



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011145370/15, 20.05.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.05.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
20.05.2009 EP PCT/EP2009/056197

(43) Дата публикации заявки: 27.06.2013 Бюл. № 18

(45) Опубликовано: 27.08.2016 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US2008019944 A1, 24.01.2008.
WO2008147057 A1, 04.12.2008. WO2008109839
A1, 12.09.2008. WO2006015127 A2, 09.02.2006.
US2004071665 A1, 15.04.2004. WO2006080434 A1,
03.08.2006.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 20.12.2011(86) Заявка РСТ:
EP 2010/057004 (20.05.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/133686 (25.11.2010)

Адрес для переписки:

190000, Санкт-Петербург, ул. Малая Морская,
15, офис 5, ВОХ-сервис 1125, ООО
"ПАТЕНТИКА"

(72) Автор(ы):

ГОССИН Винциан (ВЕ),
ГОРДОН-БЕРЕСФОРД Роланд (ВЕ),
ОМСИ Кристиан (ВЕ)

(73) Патентообладатель(и):

СЕЛЯД СА (ВЕ)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЦА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к кардиологии, и может быть использована для изготовления и применения фармацевтической композиции (ФК) для лечения нарушений, вызванных заболеваниями сердца. ФК содержит клетки, коммитированные на формирование сердечной ткани, и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Вспомогательное вещество представляет собой консервирующий раствор, который включает диметилсульфоксид

(ДМСО), ионы, рН-буферные растворы, непроникающие агенты, коллоиды и метаболиты. Также предложен набор для введения ФК. Группа изобретений обеспечивает лечение ишемической кардиомиопатии, острого инфаркта миокарда, хронического инфаркта миокарда, сердечной недостаточности неишемического характера, сердечной недостаточности ишемического характера, врожденной кардиомиопатии или их сочетания. 5 н. и 54 з.п. ф-лы, 4 табл., 1 ил., 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 595 801** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 35/34 (2015.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 9/00 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011145370/15, 20.05.2010**

(24) Effective date for property rights:
20.05.2010

Priority:

(30) Convention priority:
20.05.2009 EP PCT/EP2009/056197

(43) Application published: **27.06.2013** Bull. № 18

(45) Date of publication: **27.08.2016** Bull. № 24

(85) Commencement of national phase: **20.12.2011**

(86) PCT application:
EP 2010/057004 (20.05.2010)

(87) PCT publication:
WO 2010/133686 (25.11.2010)

Mail address:

**190000, Sankt-Peterburg, ul. Malaja Morskaja, 15,
ofis 5, VOKH-servis 1125, OOO "PATENTIKA"**

(72) Inventor(s):

**GOSSIN Vintsian (BE),
GORDON-BERESFORD Roland (BE),
OMSI Kristian (BE)**

(73) Proprietor(s):

SELYAD SA (BE)

(54) PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING CARDIAC DISEASES

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions can be used for preparing and using a pharmaceutical composition (FC) for treating disorders caused by cardiac diseases. FC contains cells of committed cardiac tissue formation, and at least one pharmaceutically acceptable excipient. Excipient is a preservative solution which comprises dimethyl sulphoxide (DMSO), ions, pH buffers, non-

penetrating agents, colloids and metabolites. Also disclosed is a kit for administering FC.

EFFECT: group of inventions allows treatment of ischemic cardiomyopathy, acute myocardial infarction, chronic myocardial infarction, cardiac failure of non-ischemic nature, ischemic cardiac insufficiency, congenital cardiomyopathy, or combinations thereof.

59 cl, 4 tbl, 1 dwg, 1 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к лечению нарушений, вызванных заболеваниями сердца, или предрасположенности к таким нарушениям посредством введения фармацевтической композиции субъекту, нуждающемуся в таком лечении. В частности, описана фармацевтическая композиция, которая содержит клетки, коммитированные на формирование сердечной ткани, и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, заключенное в контейнер для того, чтобы обеспечить выживание клеток и их транспортировку по всему миру, удобное использование медицинскими работниками для введения субъекту, причем указанные клетки получают согласно принятым международным стандартам изготовления фармацевтических продуктов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Регенеративная клеточная терапия особенно важна для лечения заболеваний, при которых органы нарушены таким образом, что необходимо восстановить ткань, например, для восстановления морфологии, а также для восстановления функции больного органа, или когда нарушены физиологические механизмы восстановления. Сердце представляет собой терминально дифференцированный орган, и большая потеря кардиомиоцитов, например, при инфаркте миокарда, приводит к необратимым изменениям, и, таким образом, к необходимости восстановления. Кроме того, заболевания сердца являются ведущей причиной смертности в мире. Клеточная терапия для восстановления сердца представляет собой проблему чрезвычайной важности.

[0003] Клиническое применение клеточной терапии было основано на зрелых стволовых клетках, вводимых в неизменном состоянии. Биопрепараты первого поколения представляли собой наивные стволовые клетки человека, которые определяли как легкодоступные цитотипы. Было показано, что у некоторых субъектов происходили улучшения после введения наивных стволовых клеток человека. Положение дел в области трансплантации наивных стволовых клеток человека в сердце человека было описано в числе других в обзоре, выполненном Abdel-Latif A. и др. 'Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis.' Arch Intern Med. (2007) 167:989-997 и включенных в него ссылок. В надежде на улучшение клинического результата была предложена концепция способов лечения с помощью стволовых клеток второго поколения, которая заключается в повышении кардиогенеративного потенциала наивных стволовых клеток перед их введением субъекту.

[0004] Для исследования способов улучшения кардиогенеративного потенциала клетки, первоначально, в фундаментальных исследованиях для расшифровки сложных сигнальных путей, участвующих в процессе дифференцировки сердца, использовали эмбриональные стволовые клетки мыши (далее мЭСК). Указанные исследования привели к обнаружению кардиогенных веществ, которые при осуществлении их контакта с клеткой повышают способность указанной клетки к дифференцировке в кардиопоэтическую клетку. Кардиопоэтическая клетка представляет собой промежуточный фенотип клетки, при котором клетка коммитирована на формирование ткани сердца, но еще дифференцирована не полностью. Ключевые этапы фундаментальных исследований в области регенерации сердца представлены в публикациях:

- Behfar и др., 'Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny', Nature Clin. Pract., Cardiovasc. Med. (2006) 3: S78-S82,
- Behfar и др., 'Cardiopoietic programming of embryonic cells for tumor-free repairs', J. Exp. Med. (2007) 204:405-420, and

- WO 2006/015127, US 2008/0019944 и WO 2009/151907, все Mayo Foundation for Medical Education and Research, Terzic A. и Behfar A.

[0005] Указанные выше авторы, заявители и авторы настоящего изобретения показали, что дифференцировку мЭСК в клетки, коммитированные на формирование
5 ткани сердца, можно вызывать при культивировании мЭСК в условиях контакта с так
называемыми коктейлями из кардиогенных веществ, т.е. композициями, содержащими
кардиогенные факторы в растворе. Согласно публикации WO 2006/015127, при введении
полученных из мЭСК кардиопоэтических клеток в сердце мышей, страдающих
10 хроническим инфарктом, можно достичь восстановления сердца. Таким образом, стало
известно, что кардиопоэтические клетки, полученные из мЭСК, способны оказывать
благоприятное действие на регенерацию ткани сердца. Тем не менее риск развития
опухоли, ассоциированный с ЭСК, ставит вопрос обеспечения безопасности при
клиническом применении указанных фундаментальных открытий. Более того, на мышах
15 в лабораторных условиях были проведены эксперименты по применению
кардиопоэтических клеток, полученных из культивируемых мЭСК, которые
суспендировали в питательной среде в пробирке и непосредственно применяли в том
же учреждении.

[0006] Считается, что лечение с применением зрелых стволовых клеток лишено риска
развития опухоли. Обнаружение источника стволовых клеток, у которых отсутствует
20 подтвержденный риск развития опухоли, и которые подходят для получения из них
кардиопоэтических клеток, описано в публикации Behfar и др. 'Derivation of a cardiopoietic
population from human mesenchymal stem yields progeny', Nature Clinical Practice, Cardiovascular
Medicine (2006) 3: S78-S82. В публикации US 2008/0019944 описываются
кардиопоэтические клетки, полученные из мезенхимных стволовых клеток.

[0007] Авторы, заявители и авторы настоящего изобретения также описывают, что
25 можно осуществить дифференцировку зрелых мезенхимных стволовых клеток человека
в кардиопоэтические клетки при использовании коктейля из кардиогенных факторов
(WO 2009/151907).

[0008] Уровень техники в области трансплантации клеток в сердце человека описан,
30 в частности, в обзоре, выполненном Abdel-Latif A. и др. 'Adult bone marrow-derived cells
for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis.' Arch Intern Med. (2007) 167:989-997,
и сопутствующих ссылках. В другом обзоре, выполненном Behfar и др., 'Guided stem
cell cardiopoietic: Discovery and translation' J. Mol. and Cell. Cardiology (2008) 45:523-529,
также представлена теория использования кардиопоэтических клеток для
35 восстановления сердца.

[0009] Переход от лабораторных исследований к клиническому применению зачастую
является трудностью для фармацевтической промышленности. В данном случае эту
трудность особенно сложно преодолеть по причине биологических свойств клеток,
коммитированных на формирование ткани сердца, и безусловной необходимости
40 сохранения указанных свойств до момента введения субъекту, если указанный субъект
находится далеко от места изготовления.

[0010] Настоящее изобретение решает указанную проблему посредством раскрытия
способа промышленного производства фармацевтической композиции, которая
содержит клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, и по меньшей мере
45 одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, в соответствии с
признанными международными стандартами производства лекарственных средств,
способа консервации и упаковки клеток, который способствует различным способам
применения при сохранении свойств клеток, коммитированных на формирование ткани

сердца, их выживанию, транспортировке по всему миру, удобному обращению медицинских работников для введения реципиенту.

Определения

5 [0011] В пределах настоящего документа, и если не указано обратное, следующие термины, заключенные в кавычки, имеют следующие определения.

[0012] Термин «МСК ККМ» обозначает мезенхимные стволовые клетки красного костного мозга, «МСК ККМч» обозначает указанные МСК ККМ человека.

10 [0013] Термин «кардиопоэтические клетки» обозначает клетки промежуточного фенотипа, т.е. коммитированные на формирование ткани сердца, но не полностью дифференцированные. Для кардиопоэтических клеток характерен перенос Nkx2.5 и MEf2C в ядро в сочетании с отсутствием саркомерных белков (Behfar и др. 'Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny', Nature Clin. Pract., Cardiovasc. Med. (2006) 3: S78-S82). Кардиопоэтические клетки сохраняют пролиферативный потенциал. Кардиопоэтические клетки могут быть получены из 15 стволовых клеток, включая, например, зрелые мезенхимные стволовые клетки человека, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, и из любого другого подходящего источника.

[0014] Термин «кардиогенный коктейль» или «коктейль» обозначает композицию, содержащую по меньшей мере два кардиогенных вещества.

20 [0015] Термин «кардиогенное вещество» обозначает вещество, которое при осуществлении контакта с клеткой увеличивает способность указанной клетки дифференцироваться в кардиопоэтическую клетку.

[0016] Термин «конфлюэнтность» обозначает состояние, в котором клетки выросли в наибольшем количестве в определенном объеме. На данном этапе осуществление 25 контакта с другими клетками приводит к подавлению роста клеток.

[0017] Термин «эффективное количество» обозначает количество указанной фармацевтической композиции, достаточное для обеспечения желаемого лекарственного или физиологического действия или результата. Такое действие или результат включает восстановление, сохранение, регенерацию, прирост ткани сердца или улучшение работы 30 сердца. В некоторых случаях проявляются побочные эффекты наряду с желаемым терапевтическим действием; поэтому лечащий врач сопоставляет возможное благоприятное действие с возможным риском при определении приемлемого «эффективного количества». Указанное количество может различаться от субъекта к субъекту, в зависимости, например, от возраста, общего состояния здоровья субъекта, 35 генетических и эпигенетических различий между субъектами и т.п. и способа введения. Таким образом, можно установить точное «эффективное количество». Тем не менее специалист в данной области может определить соответствующее «эффективное количество» в каждом отдельном случае до введения или во время введения указанной фармацевтической композиции, например, посредством введения наибольшего 40 допустимого количества без побочного действия при введении указанной фармацевтической композиции.

[0018] Термин «вспомогательное вещество» обозначает неактивное вещество, используемое в качестве носителя активных компонентов лекарственного средства. Во многих случаях невозможно с легкостью вводить «активное» вещество, и оно не 45 сразу усваивается телом человека; в таких случаях указанное вещество можно растворять в или смешивать со вспомогательным веществом. Кроме применения в количестве однократных доз, вспомогательные вещества можно применять в процессе изготовления для облегчения обращения с указанным активным веществом. В

зависимости от способа введения и формы лекарственного средства можно использовать различные вспомогательные вещества. Для стабилизации активного компонента добавляют вспомогательные вещества, гарантирующие, что активный ингредиент остается активным, и что не менее важно, стабильным в течение достаточно долгого периода времени, таким образом, что срок хранения указанного продукта обеспечивает его конкурентную способность по сравнению с другими продуктами.

[0019] В пределах настоящего документа термин «пролиферативная способность» обозначает увеличение числа клеток.

[0020] В пределах настоящего документа термин «жизнеспособность» обозначает неспособность клеток поглощать краситель трипановый синий, что свидетельствует о целостности мембраны клеток.

[0021] Термины «субъект», «реципиент» и «пациент» в настоящем описании используются взаимозаменяемо и, если не указано иное, обозначают человека или млекопитающее, нуждающееся в лечении заболевания сердца или нарушения сердца, с применением фармацевтической композиции согласно настоящему описанию. Субъекты также включают субъектов с риском развития указанного заболевания или нарушения сердца.

[0022] При использовании в настоящем описании неопределенные артикли также включают множественные значения, если из контекста не следует обратное. Таким образом, например, ссылка на фразу «стволовая клетка» включает одну клетку, а также две или более клеток; ссылка на фразу «агент» или «реагент» включает отдельный агент или реагент, а также два или более агентов или реагентов, ссылка на фразу «настоящее изобретение» или «изобретение» включает один или несколько аспектов настоящего изобретения и т.д.

[0023] Если не указано иначе, все технические и научные термины согласно настоящему описанию имеют одинаковое значение, которое будет понятно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что можно использовать способы и материалы, похожие или эквивалентные описанным в настоящей публикации способам и материалам, для реализации или проверки настоящего изобретения, подходящие методы и материалы описаны ниже.

Краткое описание изобретения

[0024] В следующем подробном описании изложены различные детали для обеспечения полного понимания заявленного предмета настоящего изобретения. Однако специалисту в данной области техники будет понятно, что указанный заявленный предмет настоящего изобретения можно осуществлять без указанных конкретных деталей. В других случаях хорошо известные способы, процедуры, компоненты и т.д. не были описаны подробно, чтобы не затруднять понимание указанного заявленного предмета.

[0025] Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, и по меньшей мере одно фармацевтическое вспомогательное вещество. Предпочтительно, клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, получают согласно принятым международным стандартам изготовления лекарственных средств. Наиболее предпочтительно, указанное фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество представляет собой консервирующий раствор. Предпочтительно указанный консервирующий раствор выбран из группы, состоящей из консервирующих растворов, которые позволяют проводить криоконсервацию при температурах от -196°C до 0°C, и консервирующих растворов, которые позволяют проводить консервацию при

температурах от 0°C до +40°C. Предпочтительно, указанный консервирующий раствор представляет собой консервирующий раствор, который может содержать ионы, буферы, непроникающие вещества, коллоиды и метаболиты, диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, сахарозу, сывороточный альбумин, трегалозу или любое их сочетание.

5 Предпочтительно, ионы выбраны из группы, состоящей из ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- и сочетаний указанных ионов. Предпочтительно, буферные растворы выбраны из группы, состоящей из H_2PO_4^- , HCO_3^- , (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты) (HEPES) и их смесей. Предпочтительно, непроникающие агенты выбраны из
10 группы, состоящей из лактобионата, сахарозы, маннитола, глюкозы и их сочетаний. Предпочтительно, указанный коллоидный раствор представляет собой Декстран-40. Предпочтительно, указанные метаболиты выбраны из группы, состоящей из аденозина, глутатиона и их сочетаний. Предпочтительно, указанный по меньшей мере один фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество дополнительно содержит по
15 меньшей мере один компонент, выбранный из группы, состоящей из факторов роста, цитокинов, белков, участвующих в сигналинге при органогенезе, лекарственных препаратов, лизата тромбоцитов, сыворотки, изотопов, средств отслеживания клеток *in vivo*, разбавителей, смазывающих веществ, матричных или каркасных материалов и их сочетаний.

20 [0026] Предпочтительно, клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, могут представлять собой стволовые клетки или клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, полученные из стволовых клеток. Предпочтительно, стволовые клетки выбраны из группы, состоящей из зрелых стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (IPS), индуцируемых в различных
25 направлениях зрелых клеток, выделенных из костного мозга (MAMI), резидентных стволовых клеток сердца, вегетативных стволовых клеток или их любого сочетания. Предпочтительно, стволовые клетки представляют собой мезенхимные стволовые клетки, полученные из соответствующей ткани, выбранной из группы, состоящей из костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови, амниотической жидкости,
30 менструальной крови, крови. Предпочтительно, клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, представляют собой клетки млекопитающего. Предпочтительно, клетки млекопитающего выбирают из группы, состоящей из клеток человека, кошек, собак, свиней, лошадей, мышей, крыс, хомяков и других млекопитающих. Предпочтительно, указанные клетки представляют собой аутологичные
35 клетки, аллогенные клетки, ксеногенные клетки или любое их сочетание.

[0027] Предпочтительно, клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, являются кардиопоэтическими клетками. Предпочтительно, кардиопоэтические клетки можно получать из стволовых клеток, включая, например, от зрелых мезенхимных
40 стволовых клеток человека, индуцируемых плюрипотентных стволовых клеток, резидентных стволовых клеток сердца или клеток из другого подходящего источника или их сочетания.

[0028] Предпочтительно указанная композиция не содержит поддающихся определению некардиопоэтических клеток, включая, но не ограничиваясь ими, кардиомиоциты, гемопоэтические клетки, клетки предшественники эндотелия,
45 адипобласты, адипоциты, хондробласты, хондроциты, остеобласты, остеоциты, нейробласты и нейроны. Предпочтительно содержание всех некардиопоэтических клеток составляет от 0% до 50% от общего количества клеток, предпочтительно от 0% до 15% от общего количества клеток. Предпочтительно содержание каждого типа

некардиопоэтических клеток составляет от 0% до 50% от общего количества клеток, предпочтительно от 0% до 15% от общего количества клеток.

[0029] Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для применения при лечении ишемической кардиомиопатии, острого инфаркта миокарда, хронического инфаркта миокарда, сердечной недостаточности неишемического характера, сердечной недостаточности ишемического характера, врожденной кардиомиопатии или их сочетания.

[0030] Настоящее изобретение также относится к способу изготовления фармацевтической композиции, который включает следующие этапы:

- получение клеток, из которых можно получить клетки, коммитированные на формирование ткани сердца;
- культивирование указанных клеток в условиях, которые позволяют получать клетки, коммитированные на формирование ткани сердца;
- сбор указанных коммитированных клеток;
- добавление к указанным коммитированным клеткам по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого носителя.

[0031] Предпочтительно указанный способ согласно настоящему изобретению осуществляют согласно принятым международным стандартам изготовления лекарственных средств, который включает отбор проб на любом этапе указанного способа для проведения процедур контроля качества. Наиболее предпочтительно указанный способ согласно настоящему изобретению осуществляют согласно принятым международным стандартам изготовления лекарственных средств, который включает забор проб на последнем этапе культивирования клеток с целью проведения контроля качества указанного активного вещества.

[0032] Предпочтительно критерии контроля качества указанного активного вещества включают по меньшей мере один анализ, выбранный из группы, состоящей из анализа на идентичность, анализа на гомогенность, анализа чистоты и их сочетаний.

Предпочтительно, если клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, представляют собой кардиопоэтические клетки, идентичность указанных

кардиопоэтических клетках определяет повышение уровня экспрессии по меньшей мере одного гена из группы, состоящей из Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1 и их гомологов. Предпочтительно экспрессия указанного гена повышается минимум в два раза по сравнению с контролем, что определяют методом количественной ПЦР. Предпочтительно, если клетки, коммитированные на

формирование ткани сердца, представляют собой кардиопоэтические клетки, их идентифицируют в качестве кардиопоэтических при наблюдаемом наличии по меньшей мере одного типа полипептида, выбранного из группы, состоящей из Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1 и их гомологов при сравнении с контролем, и дополнительно потому что Nkx2.5 и/или MEF2C переносятся в ядра

указанных кардиопоэтических клеток. Предпочтительно, наблюдаемое наличие показано с помощью иммунного окрашивания с использованием по меньшей мере одного антитела из группы, состоящей из антитела к Nkx2.5, антитела к Tbx5, антитела к MEF2C, антитела к GATA4, антитела к GATA6, антитела к Mesp1, антитела к FOG1, антитела к FOG2, антитела к Flk1 и их гомологам. Предпочтительно гомогенность

достигается, когда по меньшей мере 50% данного образца составляют кардиопоэтические клетки. Предпочтительно гомогенность считают достигнутой, если по меньшей мере 50%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 85% клеток в данном образце составляют кардиопоэтические клетки. Предпочтительно о наличии

мезенхимных стволовых клеток среди полученных клеток свидетельствует положительное иммунное окрашивание антителами, направленными против поверхностного маркера, выбранного из группы, состоящей из CD105, CD90, CD133, CD105, CD166, CD29 и CD44, и отсутствие определяемого иммунного окрашивания антителом, направленным против поверхностного маркера, выбранного из группы, состоящей из CD14, CD34 и CD45. Предпочтительно указанную чистоту считают не достигнутой при повышенной экспрессии генов CD34, FABP4, остеокальцина, нестина, Sox9 и MYH7 и их гомологов в два раза или более по сравнению с контролем. Предпочтительно указанное повышение экспрессии генов определяют методом количественной ПЦР по сравнению с контролем. Предпочтительно чистоту считают не достигнутой при повышенном количестве некардиопоэтических клеток, включая, но не ограничиваясь ими, кардиомиоциты, гемопоэтические клетки, клетки предшественники эндотелия, адипобласты, адипоциты, хондробласты, хондроциты, остеобласты, остециты, нейробласты и нейроциты, что показано с помощью иммунного мечения. Предпочтительно указанный контроль состоит из некардиопоэтических клеток. Предпочтительно указанный контроль состоит из клеток, культивированных в отсутствие любого кардиогенного вещества. Предпочтительно условия культивирования включают использование биореактора, которое включает иммобилизацию или инкапсуляцию указанных клеток на частицах или матриксе и пропускание питательной среды через слой частиц или матрикса.

[0033] Настоящее изобретение также относится к способу лечения нарушения, вызванного заболеванием сердца, или предрасположенности к такому заболеванию, согласно которому указанную фармацевтическую композицию вводят субъекту в эффективном количестве. Предпочтительно у данного субъекта наблюдают недостаточность сердечно-сосудистой системы. Предпочтительно указанный субъект страдает от ишемической кардиомиопатии, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности ишемического характера или сердечной недостаточности неишемического характера, врожденной кардиомиопатии или их сочетания.

[0034] Предпочтительно указанную фармацевтическую композицию вводят с использованием способа введения, выбранного из группы, состоящей из введения внутрь миокарда, внутрь сердца, внутрикоронарного введения, внутримышечного введения, подкожного введения, интраперитонеального введения, внутриматочного введения, парентерального или системного введения. Предпочтительно указанную фармацевтическую композицию вводят внутрь миокарда с использованием катетера, шприца или их сочетания.

[0035] Можно осуществить контакт клеток, из которых получают клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, с по меньшей мере одним кардиогенным веществом, которое можно выбрать из группы, состоящей из TGF- β 1, TGF- β 2, TNF- α , BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, FGF-2, FGF-4, FGF-5, FGF-12, FGF-13, FGF-15, FGF-20, фактора подавления лейкемии (LIF), VEGF-A, VEGF-C, инсулиноподобного фактора 1 (IGF-1), интерлейкина 6 (IL-6), активина A, α -тромбина, ретиноевой кислоты, кардиотрофина 1, кардиогенола C и их сочетаний.

[0036] Можно использовать большое количество кардиогенных коктейлей. Указанный ниже список не является ограничивающим. Например, можно использовать коктейль кардиогенных веществ, который включает TGF β -1, BMP4, α -тромбин и вещество, выбранное из группы, состоящей из кардиотрофина и IL-6, и вещество, выбранное из группы, состоящей из кардиогенола C и ретиноевой кислоты. Другой коктейль может включать TGF β -1, BMP4, α -тромбин, кардиотрофин и кардиогенол C. Также другой

коктейль может содержать по меньшей мере одно вещество, выбранное из группы, состоящей из FGF-2, IGF-1, активин А (Activin-A), TNF α , FGF-4, LIF, VEGF-A и их сочетаний. Также они могут содержать FGF 2, IGF-1 и активин-А. Другие предпочтительные коктейли включают активин-А, FGF-2, IL 6, IGF-1 и ретиноевую кислоту. В других коктейлях может отсутствовать по меньшей мере один компонент, выбранный из группы, состоящей из TNF α , FGF-4, LIF и VEGF-A.

[0037] Если одно из следующих веществ присутствует в коктейле, оно может быть представлено в количестве от 1 до 5 нг указанного TGF β 1 в мл, от 1 до 10 нг указанного BMP4 в мл, от 0.5 до 5 нг указанного кардиотрофина в мл, от 0.5 до 5 единиц указанного α -тромбина в мл, и от 50 до 500 нМ указанного кардиогенола С, от 1 до 10 нг указанного FGF 2 в мл, от 10 до 100 нг указанного IGF-1 в мл, от 1 до 50 нг указанного активина-А в мл, от 1 до 50 нг указанного TNF α в мл, от 1 до 20 нг указанного FGF-4 в мл, от 10 до 100 нг указанного IL 6 в мл, от 1 до 10 единиц указанного LIF в мл, от 1 до 50 нг указанного VEGF-A в мл, от 0.1 до 1.0 мкМ указанной ретиноевой кислоты в мл.

[0038] В частности, тип коктейля включает рекомбинантный TGF β -1 (2.5 нг/мл), BMP4 (5 нг/мл), кардиотрофин (1 нг/мл), кардиоген С (100 мкМ нМ), используемые в различных сочетаниях. Особенно предпочтительный тип коктейля содержит такие вещества и также дополнительно содержит α тромбин (1 Ед/мл), FGF 2 (10 нг/мл), IGF-1 (50 нг/мл) и активин-А (5 нг/мл).

[0039] Другие предпочтительные коктейли включают рекомбинантный TGF β 1 (2.5 нг/мл), BMP4 (5 нг/мл), активин-А (5 нг/мл), FGF-2 (10 нг/мл), IL 6 (100 нг/мл), фактор Па (α -тромбин, 1 Ед/мл), IGF-1 (50 нг/мл) и ретиноевую кислоту (1 мкМ), используемые в различных сочетаниях.

[0040] Указанный коктейль можно разбавлять в среде, содержащей вещества, выбранные из группы, состоящей из фетальной бычьей сыворотки, сыворотки человека, лизата тромбоцитов, фактора роста тромбоцитов и их смесей и выбранных веществ.

[0041] Настоящее изобретение также относится к набору для введения фармацевтической композиции, который включает контейнер, содержащий указанную фармацевтическую композицию. Предпочтительно указанный контейнер представляет собой биологически совместимый контейнер, который способствует выживанию клеток и их транспортировке в мировом масштабе, удобен для использования медицинским персоналом при введении реципиенту. Предпочтительно указанный контейнер герметично закрыт. Предпочтительно указанный контейнер совместим со вспомогательным веществом и условиями хранения. Предпочтительно указанный контейнер представляет собой закрытый стеклянный контейнер. Предпочтительно указанный контейнер имеет крышку с диафрагмой, поддающуюся прокалыванию. Предпочтительно указанная крышка с диафрагмой, поддающаяся прокалыванию, позволяет удалять жидкость из контейнера через адаптер для флакона, который включает клапан типа Луэр. Предпочтительно указанную крышку с диафрагмой, поддающуюся прокалыванию, можно проколоть с помощью иглы. Предпочтительно указанная фармацевтическая композиция хранится в герметично закрытом контейнере, подходящем для криоконсервации. Предпочтительно срок хранения фармацевтической композиции в указанном контейнере составляет по меньшей мере 8 часов, предпочтительно 72 часа. Предпочтительно, указанный набор также включает по меньшей мере один катетер. Предпочтительно, указанный набор также включает по меньшей мере один шприц.

Краткое описание фигур

[0042] На Фигуре 1 показаны конечный диастолический объем левого желудочка

(LV) (LVEDV, панель A), конечный систолический объем LV (LVESV, панель B) и фракция выброса LV (LVEF, панель C), которые измеряли в начальный момент времени и через 6 месяцев у субъектов, которых случайным образом определяли в контрольную группу (n=8) и группу исследования (n=9). Результаты нормализовали относительно

5 начального уровня.

Подробное описание изобретения

Пример

[0043] Начало изготовления: образец костного мозга человека, полученный из гребня

10 подвздошной кости субъекта и соответствующий минимальным критериям качества, культивировали в инкубаторе при 37°C/5% CO₂ во флаконах площадью 175-см² для выделения МСК ККМ. Минимальные критерии качества включали отрицательные результаты серологических анализов донора (по меньшей мере анализов на ВИЧ 1/2, сифилис, ВГБ, ВГС), контроль температуры транспортировки костного мозга от места

15 сбора к месту обработки, общий объем, отмечание наличия и объема сгустков крови и отсутствие бактериальной контаминации. Через 24 часа из флаконов аккуратно удаляли остатки клеток и костный мозг. Прикрепленные МСК ККМ промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), добавляли питательную среду и оставляли культуру до начального пассажа P0, производя смену среды каждые 4-6 дней.

20 [0044] P0 - Начальное культивирование от колоний до монослоя клеток: проводили начальный пассаж (P0) для диссоциации колоний и их культивирования и образования ими монослоя. Клетки сеяли в соотношении 1:1 на флаконы площадью 175 см² и оставляли их расти и образовывать монослой в течение периода времени длительностью до 6 дней. Степень конфлюэнтности определяла срок проведения следующего пересева.

25 Указанный этап можно пропустить, если МСК ККМ спонтанно образуют монослой, в котором невозможно различить колонии. Указанный способ продолжался с осуществлением аналогичных пассажей, которым присваивали порядковый номер, начиная с «P0», до получения минимум 50×10⁶ клеток. Определяли параметры, такие как плотность клеток при посеве и число пассажей по причине конфлюэнтности. Оно

30 представляло собой количество клеток, полученное при пассаже, которое определяет размер контейнера, который следует использовать для культивирования для того, чтобы получить оптимальное количество клеток и избежать контактного ингибирования. Анализы внутреннего контроля на этапе P0 включали определение количества клеток и их жизнеспособности.

35 [0045] P1 - Начало обработки кардиогенным коктейлем: в течение 5 дней клетки культивировали в питательной среде и кардиогенном коктейле. Например, могут быть использованы кардиогенные коктейли, такие как коктейли, описанные в публикациях WO 2006/015127, WO 2009/151907 и Behfar и др. 'Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny', Nature Clinical Practice, Cardiovascular Medicine,

40 март 2006, том 3, приложение 1, стр. S78-S82.

[0046] P2 - Окончание обработки кардиогенным коктейлем: удаляли питательную среду, содержащую указанный кардиогенный коктейль. Теперь указанная культура содержала кардиопоэтические клетки. Проводили пассирование и посев указанной культуры в новые контейнеры с питательной средой для дополнительных этапов

45 экспансии при необходимости.

[0047] P3 - Культивирование и получение суспензии: следующие пассажи обозначали «P3» с последующим порядковым номером. Производили пассирование клеток при достижении оптимальной конфлюэнтности, и повторяли его до тех пор, пока количество

клеток не достигло от 600×10^6 до 1200×10^6 клеток. При достижении указанных критериев, получали суспензию клеток. Данный этап включал окончательную обработку трипсином с последующими этапами промывки и концентрирования методом центрифугирования. Заключительную промывку проводили в консервирующем растворе для клеток.

Подходящий указанный использованный консервирующий раствор может быть аналогичен стандартным водным консервирующим растворам для холодного хранения органов и биологических тканей, таким как HypoThermosol-FRS® BioLifeSolutions (Bothell, Wash).

[0048] Затем указанный концентрат клеток переносили в биосовместимый контейнер (в настоящем примере стеклянный флакон 1 типа, Европейская Фармакопея) и добавляли консервирующий раствор до конечного объема 10 мл и концентрации клеток в пределах от 60×10^6 до 120×10^6 кл/мл. Это завершало изготовление фармацевтической композиции.

[0049] Критерии выпуска указанной фармацевтической композиции обычно включали идентичность, гомогенность и чистоту клеток, которые сочетаются с параметрами изготовления, которые подтверждают отсутствие привнесенной контаминации (асептические условия, низкий уровень содержания эндотоксина и отсутствие внесенной микоплазмы).

[0050] Следует отметить, что без какого-либо ущерба для настоящего изобретения можно использовать другие способы получения кардиопоэтических клеток вместо использования кардиогенных веществ.

[0051] Согласно настоящему примеру указанная среда для консервации представляла собой HypoThermosol-FRS® BioLifeSolutions (Bothell, Wash). HypoThermosol-FRS содержит ионы (100 mM Na^+ , 42.5 mM K^+ , 0.05 mM Ca^{2+} , 5 mM Mg^{2+} , 17.1 mM Cl^-); буферные растворы ($10 \text{ mM H}_2\text{PO}_4^-$, 5 mM HCO_3^- , 25 mM HEPES); непроникающие растворы для предотвращения разбухания клеток (100 mM лактобионата, 20 mM сахарозы, 20 mM маннитола); коллоидные вещества (6% Декстран-40); и метаболиты (5 mM глюкозы, 2 mM аденозина, 3 mM глутатиона).

[0052] Также консервацию указанной фармацевтической композиции можно осуществлять согласно настоящему изобретению посредством криоконсервации с использованием диметилсульфоксида (ДМСО). Это дает преимущество более длительного срока хранения (одна неделя или дольше) при условии транспортировки на сухом льду при надлежащем контроле температуры транспортировки.

[0053] Согласно варианту реализации указанной фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, в которой вспомогательное вещество представляет собой HypoThermosol-FRS, срок хранения указанного фармацевтического продукта в контейнере составляет по меньшей мере 72 часа. В частности, стоит отметить, что общее количество клеток 1200×10^6 занимает объем приблизительно 8 мл, тогда как наибольший желательный объем для интрамиокардиального введения составляет приблизительно 10 мл. Это означает, что количество HypoThermosol-FRS является небольшим по сравнению с объемом клеток и будет находиться в пределах всего лишь нескольких миллилитров.

[0054] Неожиданно было отмечено, что даже небольшого количества HypoThermosol-FRS достаточно для сохранения такого важного срока хранения указанной фармацевтической композиции в течение 72 часов. Это обеспечивает достаточное время для подтверждения соответствия всем критериям выпуска, для доставки указанной фармацевтической композиции в любую точку мира и для введения субъекту.

[0055] Критерии выпуска фармацевтической композиции - Идентичность: для кардиопоэтических клеток характерна положительная экспрессия и при необходимости ядерный перенос нескольких маркеров ранней кардиогенной дифференцировки, включая Nkx2.5, MEF2C и GATA-4. Об идентичности кардиопоэтических клеток, содержащихся в указанной фармацевтической композиции, свидетельствовало повышение уровня экспрессии MEF2C и/или Tbx5 по меньшей мере в два раза по сравнению с контролем, определенное методом количественной ПЦР в режиме реального времени, и сохранение указанных особенностей в течение срока хранения.

[0056] Согласно указанному предпочтительному варианту реализации, в Таблицах 1, 2 и 3 ниже показано, что экспрессия ранних маркеров дифференцировки в направлении сердца продолжалась на протяжении 14 дней после хранения указанной фармацевтической композиции в последнем контейнере, и такие клетки сохраняли жизнеспособность и способность к пролиферации в течение по меньшей мере 5 дней. Это показывает уникальную способность описанного в настоящей заявке способа получать и поддерживать клетки, которые подвергали действию кардиогенных веществ, в состоянии, соответствующем их предполагаемому применению.

Таблица 1 Идентичность (количественная ПЦР) на 100 млн жизнеспособных клеток в мл.

День	Партия 1		Партия 2	
	MEF2C	Tbx5	MEF2C	Tbx5
0	2,5	2,6	3,0	2,0
1	2,1	2,4	2,2	1,7
2	2,5	2,6	2,6	2,0
3	2,2	2,1	2,9	1,9
4	2,3	2,5	2,3	3,0
5	2,0	1,8	2,5	2,0
6	2,3	1,0	2,7	1,7
10	2,1	2,0	3,0	3,1
14	2,3	1,5	3,5	2,6

Таблица 2: Жизнеспособность указанной фармацевтической композиции при концентрации клеток 100 млн. общего количества жизнеспособных клеток/мл.

День	Партия 1	Партия 2
0	96	96
1	88	95
2	92	96
3	87	93
4	91	96
5	87	91

Таблица 2: Пролиферативная активность указанной фармацевтической композиции при концентрации клеток при концентрации клеток 100 млн. общего количества жизнеспособных клеток/мл.

День	Партия 1	Партия 2
1	444	456
2	297	481
3	417	333
4	306	417
5	303	722

[0001] Более того, в Таблице 4 и 5 показано, что указанная фармацевтическая композиция не ограничивается определенной обозначенной концентрацией клеток. В действительности сохранение жизнеспособности и пролиферативной активности клеток при различных концентрациях клеток являются отличительными чертами указанной фармацевтической композиции согласно настоящему описанию.

Таблица 3 Влияние концентрации клеток на процент жизнеспособности

День	Партия 1 (в млн. кл/мл)			Партия 2 (в млн. кл/мл)	
	80	100	110	100	120
0	96	96	96	96	96
1	90	88	91	95	94
2	90	92	90	96	87
3	90	87	88	93	93
4	94	91	90	96	96
5	90	87	88	91	94

Таблица 4 Влияние концентрации клеток на пролиферативную способность

День	Партия 1 (в млн. кл/мл)			Партия 2 (в млн. кл/мл)	
	80	100	80	100	80
1	375	444	333	456	444
2	174*	297	314	481	425
3	694	417	500	333	333
4	278	306	292	417	444
5	256	303	214	722	583

Значения, полученные для партии 1 на 2 день для 80 млн клеток в мл, обозначенные (*), считаются ошибкой опыта.

[0058] Критерии выпуска фармацевтической композиции - Гомогенность: для того, чтобы определить процентное содержание кардиопоэтических клеток в указанной фармацевтической композиции согласно описанию указанного предпочтительного варианта реализации, проводили двойное иммунное окрашивание аликвоты клеток антителами против MEF2C и CD105 с последующим окрашиванием ядер с использованием DAPI. Целью являлось определение процентного содержания кардиопоэтических клеток (ядерное окрашивание на MEF2C) и мезенхимных стволовых клеток (CD105-положительных) среди общего количества подсчитанных клеток по количеству ядер, окрашенных DAPI. Анализ полученных от субъектов кардиопоэтических клеток, которые прошли анализ на идентичность методом количественной ПЦР (повышение MEF2C в 2.8 ± 0.6 раз, повышение Tbx5 в 2.2 ± 0.6 раз), показывает, что $96 \pm 2\%$ указанных клеток являлись кардиопоэтическими. Кроме того, 100% подсчитанных клеток были CD105-положительными. Совместно с отсутствием повышения уровня экспрессии CD34, маркера гемопоэтических клеток и клеток предшественников эндотелия (см. абзац «Чистота»), это свидетельствует о том, что

100% указанных клеток являлись мезенхимными стволовыми клетками или полученными из мезенхимных стволовых клеток.

[0059] Критерии выпуска фармацевтической композиции - Чистота: анализ на чистоту, проведенный согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, был направлен на определение того, что клетки типов, отличных от кардиопоэтических клеток и МСК ККМ, отсутствуют в указанной фармацевтической композиции. Способом оценки критерия чистоты является метод количественной ПЦР. Подход, предпринятый для приспособления метода количественной ПЦР для анализа чистоты, включал обнаружение подходящих маркеров, конструкцию коммерческих наборов праймеров и зондов, анализ кривых амплификации и пиков плавления и определение коммерчески доступных положительных контролей РНК. Отсутствие фенотипов гемопоэтических клеток и клеток эндотелиальных предшественников, которые в норме присутствуют в костном мозге, определяли по отсутствию определяемых уровней клеток, экспрессирующих CD34, в указанной фармацевтической композиции. Отсутствия адипобластов, хондробластов, остеобластов или нейробластов определяли в указанной фармацевтической композиции по отсутствию определяемых уровней клеток, экспрессирующих FABP4, клеток, экспрессирующих Sox9, клеток, экспрессирующих остеокальцин, и клеток, экспрессирующих нестин, соответственно. Отсутствия зрелых кардиомиоцитов оценивали по отсутствию определяемых уровней клеток, экспрессирующих MYH7, в указанной фармацевтической композиции.

[0060] Предпочтительный вариант реализации изобретения согласно настоящему описанию указанной фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению вводили посредством инъекции эндокардиально в сердце субъектам с сердечной недостаточностью ишемического происхождения в эффективном количестве 1200×10^6 клеток в участок на границе нежизнеспособного миокарда с использованием специального катетера. Были получены удовлетворительные результаты.

[0061] Осуществимость, безопасность и эффективность фармацевтической композиции, содержащей кардиопоэтические клетки согласно настоящему изобретению, оценивали в проспективном, рандомизированном, открытом, последовательном параллельном с использованием двух групп многоцентровом клиническом исследовании.

[0062] Субъектов, демонстрирующих хроническую сердечную недостаточность на фоне ишемической кардиомиопатии, случайным образом распределяли в контрольную или исследуемую группу. Контрольная группа получала оптимальное стандартное лечение. Исследуемая группа получала указанную фармацевтическую композицию, содержащую кардиопоэтические клетки дополнительно к оптимальному стандартному лечению.

[0063] Указанную фармацевтическую композицию, содержащую кардиопоэтические клетки, вводили посредством инъекции в желудочек в пограничную зону инфаркта с использованием катетера для инъекций MyoStar® Injection Catheter (Biologics Delivery Systems, Калифорния, США). С каждой инъекцией вводили до $1,2 \times 10^9$ в 20 мест, окружающих зону инфаркта.

[0064] Проводили двухмерное эхокардиографическое исследование работы левого желудочка (LV) 17 субъектов, участвовавших в данном клиническом исследовании (9 субъектов в исследуемой группе, 8 субъектов в контрольной группе), в начальный момент времени и спустя 6 месяцев. Работу сердца оценивали, измеряя изменения конечного диастолического объема LV (LVEDV), конечного систолического объема LV (LVESV) и фракции выброса LV (LVEF) через 6 месяцев после инъекции клеток по сравнению с начальным уровнем. В группе исследования наблюдали динамику трех

указанных важных параметров, которая свидетельствовала о положительном действии указанной фармацевтической композиции на сердечную функцию (Фигура 1). Врач-специалист в данной области сможет оценить важное терапевтическое и прогностическое значение, которое имеют полученные результаты.

5 Другие варианты реализации

[0065] Следует понимать, что хотя настоящее изобретение было описано совместно с прилагаемым подробным описанием, следующее описание направлено на иллюстрацию и не ограничивает масштаб настоящего изобретения, который определен масштабом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации
10 находятся в пределах следующих пунктов формулы.

[0066] В частности, указанная фармацевтическая композиция согласно настоящему описанию, включая ее условия хранения и срок хранения, представляет собой исключительно предпочтительный вариант реализации, который описывает применение аутологичных кардиопоэтических клеток, полученных из мезенхимных стволовых
15 клеток костного мозга (МСК ККМ), т.е. фармацевтической композиции, полученной из МСК ККМ, которую будут применять для лечения того же субъекта, от которого были получены указанные МСК ККМ. Масштаб настоящего изобретения не ограничивается аутологичными МСК ККМ и включает любые стволовые клетки независимо от их источника. Клетки, из которых можно получать клетки,
20 коммитированные на формирование ткани сердца, (далее в настоящем абзаце «исходные клетки»), могут являться аллогенными и ксеногенными. Исходные клетки также можно получать другими способами, помимо заготовки костного мозга. Исходные клетки могут представлять собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (IPS), полученные любым способом, включая трансфекцию, перепрограммирование клеток
25 или другой способ, который делает IPS свободными от экзогенных генов. Исходные клетки могут представлять собой индуцируемые к дифференцировке в различных направлениях зрелые стволовые клетки (MIAMI), резидентные стволовые клетки, вегетативные стволовые клетки или любое их сочетание. Объект изобретения не ограничивается определенными компонентами формулы, способами изготовления,
30 биологическими материалами или реагентами, схемами приема и т.п., т.к. они могут различаться.

[0067] Согласно другому варианту реализации указанная фармацевтическая композиция согласно настоящему описанию может включать дополнительные компоненты, например, кардиогенные вещества, факторы роста, такие как факторы
35 роста фибробластов, фактор роста плаценты или фактор роста эндотелия сосудов, цитокины или белки, участвующие в сигналинге органогенеза, молекулярные конструкции, некардиопоэтические клетки, измененные *ex vivo*, лекарственные средства, лизат тромбоцитов, каркасные материалы, такие как ламинин, коллаген или любые другие белки внеклеточного матрикса.

[0068] Согласно другому варианту реализации указанный набор согласно настоящему описанию может включать катетер согласно описанию в публикациях РСТ/ЕР 2010/
40 055869, TW 099113613, США 61/312371, ВЕ 2009/0271, РСТ/ЕР 2010/055856, TW 099113627 или ВЕ 2009/0272.

[0069] Согласно другому варианту реализации набор согласно настоящему описанию может включать дополнительные компоненты, например, пакеты или среды, подходящие
45 для охлаждения, замораживания, лиофилизации, витрификации, размораживания, регидратации, промывки, сортировки, концентрирования, фильтрования, лиофилизации, центрифугирования, ресуспендирования, отбора образцов или аликвот указанной

фармацевтической композиции.

[0070] Согласно другому варианту реализации указанный набор может включать устройство для контроля температуры, устройство для защиты от несанкционированного вскрытия или устройство для определения радиочастот.

5 [0071] Также следует понимать, что использованные в настоящем описании термины приводятся исключительно с целью описания частных вариантов реализации изобретения, но не с целью ограничения.

Формула изобретения

10 1. Фармацевтическая композиция для лечения нарушений, вызванных заболеваниями сердца или предрасположенностей к таким нарушениям, содержащая клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, где указанные клетки демонстрируют:

i. наблюдаемое повышение уровня экспрессии MEF2C и, необязательно, по меньшей мере одного дополнительного гена, выбранного из группы, состоящей из Nkx2.5, Tbx5, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1, по сравнению с контролем, и/или

15 ii. наблюдаемое присутствие по меньшей мере одного типа полипептида, выбранного из группы, состоящей из Nkx2.5, Tbx5, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1, по сравнению с контролем, и ядерный перенос одного или более из Nkx2.5 и MEF2C к ядру клетки;

20 и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где указанное по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество представляет собой консервирующий раствор, который включает диметилсульфоксид (ДМСО), ионы, pH-буферные растворы, непроникающие агенты, коллоиды и метаболиты.

25 2. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой наблюдаемое повышение уровня экспрессии представляет собой повышение минимум в два раза при определении методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР), по сравнению с контролем.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанный консервирующий раствор выбран из группы, включающей консервирующие растворы, которые позволяют 30 осуществлять криоконсервацию при температурах от -196°C до 0°C, и консервирующие растворы, которые позволяют осуществлять консервацию при температурах от 0°C до +40°C.

4. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанный консервирующий раствор представляет собой консервирующий раствор, который может дополнительно 35 содержать глицерин, сахарозу, сывороточный альбумин, трегалозу или любое их сочетание.

5. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанные ионы выбраны из группы, состоящей из Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- и сочетаний указанных ионов.

40 6. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанные pH-буферные растворы выбраны из группы, состоящей из H_2PO_4^- , HCO_3^- , (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты) (HEPES) и их смесей.

7. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанные непроникающие агенты выбраны из группы, состоящей из лактобионата, сахарозы, маннита, глюкозы 45 и их сочетаний.

8. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанный коллоидный раствор представляет собой Декстран-40.

9. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанные метаболиты выбраны из группы, состоящей из аденозина, глутатиона и их сочетаний.

10. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанное по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество включает по меньшей мере один компонент, выбранный из группы, состоящей из факторов роста, цитокинов, белков, участвующих в сигналинге при органогенезе, лекарственных средства, лизата тромбоцитов, сыворотки, изотопов, средств для прослеживания клеток *in vivo*, разбавителей, смазывающих веществ, матричных или каркасных материалов и их сочетаний.

11. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанные клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, представляют собой стволовые клетки.

12. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанные клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, получают из стволовых клеток.

13. Фармацевтическая композиция по п. 12, в которой указанные стволовые клетки выбраны из группы, состоящей из зрелых стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (IPS), индуцируемых к дифференцировке в различных направлениях зрелых клеток костного мозга (MIAMI), резидентных стволовых клеток сердца, вегетативных стволовых клеток и их любых сочетаний.

14. Фармацевтическая композиция по п. 13, в которой указанные стволовые клетки представляют собой мезенхимные стволовые клетки, полученные из соответствующей ткани, выбранной из группы, состоящей из костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови, амниотической жидкости, менструальной крови, крови.

15. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанные клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, представляют собой клетки млекопитающего.

16. Фармацевтическая композиция по п. 15, в которой указанные клетки млекопитающего выбраны из группы, состоящей из клеток человека, кошек, собак, свиней, лошадей, мышей, крыс и хомяков.

17. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанные клетки представляют собой аутологичные клетки, аллогенные клетки, ксеногенные клетки или любое их сочетание.

18. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанные клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, представляют собой кардиопоэтические клетки, которые могут быть получены из зрелых мезенхимных стволовых клеток человека, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, резидентных стволовых клеток сердца или другого подходящего источника или их сочетания.

19. Фармацевтическая композиция по п. 18, отличающаяся тем, что указанная композиция не содержит поддающихся определению некардиопоэтических клеток, включая, но не ограничиваясь ими, кардиомиоциты, гемопоэтические клетки, клетки-предшественники эндотелия, адипобласты, адипоциты, хондробласты, хондроциты, остеобласты, остеоциты, нейробласты и нейроны.

20. Фармацевтическая композиция по п. 19, в которой содержание всех некардиопоэтических клеток составляет от 0% до 50% от общего количества клеток, предпочтительно от 0% до 15% от общего количества клеток.

21. Фармацевтическая композиция по п. 19, в которой содержание каждого типа некардиопоэтических клеток составляет от 0% до 50% от общего количества клеток, предпочтительно от 0% до 15% от общего количества клеток.

22. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-21 для применения при лечении

ишемической кардиомиопатии, острого инфаркта миокарда, хронического инфаркта миокарда, сердечной недостаточности неишемического характера, сердечной недостаточности ишемического характера, врожденной кардиомиопатии или их сочетания.

5 23. Способ изготовления фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов, включающий следующие этапы:

- получение клеток, из которых можно получить клетки, коммитированные на формирование ткани сердца;

10 - культивирование указанных клеток в условиях, которые позволяют получать клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, где указанные коммитированные клетки демонстрируют:

i. наблюдаемое повышение уровня экспрессии MEF2C и, необязательно, по меньшей мере одного дополнительного гена, выбранного из группы, состоящей из Nkx2.5, Tbx5, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1, по сравнению с контролем, и/или

15 ii. наблюдаемое присутствие по меньшей мере одного типа полипептида, выбранного из группы, состоящей из Nkx2.5, Tbx5, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1, по сравнению с контролем, и ядерный перенос одного или более из Nkx2.5 и MEF2C к ядру клетки;

- сбор указанных коммитированных клеток;

20 - добавление к указанным коммитированным клеткам по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества, причем указанное по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество представляет собой консервирующий раствор, который включает диметилсульфоксид (ДМСО), ионы, рН-буферные растворы, непроницающие агенты, коллоиды и

25 метаболиты.

24. Способ по п. 23, согласно которому осуществляют контакт указанных клеток, из которых можно получить клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, с кардиогенным коктейлем, приготовленным из одного или более кардиогенных веществ, выбранных из группы, состоящей из активина А, α -тромбина, ангиопоэтина, белков морфогенеза костной ткани (BMP), таких как BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, кардиотрофина 1, кардиогенола С, эпидермального фактора роста (EGF), эритропоэтина (EPO), факторов роста фибробластов (FGF), таких как FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-5, FGF-12, FGF-13, FGF-15, FGF-20, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), фактора роста-дифференциации 9 (GDF-9), фактора роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобных факторов роста (IGF), таких как IGF-1, IGF-2, миостатина (GDF-8), нейротрофинов, таких как NT-3, NT-4, NT-1 и фактора роста нервов (NGF), фактора роста тромбоцитов (PDGF), такого как PDGF-бета, PDGF-AA, PDGF-BB, тромбопоэтина (TPO), TGF- α (трансформирующий фактор роста альфа), трансформирующих факторов роста β (TGF- β), таких как TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), такой как VEGF-A, VEGF-C, TNF- α , фактора подавления лейкемии (LIF), интерлейкина 6 (IL-6), ретиноевой кислоты, С SDF-1 (фактора стромальных клеток-1), BDNF (нейротрофического фактора роста мозга), периостина, ангиотензина II, лиганда Flt3, нейротрофического фактора глии, связывающего белка-3 инсулиноподобного фактора роста, связывающего белка-5 инсулиноподобного фактора роста, интерлейкина-3, интерлейкина-8, мидкина, прогестерона, путресцина, фактора стволовой клетки, TGF-альфа, Wnt1, Wnt3a, Wnt5a, каспазы-4, лиганда хемокина 1, лиганда хемокина 2, лиганда хемокина 5, лиганда хемокина 7, лиганда хемокина 11, лиганда хемокина 20,

гаптоглобина, лектина, холестерина 25-гидроксилазы, синтаксина-8, синтаксина-11, церулоплазмина, компонента комплемента 1, компонента комплемента 3, интергрин альфа 6, лизосомальной кислой липазы 1, β -2 микроглобулина, убиквитина, фактора подавления миграции макрофагов, кофилина, циклофилина А, FKBP12, NDPK, профилина 1, цистатина С, кальциклина, станниокальцина-1, PGE-2, mpCCL2, IDO, iNOS, HLA-G5, M-CSF, PlGF, MCP-1, молекул внеклеточного матрикса, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL20 (MIP-3 α), CCL26 (эотаксина-3), CX3CL1 (фракталины), CXCL5 (ENA-78), CXCL11 (i-TAC), CXCL1 (GRO α), CXCL2 (GRO β), CXCL8 (IL-8), CCL10 (IP-10) и их сочетаний.

25. Способ по п. 24, согласно которому указанный кардиогенный коктейль разбавляют в среде, содержащей вещества, выбранные из группы, состоящей из телячьей эмбриональной сыворотки, сыворотки крови человека, лизата тромбоцитов, фактора роста тромбоцитов и их смесей, и вещества, выбранные из:

- первой группы, состоящей из: TGF β -1, BMP-4, α -тромбина, вещества, выбранного из группы, состоящей из кардиотрофина 1 и IL-6, и вещества, выбранного из группы, состоящей из кардиогенола С и ретиноевой кислоты;

- второй группы, состоящей из: TGF β -1, BMP-4, α -тромбина, кардиотрофина 1, IL-6, ретиноевой кислоты и кардиогенола С;

- третьей группы, состоящей из: активина-А, FGF-2, IL-6, IGF-1 и ретиноевой кислоты;

- четвертой группы, состоящей из: TGF- β 1, TGF- β 2, TNF- α , BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, FGF-2, FGF-4, FGF-5, FGF-12, FGF-13, FGF-15, FGF-20, фактора подавления лейкемии, VEGF-A, VEGF-C, инсулиноподобного фактора роста 1, интерлейкина 6 (IL-6), активина А, α -тромбина, ретиноевой кислоты, кардиотрофина 1, кардиогенола С и их сочетаний.

26. Способ по п. 23, который включает отбор образцов на любом этапе указанного способа для осуществления контроля качества.

27. Способ по п. 23, который включает отбор образцов на последнем этапе культивирования клеток для осуществления контроля качества активного вещества.

28. Способ по п. 23, согласно которому критерии контроля активного вещества включают по меньшей мере один анализ, выбранный из группы, состоящей из анализа на идентичность, анализа на гомогенность, анализа на содержание примесей и их сочетания.

29. Способ по любому из пп. 23-28, согласно которому клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, представляют собой кардиопоэтические клетки.

30. Способ по п. 29, согласно которому экспрессия указанного гена повышена минимум в два раза, при определении методом количественной ПЦР, по сравнению с контролем.

31. Способ по п. 28, согласно которому, в случае, когда клетки, коммитированные на формирование ткани сердца, представляют собой кардиопоэтические клетки, их идентичность в качестве кардиопоэтических клеток считают установленной при наблюдаемом присутствии по меньшей мере одного типа полипептида, выбранного из группы, состоящей из Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1 и их гомологов по сравнению с контролем, и когда Nkx2.5 и/или MEF2C дополнительно переносятся в ядра указанных кардиопоэтических клеток.

32. Способ по п. 31, согласно которому о наблюдаемом присутствии свидетельствует иммунное окрашивание по меньшей мере одним антителом из группы, состоящей из антитела к Nkx2.5, антитела к Tbx5, антитела к MEF2C, антитела к GATA4, антитела к GATA6, антитела к Mesp1, антитела к FOG1, антитела к FOG2, антитела к Flk1 и их

гомологам.

33. Способ по п. 28, согласно которому гомогенность достигается, если по меньшей мере 50% в данном образце составляют кардиопоэтические клетки.

34. Способ по п. 33, согласно которому гомогенность достигается, когда по меньшей мере 85% в данном образце составляют кардиопоэтические клетки.

35. Способ по п. 23, согласно которому о присутствии среди полученных клеток мезенхимных стволовых клеток свидетельствует положительное иммунное окрашивание антителами, направленными против поверхностного маркера, выбранного из группы, состоящей из CD105, CD90, CD133, CD105, CD166, CD29 и CD44, и отсутствие детектируемого иммунного окрашивания антителом, направленным против поверхностного маркера, выбранного из группы, состоящей из CD14, CD34 и CD45.

36. Способ по п. 28, согласно которому указанную чистоту считают не достигнутой при повышенном уровне экспрессии генов CD34, FABP4, остеокальцина, нестина, Sox9 и MYH7 и их гомологов в два раза или более по сравнению с контролем.

37. Способ по п. 36, согласно которому указанное повышение экспрессии генов по сравнению с контролем определяют методом количественной ПЦР.

38. Способ по любому из пп. 30, 36 или 37, согласно которому указанный контроль состоит из некардиопоэтических клеток.

39. Способ по п. 38, согласно которому указанный контроль состоит из клеток, культивированных в отсутствие кардиогенных веществ.

40. Способ по п. 23, согласно которому условия культивирования включают использование биореактора и который включает иммобилизацию или инкапсуляцию указанных клеток на частицах или матрице и пропускание питательной среды через слой частиц или матрицу.

41. Способ лечения нарушений, вызванных заболеваниями сердца или предрасположенности к таким нарушениям, согласно которому фармацевтическую композицию согласно любому из пп. 1-22 вводят субъекту в эффективном количестве.

42. Способ по п. 41, согласно которому у указанного субъекта наблюдается недостаточность сердечно-сосудистой системы.

43. Способ по п. 42, согласно которому указанный субъект страдает от ишемической кардиомиопатии, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности ишемического характера или сердечной недостаточности неишемического характера, врожденной кардиомиопатии или их сочетания.

44. Способ по любому из пп. 41-43, согласно которому указанную фармацевтическую композицию вводят с использованием способа введения, выбранного из группы, состоящей из введения внутрь миокарда, внутрь сердца, внутрикоронарного введения, внутримышечного введения, подкожного введения, интраперитонеального введения, внутриматочного введения, парентерального или системного введения.

45. Способ по п. 44, согласно которому указанную фармацевтическую композицию вводят внутрь миокарда с использованием катетера, шприца или их сочетания.

46. Набор для введения фармацевтической композиции по любому из пп. 1-22, который включает контейнер, содержащий указанную фармацевтическую композицию.

47. Набор по п. 46, в котором указанный контейнер представляет собой биологически совместимый контейнер, который способствует выживанию клеток и транспортировке по всему миру, удобен для использования сотрудником лечебного учреждения или медицинским персоналом для введения реципиенту.

48. Набор по любому из пп. 46 или 47, в котором указанный контейнер герметично закрыт.

49. Набор по п. 46, в котором указанный контейнер совместим со вспомогательным веществом и условиями хранения.

50. Набор по п. 46, в котором указанный контейнер представляет собой закрытый стеклянный контейнер.

51. Набор по п. 46, в котором указанный контейнер имеет крышку с прокалываемой диафрагмой.

52. Набор по п. 51, в котором указанная крышка с прокалываемой диафрагмой позволяет удалять жидкость из контейнера через адаптер для флакона, который включает клапан типа Луэр.

53. Набор по п. 52, в котором указанную крышку с прокалываемой диафрагмой можно проколоть с помощью иглы.

54. Набор по п. 46, в котором указанная фармацевтическая композиция хранится в герметично закрытом контейнере, подходящем для криоконсервации.

55. Набор по п. 46, в котором срок хранения фармацевтической композиции в указанном контейнере составляет по меньшей мере 48 часов.

56. Набор по п. 46, в котором срок хранения фармацевтической композиции в указанном контейнере составляет по меньшей мере 72 часа.

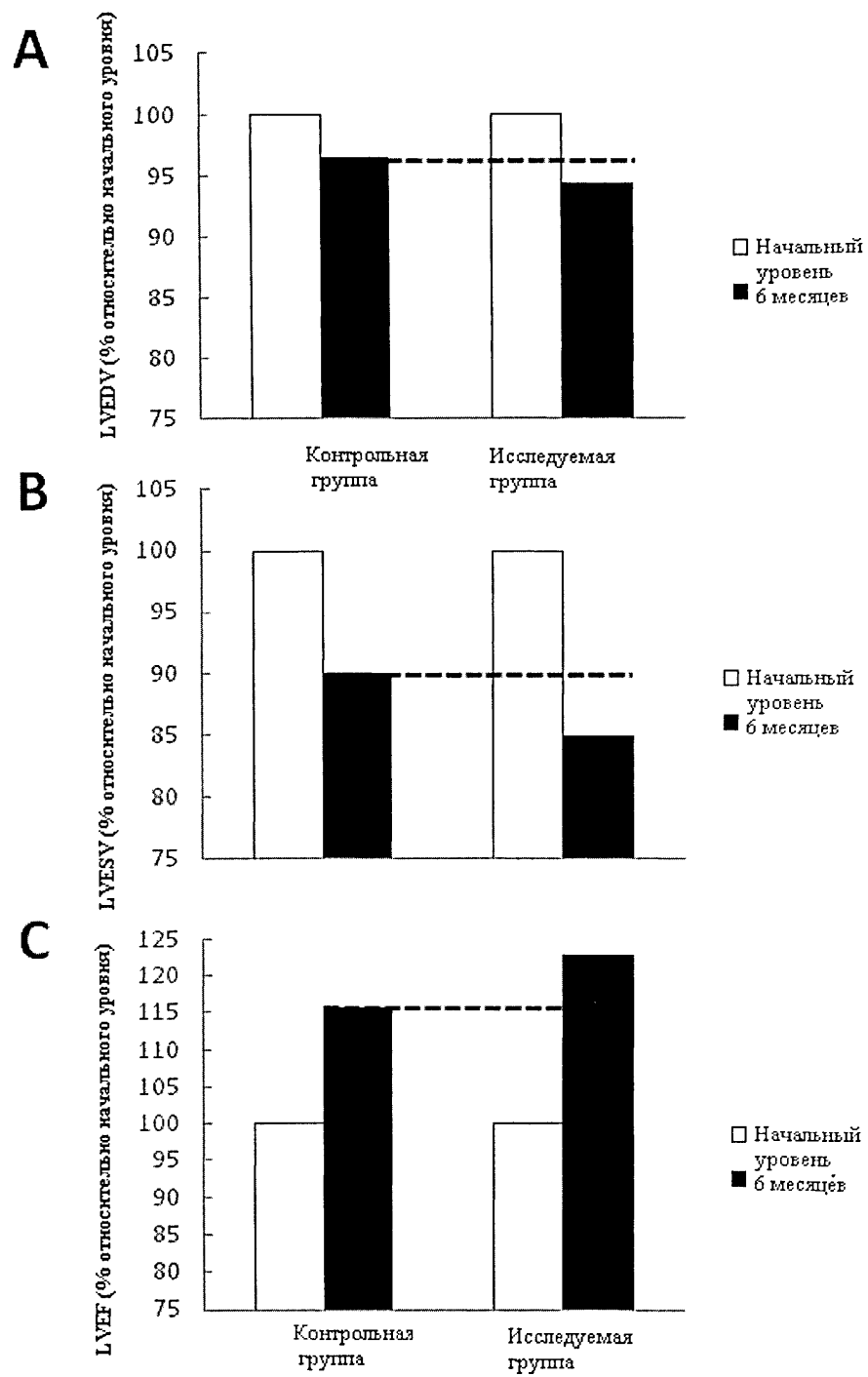
57. Набор по п. 46, который дополнительно включает по меньшей мере один катетер.

58. Набор по п. 46, который дополнительно включает по меньшей мере один шприц.

59. Применение клеток, коммитированных на формирование ткани сердца, для изготовления фармацевтической композиции по любому из пп. 1-22 для лечения ишемической кардиомиопатии, острого инфаркта миокарда, хронического инфаркта миокарда, сердечной недостаточности неишемического характера, сердечной недостаточности ишемического характера, врожденной кардиомиопатии или их сочетания, где указанные клетки демонстрируют:

i. наблюдаемое повышение уровня экспрессии MEF2C и, необязательно, по меньшей мере одного дополнительного гена, выбранного из группы, состоящей из Nkx2.5, Tbx5, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1, по сравнению с контролем, и/или

ii. наблюдаемое присутствие по меньшей мере одного типа полипептида, выбранного из группы, состоящей из Nkx2.5, Tbx5, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1, по сравнению с контролем, и ядерный перенос одного или более из Nkx2.5 и MEF2C к ядру клетки.



Фигура 1