



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124450** (13) **C2**  
(51) МПК (2021.01)**C12N 9/12** (2006.01)**C12N 15/54** (2006.01)**A61K 38/17** (2006.01)

A61P 9/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2017 06834**
- (22) Дата подання заявки: **01.12.2015**
- (24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **23.09.2021**
- (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/086,026**
- (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **01.12.2014**
- (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **27.11.2017, Бюл.№ 22**
- (46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **22.09.2021, Бюл.№ 38**
- (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2015/063118, 01.12.2015**
- (72) Винахідник(и):  
**Пен Марк С. (US),  
Кідровські Мет'ю (US),  
Майорга Маріца (US)**
- (73) Володілець (володілці):  
**САММА ХЕЛТ,  
525 East Market Street, Akron, OH 44304, United States of America (US),  
НОРТИСТ ОґАЙО МЕДІКАЛ ЮНІВЕРСИТІ,  
4209 St. Rt. 44, PO Box 95, Rootstown, OH 44272, United States of America (US)**
- (74) Представник:  
**Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
US 2009246179 A1, 01.10.2009  
Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> for drug development: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in ischemic neuronal death / Yano S., M. Morioka, Jun-ichi Kuratsu et al. // Journal of Pharmacological Sciences. – 2005. - Vol. 97. - P. 351 – 354  
Central Role for disabled-2 in mesenchymal stem cardiac protein expression and functional consequences after engraftment in acute myocardial infarction / M.E. Mayorga, F. Dong, S. Sundararaman et al. // Stem cells and development. – 2011. - Vol. 20 (4). - P. 681 – 693  
Mayorga M.E. miR-145 is differentially regulated by TGF- $\beta$ 1 and ischaemia and targets disabled-2 expression and wnt/ $\beta$ -catenin activity / M.E. Mayorga, M.S. Penn // Journal of cellular and molecular medicine. – 2012. - Vol. 16 (5). - P. 1106 – 1113  
Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement / M. Gneccchi, H.He, N.Noiseux et al. // The faseb journal, federation of american societies for experimental biology. – 2006. – Vol. 20. – P. 661 – 669  
EP 2687219 A1, 22.01.2014  
Reduction of Myocardial Infarct Size by Human Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium / L. Timmers, S.K.Limb, F. Arslan et al. // Stem Cell Research. – 2008. – Vol. 1. – P. 129 – 137  
Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin- dependent protein kinase cascade / H. Enslen, H. Tokumitsu, Ph.J.S. Stork et al. // Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america. – 1996. – Vol. 93 (20). – P. 10803-10808  
Matsushita M. Inhibition of the Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase I cascade by cAMP-dependent protein kinase / M. Matsushita, A.C. Nairn // The journal of biological chemistry. – 1999. – Vol. 274 (15). – P. 10086 – 10093  
Neuroprotection in Stroke in the Mouse with Intravenous Erythropoietin-Trojan horse / Fu A., Eric Ka-Wai Hui, Jeff Zhiqiang, Lu et al. // Fusion Protein. – 2011. – Vol. 1369. – P. 203 – 207  
Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance / A.R. Chugh, G.M. Beache, J.H. Loughran et al. // Circulation. – 2012. – Vol. 126 (1). – P. S54 - S64  
Mesenchymal stem cells with overexpression of midkine enhance cell survival and attenuate cardiac dysfunction in a rat model of myocardial infarction / Shu-Li Zhao, Yao-Jun Zhang, Ming-Hui Li et al. // Stem Cell Research & Therapy. – 2014. – Vol. 5 (2). – P. 37

(54) СПОСІБ ІНДУКЦІЇ ВІДНОВЛЕННЯ СЕРЦЯ АБО МІОКАРДА АБО ПОЛІПШЕННЯ ФУНКЦІЇ ВКАЗАНОГО СЕРЦЯ АБО МІОКАРДА ПАЦІЄНТА

(57) Реферат:

UA 124450 C2

Винахід стосується способу індукції відновлення серця або міокарда або поліпшення функції вказаного серця або міокарду пацієнта, який включає введення білка кінази 1 кальцій/кальмодулінзалежної протеїнкінази (СAМКК1) або вектора, що містить нуклеїнову кислоту, кодуючу СAМКК1, або клітин, які були модифіковані, щоб мати підвищені рівні СAМКК1, або кондиціонованого середовища з культури клітин, які модифіковані, щоб мати підвищений рівень СAМКК1, або їх комбінації у вказані серце або міокард.

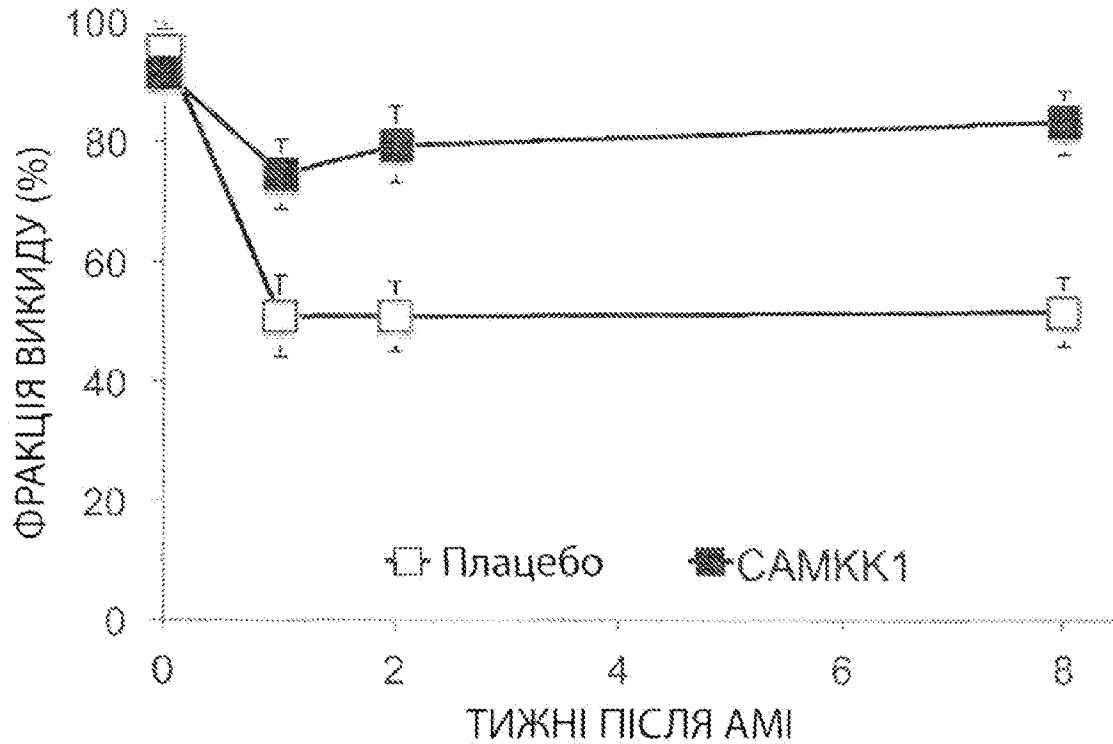


Fig. 7

Перехресні посилання на споріднені заявки

Дана заявка просить пріоритет попередньої заявки США № 62/086 026, поданої 1 грудня 2014 року, розкриття якої включено в даний опис посиланням у всій повноті.

Область техніки, до якої відноситься винахід

5 Розкриття відноситься до застосування кінази 1 кальцій/ кальмодулін-залежної протеїнкінази (СAМКК1) у якості нового регенеративного терапевтичного засобу.

Попередній рівень техніки

10 Ішемія - це стан, при якому кровоток повністю утруднений або значно зменшений у локалізованих частинах тіла, що призводить до аноксії, зменшення подачі субстратів і нагромадження метаболітів. Тривала ішемія приводить до атрофії, денатурації, апоптозу й некрозу уражених тканин.

15 Запалення є захисною відповіддю, яка призначена для усунення первісної причини травми, а також некротичних клітин/тканин, що виникають у результаті травми. Однак при деяких захворюваннях, таких як артрит, запалення виникає за відсутності травми. Тривале запалення може викликати руйнування тканин, фіброз і/або некроз.

Метою регенеративної медицини є стимулювання загоєння й запобігання утворенню фіброзу й рубця після травми шляхом заміни ушкоджених тканин і індукції ендогенних шляхів відновлення.

Сутність винаходу

20 У даному описі розкриті способи лікування ішемічного або запального стану в органі або тканині пацієнта, яке включає підвищення рівня САМКК1 у зазначеному органі або тканині.

Короткий опис креслень

25 Короткий опис, а також наступний докладний опис, далі розуміються при читанні в комбінації із прикладеними кресленнями. З метою ілюстрації розкритих способів на кресленнях показані зразкові втілення способів; однак способи не обмежуються розкритими конкретними втіленнями. На кресленнях:

30 Фіг. 1А, Фіг. 1В, Фіг. 1С і Фіг. 1D ілюструють зразкові векторні карти для застосування в розкритих способах. Фіг. А) повний вектор hCamKK1. Фіг. В) укорочений конститутивний вектор hCamKK1. Фіг. С) повний вектор мус hCamKK1. Фіг. D) усічений конститутивний вектор мус hCamKK1.

Фіг. 2 представляє серцеву функцію через 2 тижні після перев'язки LAD і ін'єкції кондиціонованих середовищ, сконцентрованих з 2 мільйонів MSC із зазначеною обробкою. Дані представляють окремих тварин. — Представляє середнє.

Фіг. 3 є зразковою ілюстрацією шляху САМКК1.

35 Фіг. 4 представляє зразковий аналіз експресії САМКК1 у клітинах зі зниженою експресією DAB2 (siRNADab2) у порівнянні з контрольними (контроль або CDNADAb2).

40 Фіг. 5 А - Фіг. 5С представляють: Фіг. 5А) серцева функція через 4 дні після перев'язки LAD і ін'єкції кондиціонованих середовищ і клітин із зазначеної обробки; дані представляють середнє  $\pm$  стандартне відхилення (n=4-8 тварин на групу); Фіг. 5В) відсоток  $\pm$  стандартне відхилення колагену, експресованого площею лівого шлуночка, і виміряного трихромним фарбуванням за Массоном через 4 дні після трансплантації MSC, попередньо оброблених і трансфікованих або скремблером (контрольна siRNA), або siRNA:CAMKK1; зображені репрезентативні мікрофотографії 4 мм зрізів із тварини кожної групи обробки над кожним стовпчиком даних; дані представлені як середнє  $\pm$  стандартне відхилення; \*\* p < 0,05 у порівнянні з контрольними MSC; Фіг. 5С) судинна щільність у приграничній зоні через 4 дні після АМІ; конфокальне зображення типового імуофлюоресцентного фарбування; фарбування ендотеліальних клітин ізоелектином (зелений), що відповідає об'єднаним зображенням: аглютинін зародків пшениці (червоний) і DAPI (синій) і число судинної щільності; дані представляють середнє  $\pm$  SEM (судини/мм<sup>2</sup>, n=3 на групу); \* p < 0,05 щодо групи з фізрозчином.

50 Фіг. 6 є зразковими результатами лікування пацієнтів після перев'язки LAD плазмідом, що кодує САМКК1. Поліпшена серцева функція спостерігалася через тиждень і 2 тижні після обробки в порівнянні з носієм (фізіологічний розчин або обробка глюкозою). Білі стовпці: фізіологічний розчин або глюкоза; Чорні стовпці: обробка ДНК-плазмідом САМКК1.

55 Фіг. 7 ілюструє ефекти надекспресії САМКК1 (ДНК) на фракцію викиду в моделі гризунів АМІ. 30 тварин були піддані інфаркту міокарда передньої стінки шляхом прямої перев'язки LAD. Після перев'язки LAD тварин рандомізували й ін'єктували 0,5 мг САМКК1-плазмиди або фізіологічного розчину в 5 розділених 50-100 мкл ін'єкціях. Через тиждень, два тижні й 8 тижнів після перев'язки LAD тваринам була зроблена ехокардіографія, а фракцію викиду розраховували на основі лівої парастернальної позиції по довгій осі лівого шлуночка серця. Усі дослідники, що виконували перев'язку LAD, ін'єкцію лікарського засобу й ехокардіографію,

працювали в сліпому режимі щодо групи обробки будь-якої тварини. (N=2 для плацебо, n=5 для CAMKK1). Плацебо бло фізіологічним розчином для ін'єкцій. Середнє  $\pm$  SD.

Фіг. 8A і Фіг. 8B ілюструють вплив надекспресії CAMKK1 (ДНК) в MSC на MSC і кондиціонованого MSC середовища на фракцію викиду в моделі гризунів AMI. Контроль був MSC, трансфіковані маркерною кДНК. Ехокардіографію проводили через 2 і 5 тижнів після AMI. Вісь Y-EF (%), середнє  $\pm$  SD.

Докладний опис ілюстративних втілень

Розкриті способи можуть бути зрозуміліші з посиланням на наступний докладний опис у комбінації із прикладеними фігурами, які є частиною цього розкриття. Слід розуміти, що розкриті способи не обмежуються конкретними способами, описаними й/або показаними в даному документі, і що використовується в даному документі термінологія призначена для опису конкретних втілень тільки як приклад і не призначена для обмеження заявлених способів.

Аналогічно, якщо спеціально не зазначене інше, кожний опис щодо можливого механізму або способу дії або причини поліпшення повинен бути тільки ілюстративним, і розкриті способи не повинні обмежуватися коректністю або некоректністю будь-якого такого пропонуваного механізму або способу дії або причини поліпшення.

Слід брати до уваги, що деякі особливості розкритих способів, які, для ясності, описані в даному документі в контексті окремих втілень, також можуть бути представлені в комбінації в одному втіленні. І навпаки, різні ознаки розкритих способів, які для стислості описано в контексті одного втілення, також можуть бути надані окремо або в будь-якій підкомбінації.

При використанні в даному документі англійською мовою форми однини "a", "an" і "the" включають множину.

В описі використовуються наступні скорочення: AMI (гострий інфаркт міокарда); CAMKK1 (кіназа 1 кальцій/кальмодулінзалежної протеїнкінази); Dab2 (2-й гомолог disabled); MSC (мезенхімальні стовбурні клітини).

Різні терміни, що відносяться до аспектів опису, використовуються в описі й формулі винаходу. Такі терміни повинні мати своє звичайне значення в даній області, якщо не зазначене інше. Інші конкретно визначені терміни повинні тлумачитися відповідно до визначень, представлених у даному документі.

Використовуваний у даному документі термін "нуклеїнова кислота" відноситься до полінуклеотиду, який містить, щонайменше, дві ковалентно зв'язані нуклеотидні субодиниці або субодиниці аналогів нуклеотидів. Нуклеїнова кислота може бути дезоксирибонуклеїновою кислотою (ДНК), рибонуклеїновою кислотою (РНК) або аналогом ДНК або РНК. Нуклеотидні аналоги комерційно доступні, а способи одержання полінуклеотидів, які містять такі нуклеотидні аналоги, відомі (Lin et al. (1994) Nucl. Acids Res. 22:5220-5234; Jellinek et al. (1995) Biochemistry 34: 363-372; Pagratis et al. (1997) Nature Biotechnol. 5:68-73). Нуклеїнова кислота може бути одностанцювою, двостанцювою або їх сумішшю. Для цілей даного опису, якщо не зазначене інше, нуклеїнова кислота є двостанцювою або це видно з контексту.

При використанні в даному документі, термін "лікування" і подібні терміни відносяться до зменшення тяжкості й/або частоти симптомів ішемічного або запального стану, усунення симптомів ішемічного або запального стану й/або основної причини зазначених симптомів, частоти або ймовірності симптомів ішемічного або запального стану й/або їх основної причини, а також поліпшення або усунення збитку, викликаного, прямо або побічно, ішемічним або запальним станом.

Використовуваний у даному документі термін "пацієнт" означає будь-яку тварину, зокрема, ссавця. Таким чином, способи застосовні до людей і інших тварин, хоча переважно використовуються з мишами, пацюками й людьми, а найбільше переважно з людьми.

Використовуваний у даному документі термін "збільшення рівня CAMKK1" означає кількість білка CAMKK1 в органі або тканині пацієнта, яка більша ніж зазвичай присутня в органі або тканині пацієнта.

Розкритими в даному документі є способи лікування ішемічного або запального стану в органі або тканині пацієнта, що включають підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині.

CAMKK1 (кіназа 1 кальцій/кальмодулін-залежної протеїнкінази, CAMKK1 людини, відома під номером UniProtKB Q8N5S9), відноситься до сигнального каскаду, викликаного кальцієм, і бере участь у ряді клітинних процесів. CAMKK1 є трансферазою, яка належить до сімейства Ser/Thr-протеїнкіназ і підродино CAMKK1, і експресується в серці, підшлунковій залозі, мигдалині, гіпоталамусі, простаті й легені. CAMKK1 активує CamK1 і CamK4 шляхом фосфорилування їх амінокислот Thr (77) і Thr (96), відповідно. Активність CAMKK1 сама по собі регулюється Ca<sup>2+</sup>/кальмодуліном; активність CAMKK1 знижується при фосфорилуванні PKA (сAMP-

залежною протеїнкіназою) і збільшується при інкубації з РКА у присутності  $\text{Ca}(2+)$ /кальмодуліна, але зменшується за відсутності. Це фосфорилування й інгібування CAMKK1 за допомогою РКА бере участь у модуляції балансу між cAMP- і  $\text{Ca}^{2+}$ -залежними шляхами сигнальної трансдукції. Послідовність нуклеїнової кислоти й амінокислотна послідовність CAMKK1 представлені в SEQ ID NO: 1 і 2, відповідно.

Фахівці в даній області знають, що ішемічні умови й запальні стани можуть виникати в ряді різних органів у тканинах. Наприклад, ішемічні стани можуть виникати в серці, печінці, нирках, мозку, хребті, легенях, тонкому кишечнику, товстому кишечнику й артеріях. Аналогічно, запальні стани можуть виникати в серці, печінці, нирках, головному мозку, хребті, легенях, кишечнику, артеріях, суглобах, хрящах і шкірі. Відповідно, розкриті способи лікування ішемічного або запального стану в органі або тканині пацієнта, причому зазначеним органом або тканиною є серце, печінка, нирка, мозок, хребет, легені, тонкий кишечник, товстий кишечник, артерії, суглоби, хрящ, шкіра або будь-які їхні комбінації. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану серця. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану міокарда. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану печінки. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану нирок. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану головного мозку. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану хребта. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану легенів. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану тонкого кишечнику. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану товстого кишечнику. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану артерій. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану суглобів. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану хряща. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану шкіри. У деяких втіленнях можуть бути використані способи для лікування ішемічного або запального стану будь-якого з вищевказаних органів або тканин.

Придатні способи збільшення рівня CAMKK1 в організмі або тканині включають, без обмеження зазначеним, введення білка CAMKK1, введення вектора, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1, введення клітин, які були модифіковані для одержання підвищеного рівня CAMKK1, введення кондиціонованих середовищ із культури клітин, які були модифіковані так, щоб збільшити рівень CAMKK1, або будь-які їхні комбінації.

Підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте, наприклад, шляхом введення білка CAMKK1 у зазначений орган або тканину. Придатні білки CAMKK1 включають CAMKK1 дикого типу або конститутивно активну CAMKK1. У деяких аспектах збільшення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом введення білка CAMKK1 дикого типу в зазначений орган або тканину. Наприклад, збільшення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом введення білка CAMKK1 дикого типу в зазначений орган або тканину, де білок CAMKK1 дикого типу представлений в SEQ ID NO: 2. В інших аспектах збільшення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом введення конститутивно активної CAMKK1. Конститутивно активна CAMKK1 може містити вкорочену CAMKK1 1-413. Збільшення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом введення вкороченої CAMKK1 1-413 у зазначений орган або тканину, де вкорочена CAMKK1 1-413 представлена в SEQ ID NO: 4. В іншому випадку, конститутивно активна CAMKK1 може містити мутант T108A, мутант S459A або мутант T108A/S459A CAMKK1. Підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом введення мутанта CAMKK1 T108A у зазначений орган або тканину, де мутант T108A CAMKK1 представлений в SEQ ID NO: 6. Підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом введення мутантного S459A CAMKK1 у зазначений орган або тканину, де мутант S459A CAMKK1 представлений в SEQ ID NO: 8. Підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом введення мутанта TAM8K/S459A CAMKK1 у зазначений орган або тканину, де мутант T108A/S459A CAMKK1 представлений в SEQ ID NO: 10. Фосфорилування CAMKK1 протеїнкіназою A інгібує активність CAMKK1. Тому створення конститутивно активної й нефосфорильованої CAMKK1 шляхом видалення одного або декількох із цих залишків (наприклад, за допомогою вкорочення) або мутації Thr108 і Ser459 на аланін, наприклад, можуть привести до сильнішої терапевтичної дії.

Збільшення рівня САМКК1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення вектора, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує САМКК1, у зазначений орган або тканину. Вектор може включати плазмідну або вірусний вектор. У деяких аспектах збільшення рівня САМКК1 в органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення плазмідної, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує САМКК1. В інших аспектах збільшення рівня САМКК1 в органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення вірусного вектора, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує САМКК1. Нуклеїнова кислота може кодувати САМКК1 дикого типу або конститутивно активну САМКК1. У деяких аспектах збільшення рівня САМКК1 в органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення плазмідної або вірусного вектора, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує САМКК1 дикого типу. Наприклад, підвищення рівня САМКК1 в органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення плазмідної або вірусного вектора, що містить САМКК1, представлену в SEQ ID NO: 1. В інших аспектах збільшення рівня САМКК1 в органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення плазмідної або вірусного вектора, що включає нуклеїнову кислоту, яка кодує конститутивно активну САМКК1. Конститутивно активна САМКК1 може містити вкорочену САМКК1 1-413. Наприклад, підвищення рівня САМКК1 в органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення плазмідної або вірусного вектора, що містить укорочену САМКК1 1-413, представлений в SEQ ID NO: 3. В іншому випадку, конститутивно активна САМКК1 може включати мутант T108A, мутант S459A або мутант T108A/S459A САМКК1. Наприклад, збільшення рівня САМКК1 в органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення плазмідної або вірусного вектора, що містить мутант T108A САМКК1, представлений в SEQ ID NO: 5. Збільшення рівня САМКК1 в органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення плазмідної або вірусного вектора, що містить мутант S459A САМКК1, представлений в SEQ ID NO: 7. Підвищення рівня САМКК1 в органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення плазмідної або вірусного вектора, що містить мутант T108A/S459A САМКК1, представлений в SEQ ID NO: 9.

Придатні вектори для застосування в розкритих способах можуть містити компоненти або функціональні групи, які додатково модулюють доставку гена й/або експресію гена або які в іншому випадку забезпечують корисні властивості цільовим клітинам. До таких інших компонентів відносяться, наприклад: компоненти, які впливають на зв'язування або націлювання на клітини (включаючи компоненти, які опосередковують клітинне або тканинспецифічне зв'язування); компоненти, які впливають на поглинання вектора клітиною; компоненти, які впливають на локалізацію нуклеїнової кислоти в клітині після поглинання (такі як агенти, які опосередковують ядерну локалізацію); і компоненти, які впливають на експресію нуклеїнової кислоти. Такі компоненти можуть бути обумовлені природною ознакою вектора (наприклад, при застосуванні певних вірусних векторів, які мають компоненти або функціональні можливості, які опосередковують зв'язування й поглинання), або вектори можуть бути модифіковані для забезпечення таких функціональних можливостей. Такі компоненти також включають маркери, такі як детектовані й/або селектовані маркери, які можуть використовуватися для детекції або селекції клітин, які поглинули й експресують нуклеїнову кислоту, що доставляється вектором. Обрані маркери включають, наприклад, ампіцилін і канаміцин. У деяких аспектах селектований маркер можна вилучити з вектора.

Придатні вірусні вектори включають, без обмеження зазначеним, ті, які отримані з аденовірусу (Ad), аденоасоційованого вірусу (AAV), вірусу простого герпесу (HSV), ретровірусу, лентівірусу й альфавірусу. Можна використовувати як вектори на основі вірусів людини, так і не людини. У втіленнях, у яких використовуються вірусні вектори людини, вірусний вектор може бути модифікований так, щоб бути дефектним за реплікацією в людей.

Вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує САМКК1, може перебувати під конститутивно активним промотором, тканинспецифічним промотором або промотором, індукованим лікарським засобом. Наприклад, тканинспецифічний промотор може бути злитий з нуклеїновою кислотою, що кодує САМКК1, обмежуючи її експресію певною тканиною.

Нуклеїнову кислоту, яка кодує САМКК1, можна вводити в клітини способами, відомими в даній області, включаючи, без обмеження зазначеним, трансфекцію й електропорацію. Вектор може бути модифікований для поліпшення ефективності трансфекції або електропорації.

Зразкові векторні карти проілюстровані на Фіг. 1А-Фіг. 1D.

Підвищення рівня САМКК1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення клітин, які були модифіковані для одержання підвищеного рівня САМКК1. Клітини можуть бути модифіковані для підвищення рівня САМКК1 шляхом, наприклад, модифікації клітин вектором, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує САМКК1, модифікації клітини агентом, який індукує експресію САМКК1 або їх комбінацією. Як обговорювалося вище, білок САМКК1 може бути диким типом або конститутивно активним САМКК1. Клітини можуть бути

модифіковані для експресії білка CAMKK1 дикого типу, представленого в SEQ ID NO: 2. Клітини можуть бути модифіковані для експресії білка CAMKK1 1-413, представленого в SEQ ID NO: 4. Клітини можуть бути модифіковані для експресії мутанта T108A CAMKK1, представленого в SEQ ID NO: 6. Клітини можуть бути модифіковані для експресії мутанта CAMKK1 S459A, представленого в SEQ ID NO: 8. Клітини можуть бути модифіковані для експресії мутанта T108A/S459A CAMKK1, представленого в SEQ ID NO: 10.

У деяких втіленнях підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення клітин, які були модифіковані вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1. Вектор може включати плазмідну або вірусний вектор. У деяких аспектах клітини можуть бути модифіковані плазмідною, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1. В інших аспектах клітини можуть бути модифіковані за допомогою вірусного вектора, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1. Як обговорювалося вище, плазмідна або вірусний вектор можуть містити нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1 дикого типу або конститутивно активну CAMKK1. Клітини можуть бути модифіковані плазмідною або вірусним вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує білок CAMKK1 дикого типу, де нуклеїнова кислота представлена в SEQ ID NO:1. Клітини можуть бути модифіковані плазмідною або вірусним вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує білок CAMKK1 1-413, де нуклеїнова кислота представлена в SEQ ID NO: 3. Клітини можуть бути модифіковані плазмідною або вірусним вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує мутант T108A білок CAMKK1, де нуклеїнова кислота представлена в SEQ ID NO: 5. Клітини можуть бути модифіковані плазмідною або вірусним вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує мутант S459A білок CAMKK1, де нуклеїнова кислота представлена в SEQ ID NO: 7. Клітини можуть бути модифіковані плазмідною або вірусним вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує мутант T108A/S459A білок CAMKK1, де нуклеїнова кислота представлена в SEQ ID NO: 9.

В інших втіленнях підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення клітин, які були модифіковані агентом, який індукуює експресію CAMKK1. Придатні агенти для індукування експресії CAMKK1 включають, без обмеження зазначеним, TGF- $\beta$ , miR45, інгібітор Dab2 або будь-яку їхню комбінацію. У деяких аспектах клітини можуть бути модифіковані TGF- $\beta$  і введені в зазначені орган або тканину. В інших аспектах клітини можуть бути модифіковані miR45 і введені в зазначені орган або тканину. Наприклад, клітини можуть бути модифіковані miR45, представленою в SEQ ID NO: 17 і введені в зазначені орган або тканину. В інших аспектах клітини можуть бути модифіковані інгібітором Dab2, таким як, наприклад, siRNA Dab2, і вводиться в зазначений орган або тканину. Придатна siRNA Dab2 включає siRNA Dab2, що містить значеннєвий і антизначеннєвий ланцюги, представлені як SEQ ID NO: 11 і 12, SEQ ID NO: 13 і 14 або SEQ ID NO: 15 і 16. Наприклад, клітини можуть бути модифіковані за допомогою siRNA Dab2, представленої в SEQ ID NO: 11 і 12, і вводиться в зазначений орган або тканину. Клітини можуть бути модифіковані за допомогою siRNA Dab2, представленої в SEQ ID NO: 13 і 14, і вводиться в зазначений орган або тканину. Наприклад, клітини можуть бути модифіковані за допомогою siRNA Dab2, представленої в SEQ ID NO: 15 і 16, і вводиться в зазначений орган або тканину.

Підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення кондиціонованих середовищ із культури клітин, які були модифіковані так, щоб підвищити рівень CAMKK1. Культуру клітин можна модифікувати, щоб підвищити рівень CAMKK1, наприклад, шляхом модифікації клітин вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1, модифікації клітин агентом, який індукуює експресію CAMKK1, або їх комбінацією. У деяких втіленнях підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення кондиціонованих середовищ із культури клітин, які були модифіковані вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1. Вектор може містити плазмідну або вірусний вектор. У деяких аспектах культуру клітин можна модифікувати плазмідною, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1. В інших аспектах культуру клітин можна модифікувати за допомогою вірусного вектора, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1. Способи можуть включати введення кондиціонованих середовищ із культури клітин, які були модифіковані плазмідною або вірусним вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1 дикого типу, представлену в SEQ ID NO:1. Способи можуть включати введення кондиціонованих середовищ із культури клітин, які були модифіковані плазмідною або вірусним вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1 1-413, представлений в SEQ ID NO: 3. Способи можуть включати

введення кондиціонованих середовищ із культури клітин, які були модифіковані плазмідною або вірусним вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує мутант T108A CAMKK1, представлений в SEQ ID NO: 5. Способи можуть включати введення кондиціонованих

середовищ із культури клітин, які були модифіковані плазмідною або вірусним вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1 S459A, представлений в SEQ ID NO: 7. Способи можуть включати введення кондиціонованих середовищ із культури клітин, які були модифіковані плазмідною або вірусним вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1 T108A/S459A, представлений в SEQ ID NO: 9.

В інших втіленнях підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині може бути досягнуте шляхом уведення кондиціонованих середовищ із культури клітин, які були модифіковані агентом, який індукує експресію CAMKK1. Придатні агенти для індукування експресії CAMKK1 включають, без обмеження зазначеним, TGF- $\beta$ , miR45, інгібітор Dab2 або будь-яку їхню комбінацію. Як показано на Фіг. 3, TGF- $\beta$  приводить до позитивної регуляції miR-45, позитивна регуляція miR-45 приводить до негативної регуляції DAB2, а негативна регуляція DAB2 приводить до позитивної регуляції CAMKK1. У деяких аспектах культура клітин може бути модифікована TGF- $\beta$ . Наприклад, культуру клітин можна інкубувати із TGF- $\beta$  протягом придатної кількості часу, кондиціоноване середовище або його частину можна збирати й кондиціоноване середовище можна вводити в зазначені орган або тканину. В інших аспектах культура клітин може бути модифікована miR45. Наприклад, культуру клітин можна трансфікувати miR45, кондиціоноване середовище або його частину можна збирати й кондиціоноване середовище можна вводити в зазначені орган або тканину. Культуру клітин можна трансфікувати miR45, представлений в SEQ ID NO: 7, кондиціоноване середовище або його частину можна збирати, і кондиціоноване середовище можна вводити в зазначені орган або тканину. В інших аспектах культура клітин може бути модифікована інгібітором Dab2, таким як, наприклад, siRNA Dab2. Культуру клітин можна трансфікувати за допомогою siRNA Dab2, кондиціоноване середовище або його частину можна збирати й кондиціоноване середовище можна вводити в зазначені орган або тканину. Культуру клітин можна трансфікувати за допомогою siRNA Dab2, представленої в SEQ ID NO: і 2, кондиціоноване середовище або його частину можна збирати й кондиціоноване середовище можна вводити в зазначені орган або тканину. Культуру клітин можна трансфікувати за допомогою siRNA Dab2, представленої в SEQ ID NO: 3 і 4, кондиціоноване середовище або його частину можна збирати й кондиціоноване середовище можна вводити в зазначені орган або тканину. Культуру клітин можна трансфікувати за допомогою siRNA Dab2, представленої в SEQ ID NO: 5 і 6, кондиціоноване середовище або його частину можна збирати й кондиціоноване середовище можна вводити в зазначені орган або тканину.

Клітини, які були модифіковані для одержання підвищеного рівня CAMKK1 або культури клітин, з яких було отримане кондиціоноване середовище, можуть бути мезенхімальними стовбурними клітинами.

Білок, вектор, клітини або кондиціоновані середовища можуть уводитися системно, безпосередньо в ішемічну або запалену тканину або на периферію ішемічної або запаленої тканини. Придатні способи системного введення включають ентеральне введення або парентеральне введення (ін'єкція, інфузія або імплантація). Білок, вектор, клітини або кондиціоновані середовища можуть бути введені, наприклад, перорально, епідурально, інтрацеребрально, інтрацеребровентрикулярно, внутрішньоартеріально, внутрішньосуглобно, внутрішньосерцево, внутрішньом'язово, внутрішньоосередково, внутрішньобрюшинно, інтратекально, внутрішньовенно, підшкірно або в будь-якій їхній комбінації.

Ішемічним або запальним захворюванням може бути гострий інфаркт міокарда, серцева недостатність, хвороба периферичних артерій, інсульт, захворювання печінки, ішемічна хвороба нирок, розсіяний склероз, травматичне ушкодження головного мозку, травма спинного мозку, хвороба "трансплантат проти хазяїна" (GVHD), діабет, хронічна обструктивна хвороба легенів (COPD), ревматоїдний артрит, травма від трансплантації твердих органів, ортопедична травма, порушення хряща, рана або будь-яка їхня комбінація. Таким чином, розкриті способи можуть бути використані для лікування ішемічного або запального стану в будь-якому з перерахованих вище органів або тканин пацієнта шляхом індукції підвищення рівня CAMKK1 у зазначених органі або тканині.

Розкриті способи можуть додатково включати введення однієї або декількох додаткових регенеративних терапій. Придатні додаткові регенеративні терапії включають, без обмеження зазначеним, мезенхімальні стовбурні клітини, отримані з кісткового мозку, жирової тканини, тканини плаценти, пуповини, вартонова холодцю, менструальної крові, стовбурних клітин, макрофагів M2, моноцитів або будь-якої їхньої комбінації. Стовбурними клітинами можуть бути клітини нейронних попередників, ендотеліальні клітини-попередники, ендогенні стовбурні клітини, специфічні для органа, або будь-яка їхня комбінація. У деяких аспектах способи можуть додатково включати введення нейронних клітин-попередників. У деяких аспектах способи

можуть додатково включати введення ендотеліальних клітин-попередників. У деяких аспектах способи можуть додатково включати введення ендогенних стовбурних клітин, таких як серцеві скіт + клітини. У деяких аспектах способи можуть додатково включати введення будь-якої комбінації вищевказаних стовбурних клітин.

#### 5 Приклади

Наступні приклади наведені для подальшого опису деяких із втілень, розкритих у даному документі. Приклади призначені для ілюстрації, а не для обмеження розкритих втілень.

10 Попередня обробка MSC фактором росту, трансформуючим фактором росту бета (TGF- $\beta$ ) підвищувала імунну пригнічуючу й проангіогенну активність клітин і приводила до підвищеної регенеративної здатності (Фіг. 2). У моделі гризунів AMI кондиціоновані середовища, зібрані з MSC, оброблених TGF- $\beta$ , були доставлені в серце. Була відзначена поліпшена серцева функція в порівнянні з доставкою кондиціонованих середовищ із неопрацьованих MSC.

15 Після зв'язування рецептора обробка TGF- $\beta$  клітин MSC приводила до зменшення експресії 2 гомолога disabled (Dab2), білка адаптера рецептора TGF- $\beta$ , яка опосередковується збільшенням мікроРНК MiR45 (Фіг. 3). Зменшення експресії Dab2 в MSC за допомогою siRNA також приводило до поліпшеного сприятливого впливу на серцеву функцію кондиціонованими середовищами, зібраними із трансфікованих клітин (Фіг. 2), у порівнянні з кондиціонованими середовищами з неопрацьованих MSC, коли їх доставляли в серце в моделі гризунів AMI. Порівнювали рівні специфічних хемокінів і факторів росту в контролі й MSC, трансфікованих Dab2: siRNA, і не спостерігали відмінностей в FGF-2, PDGF-b, IGF-, SDF- або SFRP-2 (дані не показані).

20 Щоб ідентифікувати молекулярні механізми, які приводять до посиленого секретому MSC, був виконаний скринінг генного ерею Illumina для ідентифікації змін генів у відповідь на три різні механізми негативної регуляції Dab-2: обробка TGF- $\beta$ , трансфекція miR45 і трансфекція siRNA проти Dab2 у порівнянні з неопрацьованими клітинами. У цьому експерименті зразки кРНК із оброблених клітин (TGF- $\beta$ , miR45 або siRNA Dab2) або неопрацьованих клітин гібридизували із чипом Illumina Rat-Ref2 expression Beadchip.

30 Коротко, мічені зразки кРНК гібридизували із чипом Illumina RatRef-2 expression Beadchip, який сканували з використанням Illumina Beadstation GX (Illumina, Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Кожний Beadchip містить 22 523 зонда, які були обрані з бази даних Reference Sequence (RefSeq) Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI). Зображення мікрочипа аналізували, дані інтенсивності нормалізували з використанням програмного забезпечення Illumina Beadstudio (Illumina, Сан-Дієго, Каліфорнія, США).

35 Для вибору диференційно експресованих генів був проведений двовибірковий критерій Уелча. Результати були об'єднані із кратною зміною й р-значеннями детекції для ідентифікації диференційно експресованих генів. Зокрема, критерії селекції включають суму р-значень детекції для трьох повторів, які менше або рівні 0,1, середні р-значення менше або рівні 0,05, і кратна зміна між контрольними й обробленими зразками більше, ніж або дорівнює 0,5. Крім того, операції над множинами були здійснені для ідентифікації звичайно deregulovaniх молекул.

40 Після ідентифікації диференційно експресованих генів, набір даних, який містить ці гени, та відповідні значення експресії були завантажені в програмне забезпечення для аналізу шляхів (Ingenuity Systems Pathway Analysis, IPA) (Ingenuity Systems, Редвуд-Сіті, Каліфорнія). TGF $\beta$ , miR-45 і Dab2, а також ці диференційно експресовані гени були відзначені як молекули фокуса в IPA. Молекули фокуса служили запалами, а їх зв'язки з іншими молекулами в базі даних "Ingenuity Knowledge Base" були ідентифіковані й представлені в наборі мереж (орієнтованих графів), у яких біологічний зв'язок між двома молекулами (вузлами) представлений у вигляді спрямованого краю. Крім того, функціональний і канонічний аналіз шляхів проводився з використанням IPA. Були проаналізовані молекули фокуса і їх споріднені гени, і були ідентифіковані надпредставлені функціональні групи й канонічні шляхи. Значимість асоціації між цими генами й функціональною групою або канонічним шляхом вимірюлася з використанням р-значення, отриманого з використанням точного критерію Фішера, що визначає ймовірність того, що зв'язок між молекулами фокуса й групою/шляхом пояснюється тільки випадковістю. У цьому дослідженні використовувався поріг відсічення 0,05.

55 Двадцять три (23) загальних значимих (р < 0,05) диференційно експресованих гена (із кратним значенням 0,5) були ідентифіковані в оброблених клітин у порівнянні з неопрацьованими клітинами (таблиця 1). Аналіз шляху ідентифікував один ген, кіназу 1 кальцій/калмодулін-залежної протеїнкінази (CAMKK1), нижче сигнальним шляхом miR45, TGF- $\beta$  і негативної регуляції Dab-2, що показане в даному документі для модуляції секретому й функції

MSC. Незалежний експеримент підтвердив, що негативна регуляція Dab2 приводить до посилення експресії CAMKK1 і пов'язана з підвищенням активності в білку CAMKK1 (Фіг.4).

Таблиця 1

Аналіз диференційно виражених генів при обробці за допомогою siRNA: Dab2, miRNA45 або TGFβ

| Назва гена Entrez<br>(символ)                                                             | Порівн.<br>кратна<br>зміна | Середнє р-<br>значення | Розташування |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|--------------|
| Анексин А3 (ANXA3)                                                                        | -22,07                     | 0,03                   | цитоплазма   |
| інгібітор дисоціації Rho GDP (GDI) бета (ARHGDIB)                                         | -19,47                     | 0,01                   | цитоплазма   |
| BCL 2-зв'язаний білок А1 (BCL2A1)                                                         | -4,31                      | 0,00                   | цитоплазма   |
| АТФаза, транспортування Н <sup>+</sup> , лізосомальна 42 кДа, V1 субодиниця С1 (ATP6V1C1) | -3,83                      | 0,02                   | цитоплазма   |
| АТФ-єднальна касета, підгрупа В (MDR/TAP), 9 представник (ABCB9)                          | -2,95                      | 0,02                   | цитоплазма   |
| Карбоксиангідраза ІІІ, специфічна для м'язів (CA3)                                        | -2,54                      | 0,01                   | цитоплазма   |
| Кіназа 1 кальцій/кальмодулінзалежна протеїнкінази, альфа (CAMKK1)                         | 1,72                       | 0,01                   | цитоплазма   |
| Аполіпопротеїн Е (APOE)                                                                   | -23,52                     | 0,01                   | позаклітинна |
| Компонент комплементу 1, q підкомпонент, ланцюг С (C1QC)                                  | -14,50                     | 0,03                   | позаклітинна |
| Компонент комплементу 1, q підкомпонент, ланцюг А (C1QA)                                  | -5,65                      | 0,01                   | позаклітинна |
| АДАМ-металопептидаза з мотивом тромбоспондину типу 1, 1 (ADAMTS1)                         | 2,51                       | 0,01                   | позаклітинна |
| запального фактора алотрансплантата 1 (AIF-1)                                             | -15,20                     | 0,02                   | ядро         |
| Карбоксиангідраза ІХ (CA9)                                                                | -10,81                     | 0,02                   | ядро         |
| CD68 (CD68)                                                                               | -20,28                     | 0,01                   | мембрана     |
| Молекула CD83 (CD83)                                                                      | -6,66                      | 0,02                   | мембрана     |
| Арахідонат-5-ліпоксигеназа-активуючий білок (ALOX5AP)                                     | -3,36                      | 0,02                   | мембрана     |
| Аргінін-вазопресинний рецептор 1А (AVPR1A)                                                | -2,98                      | 0,02                   | мембрана     |
| Білок-попередник амілоїда бета (A4) (App)                                                 | -2,39                      | 0,02                   | мембрана     |
| Білок, який містить домен, багатий аланіном і аргініном (AARD)                            | -27,08                     | 0,02                   | невідомо     |
| ADP-рибозилуючий фактор-подібний 11 (ARL11)                                               | -6,77                      | 0,01                   | невідомо     |
| представник Е сімейства подібних Cd-300-молекулі, псевдоген 1 (Cd300le-ps1)               | -4,08                      | 0,01                   | невідомо     |
| Повтор armadillo, Х-зв'язаний 2 (ARMCX2)                                                  | -2,78                      | 0,01                   | невідомо     |
| Аргінін-вазопресин-індукований 1 (AVPI1)                                                  | -1,78                      | 0,01                   | невідомо     |

5 ПЦР у реальному часі проводили для підтвердження того, що негативна регуляція Dab2 приводить до позитивної регуляції CAMKK1 в MSC у культурі (дані не показані). Вестерн-блот-аналіз підтвердив, що ця регуляція була пов'язана зі збільшенням експресії білка CAMKK1 (дані не показані).

10 Раніше не було продемонстровано, що CAMKK1 бере участь в індукції або посиленні ендогенних регенеративних шляхів. Щоб продемонструвати роль CAMKK1 у модуляції секретому MCS, експресія CAMKK1 була негативно регульована в MSC за допомогою трансфекції siRNA CAMKK1. Дані на Фіг. 5А показують, що ін'єкція 2 млн. MSC або концентрованого кондиціонованого середовища з 2 мільйонів MSC у прикордонну зону інфаркту під час перев'язки LAD приводить до інгібування MSC-опосередкованого збереження функції

лівого шлуночка, зокрема, збільшення на 30 і 20 % серцевої функції, відповідно, через 4 дні після АМІ. Однак за відсутності CAMKK1 не спостерігається значного збільшення серцевої функції у відповідь на ін'єкцію MSC або кондиціонованого MSC середовища (Фіг.5А). Щоб зрозуміти, як відсутність CAMKK1 змінило реакцію міокарда на ін'єкцію MSC, була проведена кількісна оцінка площі відкладання колагену й щільності судин у відповідь на ін'єкції MSC і кондиціонованого MSC середовища. Збільшення відкладання колагену (Фіг.5В) і притуплення в збільшенні щільності судин (Фіг.5С) спостерігалось у відповідь на MSC, трансфікованих CAMKK:siRNA у порівнянні з контрольними MSC. Ці дані демонструють, що модуляція CAMKK1 дійсно змінює секрецію MSC і наступне відновлення міокарда через потенційно численні механізми. Важливо відзначити, що негативна регуляція CAMKK1 у попередньо оброблених TGF- $\beta$  MSC також приводила до того, що кондиціювання цими клітинами стало неактивним (дані не показані).

Для визначення паракринних факторів, які модулюються експресією CAMKK1 в MSC, аналізували кондиціоноване середовище з MSC, трансфікованих скремблером або CAMKK:siRNA. Препарат кондиціювали протягом 24 годин, починаючи з 24 годин після трансфекції. Середовище концентрували як для внутрішньосерцевої ін'єкції. Концентроване кондиціоноване середовище аналізували з використанням ерея цитокінів на нейлоновій основі. Відповідно до гіпотези про те, що позитивна регуляція CAMKK1 є просцілюючою, негативна регуляція CAMKK1 приводить до підвищення регуляції 5 цитокінів, 4 з яких пов'язані з рекрутуванням запальних клітин.

Щоб перевірити, чи може активація CAMKK1-шляху приводити до посиленої регенераційної здатності інших типів клітин, була розроблена й використана плазмідна, яка кодує CAMKK1 нижче промотору CMV, щоб продемонструвати, що підвищення активності CAMKK1 може привести до поліпшення серцевої функції. Після індукції АМІ у гризунів шляхом перев'язки LAD, CAMKK1-кодуючу плазмиду (KCP-CAMKK1) або носій ін'єктували безпосередньо в серце в область перинфаркта. Серцеву функцію вимірювали через тиждень і через 2 тижні й отримані результати говорили про поліпшення серцевої функції, вимірюваної ехокардіографією у тварин, оброблених KCP-CAMKK1, у порівнянні із тваринами, обробленими носієм (фізіологічним розчином або глюкозою) (Фіг.6). У сукупності дані показують, що активація сигнального шляху CAMKK1 за допомогою надекспресії CAMKK1 приводить до посиленої регенерації в серці.

Для визначення того, чи було підвищувальне регулювання CAMKK1 достатнім для індукування відновлення тканини, були проведені дослідження з контрольними й надекспресуючими CAMKK1 MSC і кондиціонованим середовищем з контрольних і надекспресуючих CAMKK1 MSC. Дані на Фіг. 8А і Фіг. 8В демонструють, що надекспресія CAMKK1 в MSC поліпшує функцію MSC і кондиціонованого MSC середовища при АМІ.

Чи могла надекспресія CAMKK1 за відсутності MSC привести до MSC-подібних ефектів на лівий шлуночок в умовах АМІ, оцінили шляхом створення вектора експресії кДНК, у якому використовується промотор CMV для надекспресії CAMKK1. 5 × 100 мкг ін'єкції плазмідної кДНК були проведені навколо прикордонної зони інфаркту під час перев'язки LAD. Була проведена кількісна оцінка функції LV як функції від часу після АМІ. Як показано на Фіг. 7 надекспресія CAMKK1 за відсутності MSC привела до значного збереження або відновлення функції LV.

Гістологічні аналізи (дані не показані) тканини наприкінці експериментів, показаних на Фіг. 5В і С, продемонстрували, що CAMKK1 послідовно приводить до:

- зменшення розміру інфаркту й фіброзу міокарда, вимірюваного трихромним фарбуванням за Массоном;
- збільшення щільності судин у прикордонній зоні інфаркту.

Вплив CAMKK1 на SDF- або SDF- на експресію CAMKK1 відсутній (дані не показані). Схоже, що підхід CAMKK1 може бути повністю синергетичним і не надлишковим для SDF-.

Сутність винаходу

Як розкрито в даному документі, CAMKK1 була ідентифікована як ключовий регулятор функції MSC. Той факт, що вісь SDF-: CXCR4 і CAMKK1 не мають молекулярного перекриття стосовно індукованої експресії, передбачає, що комбінація CAMKK1 і SDF- повинна мати синергічні ефекти, найбільш очевидні при гострій травмі й, імовірно, при хронічній травмі тканин.

Розкриті способи індукують посилення регенеруючої секреції (секретованих молекул) з безлічі типів клітин, включаючи MSC. Не бажаючи бути зв'язаним теорією, вважаємо, що підвищені рівні CAMKK1 приводять до підвищення функціональних переваг за рахунок зміни секретованих факторів із клітин, які експресують CAMKK1. Цю секреторну індукцію можна використовувати в якості нового регенеративного терапевтичного засобу.

Фахівцям у даній області техніки буде зрозуміло, що в кращі втілення можуть бути внесені численні зміни й модифікації й що такі зміни й модифікації можуть бути зроблені без відхилення від сутності винаходу. Тому передбачається, що додана формула винаходу охоплює всі такі еквівалентні варіанти, які відповідають дійсному духу й обсягу винаходу.

5 Розкриття кожного патенту, патентної заявки й публікації, які цитуються або описані в цьому документі, цим включені в даний опис за допомогою посилання в повному обсязі.

Таблиця 2

Послідовності

|                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Нуклеїнова<br/>кислота САМКК1<br/>(NM_032294)</p> | <p>ATGGAGGGGGGTCCAGCTGTCTGCTGCCAGGATCCTCGGGCAGAGCTG<br/>GTAGAACGGGTGGCAGCCATCGATGTGACTCACTTGGAGGAGGCAGAT<br/>GGTGGCCCAGAGCCTACTAGAAACGGTGTGGACCCCCACCACGGGCC<br/>AGAGCTGCCTCTGTGATCCCTGGCAGTACTTCAAGACTGCTCCCAGCCC<br/>GGCCTAGCCTCTCAGCCAGGAAGCTTTCCCTACAGGAGCGGCCAGCAG<br/>GAAGCTATCTGGAGGCGCAGGCTGGGCCCTTATGCCACGGGGCCTGCCA<br/>GCCACATCTCCCCCGGGCCTGGCGGAGGCCACCATCGAGTCCCACC<br/>ACGTGGCCATCTCAGATGCAGAGGACTGCGTGCAGCTGAACCAGTACAA<br/>GCTGCAGAGTGAGATTGGCAAGGGTGCCTACGGTGTGGTGAGGCTGGC<br/>CTACAACGAAAGTGAAGACAGACACTATGCAATGAAAGTCCTTTCCAAAA<br/>AGAAGTTACTGAAGCAGTATGGCTTTCCACGTCGCCCTCCCCGAGAGG<br/>GTCCCAGGCTGCCCAGGGAGGACCAGCCAAGCAGCTGCTGCCCTGGA<br/>GCGGGTGTACCAGGAGATTGCCATCCTGAAGAAGCTGGACCACGTGAAT<br/>GTGGTCAAACCTGATCGAGGTCCTGGATGACCCAGCTGAGGACAACCTCT<br/>ATTTGGTGTTTGACCTCCTGAGAAAGGGGCCCCGTATGGAAGTGCCCTG<br/>TGACAAGCCCTTCTCGGAGGAGCAAGCTCGCCTCTACCTGCGGGACGTC<br/>ATCCTGGGCCTCGAGTACTTGCAGTGCAGAAAGATCGTCCACAGGGACA<br/>TCAAGCCATCCAACCTGCTCCTGGGGGATGATGGGCACGTGAAGATCGC<br/>CGACTTTGGCGTCAGCAACCAGTTTGAGGGGAACGACGCTCAGCTGTCC<br/>AGCACGGCGGGAACCCAGCATTTCATGGCCCCGAGGCCATTTCTGATT<br/>CCGGCCAGAGCTTCAGTGGGAAGGCCTTGGATGTATGGGCCACTGGCG<br/>TCACGTTGTACTGCTTTGTCTATGGGAAGTGCCCATTCATCGACGATTT<br/>ATCCTGGCCCTCCACAGGAAGATCAAGAATGAGCCCGTGGTGTTTCCTG<br/>AGGAGCCAGAAATCAGCGAGGAGCTCAAGGACCTGATCCTGAAGATGTT<br/>AGACAAGAATCCCGAGACGAGAATTGGGGTGCCAGACATCAAGTTGCAC<br/>CCTTGGGTGACCAAGAACGGGGAGGAGCCCCCTTCTTCGAGGAGGAG<br/>CACTGCAGCGTGGTGGAGGTGACAGAGGAGGAGGTTAAGAACTCAGTC<br/>AGGCTCATCCCCAGCTGGACCACGGTGATCCTGGTGAAGTCCATGCTGA<br/>GGAAGCGTTCTTTGGGAACCCGTTTGAAGCCCCAAGCACGGAGGGAAG<br/>AGCGATCCATGTCTGCTCCAGGAAACCTACTGGTGAAGAAGGGTTTGG<br/>TGAAGGGGGCAAGAGCCCAGAGCTCCCCGGCGTCCAGGAAGACGAGGC<br/>TGCATCCTGA<br/>(SEQ ID NO:1)</p> |
| <p>Білок САМКК1</p>                                  | <p>MEGGPAVCCQDPRAELVERVAIDVTHLEEADGGPEPTRNGVDPPPRARA<br/>ASVIPGSTSRLLPARPSLSARKLSLQERPAGSYLEAQAGPYATGPASHISPR<br/>AWRRPTIESHHVAISDAEDCVQLNQYKLQSEIGKGAYGVVRLAYNESEDRH<br/>YAMKVLKSKKLLKQYGFPRPPPRGSQAAQGGPAKQLPLERVYQEAILKK<br/>LDHVNVLKIEVLDDPAEDNLYLVFDLLRKGPVMEVPCDKPFSEEQARLYLR<br/>DVILGLEYLHCQKIVHRDIKPSNLLLGGDDGHVKIADFVSNQFEGNDAQLSST<br/>AGTPAFMAPEAISDSGQSFSGKALDWATGVTLYCFVYGKCPFIDDFILALH<br/>RKIKNEPVVFPEEPEISEELKDILKMLDKNPETRIGVPDIKLHPWVTKNGEEP<br/>LPSEEEHCSEVVEVTEEEVKNSVRLIPSWTTVILVKSMLRKRSFGNPFEPQAR<br/>REERSMSAPGNLLVKEGFGEGGKSPELPGVQEDEAAS<br/>(SEQ ID NO:2)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

|                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Нуклеїнова<br/>кислота САМКК1<br/>1-413</p> | <p>ATGGAGGGGGGTCCAGCTGTCTGCTGCCAGGATCCTCGGGCAGAGCTG<br/>GTAGAACGGGTGGCAGCCATCGATGTGACTCACTTGGAGGAGGCAGAT<br/>GGTGGCCCAGAGCCTACTAGAAACGGTGTGGACCCCCACCACGGGCC<br/>AGAGCTGCCTCTGTGATCCCTGGCAGTACTTCAAGACTGCTCCCAGCCC<br/>GGCCTAGCCTCTCAGCCAGGAAGCTTTCCCTACAGGAGCGGCCAGCAG<br/>GAAGCTATCTGGAGGCGCAGGCTGGGCCTTATGCCACGGGGCCTGCCA<br/>GCCACATCTCCCCCGGGCCTGGCGGAGGCCACCATCGAGTCCCACC<br/>ACGTGGCCATCTCAGATGCAGAGGACTGCGTGCAGCTGAACCAGTACAA<br/>GCTGCAGAGTGAGATTGGCAAGGGTGCCTACGGTGTGGTGAGGCTGGC<br/>CTACAACGAAAGTGAAGACAGACACTATGCAATGAAAGTCCTTTCCAAAA<br/>AGAAGTTACTGAAGCAGTATGGCTTTCCACGTGCCCCGAGAGG<br/>GTCCCAGGCTGCCCAGGGAGGACCAGCCAAGCAGCTGCTGCCCCCTGGA<br/>GCGGGTGTACCAGGAGATTGCCATCCTGAAGAAGCTGGACCACGTGAAT<br/>GTGGTCAAACCTGATCGAGGTCCTGGATGACCCAGCTGAGGACAACCTCT<br/>ATTTGGTGTGTTGACCTCCTGAGAAAGGGGGCCCGTCATGGAAGTGCCCTG<br/>TGACAAGCCCTTCTCGGAGGAGCAAGCTCGCCTCTACCTGCGGGACGTC<br/>ATCCTGGGCCTCGAGTACTTGCACTGCCAGAAGATCGTCCACAGGGACA<br/>TCAAGCCATCCAACCTGCTCCTGGGGGATGATGGGCACGTGAAGATCGC<br/>CGACTTTGGCGTCAGCAACCAGTTTGAGGGGAACGACGCTCAGCTGTCC<br/>AGCACGGCGGGAACCCAGCATTTCATGGCCCCCGAGGCCATTTCTGATT<br/>CCGGCCAGAGCTTCAGTGGGAAGGCCTTGGATGTATGGGCCACTGGCG<br/>TCACGTTGTACTGCTTTGTCTATGGGAAGTGCCCATTCATCGACGATTTC<br/>ATCCTGGCCCTCCACAGGAAGATCAAGAATGAGCCCGTGGTGTTTCCTG<br/>AGGAGCCAGAAATCAGCGAGGAGCTCAAGGACCTGATCCTGAAGATGTT<br/>AGACAAGAATCCCGAGACGAGAATTGGGGTGCCAGACATCAAGTTGCAC<br/>CCTTGGGTGACCAAGAACGGGTGA<br/>(SEQ ID NO:3)</p> |
| <p>Білок САМКК1 1-<br/>413</p>                 | <p>MEGGPAVCCQDPRAELVERVAIDVTHLEEADGGPEPTRNGVDPPPRARA<br/>ASVIPGSTSRLLPARPSLSARKLSLQERPAGSYLEAQAGPYATGPASHISPR<br/>AWRRPTIESHHVAISDAEDCVQLNQYKLQSEIGKGAYGVVRLAYNESEDRH<br/>YAMKVLKSKKLLKQYGFPRRPPPRGSQAAQGGPAKQLPLERVYQEIAILKK<br/>LDHVNVLKIEVLDDPAEDNLYLVFDLLRKGPVMEVPCDKPFSEEQARLYLR<br/>DVILGLEYLHCQKIVHRDIKPSNLLLGDGHHVKIADFGVSNQFEGNDAQLSST<br/>AGTPAFMAPEAISDSGQSFSGKALDVWATGVTLYCFVYGKCPFIDDFILALH<br/>RKIKNEPVVFPEEPEISEELKDLILKMLDKNPETRIGVPDIKLHPWVTKNG<br/>(SEQ ID NO:4)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

|                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Нуклеїнова<br/>кислота CAMKK1<br/>T108A</p> | <p>ATGGAGGGGGGTCCAGCTGTCTGCTGCCAGGATCCTCGGGCAGAGCTG<br/>GTAGAACGGGTGGCAGCCATCGATGTGACTCACTTGGAGGAGGCAGAT<br/>GGTGGCCCAGAGCCTACTAGAAACGGTGTGGACCCCCACCACGGGCC<br/>AGAGCTGCCTCTGTGATCCCTGGCAGTACTTCAAGACTGCTCCCAGCCC<br/>GGCCTAGCCTCTCAGCCAGGAAGCTTTCCCTACAGGAGCGGCCAGCAG<br/>GAAGCTATCTGGAGGCGCAGGCTGGGCCTTATGCCACGGGGCCTGCCA<br/>GCCACATCTCCCCCGGGCCTGGCGGAGGCCCGACATCGAGTCCCACC<br/>ACGTGGCCATCTCAGATGCAGAGGACTGCGTGCAGCTGAACCAGTACAA<br/>GCTGCAGAGTGAGATTGGCAAGGGTGCCTACGGTGTGGTGAGGCTGGC<br/>CTACAACGAAAGTGAAGACAGACACTATGCAATGAAAGTCCTTTCCAAAA<br/>AGAAGTTACTGAAGCAGTATGGCTTTCCACGTGCGCCCTCCCCGAGAGG<br/>GTCCCAGGCTGCCCAGGGAGGACCAGCCAAGCAGCTGCTGCCCCTGGA<br/>GCGGGTGTACCAGGAGATTGCCATCCTGAAGAAGCTGGACCACGTGAAT<br/>GTGGTCAAACCTGATCGAGGTCCTGGATGACCCAGCTGAGGACAACCTCT<br/>ATTTGGTGTTTGACCTCCTGAGAAAGGGGGCCCGTCATGGAAGTGCCCTG<br/>TGACAAGCCCTTCTCGGAGGAGCAAGCTCGCCTCTACCTGCGGGACGTC<br/>ATCCTGGGCCTCGAGTACTTGCCTGCCAGAAAGATCGTCCACAGGGACA<br/>TCAAGCCATCCAACCTGCTCCTGGGGGATGATGGGCACGTGAAGATCGC<br/>CGACTTTGGCGTCAGCAACCAGTTTGAGGGGAACGACGCTCAGCTGTCC<br/>AGCACGGCGGGAACCCAGCATTTCATGGCCCCCGAGGCCATTTCTGATT<br/>CCGGCCAGAGCTTCAGTGGGAAGGCCTTGGATGTATGGGCCACTGGCG<br/>TCACGTTGTACTGCTTTGTCTATGGGAAGTGCCCATTCATCGACGATTTTC<br/>ATCCTGGCCCTCCACAGGAAGATCAAGAATGAGCCCGTGGTGTTTCCTG<br/>AGGAGCCAGAAATCAGCGAGGAGCTCAAGGACCTGATCCTGAAGATGTT<br/>AGACAAGAATCCCGAGACGAGAATTGGGGTGCCAGACATCAAGTTGCAC<br/>CCTTGGGTGACCAAGAACGGGGAGGAGCCCTTCTTCCGAGGAGGAG<br/>CACTGCAGCGTGGTGGAGGTGACAGAGGAGGAGGTTAAGAACTCAGTC<br/>AGGCTCATCCCCAGCTGGACCACGGTGATCCTGGTGAAGTCCATGCTGA<br/>GGAAGCGTTCCTTTGGGAACCCGTTTGAGCCCCAAGCACGGAGGGAAG<br/>AGCGATCCATGTCTGCTCCAGGAAACCTACTGGTGAAAGAAGGGTTTGG<br/>TGAAGGGGGCAAGAGCCCAGAGCTCCCCGGCGTCCAGGAAGACGAGGC<br/>TGCATCCTGA<br/>(SEQ ID NO:5)</p> |
| <p>Білок CAMKK1<br/>T108A</p>                  | <p>MEGGPAVCCQDPRAELVERVAIDVTHLEEADGGPEPTRNGVDPPPRARA<br/>ASVIPGSTSRLLPARPSLSARKLSLQERPAGSYLEAQAGPYATGPASHISPR<br/>AWRRPDIESHHVAISDAEDCVQLNQYKLQSEIGKGAYGVVRLAYNESEDRH<br/>YAMKVLSSKKLLKQYGFPRRPPPRGSQAAQGGPAKQLPLERVYQEIALKK<br/>LDHVNNVVKLIEVLDDPAEDNLYLVFDLLRKGPVMEVPCDKPFSEEQARLYLR<br/>DVILGLEYLHCQKIVHRDIKPSNLLLGGDGHVKIADFGVSNQFEGNDAQLSST<br/>AGTPAFMAPEAISDSGQSFSGKALDVWATGVTLYCFVYGKCPFIDDFILALH<br/>RKIKNEPVVFPEEPEISEELKDLILKMLDKNPETRIGVPDIKLHPWVTKNGEEP<br/>LPSEEEHCSVVEVTEEEVKNSVRLIPSWTTVILVKSMLRKRSFGNPFEPQAR<br/>REERSMSAPGNLLVKEGFGEGGKSPELPGVQEDEAAS<br/>(SEQ ID NO:6)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

|                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Нуклеїнова<br/>кислота CAMKK1<br/>S459A</p> | <p>ATGGAGGGGGGTCCAGCTGTCTGCTGCCAGGATCCTCGGGCAGAGCTG<br/>GTAGAACGGGTGGCAGCCATCGATGTGACTCACTTGGAGGAGGCAGAT<br/>GGTGGCCCAGAGCCTACTAGAAACGGTGTGGACCCCCACCACGGGCC<br/>AGAGCTGCCTCTGTGATCCCTGGCAGTACTTCAAGACTGCTCCCAGCCC<br/>GGCCTAGCCTCTCAGCCAGGAAGCTTTCCCTACAGGAGCGGCCAGCAG<br/>GAAGCTATCTGGAGGCGCAGGCTGGGCCTTATGCCACGGGGCCTGCCA<br/>GCCACATCTCCCCCGGGCCTGGCGGAGGCCACCATCGAGTCCCACC<br/>ACGTGGCCATCTCAGATGCAGAGGACTGCGTGCAGCTGAACCAGTACAA<br/>GCTGCAGAGTGAGATTGGCAAGGGTGCCTACGGTGTGGTGAGGCTGGC<br/>CTACAACGAAAGTGAAGACAGACACTATGCAATGAAAGTCCTTTCCAAAA<br/>AGAAGTTACTGAAGCAGTATGGCTTTCCACGTGCGCCCTCCCCGAGAGG<br/>GTCCCAGGCTGCCCAGGGAGGACCAGCCAAGCAGCTGCTGCCCCTGGA<br/>GCGGGTGTACCAGGAGATTGCCATCCTGAAGAAGCTGGACCACGTGAAT<br/>GTGGTCAAACCTGATCGAGGTCCTGGATGACCCAGCTGAGGACAACCTCT<br/>ATTTGGTGTTTGACCTCCTGAGAAAGGGGGCCCGTCATGGAAGTGCCCTG<br/>TGACAAGCCCTTCTCGGAGGAGCAAGCTCGCCTCTACCTGCGGGACGTC<br/>ATCCTGGGCCTCGAGTACTTGCCTGCCAGAAGATCGTCCACAGGGACA<br/>TCAAGCCATCCAACCTGCTCCTGGGGGATGATGGGCACGTGAAGATCGC<br/>CGACTTTGGCGTCAGCAACCAGTTTGAGGGGAACGACGCTCAGCTGTCC<br/>AGCACGGCGGGAACCCAGCATTTCATGGCCCCCGAGGCCATTTCTGATT<br/>CCGGCCAGAGCTTCAGTGGGAAGGCCTTGGATGTATGGGCCACTGGCG<br/>TCACGTTGTACTGCTTTGTCTATGGGAAGTGCCCATTCATCGACGATTTTC<br/>ATCCTGGCCCTCCACAGGAAGATCAAGAATGAGCCCGTGGTGTTTCCTG<br/>AGGAGCCAGAAATCAGCGAGGAGCTCAAGGACCTGATCCTGAAGATGTT<br/>AGACAAGAATCCCGAGACGAGAATTGGGGTGCCAGACATCAAGTTGCAC<br/>CCTTGGGTGACCAAGAACGGGGAGGAGCCCTTCTTCCGAGGAGGAG<br/>CACTGCAGCGTGGTGGAGGTGACAGAGGAGGAGGTTAAGAACTCAGTC<br/>AGGCTCATCCCCAGCTGGACCACGGTGATCCTGGTGAAGTCCATGCTGA<br/>GGAAGCGTGACTTTGGGAACCCGTTTGAGCCCCAAGCACGGAGGGAAG<br/>AGCGATCCATGTCTGCTCCAGGAAACCTACTGGTGAAAGAAGGGTTTGG<br/>TGAAGGGGGCAAGAGCCCAGAGCTCCCCGGCGTCCAGGAAGACGAGGC<br/>TGCATCCTGA<br/>(SEQ ID NO:7)</p> |
| <p>Білок CAMKK1<br/>S459A</p>                  | <p>MEGGPAVCCQDPRAELVERVAIDVTHLEEADGGPEPTRNGVDPPPRARA<br/>ASVIPGSTSRLLPARPSLSARKLSLQERPAGSYLEAQAGPYATGPASHISPR<br/>AWRRPTIESHHVAISDAEDCVQLNQYKLOSEIGKGAYGVVRLAYNESEDRH<br/>YAMKVLSSKKLLKQYGFPRRPPPRGSQAAQGGPAKQLPLERVYQEIALKK<br/>LDHVNNVVKLIEVLDDPAEDNLYLVFDLLRKGPVMEVPCDKPFSEEQARLYLR<br/>DVILGLEYLHCQKIVHRDIKPSNLLLGGDGHVKIADFGVSNQFEGNDAQLSST<br/>AGTPAFMAPEAISDSGQSFSGKALDVWATGVTLYCFVYGKCPFIDDFILALH<br/>RKIKNEPVVFPEEPEISEELKDLILKMLDKNPETRIGVPDIKLHPWVTKNGEEP<br/>LPSEEEHCSVVEVTEEEVKNSVRLIPSWTTVILVKSMLRKRDFGNPFEPQAR<br/>REERSMSAPGNLLVKEGFGEGGKSPELPGVQEDEAAS<br/>(SEQ ID NO:8)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

|                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Нуклеїнова<br/>кислота CAMKK1<br/>T108A/S459A</p>                               | <p>ATGGAGGGGGGTCCAGCTGTCTGCTGCCAGGATCCTCGGGCAGAGCTG<br/>GTAGAACGGGTGGCAGCCATCGATGTGACTCACTTGGAGGAGGCAGAT<br/>GGTGGCCCAGAGCCTACTAGAAACGGTGTGGACCCCCACCACGGGCC<br/>AGAGCTGCCTCTGTGATCCCTGGCAGTACTTCAAGACTGCTCCCAGCCC<br/>GGCCTAGCCTCTCAGCCAGGAAGCTTTCCCTACAGGAGCGGCCAGCAG<br/>GAAGCTATCTGGAGGCGCAGGCTGGGCCTTATGCCACGGGGCCTGCCA<br/>GCCACATCTCCCCCGGGCCTGGCGGAGGCCCGACATCGAGTCCCACC<br/>ACGTGGCCATCTCAGATGCAGAGGACTGCGTGCAGCTGAACCAGTACAA<br/>GCTGCAGAGTGAGATTGGCAAGGGTGCCTACGGTGTGGTGAGGCTGGC<br/>CTACAACGAAAGTGAAGACAGACACTATGCAATGAAAGTCCTTTCCAAA<br/>AGAAGTTACTGAAGCAGTATGGCTTTCCACGTGCCCTCCCCGAGAGG<br/>GTCCCAGGCTGCCAGGGAGGACCAGCCAAGCAGCTGCTGCCCCTGGA<br/>GCGGGTGTACCAGGAGATTGCCATCCTGAAGAAGCTGGACCACGTGAAT<br/>GTGGTCAAACCTGATCGAGGTCCTGGATGACCCAGCTGAGGACAACCTCT<br/>ATTTGGTGTGTTGACCTCCTGAGAAAGGGGGCCCGTCATGGAAGTGCCCTG<br/>TGACAAGCCCTTCTCGGAGGAGCAAGCTCGCCTCTACCTGCGGGACGTC<br/>ATCCTGGGCCTCGAGTACTTGCCTGCCAGAAGATCGTCCACAGGGACA<br/>TCAAGCCATCCAACCTGCTCCTGGGGGATGATGGGCACGTGAAGATCGC<br/>CGACTTTGGCGTCAGCAACCAGTTTGAGGGGAACGACGCTCAGCTGTCC<br/>AGCACGGCGGGAACCCAGCATTTCATGGCCCCCGAGGCCATTTCTGATT<br/>CCGGCCAGAGCTTCAGTGGGAAGGCCTTGGATGTATGGGCCACTGGCG<br/>TCACGTTGTACTGCTTTGTCTATGGGAAGTGCCCATTCATCGACGATTTT<br/>ATCCTGGCCCTCCACAGGAAGATCAAGAATGAGCCCGTGGTGTTTCCTG<br/>AGGAGCCAGAAATCAGCGAGGAGCTCAAGGACCTGATCCTGAAGATGTT<br/>AGACAAGAATCCCGAGACGAGAATTGGGGTGCCAGACATCAAGTTGCAC<br/>CCTTGGGTGACCAAGAACGGGGAGGAGCCCCCTTCTTCCGAGGAGGAG<br/>CACTGCAGCGTGGTGGAGGTGACAGAGGAGGAGGTTAAGAACTCAGTC<br/>AGGCTCATCCCCAGCTGGACCACGGTGATCCTGGTGAAGTCCATGCTGA<br/>GGAAGCGTGACTTTGGGAACCCGTTTGAGCCCCAAGCACGGAGGGAAG<br/>AGCGATCCATGTCTGCTCCAGGAAACCTACTGGTGAAGAAGGGTTTGG<br/>TGAAGGGGGCAAGAGCCCAGAGCTCCCCGGCGTCCAGGAAGACGAGGC<br/>TGCATCCTGA<br/>(SEQ ID NO:9)</p> |
| <p>Білок CAMKK1<br/>T108A/S459A</p>                                                | <p>MEGGPAVCCQDPRAELVERVAIDVTHLEEADGGPEPTRNGVDPPPRARA<br/>ASVIPGSTSRLLPARPSLSARKLSLQERPAGSYLEAQAGPYATGPASHISPR<br/>AWRRPDIESHHVAISDAEDCVQLNQYKLQSEIGKGAYGVVRLAYNESEDRH<br/>YAMKVLSSKKLLKQYGFRRPPPRGSQAAQGGPAKQLPLERVYQEIAILKK<br/>LDHVNNVKLIEVLDDPAEDNLYLVFDLLRKGPVMEVPCDKPFSEEQARLYLR<br/>DVILGLEYLHCQKIVHRDIKPSNLLLGGDDGHVKIADFGVSNQFEGNDAQLSST<br/>AGTPAFMAPEAISDSGQSFSGKALDWATGVTLYCFVYGKCPFIDDFILALH<br/>RKIKNEPVVFPEEPEISEELKDLILKMLDKNPETRIGVPDIKLHPWVTKNGEPP<br/>LPSEEEHCSVVEVTEEEVKNSVRLIPSWTTVILVKSMLRKRDFGNPFEPQAR<br/>REERSMSAPGNLLVKEFGEGGKSPELPGVQEDEAAS<br/>(SEQ ID NO:10)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <p>siRNA Dab2<br/>Послідовність 1<br/>(5' → 3'):<br/>Значення<br/>Антизначення</p> | <p>GGAUUCUAUGAUGAAACUCTT<br/>(SEQ ID NO:11)<br/>GAGUUUCAUCAUGAAUCCTG<br/>(SEQ ID NO:12)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <p>siRNA Dab2<br/>Послідовність 2<br/>(5' → 3'):<br/>Значення<br/>Антизначення</p> | <p>GCACCAUCAAGAAGGAAATT<br/>(SEQ ID NO:13)<br/>UUUCCUUCUUUGAUGGUGCTT<br/>(SEQ ID NO:14)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

|                                                                         |                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| siRNA Dab2<br>Послідовність 3<br>(5' → 3'):<br>Значення<br>Антизначення | GGUGAUGGUGUAAAAUACATT<br>(SEQ ID NO:15)<br>UGUAUUUUACACCAUCACCTT<br>(SEQ ID NO:16)                          |
| Mir145<br>(NR_029686)                                                   | CACCTTGTCTCACGGTCCAGTTTTCCAGGAATCCCTTAGATGCTAAGA<br>TGGGGATTCTGGAAATACTGTTCTTGAGGTCATGGTT<br>(SEQ ID NO:17) |

## Втілення

Наступний список втілень призначений для доповнення, а не для викривлення або заміни попередніх описів.

Втілення 1. Спосіб лікування ішемічного або запального стану в органі або тканині пацієнта, що включає підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині.

Втілення 2. Спосіб втілення, який відрізняється тим, що зазначеним органом або тканиною є серце, печінка, нирки, мозок, хребет, легені, тонкий кишечник, товстий кишечник, артерії, суглоби, хрящ, шкіра або будь-яка їхня комбінація.

Втілення 3. Спосіб за втіленням 2, який відрізняється тим, що зазначеним органом або тканиною є серце або міокард.

Втілення 4. Спосіб за будь-яким з попередніх втілень, який відрізняється тим, що підвищення рівня CAMKK1 у зазначених органі або тканині досягається шляхом уведення білка CAMKK1 у зазначені орган або тканину.

Втілення 5. Спосіб за будь-яким з попередніх втілень, який відрізняється тим, що підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині досягається шляхом уведення вектора, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1, у зазначені орган або тканину.

Втілення 6. Спосіб за втіленням 4, який відрізняється тим, що вектором є плазмід або вірусний вектор.

Втілення 7. Спосіб за будь-яким з попередніх втілень, який відрізняється тим, що підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині досягається шляхом уведення клітин, які були модифіковані для одержання підвищеного рівня CAMKK1.

Втілення 8. Спосіб за будь-яким з попередніх втілень, який відрізняється тим, що підвищення рівня CAMKK1 у зазначеному органі або тканині досягається шляхом уведення кондиціонованих середовищ із культури клітин, які були модифіковані на збільшення рівня CAMKK1.

Втілення 9. Спосіб за втіленням 7 або 8, який відрізняється тим, що клітини були модифіковані вектором, що містять нуклеїнову кислоту, яка кодує CAMKK1.

Втілення 10. Спосіб за втіленням 9, який відрізняється тим, що вектор містить плазмід або вірусний вектор.

Втілення 11. Спосіб за втіленням 7 або 8, який відрізняється тим, що клітини були модифіковані агентом, який індукує експресію CAMKK1.

Втілення 12. Спосіб за втіленням 11, який відрізняється тим, що агентом є TGF- $\beta$ , miR45, інгібітор Dab2 або будь-яка їхня комбінація.

Втілення 13. Спосіб за втіленням 12, який відрізняється тим, що інгібітор Dab2 є siRNA Dab2.

Втілення 14. Спосіб за будь-яким з попередніх втілень, який відрізняється тим, що CAMKK1 є конститутивно активною CAMKK1.

Втілення 15. Спосіб за втіленням 14, який відрізняється тим, що конститутивно активна CAMKK1 включає вкорочену форму CAMKK1 1-413.

Втілення 16. Спосіб за втіленням 14, який відрізняється тим, що конститутивно активна CAMKK1 включає мутант T108A і S459A CAMKK1, або мутант CAMKK1 T108A/S459A.

Втілення 17. Спосіб за будь-яким з попередніх втілень, який відрізняється тим, що білок, вектор, клітини або кондиціоновані середовища вводять системно, безпосередньо в ішемічну або запалену тканину або периферію ішемічної або запаленої тканини.

Втілення 18. Спосіб за будь-яким з попередніх втілень, який відрізняється тим, що клітинами є мезенхімальні стовбурні клітини.

Втілення 19. Спосіб за будь-яким з попередніх втілень, який відрізняється тим, що ішемічним або запальним захворюванням є гострий інфаркт міокарда, серцева недостатність, хвороба периферичних артерій, інсульт, захворювання печінки, ішемічна хвороба нирок, розсіяний склероз, травматичне ушкодження головного мозку, ушкодження спинного мозку,

трансплантат проти хазяїна(GVHD), хронічне обструктивне захворювання легенів (COPD), ревматоїдний артрит, травма від трансплантації твердого органа, ортопедичне ушкодження, хрящовий розлад, рана або будь-яка їхня комбінація.

5 Втілення 20. Спосіб будь-якого з попередніх втілень, що додатково включає введення однієї або декількох додаткових регенеративних терапій.

Втілення 21. Спосіб за втіленням 20, який відрізняється тим, що одна або декілька регенеративних терапій є мезенхімальними стовбурними клітинами, отриманими з кісткового мозку, жирової тканини, тканини плаценти, пуповини, вартонова холодцю, менструальної крові, стовбурних клітин, макрофагів M2, моноцитів або будь-якої їхньої комбінації.

10 Втілення 22. Спосіб за втіленням 21, який відрізняється тим, що стовбурними клітинами є клітини нейронних попередників, клітини ендотеліальних попередників, ендогенні стовбурні клітини, специфічні для органа, або будь-які їхні комбінації.

Втілення 23. Спосіб за втіленням 22 здійснення, який відрізняється тим, що ендогенними стовбурними клітинами, специфічними для органа, є серцеві клітини skit +.

15

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб індукції відновлення серця або міокарда або поліпшення функції вказаного серця або міокарда пацієнта, який включає введення білка кінази 1 кальцій/кальмодулінзалежної протеїнкінази (CAMKK1) або вектора, що містить нуклеїнову кислоту, кодуючу CAMKK1, або клітин, які були модифіковані, щоб мати підвищені рівні CAMKK1, або кондиціонованого середовища з культури клітин, які модифіковані, щоб мати підвищений рівень CAMKK1, або їх комбінації у вказані серце або міокард.

20

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що вектором є плазмідна або вірусний вектор.

25

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що білок CAMKK1 або нуклеїнова кислота, кодуюча CAMKK1, включає вкорочену форму білка CAMKK1 1-413 або нуклеїнову кислоту, що кодує укорочення.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що білок CAMKK1 або нуклеїнова кислота, кодуюча CAMKK1, включає мутантний білок T108A, S459A або T108A/S459A, CAMKK1 або нуклеїнову кислоту, що кодує мутантний білок.

30

5. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що білок, вектор, клітини або кондиціоновані середовища вводять в серце або міокард.

6. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що клітинами є мезенхімальні стовбурні клітини.

35

7. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що ішемічним або запальним захворюванням серця або міокарда є гострий інфаркт міокарда, серцева недостатність або будь-яка їхня комбінація.

8. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що додатково включає введення однієї або декількох додаткових регенеративних терапій чи терапії, що включає агент, вибраний з трансформуючого чинника зростання бета TGF- $\beta$ , мікроРНК145 (miR145), інгібітора відключеного гомолога 2 (Dab2) або будь-якої їх комбінації.

40

9. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що одна або декілька регенеративних терапій є мезенхімальними стовбурними клітинами, отриманими з кісткового мозку, жирової тканини, тканини плаценти, пуповини, вартонових драглів, менструальної крові, стовбурних клітин, макрофагів M2, моноцитів, або будь-якими їхніми комбінаціями.

45

10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що стовбурними клітинами є клітини нейронних попередників, ендотеліальні клітини-попередники, ендогенні стовбурні клітини, специфічні для органа, або будь-які їхні комбінації.

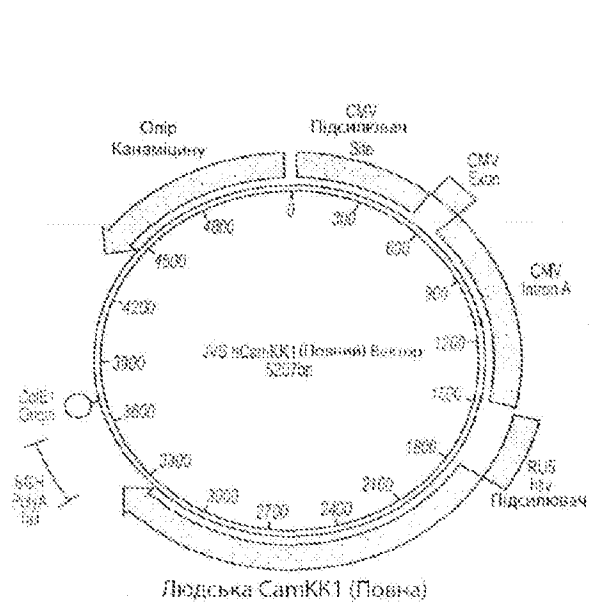
11. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що органоспецифічними ендогенними стовбурними клітинами є серцеві клітини skit+.

50

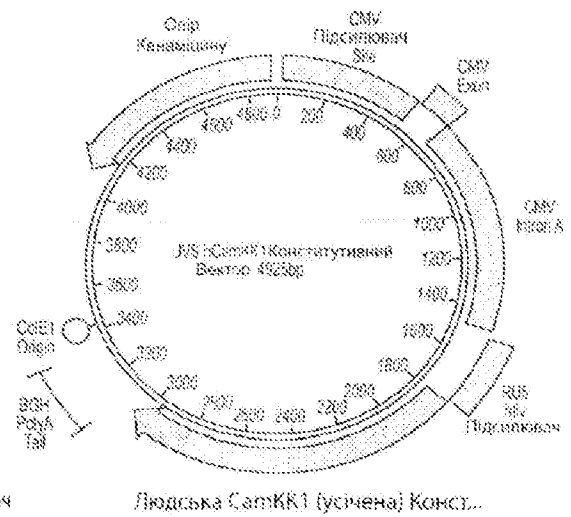
12. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що білок CAMKK1 є білками CAMKK1 людини.

13. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що нуклеїнова кислота кодує білок CAMKK1 людини.

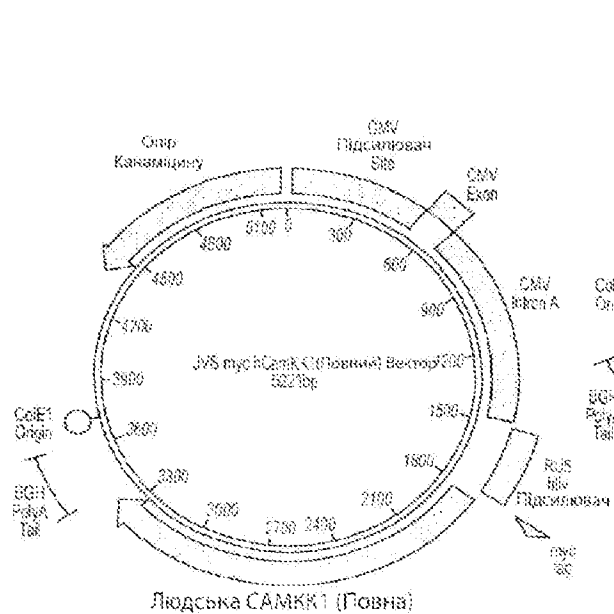
14. Спосіб за п. 7, який **відрізняється** тим, що ішемічне або запальне захворювання серця або міокарда пов'язане або не пов'язане з фракцією викиду.



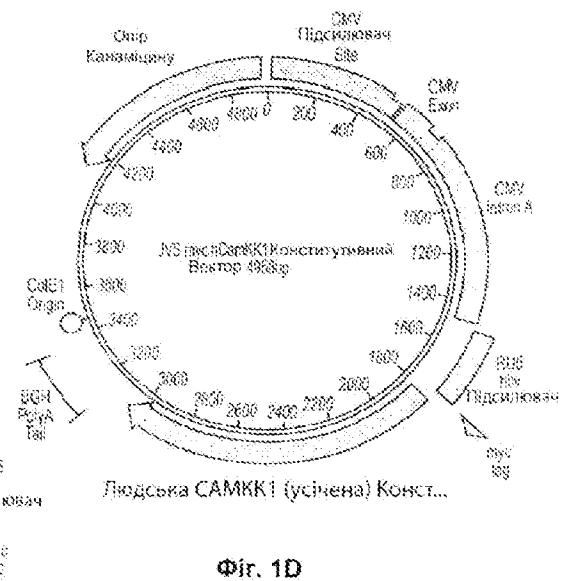
Mr. TA



Qir. 1B



Dir. 1C



Qir. 10

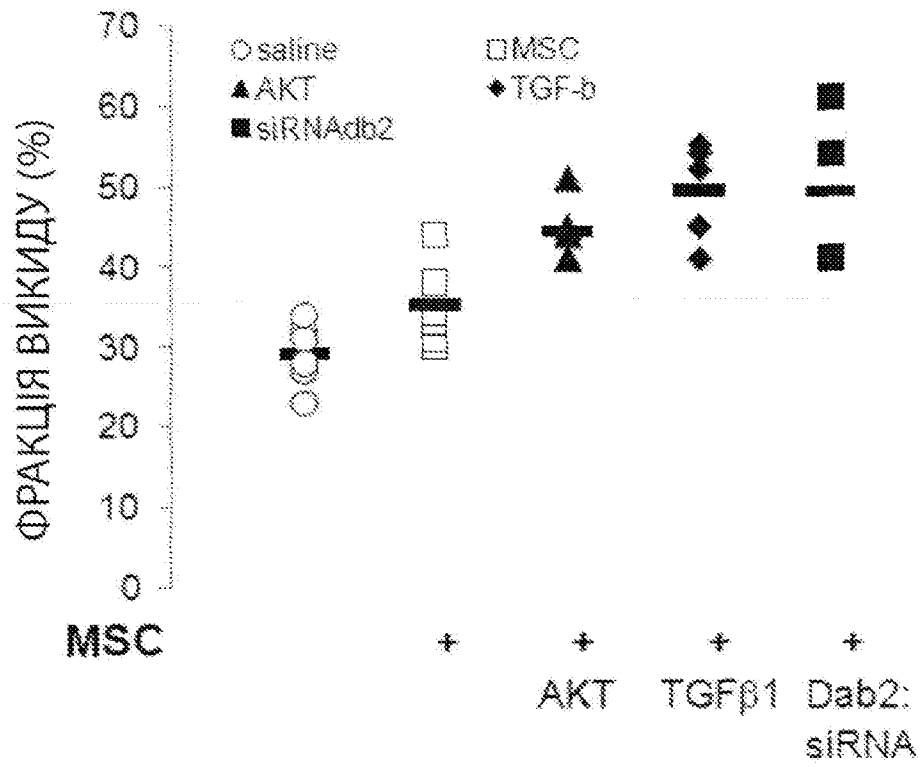


Fig. 2

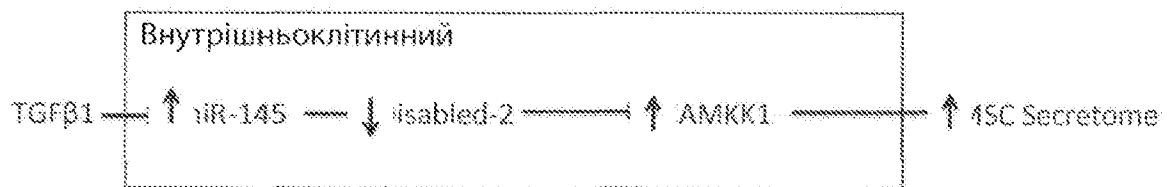


Fig. 3

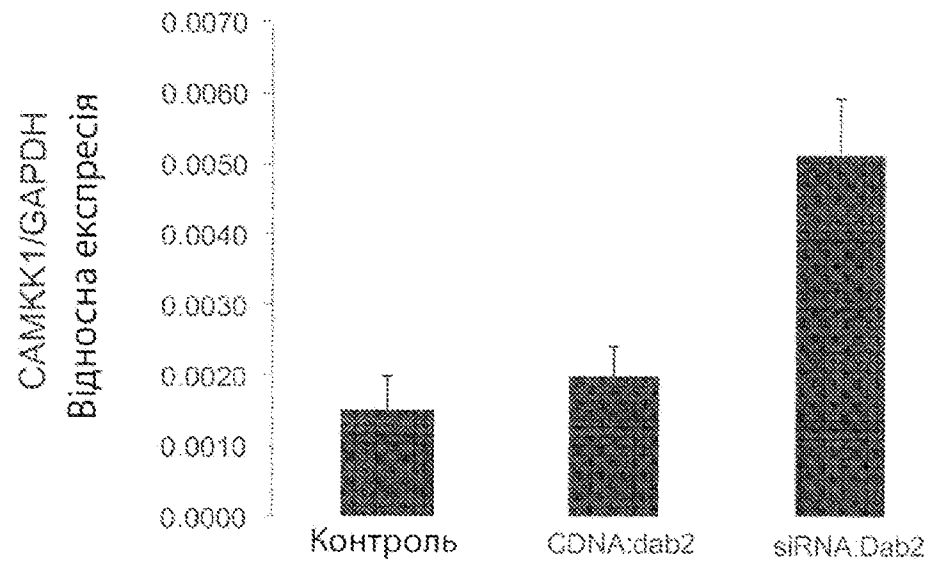


Fig. 4

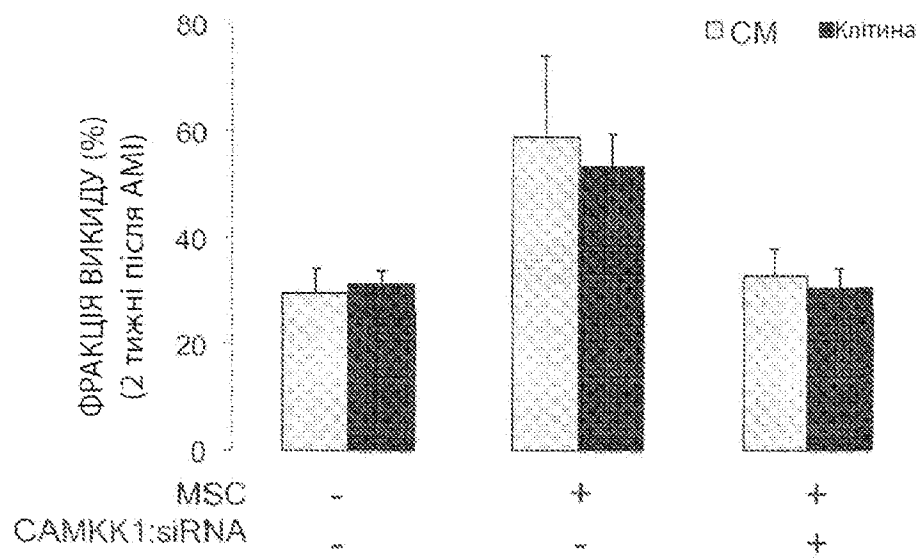


Fig. 5A

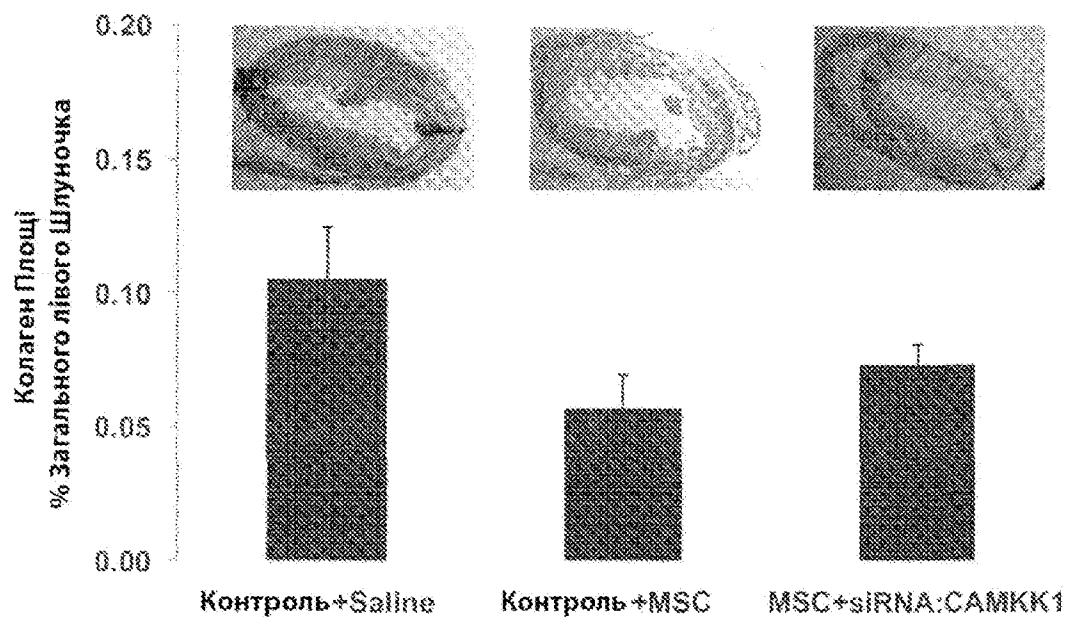


Fig. 5B

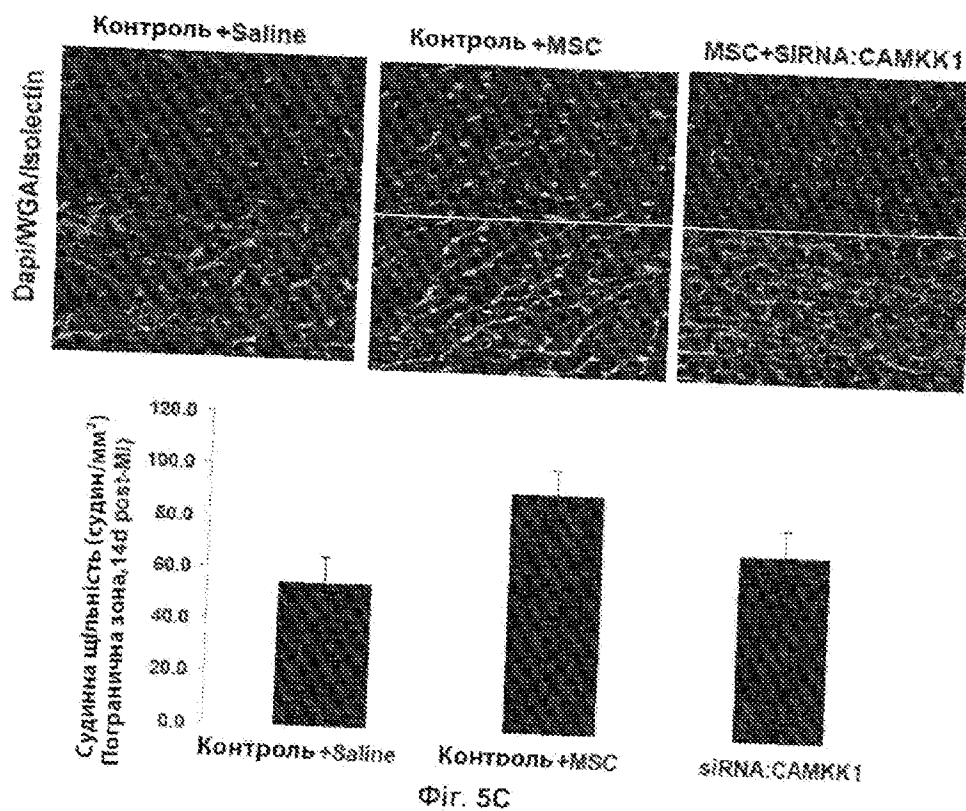
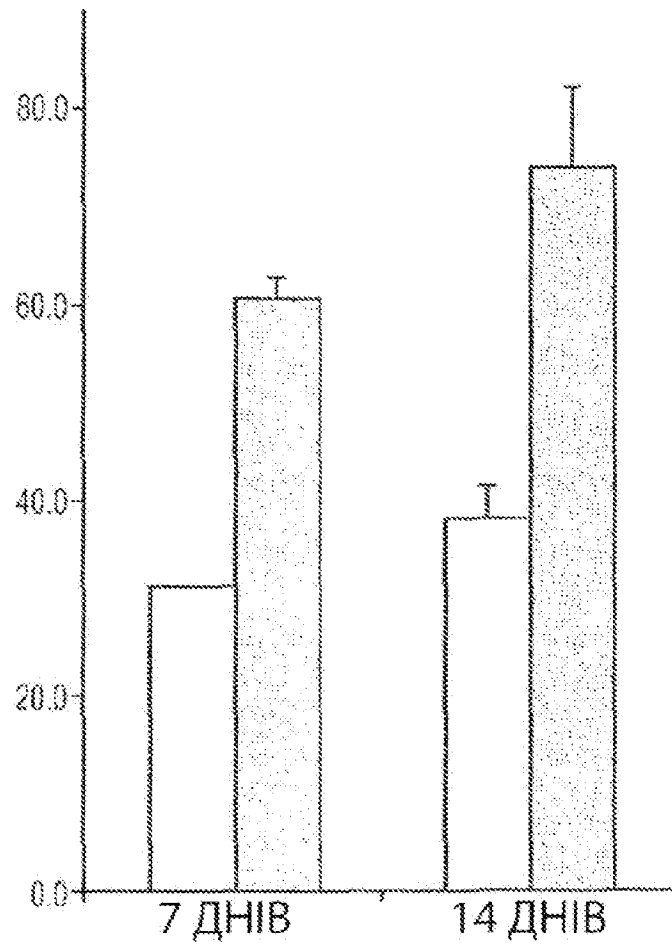


Fig. 5C



Фіг. 6

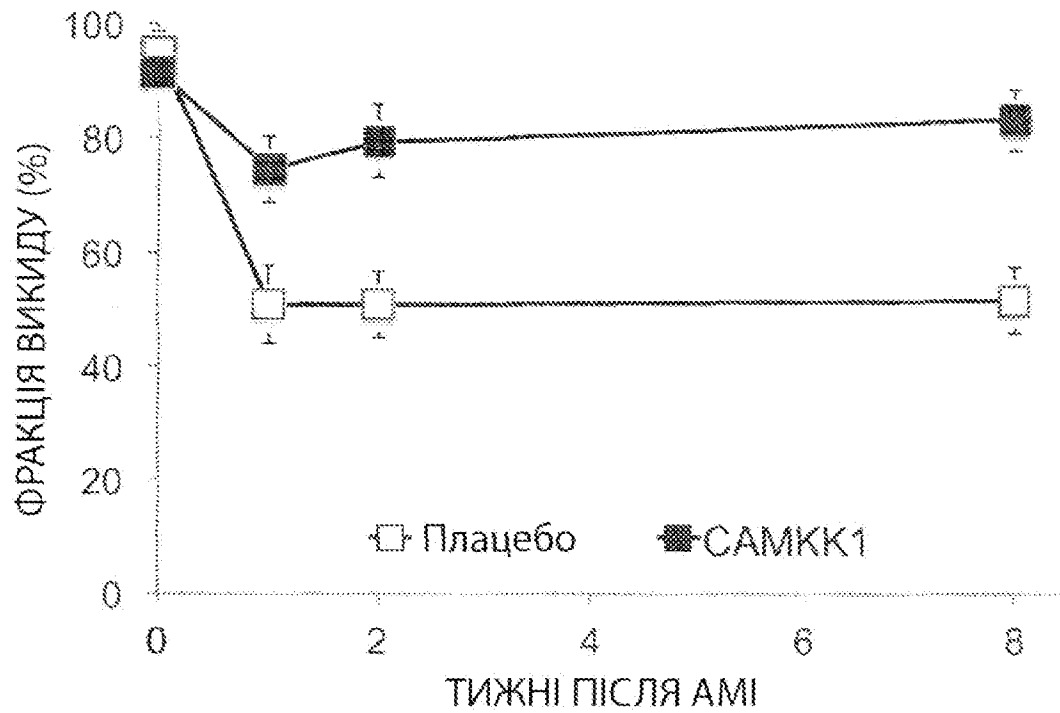


Fig. 7

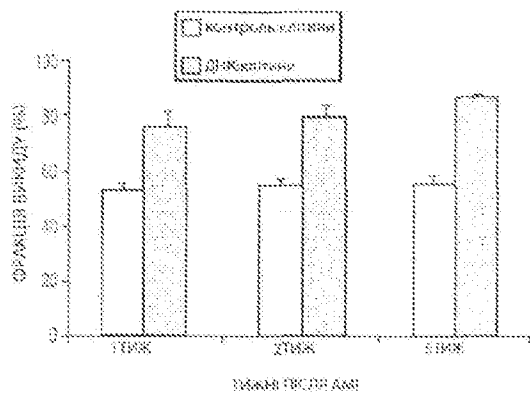


Fig. 8A

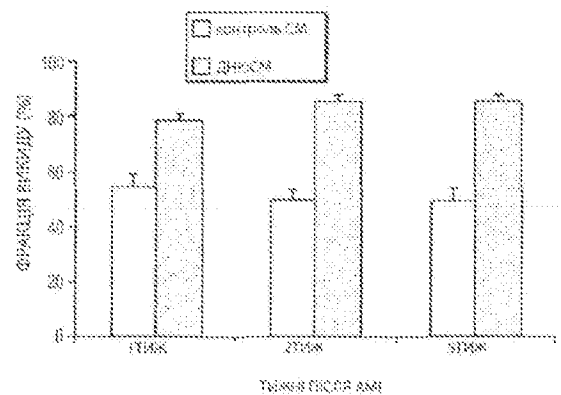


Fig. 8B