



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011143063, 20.05.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.05.2010Дата регистрации:
04.07.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
20.05.2009 US PCT/US2009/044751

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

(45) Опубликовано: 04.07.2017 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 20.12.2011(86) Заявка РСТ:
US 2010/035616 (20.05.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/135555 (25.11.2010)Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, ул. Малая Морская,
15, офис 5, ВОХ-сервис 1125, ООО
"ПАТЕНТИКА"

(72) Автор(ы):

ГОРДОН-БЕРЕСФОРД, Роланд (BE),
ГОССИН, Винциан (BE),
ОМСИ, Кристиан (BE),
ТЕРЗИК, Андре (US),
БЕФАР, Атта (US)

(73) Патентообладатель(и):

МАЙО ФАУНДЕЙШН ФО МЕДИКАЛ
ЭДЬЮКЕЙШН ЭНД РИСЕРЧ (US),
КАРДИОЗ БИОСАЙНСИЗ СА (BE)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RAJASINGH J. et al. STAT3-
dependent mouse embryonic stem cell
differentiation into cardiomyocytes: analysis
of molecular signaling and therapeutic efficacy
of cardiomyocyte precommitted mES
transplantation in a mouse model of myocardial
infarction. Circ Res. 2007 Oct 26; 101(9): 910-
918. Epub 2007 Sep 6 [Найдено 22.12.2014]
[он-лайн]. Найдено из (см. прод.)(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРДИО-ГЕНЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК
МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины.
Предложен способ определения кардио-
генеративного потенциала клеток
млекопитающих, включающий сбор измеренных
уровней экспрессии в клетках млекопитающих
генов Nkx2.5, Tbx5, MEf2C, GATA4, GATA6,
Mesp1, FOG1 и определение коэффициентакардиального генеративного потенциала (CARPI)
как среднего значения измеренных уровней
экспрессии указанных генов указанных клеток.
Изобретение обеспечивает хорошую
прогнозируемость успеха восстановления сердца.
12 з.п. ф-лы, 1 ил., 1 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

Интернет: URL: <http://circres.ahajournals.org/content/101/9/910.full.pdf+html>. LASKOWSKI K.R. et al. Uncoupling proteins in heart failure. Curr Heart Fail Rep. 2008 Jun; 5(2): 75-79 [Найдено 23.12.2014] [он-лайн]. Найдено из Интернет: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2692351/pdf/nihms-113812.pdf>. ХАРЛАП М.С. Анализ экспрессии генов в миокарде предсердия пациентов с фибрилляцией предсердий. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Москва, 2008, 101 с. [Найдено 29.12.2014] [он-лайн]. Найдено из Интернет, научная

библиотека диссертаций и авторефератов disserCat: URL:

<http://www.dissercat.com/content/analiz-ekspressii-genov-v-miokarde-predserdiya-patsientov-s-fibrillyatsiei-predse>

WO2005038454 A1, 28.04.2005.

R U 2 6 2 4 4 9 8 C 2

R U 2 6 2 4 4 9 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G06F 19/24 (2011.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011143063, 20.05.2010**

(24) Effective date for property rights:
20.05.2010

Registration date:
04.07.2017

Priority:

(30) Convention priority:
20.05.2009 US PCT/US2009/044751

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

(45) Date of publication: **04.07.2017** Bull. № 19

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

(86) PCT application:
US 2010/035616 (20.05.2010)

(87) PCT publication:
WO 2010/135555 (25.11.2010)

Mail address:
**190000, Sankt-Peterburg, ul. Malaya Morskaya, 15,
ofis 5, VOKH-servis 1125, OOO "PATENTIKA"**

(72) Inventor(s):

**GORDON-BERESFORD, Roland (BE),
GOSSIN, Vintsian (BE),
OMSI, Kristian (BE),
TERZIK, Andre (US),
BEFAR, Atta (US)**

(73) Proprietor(s):

**MAJO FAUNDEJSHN FO MEDIKAL
EDYUKEJSHN END RISERCH (US),
KARDIO3 BIOSAJNSIZ CA (BE)**

(54) METHOD FOR CARDIO-GENERATIVE POTENTIAL DETERMINATION IN MAMMAL CELLS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method for cardio-generative potential determination in mammal cells is proposed, including collection of the measured levels of Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1 genes expression in mammal cells, and cardio-generative

potential coefficient (CARPI) determination as the average value of the measured levels expression of the genes of the said cells.

EFFECT: good predictability of heart recovery success.

13 cl, 1 dwg, 1 tbl, 3 ex

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании международной заявки под номером PCT/US 2009/044751, поданной 20 мая 2009 г. Раскрытие этой первоначальной заявки считается частью (и включено посредством ссылки) настоящей заявки.

5 Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к лечению сердечно-сосудистых заболеваний путем введения клеток млекопитающих. В частности, оно относится к способу количественной оценки кардио-генеративного потенциала клеток млекопитающих, который обеспечивает хорошую прогнозируемость успеха восстановления сердца, 10 нуждающегося в этом. Также оно относится к способу количественной оценки изменения этого кардио-генеративного потенциала и кардиогенного потенциала обработки, направленной на дифференцировку клеток, а также к компьютерному устройству, включающему процессор и связанную с процессором память, в которой содержатся в кодированном виде одна или более программ, не являющихся нейросетевыми, причем 15 указанные программы обеспечивают осуществление процессором способа, включающего расчет CARPI.

Существующий уровень техники

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной заболеваемости и смертности во всем мире, несмотря на достижения в области лечения пациентов. В 20 отличие от тканей с высокой восстановительной способностью, сердечная ткань чувствительна и подвержена необратимым повреждениям. В настоящее время в клинической практике для решения проблем, связанных с нарушением работы сердечно-сосудистой системы, применяют методы клеточной регенеративной сердечно-сосудистой медицины.

25 Недавнее появление биологии стволовых клеток расширило спектр существующих способов лечения от традиционного временного облегчения до восстановительного лечения. Обычно клинический опыт основан на стволовых клетках взрослого организма, вводимых в неизмененном состоянии. Первое поколение биопрепаратов представляют собой «наивные» стволовые клетки человека, идентифицированные как легкодоступные 30 типы клеток. У нескольких человек наблюдали улучшения после введения наивных стволовых клеток.

Современный уровень области трансплантации наивных клеток в сердце человека описан, в частности, в обзоре Abdel-Latif A. et al. 'Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis' Arch Intern Med. (2007) 167: 989-997 и 35 источниках, цитируемых в этом обзоре.

Для улучшения клинических результатов были разработаны терапевтические средства второго поколения на основе стволовых клеток, обеспечивающие дифференцировку наивных стволовых клеток человека в клетки сердца перед введением в организм пациента. В обзоре Behfar et al. 'Guided stem cell cardiopoietic: Discovery and translation' J. 40 Mol. and Cell. Cardiology (2008) 45: 523-529 рассмотрена идея применения кардиальных клеток-предшественников, таких как кардиопоэтические клетки, для регенерации сердца.

Кардиопоэтические клетки обладают уникальным фенотипом: они характеризуются транслокацией в ядро полипептидов Nkx2.5 и MEF2C в сочетании с отсутствием детектируемых саркомерных белков. Такое кардиопоэтическое состояние соответствует 45 промежуточному фенотипу клетки, т.е. клетки находятся на пути дифференцировки в клетки сердца, но еще не полностью дифференцированы. Уникальной особенностью кардиопоэтических клеток является отсутствие детектируемого уровня экспрессии саркомерных белков, что отличает их от сократительных и содержащих саркомеры

кардиомиоцитоподобных клеток, образующихся из стволовых клеток, как описано в других заявках, таких как заявки Chunhui Xu (заявка США №2005/0164382) и Lough et al. (заявка США №2002/0061837).

Повышенное содержание белков - факторов транскрипции может и не означать его внутриклеточную локализацию, которая может быть также цитоплазматической или ядерной. Транслокация полипептидов Nkx2.5 и MEF2C в ядро необходима для однозначной дифференцировки в клетки сердца. Дополнительные объяснения можно найти у Behfar A. et al. (Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem cells yields cardiac progeny, Nature Clinical Practice, 2006, 3: S78-S82). Хотя ядерная транслокация может быть количественно определена методами иммуноцитохимии и иммуногистохимии, такие методики, как Вестерн-блоттинг и флуоресцентная сортировка клеток (FACS), которые позволяют оценить общее содержание белка, не подходят для количественной оценки распределения полипептида внутри клетки. Изучение распределения полипептида внутри клетки, описанное в заявке США №2008/0019944, не только является качественным, но и будет промышленной перспективе трудоемким, зависимым от оператора исследованием. Клинические результаты, а именно кардио-генеративный потенциал этих наивных стволовых клеток 'первого поколения' и ориентированных стволовых клеток 'второго поколения', нелегко спрогнозировать до введения клеток.

Существует потребность в способе количественной оценки кардио-генеративного потенциала клеток млекопитающих.

Настоящее изобретение обеспечивает прогностический способ оценки кардио-генеративного потенциала клеток млекопитающих, который включает оценку коэффициента кардиального генеративного потенциала (CARPI) как функции количественных показателей экспрессии генов указанных клеток. Также оно решает проблемы, связанные с количественной оценкой изменения кардио-генеративного потенциала клеток млекопитающих и кардиогенного потенциала лечения, направленного на дифференцировку клеток.

Определения

В рамках настоящего документа, если не указано обратное, перечисленные ниже в кавычках термины имеют следующие определения.

'Кардио-генеративный потенциал' клетки обозначает способность этой клетки образовывать клетки сердца, например кардиомиоциты.

'Кардиопоэтические клетки' представляют собой клетки промежуточного фенотипа, т.е. клетки, направленные по пути дифференцировки в клетки сердца, но не полностью дифференцированные. Кардиопоэтические клетки характеризуются транслокацией в ядро полипептидов Nkx2.5 и MEF2C в сочетании с отсутствием детектируемых саркомерных белков (Behfar et al. 'Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny', Nature Clin. Pract., Cardiovasc. Med. (2006) 3: S78-S82).

Кардиопоэтические клетки сохраняют способность к пролиферации. Кардиопоэтические клетки могут быть получены из стволовых клеток, включая, например, мезенхимальные стволовые клетки взрослого человека (Terzic et al. заявка США №2008/0019944), эмбриональные стволовые клетки мыши (Behfar et al, 'Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumour-free heart repair' J Exp Med 2007 204: 405-420), стволовые клетки, подобные эмбриональным, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клетки пуповинной крови, резидентные стволовые клетки сердца и т.п. или любые другие пригодные источники (при условии, что их получение не подразумевает разрушение эмбриона человека).

‘Коктейль’ или ‘кардиогенный коктейль’ представляет собой композицию, включающую по меньшей мере два кардиогенных вещества.

‘Кардиогенная обработка’ представляет собой обработку, которая увеличивает кардио-генеративный потенциал клетки. Пример такой обработки заключается в
 5 приведении указанных клеток в контакт с коктейлем. Примеры таких коктейлей включают по меньшей мере два вещества, выбранных из группы, состоящей из факторов роста, цитокинов, гормонов и их комбинаций. Указанные по меньшей мере два вещества могут быть выбраны из группы, в которую входят костные морфогенетические белки (BMP), такие как BMP-1, BMP-2, BMP-5, BMP-6; эпидермальный фактор роста (EGF);
 10 эритропоэтин (EPO); фактор роста фибробластов (FGF), такой как FGF-1, FGF-4, FGF-5, FGF-12, FGF-13, FGF-15, FGF-20; колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF); гранулоцито-макрофаго-колониестимулирующий фактор (GM-CSF); фактор роста и дифференцировки 9 (GDF-9); фактор роста гепатоцитов (HGF); инсулиноподобный фактор роста (IGF), такой как IGF-2; миостатин (GDF-8); нейротрофины, такие как NT-
 15 3, NT-4, NT-1 и фактор роста нервов (NGF); тромбоцитарный фактор роста (PDGF), такой как PDGF-beta, PDGF-AA, PDGF-BB; тромбопоэтин (TPO); трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α); трансформирующий фактор роста β (TGF- β), такой как TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3; фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), такой как VEGF-A, VEGF-C; TNF- α ; фактор, ингибирующий лейкемию (LIF); интерлейкин 6 (IL-6); ретиноевая
 20 кислота; фактор роста стромальных клеток 1 (C SDF-1); нейротрофический фактор головного мозга (BDNF); периостин; ангиотонин II; Flt3 лиганд; глиальный нейротрофический фактор; гепарин; белок-3, связывающий инсулиноподобный фактор роста; белок-5 связывающий инсулиноподобный фактор роста; интерлейкин-3; интерлейкин-8; мидкин; прогестерон; путресцин; фактор стволовых клеток; Wnt1; Wnt3a;
 25 Wnt5a; каспаза-4; хемокиновый лиганд 1; хемокиновый лиганд 2; хемокиновый лиганд 5; хемокиновый лиганд 7; хемокиновый лиганд 11; хемокиновый лиганд 20; гаптоглобин; лектин; холестерин-25-гидроксилаза; синтаксин 8; синтаксин 11; церулоплазмин; компонент комплемента 1; компонент комплемента 3; альфа 6 интегрин; лизосомальная кислая липаза 1; β -2 микроглобулин; убиквитин; фактор ингибирования миграции
 30 макрофагов; кофилин; циклофилин A; FKBP12; NDPK; профилин 1; цистатин C; кальциктин; станниокалцин-1; PGE-2; mpCCL2; IDO; iNOS; HLA-G5; M-CSF; ангиопоэтин; PIGF; MCP-1; молекулы внеклеточного матрикса; CCL2 (MCP-1); CCL3 (MIP-1 α); CCL4 (MIP-1 β); CCL5 (RANTES); CCL7 (MCP-3); CCL20 (MIP-3 α); CCL26 (эотаксин 3); CX3CL1 (фрактактин); CXCL5 (ENA-78); CXCL11 (i-TAC); CXCL1 (GRO α); CXCL2 (GRO β); CXCL8
 35 (IL-8); CCL10 (IP-10) и их комбинации.

‘Коктейль-ориентированные клетки’ или ‘клетки, ориентированные на дифференцировку в клетки сердца’ представляют собой клетки, обработанные коктейлем.

‘Дифференцировка’ представляет собой процесс, посредством которого менее
 40 специализированные клетки становятся более специализированными.

‘Фракция выброса’ представляет собой фракцию крови, выбрасываемую при сокращении сердца. Без ограничения, в настоящем описании термин фракция выброса обозначает фракцию выброса левого желудочка (фракция выброса левого желудочка или LVEF).

45 В описании настоящего изобретения формы единственного числа (англ. ‘a’, ‘an’ и ‘the’) включают формы множественного числа, если из контекста ясно следует обратное. Так, например, термин ‘стволовые клетки’ обозначает клетку, или две, или более клеток; ‘агент’ или ‘вещество’ обозначает агент или реагент или два или более агента или

реагента; 'настоящее изобретение' или 'изобретение' обозначает один или несколько аспектов изобретения и так далее.

Все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значение, обычно подразумеваемое специалистами в области техники, к которой принадлежит это изобретение, за исключением тех случаев, когда не определено обратное. Несмотря на то, что для осуществления изобретения могут быть использованы материалы и методы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, ниже описаны пригодные методы и материалы. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем тексте, полностью включены в него путем ссылки. В случае конфликтных ситуаций определяющим является настоящее описание, включая определения. Дополнительно, материалы, методы и примеры являются исключительно иллюстративными и не являются ограничивающими.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложен способ оценки кардио-генеративного потенциала клеток млекопитающих или кардиогенного потенциала обработки, который включает оценку коэффициента кардиального генеративного потенциала (CARPI) в зависимости от количественных показателей экспрессии генов указанных клеток.

Предпочтительно CARPI зависит от количественных показателей уровней матричной РНК (мРНК) определенных генов в указанных клетках.

Предпочтительно по меньшей мере один ген выбран из группы, в которую входят гены Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mespl, FOG1, FOG2, Fik1, их гомологи у млекопитающих и комбинации этих генов. Клетки могут представлять собой кардиальные клетки-предшественники. Они также могут быть соматическими, половыми клетками, клетками пуповинной крови, кардиальными предшественниками, эмбриональными и/или генетически модифицированными клетками.

В некоторых случаях клетки могут принадлежать одному индивидууму и CARPI может быть измерен для этих клеток до или после кардиогенной обработки клеток.

В другом варианте реализации оценивают CARPI для клеток индивидуума или группы индивидуумов в сравнении с другим индивидуумом или группой индивидуумов.

В особенно предпочтительном варианте CARPI представляет собой уравнение с несколькими переменными, в котором значения экспрессии генов на уровне мРНК являются переменными.

Уравнение предпочтительно выбрано из группы, состоящей из полиномиальных функций, трансцендентных функций и их комбинаций.

В частном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению осуществляемое измерение CARPI обеспечивает количественную оценку кардиогенного потенциала обработки.

Согласно одному из вариантов реализации способа согласно настоящему изобретению определяют корреляцию CARPI с каким-либо показателем функции сердца.

Настоящее изобретение также относится к компьютерному устройству, содержащему процессор и связанную с процессором память, в которой содержатся в кодированном виде одна или более программ, причем указанные одна или более программ обеспечивают осуществление процессором способа, включающего расчет CARPI.

Краткое описание графических материалов

На Фиг.1 по оси ординат Y в условных единицах (YE) показан CARPI, рассчитанный как для наивных МСК человека (hMSC), так и для коктейль-ориентированных МСК человека (CP-hMSC) на основе количественных показателей экспрессии генов на уровне мРНК, а по оси X показано процентное изменение LVEF (Δ EF) до и после инъекции в

сердце мышам с инфарктом миокарда. Черными символами представлены индивидуальные данные, не закрашенными символами представлены усредненные данные (Avg).

Подробное описание изобретения

Пример 1

Образцы костного мозга были получены от пациентов с ишемической болезнью сердца, перенесших аортокоронарное шунтирование. Пациенты подписали информированное согласие, утвержденное ведомственным этическим комитетом.

Мезенхимальные стволовые клетки были получены в результате посева необработанного костного мозга на пластиковые чашки, с последующей отмывкой через 12 часов, отбора адгезионных клеток, идентичность которых была подтверждена методом флуоресцентной сортировки клеток (FACS) с использованием панели маркеров CD34⁺/CD45⁺/CD133⁺. В дальнейшем клетки культивировали и размножали при температуре 37°C в среде DMEM с добавлением 5% лизата тромбоцитов человека (Mayo Clinic Blood Bank, Rochester, MN).

Для получения кардиопоэтической популяции клеток осуществляли культивирование наивных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, либо в лизате тромбоцитов, либо сыворотке с добавлением кардиогенного коктейля, содержащего TGFβ-1 (2.5 нг/мл), BMP4 (5 нг/мл), FGF2 (5 нг/мл), IGF-1 (50 нг/мл), активин А (10 нг/мл), кардиотрофин (1 нг/мл), α-тромбин (1 ед./мл) и кардиогенол С (100 нмоль).

Настоящее изобретение обеспечивает количественную оценку кардио-генеративного потенциала указанной кардиопоэтической популяции клеток путем измерения уровня экспрессии одного или более генов на уровне РНК. Настоящее изобретение позволяет обойти трудности, связанные с качественными наблюдениями, затратами времени, зависимостью от оператора, которые свойственны измерениям внутриклеточной локализации полипептидов фактора транскрипции. Одним из предпочтительных методов является количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТПЦР). Этот метод обеспечивает быстрые результаты (в течение 1 дня), которые не зависят от оператора и определены с использованием стандартного образца. Кроме того, хотя образцы, окрашенные с использованием иммунной метки, требуют поочередного анализа методом флуоресцентной микроскопии, метод кОТПЦР с использованием 96-луночного планшета позволяет исследовать до 48 различных образцов (или условий) в двух повторностях.

С целью идентификации пригодных маркеров для кОТПЦР выделяли мРНК из кардиопоэтических клеток, которые идентифицировали методом иммунофлуоресцентного окрашивания.

Стандартный образец состоял из клеток той же партии, которые культивировали в отсутствие кардиогенного коктейля.

Были определены перечисленные в табл.1 гены кардиальной транскрипционной активности.

кОТПЦР выполняли с использованием набора TaqMan PCR на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 7,900HT (Applied Biosystems, Foster City, шт. Калифорния, США). Реагенты TaqMan Gene Expression инкубировали в 96-луночном планшете, реакции осуществляли в трипликатах. Пороговый цикл (C_T) был задан как дробный номер цикла, при котором флуоресценция проходит фиксированный порог. Значения TaqMan C_T преобразовывали в относительные кратные изменения, определенные с

использованием $2^{-\Delta\Delta C_T}$ метода, нормированные по экспрессии гена 'домашнего хозяйства', например GAPDH (P/N 435,2662-0506003).

Результаты обработанных клеток были нормированы по соответствующему стандартному образцу.

CARPI, представляющий собой функцию измеренных значений экспрессии двух или более генов указанных клеток, рассчитывали с помощью электронных таблиц (Microsoft Excel 2007[®], Microsoft Corporation) как среднее значение экспрессии генов Nkx2.5, Tbx-5, MEF2C, GATA-4, GATA-6, MESP-1 и FOG-1 на уровне РНК. Использовали следующую формулу:

$$CARPI = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} \text{РНК} - \text{уровень}_i,$$

где 'i' обозначает выбранный ген, а 'n' - общее количество выбранных генов, с минимальным значением, равным 2. В данном конкретном случае n=7.

Вычисляли кардио-генеративный потенциал кардиопоэтических клеток, полученных из мезенхимальных стволовых клеток человека, у 'голой' (бестимусной) мыши с ослабленным иммунитетом (Harlan, Indianapolis, IN, США). Протокол был утвержден надлежащим ведомственным комитетом по уходу за животными и их использованию.

Вызвали инфаркт миокарда. В соответствии моделью слепого исследования, через месяц после инфаркта под контролем микроскопа вводили 600000 (в сумме) жизнеспособных наивных МСК человека или 600000 (в сумме) жизнеспособных кардиопоэтических клеток, полученных из МСК человека, суспендированных в 12,5 мкл среды для размножения, не содержащей лизата тромбоцитов, в пять эпикардальных участков передней стенки левого желудочка (по 2,5 мкл на каждый участок введения).

Осуществляли периодическое наблюдение за функцией и структурой левого желудочка с помощью трансторакальной эхокардиографии (Sequoia 512; Siemens, Malvern, PA and VisualSonics Inc, Toronto, Canada). Фракцию выброса левого желудочка (LVEF, %) рассчитывали как $[(LVVd - LVVs)/LVVd] \times 100$, где LVVd - конечно-диастолический объем левого желудочка (мкл), а LVVs - конечно-систолический объем левого желудочка (мкл).

Изменение LVEF (ΔEF) вычисляли как разницу между LVEF, измеренной спустя месяц после введения клеток, и LVEF, измеренной до введения клеток.

На Фиг.1 показан график CARPI для каждой конкретной культуры клеток в зависимости от соответствующей ΔEF у мышей, которым вводили соответствующие описанные выше отдельные культуры клеток. Наивные МСК человека (небольшие черные ромбы) обычно демонстрировали низкий CARPI, что связано с отсутствием существенного улучшения функции миокарда через месяц после введения клеток (отрицательное ΔEF). Стоит отметить редкие партии наивных МСК человека, врожденно обладающих высоким значением CARPI, наряду с врожденным регенеративным потенциалом. Среднее значение для всех групп наивных МСК человека представлено большим белым треугольником. Кардиопоэтические клетки, полученные из МСК человека (небольшие черные квадраты), обычно демонстрировали повышенный CARPI, связанный с устойчивым улучшением функции миокарда (положительное ΔEF). Среднее значение для всех групп наивных МСК человека изображено в виде большого белого квадрата. Средние значения представлены с 95%-м доверительным интервалом.

Таким образом, авторы изобретения продемонстрировали, что существует положительная корреляция между повышенным CARPI введенных клеток и изменением

во фракции выброса после введения в сердце после инфаркта. Таким образом, CARPI является прогностическим показателем кардио-генеративного потенциала.

Таблица 1

Индивидуальный номер теста Applied Biosystems	Название гена	Обозначение гена
Hs00231763_m1	- Фактор транскрипции Homeobox или - родственный фактор транскрипции NK2, 5 локус	Nkx2.5 или NKX2-5 или NKX2.5
Hs00171403_m1	- Кардиальный фактор транскрипции 'цинковые пальцы', или - связывающий белок GATA-4	GATA-4 или GATA4 (AB)
Hs00231149_m1	- Фактор усиления миоцитов 2C	MEF2c или MEF2C
Hs00361155_m1	- Фактор транскрипции T-box или -T-box 5	Tbx5 или TBX5
Hs00542350_m1	- Кофактор GATA ("Друг GATA") или - белок 'цинковые пальцы', мультитип 1	FOG 1 из FOG-1 или FOG1
Hs00251489_m1	- Фактор транскрипции Helix-loop-helix - Поздний гомолог мезодермы 1 (мышинный) (AB)	Mespl или MESPI
Hs00232018_m1	- связывающий белок GATA-6 (AB)	GATA-6 или GATA6
Hs00911699_m1	- рецептор, содержащий домен вставки киназы (рецептор тирозин киназы третьего типа)	Flk-1 или FLK1 или KDR

Пример 2

Аналогичные результаты были получены при обработке стволовых клеток коктейлем, содержащим смесь рекомбинантных белков: TGFβ-1 (2.5 нг/мл), BMP4 (5 нг/мл),

Пример 3

Аналогичные результаты были получены при обработке стволовых клеток коктейлем, содержащим смесь рекомбинантных белков: TGFβ-1 (2.5 нг/мл), BMP4 (5 нг/мл),

Другие варианты реализации

Следует понимать, что несмотря на то, что настоящее изобретение раскрыто в прилагаемом подробном описании изобретения, предшествующее описание приведено с целью иллюстрации и не ограничивает объем настоящего изобретения, который определяется прилагающейся формулой изобретения. Существуют другие аспекты, преимущества и модификации изобретения, находящиеся в пределах объема формулы изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ определения кардио-генеративного потенциала клеток млекопитающих, включающий этапы:

а) сбора измеренных уровней экспрессии в клетках млекопитающих следующих генов: Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1 и FOG1;

б) определения коэффициента кардиального генеративного потенциала (CARPI), где коэффициент кардиального генеративного потенциала (CARPI) рассчитывают как среднее значение измеренных уровней экспрессии указанных генов указанных клеток.

2. Способ по п. 1, в котором указанную экспрессию генов измеряют на уровне матричных РНК (мРНК), функциональных РНК или их комбинаций.

3. Способ по п. 2, в котором указанная функциональная РНК представляет собой микроРНК.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанные клетки выбраны из группы, состоящей из соматических, половых клеток, клеток пуповинной крови, кардиальных предшественников, эмбриональных клеток и любых их комбинаций.

5. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанные клетки являются генетически модифицированными.

6. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанные клетки не содержат детектируемых саркомерных белков.

7. Способ по любому из пп. 1-3, в котором CARPI указанных клеток оценивают до и после любой кардиогенной обработки.

8. Способ по п. 7, в котором кардиогенная обработка включает приведение указанных клеток в контакт с композицией, содержащей по меньшей мере два кардиогенных вещества, способных улучшать кардио-генеративный потенциал клетки.

9. Способ по любому из пп. 1-3 или 8, в котором указанные клетки принадлежат одному млекопитающему.

10. Способ по любому из пп. 1 или 8, в котором клетки взяты от млекопитающего или группы млекопитающих, а CARPI оценивают и сравнивают с CARPI клеток, принадлежащих другому млекопитающему или группе млекопитающих.

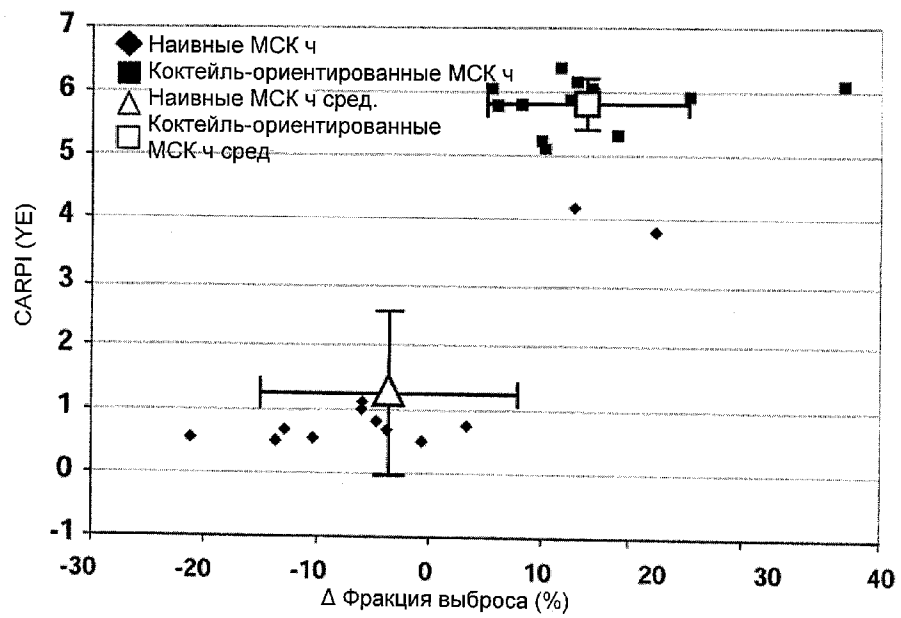
11. Способ по любому из пп. 1-3 или 8, в котором CARPI рассчитывают как среднее арифметическое уровней экспрессии следующих генов: Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1 и FOG1 по следующей формуле:

$$CARPI = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \text{уровень РНК}_i,$$

где i обозначает выбранный ген, а n - общее количество выбранных генов.

12. Способ по любому из пп. 1-3 или 8, в котором определенный CARPI используют для количественной оценки кардиогенного потенциала обработки.

13. Способ по любому из пп. 1-3 или 8, в котором определяют корреляцию CARPI с каким-либо показателем функции сердца.



ФИГ. 1