(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115484966 A
(43)申请公布日 2022.12.16

(21)申请号 202180027573.1
(22)申请日 2021.02.09
(30)优先权数据
62/972,330 2020.02.10 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/017220 2021.02.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/163037 EN 2021.08.19
(71)申请人 华盛顿大学
地址 美国华盛顿州
申请人 范德比尔特大学
(72)发明人 比约恩·科诺尔曼
罗伯特·斯科特·蒂斯
威廉·罗伯特·梅克莱兰
肯塔·纳卡穆拉
查尔斯·E·莫里
(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 11290
专利代理师 王芬 张淑珍
(51)Int.Cl.
A61K 35/34(2015.01)
C12N 5/073(2010.01)
C12N 5/074(2010.01)
A61K 35/545(2015.01)
A61P 9/02(2006.01)
A61P 9/06(2006.01)

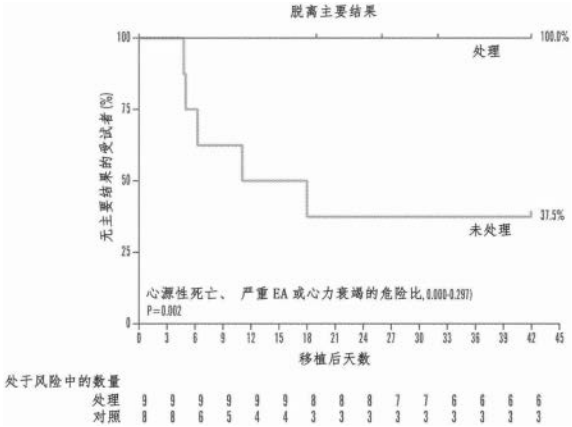
权利要求书3页 说明书35页 附图34页

(54)发明名称

治疗和预防植入性心律失常的方法

(57)摘要

本文描述了与用有效量的胺碘酮和伊伐布雷定治疗和预防植入性心律失常有关的方法和组合物。本文还描述了心肌细胞移植的方法,所述方法包括:将体外分化的心肌细胞给予至有需要的受试者的心脏组织;以及给予所述受试者一定量的胺碘酮和一定量的伊伐布雷定以有效减少受试者中的植入性心律失常。



CN 115484966 A

1.一种治疗或改善接受心肌细胞的心脏移植物的受试者中的植入性心律失常的方法，所述方法包括给予所述受试者有效量的胺碘酮和有效量的伊伐布雷定。

2.如权利要求1所述的方法，其中，所述心肌细胞的心脏移植物包含体外分化的心肌细胞。

3.如权利要求2所述的方法，其中，所述体外分化的心肌细胞从诱导多能干(iPS)细胞或从胚胎干(ES)细胞分化而来。

4.如权利要求1-3中任一项所述的方法，其中，所述心肌细胞的心脏移植物来源于所述受试者的自体干细胞。

5.如权利要求1-3中任一项所述的方法，其中，所述心肌细胞的心脏移植物来源于所述受试者的同种异体干细胞。

6.如权利要求1-5中任一项所述的方法，其中，胺碘酮和伊伐布雷定与所述心肌细胞的心脏移植物同时给予。

7.如权利要求1-5中任一项所述的方法，其中，在给予所述心肌细胞的心脏移植物之前开始胺碘酮的给予。

8.如权利要求1-5中任一项所述的方法，其中，在给予所述心肌细胞的心脏移植物之前开始伊伐布雷定的给予。

9.如权利要求1-5中任一项所述的方法，其中，在给予所述心肌细胞的心脏移植物之前开始胺碘酮和伊伐布雷定两者的给予。

10.如权利要求1-5中任一项所述的方法，其中，在给予所述心肌细胞的心脏移植物的同时或之后开始伊伐布雷定的给予。

11.如权利要求1-5中任一项所述的方法，其中，在给予所述心肌细胞的心脏移植物的同时或之后开始胺碘酮的给予。

12.如权利要求1-11中任一项所述的方法，其中，胺碘酮的给予为单次推注给予。

13.如权利要求1-11中任一项所述的方法，其中，所述给予为连续给予或重复给予。

14.如权利要求1-13中任一项所述的方法，其中，所述给予为口服给予和/或静脉内注射。

15.如权利要求1-14中任一项所述的方法，其中，以100-800mg的剂量口服给予胺碘酮，每天3次。

16.如权利要求1-14中任一项所述的方法，其中，以100-300mg的剂量通过IV推注给予胺碘酮。

17.如权利要求1-15中任一项所述的方法，其中，以1.5-2.5μg/mL的血清浓度给予胺碘酮。

18.如权利要求1-17中任一项所述的方法，其中，以5-15mg的剂量口服给予伊伐布雷定，每天两次。

19.如权利要求1-18中任一项所述的方法，其中，在存在心动过速时给予伊伐布雷定。

20.如权利要求1-19中任一项所述的方法，其中，给予伊伐布雷定以维持小于或等于150次搏动/分钟(bpm)的静息心率。

21.如权利要求1-20中任一项所述的方法，其中，相对于接受相同类型细胞的移植物但未有胺碘酮和伊伐布雷定给予的受试者，胺碘酮和伊伐布雷定的给予将移植物接受者经历

的移植后加速心率降低至少10％。

22.如权利要求1-21中任一项所述的方法，其中，相对于接受相同类型的心肌细胞的心脏移植物但未有胺碘酮和伊伐布雷定给予的受试者，胺碘酮和伊伐布雷定的给予使所述受试者经历植入性心律失常的时间比例减少至少10％。

23.如权利要求1-22中任一项所述的方法，其中，胺碘酮和伊伐布雷定的给予为短期的。

24.如权利要求1-22中任一项所述的方法，其中，在植入性心律失常负荷达到零后终止胺碘酮和伊伐布雷定的给予，而心律失常没有复发。

25.一种心肌细胞移植的方法，所述方法包括：

a)将体外分化的心肌细胞给予至有需要的受试者的心脏组织；

b)给予所述受试者一定量的胺碘酮和一定量的伊伐布雷定，以有效减少所述受试者的植入性心律失常。

26.如权利要求25所述的方法，其中，相对于接受体外分化的心肌细胞而未接受胺碘酮和伊伐布雷定的受试者，所述受试者的植入性心律失常减少。

27.如权利要求25或26所述的方法，其中，所述体外分化的心肌细胞由胚胎干细胞或由iPS细胞在体外分化而来。

28.如权利要求27所述的方法，其中，所述iPS细胞对于所述受试者而言为自体的。

29.如权利要求27所述的方法，其中，所述iPS细胞对于所述受试者而言为同种异体的。

30.如权利要求25-29中任一项所述的方法，其中，胺碘酮和伊伐布雷定与所述体外分化的心肌细胞同时给予。

31.如权利要求25-29中任一项所述的方法，其中，在给予所述体外分化的心肌细胞之前开始胺碘酮的给予。

32.如权利要求25-29中任一项所述的方法，其中，在给予所述体外分化的心肌细胞之前开始伊伐布雷定的给予。

33.如权利要求25-29中任一项所述的方法，其中，在给予所述体外分化的心肌细胞之前开始胺碘酮和伊伐布雷定两者的给予。

34.如权利要求25-29中任一项所述的方法，其中，在给予所述体外分化的心肌细胞的同时或之后开始伊伐布雷定的给予。

35.如权利要求25-29中任一项所述的方法，其中，在给予所述体外分化的心肌细胞的同时或之后开始胺碘酮的给予。

36.如权利要求25-35中任一项所述的方法，其中，伊伐布雷定的给予为单次推注给予。

37.如权利要求25-36中任一项所述的方法，其中，所述给予为连续给予或重复给予。

38.如权利要求25-37中任一项所述的方法，其中，所述给予为口服给予和/或静脉内(IV)注射。

39.如权利要求25-38中任一项所述的方法，其中，以100-800mg的剂量口服给予胺碘酮，每天3次。

40.如权利要求25-39中任一项所述的方法，其中，以100-300mg的剂量通过IV推注给予胺碘酮。

41.如权利要求25-40中任一项所述的方法，其中，以1.5-2.5μg/mL的血清浓度给予胺

碘酮。

42.如权利要求25-41中任一项所述的方法,其中,以5-15mg的剂量口服给予伊伐布雷定,每天两次。

43.如权利要求25-42中任一项所述的方法,其中,当存在心动过速时给予伊伐布雷定。

44.如权利要求25-43中任一项所述的方法,其中,给予伊伐布雷定以维持小于或等于150次搏动每分钟(bpm)的静息心率。

45.如权利要求25-44中任一项所述的方法,其中,胺碘酮和伊伐布雷定的给予为短期的。

46.如权利要求25-45中任一项所述的方法,其中,在植入性心律失常负荷达到零后终止胺碘酮和伊伐布雷定的给予,而心律失常没有复发。

47.如权利要求1-46中任一项所述的方法,其中,将约1000万个心肌细胞至约100亿个心肌细胞给予所述受试者。

48.如权利要求1-47中任一项所述的方法,其中,所述受试者为人。

49.如权利要求1-48中任一项所述的方法,其中,所述受试者具有心血管疾病或心脏事件或者处于具有心血管疾病或心脏事件的风险中。

50.如权利要求49所述的方法,其中,所述心血管疾病或所述心脏事件选自于由如下所组成的组:动脉粥样硬化性心脏病、心肌梗死、心肌病、心脏心律失常、瓣膜狭窄、先天性心脏疾病、慢性心力衰竭、反流、缺血、纤颤和多形性室性心动过速。

51.一种组合物,所述组合物包含体外分化的心肌细胞、胺碘酮和伊伐布雷定。

治疗和预防植入性心律失常的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C.§119(e),本申请要求2020年2月10日提交的美国临时申请No.62/972,330的权益,以引用的方式将其内容整体并入本文。

技术领域

[0003] 本文所述的技术涉及治疗心血管疾病的方法。

背景技术

[0004] 心血管疾病仍然是全世界男性和女性死亡的主要原因,对发展中国家的影响迅速增长。心肌细胞替代疗法是治疗心血管疾病的一个积极研究领域,可在心肌梗死后恢复心脏功能。体外培养的人干细胞可用作生产人心肌细胞的起始材料,用于植入到受伤的心脏中。然而,存在与心脏植入有关的并发症,其中之一是体外分化的心肌细胞缺乏成熟度,可导致发生一过性的心脏心律失常。需要预防和治疗由心脏移植物引起的心律失常的方法,以改善心肌细胞替代疗法后的患者预后。

发明内容

[0005] 本文所述的方法部分地与以下发现相关:胺碘酮和伊伐布雷定治疗的组合改善接受心脏移植物的受试者的存活并降低心律失常负荷。本文所述的方法减少了短暂的移植物相关心律失常,并显著提高了用这两种抗心律失常药剂治疗的受试者的安全性和存活。

[0006] 在一个方面,本文描述了治疗或改善接受心肌细胞心脏移植物的受试者中的植入性心律失常的方法,所述方法包括给予所述受试者有效量的胺碘酮和有效量的伊伐布雷定。

[0007] 在这个或任何其他方面的一个实施方式中,心肌细胞的心脏移植物包含体外分化的心肌细胞。在另一实施方式中,所述体外分化的心肌细胞从诱导多能干(iPS)细胞或从胚胎干(ES)细胞分化而来。

[0008] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,心肌细胞的心脏移植物来源于受试者的自体干细胞。

[0009] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,心肌细胞的心脏移植物来源于受试者的同种异体干细胞。

[0010] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,胺碘酮和伊伐布雷定与心肌细胞的心脏移植物同时给予。

[0011] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,在给予心肌细胞移植物之前开始给予胺碘酮。在一个实施方式中,给予可在例如移植之前1天、移植之前2天、移植之前3天、移植之前4天、移植之前5天、移植之前6天、或移植之前7天以上。

[0012] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,在给予心肌细胞移植物之前开始给予伊伐布雷定。在一个实施方式中,给予可在例如移植之前1天、移植之前2天、移植之前3天、

移植之前4天、移植之前5天、移植之前6天、或移植之前7天以上。

[0013] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，在给予心肌细胞的心脏移植物之前开始给予胺碘酮和伊伐布雷定二者。在一个实施方式中，给予可在例如移植之前1天、移植之前2天、移植之前3天、移植之前4天、移植之前5天、移植之前6天、或移植之前7天以上。在另一实施方式中，胺碘酮可以比伊伐布雷定更早给予，例如早1天、2天、3天、4天、5天或6天。

[0014] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，在给予心肌细胞的心脏移植物的同时或之后开始给予伊伐布雷定。

[0015] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，在给予心肌细胞的心脏移植物的同时或之后开始给予胺碘酮。

[0016] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，胺碘酮的给予为单次推注给予。

[0017] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，给予为连续给予或重复给予。

[0018] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，给予为口服给予和/或静脉内注射。

[0019] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，以100-800mg的剂量口服给予胺碘酮，每天3次。

[0020] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，以100-300mg的剂量通过IV推注给予胺碘酮。

[0021] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，胺碘酮以1.5-2.5μg/mL的血清浓度给予。

[0022] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，以5-15mg的剂量口服给予伊伐布雷定，每天两次。

[0023] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，当存在心动过速时给予伊伐布雷定。

[0024] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，给予伊伐布雷定以维持小于或等于每分钟150次搏动(bpm)的静息心率。在另一实施方式中，给予伊伐布雷定以维持60-150bpm的静息心率，例如60-140bpm、60-130bpm、60-120bpm、60-110bpm、60-100bpm、60-90bpm或60-80bpm。

[0025] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，相对于在没有胺碘酮和伊伐布雷定给予的情况下接受相同类型细胞移植物的受试者，给予胺碘酮和伊伐布雷定将移植物接受者经历的移植后加速的心率降低至少10％。

[0026] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，相对于在没有胺碘酮和伊伐布雷定给予的情况下接受相同类型的心肌细胞移植物的受试者，给予胺碘酮和伊伐布雷定使受试者经历植入性心律失常的时间比例减少至少10％。在另一实施方式中，使受试者经历植入性心律失常的时间比例减少至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或更多。

[0027] 在另一方面，本文描述了心肌细胞移植的方法，所述方法包括：a)将体外分化的心肌细胞给予至有需要的受试者的心脏组织；以及b)给予所述受试者一定量的胺碘酮和一定量的伊伐布雷定以有效减少所述受试者中的植入性心律失常。

[0028] 在这个或任何其他方面的一个实施方式中，相对于接受体外分化的心肌细胞而未接受胺碘酮和伊伐布雷定的受试者，使受试者中的植入性心律失常减少。

[0029] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中，体外分化的心肌细胞从胚胎干细胞或

从iPS细胞在体外分化而来。

[0030] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,iPS细胞对于受试者为自体的。

[0031] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,iPS细胞对于受试者为同种异体的。

[0032] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,胺碘酮和伊伐布雷定与体外分化的心肌细胞同时给予。

[0033] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,在给予体外分化的心肌细胞之前开始给予胺碘酮。

[0034] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,在给予体外分化的心肌细胞之前开始给予伊伐布雷定。

[0035] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,在给予体外分化的心肌细胞之前开始给予胺碘酮和伊伐布雷定两者。

[0036] 在这个或任何其他方面的另一个实施方式中,在给予体外分化的心肌细胞的同时或之后开始给予伊伐布雷定。

[0037] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,在给予体外分化的心肌细胞的同时或之后开始给予胺碘酮。

[0038] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,伊伐布雷定的给予为单次推注给予。

[0039] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,给予为连续给予或重复给予。

[0040] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,胺碘酮和伊伐布雷定的给予为短期的。

[0041] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,在植入性心律失常负荷达到零后终止胺碘酮和伊伐布雷定的给予,心律失常没有复发。

[0042] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,给予为口服给予和/或静脉内(IV)注射。

[0043] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,以100-800mg的剂量口服给予胺碘酮,每天3次。

[0044] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,以100-300mg的剂量通过IV推注给予胺碘酮。

[0045] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,胺碘酮以1.5-2.5μg/mL的血清浓度给予。

[0046] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,以5-15mg的剂量口服给予伊伐布雷定,每天两次。

[0047] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,当存在心动过速时给予伊伐布雷定。

[0048] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,给予伊伐布雷定以维持小于或等于每分钟搏动150次(bpm)的静息心率。

[0049] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,将约1000万个心肌细胞至约100亿个心肌细胞给予受试者。

[0050] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,所述受试者为人。

[0051] 在这个或任何其他方面的另一实施方式中,所述受试者具有心血管疾病或心脏事件或者处于具有心血管疾病或心脏事件的风险中。在另一实施方式中,所述心血管疾病或

心脏事件选自于由如下所组成的组:动脉粥样硬化性心脏病、心肌梗死、心肌病、心脏心律失常、瓣膜狭窄、先天性心脏疾病、慢性心力衰竭、反流、缺血、纤颤和多形性室性心动过速。

[0052] 在另一方面,本文描述了组合物,所述组合物包含体外分化的心肌细胞、胺碘酮和伊伐布雷定。

附图说明

[0053] 图1A-图1B表明,与接受心脏移植物的未处理的猪相比,胺碘酮和伊伐布雷定疗法降低了接受心脏移植物的猪的心率和心律失常负荷。图1A显示了与未处理的猪(白色圆圈,无抗心律失常药,n=6)相比,接受胺碘酮/伊伐布雷定处理的猪(黑色方块,胺碘酮±伊伐布雷定,n=6)在植入疗法过程(天)中的平均心率。图1B显示了在植入疗法过程(天)中,与未处理的猪(白色圆圈,无抗心律失常药,n=6)相比,观测到的接受胺碘酮/伊伐布雷定处理的猪(黑色方块,胺碘酮±伊伐布雷定,n=6)的平均心律失常时间百分比。

[0054] 图2显示了具有心脏移植物的经处理猪(黑色实线,胺碘酮±伊伐布雷定,n=6)和未处理猪(虚线,无抗心律失常药,n=6)的心脏存活百分比。

[0055] 图3-图14显示了在存在和不存在胺碘酮/伊伐布雷定处理的情况下接受心脏移植物的每只个体猪的心率和%心律失常。心率报告为每分钟搏动数,在图中左侧垂直轴上以灰色表示。心律失常负荷报告为心律失常与正常窦性心律相比的百分比时间,由右侧垂直轴上的黑色圆圈表示。

[0056] 用抗心律失常药剂处理的猪示于图3-图8中。每个图表顶部处的黑色条表示胺碘酮处理,而有格子图案的条表示伊伐布雷定处理。

[0057] 图9-图14中显示了接受心脏移植物但未接受抗心律失常处理的猪。

[0058] 图15显示了猪(猪(swine))和人的抗心律失常方案剂量的实施方式。BID:每天两次;PO:口服给药。

[0059] 图16显示了研究设计的流程图。阶段1由9头受试者组成,其中4头用于研究植入性心律失常(EA)的自然病程,5头用于筛选七种候选抗心律失常药剂。发现胺碘酮和伊伐布雷定具有有期望的效果迹象,并有待进一步研究。阶段2由共19头受试者组成:9头被分配至胺碘酮和伊伐布雷定处理,8头分配至不处理,2头分配至有以假手术移植引起的梗死并且无抗心律失常药物处理。

[0060] 图17显示了长期胺碘酮和辅助伊伐布雷定疗法的阶段2药物试验的研究时间表。在人胚胎干细胞来源的心肌细胞移植(第0天)前两周,由左前降支动脉中段的90分钟球囊阻塞诱导心肌梗死(MI)。所有受试者均接受多药免疫抑制。处理同期群接受联合口服胺碘酮和辅助口服伊伐布雷定的速率和节律控制。

[0061] 图18显示了猪的血浆胺碘酮水平。通过液相色谱-质谱法测定对血浆中的胺碘酮水平进行测量。在达到电成熟和植入性心律失常稳定后,停用六头猪的长期口服胺碘酮。每周测定胺碘酮的血清浓度,包括停药后3-4周。

[0062] 图19显示了单头猪中植入性心律失常(EA)的可变形态。在这头猪(受试者12)中观测到正常窦性心律(NSR)和类似于加速交接区心律(AJR)、室性心动过速(VT)和加速性心室自主心律(AIVR)的EA的三种形态的例子。注意速率、电轴和QRS持续时间的变化。连续节律记录显示,来自hESC-CM移植物的多个脉冲产生焦点,在宿主传导系统的各个水平上相互作

用以诱导EA。在手术假手术对照组中未发现持续性心律失常。

[0063] 图20显示了hESC-CM移植物组织学和位置。左图:用picrosirius red(鉴别胶原(梗死))以及固绿(鉴别存活心肌)染色的组织切片。用人cTnT标记的相邻切片鉴别未染色的猪心肌和瘢痕组织内移植的hESC-CM移植物。在移植后第42天获得处理切片和未处理切片。右图:移植的hESC-CM移植物位于处理(实心正方形)和未处理(空心圆)之间,并成功靶向前壁的梗死和梗死周围区域。

[0064] 图21A-图21B显示了胺碘酮和伊伐布雷定对植入性心律失常的急性作用。胺碘酮作为静脉内推注对心律转复植入性心律失常至正常窦性或较低心率是有效的(图21A)。口服给予的伊伐布雷定显著减慢了EA,但没有心脏复律(图21B)。这些数据支持胺碘酮和伊伐布雷定联合抗心律失常策略用于EA的节律和速率控制。

[0065] 图22A-图22B显示了用于猪的植入性心律失常的胺碘酮和伊伐布雷定抗心律失常处理。(图22A)与未处理相比,处理显著改善了针对没有关于心源性死亡、不稳定的EA或心力衰竭的主要结果的Kaplan-Meier曲线(p=0.002)。处理线上的Tic标记表示由于机会性感染(第19天和第26天)或计划中的安乐死(第30天)导致的非心源性死亡。(图22B)与未处理相比,总存活的Kaplan-Meier曲线显示处理引起在统计学上临界性改善(p=0.051)。*死于肺孢子菌肺炎。**死于猪巨细胞病毒。缩写:CI,95%置信区间。

[0066] 图23A-图23F证明了抗心律失常处理对心率和心律失常负荷的效果。与未处理(灰色)相比,处理(黑色)的合并日平均心率(图23A)和合并日平均心律失常负荷(图23B)。在移植后第30天观测到处理和未处理之间的心率或心律失常负荷没有显著差异。假手术移植(浅灰色)未诱发心动过速或心律失常。抗心律失常处理(黑色)、未处理(浅灰色)和假手术移植(灰色)的受试者水平的平均每日心率(图23C)和心律失常负荷(图23D)。黑色符号表示的意外死亡或安乐死。与未处理(浅灰色)相比,处理(黑色)显著降低峰心率(图23E)和峰心律失常负荷(图23F)。*$p<0.05$,**$p<0.005$。

[0067] 图24A-图24B显示了移植的hESC-CM移植物与猪心肌中的弥散性浦肯野传导系统相互作用。浦肯野纤维以网状网络分布在整个天然猪心肌中(图24A)。左心室游离壁横切面的心内膜下和心肌内连接蛋白40(Cx40)$^{+}$浦肯野纤维(PFs,白色),比例尺2mm。心肌内PF以较高的放大率插图显示。白框区域的进一步放大视图显示了Cx40定位于浦肯野细胞的间隙连接,与周围的心肌细胞相比,显示较低的肌节含量(F-肌动蛋白)(i.)和缺乏T小管(WGA)(ii.),比例尺20μm。以人特异性慢骨骼心肌钙蛋白I(ssTnI)为标志的hPSC-心肌细胞移植物与Cx40^{+}(白色)PF相互作用(图24B)。方框区域的高放大率显示了浦肯野过渡细胞-移植物(即白色箭头)和直接浦肯野-移植物(ii.,白色箭头)相互作用的示例,比例尺为500μm(顶部)或50μm(底部)。

[0068] 图25表明连接蛋白40特异性染色浦肯野纤维。连接蛋白40(Cx40)标记浦肯野纤维(PF)并定位于PF的间隙连接,与周围的心肌细胞相比,显示较低的肌节含量(F-肌动蛋白)和缺乏T小管(WGA),比例尺为20μm。

具体实施方式

[0069] 用于治疗心血管疾病的心脏细胞替代疗法的主要挑战之一是人干细胞来源的心肌细胞(ES和iPS心肌细胞)缺乏与天然心脏组织完全整合的功能成熟度。结果,在体外分化

的心肌细胞移植后不久出现移植物诱导的心律失常,在此期间接受者处于心源性猝死和心力衰竭的风险中。几周后,在植入过程中存活的受试者被观测到恢复到正常的窦性心律,这反映了移植的心肌细胞的体内成熟。为了实现这一点,需要与宿主心肌充分的电整合,以避免致心律失常并提高心脏植入后的存活。

[0070] 本文所述的方法部分地与以下发现相关:胺碘酮和伊伐布雷定治疗的组合改善了接受心脏移植物的受试者的存活,预防心动过速并降低了心律失常负荷。本文所述的方法减少了短暂的移植物相关心律失常,并显著提高了用两种抗心律失常药剂治疗的受试者的安全性和存活。

[0071] 定义:

[0072] 为方便起见,下面提供了说明书、实施例和所附权利要求中使用的一些术语和短语的含义。除非另有说明或从上下文中暗示,否则以下术语和短语包括下面提供的含义。提供这些定义是为了帮助描述特定实施方式,而不是旨在限制要求保护的技术,因为该技术的范围仅由权利要求限制。除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本技术所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。如果本领域术语的使用与本文提供的定义存在明显差异,应以说明书中提供的定义为准。

[0073] 细胞和分子生物学以及生物化学中常用术语的定义可见于:The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第19版,Merck Sharp&Dohme Corp.出版,2011(ISBN 978-0-911910-19-3);Robert S.Porter等(编著),The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine,由Blackwell Science Ltd.出版,1999-2012(ISBN 9783527600908);以及Robert A.Meyers(编著),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,由VCH Publishers,Inc.出版,1995(ISBN 1-56081-569-8);Immunology by Werner Luttmann,由Elsevier出版,2006;Janeway's Immunobiology,Kenneth Murphy,Allan Mowat,Casey Weaver(编著),Taylor&Francis Limited,2014(ISBN 0815345305,9780815345305);Lewin's Genes XI,由Jones&Bartlett Publishers出版,2014(ISBN-1449659055);Michael Richard Green和Joseph Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA(2012)(ISBN 1936113414);Davis等,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing,Inc.,New York,USA(2012)(ISBN 044460149X);Laboratory Methods in Enzymology:DNA,Jon Lorsch(编著),Elsevier,2013(ISBN 0124199542);Current Protocols in Molecular Biology(CPMB),Frederick M.Ausubel(编著),John Wiley and Sons,2014(ISBN 047150338X,9780471503385);Current Protocols in Protein Science(CPPS),John E.Coligan(编著),John Wiley and Sons,Inc.,2005;以及Current Protocols in Immunology(CPI)(John E.Coligan,ADA M Kruisbeek,David H Margulies,Ethan M Shevach,Warren Strobe编著)John Wiley and Sons,Inc.,2003(ISBN 0471142735,9780471142737),通过引用方式将其内容全部整体并入本文。

[0074] 本文所指的心脏紊乱、心脏疾病、事件或心脏损伤(例如心肌梗死)的"处理/治疗"是指增强心脏功能、减少植入性心律失常和/或增强心肌细胞植入和/或增强处理/治疗区域中的心肌细胞移植或移植物血管形成的治疗性干预,从而改善(例如)心脏的功能。也就

是说，心脏“处理/治疗”面向心脏功能(例如，梗死区域内的功能增强)和/或用本文所述的组合物处理/治疗的其它部位。相对于适当的对照，将改善心脏功能至少10％(优选至少20％、30％、40％、50％、75％、90％、100％或更多，例如2倍、5倍、10倍或更多，直至并包括全功能)(例如通过测量心率和/或降低心律失常频率来评估)的治疗性方法被认为是有效的处理/治疗。有效的处理/治疗不需要治愈或直接影响心脏疾病或紊乱的根本原因，也被认为是有效的处理/治疗。

[0075] 如本文所用，术语“短期”在应用于用胺碘酮和伊伐布雷定治疗植入性心律失常时，是指仅在植入性心律失常继续发生时进行的治疗。本文证明，用这种药物组合治疗可降低植入性心律失常负荷，并且可在植入性心律失常解决后安全撤走，而不会有心律失常复发。因此，虽然不同受试者的确切时间可能会有所不同，但在一些实施方式中，短期治疗将在移植后数周(例如，2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周或更少)至几个月(例如，1个月、2个月、3个月、4个月或更少)完成。

[0076] 如本文所用，“预防(prevention/preventing)”在用于指代疾病、紊乱或其症状时，是指个体将发展为疾病或紊乱(例如心肌梗死后的心力衰竭，仅作为一个实例)的可能性降低。例如，从统计学上来说，相对于具有相同风险因素且未接受本文所述治疗的人群而言，当具有疾病或紊乱的一个或多个风险因素的个体未发展为该紊乱或者在较晚时间发展为该疾病或紊乱或者发展出较轻严重程度的此类疾病或紊乱时，发展为所述疾病或紊乱的可能性降低。未发展为疾病症状，或发展出减轻(例如该疾病或紊乱的临床上接受的程度的至少10％)或延迟(例如数天、数周、数月或数年)的症状被认为是有效预防。

[0077] 术语“患者”、“受试者”和“个体”在本文中可互换使用，是指向其提供处理/治疗(包括预防性处理/治疗)的动物，特别是人。如本文所用，术语“受试者”是指人和非人动物。术语“非人动物”和“非人哺乳动物”在本文中可互换使用，包括所有脊椎动物，例如哺乳动物，例如非人灵长类动物(特别是高等灵长类动物)、绵羊、狗、啮齿动物(例如小鼠或大鼠)、豚鼠、山羊、猪、猫、兔、牛，和非哺乳动物，如鸡、两栖动物、爬行动物等。在任一方面的一个实施方式中，受试者为人。在任一方面的另一实施方式中，受试者是作为疾病模型的实验动物或动物替代物。在任一方面的另一实施方式中，受试者为驯养动物，包括伴侣动物(例如，狗、猫、大鼠、猪、豚鼠、仓鼠等)。受试者可在先前接受过针对心血管疾病或心脏事件的处理/治疗，或者从未接受过针对心血管疾病或心脏事件的处理/治疗。受试者可在先前被诊断患有心血管疾病，或从未被诊断患有心血管疾病。

[0078] 如本文所用，术语“人干细胞”是指可自我更新和分化为至少一种细胞类型的人细胞。术语“人干细胞”涵盖人干细胞系、人源性诱导多能干(iPS)细胞、人胚胎干细胞、人多能细胞、人专能干细胞(human multipotent stem cells)、羊膜干细胞、胎盘干细胞或人成体干细胞。

[0079] 如本文所用，“体外分化的心肌细胞”是指在培养中产生的心肌细胞，通常通过从前体细胞(如人胚胎干细胞、诱导多能干细胞、早期中胚层细胞、侧板中胚层细胞或心脏祖细胞)逐步分化而来。

[0080] 如本文所用，术语“抗心律失常药”或“抗心律失常药剂”是指降低心脏心律失常的发作、频率和/或严重程度的任何药剂(例如，小分子或药物组合物)。抗心律失常药可用于治疗不规律的心节律，降低心动过速中的心率，增加心动过缓中的心率，或以其他方式促进

正常的窦性心律并预防心源性猝死。

[0081] 关于干细胞使用的术语“来源自”是指通过将分化的细胞重编程为干细胞表型来产生干细胞。用于指分化细胞的术语“来源自”是指该细胞是干细胞分化(例如体外分化)的结果。如本文所用,“iPSC-CM”或“诱导多能干细胞来源的心肌细胞”可互换使用,以指代来源自诱导多能干细胞的心肌细胞。

[0082] 本文使用短语“药学上可接受的”来指在合理的医学判断范围内适合用于与人体和动物组织接触,而没有过度毒性、刺激、变态反应或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称的那些试剂、化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0083] 术语“降低”、“减少”或“抑制”在本文中均用于表示特性、水平或其它参数的降低或减轻统计学上显著的量。在一些实施方式中,“降低”、“减少”或“抑制”通常是指与参考水平(例如,不存在给定的处理/治疗)相比至少10%减低,并且可以包括,例如,降低至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或更多。如本文所用,“减少”或“抑制”不涵盖与参考水平相比的完全抑制或减少。“完全抑制”是与参考水平相比100%的抑制。降低可以优选地下降到被接受为对于没有给定紊乱的个体而言在正常范围内的水平。

[0084] 术语“增加”、或“增强”或“激活”在本文中均用于一般意指特性、水平或其它参数增加统计学上显著的量;为避免任何疑问,术语“增加”或“增强”或“激活”是指与参考水平相比至少10%的增加,例如与参考水平相比,至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%的增加或直至并包括100%的增加或10-100%之间的任何增加,或与参考水平相比,至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍或至少约10倍增加,至少约20倍增加,至少约50倍增加,至少约100倍增加,至少约1000倍增加或更多。

[0085] 如本文所用,“参考水平”是指正常的、或未受影响的细胞群或组织(例如,从健康受试者获得的细胞、组织或生物样品,或在先前时间点从受试者获得的生物样品,例如,在被诊断患有疾病之前从患者获得的细胞、组织或生物样品,或尚未与本文公开的药剂或组合物接触的生物样品)中的标志物或参数的水平。

[0086] 如本文所用,“适当对照”是指相对于用给定处理接触或处理的细胞、组织、生物样品或群体,未经处理的或相同的细胞、受试者、生物体或群体(例如,未与本文所述的药剂或组合物接触的细胞、组织或生物样品)。例如,合适的对照可为未给予胺碘酮和伊伐布雷定的受试者或组织。

[0087] 术语“统计学上显著的”或“显著地”是指统计显著性,并且通常是指两个标准差(2SD)或更大的差异。

[0088] 如本文所用,术语“包括/包含/含有”是指除了呈现的定义的元素之外还可以存在其他元素。使用“包括/包含/含有”表示包含而不是限制。

[0089] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法及其各自的组分,其不包括在实施方式的描述中未列举的任何元素。

[0090] 如本文所用,术语“基本上由……组成”是指给定实施方式所需的那些元素。该术语允许存在不实质影响本发明的该实施方式的基本和新颖或功能性特征的另外的元素。

[0091] 除非上下文另有明确指示，单数术语“一个/一种”、和“所述/该”包括复数指示物。类似地，除非上下文另有明确指示，否则“或”一词旨在包括“和”。尽管与本文所述的方法和材料类似或等效的方法和材料可用于本公开的实践或测试，在下面描述了合适的方法和材料。缩写“例如(e.g.)”源自拉丁语exempli gratia，在此用于表示非限制性示例。因此，缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”同义。

[0092] 此外，除非上下文另有要求，否则单数术语应包括复数，并且复数术语应包括单数。

[0093] 除了在操作实施例中或另有指明的情况下，本文使用的所有表示成分量或反应条件的数字都应理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。当与百分比结合使用时，术语“约”可以表示±1％。

[0094] 心血管疾病

[0095] 心血管疾病是影响受试者的心脏和/或循环系统的疾病。心脏疾病的非限制性实例包括动脉粥样硬化性心脏病、心肌病、心脏心律失常、先天性心脏疾病、心肌梗死、心力衰竭、心脏肥厚、瓣膜狭窄、反流、缺血、纤颤和多形性室性心动过速。心血管疾病的症状可包括但不限于晕厥、疲劳、气短、胸痛和心悸。通常通过体检、血液检测和/或心电图(EKG)来诊断心血管疾病。异常的EKG表明受试者具有异常的心节律或心脏心律失常。诊断心律失常的方法是本领域已知的。

[0096] 术语“心脏事件”是指心肌损伤、心肌梗死、心室颤动、狭窄、心律失常等的事故。

[0097] 心脏电生理和收缩功能是一个严格控制的过程。当心脏细胞或组织中的离子通道调节或收缩功能被破坏时，这可能导致有时可能致命的心脏心律失常。心脏疾病仍然是全世界死亡的主要原因。

[0098] 人干细胞来源的心肌细胞已成为有前途的治疗心血管疾病和心肌梗死引起的心脏损伤的方法。然而，现有模型中体外分化的心肌细胞的功能成熟度普遍缺乏，这些心肌细胞在植入后会引起心律失常。

[0099] 在一个方面，本文描述了治疗心血管疾病的方法。在另一方面，本文描述了治疗或改善接受心肌细胞心脏移植物的受试者中的植入性心律失常的方法，所述方法包括：给予所述受试者有效量的胺碘酮和有效量的伊伐布雷定。

[0100] 在任一方面的一些实施方式中，受试者具有心血管疾病或心脏事件或处于具有心血管疾病或心脏事件的风险中。

[0101] 在任一方面的一些实施方式中，具有心血管疾病的受试者需要或已经接受了心脏移植物。在一些实施方式中，受试者具有或被诊断具有植入性心律失常。在一些方面，本文描述了预防或减少植入性心律失常的方法。

[0102] 植入性心律失常是在给予心脏细胞或心肌细胞的移植物之后发生的新的且异常的心节律。在心脏移植物移植后观测到植入性心律失常，通常短暂持续数天至数周。植入性心律失常可导致受试者心源性猝死和心力衰竭。

[0103] 治疗心血管疾病和心律失常的方法是本领域已知的。用于治疗心血管疾病、特别是心律失常的治疗剂的一个典型例子包括抗心律失常药剂。

[0104] 用于心脏植入的心肌细胞

[0105] 心脏植入将心肌细胞给予心脏中的心脏损伤部位。熟练的医师可以通过本领域已

知的方法确定损伤部位。心脏植入的主要目标是为受伤的心肌提供电和机械稳定性，这无法通过单独的药物治疗来实现。

[0106] 以下描述了可用于制备心肌细胞以植入到受试者中的各种来源和干细胞。

[0107] 干细胞是保留通过有丝细胞分裂自我更新的能力并且可分化为更特化的细胞类型的细胞。哺乳动物干细胞的三大类型包括：在胚泡中发现的胚胎干(ES)细胞、从体细胞重编程而来的诱导多能干细胞(iPSC)以及在成体组织中发现的成体干细胞。多能干细胞的其他来源可包括羊膜来源或胎盘来源的干细胞。多能干细胞可分化为来自三个胚层中的任何一个的细胞。

[0108] 其中，可用于本文所述的组合物和方法的心肌细胞可由胚胎干细胞和诱导多能干细胞二者分化而来。在一个实施方式中，本文提供的组合物和方法使用从胚胎干细胞分化而来的人心肌细胞。或者，在一些实施方式中，本文提供的组合物和方法不包括由取自活人胚胎的细胞制成的人心源性细胞的产生或使用。

[0109] 胚胎干细胞：胚胎干细胞及其回收方法在本领域中是众所周知的，并且描述于例如Trounson A O Reprod Fertil Dev(2001)13:523;Roach ML Methods Mol Biol(2002)185:1以及Smith A G Annu Rev Cell Dev Biol(2001)17:435。术语“胚胎干细胞”用于指胚胎囊胚的内细胞团的多能干细胞(参见例如美国专利No.5,843,780、6,200,806)。此类细胞可以类似地从源自体细胞核移植的囊胚的内细胞团获得(参见例如美国专利No.5,945,577、5,994,619、6,235,970)。

[0110] 源自胚胎来源的细胞可包括从干细胞库或其他公认的保藏机构获得的胚胎干细胞或干细胞系。产生干细胞系的其他手段包括如下方法，所述方法包括使用来自在胚泡形成之前的早期胚胎的卵裂球细胞(在大约8细胞阶段)。此种技术对应于辅助生殖诊所常规实施的植入前基因诊断技术。单个卵裂球细胞与已建立的ES细胞系共培养，然后从它们中分离出来，形成完全有能力的ES细胞系。

[0111] 未分化的胚胎干(ES)细胞很容易被本领域技术人员鉴别，并且通常在显微镜的二维视图中以具有高核/细胞质比率和突出核仁的细胞集落出现。在一些实施方式中，本文所述的人心肌细胞并非来源于胚胎干细胞或任何其他胚胎来源的细胞。

[0112] 诱导多能干细胞(iPSC)：

[0113] 在一些实施方式中，本文所述的组合物和方法利用在体外从诱导多能干细胞分化的心肌细胞。使用iPSC产生用于本文所述组合物的心肌细胞的优点是如果需要，所述细胞可以源自将要给予所需人心肌细胞的同一受试者。也就是说，可以从受试者获得体细胞，重编程为诱导多能干细胞，然后再分化为待被给予至所述受试者的人心肌细胞(例如，自体细胞)。由于心肌细胞(或其分化的后代)基本上来源于自体来源，因此与使用来自另一受试者或受试者组的细胞相比，植入排斥或变态反应的风险降低。虽然这是iPS细胞的优点，在替代实施方式中，可用于本文所述方法和组合物的心肌细胞源自非自体来源(例如，同种异体)。此外，iPSC的使用无需从胚胎来源获得细胞。因此，在一个实施方式中，用于产生用于本文所述方法和组合物的心肌细胞的干细胞不是胚胎干细胞。

[0114] 尽管分化在生理环境下通常是不可逆的，但近年来已经开发了几种方法来将体细胞重编程为诱导多能干细胞。示例性方法是本领域技术人员已知的，并且在下文中简要描述。

[0115] 重编程是改变或逆转分化细胞(例如,体细胞)的分化状态的过程。换句话说,重编程是将细胞分化倒转,驱动为更未分化或更原始类型的细胞的过程。应该注意的是,在培养物中放置许多原代细胞会导致完全分化特征的一些丧失。然而,简单地培养包括在术语分化细胞中的此类细胞不会使这些细胞成为非分化细胞(例如,未分化细胞)或多能细胞。分化细胞向多能性的转变需要重编程刺激,该刺激超出了在将分化细胞置于培养物中时导致分化特征部分丧失的刺激。相对于通常在培养中仅具有有限次数分裂能力的原代细胞亲本,重编程细胞还具有延长传代能力而不丧失生长潜力的特性。

[0116] 待重编程的细胞在重编程之前可为部分或终末分化。因此,细胞可为终末分化的体细胞,以及来自成体干细胞或体干细胞。

[0117] 在一些实施方式中,重编程包括将分化细胞(例如,体细胞)的分化状态完全逆转为多能状态或专能状态。在一些实施方式中,重编程涵盖分化细胞(例如,体细胞)的分化状态完全或部分逆转为未分化细胞(例如,胚胎样细胞)。重编程可导致细胞表达特定基因,其表达进一步有助于重编程。在本文所述的某些实施方式中,分化细胞(例如,体细胞)的重编程导致分化细胞呈现具有自我更新和分化为所有三个胚层谱系细胞的能力的未分化状态。这些为诱导多能干细胞(iPSC或iPS细胞)。

[0118] 将体细胞重编程为iPS细胞的方法是本领域已知的。例如,参见美国专利No.8,129,187B2;8,058,065B2;美国专利申请2012/0021519 A1;Singh等,Front.Cell Dev Biol.(2015);以及Park等,Nature(2008);以引用的方式将其全部内容并入本文。具体来说,iPSC是通过引入重编程转录因子的组合从体细胞产生的。重编程因子可为例如核酸、载体、小分子、病毒、多肽或其任意组合。重编程因子的非限制性实例包括Oct4(八聚体结合转录因子-4)、Sox2(性别确定区域Y)-盒2、Klf4(Kruppel样因子-4)和c-Myc。已发现因子(例如,LIN28+Nanog、Esrrb、Pax5 shRNA、C/EBPa、p53 siRNA、UTF1、DNMT shRNA、Wnt3a、SV40 LT(T)、hTERT)或化学品(例如,BIX-01294、BayK8644、RG108、AZA、地塞米松、VPA、TSA、SAHA、PD025901+CHIR99021(2i)、A-83-01)代替基础重编程因子中的一种或其他重编程因子或提高重编程效率。

[0119] 用于从体细胞(例如,除生殖系细胞外的任何身体细胞;成纤维细胞等)产生多能干细胞的具体途径或方法对于要求保护的发明并不是关键。因此,将体细胞重新编程为多能表型的任何方法将都适于在本文所述的方法中使用。

[0120] 可以通过添加各种小分子来增强源自起始细胞群的重编程效率(即重编程细胞的数量),如Shi,Y等,(2008)Cell-Stem Cell 2:525-528;Huangfu,D等,(2008)Nature Biotechnology 26(7):795-797;以及Marson,A等,(2008)Cell-Stem Cell 3:132-135中所示。增强重编程效率的试剂的一些非限制性实例包括可溶性Wnt、Wnt条件培养基、BIX-01294(G9a组蛋白甲基转移酶)、PD0325901(MEK抑制剂)、DNA甲基转移酶抑制剂、组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂、丙戊酸、5'-氮杂胞苷、地塞米松、辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)、维生素C和曲古抑素(TSA)等。

[0121] 为了证实用于本文所述方法的多能干细胞的诱导,可测试分离的克隆的一种或多种干细胞标志物的表达。源自体细胞的细胞中的此类表达将细胞鉴定为诱导多能干细胞。干细胞标志物可包括但不限于SSEA3、SSEA4、CD9、Nanog、Oct4、Fbx15、Ecat1、Esg1、Eras、Gdf3、Fgf4、Cripto、Dax1、Zpf296、Slc2a3、Rex1、Utf1和Nat1等。在一个实施方式中,表达

Oct4或Nanog的细胞被鉴定为多能的。用于检测此类标志物表达的方法可以包括例如RT-PCR以及检测编码多肽的存在的免疫学方法，例如蛋白质印迹或流式细胞术分析。在一些实施方式中，检测不仅涉及RT-PCR，还包括蛋白标志物的检测。细胞内标志物最好通过RT-PCR鉴定，而细胞表面标志物例如通过免疫细胞化学很容易鉴定。

[0122] 可通过评价iPSC分化为三个胚层中每一个的细胞的能力的测试来确认分离细胞的多能干细胞特性。作为一个实例，裸鼠中的畸胎瘤形成可用于评价分离克隆的多能特性。将细胞引入裸鼠，并对由细胞产生的肿瘤进行组织学和/或免疫组织化学。例如，包含来自所有三个胚层的细胞的肿瘤的生长进一步表明这些细胞是多能干细胞。

[0123] 成体干细胞：成体干细胞是源自出生后或新生儿后生物体的组织或来自成体生物体的干细胞。成体干细胞在结构上与胚胎干细胞不同，不仅在于它相对于胚胎干细胞表达或不表达的标志物，而且还在于表观遗传差异的存在，例如，DNA甲基化模式的差异。预期从成体干细胞分化的心肌细胞也可用于如本文所述的心脏移植物。分离成体干细胞的方法是本领域已知的。参见例如美国专利No.9,206,393 B2；以及美国申请No.2010/0166714 A1；以引用的方式将其全部内容并入本文。

[0124] 体外分化

[0125] 本文所述的方法和组合物使用体外分化的心肌细胞。用于从ESC或iPSC分化任一细胞类型的方法是本领域已知的。参见例如LaFlamme等，Nature Biotech 25:1015-1024(2007)，其描述了心肌细胞的分化，以引用的方式将其整体并入本文。

[0126] 在某些实施方式中，ESC或iPSC向心肌细胞的逐步分化按以下顺序进行：ESC或iPSC>心源性中胚层>心脏祖细胞>心肌细胞(参见例如Lian等，Nat Prot(2013)；美国申请No.2017/0058263 A1；2008/0089874 A1；2006/0040389 A1；美国专利No.10,155,927 B2；9,994,812 B2；和9,663,764 B2，以引用的方式将其各自的内容以其整体并入本文)。用于将ESC和iPSC分化为心肌细胞的许多方案在本领域中是已知的。例如，可以从细胞培养基中添加或移除试剂，以逐步方式引导分化为心肌细胞。可促进心肌细胞分化的因子和试剂的非限制性实例包括小分子(例如，Wnt抑制剂、GSK3抑制剂)、多肽(例如，生长因子)、核酸、载体和图案化基板(例如，纳米图案)。添加心血管发育所需的生长因子(包括但不限于成纤维细胞生长因子2(FGF2)、转化生长因子β(TGFβ)超家族生长因子-激活素A和BMP4、血管内皮生长因子(VEGF)和Wnt抑制剂DKK-1)也可有益于指导沿心脏谱系的分化。有助于促进心肌细胞分化的因素和条件的其他实例包括但不限于缺乏胰岛素的B27补充剂、细胞条件培养基、外用电起搏和纳米图案化基板等。

[0127] 心脏/心肌细胞移植物

[0128] 在一个方面，本文描述了心肌细胞植入或移植的方法，所述方法包括：a)将心肌细胞给予有需要的受试者的心脏组织；以及b)给予所述受试者一定量的胺碘酮和一定量的伊伐布雷定以有效减少受试者的植入性心律失常。

[0129] 如本文所用，术语“移植(transplanting/transplant)”在将如本文所述的细胞(例如心肌细胞)放置进入受试者的上下文中使用，所述放置通过导致引入的细胞至少部分定位于所需部位(例如损伤或修复部位)的方法或途径，从而产生所需的效果。可以将细胞(例如心肌细胞)或其分化的后代(例如心脏成纤维细胞等)和心肌细胞直接植入或者植入到接受者的心脏组织中，例如在某个部位处或某部位附近；或者植入到患有心脏疾病的受

试者的心脏组织中。如本领域技术人员将理解的，需要心肌细胞的长期植入，因为心肌细胞通常不增殖到心脏可以从包括细胞死亡的急性损伤中愈合的程度。在一些实施方式中，将细胞任选地移植在支架或生物相容性材料之上或之内，其支持所植入的心肌细胞的活力，和/或例如有助于将给予的细胞保持在用于植入的所需位置或促进与在受试者中天然心脏细胞的整合。优选地，心肌细胞是如本文所述的人干细胞来源的心肌细胞或体外分化的心肌细胞。在一些实施方式中，体外分化的心肌细胞从胚胎干细胞或从iPS细胞在体外分化而来。

[0130] 支架为一种结构，其包括生物相容性材料，包括但不限于凝胶、板或lattice，其可以在所需位置包含细胞，但允许生存和功能所必需的因子进入环境或在环境中扩散。许多适用于支架的生物相容性聚合物是本领域已知的。

[0131] 本领域技术人员可以确定移植物所需的心肌细胞数量。在一些实施方式中，将约1000万心肌细胞至约100亿心肌细胞给予受试者。为了用于本文所述的各个方面，有效量的人心肌细胞可包括至少1×10^7、至少1.1×10^7、至少1.2×10^7、至少1.3×10^7、至少1.4×10^7、至少1.5×10^7、至少1.6×10^7、至少1.7×10^7、至少1.8×10^7、至少1.9×10^7、至少2×10^7、至少3×10^7、至少4×10^7、至少5×10^7、至少6×10^7、至少7×10^7、至少8×10^7、至少9×10^7、至少1×10^8、至少2×10^8、至少5×10^8、至少7×10^8、至少1×10^9、至少2×10^9、至少3×10^9、至少4×10^9、至少5×10^9、至少6×10^9、至少7×10^9、至少8×10^9、至少9×10^9、至少1×10^{10}、或更多个用于植入的心肌细胞。

[0132] 为了降低接受心脏移植心肌细胞的受试者中植入性心律失常的发作和严重程度，本文所述的方法还包括给予受试者有效量的胺碘酮和有效量的伊伐布雷定。这些抗心律失常药剂的组合在本文中在工作实例中被证明减少和治疗植入性心律失常。

[0133] 胺碘酮是一种III类抗心律失常药剂，处方用于治疗心脏骤停、室性心动过速和心房颤动。胺碘酮的类似物和衍生物是本领域已知的，参见例如美国专利No.7,799,799 B2；9,018,250 B2；和Carlsson等，J Med Chem.2002年1月31日，45(3)：623-30，以引用的方式将其全部并入本文。预期胺碘酮类似物和衍生物也可有益于治疗植入性心律失常。

[0134] 胺碘酮的作用机制是药物抑制电压门控钾通道和电压门控钙通道，进而延长心脏动作电位的第3相。具体而言，胺碘酮抑制钾离子通道的成孔亚基$K_v11.1$(由KCNH2基因编码)并抑制电压门控钙通道(由CACNA2D2基因编码)。然而，胺碘酮也被证明抑制电压门控钠通道活性，这可能有助于药物的促心律失常潜力。

[0135] 胺碘酮的给药表现出β-阻滞剂样活性，因为当给予受试者时它使心率降低。胺碘酮的临床作用包括由于心室、希氏束和浦肯野纤维的不应期增加而延长QT间期。虽然这种作用有利于治疗心律失常(例如心房颤动)，但这种作用可能会导致促心律失常。本领域众所周知，胺碘酮和其他抗心律失常药剂可导致药物诱导的QT延长，这取决于剂量和治疗方案。当与其他药物或抗心律失常药剂联用时，这种情况可能加剧。

[0136] 伊伐布雷定是用于治疗心绞痛、心动过速和心力衰竭的I_f类抗心律失常药剂。伊伐布雷定的类似物和衍生物是本领域已知的。例如，参见美国专利No.7,879,842；7,361,650；7,867,996；以及7,361,649，以引用的方式将其全部并入本文。预期某些伊伐布雷定类似物和衍生物也可有益于本文所述的方法。

[0137] 已知伊伐布雷定抑制心脏中的funny通道(也称为HCN通道)。由HCN基因HCN1-HCN4

编码的HCN通道有4种亚型。心脏中funny电流(I_f)的主要功能是维持SA节点的起搏器活动。用伊伐布雷定阻断funny通道导致心率整体降低。

[0138] 如本文所述的胺碘酮与伊伐布雷定的组合降低了具有心肌细胞移植物的受试者的心律失常的负担和速率。如工作实例中所示，抗心律失常药剂的这种组合表明受试者的心血管存活得到提高。

[0139] 给药和功效

[0140] 在一方面，本文描述了用于治疗或改善心脏疾病、紊乱、事件或损伤的方法，所述方法包括给予有需要的受试者心肌细胞并给予有效量的胺碘酮和伊伐布雷定。在一些实施方式中，本文所述的方法预防预期的紊乱，例如植入性心律失常。

[0141] 在另一方面，本文描述了用于治疗或改善植入性心律失常的方法。

[0142] 可通过导致受试者心律失常负荷降低的任何适当途径给予本文所述的抗心律失常药剂。在任一方面的一些实施方式中，术语“给予/给药”是指给予包含一种或多种药剂的药物组合物。可通过直接注射(例如，直接给予至靶细胞或组织)、皮下注射、肌内注射、口服或鼻递送或其组合对有需要的受试者进行给予/给药。

[0143] 如上所讨论，将细胞直接给予至心脏组织。抗心律失常药剂(例如胺碘酮和伊伐布雷定)可以以任何合适的方式给药，包括但不限于口服、肠胃外、静脉内(IV)、肌内、皮下、透皮、气道(气溶胶)、肺、皮肤、局部或注射给予。给予/给药可为局部的或系统性的。

[0144] 胺碘酮和伊伐布雷定的给予对于二者可为IV或口服。因此，预期两种药物(或其类似物)可口服给药，两者均IV给药，或一种口服给药并且另一种IV组合给药。然而，为了易于给药和患者依从性，优选两种药物均口服给药。

[0145] 如本文所用，“有效量”是指减轻植入性心律失常所需的胺碘酮和/或伊伐布雷定或它们的类似物的量。通过预防或减轻植入性心律失常，可促进移植细胞的植入和整合，可改善受试者的临床结果，包括降低心力衰竭或心源性猝死的风险。在本文中，“减轻”是指相对于发生或预期发生的心律失常而不给予如本文所述的胺碘酮和伊伐布雷定时，心率失常负荷降低至少10％。可如本文工作实例中所述或如本领域已知的那样来计算心律失常负荷。没有所述药物方案的心律失常负荷可为75％或更多。用胺碘酮和伊伐布雷定的给药可使其降低至少10％。可以理解，对于任何给定的情况，适当的“有效量”可仅使用常规实验由本领域普通技术人员确定。

[0146] 在任一方面的一些实施方式中，相对于接受相同类型细胞移植物但未给予胺碘酮和伊伐布雷定或它们的类似物的受试者，胺碘酮和伊伐布雷定或它们的类似物的给予使移植接受者经历的移植后加速静息心率降低至少10％或更多、20％或更多、30％或更多、40％或更多、50％或更多、60％或更多。

[0147] 因此，在任一方面的一些实施方式中，相对于接受相同类型的心肌细胞移植物但未进行胺碘酮和伊伐布雷定给予的受试者，胺碘酮和伊伐布雷定或它们的类似物的给予将植入性心律失常负荷(即受试者经历植入性心律失常的时间比例)降低至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少99％或更多。虽然至少10％降低被认为是有效的治疗，但预期胺碘酮和伊伐布雷定的给予允许完全停止植入性心律失常。

[0148] 最初可从细胞培养测定中估计有效剂量，并且可在动物(例如猪)中制定剂量范

围。从细胞培养测定和动物研究中获得的数据可用于制定用于人的剂量范围。此类抗心律失常药剂的剂量优选地位于包括ED_{50}的循环浓度范围内，几乎没有毒性或没有毒性。剂量可在这个范围内变化，这取决于采用的剂型和所利用的使用或给药途径。

[0149] 通常，给予组合物使得胺碘酮以至少50mg、至少100mg、至少150mg、至少200mg、至少250mg、至少300mg，至少350mg、至少400mg、至少450mg、至少500mg、至少550mg、至少600mg、至少650mg、至少700mg、至少750mg、至少800mg、至少850mg、至少900mg、至约1000mg的剂量来使用或给予。

[0150] 在任一方面的一些实施方式中，胺碘酮或其类似物以100-800mg的剂量口服给予，每天3次。在任一方面的一些实施方式中，胺碘酮通过IV推注以100-300mg的剂量给予。在任一方面的一些实施方式中，胺碘酮以1.5-2.5μg/mL的血清浓度来给予。

[0151] 在一些实施方式中，伊伐布雷定以至少1mg、至少2mg、至少3mg、至少4mg、至少5mg、至少6mg、至少7mg、至少8mg、至少9mg、至少10mg、至少11mg、至少12mg、至少13mg、至少14mg、至少15mg、至少16mg、至少17mg、至少18mg、至少19mg、至约20mg的剂量来给予。

[0152] 在任一方面的一些实施方式中，伊伐布雷定或其类似物以5-15mg的剂量口服给予，每天两次。

[0153] 在一些实施方式中，胺碘酮的给予是单次推注给予。在一些实施方式中，给予是连续给予或重复给予。在一些实施方式中，给予是口服给予和/或静脉内注射。在一些实施方式中，胺碘酮以100-800mg的剂量口服给予，每天3次。在一些实施方式中，胺碘酮通过IV推注以100-300mg的剂量给予。在一些实施方式中，胺碘酮以1.5-2.5μg/mL的血清浓度来给予。在一些实施方式中，伊伐布雷定以5-15mg的剂量口服给予，每天两次。在一些实施方式中，当存在心动过速时给予伊伐布雷定。在一些实施方式中，给予伊伐布雷定以维持小于或等于每分钟搏动150次(bpm)的静息心率。在一些实施方式中，胺碘酮和伊伐布雷定的给予是短期的。在一些实施方式中，在植入性心律失常负荷达到零后终止胺碘酮和伊伐布雷定的给予，而心律失常没有复发。

[0154] 本文所述的抗心律失常药剂胺碘酮和伊伐布雷定或它们的类似物联合用于治疗植入性心律失常和/或心血管疾病。如本文所用，“联合”给予/给药是指在受试者受紊乱困扰的过程中向受试者递送两种(或多种)不同的治疗，例如，在受试者被诊断出具有紊乱(心血管疾病或植入性心律失常)之后，并且在紊乱被治愈或消除或因其他原因停止治疗之前，递送两种以上治疗。在一些实施方式中，当第二种治疗开始递送时，一种治疗的递送仍在发生，因此在给予方面存在重叠。这有时在本文中被称为“同时”或“同时递送”。在其它实施方式中，一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一情况的一些实施方式中，由于联合给予/给药，治疗更有效。例如，第二治疗更有效，例如，以较少的第二治疗可以看到相当的效果，或者第二治疗以比在没有第一治疗的情况下给予第二治疗将能看到的程度更大的程度减轻症状，或者用第一治疗看到了类似的情况。在一些实施方式中，递送使得与紊乱相关的症状或其他参数的减少大于在不存在另一种的情况下递送的一种治疗将观察到的减少。两种治疗的效果可为部分相加的、完全相加的或大于相加的。递送可使得递送的第一治疗的效果在递送第二治疗时仍然可检测到。本文所述的抗心律失常药剂和/或至少一种另外的疗法可以同时(在相同或分开的组合物中)或顺序给予。对于顺序给予，可首先给予本文所述的胺碘酮，伊伐布雷定可以后给予，或者可颠倒给予顺序。药剂和/或其它治

疗剂、程序或形式可在活跃紊乱期间(例如在植入心律失常期间),或在疾病缓解期或较不活跃期间(例如在植入之前或之后)给予。抗心律失常药剂可在心脏移植之前、与治疗同时、治疗后或在植入后心血管疾病爆发期间给予。

[0155] 当联合给予时,可以高于、低于或等于单独使用每种抗心律失常药剂(例如作为单一疗法)的量或剂量来给予胺碘酮和伊伐布雷定。在某些实施方式中,胺碘酮、伊伐布雷定或两者的给药量或剂量低于(例如,至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)单独使用的每种抗心律失常药剂的量或剂量。在其它实施方式中,产生所需效果(例如,治疗心血管疾病)的胺碘酮、伊伐布雷定或两者的量或剂量低于(例如,至少20%、至少30%、至少40%、或至少低50%)达到相同治疗效果单独需要的每种药剂的量或剂量。

[0156] 在任一方面的一些实施方式中,胺碘酮和伊伐布雷定或它们的类似物与心肌细胞移植物同时给予。在任一方面的一些实施方式中,在给予心肌细胞移植物之前开始给予胺碘酮。在任一方面的一些实施方式中,在心肌细胞移植物的给予之前开始伊伐布雷定的给予。在任一方面的一些实施方式中,胺碘酮和伊伐布雷定两者的给予在给予心肌细胞移植物之前开始。在任一方面的一些实施方式中,伊伐布雷定的给予在心肌细胞移植物的给予同时或之后开始。在任一方面的一些实施方式中,胺碘酮的给予在心肌细胞移植物的给予同时或之后开始。

[0157] 在任一方面的一些实施方式中,在植入前至少1小时、至少5小时、至少10小时、至少15小时、至少20小时、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天开始给予胺碘酮。在任一方面的一些实施方式中,在植入前至少1小时、至少5小时、至少10小时、至少15小时、至少20小时、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天开始给予伊伐布雷定。

[0158] 在任一方面的一些实施方式中,根据需要给予伊伐布雷定,以控制心率,即限制或控制如与植入性心律失常通常一起发生的心动过速。在此类实施方式中,胺碘酮在移植物给予之前(例如,开始7天、6天、5天、4天、3天、2天、1天)给予或与移植物给予同时给予,并在移植后继续。

[0159] 在任一方面的一些实施方式中,每天至少一次、每天两次、每天三次或更多次给予胺碘酮。在任一方面的一些实施方式中,每天至少一次、每天两次、每天三次或更多次给予伊伐布雷定。

[0160] 在额外的实施方式中,可同时给予其他类型的抗心律失常药或者除了胺碘酮和伊伐布雷定之外给予其他类型的抗心律失常药,以帮助治疗受试者。

[0161] 在某些实施方式中,可根据需要给予胺碘酮和/或伊伐布雷定或它们的类似物,以用于受试者的速率控制以及以减轻植入性心律失常的至少一种症状。如本文所述的组合物的剂量可由医生确定,并在必要时进行调整,从而适应观测到的治疗效果。关于治疗的持续时间和频率,熟练的临床医生通常监测受试者,以确定治疗何时提供治疗益处,并确定是否增加或减少剂量、增加或减少给药频率、停止治疗、恢复治疗,或对治疗方案进行其他更改。

[0162] 在任一方面的一些实施方式中,本文所述的方法包括给予受试者有效量的胺碘酮和伊伐布雷定,以减轻植入性心律失常和/或心血管疾病的至少一种症状。如本文所用,“减轻心血管疾病的至少一种症状”或“减轻植入性心律失常的至少一种症状”是改善与心血管疾病相关的任何病症或症状(例如,疲劳、气短、晕厥、胸痛),并包括例如减轻心律失常本

身。如通过任何标准技术所测量的，与同等的未处理对照相比，此类减少为至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或更多。

[0163] 在任一方面的一些实施方式中，在初始治疗方案之后，可以以较低频率基础来给予治疗。例如，每天给药持续三周，根据受试者心律失常的发生率，可将给药减少到每隔一天、每三天、每周或更低频率。或者，给药频率可保持不变，但量减少。

[0164] 在任一方面的一些实施方式中，在给予本文所述的心肌细胞移植物之前，受试者先被诊断为患有心血管疾病或紊乱。在一些实施方式中，在给予细胞之前，受试者先被诊断为有发展为心脏疾病(例如心肌损伤)或紊乱的风险。

[0165] 在一些实施方式中，当存在心动过速时给予伊伐布雷定或其类似物。成人静息心率一般为每分钟搏动60-100次(bpm)。心动过速是比这更高的静息心率。然而，虽然60-100bpm的静息心率是一个目标，但患者通常可以控制低于150bpm的速率。因此，可给予伊伐布雷定以用于移植后的心动过速，目标是维持静息心率在100和150bpm之间，优选低于140bpm、低于130bpm、低于120bpm或低于110bpm。

[0166] 除非另有阐明，否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0167] 应当理解，本公开内容不限于本文所述的特定方法学、方案和试剂等，因此可以变化。本文使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的，并不旨在限制本公开的范围，其仅由权利要求限定。

[0168] 所指认的所有专利和其它出版物都明确地通过引用并入本文，用于描述和公开例如可能与本公开结合使用的此类出版物中描述的方法学。提供这些出版物仅是为了这些公开在本申请的提交日期之前。这方面的任何内容都不应被解释为承认发明人无权因在先披露或出于任何其它原因而提前此类披露。关于这些文件的日期的所有陈述或内容的陈述均基于申请人可获得的信息，并不构成对这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

[0169] 本文描述的技术的一些实施方式可以根据以下编号的段落中的任何一项来定义：

[0170] 1.一种治疗或改善接受心肌细胞的心脏移植物的受试者中的植入性心律失常的方法，所述方法包括给予所述受试者有效量的胺碘酮和有效量的伊伐布雷定。

[0171] 2.如段落1所述的方法，其中，所述心肌细胞的心脏移植物包含体外分化的心肌细胞。

[0172] 3.如段落2所述的方法，其中，体外分化的心肌细胞从诱导多能干(iPS)细胞或从胚胎干(ES)细胞分化而来。

[0173] 4.如段落1-3中任一项所述的方法，其中，所述心肌细胞的心脏移植物来源于所述受试者的自体干细胞。

[0174] 5.如段落1-3中任一项所述的方法，其中，所述心肌细胞的心脏移植物来源于所述受试者的同种异体干细胞。

[0175] 6.如段落1-5中任一项所述的方法，其中，胺碘酮和伊伐布雷定与所述心肌细胞的心脏移植物同时给予。

[0176] 7.如段落1-5中任一项所述的方法，其中，在给予所述心肌细胞的心脏移植物之前开始胺碘酮的给予。

[0177] 8.如段落1-5中任一项所述的方法，其中，在给予所述心肌细胞的心脏移植物之前

开始伊伐布雷定的给予。

[0178] 9.如段落1-5中任一项所述的方法,其中,在给予所述心肌细胞的心脏移植物之前开始胺碘酮和伊伐布雷定两者的给予。

[0179] 10.如段落1-5中任一项所述的方法,其中,在给予所述心肌细胞的心脏移植物的同时或之后开始伊伐布雷定的给予。

[0180] 11.如段落1-5中任一项所述的方法,其中,在给予所述心肌细胞的心脏移植物的同时或之后开始胺碘酮的给予。

[0181] 12.如段落1-11中任一项所述的方法,其中,胺碘酮的给予为单次推注给予。

[0182] 13.如段落1-11中任一项所述的方法,其中,所述给予为连续给予或重复给予。

[0183] 14.如段落1-13中任一项所述的方法,其中,所述给予为口服给予和/或静脉内注射。

[0184] 15.如段落1-14中任一项所述的方法,其中,胺碘酮以100-800mg的剂量口服给予,每天3次。

[0185] 16.如段落1-14中任一项所述的方法,其中,胺碘酮通过IV推注以100-300mg的剂量给予。

[0186] 17.如段落1-15中任一项所述的方法,其中,胺碘酮以1.5-2.5μg/ml的血清浓度给药。

[0187] 18.如段落1-17中任一项所述的方法,其中,伊伐布雷定以5-15mg的剂量口服给予,每天两次。

[0188] 19.如段落1-18中任一项所述的方法,其中,当存在心动过速时给予伊伐布雷定。

[0189] 20.如段落1-19中任一项所述的方法,其中,给予伊伐布雷定,以维持小于或等于每分钟搏动150次(bpm)的静息心率。

[0190] 21.如段落1-20中任一项所述的方法,其中,相对于接受相同类型细胞的移植物但未有胺碘酮和伊伐布雷定给予的受试者,胺碘酮和伊伐布雷定的给予将移植物接受者经历的移植后加速心率降低至少10%。

[0191] 22.如段落1-21中任一项所述的方法,其中,相对于接受相同类型的心肌细胞移植物但未有胺碘酮和伊伐布雷定给予的受试者相比,胺碘酮和伊伐布雷定的给予将所述受试者经历植入性心律失常的时间比例降低至少10%。

[0192] 23.如段落1-22中任一项所述的方法,其中,胺碘酮和伊伐布雷定的给予为短期的。

[0193] 24.如段落1-22中任一项所述的方法,其中,在植入性心律失常负荷达到零后终止胺碘酮和伊伐布雷定的给予,而心律失常没有复发。

[0194] 25.一种心肌细胞移植的方法,所述方法包括:

[0195] a)将体外分化的心肌细胞给予至有需要的受试者的心脏组织;

[0196] b)向所述受试者给予一定量的胺碘酮和一定量的伊伐布雷定,以有效减少受试者的植入性心律失常。

[0197] 26.如段落25所述的方法,其中,相对于接受体外分化的心肌细胞而未接受胺碘酮和伊伐布雷定的受试者而言,所述受试者中的植入性心律失常减少。

[0198] 27.如段落25或26中任一项所述的方法,其中,所述体外分化的心肌细胞由胚胎干

细胞或由iPS细胞在体外分化而来。

[0199] 28.如段落27所述的方法,其中,所述iPS细胞对于所述受试者而言为自体的。

[0200] 29.如段落27所述的方法,其中,所述iPS细胞对于所述受试者而言为同种异体的。

[0201] 30.如段落25-29中任一项所述的方法,其中,胺碘酮和伊伐布雷定与所述体外分化的心肌细胞同时给予。

[0202] 31.如段落25-29中任一项所述的方法,其中,在给予所述体外分化的心肌细胞之前开始胺碘酮的给予。

[0203] 32.如段落25-29中任一项所述的方法,其中,在给予所述体外分化的心肌细胞之前开始伊伐布雷定的给予。

[0204] 33.如段落25-29中任一项所述的方法,其中,在给予所述体外分化的心肌细胞之前开始胺碘酮和伊伐布雷定两者的给予。

[0205] 34.如段落25-29中任一项所述的方法,其中,在给予所述体外分化的心肌细胞的同时或之后开始伊伐布雷定的给予。

[0206] 35.如段落25-29中任一项所述的方法,其中,在给予所述体外分化的心肌细胞的同时或之后开始胺碘酮的给予。

[0207] 36.如段落25-35中任一项所述的方法,其中,伊伐布雷定的给予为单次推注给予。

[0208] 37.如段落25-36中任一项所述的方法,其中,所述给予为连续给予或重复给予。

[0209] 38.如段落25-37中任一项所述的方法,其中,所述给予为口服给予和/或静脉内(IV)注射。

[0210] 39.如段落25-38中任一项所述的方法,其中,以100-800mg的剂量口服给予胺碘酮,每天3次。

[0211] 40.如段落25-39中任一项所述的方法,其中,以100-300mg的剂量通过IV推注给予胺碘酮。

[0212] 41.如段落25-40中任一项所述的方法,其中,以1.5至2.5μg/mL的血清浓度给予胺碘酮。

[0213] 42.如段落25-41中任一项所述的方法,其中,以5-15mg的剂量口服给予伊伐布雷定,每天两次。

[0214] 43.如段落25-42中任一项所述的方法,其中,当存在心动过速时给予伊伐布雷定。

[0215] 44.如段落25-43中任一项所述的方法,其中,给予伊伐布雷定以维持小于或等于每分钟搏动150次(bpm)的静息心率。

[0216] 45.如段落25-44中任一项所述的方法,其中,胺碘酮和伊伐布雷定的给予为短期的。

[0217] 46.如段落25-45中任一项所述的方法,其中,在植入性心律失常负荷达到零后终止胺碘酮和伊伐布雷定的给予,而心律失常没有复发。

[0218] 47.如段落1-46中任一项所述的方法,其中,将约1000万个心肌细胞至约100亿个心肌细胞给予所述受试者。

[0219] 48.如段落1-47中任一项所述的方法,其中,所述受试者为人。

[0220] 49.如段落1-48中任一项所述的方法,其中,所述受试者具有心血管疾病或心脏事件或处于具有心血管疾病或心脏事件的风险中。

[0221] 50.如段落49的方法,其中,所述心血管疾病或所述心脏事件选自于由如下所组成的组:动脉粥样硬化性心脏病、心肌梗死、心肌病、心脏心律失常、瓣膜狭窄、先天性心脏疾病、慢性心力衰竭、反流、缺血、纤颤和多形性室性心动过速。

[0222] 51.一种组合物,所述组合物包含体外分化的心肌细胞、胺碘酮和伊伐布雷定。

[0223] 实施例

[0224] 实施例1:胺碘酮/伊伐布雷定疗法减少移植物相关的心律失常

[0225] 心肌细胞替代疗法是一个积极研究的领域,并且可在心肌梗塞后恢复心脏功能。人多能干细胞(hPSC)可用作体外生产人心肌细胞的起始材料。心肌梗死的大型动物模型已经证明了这种候选治疗剂的恢复潜力(Chong等,2014;Shiba等,2016;Liu等,2018)。然而,hPSC来源的心肌细胞在电生理上不成熟,并在大型动物模型中引发心脏心律失常(同上,Romagnuolo等,2019)。这些移植物诱发的心律失常在移植hPSC来源的心肌细胞不久后出现,并短暂持续3-4周,在此期间接受者有心源性猝死和心力衰竭的风险。假设观测到的恢复正常窦性心律反映了移植的hPSC来源心肌细胞的体内成熟,并表明与宿主心肌完全电整合。

[0226] 减少这些短暂的移植物相关心律失常可显著提高这种治疗剂在心肌梗死患者中的安全性。虽然有许多抗心律失常药物可供心脏疾病患者使用,很难预测它们在心肌细胞替代疗法中的功效,因为未成熟心肌细胞的移植不同于任何自然发生的心脏疾病病理或先前的疗法。因此,需要凭经验确定对此有效的一种或多种抗心律失常药物。本申请描述了两种药物的组合,可降低猪中由hPSC来源的心肌细胞移植引起的心率加速和心律失常负荷。

[0227] 实验设计:使用重30-40kg的尤卡坦小型猪来建模心肌梗死。为此,使用经皮冠状动脉腔内成形术球囊使动物的左前降支冠状动脉经历90分钟的阻塞。植入的心电描记术设备允许在研究期间连续远程监测心脏。在梗死形成后两周给予hPSC来源的心肌细胞,并对猪进行免疫抑制,以防止移植细胞的免疫排斥。通过经皮经心内膜注射递送共计5亿个心肌细胞。按照设计,移植后研究持续时间为至少30天。对照组(n=6)未接受任何抗心律失常药物。处理组(n=6)接受由如下所组成的联合抗心律失常药物疗法:负荷和维持剂量的胺碘酮,目标血清水平为1.5和2.5μg/mL,以及每天两次5-15mg的口服伊伐布雷定。

[0228] 新发现:发现胺碘酮/伊伐布雷定疗法的使用降低了经处理猪的心率加快和心律失常负荷。这反映在研究过程中处理动物和对照动物的以下汇总数据中(图1A-图1B)。最令人惊讶的结果是胺碘酮/伊伐布雷定组合对死亡率的影响(图2)。在没有胺碘酮/伊伐布雷定疗法的情况下,六只对照猪中的两只死于心室颤动(图9,图11),四只存活(图10,图12-图14)。相比之下,用胺碘酮和伊伐布雷定处理的六头猪中没有一头死于心血管并发症(图3-图8)。

[0229] 结果:本文提供了本研究中个体动物的数据(图1A-图14)。注意,处理组中的最后两只动物(胺碘酮±伊伐布雷定)由于与免疫抑制相关的并发症(CMV感染再激活)而被安乐死,并且在病因学上不是心脏疾病(图7-图8)。

[0230] 总之,本文提供的结果显示与未处理的动物相比,胺碘酮和伊伐布雷定疗法降低了接受心脏移植物的动物的心率和心律失常负荷(图1A-图1B),并且这些抗心律失常药剂的组合提高了接受细胞替代疗法的动物的存活(图2)。

[0231] 参考文献

[0232] Chong,JJ,Yang X,Don CW,Minami E,Liu YW,Weyers JJ,Mahoney WM,Van Biber B,Palpant NJ,Gantz JA,Fugate JA,Muskheli V,Gough GM,Vogel KW,Astley CA,Hotchkiss CE,Baldessari A,Pabon L,Reinecke H,Gill EA,Nelson V,Kiem HP,Laflamme MA,Murry CE(2014)Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts.Nature 510(7504):273-277.

[0233] Liu YW,Chen B,Yang X,Fugate JA,Kalucki FA,Futakuchi-Tsuchida A,Couture L,Vogel KW,Astley CA,Baldessari A,Ogle J,Don CW,Steinberg ZL,Seslar SO,Tuck SA,Tsuchida H,Naumova A,Lyu MS,Lee J,Hailey DW,Reinecke H,Pabon L,Fryer BH,MacLellan WR,Thies RS,Murry CE(2018)Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates.Natutre Biotech 36(7):597-605.

[0234] Romagnuolo R,Masoudpour H,Porta-Sanchez A,Qiang B,Barry J,Laskary A,Qi X,Masse S,Magtibay K,Kawajiri H,Wu J,Sadikov TV,Rothberg J,Panchalingham KM,Titus E,Ren-Ke L,Zandstra PW,Wright GA,Nanthakumar K,Ghugre NR,Keller G,Laflamme MA(2019)Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes regenerate the infarcted pig heart but induce ventricular tachyarrhythmias.Stem Cell Reports 12:1-15

[0235] Shiba Y,Gomibuchi T,Seto T,Wada Y,Ichimura H,Tanaka Y,Ogasawata T,Okada K,Shiba N,Sakamoto K,Ido D,Shiina T,Ohkura M,Nakai J,Uno N,Kazuki Y,Oshimura M,Minami I,Ikeda U(2016)Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts.Nature 538(7625):388-391.

[0236] 实施例2:经测试用于治疗植入性心律失常的抗心律失常药物

[0237] 使用重30-40kg的尤卡坦小型猪来建模心肌梗死。为此,使用经皮冠状动脉腔内成形术球囊使动物的左前降支冠状动脉经历90分钟的阻塞。植入的心电描记术设备允许在研究期间连续远程监测心脏。在梗死形成后两周给予hPSC来源的心肌细胞,并对猪进行免疫抑制以防止移植细胞的免疫排斥。通过经皮经心内膜注射递送共计有5亿个心肌细胞。对照组不接受任何抗心律失常药物,而处理组给予表1所示的抗心律失常药。测试了许多抗心律失常疗法,以确定它们在治疗和预防植入性心律失常方面的功效。表1总结了这些结果(如下)。

[0238] 表1:抗心律失常试验

[0239]

测试的模型	抗心律失常药	浓度	结果
猪	利多卡因（Ib）	100 mg IV	适度的 HR 效果，罕见心脏复律
猪	氟卡尼（Ic）	2 mg/kg PO, 4 mg/kg PO, 6 mg/kg PO, 10 mg/kg PO	关于HR或EA负荷没有反应
猪	普罗帕酮（Ic）	1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV, 3 mg/kg IV	关于 HR 无反应，短暂心脏复律 *剂量限制的呕吐
猪	**胺碘酮（III）**	**150 mg IV**	**适度的 HR 效果，经常性的心脏复律**
猪	索他洛尔（III）	1 mg/kg PO, 2 mg/kg PO, 4 mg/kg PO	关于HR或EA负荷没有反应
猪	美托洛尔（β_1AR）	5 mg IV, 25 mg PO BID, 50 mg PO BID, 75 mg PO BID	中等HR效果（仅IV），关于EA负荷没有反应
猪	**伊伐布雷定（I_f）**	**2.5 mg PO, 5 mg PO BID, 10 mg PO BID, 15 mg BID;** 1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV	**强大的剂量依赖性 HR 效果*（仅 PO），关于 EA 负荷无反应 *严重的窦性心动过缓、R-on-T 事件和多形性 VT**
猪	丹曲林（RyR_1）	2 mg/kg IV	关于HR或EA负荷没有反应
非人类灵长类动物	维拉帕米（CCB）		心源性猝死

[0240] 当单独给药时，胺碘酮对降低心率产生中度效果并提供心脏复律。伊伐布雷定能够减慢心率，但对降低植入模型的心律失常负荷没有重大影响。测试的其他抗心律失常药对植入动物的心率或降低心律失常负荷有中度或无显著影响。

[0241] 从所测试的药物中，发现胺碘酮和口服伊伐布雷定的组合在降低猪的心率和心律失常负荷方面最有效。特别地，发现以下胺碘酮和伊伐布雷定的疗法方案在植入动物模型中是最有成效的(也参见图15)。

[0242] 猪

[0243] 节律/速率控制:胺碘酮200-1200mg BID PO开始日移植-7

[0244] 滴定至谷目标1.5-2.5μg/mL

[0245] 速率控制:伊伐布雷定2.5-15mg PO BID prn HR≥150

[0246] 滴定至HR目标<125bpm

[0247] 为了比较，胺碘酮和伊伐布雷定在人受试者中的典型临床剂量如下所列：

[0248] 人

[0249] 节律/速率控制:胺碘酮100-800mg TID PO开始日移植-7

[0250] 速率控制:伊伐布雷定5-15mg PO BID prn心动过速。

[0251] 总之，与未用胺碘酮和伊伐布雷定处理的动物相比，胺碘酮和伊伐布雷定的特定

组合降低了接受细胞疗法的动物的心率并降低了植入性心律失常负荷(图1A-图2)。

[0252] 实施例3:用于由人类心肌细胞移植引起的植入性心律失常的药物疗法

[0253] 背景在用于心肌梗死的人多能干细胞来源的心肌细胞(hPSC-CM)的心肌内移植的大型动物研究中,观测到植入性心律失常(EA)。虽然是短暂的,但EA带来的风险对临床转化构成了障碍。

[0254] 方法通过手术或经皮递送将hPSC-CM移植到梗死的猪心脏中,以诱导EA。在筛选抗心律失常药剂后,进行了一项前瞻性研究,以确定胺碘酮加伊伐布雷定在预防心源性死亡和抑制EA方面的有效性。

[0255] 结果在所有受试者中均观测到EA,胺碘酮-伊伐布雷定处理耐受性良好。与对照同期群中的5/8(62.5%)相比,经处理的受试者均未经历心源性死亡、不稳定EA或心力衰竭的主要终点(风险比0.00;95%置信区间,0-0.297;p=0.002)。包括处理同期群中两名感染死亡在内的总存活显示出由处理而来的改善(风险比0.21;95%置信区间,0.03-1.01;p=0.05)。未经处理的情况下,峰心率平均为305±29次搏动/min,而在经处理的动物中,峰心率显著地被限制为185±9次搏动/min(p=0.001)。类似地,处理将峰EA负荷从96.8±2.9%降低到76.5±7.9%(p=0.03)。抗心律失常的处理在约1个月的处理后安全停止,并且心律失常未复发。

[0256] 结论胺碘酮和伊伐布雷定联合的药物疗法可显著降低hPSC-CM移植后植入性心律失常和相关后遗症的风险。

[0257] 引言

[0258] 在美国和世界各地,心肌梗死(MI)仍然是心力衰竭和死亡的主要原因(1)。在MI期间,大约有10亿个心肌细胞永久丢失,通常导致衰弱性心力衰竭。目前的治疗可减缓心力衰竭的起始和进展,但没有一种方法替代丢失的心肌,原位心脏移植短缺,这在可用性和适应症方面仍然受到限制(2)。人多能干细胞(hPSC,包括胚胎干细胞[ESC]及其重编程表亲,诱导多能干细胞(iPSC))是心肌细胞(CM)的可再生来源。将hPSC来源的心肌细胞(hPSC-CM)移植到小动物(小鼠、大鼠、豚鼠)的梗死心肌中已显示出稳定的植入(3-7)。已经描述了移植人多能干细胞hPSC-CM后梗死非人类灵长类动物(NHP)的再肌化和功能益处(8-10)。除了功能性再肌化外,人移植物在移植后1个月内血管化并与宿主心肌发生电机械耦合,并保持多达至少3个月的耐用性。

[0259] 尽管在较小的动物中没有观测到心律失常,但本发明人和其他人始终观测到在hPSC-CM移植到NHP(8-10)和猪(11)中后的异位心律失常,这在本文中被称为植入性心律失常(EA)。EA通常是短暂的,在移植一周内发生,通常在一个月后自发消退。基于电标测、超速起搏和心脏复律研究,EA似乎集中起源于移植物或移植物周围的心肌,并作为自动病灶而不是折返通路发挥作用(9,11)。尽管EA在NHP中的耐受性相当好,但Laflamme团队(11)报道EA在一些猪中可能是致命的。因此,EA已成为人心肌细胞移植临床转化的最大障碍(12)。

[0260] 因为猪对EA表现出提高的敏感性,并且因为它是心血管研究(13)和细胞疗法(14)中公认的模型,其较大的尺寸允许使用经皮递送导管,在这种大型动物模型中测试了缓解EA风险和后遗症的方法。在研究的第一阶段,筛选了一组抗心律失常药剂。胺碘酮和伊伐布雷定分别独立成为控制节律和速率的最有希望的药剂。进行第二阶段测试以确定联合胺碘酮和伊伐布雷定治疗的效果。有趣的是,这种方案减少了心源性猝死,并阻抑心动过速和心

律失常。

[0261] 方法

[0262] hESC-CM生产

[0263] 在该研究中使用了两个hESC细胞系。如前所述(8,9,15)，最初的受试者接受了H7(WiCell)来源的心肌细胞，这些细胞在悬浮培养中被培养、扩增和分化。大多数受试者接受在搅拌悬浮培养形式中的RUES2(Rockefeller University)来源的心肌细胞。简而言之，培养RUES2 hESC以形成聚集体并在市售培养基(Gibco Essential 8)中扩增。对于心脏分化，通过定时使用小分子GSK-3抑制剂和Wnt/β-连环蛋白信号通路抑制剂(Tocris)，在补充有B-27(Gibco)或血清白蛋白的RPMI-1640(Gibco)、MCDB-131(Gibco)或M199(Gibco)中诱导悬浮适应的多能聚集体分化。冷冻保存之前24小时，对RUES2 hESC-CM进行热休克，以提高其在收获、冷冻保存、解冻和移植后的存活。心肌细胞聚集体通过用Liberase TH(Fisher)和TrypLE(Gibco)处理而解离，并使用可控速率的液氮冷冻机在补充有10μM MY-27632(Stem Cell Technologies)的CryoStor CS10(Stem Cell Technologies)中冷冻保存。移植前约3小时，将冷冻保存的hESC-CM从低温储存(-150℃至-196℃)中取出，并在37℃水浴中解冻(2min±30s)。将补充有B-27和≥200Kunitz Units/mL DNase I(Millipore)的RPMI-1640添加到细胞悬浮液中以稀释冷冻保存培养基。随后的洗涤步骤使用体积逐渐减小的RPMI-1640基础培养基进行，以浓缩细胞悬浮液。对于最后的离心步骤，将细胞沉淀重新悬浮在足够体积的RPMI-1640中，以达到在1.6mL中注射约0.3×10^9个细胞/mL的目标细胞密度。在一种情况下，将较大剂量的细胞重新悬浮在补充有血清白蛋白的RPMI中，以在大约2.3mL中达到0.43×10^9个细胞/mL的密度。细胞悬浮液的最终体积由在最终离心步骤之前采样的计数结果确定。如前所述进行细胞计数以达到500×10^6个活细胞的最终总剂量(9)。

[0264] 研究设计

[0265] 本研究的目的是确定减轻心脏再肌化疗法后的心律失常的药物方案。该研究设计为两个阶段：第一阶段，观察EA的自然病程并筛选各种抗心律失常药剂的功效，以及第二阶段，测试功效(图16)。所有受试者均为6-13个月大的30-40kg去势雄性尤卡坦小型猪(S&S农场)。在阶段1，9头受试者经历了500×10^6hESC-CM的心脏再肌化疗法，所述hESC-CM通过直接手术经心外膜注射或以后通过经皮经心内膜注射递送。跟踪前四头受试者(一头未梗死和三头梗死)了解EA的自然病程，并为阶段2药物试验建立临床终点和参数。随后的五头受试者经历了抗心律失常药剂的系统性给药，并用连续心电描记术(ECG)监测来确定对节律和速率的影响(表2)。在阶段1的9头受试者中，观测到高死亡率，9头中有6个经历心室颤动(VF)或心动过速诱导的心力衰竭，需要安乐死。VF与不稳定的EA>350搏动次/分钟(bpm)的频繁非持续性发作和具有慢性心率升高>150bpm的心力衰竭相关，这可能是心动过速诱导的。基于阶段1的可喜结果，阶段2作为前瞻性试验药物试验开始，以预防EA相关的死亡率。

[0266] 表2-药物、剂量和效果

[0267]

药物	剂量	效果
利多卡因（Ib）	100 mg IV	适度的 HR 效果，罕见心脏复律
氟卡尼（Ic）	2 mg/kg PO, 4 mg/kg PO, 6 mg/kg PO, 10 mg/kg PO	关于 HR 或 EA 负荷没有反应
普罗帕酮（Ic）	1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV, 3 mg/kg IV	关于 HR 无反应，短暂心脏复律 *
胺碘酮（III）	150 mg IV	适度的心率效果，经常性的心脏复律
索他洛尔（III）	1 mg/kg PO, 2 mg/kg PO, 4 mg/kg PO	关于 HR 或 EA 负荷没有反应
美托洛尔（β_1AR）	5 mg IV, 25 mg PO BID, 50 mg PO BID, 75 mg PO BID	中等 HR 效果（仅 IV），关于 EA 负荷没有反应
伊伐布雷定（I_f）	2.5 mg PO, 5 mg PO BID, 10 mg PO BID, 15 mg BID; 1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV	强大的剂量依赖性 HR 效果（仅 PO）*，关于 EA 负荷无反应

[0269] *在治疗剂量下观测到严重的恶心/呕吐，限制了临床应用

[0270] **严重心动过缓

[0271] 缩写：β_1AR，β1-肾上腺素能受体；BID，每天两次；HR，心率；EA，植入性心律失常；I_f，funny电流；PO，口服；RyR_1，ryanodine受体1；VT，室性心动过速

[0272] 在阶段2，用胺碘酮和伊伐布雷定进行了两种药物的抗心律失常研究，并入组了另外15个受试者(7个处理，6个未处理和2个假手术移植)，它们经历了MI以及在MI后两周的经皮hESC-CM再肌化。两个另外的受试者经历了假手术载体注射的MI，以用作假手术移植对照(图16，图17)。主要终点被预先设定为合并心源性死亡(心律失常或心力衰竭导致的自发性死亡，或因心动过速>350bpm或心力衰竭迹象而需要进行临床指导的安乐死之一)。预定的次要终点是心动过速的抑制、心律失常的时间百分比(心律失常负荷)和心律失常的消退，称为电成熟，定义为心律失常负荷连续48小时<25％。在电成熟后或移植后第30天(以较早者为准)停止抗心律失常疗法。为防止死亡率过高，滴定治疗以将目标心率和心律失常负荷分别维持在<150bpm和<25％。根据早期经验，心动过速>350bpm经常脱变为VF，如果达到心率>350bpm，则对受试者人道地实施安乐死。监测了连续遥测ECG(MI后两周和移植后六周)，共八周。值得注意的是，受试者1和受试者2(未处理)以及受试者3和受试者4(精处理)接受了H7 hESC-CM，受试者1、受试者2和受试者3在采用经皮递送之前进行了手术移植。受试者5在第37天被安乐死，作为电成熟后的预设终点，然后将研究持续时间延长至移植后6周以延长治疗清除和监测。

[0273] 动物护理

[0274] 所有方案均根据University of Washington(UW)Office of Animal Welfare and the Institutional Animal Care and Use Committee批准和实施。动物接受自由饮用的水并每天喂食两次(Lab Diet-5084 Laboratory Porcine Grower Diet)。对于外科手术，用肌内布托啡诺、乙酰丙嗪和氯胺酮联合诱导麻醉。动物被插管并使用异氟醚和氧进行

机械通气以维持麻醉手术面。在每个手术过程中连续监测生命体征。所有动物都接受皮下丁丙诺啡SR-Lab(ZooPharm)用于术后镇痛,并通过静脉内Euthasol(Virbac)实施安乐死。所有尸检均由盲法委员会认证的兽医病理学家(blinded board-certified veterinary pathologist)进行。

[0275] 猪心肌梗死模型

[0276] 如先前所述,在NHP(9)中诱导经皮缺血/再灌注损伤,并针对猪模型进行了修改。在股三角制作5-8cm的切口,通过钝性解剖暴露股动脉。在获得血管通路之前,给予肝素以实现治疗性抗凝(活化凝血时间>250秒)。将5-French导丝/导引器护套系统(Terumo Medical)放入股动脉并固定。在整个过程中监测连续ECG、有创动脉血压、脉搏血氧饱和度测定术和碳酸描绘法(capnography)。缺血前以单次推注给予静脉内胺碘酮150mg和利多卡因100mg,以使心律失常风险最小化。在透视引导(OEC 9800 Plus,GE Medical Systems)下,将5-French Judkins right 2或曲棍球棒引导导管(Boston Scientific)推进到升主动脉,以选择性地接合左侧主冠状动脉的开口。使用手动注射造影剂(Visipaque)进行冠状动脉造影,并将0.035”冠状动脉导丝(Runthrough NS Extra Floppy,Terumo Medical)放入远端左冠状动脉前降支(LAD)。然后将适当大小的血管成形术球囊导管置于第一对角分支动脉远端的LAD中段,并充气至血管造影证实的完全阻塞远端灌注所需的最小压力。缺血通过ECG上ST段抬高得到证实。动物在通气和血流动力学支持的麻醉下维持90分钟,然后将球囊放气以恢复远端灌注,再次通过透视和ECG确认。观测动物的再灌注心律失常,如果发生心室颤动,则进行体外心脏复律。在恢复之前,所有受试者都接受了植入式遥测单元和中心静脉导管放置。简而言之,暴露颈静脉沟中的颈外静脉,插入5-French中心静脉导管(Access Technologies)并通过隧道引出至肩胛前区背侧。使用颈静脉沟中的相同切口将遥测发射器(EMKA easyTEL+)植入皮下袋中,皮下导联通过隧道来捕获心尖至心底。包括梗死在内的总体手术死亡率<10%。

[0277] 心脏再肌化疗法

[0278] 如先前针对NHP所述,稍作修改(9),三个初始受试者(1-3)的细胞移植通过直接经心外膜注射到梗死周围区域进行的。简而言之,进行部分正中胸骨切开术以暴露梗死的左心室前部。荷包缝合线预先放置在LAD对应的五个离散位置,针对中央缺血区域和侧边界区域。将荷包缝合紧紧地绕在针头上后,通过部分退出和横向重新定位进行3次每次100μL的注射,总共注射15次以递送500×10^{6}hESC-CM的总剂量。所有后续受试者(4-19)使用NOGA-MyoStar平台(BioSense Webster)通过经皮经心内膜注射接受细胞移植,首先绘制左心室中梗死区域,然后进行16次离散心内膜注射,每次100μL,总剂量500×10^{6}hESC-CM。只有在位置和环路稳定性极佳、ST段抬高和存在室性早搏(PVC)的情况下进行注射,并通过电解剖图和单极电压将针插入适当的位置。对于手术和经皮细胞移植,三分之二的注射液被放置在视觉上或通过5-7.5mV的单极电压定义的梗死周围边界区域中,其余的三分之一进入视觉上或按照单极电压<5mV定义的中央缺血区域。两个受试者(9和10)按照方案发生梗死,但接受了不带细胞的RMI-1640载体的假手术注射作为假手术移植对照。

[0279] 免疫抑制疗法

[0280] 如先前描述的修改(9),所有受试者接受三药免疫抑制方案以预防异种移植排斥。对于初始方案(受试者1-受试者6),在细胞移植前5天,开始口服环孢素A,以在研究期间维

持>400ng/mL(约250-1000mg,每天两次)的血清谷水平。移植之前两天,以3mg/kg开始口服甲基强的松龙,持续两周,然后在剩余的研究中滴定至1.5mg/kg。在移植当天,静脉内给予阿巴西普(CTLA4-Ig,Bristol-Myers Squibb)12.5mg/kg,此后每两周给药一次。由于与免疫抑制相关的并发症(主要是猪巨细胞病毒和肺孢子菌肺炎),对于受试者7-受试者19,环孢素A谷浓度降至>300ng/mL,甲基强的松龙降至1.0mg/kg,没有组织学排斥证据。对所有受试者给予预防性口服头孢氨苄,以防止留置中心静脉导管感染。在受试者3出现肺孢子菌肺炎后,添加了预防性磺胺甲噁唑/三甲氧苄啶。在受试者6中发现内源性猪巨细胞病毒激活后,添加了预防性缬更昔洛韦(valganciclovir)和益生菌。

[0281] 抗心律失常治疗

[0282] 在细胞移植前7天开始,治疗对象每天两次口服加载口服胺碘酮1000-1200mg,然后每天两次口服400-1000mg的维持剂量,以维持1.5-4.0μg/mL的稳态血浆水平(图18)。当持续性心动过速达到≥150bpm时,以2.5mg开始每天两次口服伊伐布雷定,每3天滴定至15mg,每天两次,目标心率<125bpm。除一个受试者(受试者1)外,所有受试者都需要辅助伊伐布雷定,以进行额外的心率控制。在达到电成熟后或移植后第30天(以较早者为准)停用抗心律失常药,以允许治疗清除并评估心律失常的复发。所有受试者均耐受抗心律失常方案,无并发症。未经处理和假手术移植对照受试者在MI手术后没有接受抗心律失常药剂,但接受了所有免疫抑制和标准护理。

[0283] 胺碘酮药物监测

[0284] 建立了用胺碘酮的新的液相色谱-质谱测定法,以监测猪模型中的稳态血清水平,并指导口服给药以确保功效,并避免剂量相关的毒性。从先前的人体药代动力学研究推断出1.5-4.0μg/mL的目标血清水平(16,17)。还通过在6头猪(受试者6、受试者7、受试者8、受试者13、受试者14、受试者16)中获得每周谷浓度来研究停止口服胺碘酮疗法后的消除动力学(图18)。

[0285] 心电描记术(ECG)分析

[0286] 从心肌梗死开始实时连续监测遥测ECG,以检测心脏死亡或不稳定EA的主要终点。由委员会认证的心脏病专家使用ecgAUTO 3.3.5.10软件包(EMKA Technologies)离线执行心率和心律失常负荷的自动量化。心律失常被定义为异位搏动(例如室性早搏)或节律(例如室性节律、室性心动过速)。EA通常被观察为具有不同速率和形态的持续性和非持续性室性快速性心律失常,但也包括缓慢和狭窄的复杂异位节律(图19)。每五分钟对心率和心律失常负荷连续两分钟进行量化(计算总节律的40%),并以每日平均值表示。

[0287] 组织学分析

[0288] 组织学研究如前所述进行,并进行修改(8,9)。简而言之,在以2.5mm的间隔切割短轴横截面之前,解剖多聚甲醛固定的心脏以去除心房和右心室。在进一步划分成组织盒之前获得整个心脏、左心室和每个切片的重量。然后对组织进行处理,包埋在石蜡中,并切下4μm切片进行染色。对于形态测量,梗死区域通过picrosirius red染色进行鉴定;通过抗人心肌肌钙蛋白T鉴定人移植物,使用抗生物素蛋白-生物素反应(ABC试剂盒,VectorLabs)染色,然后通过二氨基联苯胺(Sigmafast,Sigma Life Science)进行显色检测(图20)。使用整张玻片扫描仪(Nanozoomer,Hamamatsu)对玻片进行数字化,并使用NDP.view 2.6.13(Hamamatsu)查看和导出图像。使用ImageJ开源软件平台(18)中的自定义编写算法分析梗

死和移植物区域。简而言之，在以TIFF格式(19)提取图像后，图像前景被分割成阈值，该阈值源自其像素的亮度分布，从而产生描绘成像组织切片的二进制掩码。随后通过对色调、亮度和饱和度进行阈值处理的颜色去卷积允许分割被Picro-Sirius Red染色剂染色的区域或免疫标记人心肌肌钙蛋白-T的区域。为了将瘢痕与弥漫性纤维化分开，应用了粒径的截止值。梗死大小和移植物大小计算为(面积百分比×块重量)，对整个心室求和，并分别表示为左心室质量或梗死质量的百分比。请参阅浦肯野纤维染色的补充方法。

[0289] 统计学分析

[0290] 使用Prism 8.4.2软件(GraphPad)和Stata 15(StataCorp,College Station,Texas)进行统计学分析和绘图。数据表示为平均值±平均值的标准差(SEM)。除非另有说明，否则使用显著性阈值P<0.05的双尾学生t检验进行比较。误差条图显示了两个处理组中心率和心律失常负荷的平均值±SEM如何随时间变化。Kaplan-Meier图显示了主要终点心源性死亡、不稳定EA或心力衰竭以及全因死亡率的生存曲线。Cox比例回归模型用于估计两个处理组之间的主要结果和死亡率的风险比(HR)。显著性基于似然比检验，HR的置信区间是通过反转似然检验来计算的，基于在Stata中改变stcox程序中的偏移项。

[0291] 结果

[0292] 在梗死猪模型中经皮递送hESC-CM

[0293] hESC-CM的基于导管的心内膜递送在使梗死的猪心脏再肌化方面是安全和有效的(图20)。在处理组之间未观测到心肌梗死或心肌细胞移植物大小的显著差异。处理同期群和未处理同期群的平均梗死大小相当，分别为左心室的11.7±1.1％和10.5±2.0％(p＝0.59)。对于处理和不处理，移植物大小相对于梗死大小也相当，分别为2.3±0.7％和2.8±1.3％(p＝0.74)。hESC-CM的递送按预期成功靶向梗死周围边界区和中央缺血区域，并导致如先前报道的那样将离散的hPSC-CM移植物移植到宿主心肌中(8-11)。如先前报道的在猪中的(11)，所有移植物均位于前壁、前间隔和前侧壁，并且在移植后2周前的早期时间点出现结构不成熟，伴随着成熟度的增加至研究结束。

[0294] 植入性心律失常的临床病程

[0295] 研究中所有动物的流程图显示在图16中。在经历了心肌梗死和经皮心内注射载体的两名假手术移植受试者(9和10)中没有发现明显的心律失常。所有接受人心肌细胞移植物的受试者在细胞移植后2-6天之间都发展出EA。EA的起始以非持续性VT的齐射为特征，这通常进展为持续VT期，速率范围为110-250bpm(图19)。VT通常是多态的，同一只动物在不同时间表现出不同的电轴和宽窄复合心动过速。在8只未经处理的动物中有4只，由于预先指定的不稳定心动过速终点(定义为持续心率>350bpm)，EA要么是致命的，要么是必需安乐死。在另外一个未处理的病例(受试者12)中，在以300bpm的速率开始EA后不久，临床上注意到急性心力衰竭，根据兽医工作人员的建议，受试者被安乐死。随后在尸检时证实了心力衰竭的迹象。在所有其他情况下，注意到EA快速加速至>350bpm(受试者11和受试者12)，并且在两个病例下，在安乐死之前恶化至VF(受试者1和受试者2)(表3)。四分之三的心律失常终点发生在发展出EA的前三天内，并且它们发生在快速心律失常几乎恒定时。平均心率在移植后第8天达到峰值，之后开始下降，而心律失常负荷在第8-16天趋于平稳，此后开始正常化。在未经处理的同期群中的三个存活者中，两个没有使节律正常化，并且在研究结束时平均经历了42％的心律失常负荷(受试者15和受试者17)。在移植后第26天，未处理同期群中

的一个受试者(受试者11)使心率和节律正常化。

[0296] 表3-受试者结果

受试者	年龄–mo	体重–kg	MI	细胞系	方法	cTnT–%	存活率–%	梗死大小–%LV	移植物大小–%梗死	HR–bpm 第7天	HR–bpm 第30天	心律失常负荷—天的% 第7天	心律失常负荷—天的% 第30天	结果
处理														
3	7.7	34.7	Yes	H7	Surg	98%	89%	–	–	72.8	n/a	2.0	n/a	安乐死，第26天（PCP）
4	7.6	32.0	Yes	H7	Perc	98%	89%	–	–	92.7	93.9	86.0	97.8	存活
5	7.9	33.0	Yes	RUES2	Perc	91%	89%	–	–	162.6	80.9	25.6	0.5	存活
6	7.7	33.4	Yes	RUES2	Perc	91%	90%	10.1%	1.4%	99.6	n/a	47.1	n/a	安乐死，第19天（pCMV）
7	7.7	37.0	Yes	RUES2	Perc	91%	93%	9.6%	0.3%	89.4	78.6	45.8	28.2	存活
8	10.0	33.5	Yes	RUES2	Perc	86%	88%	15.9%	3.4%	72.8	77.4	67.6	4.7	存活
15	9.0	33.0	Yes	RUES2	Perc	89%	88%	10.9%	4.2%	79.4	75.7	35.4	44.9	存活
16	8.8	34.0	Yes	RUES2	Perc	88%	85%	14.6%	0.7%	74.2	68.6	43.9	7.6	存活
18	12.7	32.5	Yes	RUES2	Perc	94%	75%	9.3%	3.7%	69.0	78.2	1.6	1.6	存活
Avg±SEM	8.8±0.6	33.7±0.5				90±1%	87±2%	11.7±1.1%	2.3±0.7%	90.3±9.7	79±2.9	39.5±9.2	26.5±13.4	
无处理														
1	8.9	32.0	No	H7	Surg	98%	88%	–	–	328.2	n/a	100.0	n/a	主要终点第7天（VF）
2	10.5	32.0	Yes	H7	Surg	98%	90%	–	–	120.2	n/a	62.7	n/a	主要终点第18天（VF）
11	9.4	33.5	Yes	RUES2	Perc	82%	87%	9.7%	1.1%	165.6	n/a	94.0	n/a	主要终点第12天（EA）
12	9.5	35.0	Yes	RUES2	Perc	86%	90%	13.2%	1.0%	n/a	n/a	n/a	n/a	主要终点第5天（EA）
13	9.7	35.5	Yes	RUES2	Perc	87%	83%	16.5%	1.7%	162.0	82.6	95.9	1.9	存活
14	9.0	33.0	Yes	RUES2	Perc	87%	90%	4.6%	9.1%	n/a	n/a	n/a	n/a	主要终点第6天（EA/HF）
17	7.0	33.0	Yes	RUES2	Perc	98%	70%	13.5%	0.4%	106.0	115.2	49.1	75.7	存活
19	6.4	33.5	Yes	RUES2	Perc	92%	74%	5.4%	3.6%	98.5	84.3	71.5	51.7	存活
Avg±SEM	8.8±0.5	33.4±0.4				91±2%	84±3%	10.5±2%	2.8±1.3%	163.4±34.9	94±10.6	78.9±8.5	43.1±21.7	
P-value†	0.97	0.73				0.77	0.31	0.59	0.74	0.03	0.09	0.01	0.52	
假手术移植														
9	8.30	33.5	Yes	RUES2	Perc	n/a	n/a	–	n/a	71.5	67.6	0.8	0.0	存活
10	7.77	33.0	Yes	RUES2	Perc	n/a	n/a	–	n/a	76.5	69.4	1.2	0.8	存活
Avg±SEM	8.0±0.3	33.3±0.3								74±2.5	68.5±0.9	1.0±0.2	0.4±0.4	

[0297]

[0298] †处理vs不处理

[0299] 缩写:bpm,每分钟搏动;EA,植入性心律失常;hESC-CM,人胚胎干细胞来源的心肌细胞;HF,心力衰竭;HR,心率;MI,心肌梗死;surg,手术;PCP,肺孢子菌肺炎;pCMV,猪巨细胞病毒;perc,经皮;VF,心室颤动

[0300] 关于抗心律失常效果筛选药物

[0301] 在研究的阶段1,筛选了六种广泛靶向钠通道、钾通道和β-肾上腺素能受体的经典抗心律失常药剂对EA心率和节律的效果:利多卡因(Ib,钠通道抑制剂)、氟卡尼(Ic,钠通道抑制剂)、普罗帕酮(Ic,钠通道抑制剂)、胺碘酮(III,钾通道抑制剂)、索他洛尔(III,钾通道抑制剂)和美托洛尔(β1-肾上腺素能受体抑制剂)。此外,还测试了funny电流/HCN4通道拮抗剂伊伐布雷定(表1和表2)。这个系列并不意味着确定,而是为了快速识别候选药剂。将动物带入实验室,使其处于EA中,麻醉,并研究短期静脉输注抗心律失常药剂的效果。在三

个实例中，静脉内胺碘酮成功地将不稳定的EA从>350bpm心律转复为通常为窦性心律的较低心率，尽管是短暂的(图21A)。口服伊伐布雷定对心率表现出强大的剂量依赖性效果，但它不能恢复窦性心律(图21B)。其他五种药物(利多卡因、氟卡尼、索他洛尔和美托洛尔)在该筛查中没有显著效果。普罗帕酮在两种药物挑战中短暂降低了心率并恢复了窦性心律，但这种药物与大量胃肠道毒性有关，因此没有进一步研究(数据未显示)。

[0302] 胺碘酮-伊伐布雷定提高生存

[0303] 预期在研究的阶段2中，慢性胺碘酮与辅助伊伐布雷定将减少心源性死亡、不稳定EA>350bpm和心力衰竭的组合主要终点。共有9个接受处理、8个未经处理和2名假手术移植受试者参加了研究，具有相似的基线和细胞移植特征(表3)。如方法中详述，经处理的动物接受推注和维持剂量的胺碘酮，并根据需要给予伊伐布雷定以保持心率<150bpm。与未处理受试者的3/8(37.5％)相比，所有经处理受试者(100％)存活，并且没有主要心脏终点(图22A)。抗心律失常治疗的主要终点风险比为0.000(95％CI，0.000-0.297；p＝0.002)。值得注意的是，由于免疫抑制相关并发症(分别为肺孢子菌肺炎和猪巨细胞病毒)，两个经处理受试者(3和6)在移植后第19天和第26天经历了非心源性死亡。总存活的意向处理分析也有利于处理同期群，风险比为0.212(95％CI，0.030-1.007；p＝0.051)(图22B)。

[0304] 阻抑心动过速和心律失常负荷

[0305] 心率和心律失常负荷的合并的和个体受试者水平数据在图23A-图23B和图23C-图23D中提供。与未处理相比，抗心律失常处理的平均心率显著较低。未处理动物的平均心率在移植后第7天达到峰值，为163±35bpm，而处理组的心率平均为90±10bpm(p＝0.03)(表3和图23)。经处理动物的心率与MI和移植前的正常静息心率没有显著差异(84±1bpm，p＝0.21)。移植后，未处理动物的峰心率平均为305±29搏动次/min，而处理将心动过速显著限制为185±9搏动次/min(p＝0.001)(图23E)。心律失常负荷定义为心律失常占一天的百分比。处理将峰心律失常负荷从96.8±2.9％降低到76.5±7.9％(p＝0.03)(图23F)。在移植后第30天，没有注意到心率或心律失常负荷的差异，因为无论处理如何，大多数心律失常都已消退(图23A-图23B)(分别为p＝0.09和p＝0.52)。

[0306] 在达到电成熟且心律失常没有复发的所有经处理受试者中，到第30天安全地停止抗心律失常处理(图23)。两个经处理的受试者和两个未经处理的受试者(分别为3、4和15、17)在研究结束时未能电成熟，并表现出明显的心律失常。在这四只动物中，无论处理如何，心率都得到了很好的控制，并且它们一直存活到研究完成。在停药1周内，平均血清胺碘酮是亚治疗性的，在0.42±0.12μg/mL(图19)。

[0307] 移植物与宿主浦肯野传导系统的相互作用

[0308] 猪心肌中的hESC-CM移植物的显微镜检查显示与宿主猪心脏的弥散性浦肯野传导系统的相互作用(图24)。与之前的报道一致(20、21)，观测到整个左心室的壁内浦肯野纤维(PF)的网状网络(图24A；未显示的视频数据证实了整个天然猪心肌的网状网络)，其定位于与hESC-CM移植物非常接近(图24B；未显示的视频数据证实了以慢速骨骼肌钙蛋白I(ssTnI)为标志的hPSC-心肌细胞与连接蛋白40^{+}浦肯野纤维相互作用)。连接蛋白(Cx40)特异性染色浦肯野细胞间隙连接(20、22)，其中如预期的那样观测到较低的肌节含量和缺乏T小管(图25)。

[0309] 讨论

[0310] hPSC-CM的心肌内移植是使梗死心脏再肌化和恢复功能的有前景的策略(2)。这种预防和治疗心力衰竭的疗法将是解决大量未满足需求的开创性进展。在大型动物中的研究已经证明了长期疗效,但也确定了短暂但可能致命的心律失常的重要安全信号。如早期研究(9-11)所示,EA是心肌梗死的心脏再肌化疗法的可预测并发症(23)。在NHP中,EA通常表现为具有可变电轴的广泛复杂性心动过速(8,9),最近Laflamme实验室在猪中重现了这种情况(11)。由于随着源自不同的移植病灶的异位所观测到的电轴变化,因此此处将EA描述为多态性的。有趣的是,在猪中观测到窄复合VT与宽复合心动过速交替,这种模式未见于NHP中。不希望受到理论的束缚,天然和移植猪心肌的组织学支持这样的假设,即宽复合搏动源于移植物接触传导缓慢的工作型心肌,而窄复合搏动源于移植物接触弥散性渗透到猪心脏的壁内浦肯野纤维(20、21)。移植有500×10^{6}hESC-CM的所有17个受试者都表现出明显的心律失常负荷,虽然通常是短暂的,但与猪的高死亡率有关。与Laflamme及其同事最近的研究相比时,本研究中观测到与EA相关的较高发病率和死亡率(11)。这反映了尤卡坦小型猪模型、经皮细胞递送或细胞产品的差异。本文所述的实验表明心脏发病的两种主要机制。首先,快速EA>350bpm可蜕变为致命的心室颤动,其次,慢性心动过速>230bpm的猪通常会发生心力衰竭(24)。因此,主要终点包括这些参数以限制抗心律失常试验中的过高死亡率。

[0311] 用基线胺碘酮和辅助伊伐布雷定的联合抗心律失常治疗,在所有经处理受试者中安全地预防了心源性死亡、不稳定的EA和心力衰竭的组合主要终点,表明可以通过药理学减轻EA的风险。治疗与峰心动过速和心律失常显著降低有关。一旦受试者经历心律失常负荷的持续改善(称为电成熟),所有受试者中抗心律失常疗法均成功退出。因此,短期胺碘酮和伊伐布雷定治疗促进了电稳定性,直到移植物变得不那么致心律失常。

[0312] 虽然不希望受理论束缚,抗心律失常治疗的益处机制可能与阻抑自律性、降低心率和心律失常负荷两者有关。这些药物在EA的早期阶段期间特别有益,这时VF恶化的风险最大。分别在NHP(9)和猪(11)中进行的电生理研究表明,EA的病因是局灶性自律性增加,而不是临床室性心动过速通常观测到的宏观折返(25)。随着EA在未经处理的动物中变得不稳定,心率迅速加速至>350bpm,并且不排除这种升级可能是一种独特的机制的可能性,例如导致折返的自律性。这说明了为什么治疗成功地阻抑了不稳定和致命的心律失常,但无法完全预防EA。伊伐布雷定对EA速率控制的功效表明其药理学靶点,即HCN4通道携带的I_f电流,在未成熟心肌细胞和hPSC-CM(26)中高度表达,可能是一个重要的介质。伊伐布雷定本身从未消除EA,这表明I_f电流是一种速率调节剂,但不是心律失常的唯一来源。相比之下,胺碘酮在一些急性输注实验中长期降低EA的负荷,并明显恢复了窦性心律(图21A-21B)。虽然主要归类为K^+通道阻滞剂,但众所周知,胺碘酮还拮抗Na^+通道、Ca^{2+}通道和β-肾上腺素能受体(27)。因此,虽然绝不会降低发现本文公开的有效药物组合的重要性,但很难从胺碘酮的功效中深入了解EA的机制。EA的消失与干细胞来源移植物的成熟同时发生(8、9、28),并且预计致心律失常窗口可以反映在达到更类似于宿主心肌状态之前的体内移植物成熟期(26、29-33)。其他策略(例如在移植前促进成熟、基因编辑和调节宿主/细胞相互作用)可以提供额外的心律失常控制手段。通过开发较高通量的平台,以在大型动物模型中进行遗传、药理学和电生理学研究然后进行表型分析,将加速对EA潜在机制的进一步研究。

[0313] 植入性心律失常是心脏再肌化疗法临床转化的最重要障碍。从NHP和最近的猪数据中出现的EA的自然病程表明,一旦EA消退,进一步心律失常的风险很低。这项研究提供了

一个概念验证,即临床相关的抗心律失常药物治疗可以成功地阻抑致命的心律失常,并控制心动过速以实现电静止。这是在心肌细胞移植用于心脏再肌化疗法的临床安全性方面向前迈出的重要一步。

[0314] 该研究表明EA对药理学阻抑有反应。研究中给予了临床相关剂量的胺碘酮和伊伐布雷定。

[0315] 结论

[0316] 在这项利用心脏再肌化疗法的猪梗死模型的研究中,普遍观测到EA,并与显著死亡率相关。慢性胺碘酮治疗联合辅助伊伐布雷定成功地预防了心源性死亡、不稳定的EA和心力衰竭的组合主要终点。抗心律失常治疗显著提高了总存活,并与心率和节律控制相关。

[0317] 实施例5:补充方法

[0318] 在猪中进行实验性抗心律失常筛选

[0319] 五只梗死的猪经历了hESC-CM移植,所有都表现出刻板的EA。对受试者给予多个测试抗心律失常药,并通过连续ECG监测观测急性反应。在2分钟内以推注剂量递送静脉内药剂。口服药剂通过直接观测在最少的苹果、苹果酱或南瓜泥中来给予,每天喂食,并每天给药以增加剂量。在药剂之间提供了至少三天的清洗期。考虑到延长半衰期和消除动力学,胺碘酮作为试验的最后一种药剂给予。所有药剂都在至少两个受试者中进行了测试。

[0320] 浦肯野纤维组织学

[0321] 对于薄切片,将组织切割并修整至1cm×1cm×3mm,在异戊烷中快速冷冻,并包埋在OCT(TissueTek)。将10μm切片浸入-20℃的100％甲醇中15分钟,并使用下述染色剂通过标准免疫荧光技术进行染色。图像在Leica SP8共聚焦显微镜上获取。

[0322] 对于厚切片,将1cm×1cm×3mm含有移植物的组织块在100％甲醇中于20℃孵育1小时,再水化(80％甲醇、60％甲醇、0％甲醇,稀释于PBS,每种试剂在-20℃下孵育15分钟)。在Leica VT1200s vibratome上切割150μm切片,并使用如下所述的染色剂用标准免疫荧光技术进行染色。然后如先前报道的(34)使用BABB清除染色切片,并在Leica SP8共聚焦显微镜上以1μm z-步增量成像。

[0323] 浦肯野纤维染色

[0324] 切片用以下试剂染色:Hoechst 33342(DNA,Thermo Fisher Scientific,#62249),小麦胚芽凝集素-俄勒冈绿(WGA,Thermo Fisher Scientific,#W6748),Phalloidin-647(F-Actin,Thermo Fisher Scientific,#A22287)、抗连接蛋白40(Cx40,Alpha Diagnostics,#CXN40A)或抗慢速骨骼肌钙蛋白I(ss-TnI,Novus,#NBP2-46170)与两种抗兔二抗之一(Alexa Fluor 555/647,Thermo Fisher Scientific,#A-31570/A-31573)。

[0325] 参考文献

[0326] 1.Collaborators GBDCoD.Global,regional,and uational age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories,1980-2017:a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017.Lancet 2018;392:1736-1788.

[0327] 2.Nakamura K,Murry CE.Function Follows Form-A Review of Cardiac Cell Therapy.Circ J 2019;83:2399-2412.

[0328] 3.Caspi O,Huber I,Kehat I et al.Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myoeardial performance in infarcted rat hearts.J Am Coll Cardiol 2007;50:1884-93.

[0329] 4.Laflamme MA,Chen KY,Naumova AV et al.Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts.Nat Biotechnol 2007;25:1015-24.

[0330] 5.Shiba Y,Fernandes S,Zhu WZ et al.Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts.Nature 2012;489:322-5.

[0331] 6.van Laake LW,Passier R,Monshouwer-Kloots J et al.Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction.Stem Cell Res 2007;1:9-24.

[0332] 7.Shiba Y,Filice D,Fernandes S et al.Electrical Integration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Guinea Pig Chronic Infarct Model.J Cardiovase Pharmacol Ther 2014;19:368-381.

[0333] 8.Chong JJ,Yang X,Don CW et al.Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts.Nature 2014;510:273-7.

[0334] 9.Liu YW,Chen B,Yang X et al.Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates.Nat Biotechnol 2018;36:597-605.

[0335] 10.Shiba Y,Gomibuchi T,Seto T et al.Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts.Nature 2016;538:388-391.

[0336] 11.Romagnuolo R,Masoudpour H,Porta-Sanchez A et al.Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias.Stem Cell Reports 2019;12:967-981.

[0337] 12.Eschenhagen T,Bolli R,Braun T et al.Cardiomyocyte Regeneration:A Consensus Statement.Circulation 2017;136:680-686.

[0338] 13.Lelovas PP,Kostomitsopoulos NG,Xanthos TT.A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart.J Am Assoc Lab Anim Sci 2014;53:432-8.

[0339] 14.van der Spoel TI,Jansen of Lorkeers SJ,Agostoni P et al.Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy:systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease.Cardiovasc Res 2011;91:649-58.

[0340] 15.Chen VC,Ye J,Shukla P et al.Development of a scalable suspension culture for cardiac differentiation from human pluripotent stem cells.Stem Cell Res 2015;15:365-75.

[0341] 16.Staubli M,Bircher J,Galeazzi RL,Remund H,Studer H.Serum concentrations of amiodarone during long term therapy.Relation to dose, efficacy and toxicity.Eur J Clin Pharmacol 1983;24:485-94.

[0342] 17.Mostow ND,Rakita L,Vrobel TR,Noon DL,Blumer J.Amiodarone: correlation of serum concentration with suppression of complex ventricular ectopic activity.Am J Cardiol 1984;54:569-74.

[0343] 18.Schindelin J,Rueden CT,Hiner MC,Eliceiri KW.The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis.Mol Reprod Dev 2015;82:518-29.

[0344] 19.Deroulers C,Ameisen D,Badoual M,Gerin C,Granier A,Lartaud M.Analyzing huge pathology images with open source software.Diagn Pathol 2013;8:92.

[0345] 20.Garcia-Bustos V,Sebastian R,Izquierdo M,Molina P,Chorro FJ,Ruiz-Sauri A.A quantitative structural and morphometric analysis of the Purkinje network and the Purkinje-myocardial junctions in pig hearts.J Anat 2017;230: 664-678.

[0346] 21.Panescu D,Kroll M,Brave M.Limitations of animal electrical cardiac safety models.Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc 2014;2014:6483-6.

[0347] 22.Pallante BA,Giovannone S,Fang-Yu L et al.Contactin-2 expression in the cardiac Purkinje fiber network.Circ Arrhythm Electrophysiol 2010;3:186-94.

[0348] 23.Yu JK,Franeeschi W,Huang Q,Pashakhanloo F,Boyle PM,Trayanova NA.A comprehensive,multiscale framework for evaluation of arrhythmias arising from cell therapy in the whole post-myocardial infarcted heart.Sci Rep 2019;9: 9238.

[0349] 24.Chow E,Woodard JC,Farrar DJ.Rapid ventricular pacing in pigs:an experimental model of congestive heart failure.Am J Physiol 1990;258:H1603-5.

[0350] 25.Josephson M,Marchlinski F,Buxton A et al.Electrophysiologic basis for sustained ventricular tachycardia:role of reentry.Tachycardias: Mechanisms,Diagnosis,Treatment Philadelphia,Pa:Lea and Febiger 1984:305-323.

[0351] 26.Karbassi E,Fenix A,Marchiano S et al.Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine.Nat Rev Cardiol 2020.

[0352] 27.Waks JW,Zimetbaum P.Antiarrhythmic Drug Therapy for Rhythm Control in Atrial Fibrillation.J Cardiovasc Pharmacol Ther 2017;22:3-19.

[0353] 28.Kadota S,Pabon L,Reinecke H,Murry CE.In Vivo Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Neonatal and Adult Rat Hearts.Stem Cell Reports 2017:8:278-289.

[0354] 29.Marchiano S,Bertero A,Murry CE.Learn from Your Elders: Developmental Biology Lessons to Guide Maturation of Stem Cell-Derived

Cardiomyocytes.Pediatr Cardiol 2019;40:1367-1387.

[0355] 30.Guo Y,Pu WT.Cardiomyocyte Maturation:New Phase in Development.Circ Res 2020;126:1086-1106.

[0356] 31.Kannan S,Kwon C.Regulation of cardiomyocyte maturation during critical perinatal window.J Physiol 2020;598:2941-2956.

[0357] 32.Maroli G,Braun T.The long and winding road of cardiomyocyte maturation.Cardiovasc Res 2020.

[0358] 33.Ichimura H,Kadota S,Kashihara T et al.Increased predominance of the matured ventricular subtype in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in vivo.Sci Rep 2020;10:11883.

[0359] 34.El-Nachef D,Oyama K,Wu YY,Freeman M,Zhang Y,MacLellan WR.Repressive histone methylation regulates cardiac myocyte cell cycle exit.J Mol Cell Cardiol 2018;121:1-12.

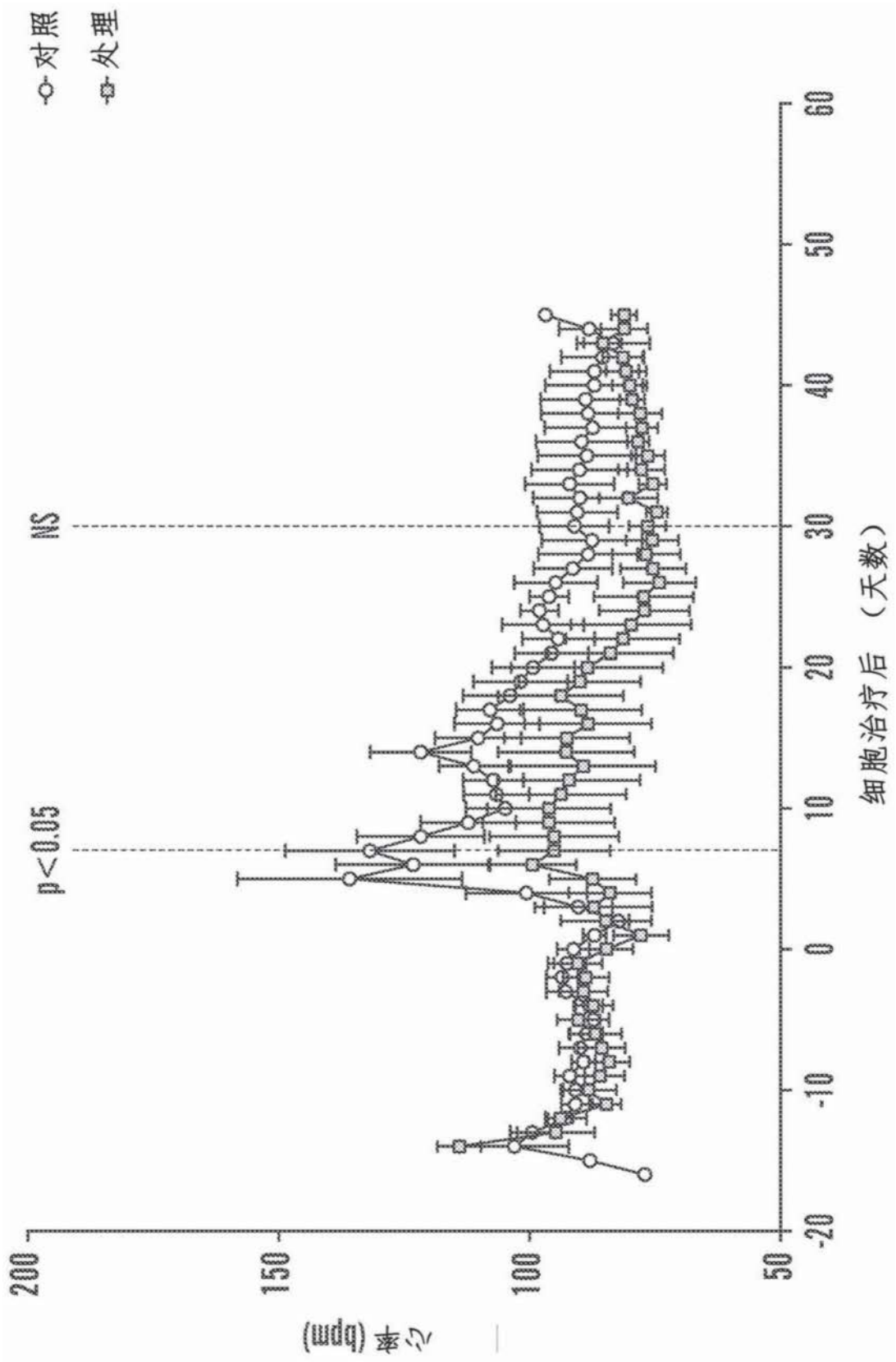


图1A

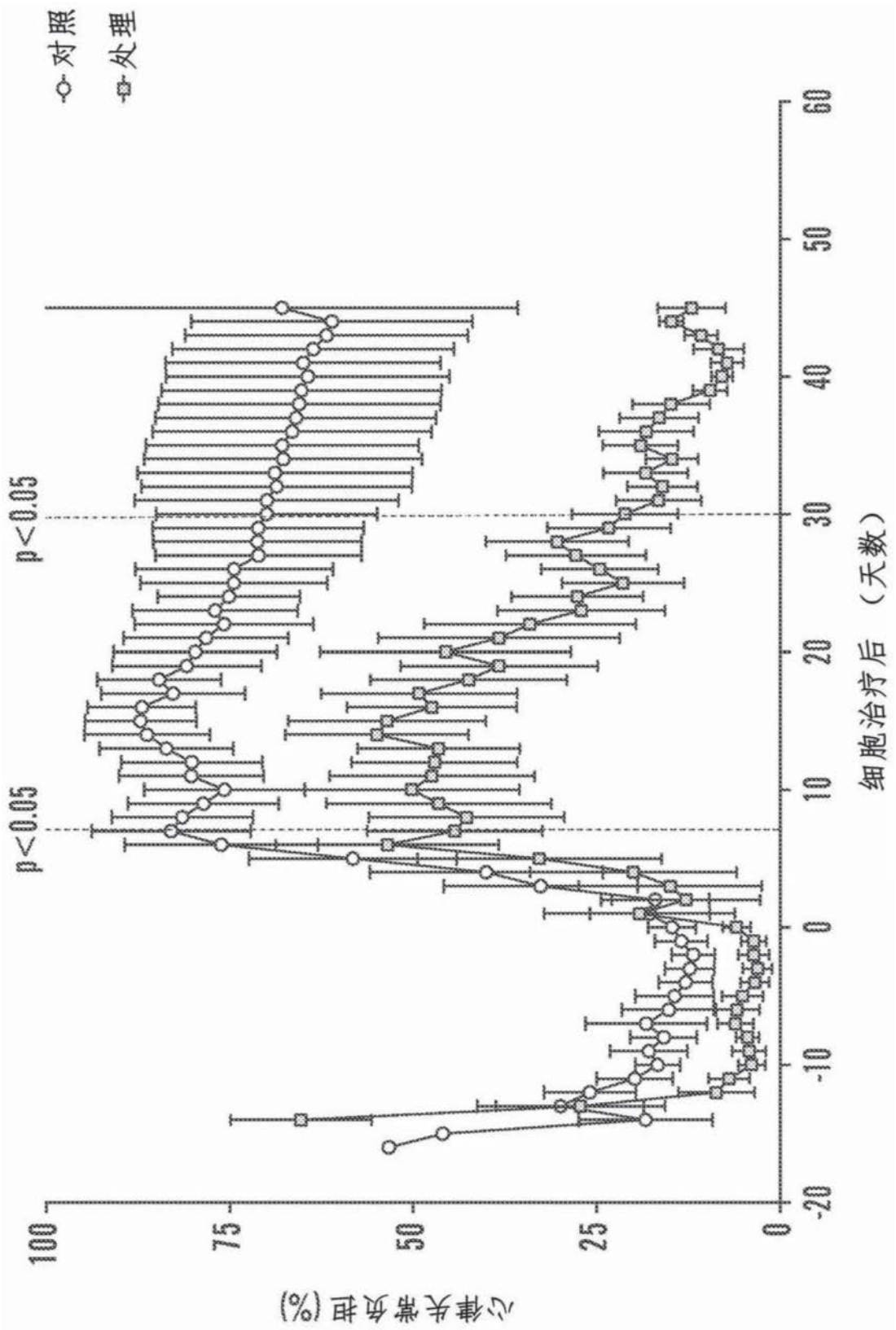

对照
处理
p<0.05
p<0.05
心律失常负担(%)
100
75
50
25
0
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
细胞治疗后（天数）

图1B

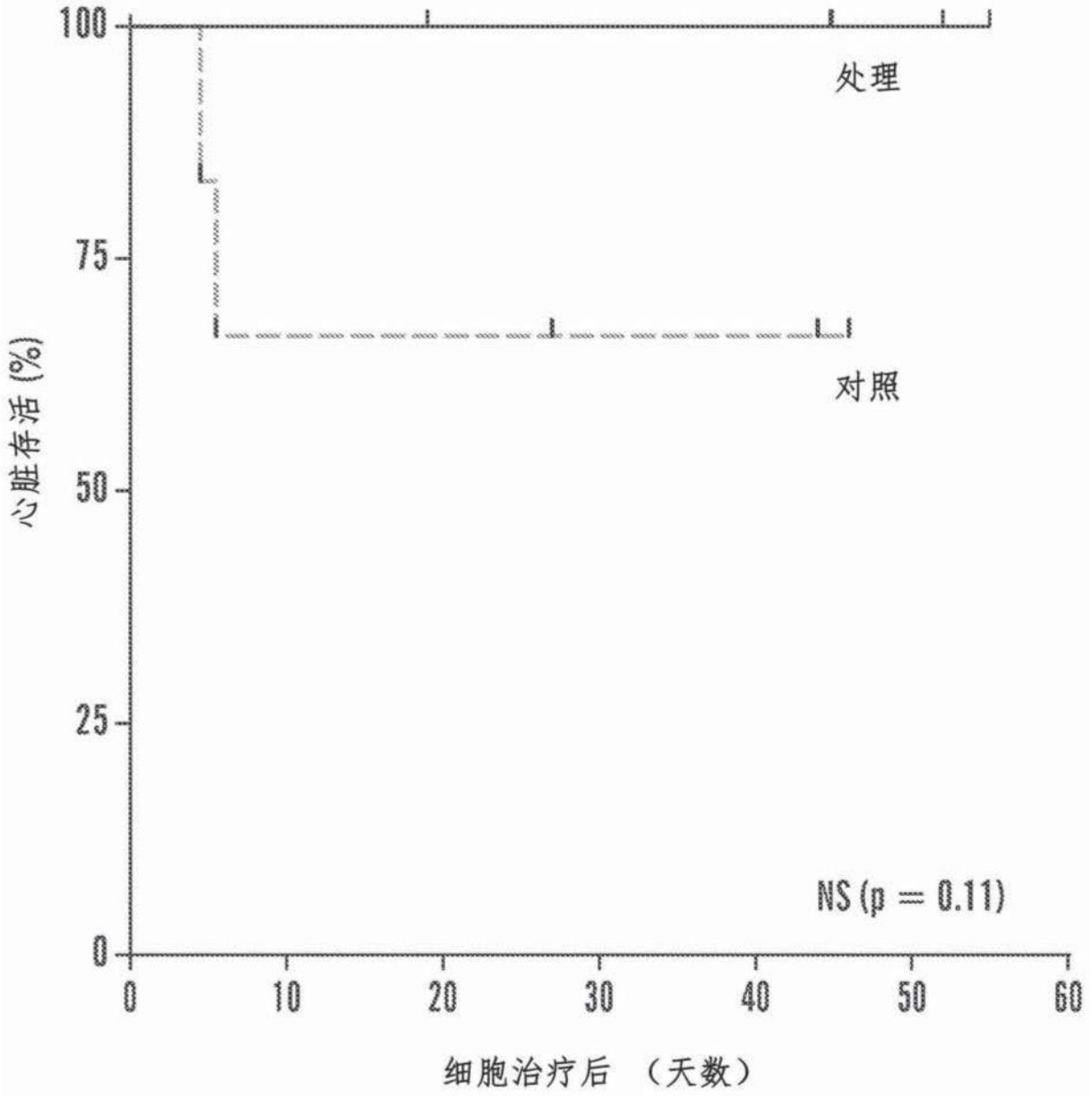


图2

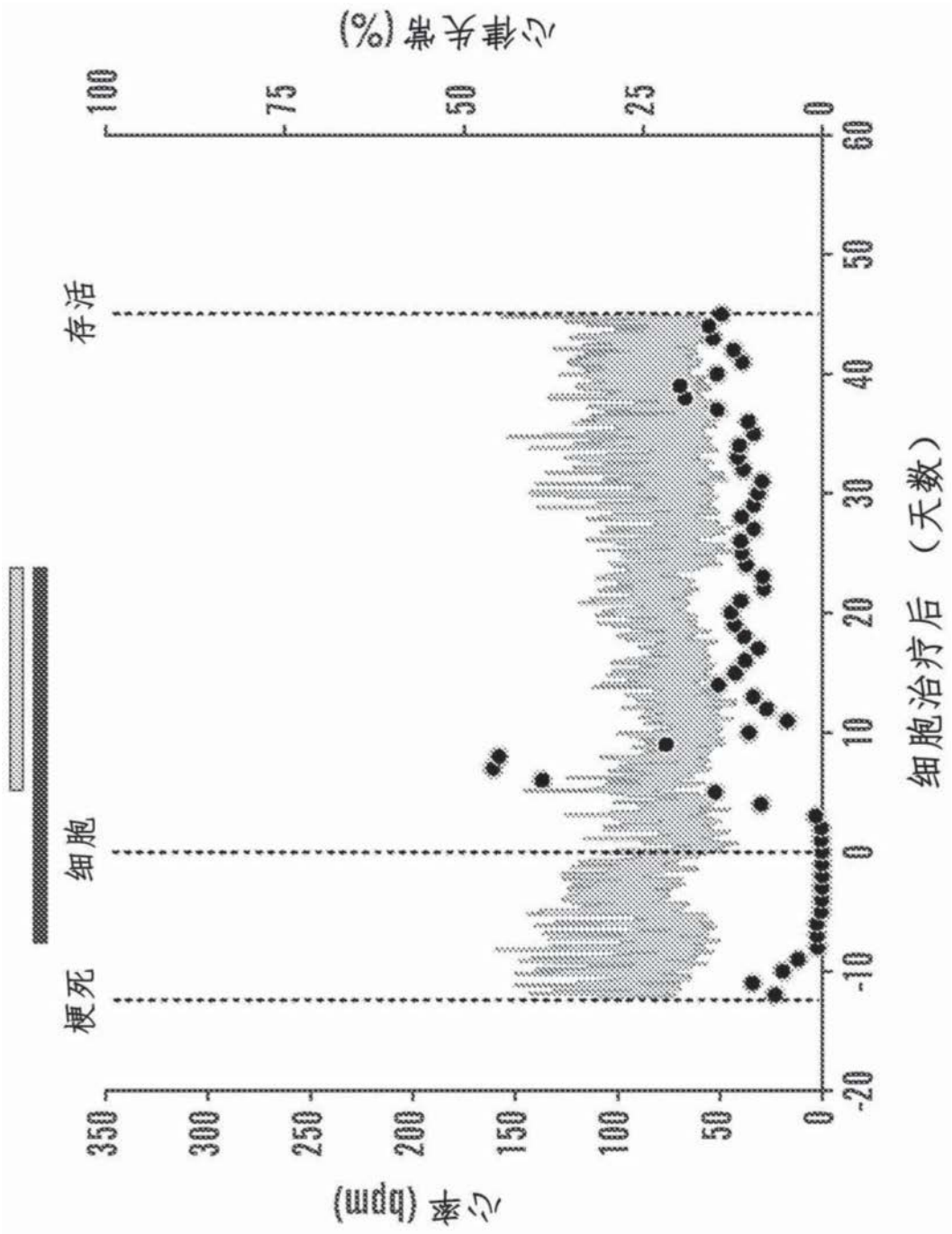

心律失常(%)
100
75
50
25
0
存活
细胞
梗死
心率(bpm)
350
300
250
200
150
100
50
0
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
细胞治疗后（天数）

图3

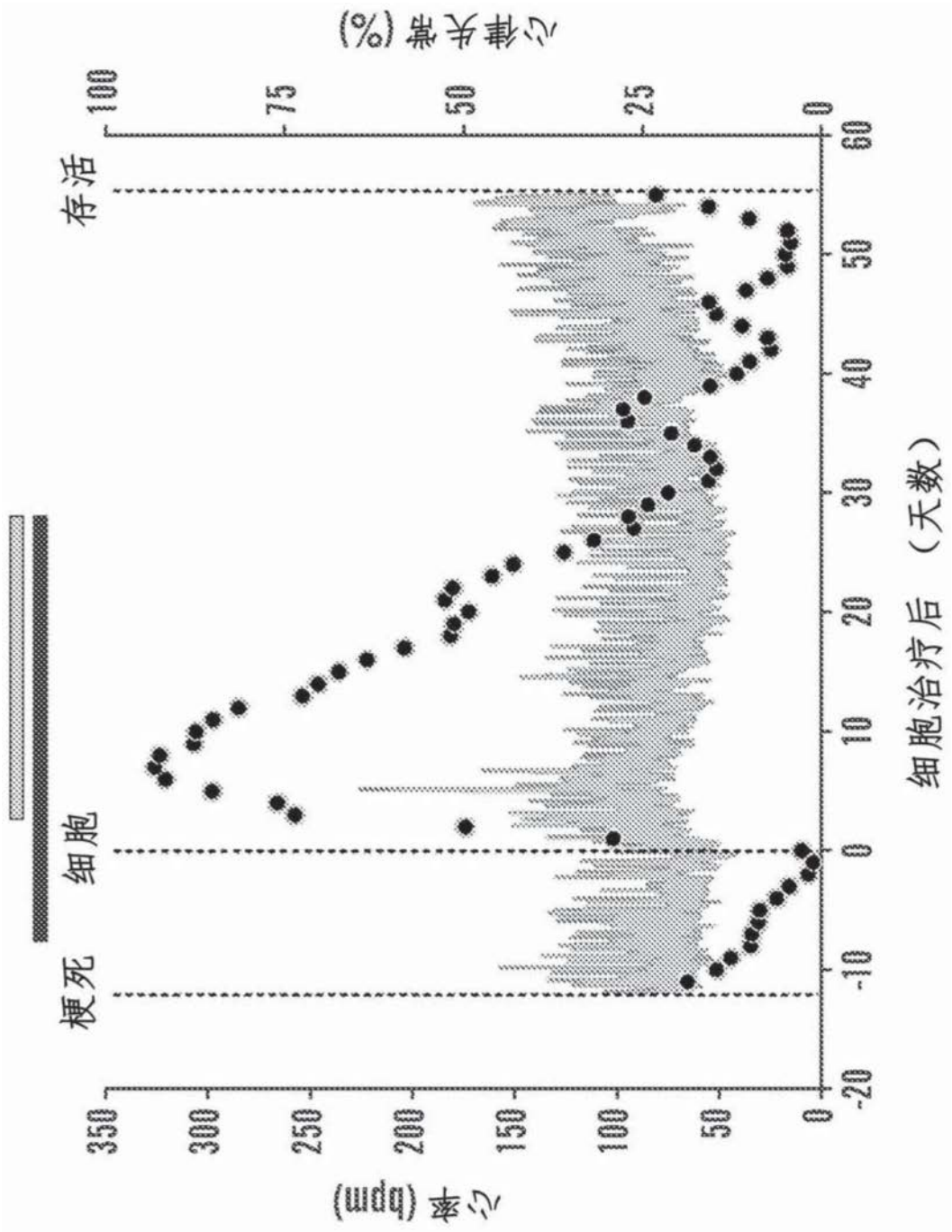

心律失常 (%)
100
75
50
25
0
存活
细胞
梗死
350
300
250
200
150
100
50
0
心率 (bpm)
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
细胞治疗后 （天数）

图4

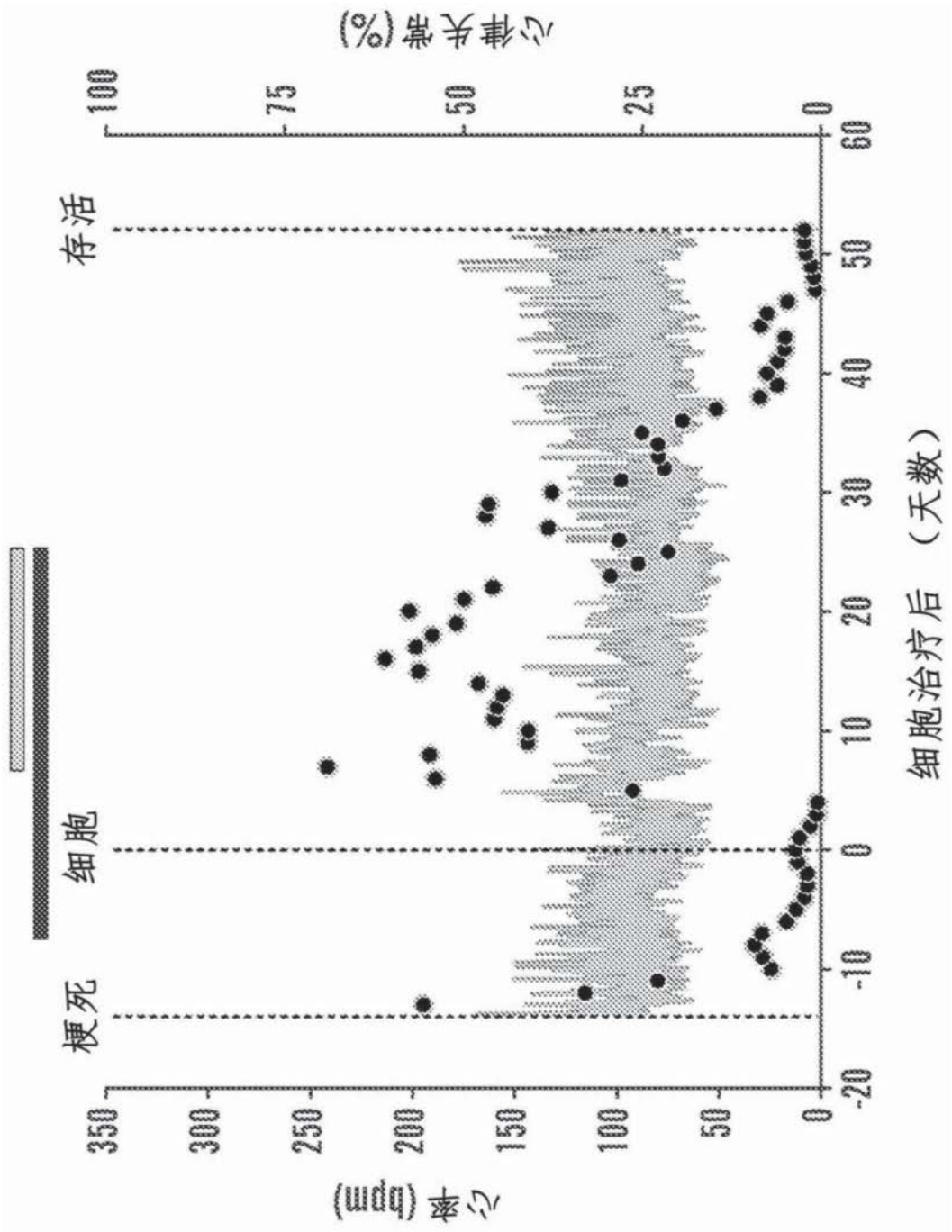

心律失常(%)
100
75
50
25
0
存活
细胞
梗死
350
300
250
200
150
100
50
0
心率(bpm)
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
细胞治疗后（天数）

图5

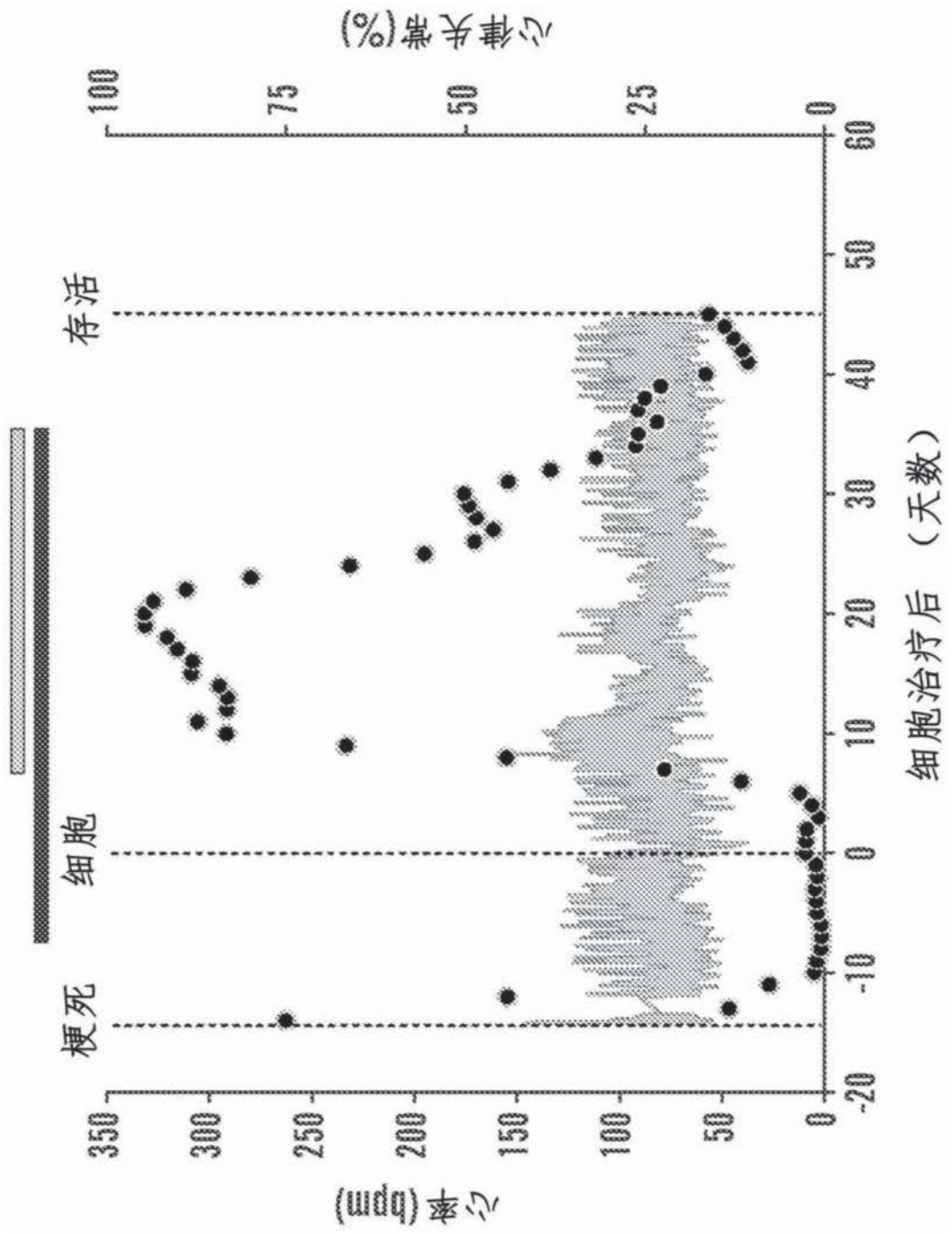

心律失常(%)
100
75
50
25
0
存活
细胞
梗死
心率(bpm)
350
300
250
200
150
100
50
0
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
细胞治疗后（天数）

图6

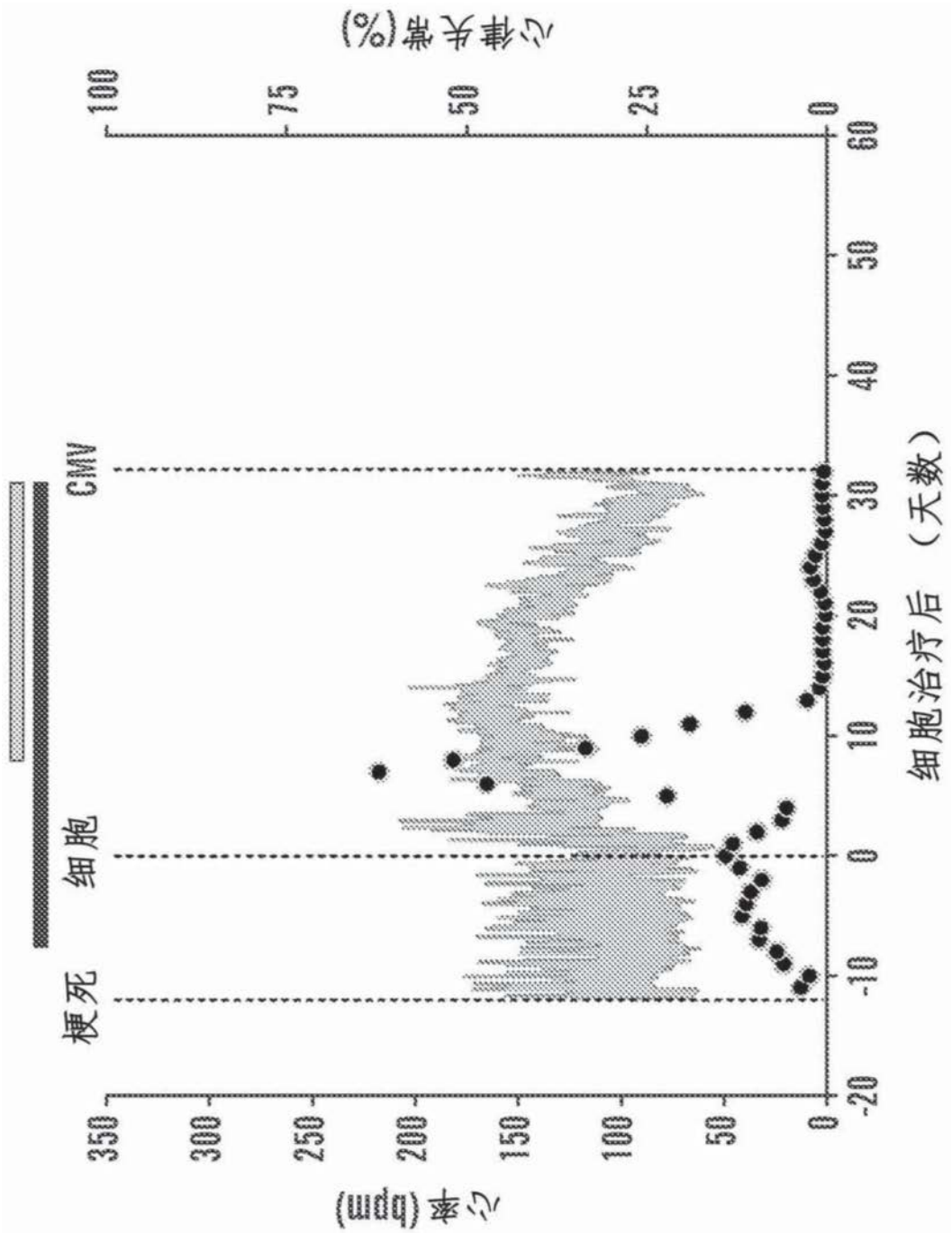

心律失常(%)
100
75
50
25
0
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
CMV
细胞
梗死
350
300
250
200
150
100
50
0
心率(bpm)
细胞治疗后（天数）

图7

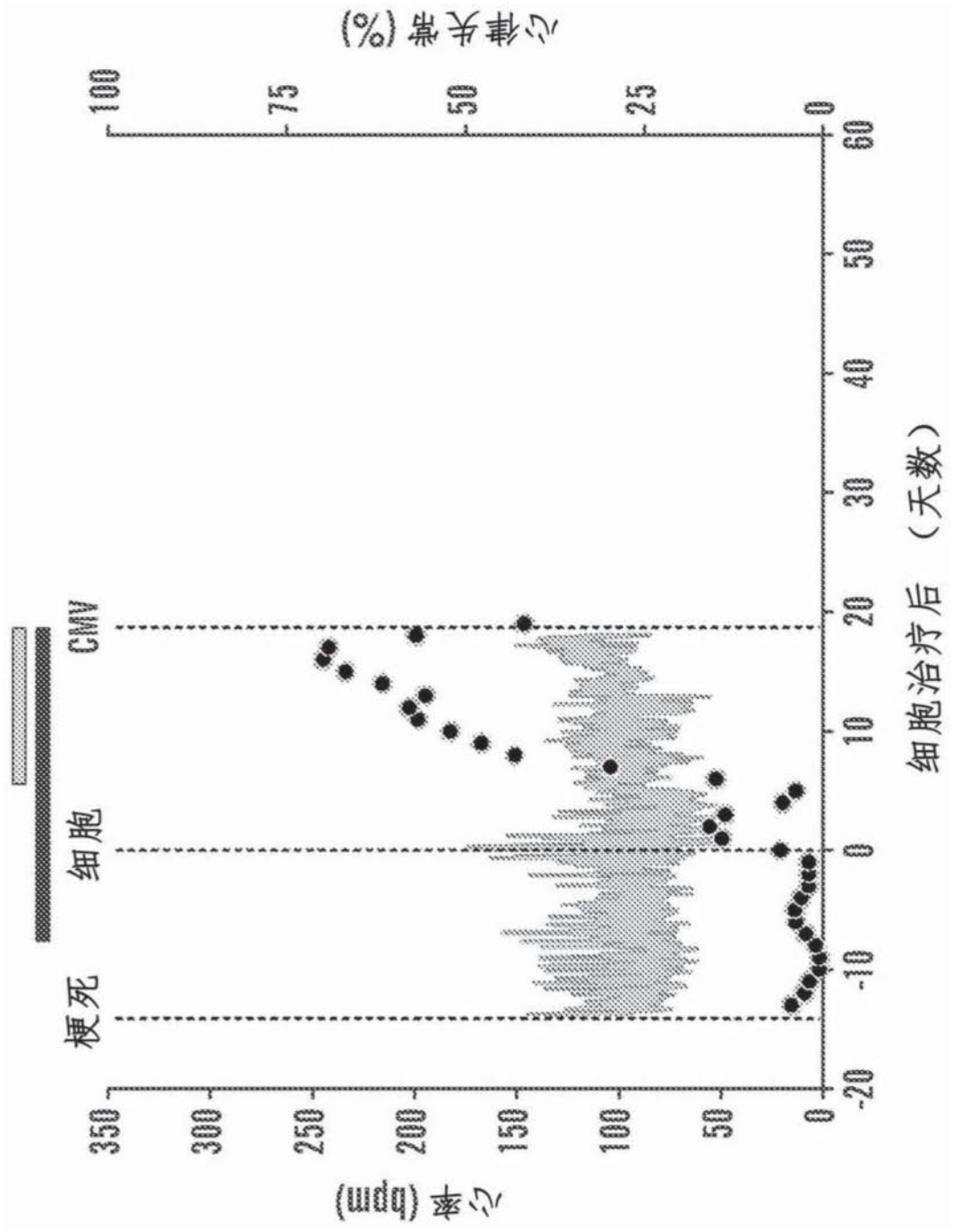

心律失常 (%)
100
75
50
25
0
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
细胞治疗后 （天数）
CMV
细胞
梗死
350
300
250
200
150
100
50
0
心率 (bpm)

图8

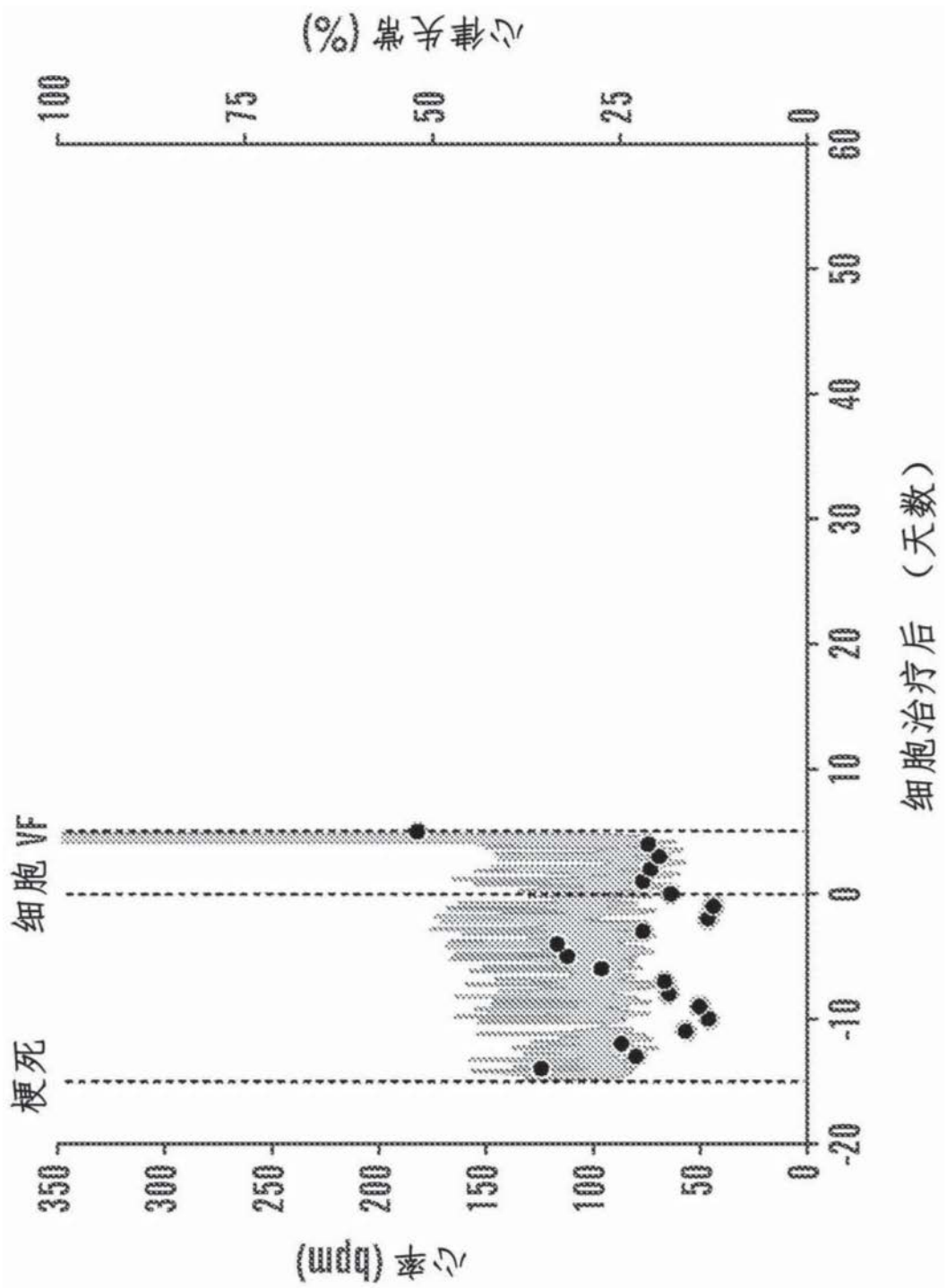

心律失常 (%)
100
75
50
25
0
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
细胞治疗后 （天数）
细胞 VF
梗死
350
300
250
200
150
100
50
0
心率 (bpm)

图9

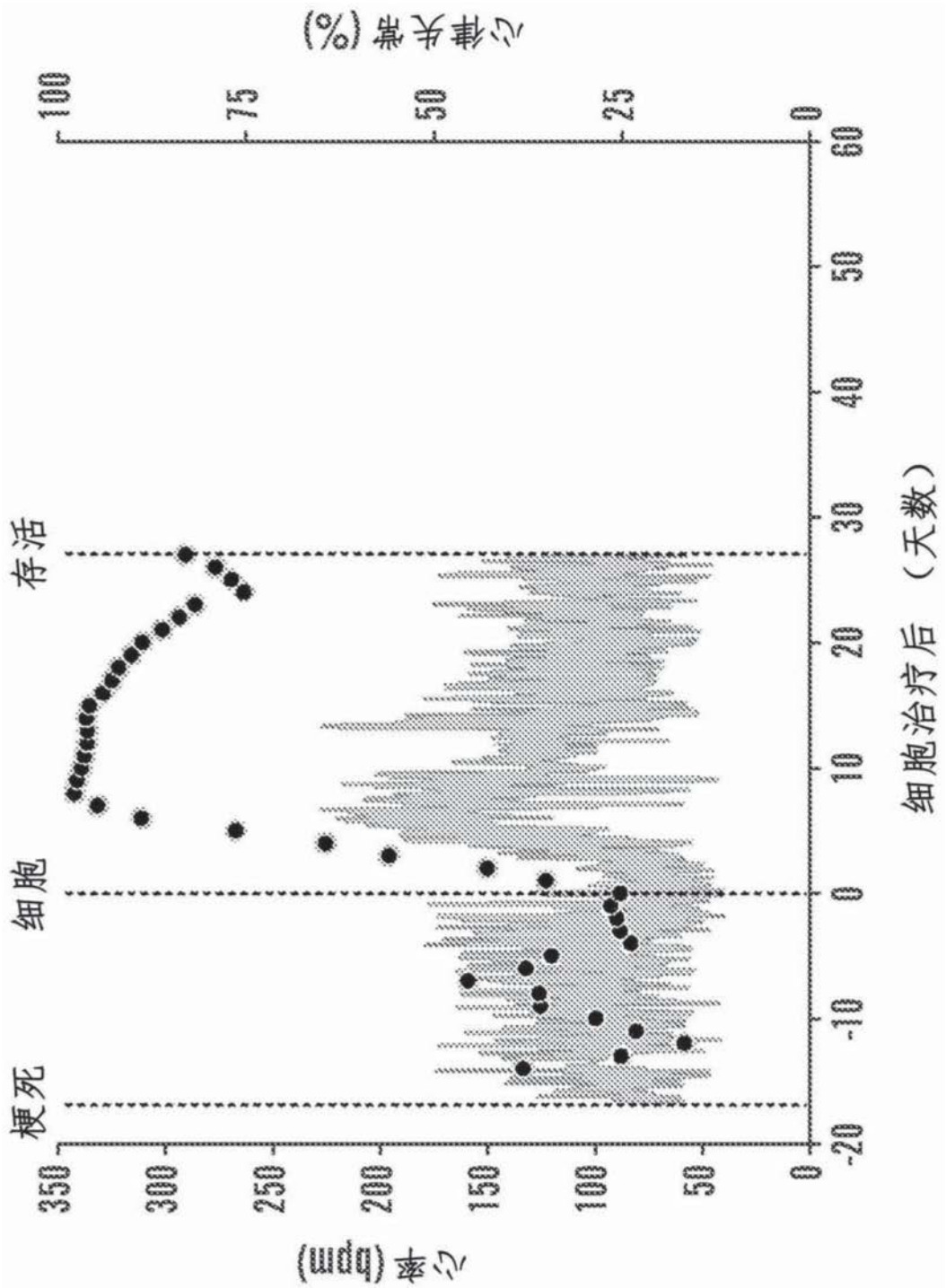

心律失常 (%)
100
75
50
25
0
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
细胞治疗后 （天数）
存活
细胞
梗死
心率 (bpm)
350
300
250
200
150
100
50
0

图10

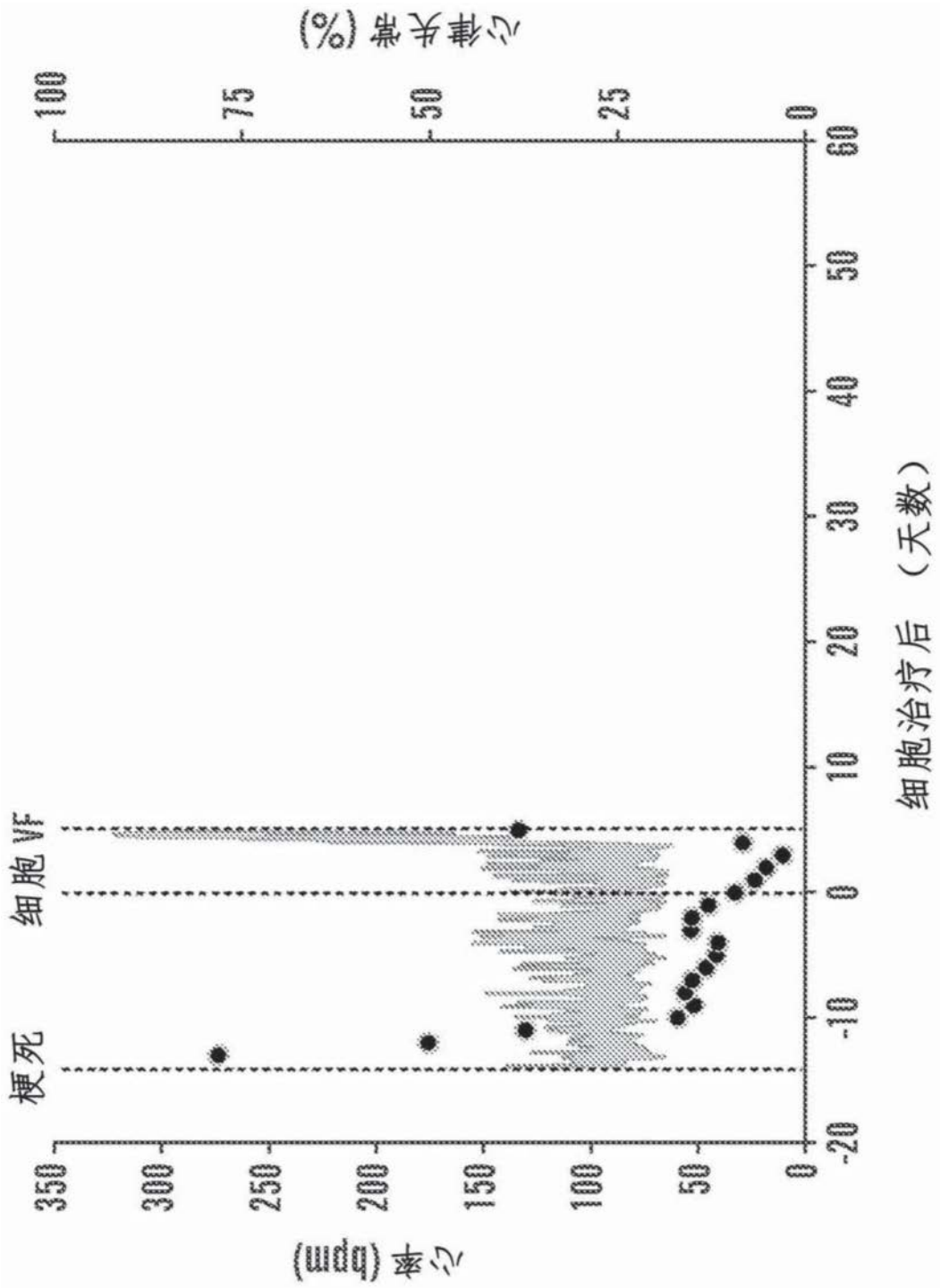

心律失常 (%)
100
75
50
25
0
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
细胞治疗后 （天数）
细胞 VF
梗死
350
300
250
200
150
100
50
0
心率 (bpm)

图11

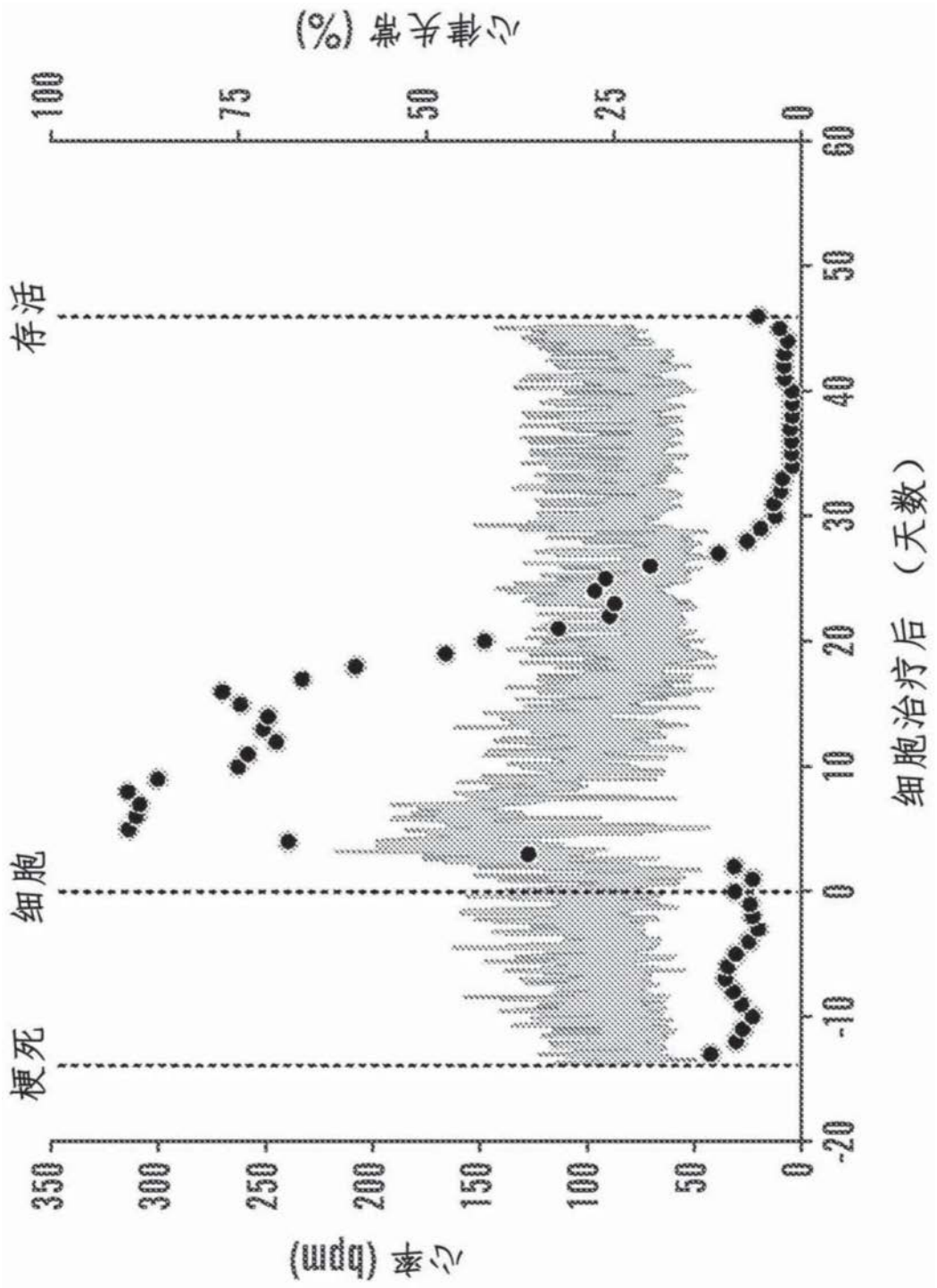

心律失常 (%)
100
75
50
25
0
存活
细胞
梗死
350
300
250
200
150
100
50
0
心率 (bpm)
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
细胞治疗后 （天数）

图12

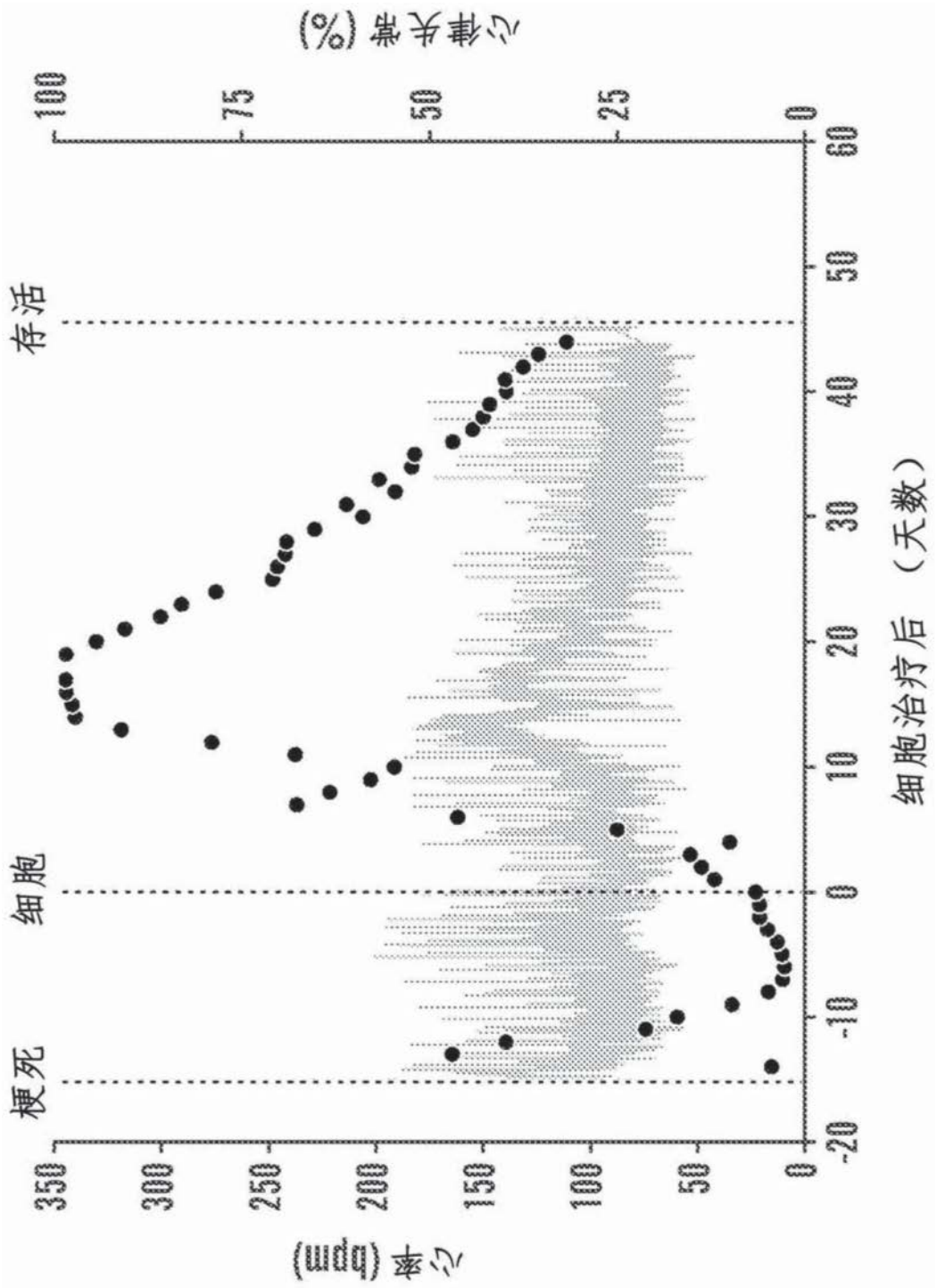

心律失常 (%)
100
75
50
25
0
存活
细胞
梗死
350
300
250
200
150
100
50
0
心率 (bpm)
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
细胞治疗后 （天数）

图13

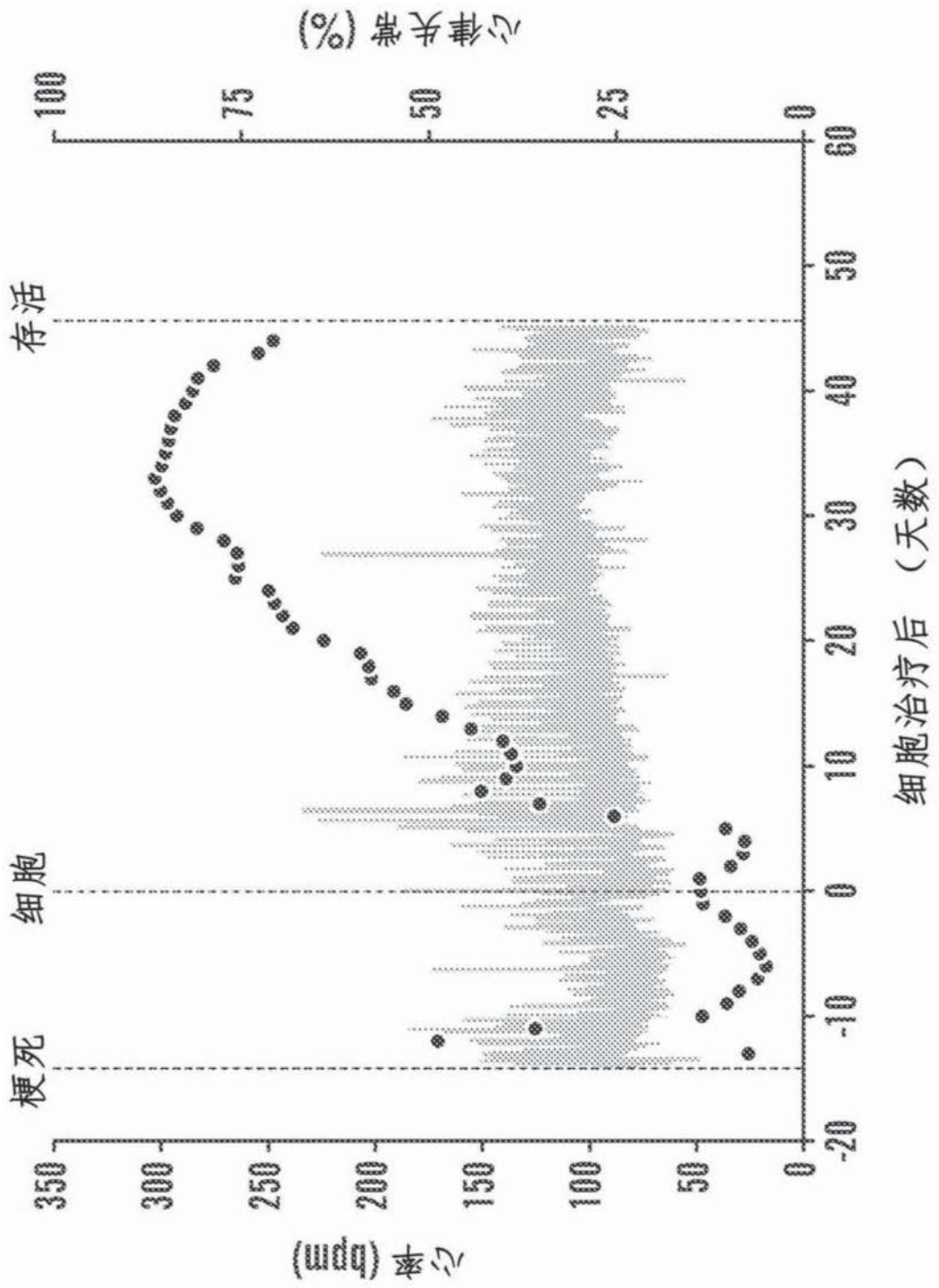

心律失常 (%)
100
75
50
25
0
存活
细胞
梗死
350
300
250
200
150
100
50
0
心率 (bpm)
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
细胞治疗后 （天数）

图14

抗心律失常方案的剂量

猪

- 节律 / 速率控制
  - 移植 7 天开始胺碘酮 200-1200mg BID PO
    滴定至谷目标 1.5-2.5 μg/mL
  - 胺碘酮 150mg IV 推注 prn 急性心律失常
- 速率控制
  - 伊伐布雷定2.5-15 mg PO BID prn HR ≥150
    滴定至 HR 目标 <125bpm

人

- 节律 / 速率控制
  - 移植 7 天开始胺碘酮 100-800mg TID PO
  - 胺碘酮 100-300mg IV 推注 prn 急性心律失常
- 速率控制
  - 伊伐布雷定 5-15mg PO BID prn 心动过速

图15

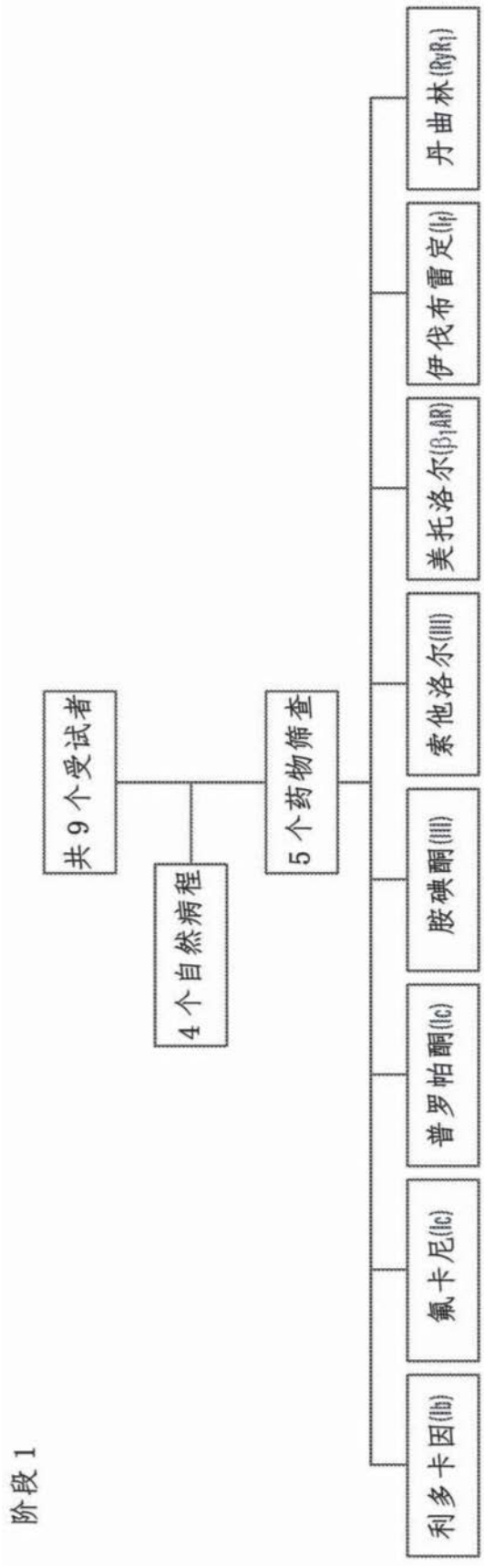

阶段 1
共 9 个受试者
4 个自然病程
5 个药物筛查
利多卡因(IIb)
氟卡尼(IIc)
普罗帕酮(IIc)
胺碘酮(III)
索他洛尔(III)
美托洛尔(β1AR)
伊伐布雷定(If)
丹曲林(RyR1)

图16

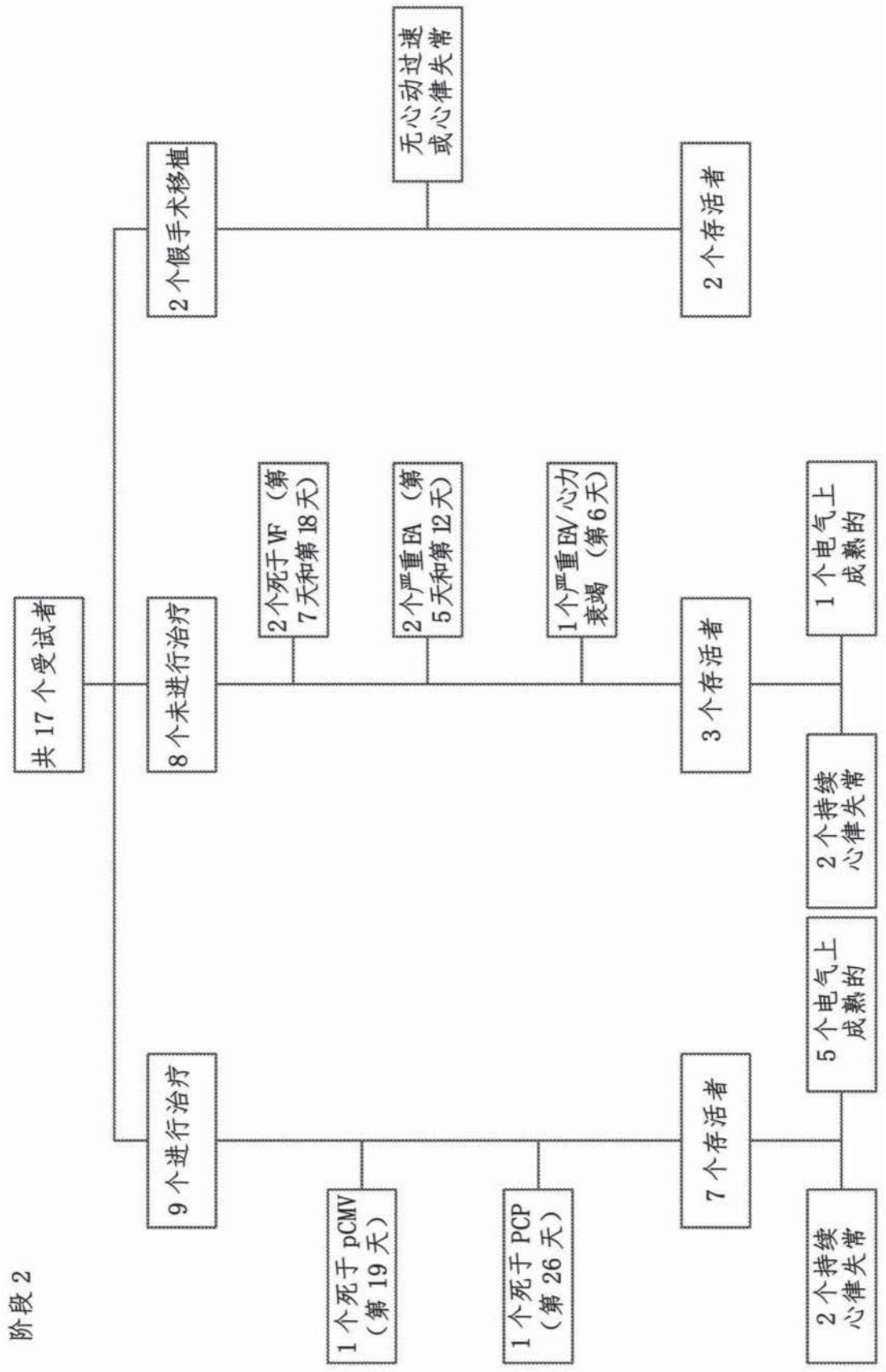

阶段 2
共 17 个受试者
2 个假手术移植
无心动过速或心律失常
2 个存活者
8 个未进行治疗
2个死于 VF （第7天和第 18 天）
2个严重 EA （第5天和第 12 天）
1个严重 EM/心力衰竭 （第 6 天）
3 个存活者
1 个电气上成熟的
2 个持续心律失常
9 个进行治疗
1 个死于 pCMV（第 19 天）
1 个死于 PCP（第 26 天）
7 个存活者
5 个电气上成熟的
2 个持续心律失常

图16(续)

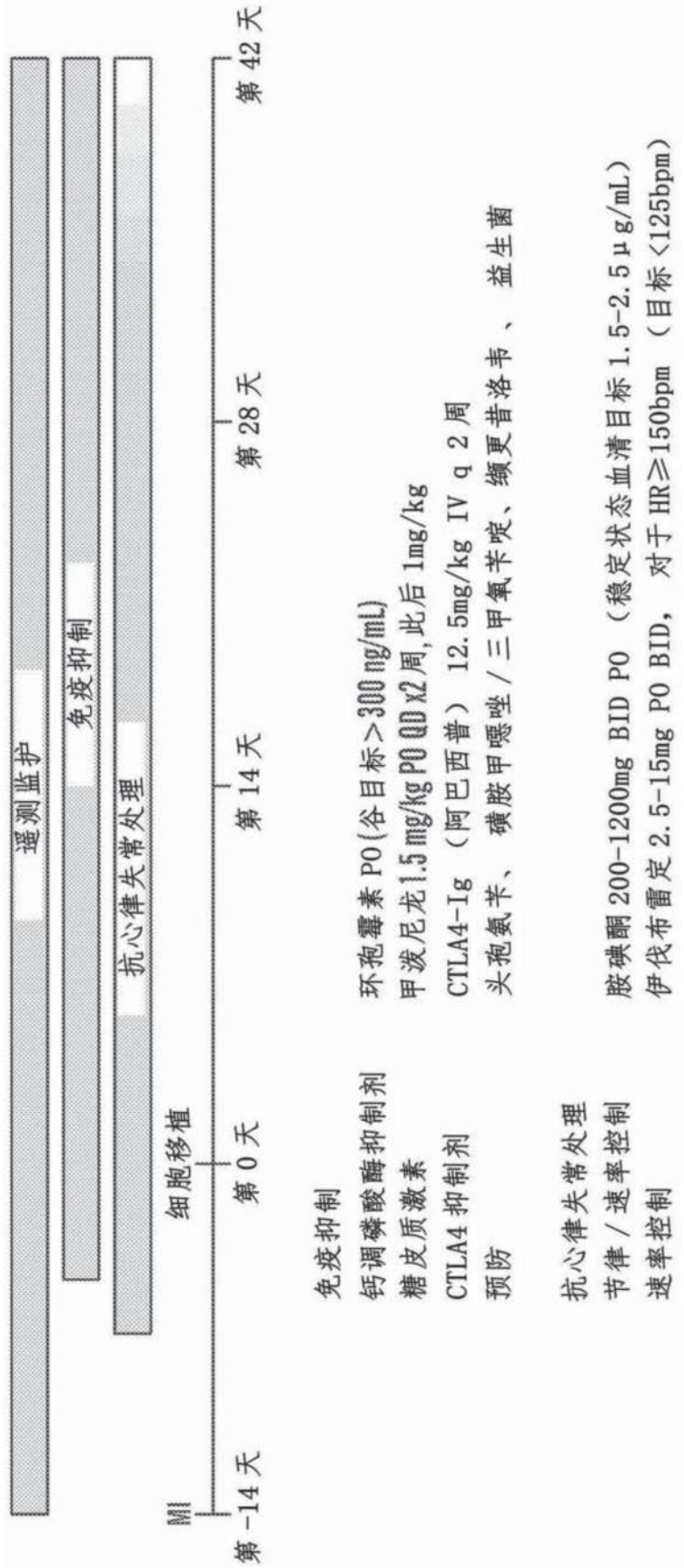

遥测监护
免疫抑制
抗心律失常处理
细胞移植
第-14天
第0天
第14天
第28天
第42天
免疫抑制
钙调磷酸酶抑制剂 环孢霉素 PO(谷目标>300 ng/mL)
糖皮质激素 甲泼尼龙1.5 mg/kg PO QD x2周,此后 1mg/kg
CTLA4 抑制剂 CTLA4-Ig (阿巴西普) 12.5mg/kg IV q 2周
预防 头孢氨苄、磺胺甲噁唑/三甲氧苄啶、缬更昔洛韦、益生菌
抗心律失常处理
节律/速率控制 胺碘酮 200-1200mg BID PO (稳定状态血清目标 1.5-2.5 μg/mL)
速率控制 伊伐布雷定 2.5-15mg PO BID, 对于 HR≥150bpm (目标<125bpm)

图17

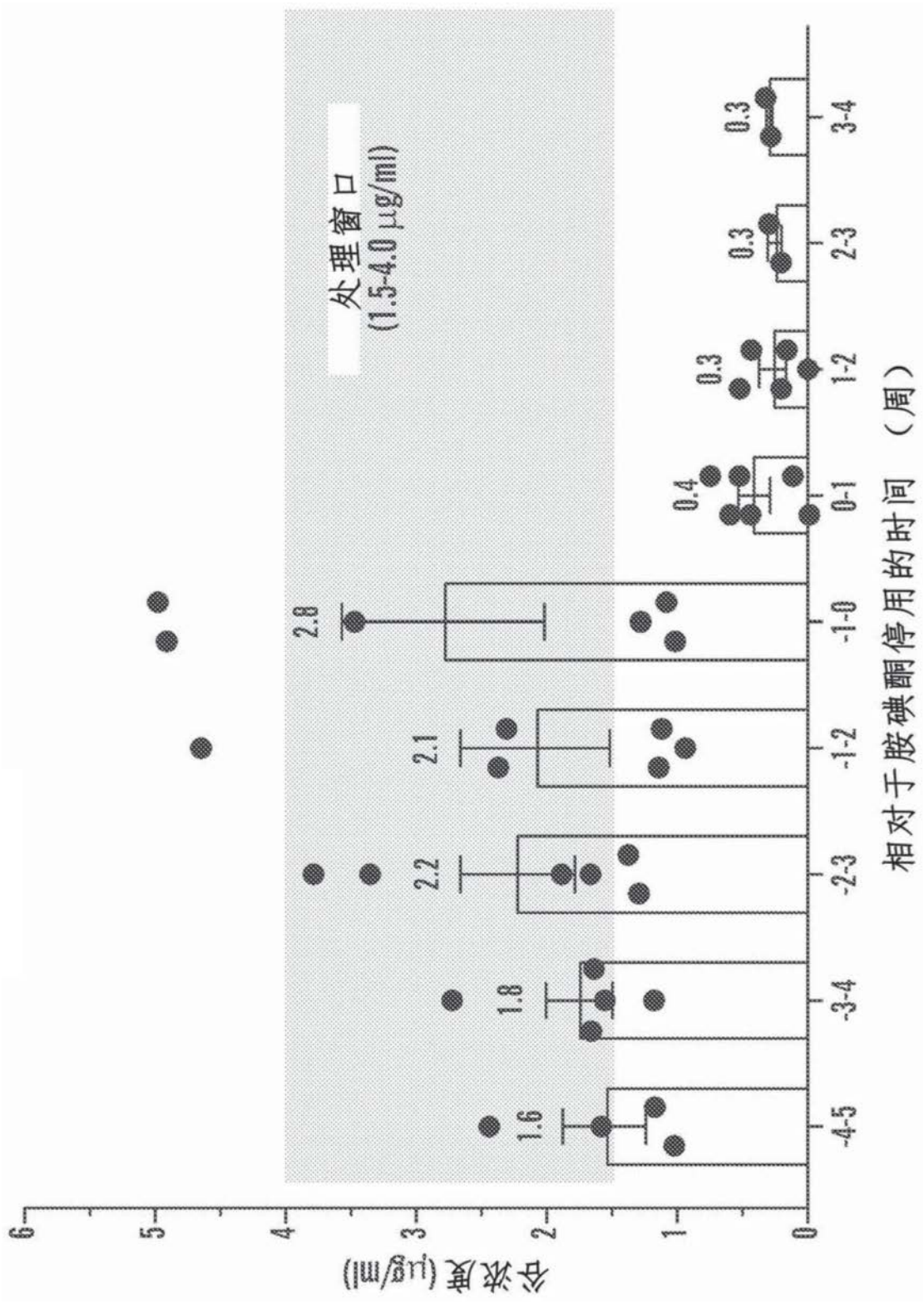

处理窗口
(1.5-4.0 μg/ml)
谷浓度 (μg/ml)
相对于胺碘酮停用的时间 （周）
0
1
2
3
4
5
6
-4-5
-3-4
-2-3
-1-2
-1-0
0-1
1-2
2-3
3-4
1.6
1.8
2.2
2.1
2.8
0.4
0.3
0.3
0.3

图18

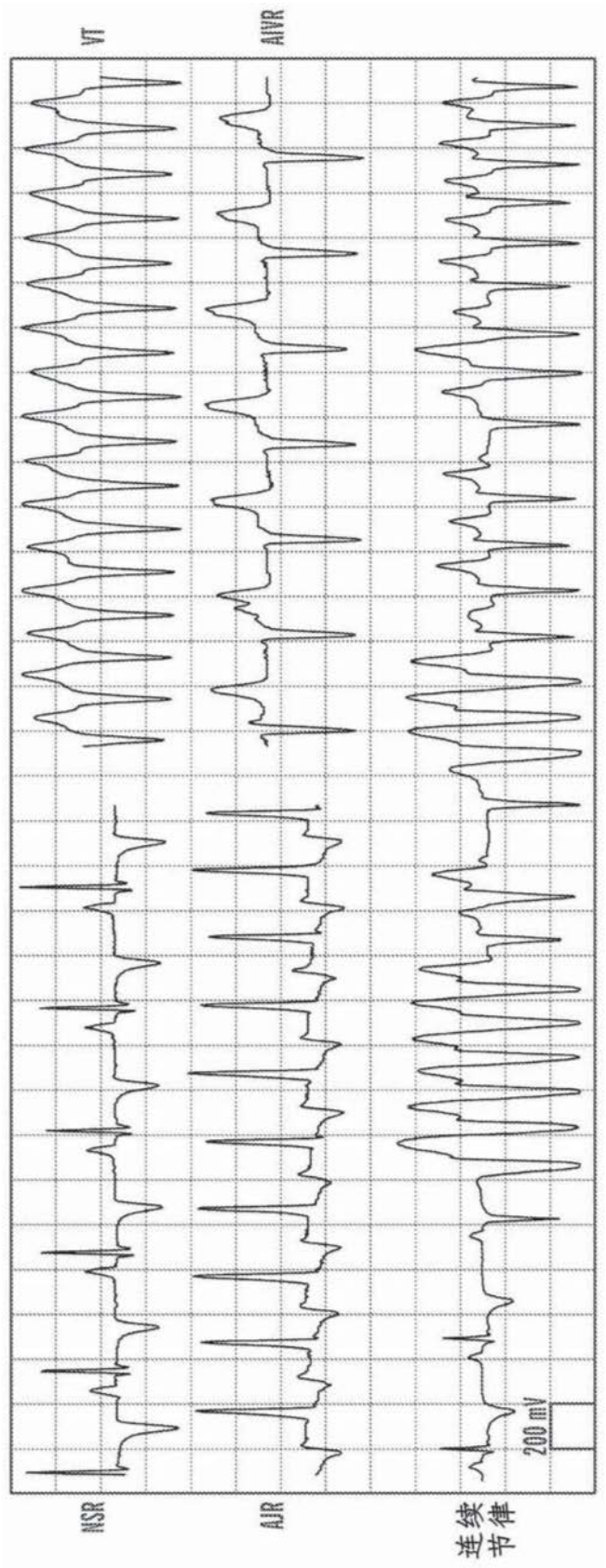


图19

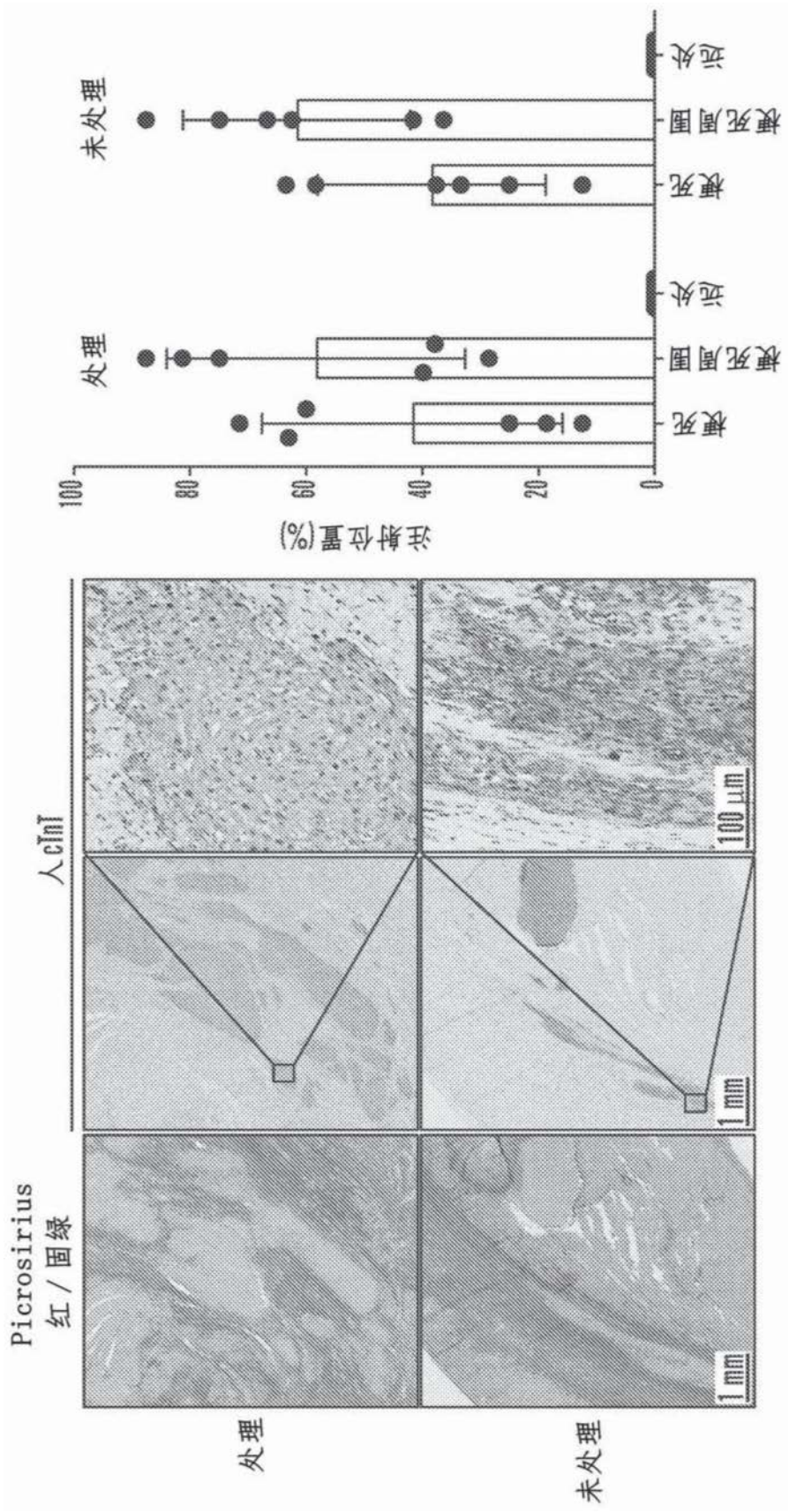

Picrosirius
红 / 固绿
人cTnT
处理
未处理
1 mm
100 μm
注射位置(%)
100
80
60
40
20
0
梗死
梗死周围
远处
处理
未处理

图20

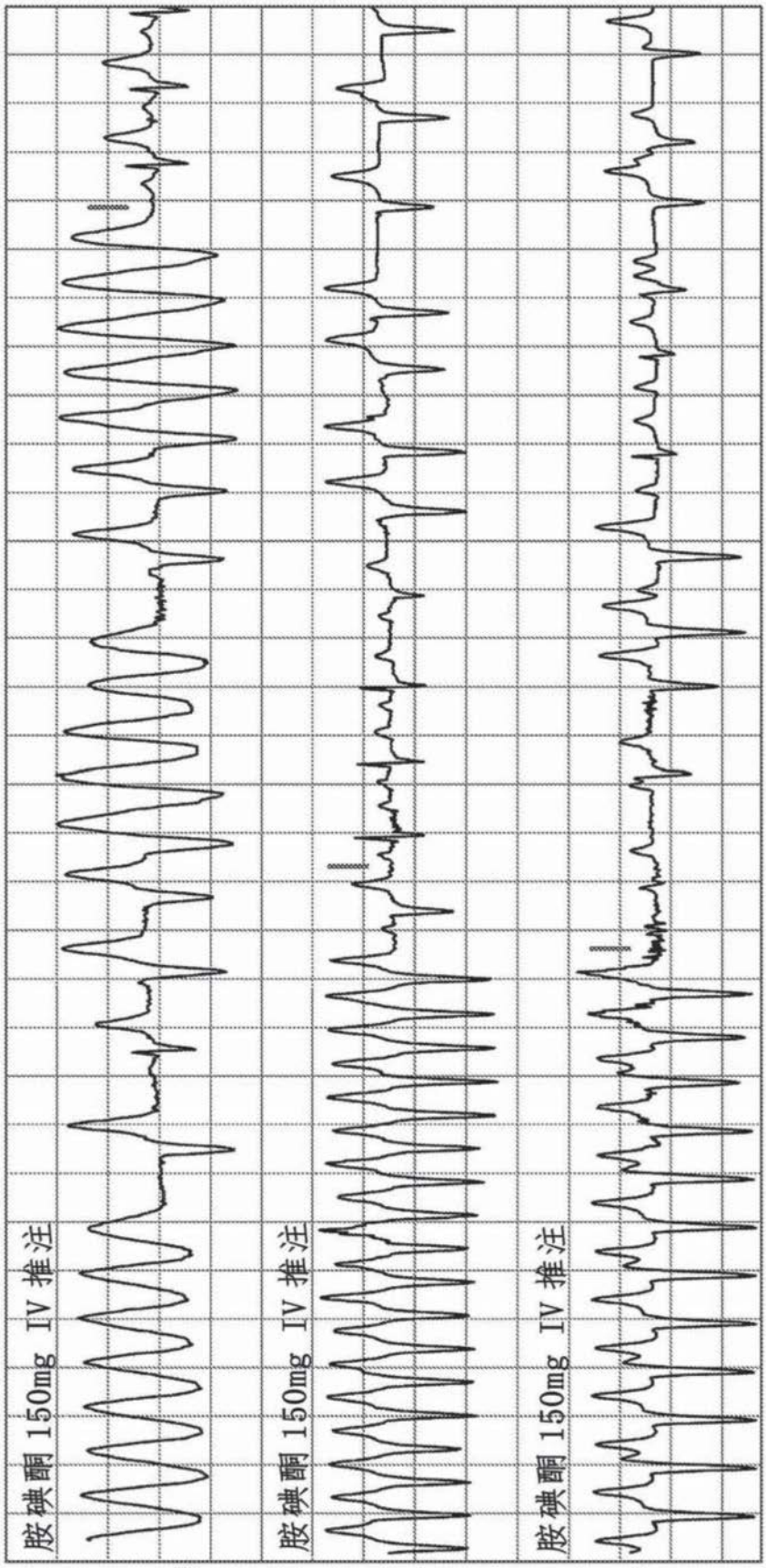


图21A

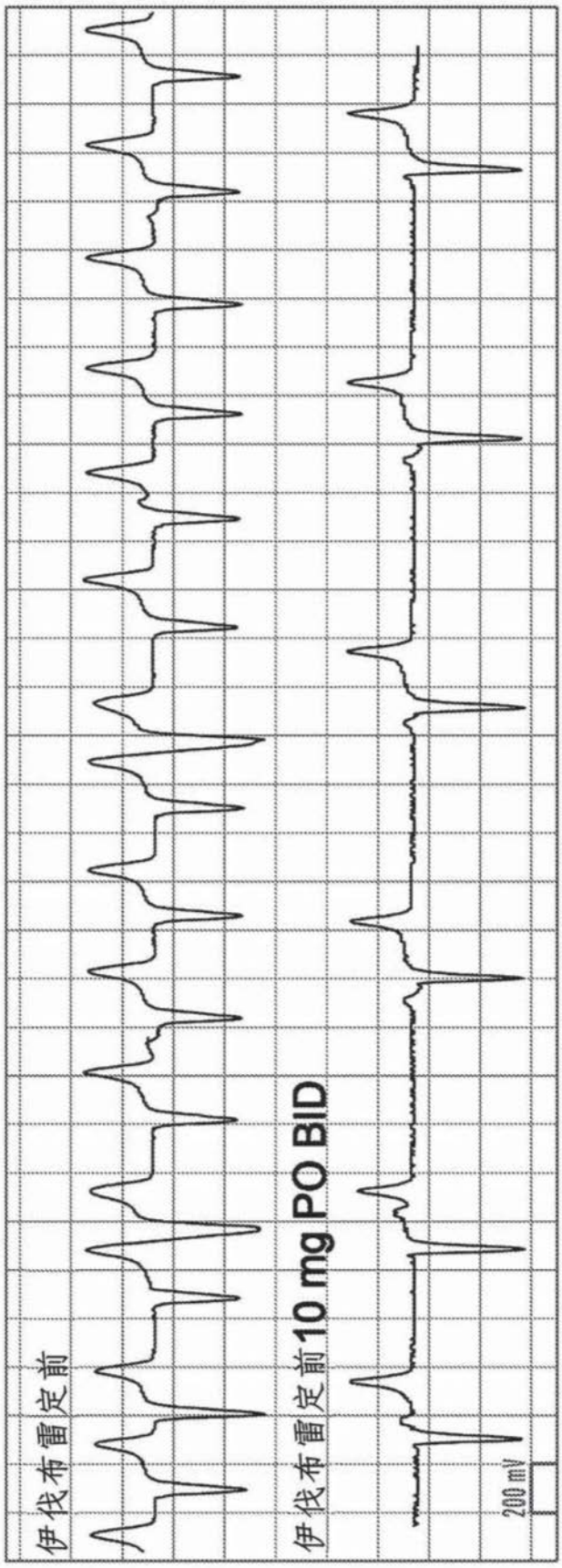


图21B

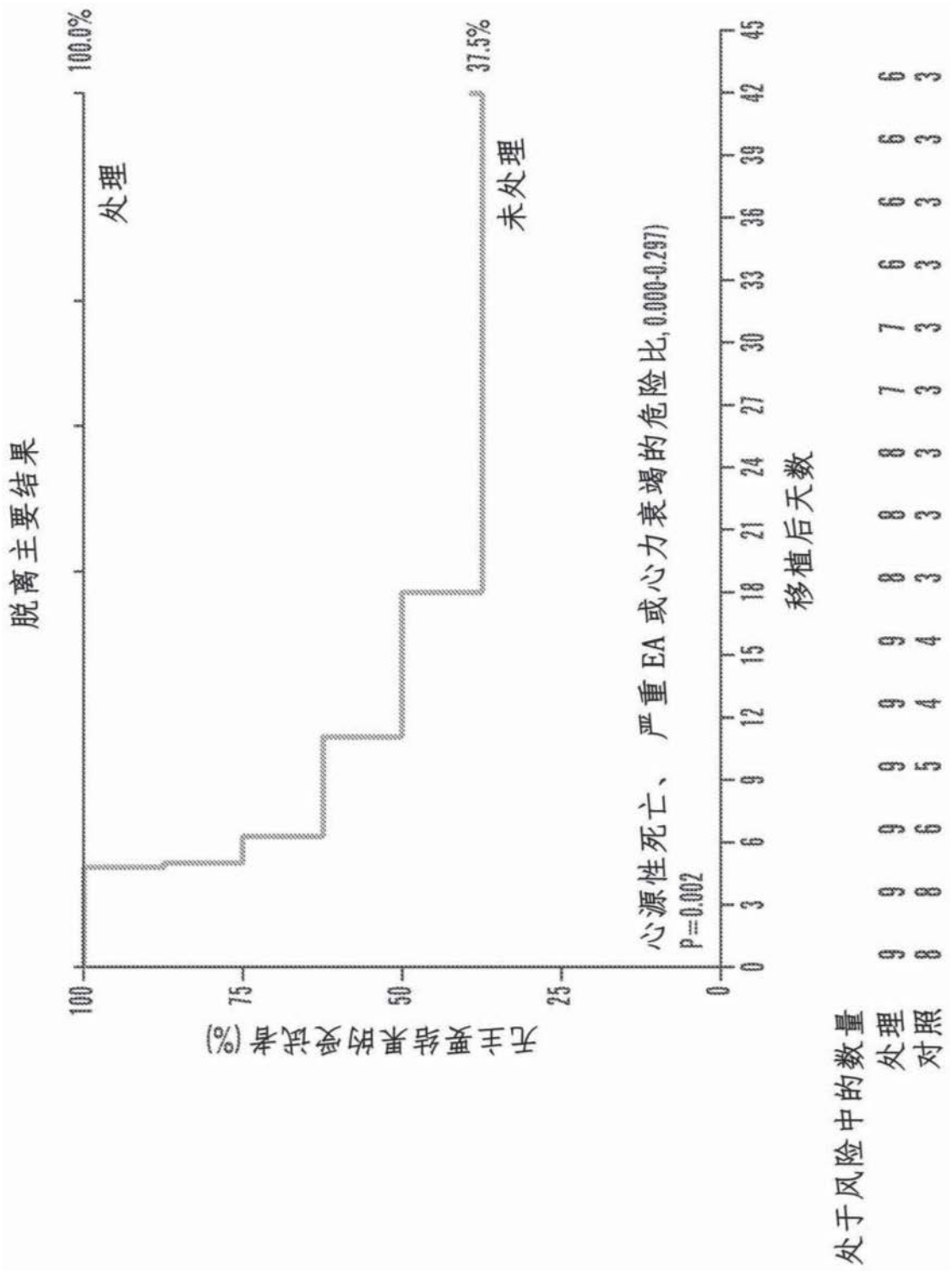

脱离主要结果
处理
未处理
100.0%
37.5%
无事件发生的概率 (%)
100
75
50
25
0
心源性死亡、严重 EA 或心力衰竭的危险比, 0.000-0.297)
P=0.002
移植后天数
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45
处于风险中的数量
处理 9 9 9 9 9 8 8 8 7 7 6 6 6 6
对照 8 8 6 5 4 4 3 3 3 3 3 3 3 3

图22A

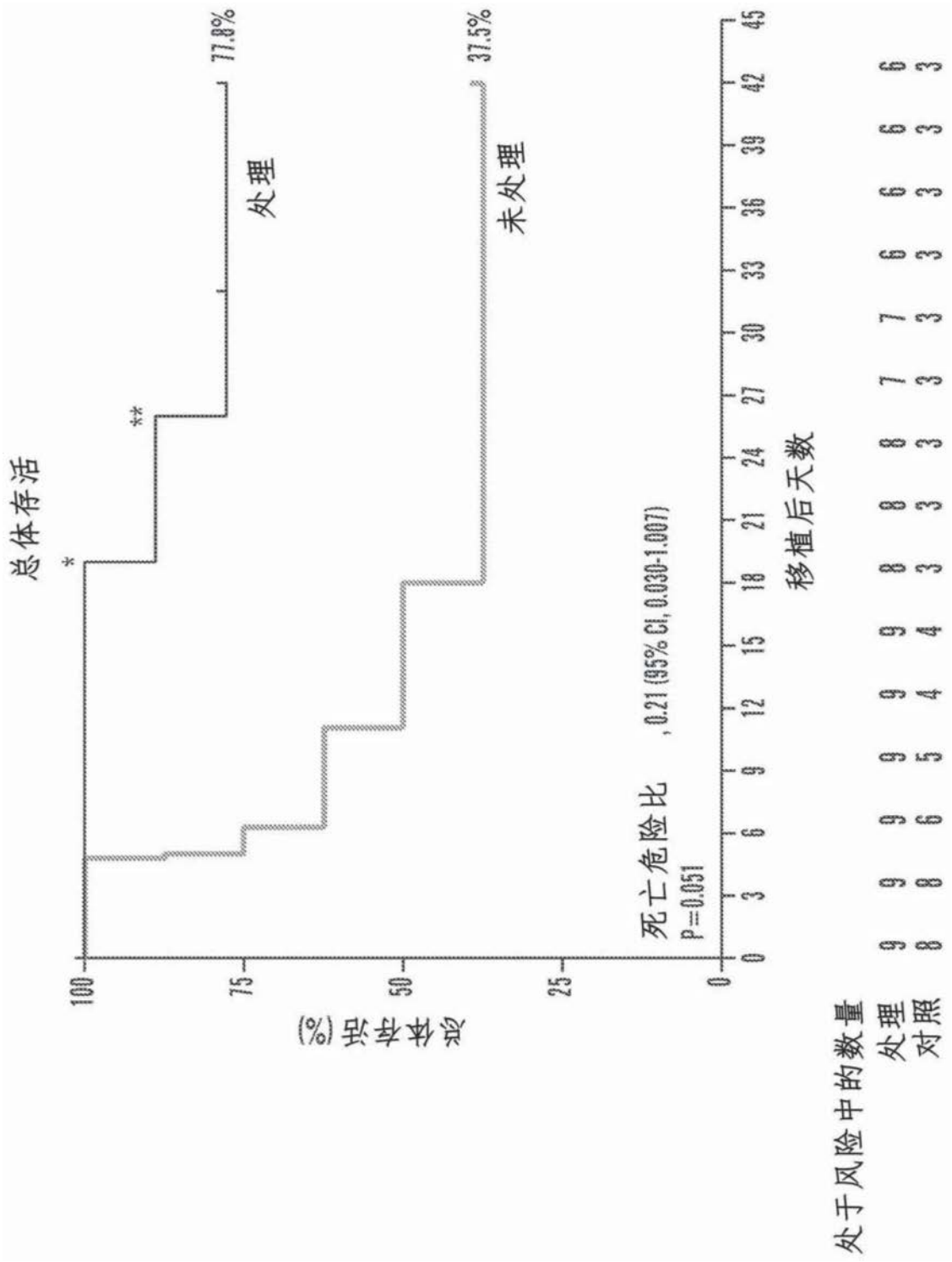

总体存活
*
**
77.8%
37.5%
处理
未处理
100
75
50
25
0
总体存活(%)
死亡危险比 ,0.21(95% CI, 0.030-1.007)
P=0.051
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45
移植后天数
处于风险中的数量
处理 9 9 9 9 9 9 8 8 8 8 7 7 6 6 6 6
对照 8 8 6 5 4 4 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3

图22B

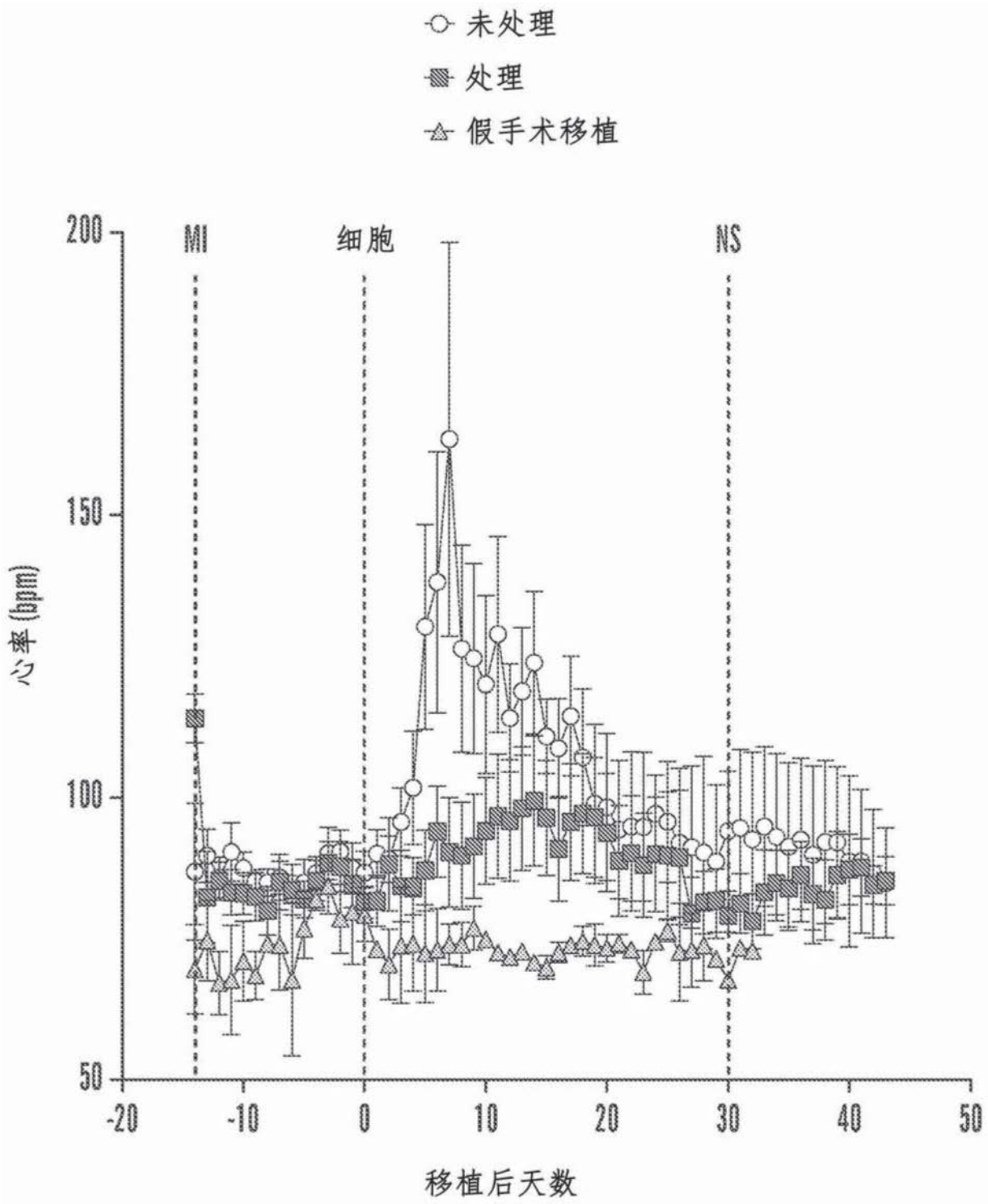

未处理
处理
假手术移植
MI
细胞
NS
200
150
100
50
心率(bpm)
-20
-10
0
10
20
30
40
50
移植后天数

图23A

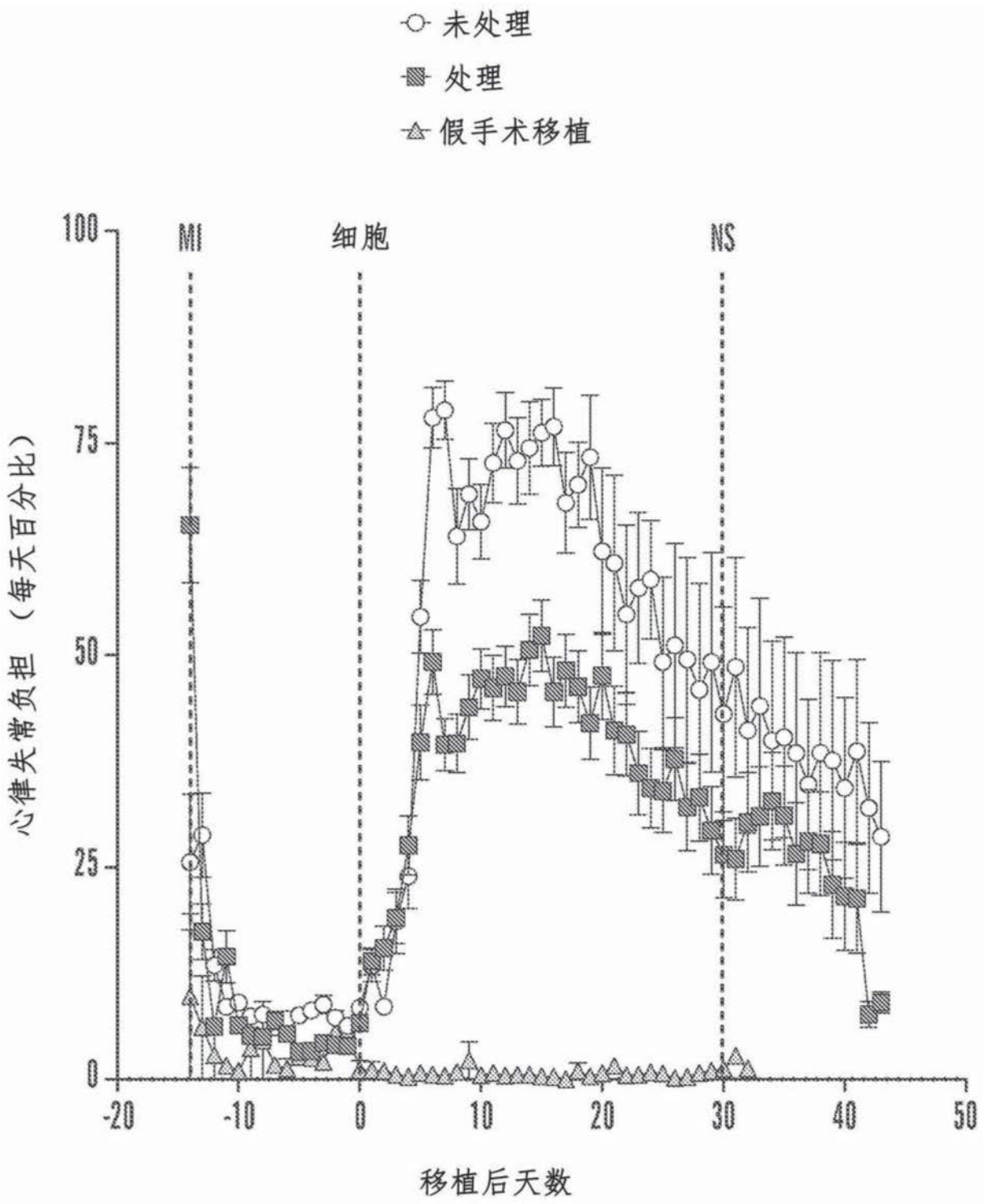

未处理
处理
假手术移植
MI
细胞
NS
心律失常负担（每天百分比）
100
75
50
25
0
-20
-10
0
10
20
30
40
50
移植后天数

图23B

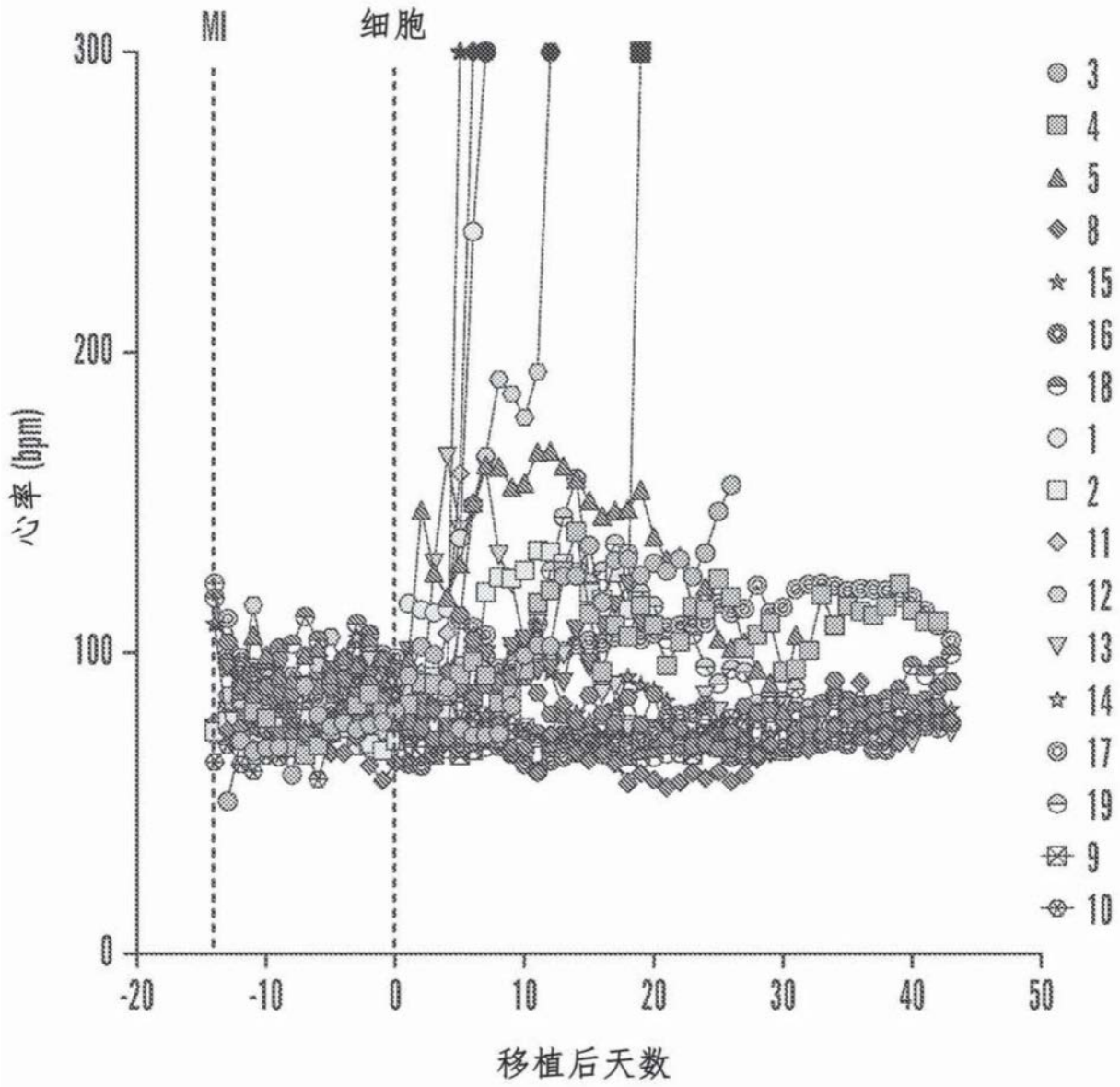

MI
细胞
300
200
100
0
-20
-10
0
10
20
30
40
50
移植后天数
3
4
5
8
15
16
18
1
2
11
12
13
14
17
19
9
10

图23C

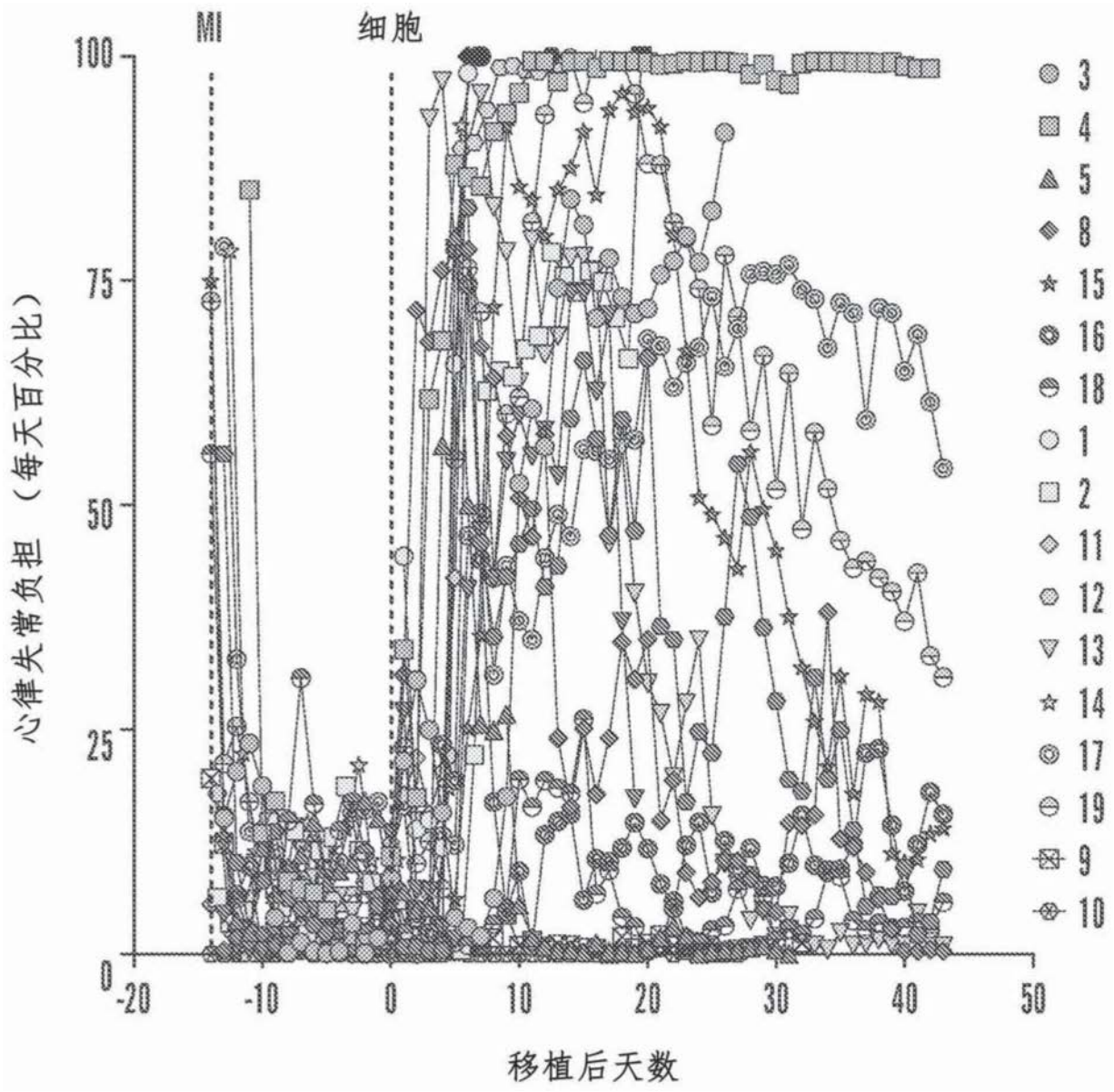

MI
细胞
心律失常负担（每天百分比）
100
75
50
25
0
-20
-10
0
10
20
30
40
50
移植后天数
3
4
5
8
15
16
18
1
2
11
12
13
14
17
19
9
10

图23D

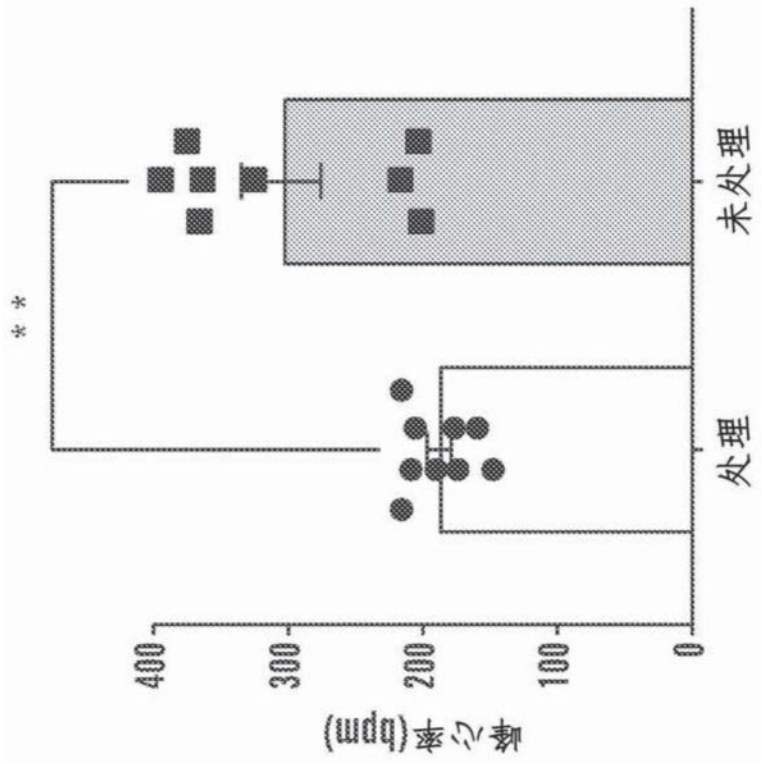


图23E

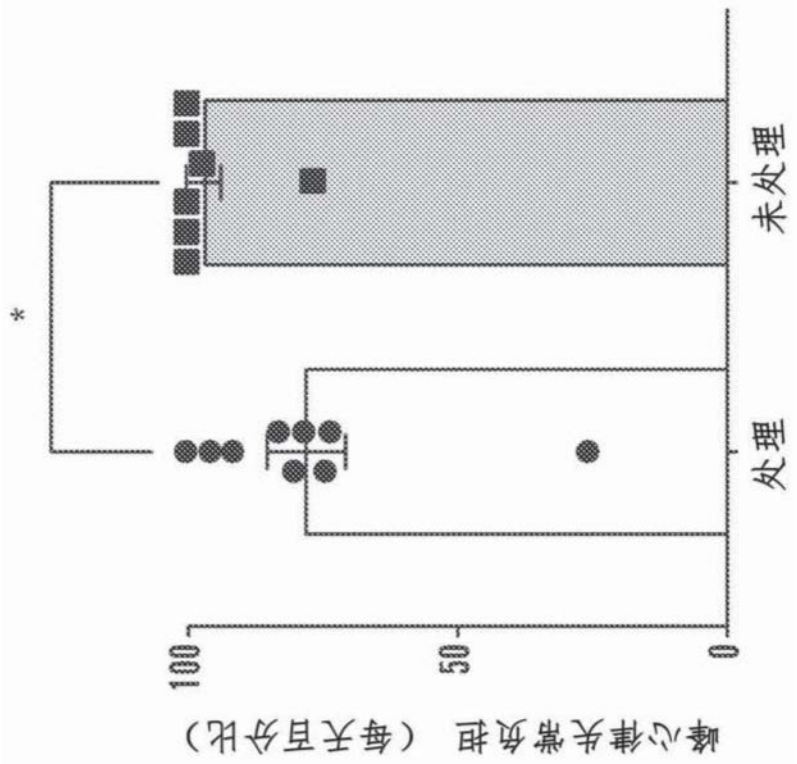


图23F

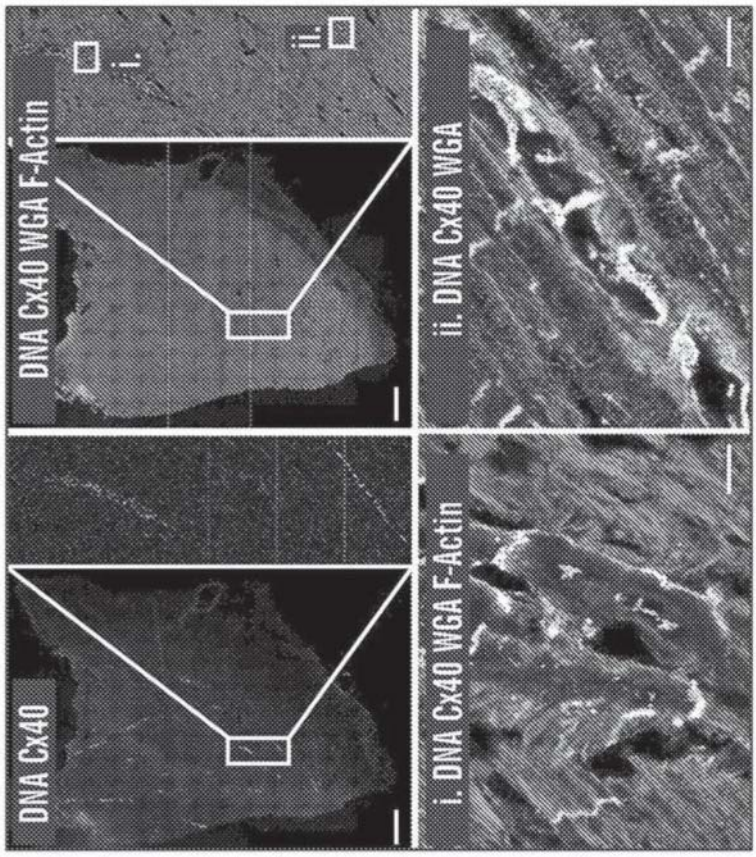

DNA Cx40
DNA Cx40 WGA F-Actin
i.
ii.
i. DNA Cx40 WGA F-Actin
ii. DNA Cx40 WGA

图24A

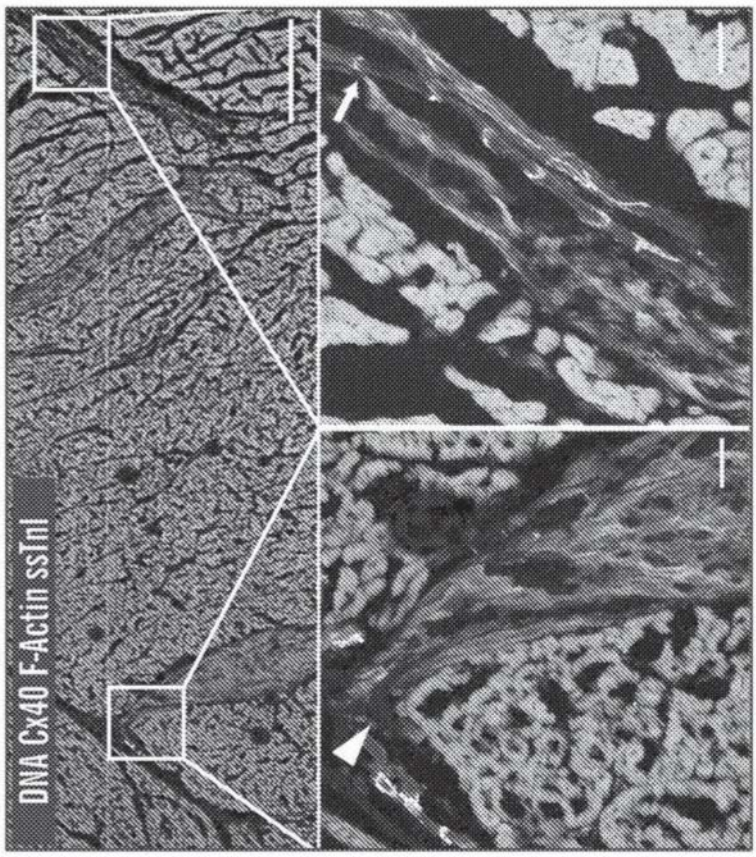


图24B

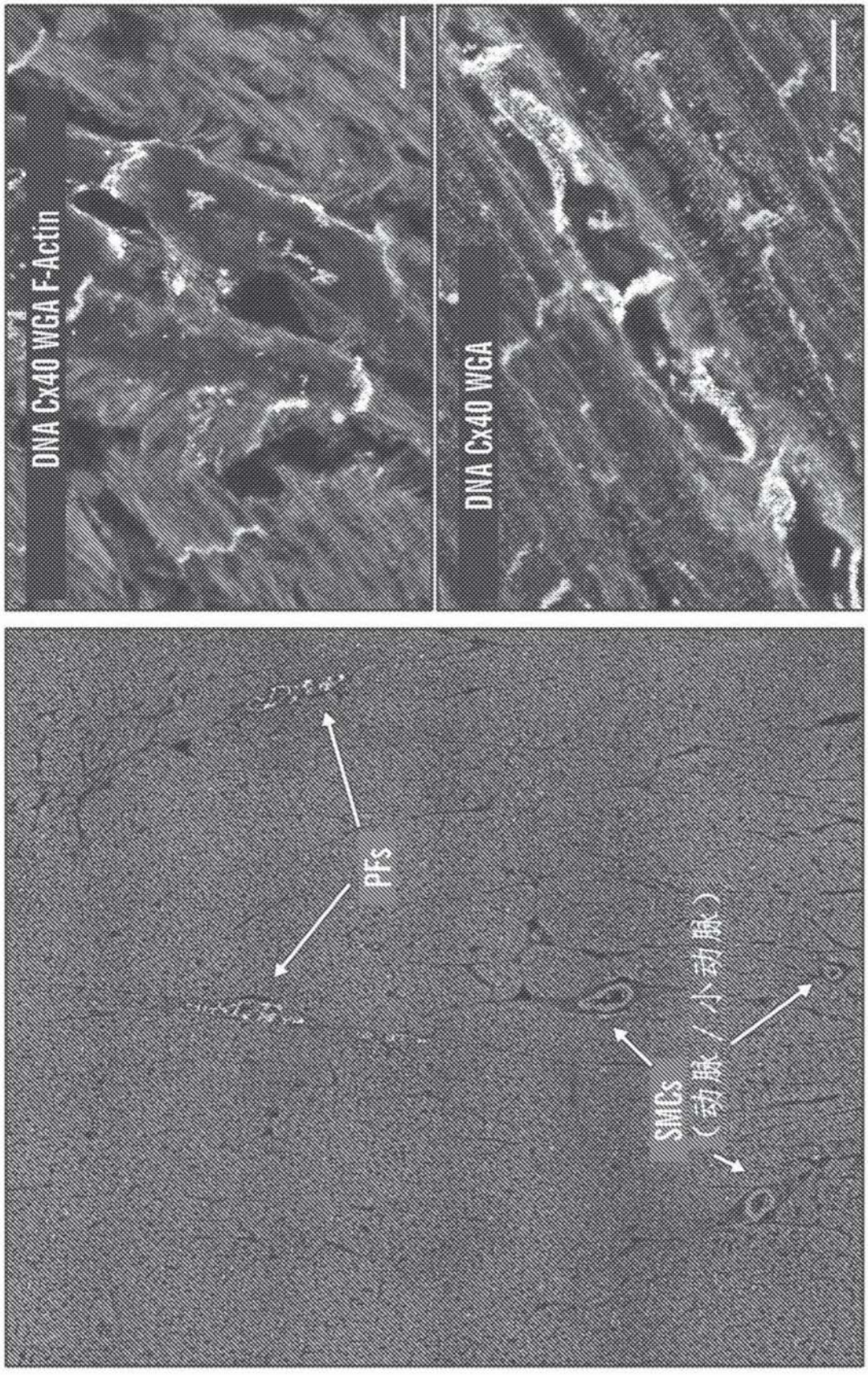


图25