РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 637 407**(13) **C1**

(51) МПК
*A61K 38/18* (2006.01)
*A61K 38/19* (2006.01)
*A61K 38/30* (2006.01)
*A61K 38/20* (2006.01)
*A61P 25/00* (2006.01)

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2016121766, 01.06.2016**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
**01.06.2016**

Дата регистрации:
**04.12.2017**

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **01.06.2016**

(45) Опубликовано: **04.12.2017** Бюл. № **34**

Адрес для переписки:
**630099, г. Новосибирск-99, ул. Ядринцевская, 14, НИИФКИ**

(72) Автор(ы):
**Шевела Екатерина Яковлевна (RU),**
**Сахно Людмила Васильевна (RU),**
**Кафанова Марина Юрьевна (RU),**
**Давыдова Мария Николаевна (RU),**
**Андрушкевич Михаил Михайлович (RU),**
**Останин Александр Анатольевич (RU),**
**Черных Елена Рэмовна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):
**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии" (НИИФКИ) (RU)**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **CHERNYKH E.R. et al. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair. Cellular Therapy and Transplantation, 2010 Vol. 2, No. 6 - 8P, abstrct, [он-лайн], [найдено 18.10.2017]. Найдено из Интернет: < URL: http://journaldatabase.info/articles/generation_properties_human_m2-like.html. МОРОЗОВ С.А. И ДР.** (см. прод.)

(54) **Способ получения кондиционной среды, обладающей регенераторным потенциалом, для интраназального введения при лечении заболеваний центральной нервной системы**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к неврологии и иммунологии, и касается способа получения кондиционной среды, вводимой пациенту интраназально. Кондиционную среду получают путем лабораторного процессинга и культивирования макрофагов 2 типа, получаемых из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови пациента или его ближайшего родственника путем культивирования в течение 7-8 суток в питательной среде, дополненной 2-3% аутологичной плазмы в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, в результате чего в кондиционную среду секретируются биоактивные факторы, выбранные из группы, включающей эритропоэтин [EPO], инсулиноподобный ростовой фактор-1 [IGF-1], интерлейкин-6 [IL-6], нейротрофический фактор головного мозга [BDNF], эпидермальный ростовой фактор [EGF], основной фактор роста фибробластов [FGF-basic]. Полученная предложенным способом кондиционная среда обладает регенераторным потенциалом при лечении функциональных расстройств центральной нервной системы и последствий органических поражений мозга. Кондиционную среду используют в виде интраназальных ингаляций по индивидуальной курсовой программе в зависимости от исходного состояния



RU 2637407 C1

RU 2637407 C1

больного и особенностей/тяжести заболевания. 2 з.п. ф-лы, 4 пр.

(56) (продолжение):
**М2-подобные макрофаги как потенциальные кандидаты в лечении последсствий церебрального инсульта // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2012, N3 (85), часть2, стр. 125-128. RU 2341270 C2, 20.12.2008. RU 2292212 C1, 27.01.2007. WO2015145370 A1, 01.10.2015.**

RU 2637407 C1

RU 2637407 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 637 407**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
*A61K 38/18* (2006.01)
*A61K 38/19* (2006.01)
*A61K 38/30* (2006.01)
*A61K 38/20* (2006.01)
*A61P 25/00* (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2016121766, 01.06.2016**

(24) Effective date for property rights:
**01.06.2016**

Registration date:
**04.12.2017**

Priority:
(22) Date of filing: **01.06.2016**

(45) Date of publication: **04.12.2017** Bull. № **34**

Mail address:
**630099, g. Novosibirsk-99, ul. Yadrintsevskaya, 14, NIIFKI**

(72) Inventor(s):
**Shevela Ekaterina Yakovlevna (RU),**
**Sakhno Lyudmila Vasilevna (RU),**
**Kafanova Marina Yurevna (RU),**
**Davydova Mariya Nikolaevna (RU),**
**Andrushkevich Mikhail Mikhajlovich (RU),**
**Ostanin Aleksandr Anatolevich (RU),**
**Chernykh Elena Removna (RU)**

(73) Proprietor(s):
**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe nauchnoe uchrezhdenie "Nauchno-issledovatelskij institut fundamentalnoj i klinicheskoj immunologii" (NIIFKI) (RU)**

# (54) METHOD OF OBTAINING CONDITIONED MEDIA WITH REGENERATIVE POTENTIAL FOR INTRANASAL INTRODUCTION IN TREATMENT OF DISEASES OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: conditioned media is obtained by laboratory processing and cultivation of type 2 macrophages obtained from the adherent fraction of peripheral blood mononuclear cells of the patient or his immediate relative by cultivation for 7-8 days in a nutrient medium supplemented with 2-3% autologous plasma in the presence of granulocyte-macrophagal colony-stimulating factor, as a result of which the bioactive factors are secreted to conditioned media, selected from the group consisting of erythropoietin [EPO], insulin-like growth factor-1 [IGF-1], interleukin-6 [IL-6], brain-derived neurotrophic factor [BDNF], epidermal growth factor [EGF], basic fibroblast growth factor [FGF-basic]. Conditioned media is used in the form of intranasal inhalations according to the individual course program, depending on the patient's initial condition and the features / severity of the disease.

EFFECT: conditioned medium obtained by the proposed method has a regenerative potential in the treatment of functional disorders of central nervous system and the consequences of organic brain damages.

3 cl, 4 ex

RU 2637407 C1

RU 2637407 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к неврологии и иммунологии, и касается способа получения кондиционной среды, вводимой пациенту интраназально. Полученная предложенным способом кондиционная среда обладает регенераторным потенциалом и может быть использована при лечении функциональных расстройств центральной нервной системы и последствий органических поражений мозга.

Коррекция функциональных расстройств ЦНС и последствий органических поражений мозга требует длительного лечения и реабилитации. Однако применение довольно обширного арсенала медикаментозных и немедикаментозных методов лечения не позволяет достичь восстановления утраченных функций нейронов головного мозга. Как правило, существующие методы лечения носят сугубо симптоматический характер. Поэтому перспективным направлением в этой области считается разработка новых подходов, направленных на усиление регенерации нервной ткани и восстановление функции поврежденных нейронов, в том числе с помощью интраназального введения биоактивных факторов.

Введение лекарственных препаратов в носовую полость (интраназальное введение) расширяет терапевтические возможности доставки лекарств в ЦНС и является альтернативой инвазивным методам. Такой способ снижает вероятность передозировки препарата и возникновения побочных эффектов, не требует специальной модификации действующих веществ, транспорт осуществляется мгновенно, в течение нескольких минут после введения. Впервые метод был предложен в 1989 для транспортировки в ткань мозга через ольфакторный и тригеминальный пути, минуя гемато-энцефалический барьер, неврологических терапевтических и диагностических препаратов (WO 9107947, A61K 9/00, 1991).

В дальнейшем была предложена целая группа патентов, в которых осуществлялась интраназальная доставка различных терапевтических или диагностических препаратов в ЦНС при различных заболеваниях головного мозга, в том числе болезни Паркинсона, Альцгеймера, ишемических инсультах и др. (AU 2014223679, A61K 39/395, 2015; WO 2006020727, A61K 31/165, 2009; EP 2089062, A61K 3149/00, 2011; US 2014057984, A61K 31/16, 2014). Сообщается также об успешных пилотных клинических испытаниях интраназально введенного инсулина у пациентов с дефицитом памяти (Spetter M.S., Hallschmid M. Intranasal neuropeptide administration to target the human brain in health and disease // Mol Pharmaceutics. - 2015. - V. 12. - P. 2767-2780). В терапии перинатальных поражений ЦНС, в частности у детей с детским церебральным параличом (ДЦП), более 15 лет используется интраназальный путь введения регуляторных пептидов (препарат «Семакс»), и за этот срок не было зарегистрировано ни одного серьезного побочного эффекта.

Нервная и иммунная системы являются основными регуляторными гомеостатическими системами организма, функционирование которых тесно взаимосвязано между собой. Установлено, что различные биоактивные факторы (цитокины, ростовые и трофические факторы, хемокины) играют определяющую роль в психонейроиммунных взаимоотношениях, поскольку как сами биоактивные факторы, так и рецепторы к ним продуцируются и экспрессируются иммунокомпетентными клетками (Т-лимфоцитами, макрофагами) и клетками нервной системы. Таким образом, обеспечивается адекватная сопряженная работа иммунной и нервной систем (Kronfol Z., Remick D.G. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry // Am J Psychiatry. - 2000. - V. 157. - P. 683-694).

Понимание роли биоактивных факторов в регенерации поврежденных нейронов послужило стимулом для разработки принципиально новых подходов в лечении

поражений ЦНС, ориентированных, с одной стороны, на купирование нейровоспаления, а с другой - на стимуляцию нейрорегенерации.

Известен способ лечения шизофрении (патент РФ 2484836, A61K 35/28, 2013), согласно которому композиционный раствор цитокинов вводят ингаляционно в виде мелкодисперсного аэрозоля по индивидуальной курсовой программе в зависимости от исходного состояния больного и особенностей/тяжести заболевания в течение до 3 мес. на фоне полной отмены психотропных препаратов. Введение цитокинов в разработанном режиме обеспечивает повышение эффективности лечения больных шизофренией, что проявляется в виде выраженной редукции психопатологической симптоматики по шкале PANSS и индукции стойкой ремиссии продолжительностью более 6 мес.

Известен способ интраназального введения препарата с провоспалительной активностью для лечения неврологических расстройств (US 2014290647, A61K 31/727, 2014). Препарат состоит из дистиллированной воды или водного раствора, гипотонического или по существу изотонического по отношению к плазме крови или, что менее предпочтительно, гипертонического по отношению к плазме крови. Препарат вводят на слизистую оболочку носа, чтобы вызвать локальное раздражение/воспаление, что приводит к стимуляции эндогенной продукции воспалительных медиаторов, включая NGF, нейротрофин-3, нейротрофин-4, серотонин, вещество P, гепарин, ECF-A. Способ предлагается для терапии и профилактики неврологических расстройств, в частности дегенеративных заболеваний центральной и периферической нервной системы.

Несмотря на то, что распыление водного раствора с различной осмолярностью на слизистую носа приводит к запуску эндогенной продукции биоактивных нейротрофических факторов (NGF, нейротрофин-3, нейротрофин-4), существенным недостатком данного способа является высокий риск эскалации воспалительных процессов в ткани мозга за счет одновременного усиления эндогенной продукции различных воспалительных медиаторов (серотонин, вещество P, гепарин, ECF-A).

Известен способ получения кондиционной среды, обладающей регенераторным потенциалом, путем лабораторного процессинга и культивирования аллогенных мезенхимальных стромальных/стволовых клеток (МСК), выделенных из аспирата костного мозга доноров (AU 2014313874, A61K 35/28, 2016). Данная кондиционная среда содержит в своем составе комплекс биоактивных факторов, выбранных из группы VEGF, TGF-b, PGE-2, PDGF, GDNF, IGFBP, FGF, GCSF M-CSF angiogenic angiopoietin, KGF, FGF7, BMP6, IGF1, laminin, MMP1, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, HGF, SDF1, LIF, IL-10. Предлагается приготавливать данную кондиционную среду в виде лекарственных форм, выбранных из группы: масляных суспензий, гидрогеля, наногеля, влажных салфеток, мазей, пластырей, гелей, лосьонов, эмульсий, кремов, спрея, капель, или любой их комбинации, и использовать локально в области дерматологии и косметологии.

Недостатком способа является необходимость поиска и рекрутирования доноров костного мозга; их предварительного тестирования для подтверждения безопасности клеточного материала; проведения у них под местной анестезией процедуры трепанобиопсии, являющейся травматичной для волонтера и достаточно трудоемкой для медперсонала; длительные сроки культивирования клеток-продуцентов.

Известен способ получения кондиционной среды, обладающей регенераторным потенциалом, путем лабораторного процессинга, включая биофизическую сортировку на микропроточном оборудовании, и культивирования аутологичных или аллогенных больших мезенхимальных стволовых клеток (large-MSC population), выделенных из аспирата костного мозга взрослого человека (WO 2015126528, C12N 5/074, 2015). Данная

кондиционная среда содержит в своем составе комплекс биоактивных факторов, а именно, IL-6, IL-8, MCP-1, EGF, VEGF, FGF1, FGF2, BMP2, ANG1, osteopontin, lgfbp2, Angptl2, Angptl3, and Angptl5, концентрация одного или более из которых выше, чем в кондиционной среде, полученной от малых мезенхимальных стволовых клеток (small-MSC population). Предлагается использовать сами клетки (large-MSC) или полученную от них кондиционную среду путем системного или локального введения с целью стимуляции тканевой репарации, а именно для стимуляции репарации костной ткани, соединительной ткани (суставного хряща, сухожилий и связок), костного мозга или сосудистой ткани.

Недостатком данного способа также является технически сложный лабораторный процессинг клеток-продуцентов, связанный с выделением, сортировкой и культивированием отдельной субпопуляции костномозговых больших мезенхимальных стволовых клеток, а также ограниченное стимулирующее действие клеток и/или получаемой кондиционной среды в отношении репарации костной/соединительной/сосудистой ткани и костного мозга.

Известен способ получения кондиционной среды, содержащей в своем составе биоактивные факторы, путем лабораторного процессинга и культивирования аллогенных адгезивных клеток, выделенных из плаценты или жировой ткани, и имеющих фенотип стромальных стволовых клеток (WO 2007108003, RU 2008141894, C12N 5/07, 2010). Согласно данному способу стромальные адгезивные клетки культивируют в 3D-биореакторе в трехмерных условиях культивирования, что способствует количественной экспансии клеток, характеризующихся более высокой иммуносупрессорной активностью, а также секрецией более высокого уровня, по меньшей мере одного фактора, выбранного из группы, состоящей из SCF, IL-6 и Flt-3, чем уровень, секретируемый адгезивными клетками плаценты или жировой ткани, выращенными в 2D культуре. Предлагается использовать указанные адгезивные клетки и/или кондиционные среды 3D-культур при различных аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваниях (болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, аутоиммунного энцефаломиелита, рассеянного склероза).

Недостатки данного способа связаны с тем, что в качестве клеток-продуцентов предлагается использовать аллогенные адгезивные клетки, выделенные из плаценты или жировой ткани, что обуславливает необходимость лабораторного тестирования для подтверждения безопасности клеточного материала. Условием получения кондиционной среды является культивирование клеток-продуцентов в условиях 3D-биореактора и что сама кондиционная среда характеризуется высокой иммуносупрессорной активностью, т.е. выполняет очень узкую задачу ингибиции аутоиммунных реакций, но не стимулирует нейрорегенераторные процессы.

В качестве прототипа предлагаемого изобретения рассматривается способ получения кондиционной среды, обладающей регенераторным потенциалом, для интраназального введения при лечении заболеваний центральной нервной системы, включающий лабораторный процессинг и культивирование клеток-продуцентов человека, секретирующих в кондиционную среду ангиогенные факторы, в том числе фактор роста эндотелия сосудов [VEGF] (WO 2015145370, A61K 35/28, 2015). В качестве клеток-продуцентов в прототипе используют пулированные, аллогенные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), выделенные из аспирата костного мозга, или из жировой ткани, или пульпы зуба, или Вартонова студня пуповины, предпочтительно из костного мозга здоровых добровольцев. Для того чтобы получить достаточное количество кондиционной среды и клеток (в диапазоне лечебных доз от 0,5 млн до 5,0 млн/кг веса больного), выделенные МСК длительно культивируют (как минимум от 21 до 42 суток)

и многократно пересевают в течение 3-6 пассажей. Клетки-продуценты в процессе своего культивирования секретируют в кондиционную среду комплекс биоактивных факторов, выбранных из группы, включающей VEGF, Angl и TGF-бета, или любой их комбинации. Полученные клетки-продуценты и/или их кондиционную среду предлагается использовать для стимуляции образования новых сосудов в ишемизированных тканях. В частности, для лечения или профилактики ишемического инсульта, ишемической кардиомиопатии, ишемии конечностей, ишемической язвы или их комбинаций. При этом полученная кондиционная среда используется топически в участки, пораженные ишемией, либо одновременно, либо последовательно с клеточной композицией. По способу-прототипу сами клетки и/или кондиционную среду приготавливают в виде препарата, выбранного из группы, включающей, в частности, водную суспензию, капли, лиофилизированного клеточного порошка или спрэя, или любые их комбинации, предпочтительно водной эмульсии.

Недостатком способа-прототипа является сложность получения кондиционной среды, т.к. в качестве клеток-продуцентов используют пулированные, аллогенные мезенхимальные стромальные клетки. Эти клетки выделяют из аспирата костного мозга нескольких здоровых добровольцев (от 3 до 10 человек), что подразумевает поиск и рекрутирование волонтеров, проведение у них под местной анестезией процедуры трепанобиопсии, являющейся травматичной. Кондиционную среду собирают на этапе стационарного (сливного) роста стабильной линии МСК, что подразумевает длительные сроки культивирования клеток-продуцентов (как минимум от 21 до 42 суток) и необходимость 3-6-кратных пассажей, что усложняет способ, и, кроме того, существенно повышает риск бактериальной контаминации клеточных культур. Длительное культивирование клеток-продуцентов требует многократного обновления питательной среды со всеми необходимыми добавками, что существенно усложняет способ. Несмотря на сложность способа получения, сама кондиционная среда содержит в своем составе биоактивные факторы (VEGF, Angl и TGF-бета), которые характеризуются, главным образом, ангиогенными свойствами, т.е. выполняет ограниченную регенераторную задачу стимуляции образования новых сосудов в ишемизированных тканях, при этом не обеспечивает нейропротекцию и не стимулирует нейрорегенераторные процессы. Также недостатком способа-прототипа является то, что для достижения лечебного эффекта кондиционная среда должна использоваться в сочетании с клетками-продуцентами (МСК), а именно либо одновременно, либо последовательно с введением клеточной композиции, что также усложняет способ.

Задачей изобретения является упрощение способа получения кондиционной среды, обладающей регенераторным потенциалом, для интраназального введения при лечении заболеваний центральной нервной системы.

Поставленная задача достигается тем, что в способе получения кондиционной среды, обладающей регенераторным потенциалом, для интраназального введения при лечении заболеваний центральной нервной системы, включающем лабораторный процессинг и культивирование клеток-продуцентов человека, секретирующих в кондиционную среду ангиогенные факторы, в том числе фактор роста эндотелия сосудов [VEGF], в качестве клеток-продуцентов используют макрофаги 2 типа, получаемые из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови пациента или его ближайшего родственника путем культивирования в течение 7-8 суток в питательной среде, дополненной 2-3% аутологичной плазмы в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, в результате чего в кондиционную среду секретируются биоактивные факторы, выбранные из группы, включающей

эритропоэтин [EPO], инсулиноподобный ростовой фактор-1 [IGF-1], интерлейкин-6 [IL-6], нейротрофический фактор головного мозга [BDNF], эпидермальный ростовой фактор [EGF], основной фактор роста фибробластов [FGF-basic], обладающие нейротрофическими и нейропротективными свойствами.

Интраназальное введение кондиционной среды осуществляют путем ингаляций в виде мелкодисперсного аэрозоля, в течение от 20 до 30 суток.

Интраназальные ингаляции проводят по индивидуальной курсовой программе в зависимости от исходного состояния больного и особенностей/тяжести заболевания.

По нашему мнению, предлагаемый способ отвечает критериям новизны изобретательского уровня.

Следует отметить, что и в способе-прототипе и в способах-аналогах (AU 2014313874, WO 2015126528, WO 2007108003) в качестве клеток-продуцентов, секретирующих в кондиционную среду различные биоактивные факторы, используют мезенхимальные стромальные/стволовые клетки. Однако с этой целью могут быть использованы и другие типы клеток, а именно макрофаги, генерированные из моноцитов периферической крови. Известно, что макрофаги играют центральную роль в заживлении различных тканей. В частности, доказано участие макрофагов в репарации нервной ткани, которое осуществляется за счет нескольких механизмов: фагоцитоза и клиренса клеточного детрита и ингибиторных молекул; инактивации токсических молекул (связывания избыточного количества глютамата); продукции цитокинов и нейротрофических факторов, обладающих нейропротективными свойствами и способных стимулировать рост аксонов, ремиелинизацию и нейрогенез; продукции хемокинов, способных рекрутировать нейрональные предшественники и Т-клетки (Donnelly D.J., Popovich P.G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury // Exp Neurol. - 2008. - V. 209. - P. 378-388; Yin Y., Cui Q., Li Y., et al. Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration // J Neurosci. - 2003. - V. 23. - P. 2284-2293; Hohlfeld R., Kerschensteiner M., Meinl E. Dual role of inflammation in CNS disease // Neurology. - 2007. - 68 (Suppl 3). - S58-S63; Kerschensteiner M., Gallmeier E., Behrens L, et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation. // J Exp Med. - 1999. - V. 189. - P. 865-870).

Биологические эффекты макрофагов могут существенно различаться в силу гетерогенности этой популяции. Наряду с «классическими» макрофагами 1 типа (Мф-1) описаны также различные типы альтернативно-активированных макрофагов 2 типа (Мф-2) (Gordon S., Taylor P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity // Nat. Rev. Immunol. - 2005. - V. 5. - P. 953-964).

Накопленный нами опыт позволил в процессе сравнительной анализа макрофагов 1 и 2 типа установить, что макрофаги 2 типа отличаются более низкой антиген-презентирующей и провоспалительной активностью и при этом характеризуются более выраженным регенераторным потенциалом за счет высокого уровня продукции в кондиционную среду целого комплекса нейротрофических, нейропротективных и ангиогенных факторов (Chernykh E.R., Shevela E.Y., Sakhno L.V., et al. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair. Cellular Therapy and Transplantation, 2010 Vol. 2, No. 6 - 8P; Sakhno L.V., Shevela E.Y., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The phenotypic and functional features of human M2 macrophages generated under low serum conditions. // Scand J Immunol. - 2016. - Vol. 83, pp. 151-159.). В частности, определение концентрации 23 цитокинов в кондиционной среде Мф-1 и Мф-2 клеток-продуцентов показала, что Мф-2 характеризуются более низким уровнем продукции

провоспалительных цитокинов и хемокинов, при этом активно секретируют эритропоэтин (EPO), а также фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), необходимый для ангио/васкулогенеза; инсулиноподобный ростовой фактор-1 (IGF-1), индуцирующий пролиферацию/дифференцировку нейронов, а также астроцитов и олигодендроцитов; IL-6, стимулирующий пролиферацию и дифференцировку клеток ЦНС и индуцирующий секрецию других нейротрофических факторов; ряд других ростовых факторов (BDNF, EGF, FGF-basic), которые могут повышать выживаемость, усиливать пролиферацию, дифференцировку/деление астроцитов, олигодендроцитов, нейронов и эндотелиальных клеток, а также стимулировать эндогенные, в том числе и нейральные прогениторные клетки.

Известны публикации, в которых также показано, что отличительными характеристиками Мф2 являются высокая способность к активации ангиогенеза и стимуляции репаративных процессов в тканях наряду с низкой антиген-презентирующей активностью (Gordon S., Taylor P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity // Nat. Rev. Immunol. - 2005. - V. 5. - P. 953-964).

Позитивный эффект Мф2 подтвержден экспериментальными исследованиями на различных моделях повреждений ЦНС несколькими группами исследователей (Rapalino O., Lazarov-Spiegler O., Agranov E., et al. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats // Nat Med. - 1998. - V. 4. - P. 814-821; Shechter R., London A., Varol C, et al. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice // PLoS Medicine. - 2009. - V. 6. - P. 1-16; Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., et al. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord // J. Neurosci. - 2009. - V. 29. - P. 13435-13444).

Кроме того, Мф2 были успешно апробированы у человека при лечении травмы спинного мозга (Knoller N., Auerbach G., Fulga V., et al. Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase I study results // J Neurosurg. - 2005. - V. 3. - P. 173-181).

Упрощение способа достигается также тем, что в качестве источника получения клеток-продуцентов вместо аспирата костного мозга используют периферическую кровь самого пациента или его ближайшего родственника, а не нескольких (от 3 до 10) волонтеров. Упрощение способа достигается также тем, что в качестве клеток-продуцентов вместо мезенхимальных стромальных клеток используются макрофаги 2 типа, которые генерируют из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови в более короткие сроки культивирования (в течение 7-8 вместо 21-42 суток), что не требует многократного пассирования. Упрощение способа достигается также тем, что для получения клеток-продуцентов не требуется многократного обновления питательной среды со всеми необходимыми добавками, поскольку дифференцировка адгезивных клеток крови (моноцитов) в макрофаги 2 типа в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора происходит в условиях дефицита ростовых/сывороточных факторов, когда питательная среда дополнена только 2-3% аутологичной плазмы.

На основе полученных нами данных предлагается изобретение, направленное на упрощение способа получения кондиционной среды, обладающей регенераторным потенциалом, для интраназального введения при лечении заболеваний ЦНС.

В современной литературе отсутствуют указания на предлагаемый способ получения кондиционной среды из-под культур макрофагов 2 типа, генерированных в условиях дефицита ростовых/сывороточных факторов, и по использованию данной кондиционной

среды в виде интраназальных ингаляций при лечении больных с функциональными расстройствами ЦНС и последствиями органических поражений мозга.

Предложенный способ получения кондиционной среды для лечения заболеваний центральной нервной системы осуществляется следующим образом.

Мф-2 генерируют из прилипающей фракции мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови пациента или его ближайшего родственника. Процедуру гемоэксфузии проводят в утренние часы. Для этого в стерильный флакон, содержащий раствор гепарина (50-70 Ед/мл), из кубитальной вены забирают кровь в объеме не более 10% объема циркулирующей крови, добавляют раствор желатиноля (в соотношении 1:5) и инкубируют 45 мин при 37°С. Полученную лейковзвесь собирают в отдельный флакон, центрифугируют при 1000 об/мин 20 мин. Содержащуюся в надосадке аутоплазму собирают для последующего использования. Осажденные клетки лейковзвеси однократно отмывают фосфат-забуференным физиологическим раствором, наслаивают на градиент плотности фиколла-верографина и центрифугируют в течение 20 мин при 3000 об/мин. Собранные из интерфазы МНК двукратно отмывают, подсчитывают количество и ресуспендируют в среде RPMI-1640, содержащей 0,05 mM 2-меркапэтанола, 2 mM пирувата натрия, 0,3 mg/ml L-глютамина, 1% раствора незаменимых аминокислот, 100 μg/ml гентамицина. В полученную питательную среду добавляют 2-3% аутоплазмы и рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека в дозе 50 нг/мл. Затем МНК в концентрации $1,5\text{-}2,5\times10^6$/мл инкубируют в течение 18-24 ч при 37°С в стерильных флаконах площадью 75 или 150 $см^2$ (Falcon), в зависимости от количества выделенных клеток. Затем фракцию неприкрепившихся к пластику клеток осторожно удаляют, центрифугируют при 1500 об/мин 7 мин, надосадок пипетируют и возвращают во флакон к оставшимся адгезивным клеткам, из которых не менее 80-90% экспрессируют CD14 - линейный маркер моноцитов. Далее клетки культивируют, не меняя питательной среды. На 7-8 сутки из-под культур Мф-2, генерированных в условиях дефицита ростовых/сывороточных факторов, собирают кондиционную среду в стерильные пенфлаконы (объемом 2 мл, или 2,5 мл, или 3 мл/флакон), которые маркируют и укупоривают.

Таким образом в предложенном способе Мф2 клетки-продуценты в процессе культивирования секретируют в кондиционную среду комплекс биоактивных факторов, выбранных из группы EPO, VEGF, IGF-1, IL-6, BDNF, EGF и FGF-basic, обладающих ангиогенными, нейротрофическими и нейропротективными свойствами.

Полученную кондиционную среду используют либо непосредственно по назначению, либо хранят в течение продолжительного времени в определенных условиях. Например, если предполагается использование кондиционной среды в течение одной недели, то ее хранят холодильнике при температуре около 3-4°С. При сроках использования более чем через одну неделю ее замораживают и хранят при температуре -20°С и ниже. Перед употреблением среду размораживают при комнатной температуре.

Полученную кондиционную среду вводят в виде мелкодисперсного аэрозоля интраназально с помощью компрессионного ингалятора (небулайзера) по 2 мл, или 2,5 мл, или 3 мл от 1 до 2 раза в сутки по индивидуальной курсовой программе в течение от 20 до 30 дней. Введение кондиционной среды указанным способом обеспечивает более эффективную доставку биоактивных факторов к слизистой обонятельных зон, локализованных в верхней трети носовых ходов. При этом локальное введение кондиционной среды в виде интраназальных ингаляций не требует сочетанного введения клеток-продуцентов.

Пациента обучают обращению с небулайзером и правильному дыханию. Первые

несколько ингаляций проводят под контролем врача. Терапевтическую дозу кондиционной среды (от 2 до 3 мл) распыляют интраназально с помощью специальной насадки.

Кондиционные среды данного изобретения могут быть использованы в чистом виде при лечении пациента. Кроме того, по решению лечащего врача кондиционные среды могут быть использованы в сочетании с любым другим способом лечения/реабилитации больных с функциональными расстройствами ЦНС и последствиями органических поражений мозга.

Приведенные ниже примеры конкретной реализации способа иллюстрируют различные аспекты данного изобретения и не могут быть истолкованы как ограничение изобретения.

Пример 1

Пациент С., 62 г., госпитализирован 02.11.2015 г. с диагнозом: ранний восстановительный период ишемического инсульта в бассейне левой среднемозговой артерии (от 31.05.2015 г.), легкий правосторонний гемипарез, сенсорная, моторная афазия, алексия. NIHSS 7б.

Из анамнеза: на фоне атеросклероза брахиоцефальных артерий со стенозом левой внутренней сонной артерии (ВСА) до 25% и артериальной гипертензии, 31.05.2015 г. случился ишемический инсульт в бассейне левой среднемозговой артерии с правосторонним гемипарезом и тотальной афазией. Получал курсы стационарного лечения, проводилась амбулаторная реабилитация, вследствие которых удалось получить положительную динамику в виде уменьшения пареза и некоторого улучшения речи (стал произносить отдельные слова, частично понимать обращенную речь).

На момент обращения (через 5 мес. после инсульта) сохраняется легкий правосторонний гемипарез, сенсорная, моторная афазия, алексия. Жалобы на умеренные головную боль и головокружение, нарушение функции ходьбы, слабость в правых конечностях, грубые речевые нарушения (произносил отдельные слова, затруднялся в восприятии чужой речи), нарушение чтения (алексия), шум в голове, выраженную утомляемость, затруднение в самообслуживании (требовалась помощь в принятии ванны, приготовлении еды).

Неврологический статус: Зрачки D=S. Фотореакция сохранена. Конвергенция отсутствует. Центральный парез лицевого нерва справа. Язык девиирует вправо. Афазия: сенсорная, моторная. Алексия. Тонус в правых конечностях повышен по пирамидному типу (1 балл). Сила в правой руке проксимально 4 балла, в кисти - 3 балла, в ноге - 4 балла, слева - в норме. Легкий тремор в правой руке. Сухожильные рефлексы живые, D>S. Рефлекс Бабинского справа, Маринеску-Радовичи с 2-х сторон. В позе Ромберга устойчив. Пальце-носовую пробу (ПНП) выполняет справа неуверенно. Гемигипестезия справа. Когнитивное снижение (речь, память, чтение).

Выраженность неврологического дефицита по шкале NIHSS - 7 баллов, оценка инструментальной деятельности в повседневной жизни (по шкале IADL) - 12 баллов, двигательная активность - 28 баллов (умеренное нарушение), индекс активности повседневной жизни Бартел - 85 баллов, оценка мышечной силы по шкале Эшворта - 1 балл, субъективная оценка основных симптомов клинического синдрома болезни - 23 балла.

Кондиционную среду, полученную по заявляемому способу от аутологичных Мф2, вводили в виде мелкодисперсного аэрозоля интраназально с помощью небулайзера по 2 мл, ежедневно, курсом 28 дней. Через 1 мес после окончания лечения у пациента регрессировали головные боли, уменьшилась интенсивность головокружения,

улучшилась походка, увеличилась сила в правых конечностях, уменьшились речевые нарушения (практически полностью понимает обращенную речь, произносит отдельные предложения, сложные слова), уменьшились шум в голове и общая слабость.

В неврологическом статусе: увеличилась сила в правых конечностях на 0,5 балла, нормализовался тонус в правых конечностях, регрессировали нарушения чувствительности справа, уменьшился тремор в правой руке.

Выраженность неврологического дефицита по шкале NIHSS - 5 баллов, оценка инструментальной деятельности в повседневной жизни (шкала IADL) - 13 баллов, двигательная активность - 36 баллов, индекс активности повседневной жизни Бартел - 90 баллов, оценка мышечной спастичности по шкале Эшворта - 0 баллов, субъективная оценка основных симптомов клинического синдрома болезни - 14 балла.

В результате лечения улучшилась двигательная активность, что позволило пациенту самостоятельно длительно прогуливаться по улице; практически восстановилось самообслуживание: может готовить при наличии нужных ингредиентов, самостоятельно принимает ванну, помощь требуется только при бритье. Улучшение речевых функций привело к нормализации эмоционального фона пациента и восстановлению коммуникационных возможностей с членами его семьи.

Пример 2

Пациент Ф., 3,5 г. Клинический диагноз: детский церебральный паралич, гемипаретическая форма слева, поздняя резидуальная стадия. Вторичная микроцефалия. Задержка психомоторного и речевого развития. Симптоматическая фокальная эпилепсия, ремиссия.

Жалобы при обращении: на задержку психомоторного и речевого развития: самостоятельно не садится, не стоит, не ходит, нарушено движение в верхних конечностях (грубее слева), обращенную речь понимает, но не говорит. Постоянно получает депакин-хроносфера, 200 мг в сутки.

Неврологический статус: череп микроцефальной формы, окружность головы 44,5 см. Глазные щели равные, зрачки равные, фотореакция сохранена. Взгляд не фиксирует, непостоянное сходящееся косоглазие. Язык в полости рта по средней линии. Слюнотечение, пищу глотает, жует. Сухожильные рефлексы вызываются в полном объеме, высокие, тонус повышен, больше слева. Справа опора на полную стопу, слева на носочек. Работает правой рукой, левой нет. Сам не ползает, не стоит, не ходит. Слушает музыку, улыбается. Речь не сформирована.

Оценка спастичности по шкале Эшворта - 4 балла, оценка мышечной силы Британского совета медицинских исследований - 1 балл.

Мф2 генерировали из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови матери. Кондиционную среду, полученную по заявляемому способу от аллогенных Мф2, вводили в виде мелкодисперсного аэрозоля интраназально с помощью небулайзера по 2,5 мл, 2 раза/день, ежедневно, курсом 20 дней.

Через 1 месяц в неврологическом статусе отмечается снижение тонуса и увеличение мышечной силы. Оценка спастичности по шкале Эшворта - 1 балл, оценка мышечной силы Британского совета медицинских исследований - 4 балла. Стал понимать обращенную речь. Через 2 месяца: череп увеличился в размерах на 0,5 см. Взгляд фиксирует кратковременно, косоглазия нет. Купировалось слюнотечение, глотает, фонирует. Сухожильные рефлексы вызываются в полном объеме, не оживлены. Сидит без поддержки, переворачивается, встает у опоры, ходит с поддержкой. Через 3 месяца после проведенного лечения: дальнейшее уменьшение тонуса и спастики, стал повторять фразы и стихи. Родители оценивают результат курсового лечения как эффективный.

Пример 3

Пациентка М., 23 г., в 2010 г. перенесла тяжелую черепно-мозговую травму вследствие ДТП. Множество очагов ушиба в правой темпоральной области. Постгипоксическая энцефалопатия. Посттравматическая гидроцефалия. Посттравматическая эпилепсия. Стволовой синдром. Квадрипарез. Состояние после трахеостомии и продолжительной искусственной вентиляции легких. Состояние после перелома правой лучевой кости, таза, правой бедренной кости, остеосинтеза правой бедренной кости. Состояние после перенесенного сепсиса. Оперирована в объеме установки вентрикуло-перитонеального шунта (ВПШ) слева.

Проводились курсы стационарного восстановительного лечения, массаж и противосудорожная терапия. Отмечалась незначительная динамика.

На момент осмотра (через 4 года после травмы) предъявляет жалобы на отсутствие самообслуживания, невозможность глотать твердую и жидкую пищу (кормление через гастростому), повышенный мышечный тонус, выраженную спастику в руках и ногах. Обращенную речь понимает, говорит отдельные слова, медленно и тихо. Эмоции не контролирует. Чувствительность и координационные пробы определить невозможно. Себя не обслуживает, не сидит, не стоит, не ходит.

Клинический диагноз на момент обращения: Травматическая болезнь головного мозга. Посттравматическая гидроцефалия в стадии субкомпенсации, состояние после ВПШ слева. Симптоматическая эпилепсия. Спастический тетрапарез. Частичная атрофия зрительного нерва. Сопутствующий диагноз: Состояние после трахеостомии. Носитель гастростомы.

В неврологическом статусе: Сознание ясное, обращенную речь понимает, говорит отдельные слова, с трудом. Положение вынужденное, себя не обслуживает из-за грубого спастического тетрапареза (больше в руках и больше справа, по типу гемиплегии). Зрачки средней величины, D=S, фотореакция хорошая, расходящееся косоглазие, глазами следит за предметами. Рефлексы с рук и ног повышены, D=S, с расширением зон вызывания. По данным мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) головного мозга: Наружно-внутренняя гидроцефалия, состояние после ВПШ слева.

Кондиционную среду, полученную по заявляемому способу от аутологичных Мф2, вводили в виде мелкодисперсного аэрозоля интраназально с помощью небулайзера по 2,5 мл, 1 раз в день, ежедневно, курсом 25 дней.

Через 1 месяц после окончания лечения отмечается улучшение речи - стала лучше и четче произносить слова, появилась фразовая речь. Уменьшилась спастика, появилась двигательная активность. Начала сидеть без опоры, переворачиваться, стоять в вертикализаторе. Стала лучше глотать твердую пищу, кормление через рот, но «допаивается» через гастростому. Отмечается положительная динамика в эмоциональной сфере: появилась ответная реакция на шутки, лучше контролирует эмоции. Со слов родственников, значительно облегчился уход за пациенткой.

Пример 4

Пациент Ш., 6 лет. Клинический диагноз: Церебральная ишемия I степени, синдром гипервозбудимости, синдром пирамидной недостаточности в ногах. В 2 мес был госпитализирован в инфекционную больницу с подозрением на бронхит. Диагноз не подтвердился, однако произошло инфицирование синегнойной палочкой, приведшее к развитию судорожного синдрома и комы, продолжавшейся 4 дня. Дальнейшее физическое развитие проходило в соответствии с возрастом. Посещал ясли. К 3,5 годам стало очевидным наличие задержки в развитии речи: ребенок говорил только отдельные слова («мама», «папа», «жук», «космос» и т.д.), фразовая речь отсутствовала. Стал

замыкаться, особенно по отношению к незнакомым людям (делал вид, что их нет). При этом любил играть с конструктором Лего, собирать пазлы и рисовать. Однако пазлы и рисунки были исключительно на «космическую» тему (глобус, планеты и т.д.).

Электроэнцефалография (ЭЭГ): Фоновая ЭЭГ - без патологии. Диффузная эпиактивность в фазе медленного сна (ФМС).

Компьютерная томография (КТ) головного мозга: Мелкая венозная ангиома в левой теменно-затылочной области на фоне множественных расширенных периваскулярных пространств. Начальные проявления внутричерепной гипертензии.

Глазное дно: Ангиопатия сетчатки обоих глаз.

Мф2 генерировали из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови матери. Кондиционную среду, полученную по заявляемому способу от аллогенных Мф2, вводили в виде мелкодисперсного аэрозоля интраназально с помощью небулайзера по 2,5 мл, 1 раз/день, ежедневно, в течение 30 дней.

Через 1 месяц родители ребенка отметили улучшение контакта с людьми, более адекватное проявление эмоций (и лицом, и жестами), более адекватное использование игрушек, более быстрое реагирование на звуки. Наиболее значительным результатом лечения можно считать появление фразовой речи - от достаточно простых фраз («Покажи мне», «Я хочу пить»), до более сложных («О боже, что с вами поделать!»). Стал заучивать стихи. Еще один яркий позитивный симптом, появившийся после лечения, связан с появлением новых тем для рисования (стал рисовать дома, героев мультфильмов). В настоящее время ребенок каждый день ходит в детский сад (на несколько часов) и занимается с логопедом (5 раз в неделю), который также отмечает положительные сдвиги в психо-речевом развитии ребенка.

Приведенные примеры представлены для иллюстрации, но не для ограничения объема заявленного изобретения. Другие варианты изобретения будут полностью очевидны специалистам в данной области и охватываются прилагаемой формулой изобретения

Данное изобретение предлагает достаточно простой способ получения кондиционной среды, обладающей регенераторным потенциалом, для интраназального введения при лечении заболеваний центральной нервной системы. Способ максимально упрощает лабораторный процессинг по выделению клеток-продуцентов и сокращает сроки их культивирования. Полученная по заявленному способу кондиционная среда содержит в своем составе комплекс биоактивных факторов, обладающих не только ангиогенными, но и нейротрофическими и нейропротективными свойствами. Введение кондиционной среды в виде интраназальных ингаляций является простым и нетравматичным, при этом повышается эффективность проникновения комплекса биоактивных факторов в центральную нервную систему.

Литература

1. Spetter M.S., Hallschmid M. Intranasal neuropeptide administration to target the human brain in health and disease // Mol Pharmaceutics. - 2015. - V. 12. - P. 2767-2780.

2. Kronfol Z., Remick D.G. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. // Am J Psychiatry. - 2000. - V. 157. - P. 683-694.

3. Donnelly D.J., Popovich P.G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury // Exp Neurol. - 2008. - V. 209. - P. 378-388.

4. Yin Y., Cui Q., Li Y., et al. Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration // J Neurosci. - 2003. - V. 23. - P. 2284-2293.

5. Hohlfeld R., Kerschensteiner M., Meinl E. Dual role of inflammation in CNS disease // Neurology. - 2007. - 68 (Suppl 3). - S58-S63.

6. Kerschensteiner M., Gallmeier E., Behrens L., et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation. // J Exp Med. - 1999. - V. 189. - P. 865-870.

7. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity // Nat. Rev. Immunol. - 2005. - V. 5. - P. 953-964.

8. Chernykh E.R., Shevela E.Y., Sakhno L.V., et al. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair. Cellular Therapy and Transplantation, 2010 Vol. 2, No. 6 - 8 P.

9. Sakhno L.V, Shevela E.Y., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The phenotypic and functional features of human M2 macrophages generated under low serum conditions. // Scand J Immunol. - 2016. - Vol. 83, pp. 151-159.

10. Rapalino O., Lazarov-Spiegler O., Agranov E., et al. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats // Nat Med. - 1998. - V. 4. - P. 814-821.

11. Shechter R., London A., Varol C., et al. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice // PLoS Medicine. - 2009. - V. 6. - P. 1-16.

12. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., et al. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord // J. Neurosci. - 2009. - V. 29. - P. 13435-13444.

13. Knoller N., Auerbach G., Fulga V., et al. Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase I study results // J Neurosurg. - 2005. - V. 3. - P. 173-181.

## (57) Формула изобретения

1. Способ получения кондиционной среды, обладающей регенераторным потенциалом, для интраназального введения при лечении заболеваний центральной нервной системы, включающий лабораторный процессинг и культивирование клеток-продуцентов человека, секретирующих в кондиционную среду ангиогенные факторы, в том числе фактор роста эндотелия сосудов [VEGF], отличающийся тем, что в качестве клеток-продуцентов используют макрофаги 2 типа, получаемые из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови пациента или его ближайшего родственника путем культивирования в течение 7-8 суток в питательной среде, дополненной 2-3% аутологичной плазмы в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, в результате чего в кондиционную среду секретируются биоактивные факторы, выбранные из группы, включающей эритропоэтин [EPO], инсулиноподобный ростовой фактор-1 [IGF-1], интерлейкин-6 [IL-6], нейротрофический фактор головного мозга [BDNF], эпидермальный ростовой фактор [EGF], основной фактор роста фибробластов [FGF-basic], обладающие нейротрофическими и нейропротективными свойствами.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что интраназальное введение кондиционной среды осуществляют путем ингаляций в виде мелкодисперсного аэрозоля, в течение от 20 до 30 суток.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что интраназальные ингаляции проводят по индивидуальной курсовой программе в зависимости от исходного состояния больного и особенностей/тяжести заболевания.