РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 533 253**(13) **C2**

(51) МПК
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2011129676/15, 18.12.2009**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.12.2009

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
18.12.2008 EP 08450198.0

(43) Дата публикации заявки: **27.01.2013** Бюл. № 3

(45) Опубликовано: **20.11.2014** Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 2006045872 A1 02.03.2006. GERALD E. et.al. Keratinocyte growth regulation by the products of immune cells // J.exp.med., 1988, vol.168, pages 1395-1402. RU 2295963 C1 27.03.2007. NEUBER K. et al. Cytokine-mediated effects of peripheral blood mononuclear cells from patients with atopic eczema on keratinocytes (HaCaT) in a new coculture system,** (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **18.07.2011**

(86) Заявка PCT:
EP 2009/067534 (18.12.2009)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2010/079086 (15.07.2010)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент"

(72) Автор(ы):
АНКЕРСМИТ Хендрик Ян (AT)

(73) Патентообладатель(и):
АПОСАЙЕНС АГ (AT)

RU 2533253 C2

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ, ВКЛЮЧАЮЩИЙ НАДОСАДОЧНУЮ ЖИДКОСТЬ КУЛЬТУРЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтическому препарату наружного применения для лечения воспалительных кожных патологий, предпочтительно кожной патологии, связанной с ишемией. Указанный препарат содержит надосадочную жидкость физиологического раствора, получаемую при культивировании по меньшей мере в течение 1 часа мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) или их субпопуляции в физиологическом растворе, свободном от веществ, способствующих пролиферации PBMC и активирующих PBMC, в условиях, вызывающих стресс у клеток. Также изобретение относится к способу приготовления и применению данного препарата. Заявленное изобретение способствует облегчению симптомов

воспалительных кожных патологий и процессу заживления. 4 н. и 16 з.п. ф-лы, 18 ил., 5 пр.

(56) (продолжение):
The British jornal of dermatology, 1995, 133(5), p.750-760. OLSSON S. et al. Low concentrations of cytokines produced by allergen-stimulated peripheral blood mononuclear cells have potent effects on nasal polyp-derived fibroblasts, Clinical and experimental immunology, 2003, 132(2), p.254-260. ROSLONIEC EF JR. et al. Induction of T-cell proliferation and enhancement of NK activity by supernatants from Con A-stimulated human peripheral blood mononuclear cells: a new lymphokine, Cellular imunology, 1986, 99(1), p.170-181

RU 2533253 C2

RU 2533253 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 533 253**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011129676/15, 18.12.2009**

(24) Effective date for property rights:
18.12.2009

Priority:
(30) Convention priority:
18.12.2008 EP 08450198.0

(43) Application published: **27.01.2013** Bull. № **3**

(45) Date of publication: **20.11.2014** Bull. № **32**

(85) Commencement of national phase: **18.07.2011**

(86) PCT application:
EP 2009/067534 (18.12.2009)

(87) PCT publication:
WO 2010/079086 (15.07.2010)

Mail address:
109012, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO "Sojuzpatent"

(72) Inventor(s):
ANKERSMIT Khendrik Jan (AT)

(73) Proprietor(s):
APOSAJENS AG (AT)

RU 2533253 C2

(54) PHARMACEUTICAL PREPARATION CONTAINING SUPERNATANT OF BLOOD MONONUCLEAR CELL CULTURE

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention refers to a topical pharmaceutical preparation for treating inflammatory skin pathologies, preferentially an ischemia-related skin pathology. The above preparation contains a supernatant of normal saline prepared by culturing for at least 1 hour peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or their subpopulation in normal saline free from substances promoting the PBMC proliferation and activating the PBMC in the stress-inducing environment. Also, the invention refers to a method for producing and using the above preparation.

EFFECT: invention promotes relieving the symptoms of the inflammatory skin pathologies and the healing process.

20 cl, 18 dwg, 5 ex

RU 2533253 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому препарату для лечения внутренних воспалительных кожных патологий, предпочтительно внутренних кожных патологий, связанных с ишемией.

Уровень техники

Гипоксия, состояние кислородного голодания, может наступить при повреждении легких или снижении тока крови. Ишемия, снижение кровотока, может быть вызвана закупоркой артерии или вены кровяным сгустком (тромб) или любым инородным циркулирующим в крови материалом (эмбол) или сосудистым нарушением, таким как атеросклероз. Снижение кровотока может наступить внезапно и продолжаться в течение короткого времени (острая ишемия) или может начинаться медленно и продолжаться в течение длительного времени или проявляться частыми рецидивами (хроническая ишемия). Острая ишемия зачастую связана с регионарным необратимым некрозом ткани (инфаркт), тогда как хроническая ишемия обычно связана с кратковременным гипоксическим поражением ткани. Однако если снижение перфузии является длительным или тяжелым, хроническая ишемия может ассоциироваться с инфарктом. Инфаркты обычно имеют место в селезенке, почках, легких, головном мозге и сердце, вызывая такие нарушения, как интестинальный инфаркт, легочный инфаркт, ишемический инсульт и инфаркт миокарда.

Патологические изменения при ишемических заболеваниях зависят от продолжительности и тяжести ишемии и от продолжительности жизни больного. Некроз может проявиться в пределах инфаркта в течение первых 24 часов, и острая воспалительная реакция развивается в жизнеспособных соседних с участком инфаркта тканях с миграцией лейкоцитов в участок омертвевшей ткани. В последующие дни происходит постепенное разрушение и удаление клеток в пределах инфаркта за счет фагоцитоза и замены коллагеновым или глиальным рубцом.

Гипоперфузия или инфаркт в одном органе часто отрицательно влияет на другие органы. Например, ишемия легкого, вызванная, например, легочной эмболией, негативно влияет не только на легкое, но также приводит сердце и другие органы, такие как головной мозг, в состояние гипоксического стресса. Инфаркт миокарда, который зачастую предполагает блокирование коронарной артерии из-за тромбоза, спазмов сосудов стенок артерии или вирусной инфекции сердца, может привести к застойной сердечной недостаточности и системной гипотензии. Вторичные осложнения, такие как глобальная ишемическая энцефалопатия, могут развиваться, если остановка сердечной деятельности затягивается при длительной гипоперфузии. Церебральная ишемия, наиболее часто вызываемая закупоркой сосудов из-за атеросклероза, может находиться в интервале тяжести заболевания от преходящих нарушений мозгового кровообращения (TIA) до церебрального инфаркта или инсульта. Хотя симптомы TIA являются временными и обратимыми, TIA имеют тенденцию рецидивировать и за ними часто следует инсульт.

Заболевания, связанные с закупоркой артерии, включают заболевание коронарной артерии, которое может привести к инфаркту миокарда, и заболевание периферийной артерии, которое может влиять на брюшную аорту, ее основные ответвления и артерии ног. Заболевания периферийной артерии включают болезнь Бюргера, болезнь Рейно и акроцианоз. Хотя заболевание периферийной артерии обычно вызывается атеросклерозом, другими основными причинами являются, например, диабет и тому подобное. Осложнения, связанные с заболеванием периферийной артерии, включают тяжелые судороги ног, стенокардию, аномальный сердечный ритм, сердечную

недостаточность, сердечный приступ, инсульт и почечную недостаточность.

Ишемические и гипоксические нарушения являются основной причиной заболеваемости и смертности. Сердечнососудистые заболевания ответственны за 30% смертельных случаев во всем мире. Среди различных сердечнососудистых заболеваний ишемическая болезнь сердца и цереброваскулярные заболевания служат причиной приблизительно 17% смертельных случаев.

В настоящее время лечение ишемических и гипоксических нарушений сосредоточено на ослаблении симптомов и лечении причинных нарушений. Например, лечение инфаркта миокарда включает нитроглицерин и анальгетики для борьбы с болью и смягчения нагрузки на сердце. Другие медикаменты, в том числе дигоксин, диуретики, амринон, β-блокаторы, агенты, снижающие уровень липидов, и ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, используются для стабилизации состояния, но ни одно из таких лечений не ориентировано непосредственно на поражение ткани, вызванное ишемией и гипоксией.

Раскрытие изобретения

Из-за недостаточности современного лечения остается потребность в способах, которые эффективны при лечении состояний, связанных с гипоксией. Также существует потребность в способах, которые эффективны для предупреждении поражения ткани, вызванного ишемией, которая возникает, например, из-за атеросклероза, диабета и легочных заболеваний.

Состояния, связанные с ишемией и гипоксией, обычно сопровождаются воспалением. Следовательно, необходимы средства и способы, которые также уменьшают воспаление.

Так, цель настоящего изобретения заключается в предоставлении средств, позволяющих эффективно лечить воспалительные состояния, предпочтительно состояния, связанные с ишемией.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому препарату наружного применения для лечения воспалительных кожных патологий, предпочтительно кожной патологии, связанной с ишемией, содержащему надосадочную жидкость физиологического раствора, получаемую при культивировании мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) или их субпопуляции в физиологическом растворе, свободном от веществ, способствующих пролиферации PBMC и активирующих PBMC, по меньшей мере в течение 1 часа.

Было обнаружено, что введение фармацевтического препарата согласно определению выше пациенту, страдающему воспалительной кожной патологией, предпочтительно кожной патологией, связанной с ишемией, приводит к облегчению соответствующих симптомов и процессу заживления.

Фармацевтический препарат по настоящему изобретению включает надосадочную жидкость культивированных PBMC или их субпопуляции. При культивировании PBMC эти клетки экспрессируют и выделяют вещества типа цитокинов, которые отличаются от веществ, экспрессируемых и выделяемых активированными PBMC. Это означает, что секретом PBMC по настоящему изобретению отличается от секретома активированных PBMC. В клетках по настоящему изобретению происходит выработка секретома, включающего вещества, не являющиеся клеточно-поверхностными. Поэтому удивительно то, что надосадочную жидкость PBMC, которые не контактировали с веществами, активирующими PBMC, такими как ФГА или липополисахариды, можно применять для лечения воспалительных кожных патологий, это показывает, что секретом этих клеток содержит вещества, поддерживающие лечение упомянутых патологий. Более конкретно, для лечения ишемических кожных патологий подходит

надосадочная жидкость.

Надосадочную жидкость PBMC по настоящему изобретению получают культивированием их в физиологическом растворе, который не содержит веществ, способствующих пролиферации PBMC и активирующих PBMC.При этом PBMC инкубируют в физиологическом растворе по меньшей мере в течение 1 часа. Это минимальное время культивирования необходимо для того, чтобы позволить PBMC выделить цитокины и другие вещества, обладающие целительными свойствами.

Часть препарата из PBMC по настоящему изобретению можно получить из цельной крови способами, известными специалистам в этой области, такими как градиент фиколла, гипотонический лизис и тому подобными. Эти способы хорошо известны специалистам.

PBMC фармацевтического препарата можно получить из пула доноров или от того же пациента, для лечения которого будет применяться этот препарат.

Физиологический раствор, из которого получают надосадочную жидкость, содержит по меньшей мере 500, предпочтительно по меньшей мере 1000, более предпочтительно по меньшей мере 105, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 106 клеток на мл раствора или на единицу дозирования.

Термин «физиологический раствор», использованный здесь, означает жидкий раствор, в котором культивируют PBMC до их применения в фармацевтическом препарате по настоящему изобретению.

Термин «физиологический раствор» также означает раствор, который не приводит к гибели PBMC в течение одного часа, предпочтительно в течение 30 мин. Если число жизнеспособных PBMC снижается в растворе на 75%, предпочтительно на 90% в течение одного часа, предпочтительно в течение 30 мин, раствор не считается «физиологическим раствором» согласно определению в данном документе. «Физиологический раствор» не приводит к спонтанному лизису PBMC при их контакте с упомянутым раствором.

В этом контексте этап «культивирования» или «выращивания в питательной среде» включает или состоит из этапа «инкубирования», этапа, во время которого клетки контактируют с раствором в течение определенного времени (по меньшей мере 1 часа, предпочтительно по меньшей мере 4 часов, более предпочтительно по меньшей мере 8 часов, наиболее предпочтительно по меньшей мере 12 часов) в условиях, которые обычно используются для культивирования PBMC.

Термин «кожная патология, связанная с ишемией», в контексте настоящего изобретения может использоваться как взаимозаменяемый с термином «ишемическая кожная патология» и означает любое состояние, болезнь или нарушение, при котором участки тела человека или животного лишены поступления кислорода в достаточном количестве, в результате чего возникает повреждение или дисфункция ткани. Патологическое состояние может характеризоваться уменьшением или прекращением притока крови в коже или в ее части, что может быть обусловлено сужением или закупоркой кровеносного сосуда. Такие патологии здесь собирательно называют термином «ишемия» или «кожной патологией, связанной с ишемией». Например, при болезнях сердца, термин ишемия зачастую используют для описания сердечной мышцы, которая не получает достаточного количества обогащенной кислородом крови по причине сужения или закупорки коронарных артерий. Симптомы ишемии зависят от органа, который является «ишемическим». В случае с сердцем ишемия зачастую приводит к стенокардии. В случае с мозгом ишемия может привести к инсульту. Состояния ишемии сопровождаются воспалением.

Неограничивающие примеры кожных патологий, связанных с воспалением, в

частности с ишемией, включают раны, хронические раны, диабетические раны, наружные кожные язвы, псориаз и тому подобное.

Невзирая на вышесказанное, патологическое состояние в контексте изобретения может характеризоваться повреждением или дисфункцией эндотелиальных клеток, то есть раной. Неограничивающими примерами ран, которые можно лечить применением препарата по настоящему изобретению, являются хронические раны, диабетические раны, язвы, ожоги, воспалительные кожные заболевания и болезни кишечника.

Используемый здесь «физиологический раствор» предпочтительно является раствором, проявляющим осмотическое давление, которое не приводит к разрушению PBMC или их субпопуляций, и его можно напрямую вводить пациенту.

Термин «свободный от веществ, способствующих пролиферации PBMC и активирующих PBMC», означает физиологический раствор, который не содержит веществ, активирующих PBMC и вызывающих пролиферацию PBMC или их субпопуляций. Эти вещества включают ФГА, липополисахариды и тому подобное.

По предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения воспалительное кожное заболевание выбирают из группы, включающей воспаление, вызванное гипоксией воспаление и аутоиммунное заболевание, предпочтительно псориаз, акне, розацеа, гангренозную пиодермию, дерматит, атопическое кожное заболевание, контактный дерматит, себорейный дерматит, узловатую эритему, инфекционные болезни кожи, вызываемые бактериальной, вирусной, грибковой, паразитической инфекцией, ужалением, укусами, и крапивницу, и кожные патологии, связанные с ишемией. В частности, предпочтительными кожными патологиями являются кожные патологии, связанные с ишемией.

По предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения кожную патологию, связанную с ишемией, выбирают из группы, включающей раны, тканевую ишемию, хронические раны, диабетические раны, наружные кожные язвы, ожоги кожи, кожные лоскуты в пластической хирургии и регенерацию тканей после стоматологической имплантации.

Субпопуляцией мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) предпочтительно являются Т-клетки, В-клетки или NK-клетки. Очевидно, можно также применять сочетания этих клеток: Т-клетки и В-клетки; Т-клетки и NK-клетки; В-клетки и NK-клетки; Т-клетки, В-клетки и NK-клетки. Способы получения и выделения упомянутых клеток известны.

Неожиданно обнаружилось, что PBMC по настоящему изобретению можно культивировать в любом типе раствора при условии, что упомянутый раствор не содержит веществ, которые фармацевтически неприемлемы, приводят к немедленной гибели PBMC (согласно описанию выше), активируют PBMC и стимулируют пролиферацию PBMC. Поэтому раствор, который будет использоваться, по меньшей мере должен проявлять осмотические свойства, не приводящие к лизису PBMC.Физиологическим раствором предпочтительно является физиологический раствор соли, предпочтительно физиологический раствор NaCl, цельная кровь, фракция крови, предпочтительно сыворотка, или среда для культуры клеток.

Среду для культуры клеток предпочтительно выбирают из группы, включающей среду RPMI, среду Игла, модифицированную по способу Дульбекко (DMEM), среду X-vivo и среду Ultraculture.

По предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения клетки по настоящему изобретению культивируют в условиях, вызывающих стресс.

Используемый здесь термин «в условиях, вызывающих стресс», означает условия

культивирования, приводящие к тому, что клетки оказываются в состоянии стресса. Условия, вызывающие стресс у клеток, помимо прочих включают нагрев, химикаты, облучение, гипоксию, осмотическое давление и тому подобное.

Дополнительный стресс у клеток по настоящему изобретению приводит к дальнейшему увеличению экспрессии и секреции веществ, целительных при лечении воспалительных кожных патологий, в частности кожных патологий, связанных с ишемией.

По предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения условия, вызывающие стресс, включают гипоксию, озон, нагрев (например, более, чем на 2°C, предпочтительно более чем на 5°C, более предпочтительно более чем на 10°C, выше оптимальной температуры культивации PBMC, более конкретно, 37°C), облучение (например, УФ-облучение, гамма-облучение), химикаты, осмотическое давление (например, осмотические условия, которые по меньшей мере на 10% превышают осмотические условия, обычно имеющие место в биологической жидкости, более конкретно, в крови) или их комбинацию.

Если для создания стресса у PBMC по настоящему изобретению используется облучение, клетки предпочтительно облучают дозой по меньшей мере 10 Гр, более предпочтительно по меньшей мере 20 Гр, наиболее предпочтительно по меньшей мере 40 Гр, при этом в качестве источника Cs-137 предпочтительно применяют цезий.

По предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения неактивированные PBMC или их субпопуляцию культивируют в среде по меньшей мере в течение 4 часов, предпочтительно по меньшей мере в течение 6 часов, наиболее предпочтительно по меньшей мере в течение 12 часов.

Фармацевтический препарат по настоящему изобретению предназначен для наружного применения. Следовательно, упомянутый препарат предпочтительно имеет форму геля, предпочтительно гидрогеля, мази, кожного пластыря, фармацевтически приемлемой матрицы, предпочтительно на матрице из коллагена/эластина (см., например, Haslik W et al. J Plast Reconst Aesth Surg (2008): "Management of full-thickness skin defects in the hand and wrist region: first long-term experiences with the dermal matrix Matriderm" («Лечение дефектов всей толщи кожи в зоне кисти и запястья: первый долговременный опыт применения кожной матрицы Matriderm»)), пасты, крема, порошка, линимента или лосьона.

Фармацевтический препарат по настоящему изобретению может содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как растворители, стабилизаторы, носители и тому подобное. В зависимости от лекарственной формы препарат по настоящему изобретению содержит соответствующие ингредиенты. Способы приготовления препарата хорошо известны специалистам в этой области.

Для увеличения срока хранения препарата по настоящему изобретению раствор a) или надосадочную жидкость b) лиофилизируют. Способы лиофилизации таких препаратов хорошо известны специалистам в этой области.

Перед использованием лиофилизированный препарат можно ввести в контакт с водой или с водным раствором, содержащим буферы, стабилизаторы, соли и тому подобное.

Другой аспект настоящего изобретения касается применения препарата согласно определению выше для изготовления лекарственного средства для лечения воспалительных кожных патологий, более конкретно кожной патологии, связанной с ишемией.

Еще один аспект настоящего изобретения касается способа приготовления

фармацевтического препарата наружного применения, раскрываемого в настоящем документе, включающего этапы:

a) получения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) или их субпопуляции,

b) культивирования клеток, полученных на этапе a), в физиологическом растворе, свободном от веществ, способствующих пролиферации PBMC и активирующих PBMC по меньшей мере в течение 1 часа,

c) отделения надосадочной жидкости, полученной на этапе b), и

d) приготовления фармацевтического препарата с использованием надосадочной жидкости, полученной на этапе c).

Препарат по настоящему изобретению можно получить инкубированием или культивированием PBMC в физиологическом растворе по меньшей мере в течение 1 часа, предпочтительно по меньшей мере в течение 4 часов, более предпочтительно по меньшей мере в течение 8 часов, наиболее предпочтительно по меньшей мере в течение 12 час. Во время этого этапа PMBC начинают синтезировать и выделять вещества, полезные при лечении воспалительных состояний. До, после и в течение этапа культивирования клетки не активируют добавлением веществ, активирующих PBMC, таких как ФГА или липополисахариды. После этапа культивирования клетки и/или надосадочную жидкость культуры отделяют для последующего использования при приготовлении окончательного фармацевтического препарата. В соответствии с обсуждением выше фармацевтический препарат может содержать культивированные PBMC, надосадочную жидкость культуры, в которой инкубировали упомянутые клетки или одновременно культивированные PBMC и культуральную среду.

По предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения клетки подвергают воздействию условий, вызывающих стресс, до или во время этапа b), причем упомянутые условия, вызывающие стресс, включают гипоксию, озон, нагрев, облучение, химикаты, осмотическое давление (например, вызванное добавлением соли, в частности, NaCl, для создания более высокого осмотического давления, чем осмотическое давление крови), сдвиг pH (например, изменение pH добавлением кислот или гидроокисей для придания pH значения в диапазоне от 6,5 до 7,2 или от 7,5 до 8,0) или их комбинацию.

По предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения клетки облучают до или в течение этапа b) дозой по меньшей мере 10 Гр, предпочтительно по меньшей мере 20 Гр, более предпочтительно по меньшей мере 40 Гр, озоном, повышенной температурой или УФ-облучением.

Еще один аспект настоящего изобретения касается препарата, получаемого способом, описанным выше.

Еще один аспект настоящего изобретения касается способа лечение воспалительных кожных патологий, более конкретно, кожных патологий, связанных с ишемией, введением нуждающемуся в нем пациенту соответствующего количества фармацевтического препарата по настоящему изобретению.

Ниже настоящее изобретение будет проиллюстрировано следующими фигурами и примерами, но не будет ограничиваться ими.

На фигуре 1 показано влияние надосадочной жидкости (SN), происходящей из культуры мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) на миграцию клеток у первичных кератиноцитов человека (KC) и фибробластов кожи (FB).

KC и FB были выращены, соответственно, в среде для роста KC и среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки). После достижения конфлюентности монослой клеток соскребали кончиком

пипетки и затем культивировали с SN, происходящей от PBMC, в течение 16 часов. Мы смогли выявить лишь небольшой эффект SN, происходящей от живых PBMC (LL) на KC, тогда как SN, происходящая от апоптотических PBMC (APO), в значительной степени стимулировала миграцию KC. Напротив, обе SN (LL и APO) в значительной степени стимулировали миграцию клеток у фибробластов кожи FB.

На фигуре 2 показано влияние SN, происходящей от PBMC на ход клеточного цикла KC и FB.

Пролиферирующие KC и FB культивировали в SN, происходящей от PBMC. После 24 часов клетки инкубировали с 5-бромдезоксиуридином в течение 2 часов и затем обработали согласно указаниям в инструкции по применению (набор для флуоресцентной сортировки клеток в зависимости от стадии цикла с помощью 5-бромдезоксиуридина в проточной кювете, BD Biosciences). Как показано на фигуре 2, стимулирование FB с использованием SN, происходящей от PBMC, приводило к сокращению пролиферирующей популяции клеток, сопровождающемуся увеличением числа клеток в фазе G2/M. Напротив, было обнаружено значительное увеличение числа пролиферирующих KC при применении обеих SN: LL и APO. Однако эффект от SN, происходящей от апоптотических клеток, был менее выражен в случае с KC.

На фигуре 3 показано, что SN, происходящая от PBMC, заметно усиливает заживление раны in vivo.

Кремы, содержащие SN, происходящую либо от LL (фиг.3a, b), либо от APO (фиг.3b) PBMC, наносили на раны от пункционной биопсии размером 6 мм на спине мышей B6/129 сразу после нанесения раны. Через 8 дней после нанесения раны мышей забивали и проводили анализ ран окрашиванием гематоксилином-эозином. Как показано на фигурах 3a и 3b обе SN значительно ускоряли заживление ран как в дермальных, так и в эпидермальных слоях кожи.

На фигуре 4 показано, что SN, происходящая от PBMC, заметно усиливает заживление раны in vivo.

Измеряли размер раны в течение первых 5 дней после нанесения раны, пока не сформировалась корочка. Как показано на фигуре 4, было обнаружено, что закрытие раны после обработки кремами, содержащими надосадочную жидкость, происходящую от PBMC, происходило гораздо быстрее по сравнению только с одним кремом в течение всех 5 дней. Тогда как размер раны несколько увеличивался в течение первых 2 дней при обработке только кремом, раны, обработанные надосадочной жидкостью, происходящей от PBMC, начинали затягиваться в течение первых 24 часов после нанесения ран и обработки кремом.

На фигуре 5 показано усиление ангиогенеза в ранах мышей in vivo после обработки SN, происходящей от PBMC.

Иммуногистохимическим исследованием фактора VIII (фиг.5a) и CD31 (фиг.5b), которые оба являются маркерами кровеносных сосудов, было обнаружено массивное увеличение CD31-положительных клеток в ранах, обработанных SN, по сравнению с контролем, указывающее на усиление ангиогенеза, что могло способствовать ускорению заживления ран. Напротив, увеличения числа пролиферирующих клеток в этот момент времени согласно анализу окрашиванием Ki67 обнаружено не было (фиг.5a).

На фигуре 6a показано, что ни нестимулированные жизнеспособные PBMC, ни IA-PBMC не выделяют основной происходящий от моноцитов провоспалительный цитокин TNF-α. (Значимость обозначена следующим образом: * p=0,05, ** p=0,001; n=8).

На фигуре 6b показана сильная индукция секреции провоспалительного интерферона-γ после активации по сравнению с нестимулированными PBMC. (Значимость обозначена

следующим образом: * p=0,05, ** p=0,001; n=8).

На фигуре 7a показаны сводные результаты проточно-цитометрического анализа. Были определены PBMC, дающие сигнал выше порогового значения для Т-клеток, и была оценена экспрессия маркеров активации CD69 и CD25. (Значимость обозначена следующим образом: * p=0,05, ** p=0,001; n =4).

На фигуре 7b показан репрезентативный анализ результатов флуоресцентной сортировки активированных PBMC (либо ФГА, либо CD3 mAb). Дискриминационное окно показывает % положительных клеток.

На фигуре 8 показана высокая скорость пролиферации по результатам измерений включения 3[H]-тимидина стимулированных PBMC по сравнению с жизнеспособными PBMC, культивированными в растворе RPMI без стимуляции.

На фигуре 9 показано ингибирование ответа Т-клеток секретома PBMC при анализе пролиферации Т-клеток.

На фигуре 10 показаны результаты экспериментов по стимуляции анти-CD3 и ФГА, проведенных с PBMC.

На фигуре 11 показана пролиферация PBMC при стимуляции анти-CD3, ФГА и смешанными лимфоцитами.

На фигуре 12 показан уровень аннексина V и PI-позитивность надосадочной жидкости CD4+ клеток, инкубированных с надосадочной жидкостью PBMC.

На фигуре 13 показано ингибирование позитивной регуляции CD25 и CD69 в CD4+ клетках надосадочной жидкостью PBMC.

На фигуре 14 показано, что обработка анти-IL-10 и TGF-β агентами не приводит к увеличению скорости пролиферации CD4+ клеток.

Примеры

Пример 1. Надосадочная жидкость культуры мононуклеарных клеток периферической крови заметно ускоряет заживление ран.

Незаживающие кожные язвы зачастую не поддаются общепринятому лечению. При предварительных исследованиях было обнаружено, что применение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) вместе с основным фактором роста фибробластов, по-видимому, является полезным лечением диабетической гангрены. В настоящем примере исследовали, будет ли надосадочная жидкость культуры PBMC (облученных или необлученных) достаточной для стимулирования ускоренного заживления ран на модели мышей. Кроме того, было проанализировано воздействие этой надосадочной жидкости на первичные фибробласты кожи (FB), кератиноциты (KC) и эндотелиальные клетки (EC) человека.

Инкубированием FB и KC с надосадочной жидкостью, происходящей от PBMC, было обнаружено, что надосадочная жидкость как необлученных, так и облученных клеток в значительной степени стимулировала миграцию FB, при том, что она не оказывала влияния на пролиферацию FB. Напротив, было показано, что обе надосадочные жидкости влияли на KC в плане их способности к миграции и пролиферации. Однако эффект надосадочной жидкости, происходящей от облученных клеток, был более выраженным. Поскольку надосадочная жидкость, происходящая от PBMC, стимулировала механизмы миграции и пролиферации in vitro, было проведено дальнейшее изучение того, способны ли эти надосадочные жидкости также стимулировать заживление ран in vivo. Поэтому были приготовлены кремы, содержащие происходящую от PBMC надосадочную жидкость, и наносили их на раны от пункционной биопсии размером 6 мм на спине мышей B6/129 сразу после нанесения раны. Измеряли размер раны в течение следующих 4-5 дней, пока не сформировалась

корочка. Удивительным образом было обнаружено, что закрытие раны после обработки кремами, содержащими надосадочную жидкость, происходящую от PBMC, происходило гораздо быстрее по сравнению только с одним кремом в течение всех 5 дней. Примечательно, что тогда как размер раны несколько увеличивался в течение первых 2 дней при обработке только кремом, раны, обработанные надосадочной жидкостью, происходящей от PBMC, начинали затягиваться в течение первых 24 часов после нанесения ран и обработки кремом. Через 8-10 дней после нанесения раны мышей забивали и проводили анализ ран окрашиванием гематоксилином-эозином и иммуногистохимическим исследованием CD31, который является маркером кровеносных сосудов. Окрашивание гематоксилином-эозином выявило, что заживление ран как в дермальных, так и в эпидермальных слоях кожи значительно ускорялось в присутствии кремов с происходящей от PBMC надосадочной жидкостью. Кроме того, отмечалось массивное увеличение CD31-положительных клеток в этих ранах, указывающее на усиление ангиогенеза, что могло способствовать ускорению заживления ран.

Таким образом, было показано, что происходящая от PBMC надосадочная жидкость приводила к ускорению заживления ран у мышей in vivo, и что эти надосадочные жидкости также стимулировали пролиферацию и миграцию у клеток человека in vitro. Лекарственная форма кремов, содержащих происходящую от PBMC надосадочную жидкость, может обладать большими преимуществами при лечении незаживающих наружных язв кожи (см. фиг.1-5).

Пример 2. Мононуклеауные клетки периферической крови (PBMC) в покое демонстрируют невысокий уровень маркеров активации и сниженную выработку воспалительного иитокина.

Активированные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и их надосадочная жидкость (SN) предположительно благоприятно влияют на регенерацию ран (Holzinger C et al. Eur J Vase Surg. 1994 May; 8(3): 351-6). В примерах 1 и 2 могло быть показано, что неактивированные PBMC и происходящая от них SN оказывают благоприятное воздействие при экспериментальном остром инфаркте миокарда (AMI) и на модели ран. Поскольку отсутствие активации PBMC надо было проверить экспериментально, было проведено исследование того, приводит ли культивирование PBMC к увеличению количества маркеров активации Т-клеток (CD69, CD25) или увеличению секреции воспалительного цитокина (активация моноцитов=TNFα, активация Т-клеток=INFγ). В контрольном эксперименте культивируемые Т-клетки включали стимуляцией CD3 mAb или фитогемагглютинином (ФГА).[

Методы и результаты

У здоровых волонтеров отбирали венозную кровь в пробирки с ЭДТА. После разделения в градиенте плотности Фиколла-Гипака PBMC собирали и разделяли на жизнеспособные и облученные апоптотические клетки (IA-PBMC). Для получения апоптотических клеток PBMC облучали дозой 60 Гр (цезий-137). Для проточного цитометрического анализа 500.000 PBMC культивировали в 200 мкл среды, свободной от сыворотки. Клетки стимулировали ФГА (7 мкг/мл) или CD3-mAb (10 мкг/мл) или оставляли нестимулированными. После 24 часов инкубации клетки промывали, окрашивали для выявления CD3, CD69 и CD25 (R&D System) и оценивали на предмет маркеров поверхностной активации с помощью FC500 (Coulter). Для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) PBMC культивировали в течение ночи при плотности $2,5\times10^6$ клеток/мл при стимуляции ФГА или CD3 или без стимуляции. После 24 часов надосадочную жидкость отбирали и замораживали при -20°C. Были приобретены выпускаемые в продажу наборы для иммуноферментного анализа (ELISA)

для TNF-α (R&D) и INF-γ (Bender). Коротко говоря, пластины MaxiSorp покрывали антителами к TNF-α и INF-γ выдерживали в течение ночи. Через 24 часа пластины промывали, и в каждую лунку вносили пробы в двух повторностях. После инкубирования и добавления идентифицирующего антитела и стрептавидина-HRP, в каждую лунку был добавлен субстрат ТМБ. После развития цвета ферментную реакцию останавливали добавлением серной кислоты. Показатели оптической плотности считывали по спектрофотометру для прочтения планшетов Wallac Victor3.

Результаты.

Флуоресцентная сортировка клеток: Т-клетки, стимулированные CD3 и ФГА демонстрировали позитивную регуляцию маркеров активации CD69 и CD25 после 24 часов инкубации. Нестимулированные и апоптотические клетки экспрессировали лишь небольшое количество CD69 и CD25 (фиг.6a (репрезентативная проба, фиг.6b, гистограмма, n=4). Статистическая значимость обозначена звездочкой (xx $p<0,001$, x $p<0,05$). Иммуноферментный анализ: Тогда как в происходящей от нестимулированных PBMC надосадочной жидкости не были обнаружены ни TNF-α, ни INF-γ, в надосадочной жидкости от PBMC, стимулированных ФГА или CD3, обнаружен высокий уровень этих цитокинов согласно результатам иммуноферментного анализа (звездочка ** $p<0,001$, * $p<0,05$, n=8). Эти результаты явно указывают на иную модель секреции воспалительных цитокинов по сравнению с нестимулированными PBMC.

Заключение.

Эти данные указывают на то, что «нестимулированные PBMC» проявляли отчетливо иной фенотип (маркер активации, секреция цитокинов) по сравнению со стимулированными PBMC (ФГА и CD3 mAb).

На фигуре 6a показано, что ни нестимулированные жизнеспособные PBMC, ни IA-PBMC не выделяют основной происходящий от моноцитов провоспалительный цитокин TNF-α. (Значимость обозначена следующим образом: * $p=0,05$, ** $p=0,001$; n=8).

На фигуре 6b продемонстрирована сильная индукция секреции провоспалительного интерферона-γ после активации по сравнению с нестимулированными PBMC. (Значимость обозначена следующим образом: * $p=0,05$, ** $p=0,001$; n=8).

На фигуре 7a показаны сводные результаты проточно-цитометрического анализа. Были определены PBMC, дающие сигнал выше порогового значения для Т-клеток, и была оценена экспрессия маркеров активации CD69 и CD25. (Значимость обозначена следующим образом: * $p=0,05$, ** $p=0,001$; n=4).

На фигуре 7b показан репрезентативный анализ результатов флуоресцентной сортировки активированных PBMC (либо ФГА, либо CD3 mAb). Дискриминационное окно показывает % положительных клеток.

Пример 3. Пролиферативная активность PBMC, культивируемых в физиологическом растворе.

Цель этого примера заключалась в том, чтобы доказать, что PBMC не обладают пролиферативной активностью по результатам сравнения данных иммунного анализа, в котором используется специфическое (CD3), неспецифическое (лектин, ФГА) и аллогенное включение Т-клеток (реакция смешанной культуры лимфоцитов, СКЛ) в исследованиях с 2-дневным (CD3, ФГА) и 5-дневным (СКЛ) стимулированием.

Материалы и методы

PBMC из крови молодых здоровых волонтеров отделяли центрифугированием в градиенте плотности Фиколла и повторно суспендировали в среде RPMI (Gibco, США), содержащей 0,2% сульфата гентамицина (Сигма Кемикал (Sigma Chemical Co), США), 1% L-глутамина (Сигма (Sigma), США) из расчета $1*10^5$ клеток на 200 мкл. Клетки-

респондеры стимулировали МоАЬ к CD3 (10 мкг/мл, BD, Нью-Джерси, США) или ФГА (7 мкл/мл, Сигма Кемикал (Sigma Chemical Co), США) или облученными аллогенными PBMC в соотношении 1:1 (в случае СКЛ-реакции). Пластинки инкубировали в течение 48 часов или 5 дней и затем подвергали «облучению» в течение 18 часов 3[H]-тимидином (3,7*10^4 Бк/лунку; Амершам Фармация Биотех (Amersham Pharmacia Biotech), Швеция).

Клетки собирали и измеряли включение 3[H]-тимидина в жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Результаты.

Стимулированные PBMC демонстрировали высокую скорость пролиферации по результатам измерения включения 3[H]-тимидина по сравнению с жизнеспособными PBMC, культивированными в среде RPMI без стимуляции (фиг.8). Этот эффект отмечался при добавлении стимуляторов, специфических для Т-клеток (ФГА, CD3), а также в исследованиях, в которых пролиферация включалась антиген-представляющими клетками (СКЛ).

Заключение.

Эта серия экспериментов указывает на то, что жизнеспособные PBMC, выдержанные в культуре в течение до 5 дней, не пролиферируют, тогда как PBMC, стимулированные различными способами, демонстрировали выраженный пролиферативный ответ. Был сделан вывод о том, что культура PBMC без стимуляции не приводит к возникновению пролиферативного ответа.

Пример 4. Секретом отделенных PBMC при хранении в условиях стерильной культуры обладает неоангиогенными свойствами.

Поскольку in vivo неоангиогенез и воспаление тесно взаимосвязаны, было исследовано, оказывают ли эти секретомы PBMC также анти-пролиферативное действие на Т-клетки и, следовательно, мешают ли они воспалительной иммунной реакции.

Материалы и методы

Секретомы были получены при инкубировании PBMC (2,5*10^6/мл) от молодых здоровых волонтеров, отделенные центрифугированием в градиенте плотности Фиколла, в течение 24 часов в среде RPMI (Джибко (Gibco), Калифорния, США), содержащей 0,2% сульфата гентамицина (Сигма Кемикал (Sigma Chemical Co), США) и 1% L-глутамина (Сигма (Sigma), США). Надосадочную жидкость отделяли от клеточной фракции и хранили при -80°C. Для исследования пролиферации аллогенные PBMC повторно суспендировали из расчета 1*10^5 клеток на 200 мкл среды RPMI после отделения. Клетки-респондеры стимулировали MoAb к CD3 (10 мкг/мл, BD, США) или ФГА (7 мкл/мл, Сигма Кемикал (Sigma Chemical Co), США). Добавляли надосадочную жидкость в различных разведениях. Пластинки инкубировали в течение 48 часов и затем подвергали «облучению» в течение 18 часов 3[H]-тимидином (3,7*10^4 Бк/лунку; Амершам Фармация Биотех (Amersham Pharmacia Biotech), Швеция). Клетки собирали и измеряли включение 3[H]-тимидина в жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Результаты.

Секретомы аллогенных PBMC продемонстрировали значительное снижение скорости пролиферации, замеренной включением [H]-тимидина при сравнении с положительным контролем (фиг.9). Этот эффект зависел от дозы и отмечался как при анти-CD3 обработке, так и при стимуляции ФГА.

Вывод.

Эта серия экспериментов косвенно указывает на то, что секретомы, полученные от жизнеспособных PBMC, выдержанных в культуре в течение 24 часов, проявляли

значительное анти-пролиферативное действие in vitro. Эти данные указывают на то, что надосадочная жидкость, происходящая от PBMC, или в лиофилизированной форме может использоваться в качестве потенциального состава терапевтического средства для лечения болезней человека, связанных с воспалением, вызванным гипоксией, или других гипервоспалительных заболеваний (например, аутоиммунных болезней, воспалительных кожных патологий).

Пример 5. Паракринные факторы, выделяемые мононуклеарными клетками периферической крови, обладают иммуносупрессивными свойствами.

В примере 1 было продемонстрировано противовоспалительное действие секретома PBMC на модели животных с острым инфарктом миокарда (AMI). В этом примере показано, что применение секретома PBMC после вызывания AMI замедляет воспалительные поражения сердечной мышцы массивной негативной регуляцией иммунного ответа.

На основании этих данных было исследовано возможное иммуносупрессивное действие секретома в экспериментах in vitro. Ключевую роль в подготовке иммунного ответа играют CD4+ клетки, поскольку они являются главными в помощи других лейкоцитов (например, макрофагов, B-клеток, цитотоксических T-клеток) в иммунологических процессах.

Материалы и методы

Получение секретома PBMC

PBMC от здоровых волонтеров отделяли центрифугированием в градиенте плотности Фиколла. Клетки повторно суспендировали в среде Ultra Culture (Лонза (Lonza), Базель, Швейцария) из расчета $1*10^6$ клеток /мл (sup liv). Для получения секретома от апоптотических PBMC апоптоз вызывали облучением дозой 60 Гр (sup APA). Клетки инкубировали в течение 24 часов в увлажненной атмосфере (5% CO_2, 37°C, относительная влажность 95%). Надосадочную жидкость собирали и проводили диализ с пределом отсечения 3,5 кДа (Спектрум Лабораториз (Spectrum laboratories), Бреда, Нидерланды) против 50 мМ раствора ацетата аммония в течение ночи при 4°C. После этого надосадочную жидкость фильтровали через стерильный фильтр и лиофилизировали. Лиофилизированные секретомы хранили при -80°C и для каждого эксперимента готовили свежую повторную суспензию. Случайно отбирали пробы секретомов для определения уровня pH.

Отделение клеток CD4+

CD4+ клетки отделяли элиминацией T клеток, не относящихся к CD4+ клеткам, с помощью системы гранул для магнитной сортировки клеток MACS (Милтений (Miltenyi), Бергиш-Гладбах, Германия). Клетки готовили заново и сразу же использовали для каждого эксперимента.

Измерение апоптоза

Апаптоз выявляли методом проточной цитометрии с использованием выпускаемого в продажу набора аннексии V/PI (BD, Нью-Джерси, США). Апоптоз определяли по положительному окрашиванию аннексином, поздний апоптоз - по PI-позитивности.

Эксперименты с пролиферацией

PBMC или очищенные CD4+ клетки разводили в Ultra Culture с добавлением 0,2% сульфата гентамицина (Сигма (Sigma), Сент-Луис, Миссури, США), 0,5% β-меркаптоэтанола (Сигма (Sigma), Сент-Луис, Миссури, США) и 1% GlutaMAX-I (Инвитроген (Invitrogen), Карлсбад, Калифорния, США) из расчета $1*10^5$/лунку в плашке на 96-лунок с круглым дном. Клетки стимулировали ФГА (7 мкг/мл, Сигма (Sigma),

США) или CD3 (10 мкг/мл, BD, Нью-Джерси, США), IL-2 (10 ед/мл, BD, США) или соотношением 1:1 аллогенных облученных (60 Гр) PBMC для СКЛ. Клетки инкубировали в течение 48 часов или 5 дней (СКЛ) с различными концентрациями секретома PBMC, IL-10 или TGF-β. Затем клетки «облучали» в течение 18 часов 3[H]-тимидином ($3,7*10^4$ Бк/лунку; Амершам Фармация Биотех (Amersham Pharmacia Biotech), Уппсала, Швеция). Клетки собирали и замеряли включение 3[H]-тимидина в жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Маркеры активации

Очищенные CD4+ клетки симулировали анти-CD3 (10 мкг/мл) и соинкубировали с секретомом PBMC в различных концентрациях. Клетки окрашивали для выявления CD69 и CD25 в соответствии со стандартной процедурой окрашивания при проточной цитометрии и анализировали с помощью проточного цитометра FC500 (Бекман Коултер (Beckman Coulter), Фуллертон, Калифорния, США).

Результаты.

В предварительных экспериментах проводили тестирование антипролиферативных свойств надосадочной жидкости PBMC жизнеспособных клеток (sup liv). В экспериментах со стимуляцией анти-CD3 и ФГА скорость пролиферации была значительно снижена при добавлении секретома (n=10).

На основании этих данных оценивали эффект секретома PBMC на компартмент клеток Т-хелперов, поскольку эти клетки играют главную роль в запуске и поддержании иммунного ответа. По аналогии с фигурой 10, CD4+ клетки высокой степени очистки теряли свою пролиферативную способность при добавлении секретома. Этот феномен наблюдали для надосадочной жидкости как живых, так и апоптотических, облученных PBMC (фиг.11, n=5).

Следующий этап заключался в определении возможного воздействия секретома на жизнеспособность клетки. Поэтому CD4+ клетки в покое инкубировали с надосадочной жидкостью и оценивали уровень аннексина V и PI-позитивность. Надосадочная жидкость как от живых, так и от апоптотических PBMC демонстрировала заметное про-апоптотическое действие (фиг.12, n=5).

Для исследования того, способны ли секретомы PBMC подавлять активацию CD4+ клеток, оценивали уровень маркеров активации Т-клеток CD25 и CD69 после стимуляции CD4+ клеток анти-СЭЗ. Позитивная регуляция обоих маркеров существенно и дозозависимо подавлялась секретомом PBMC (фиг.13, n=5).

В последней серии экспериментов изучали эффект иммуносупрессивных цитокинов IL-10 и TGF-β при добавлении нейтрализующих антител. Было установлено, что ни IL-10, ни TGF-β не отвечали за антипролиферативное воздействие наших секретомов PBMC, поскольку нейтрализация этих цитокинов не приводила к увеличению скорости пролиферации (фиг.14, n=5).

Заключение

Эти эксперименты впервые свидетельствуют о том, что секретом PBMC обладает иммуносупрессивными признаками in vitro. Было показано, что надосадочная жидкость a) снижает скорость пролиферации в экспериментах по стимуляции анти-CD3, ФГА и СКЛ, b) обладает свойствами вызывать апоптоз и подавляет активацию CD4+клеток при запуске Т-клеточного ответа.

Формула изобретения

1. Фармацевтический препарат наружного применения для лечения воспалительных кожных патологий, предпочтительно кожной патологии, связанной с ишемией,

содержащий надосадочную жидкость физиологического раствора, получаемую при культивировании по меньшей мере в течение 1 часа мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) или их субпопуляции в физиологическом растворе, свободном от веществ, способствующих пролиферации PBMC и активирующих PBMC, в условиях, вызывающих стресс у клеток.

2. Препарат по п.1, характеризующийся тем, что упомянутую патологию выбирают из группы, включающей раны, тканевую ишемию, хронические раны, диабетические раны, наружные кожные язвы, ожоги кожи, кожные лоскуты в пластической хирургии и регенерацию тканей после стоматологической имплантации.

3. Препарат по п.1 или 2, характеризующийся тем, что субпопуляция мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) представляет собой Т-клетки, В-клетки или NK-клетки.

4. Препарат по п.1 или 2, характеризующийся тем, что физиологическим раствором является физиологический раствор соли, предпочтительно физиологический раствор NaCl, цельная кровь, фракция крови, предпочтительно сыворотка, или среда для культуры клеток.

5. Препарат по п.3, характеризующийся тем, что физиологическим раствором является физиологический раствор соли, предпочтительно физиологический раствор NaCl, цельная кровь, фракция крови, предпочтительно сыворотка, или среда для культуры клеток.

6. Препарат по п.4, характеризующийся тем, что среду для культуры клеток выбирают из группы, включающей среду RPMI, среду Игла, модифицированную по способу Дульбекко (DMEM), среду X-vivo и среду Ultraculture.

7. Препарат по п.5, характеризующийся тем, что среду для культуры клеток выбирают из группы, включающей среду RPMI, среду Игла, модифицированную по способу Дульбекко (DMEM), среду X-vivo и среду Ultraculture.

8. Препарат по любому из пп.1, 2, 5, 6 или 7, характеризующийся тем, что условия, вызывающие стресс, включают гипоксию, озон, нагрев, облучение, химикаты, осмотическое давление, сдвиг pH или их комбинацию.

9. Препарат по п.3, характеризующийся тем, что условия, вызывающие стресс, включают гипоксию, озон, нагрев, облучение, химикаты, осмотическое давление, сдвиг pH или их комбинацию.

10. Препарат по п.4, характеризующийся тем, что условия, вызывающие стресс, включают гипоксию, озон, нагрев, облучение, химикаты, осмотическое давление, сдвиг pH или их комбинацию.

11. Препарат по п.8, характеризующийся тем, что условия, вызывающие стресс, включают гипоксию, озон, нагрев, облучение, химикаты, осмотическое давление, сдвиг pH или их комбинацию.

12. Препарат по п.1, характеризующийся тем, что PBMC или их субпопуляцию подвергают стрессу при культивировании дозой, по меньшей мере, 10 Гр, предпочтительно, по меньшей мере, 20 Гр, более предпочтительно, по меньшей мере, 40 Гр, озоном, повышенной температурой или УФ-облучением.

13. Препарат по п.1, характеризующийся тем, что упомянутый препарат предпочтительно имеет форму геля, предпочтительно гидрогеля, мази, кожного пластыря, фармацевтически приемлемой матрицы, предпочтительно на матрице из коллагена/эластина, пасты, крема, порошка, линимента или лосьона.

14. Препарат по п.1, характеризующийся тем, что надосадочная жидкость лиофилизирована.

15. Препарат по п.1, характеризующийся тем, что PBMC или их субпопуляцию культивируют в упомянутом растворе, по меньшей мере, в течение 4 часов, предпочтительно, по меньшей мере, в течение 6 часов, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, в течение 12 часов.

16. Применение препарата по любому из пп.1-15 для изготовления лекарственного средства для лечения воспалительных кожных патологий, предпочтительно кожной патологии, связанной с ишемией.

17. Способ приготовления фармацевтического препарата наружного применения, по любому из пп.1-15, включающий этапы:

a) получения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) или их субпопуляции,

b) культивирования по меньшей мере в течение 1 часа клеток, полученных на этапе a), в физиологическом растворе, свободном от веществ, способствующих пролиферации PBMC и активирующих PBMC,

c) отделения надосадочной жидкости, полученной на этапе b), и

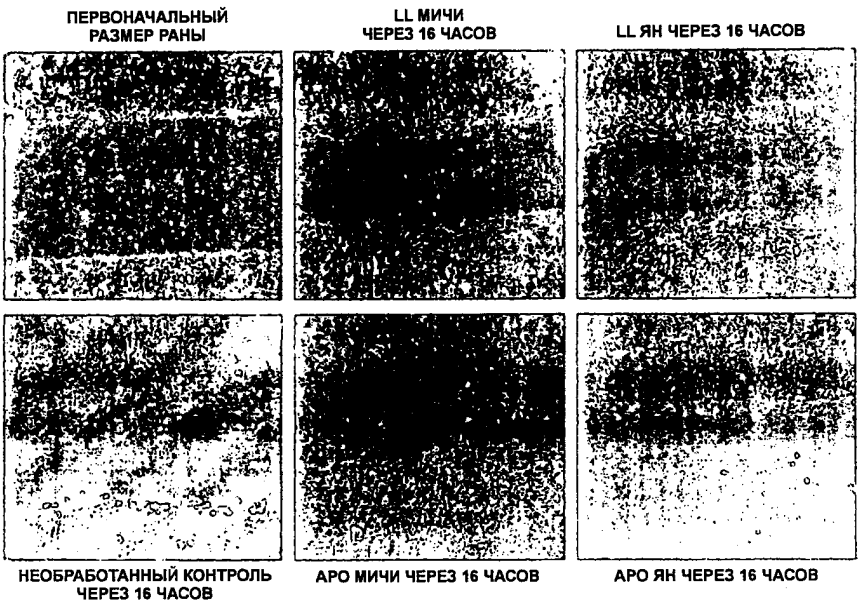
d) приготовления фармацевтического препарата с использованием надосадочной жидкости, полученной на этапе c).

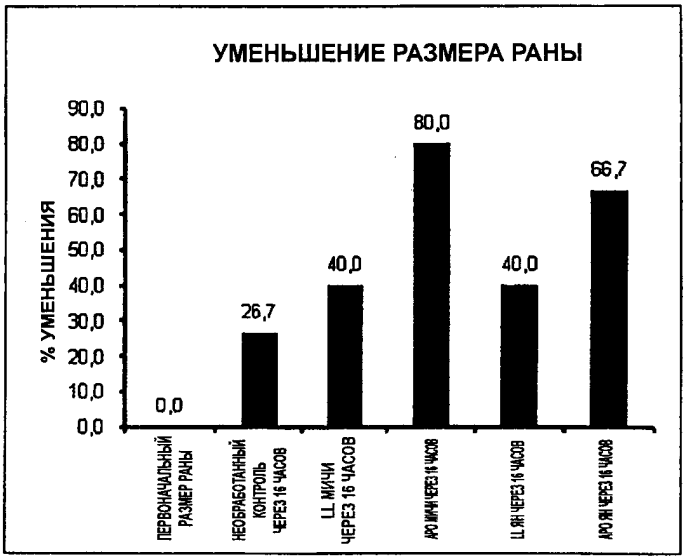
18. Способ по п.17, характеризующийся тем, что клетки подвергают воздействию условий, вызывающих стресс, до или во время этапа b), причем упомянутые условия, вызывающие стресс, включают гипоксию, озон, нагрев, облучение, химикаты, осмотическое давление, сдвиг pH или их комбинацию.

19. Способ по п.17 или 18, характеризующийся тем, что клетки облучают до или в течение этапа b) дозой по меньшей мере 10 Гр, предпочтительно по меньшей мере 20 Гр, более предпочтительно по меньшей мере 40 Гр, озоном, повышенной температурой или УФ-облучением.

20. Препарат для лечения воспалительных кожных патологий, получаемый способом по любому из пп.17 или 18.

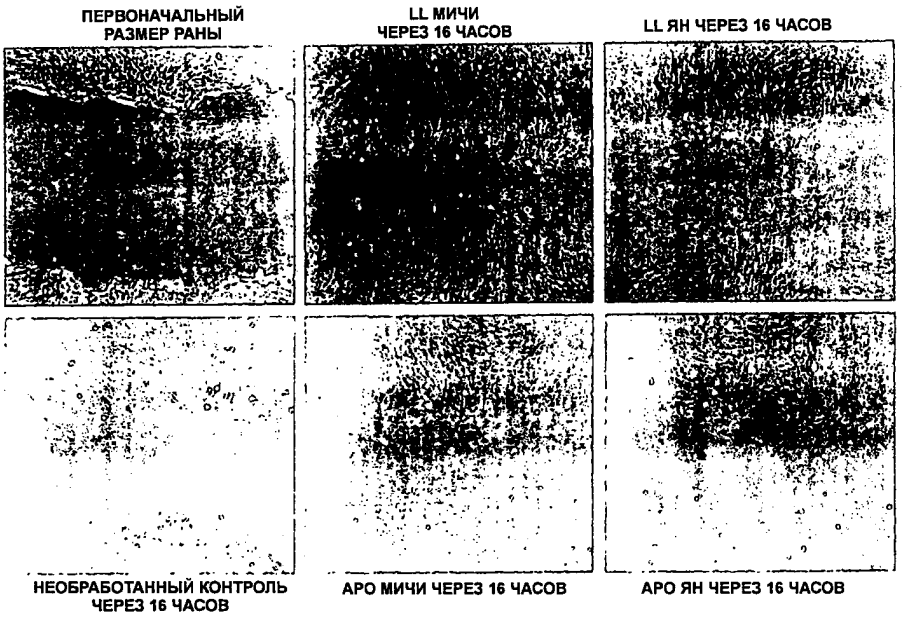
КЕРАТИНОЦИДЫ

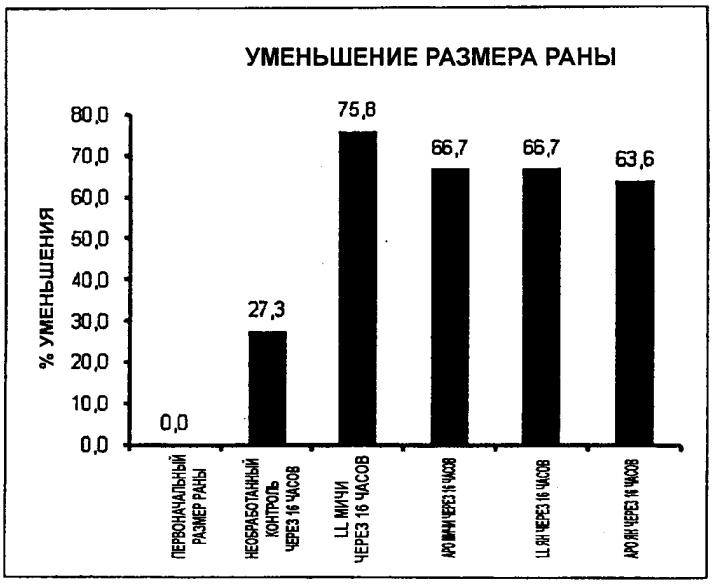




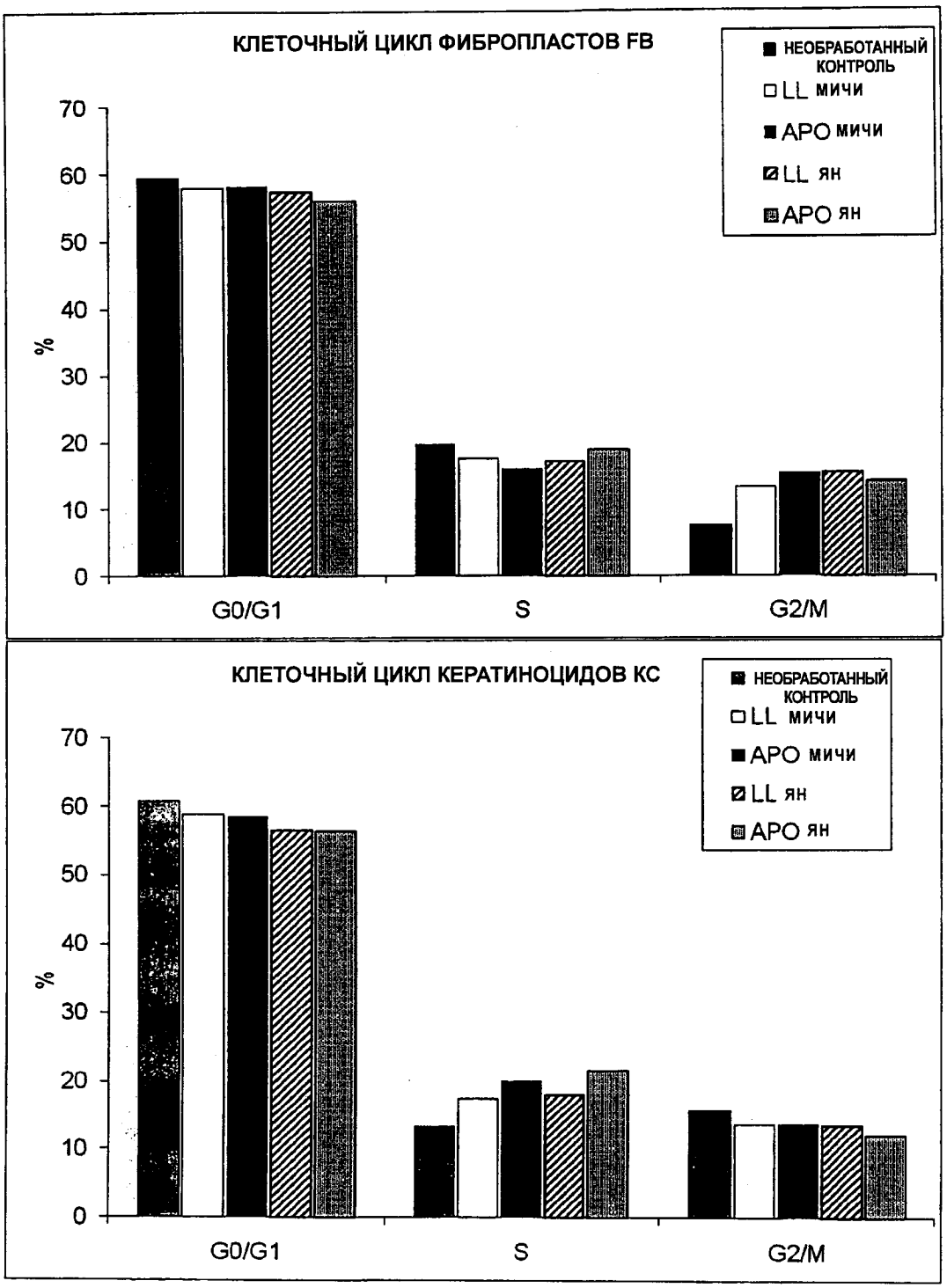
Фиг. 1

ФИБРОПЛАСТЫ

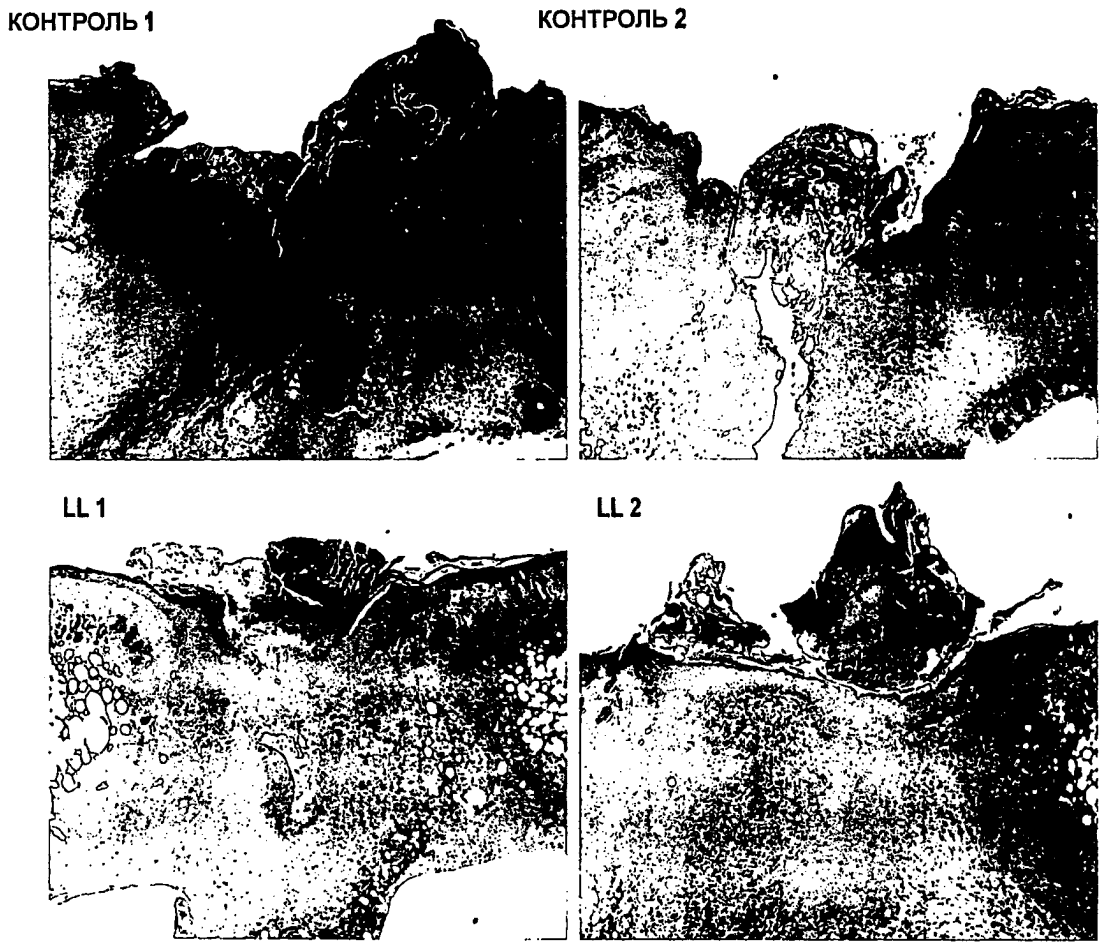




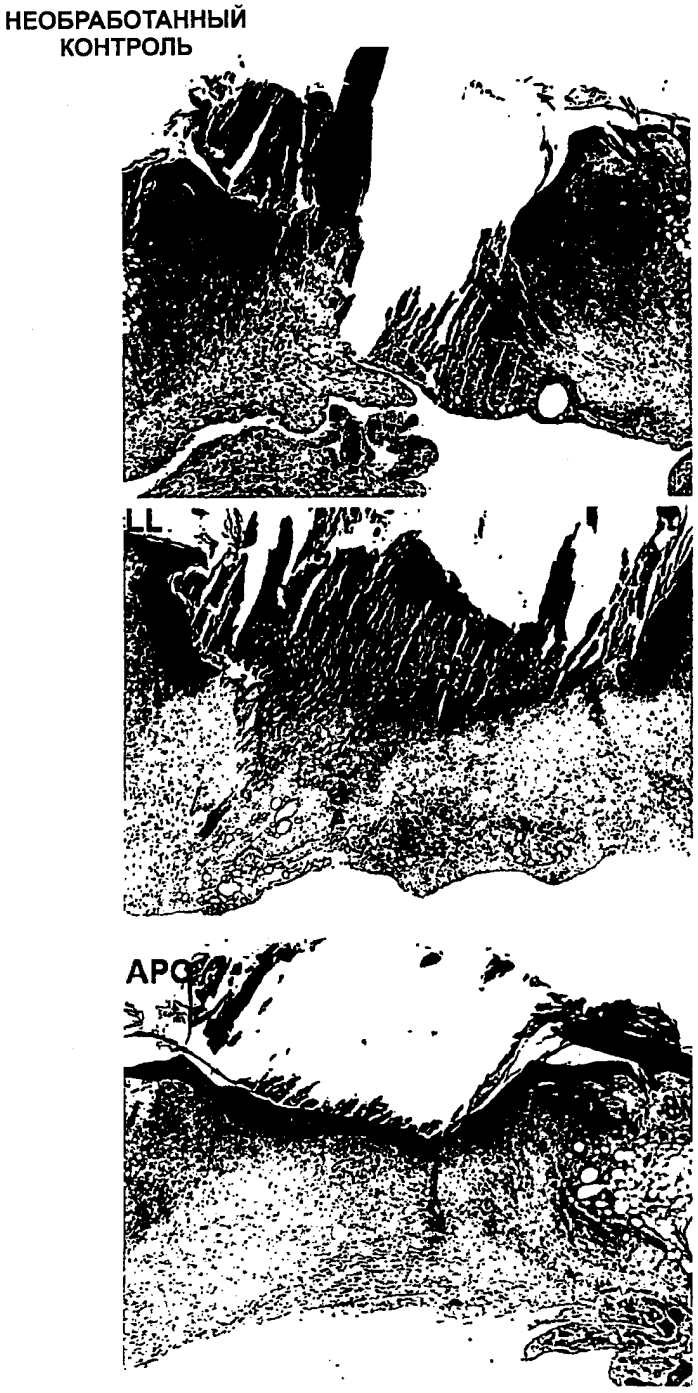
Фиг. 1 (продолжение)


КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ ФИБРОПЛАСТОВ FB
НЕОБРАБОТАННЫЙ КОНТРОЛЬ
LL мичи
APO мичи
LL ян
APO ян
%
70
60
50
40
30
20
10
0
G0/G1
S
G2/M
КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ КЕРАТИНОЦИДОВ КС
НЕОБРАБОТАННЫЙ КОНТРОЛЬ
LL мичи
APO мичи
LL ян
APO ян
%
70
60
50
40
30
20
10
0
G0/G1
S
G2/M

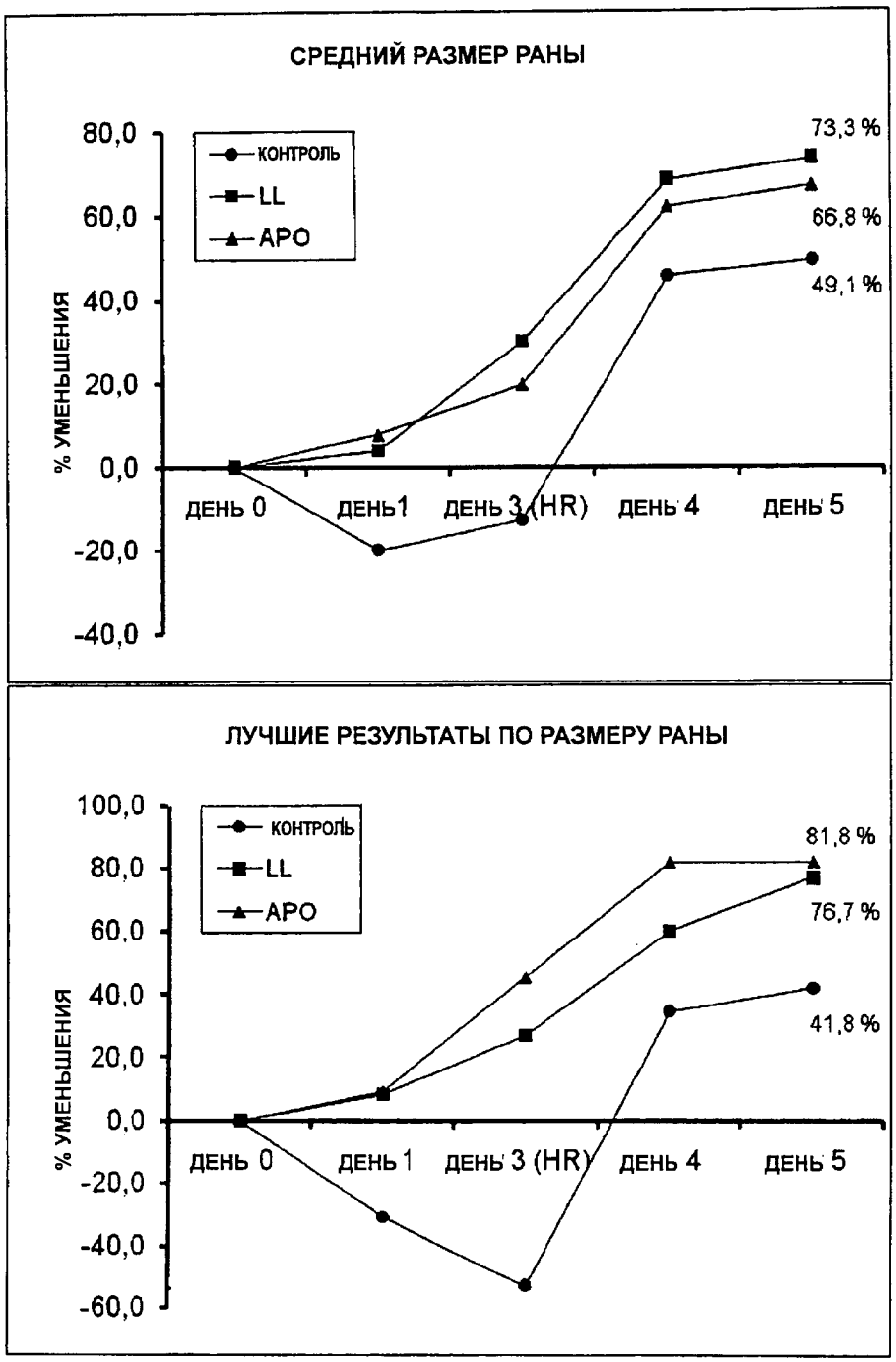
Фиг. 2



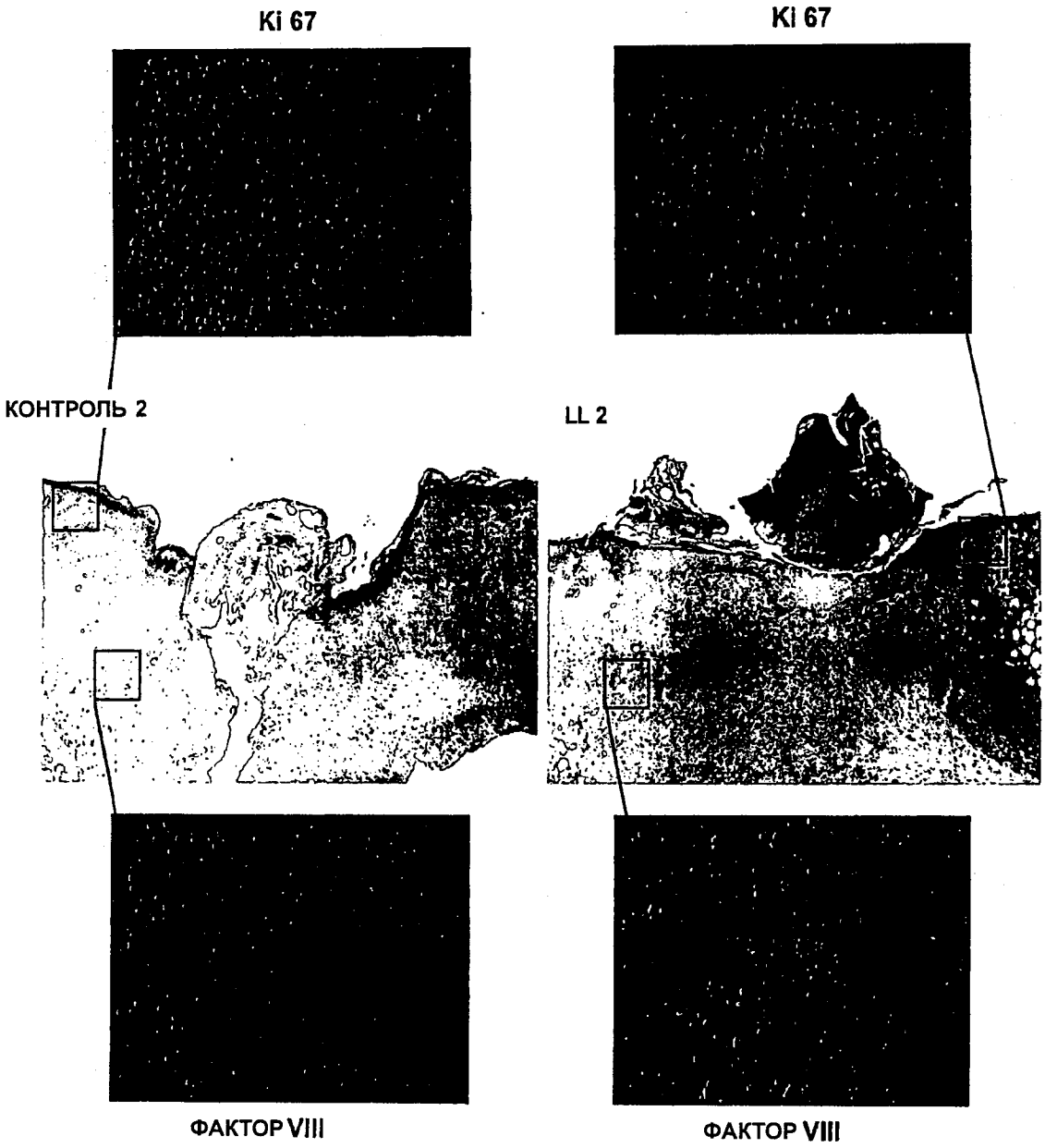
Фиг. 3а



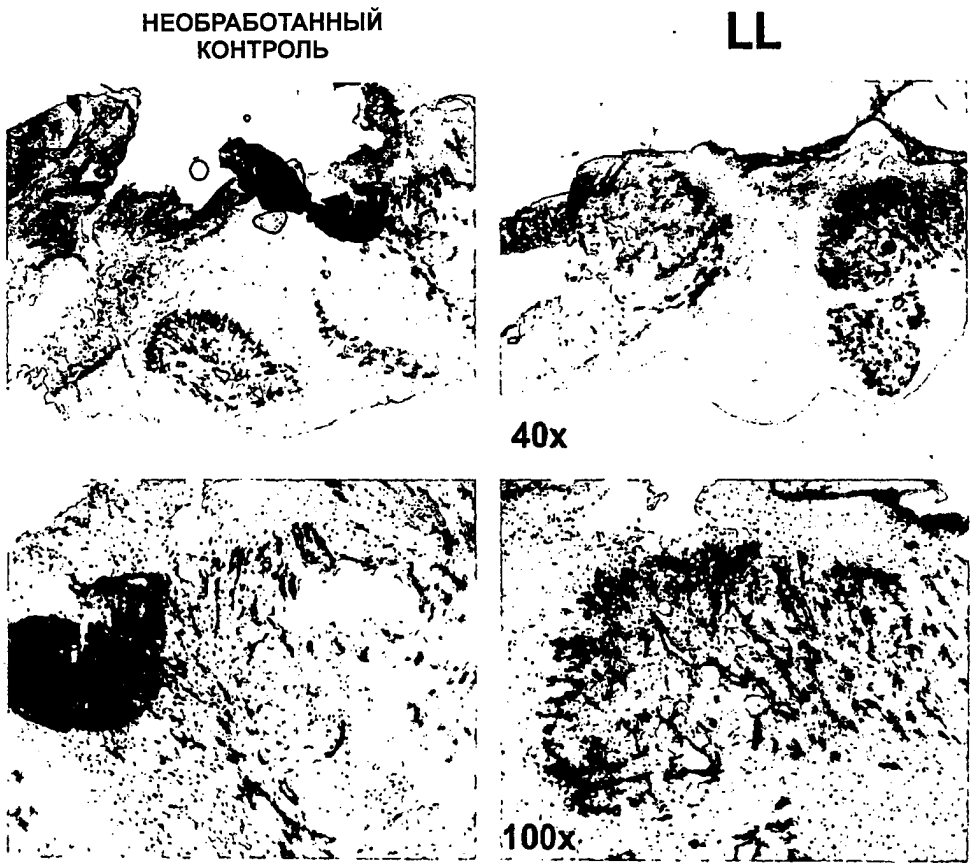
Фиг. 3b


СРЕДНИЙ РАЗМЕР РАНЫ
% УМЕНЬШЕНИЯ
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
-20,0
-40,0
КОНТРОЛЬ
LL
APO
73,3 %
66,8 %
49,1 %
ДЕНЬ 0
ДЕНЬ1
ДЕНЬ 3 (HR)
ДЕНЬ 4
ДЕНЬ 5
ЛУЧШИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПО РАЗМЕРУ РАНЫ
% УМЕНЬШЕНИЯ
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
-20,0
-40,0
-60,0
КОНТРОЛЬ
LL
APO
81,8 %
76,7 %
41,8 %
ДЕНЬ 0
ДЕНЬ 1
ДЕНЬ 3 (HR)
ДЕНЬ 4
ДЕНЬ 5

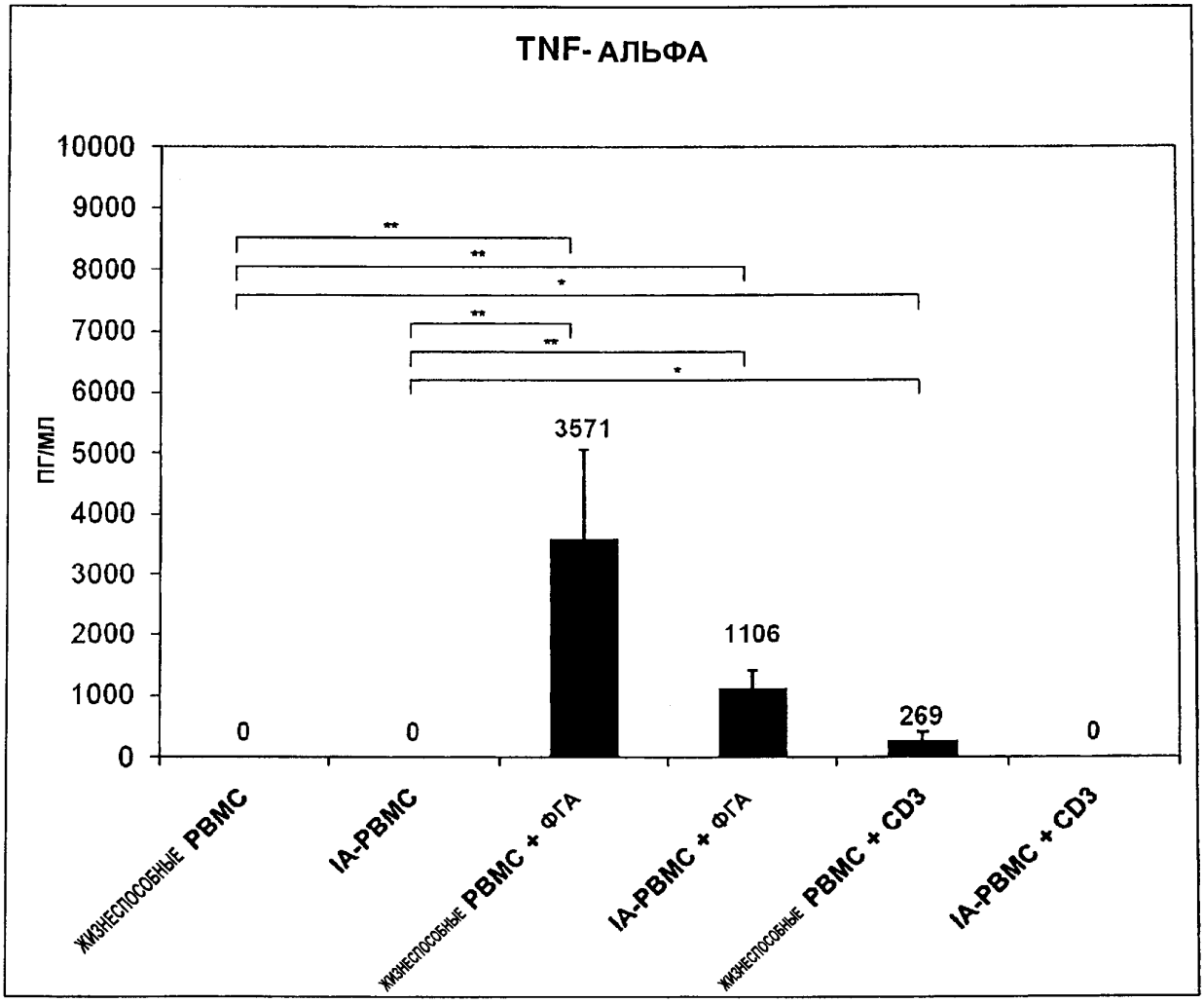
Фиг. 4



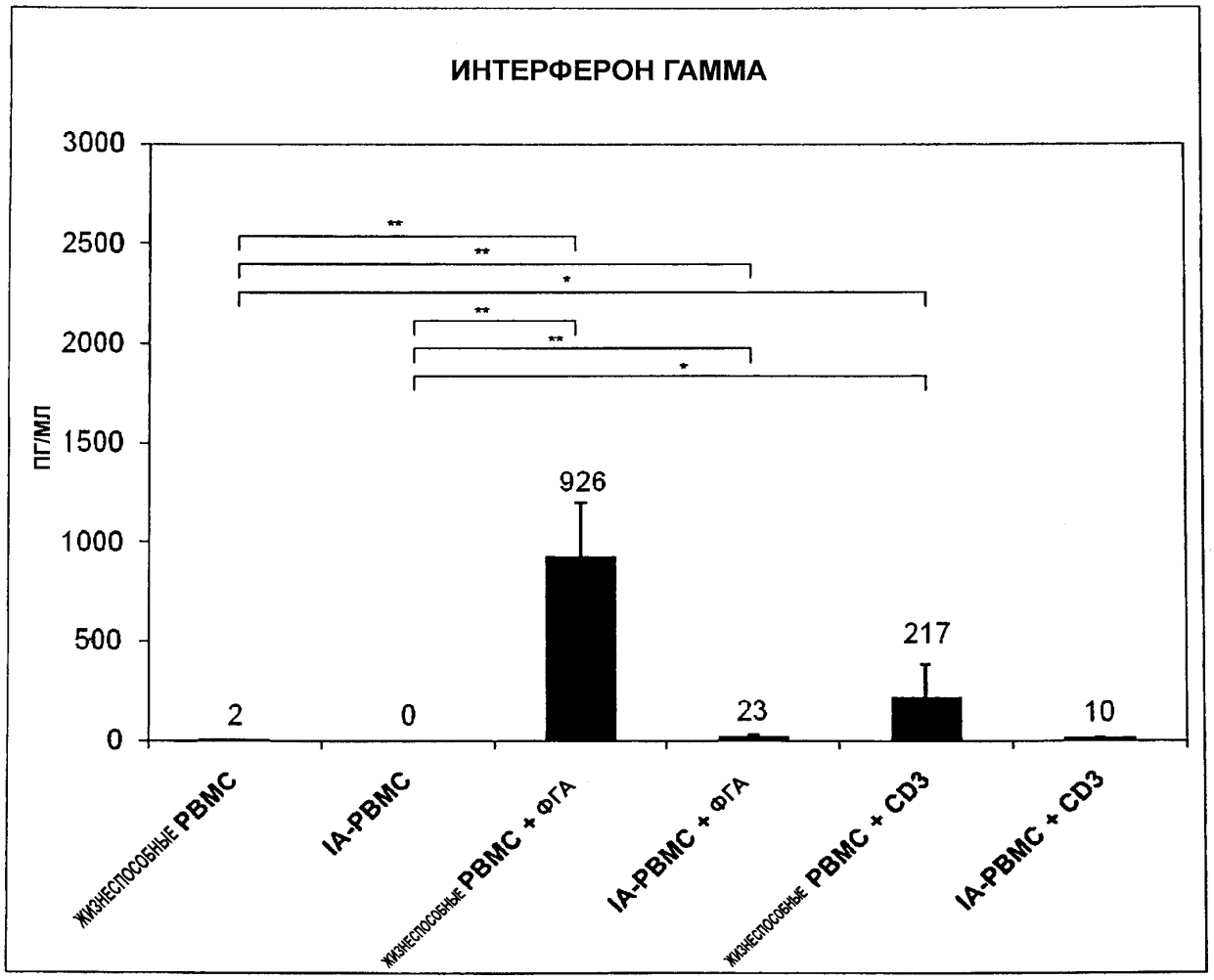
Фиг. 5а



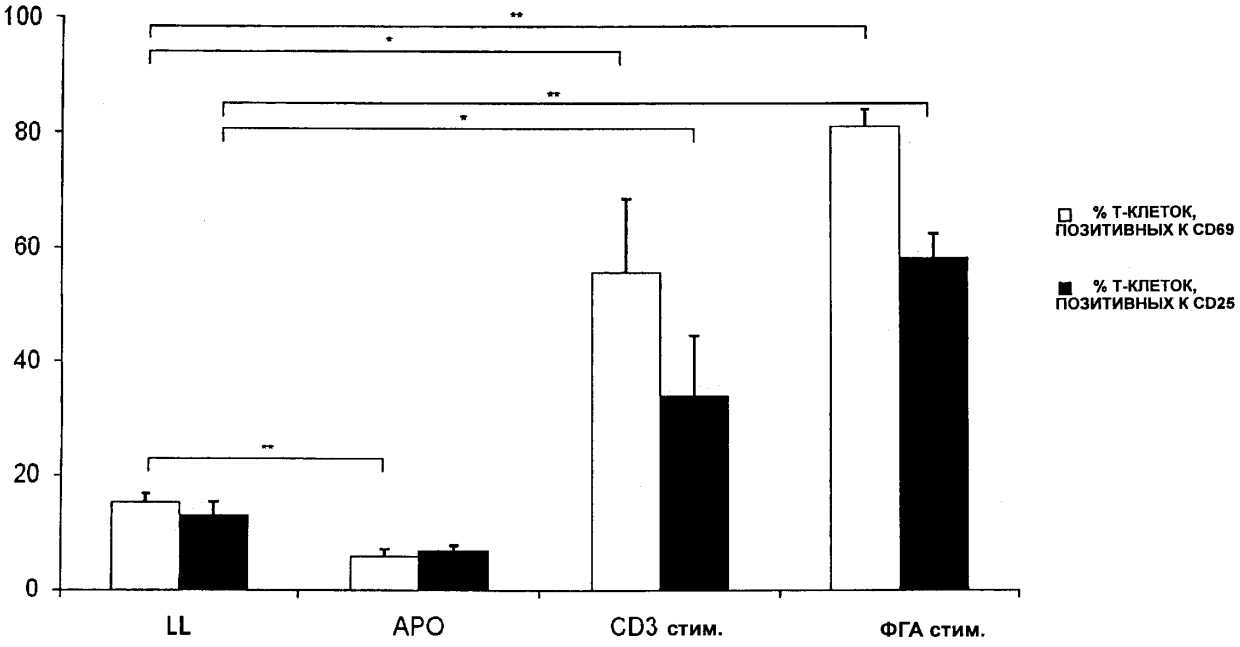
Фиг. 5b


TNF-АЛЬФА
ПГ/МЛ
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
**
**
*
**
**
*
3571
1106
269
0
0
0
ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ PBMC
IA-PBMC
ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ PBMC + ФГА
IA-PBMC + ФГА
ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ PBMC + CD3
IA-PBMC + CD3

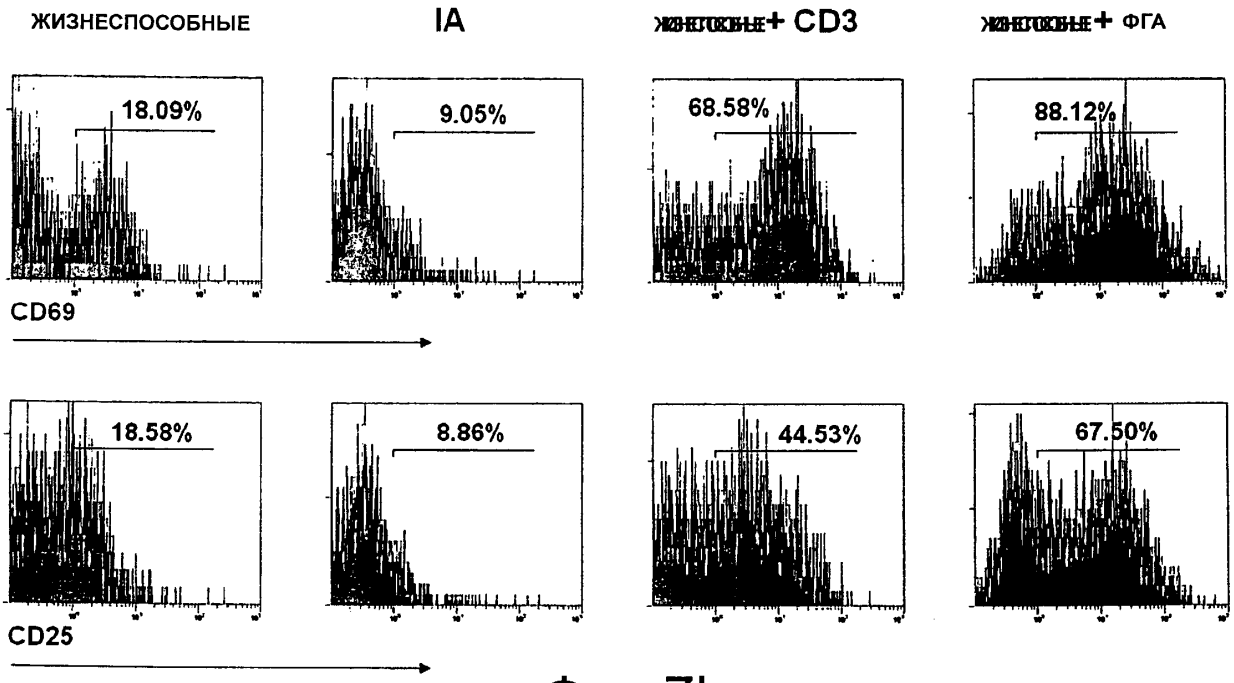
Фиг. 6а


ИНТЕРФЕРОН ГАММА
ПГ/МЛ
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
926
217
2
0
23
10
**
**
*
**
**
*
ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ PBMC
IA-PBMC
ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ PBMC + ФГА
IA-PBMC + ФГА
ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ PBMC + CD3
IA-PBMC + CD3

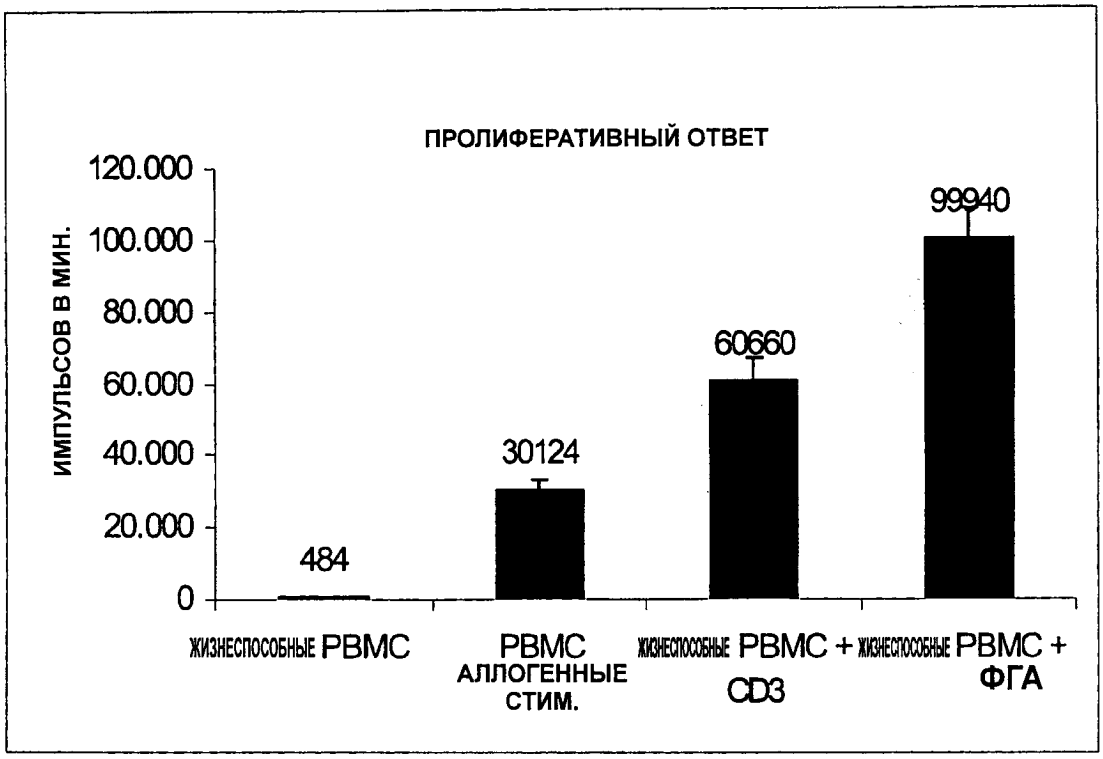
Фиг. 6b


100
80
60
40
20
0
**
*
**
*
**
LL
APO
CD3 стим.
ФГА стим.
% Т-КЛЕТОК, ПОЗИТИВНЫХ К CD69
% Т-КЛЕТОК, ПОЗИТИВНЫХ К CD25

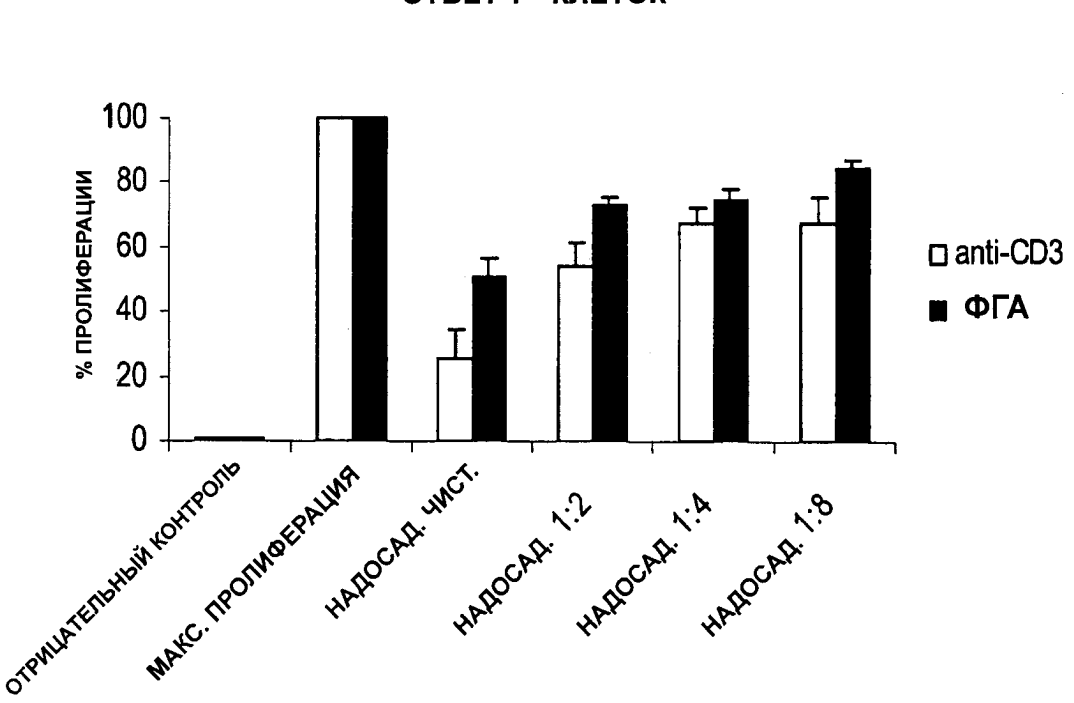
Фиг. 7a


ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ
IA
+ CD3
+ ФГА
18.09%
9.05%
68.58%
88.12%
CD69
18.58%
8.86%
44.53%
67.50%
CD25

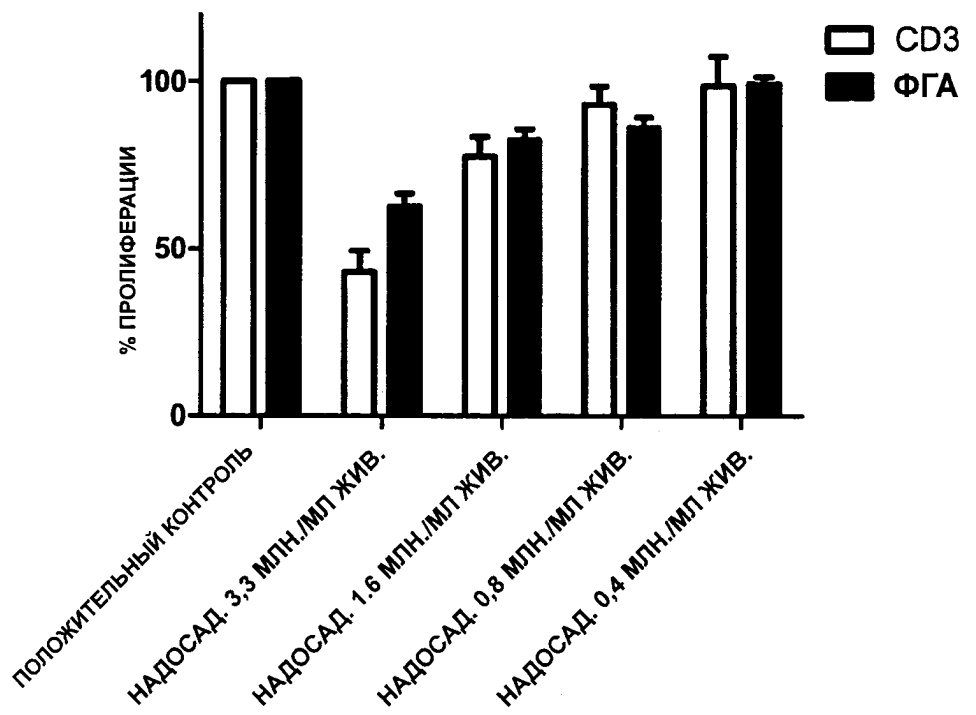
Фиг. 7b


ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ
ИМПУЛЬСОВ В МИН.
120.000
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0
484
30124
60660
99940
ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ PBMC
PBMC АЛЛОГЕННЫЕ СТИМ.
ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ PBMC + CD3
ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ PBMC + ФГА

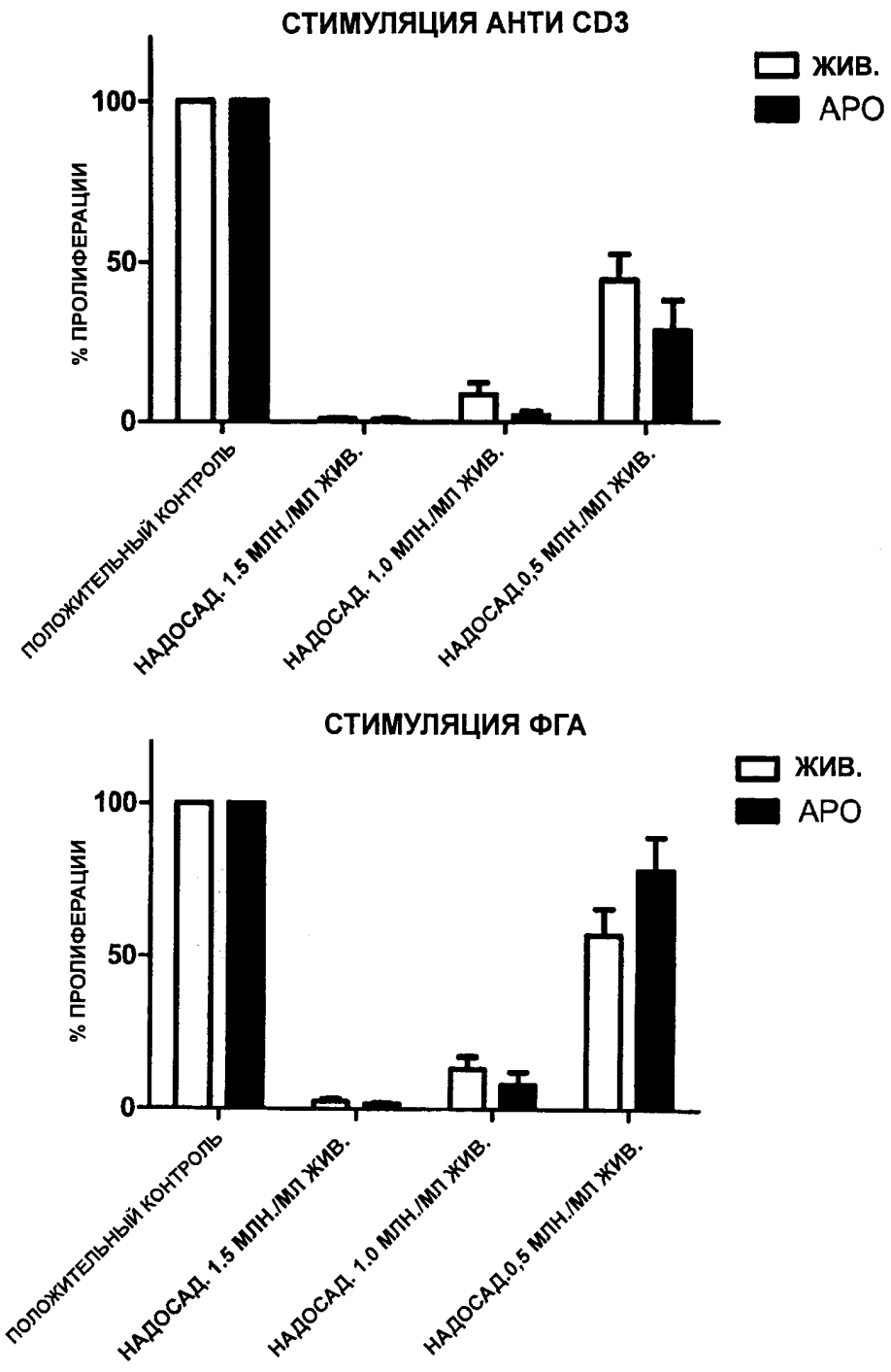
Фиг. 8


ОТВЕТ Т - КЛЕТОК
% ПРОЛИФЕРАЦИИ
100
80
60
40
20
0
anti-CD3
ФГА
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ
МАКС. ПРОЛИФЕРАЦИЯ
НАДОСАД. ЧИСТ.
НАДОСАД. 1:2
НАДОСАД. 1:4
НАДОСАД. 1:8

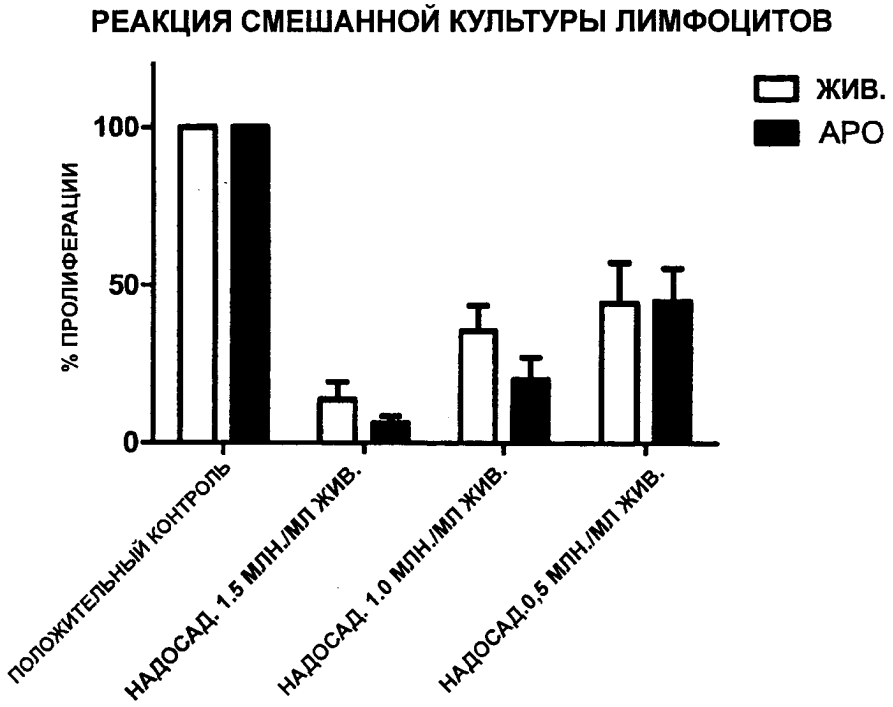
Фиг. 9


ПРОЛИФЕРАЦИЯ PBMC
% ПРОЛИФЕРАЦИИ
100
50
0
CD3
ФГА
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ
НАДОСАД. 3,3 МЛН./МЛ ЖИВ.
НАДОСАД. 1,6 МЛН./МЛ ЖИВ.
НАДОСАД. 0,8 МЛН./МЛ ЖИВ.
НАДОСАД. 0,4 МЛН./МЛ ЖИВ.

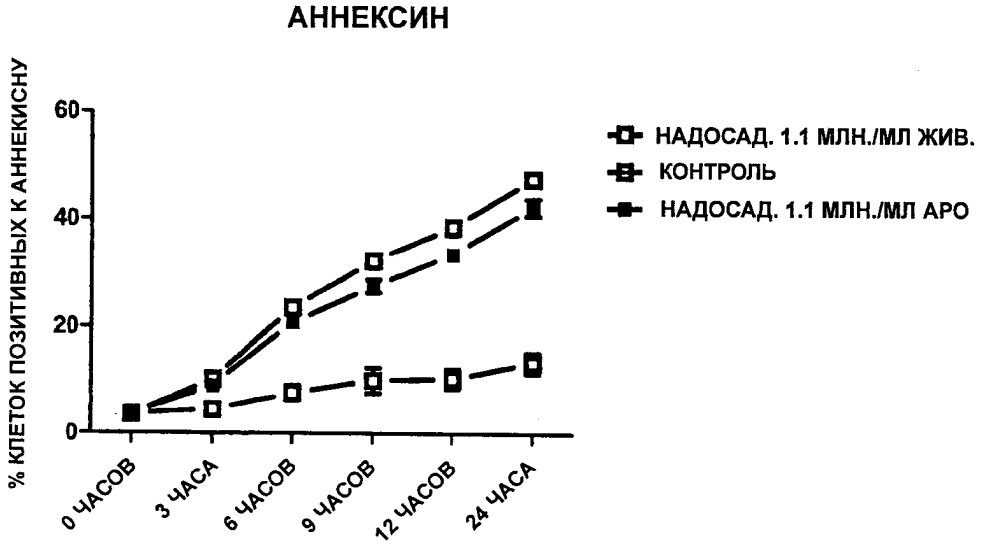
Фиг. 10


СТИМУЛЯЦИЯ АНТИ CD3
ЖИВ.
АРО
% ПРОЛИФЕРАЦИИ
100
50
0
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ
НАДОСАД. 1.5 МЛН./МЛ ЖИВ.
НАДОСАД. 1.0 МЛН./МЛ ЖИВ.
НАДОСАД.0,5 МЛН./МЛ ЖИВ.
СТИМУЛЯЦИЯ ФГА
ЖИВ.
АРО
% ПРОЛИФЕРАЦИИ
100
50
0
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ
НАДОСАД. 1.5 МЛН./МЛ ЖИВ.
НАДОСАД. 1.0 МЛН./МЛ ЖИВ.
НАДОСАД.0,5 МЛН./МЛ ЖИВ.

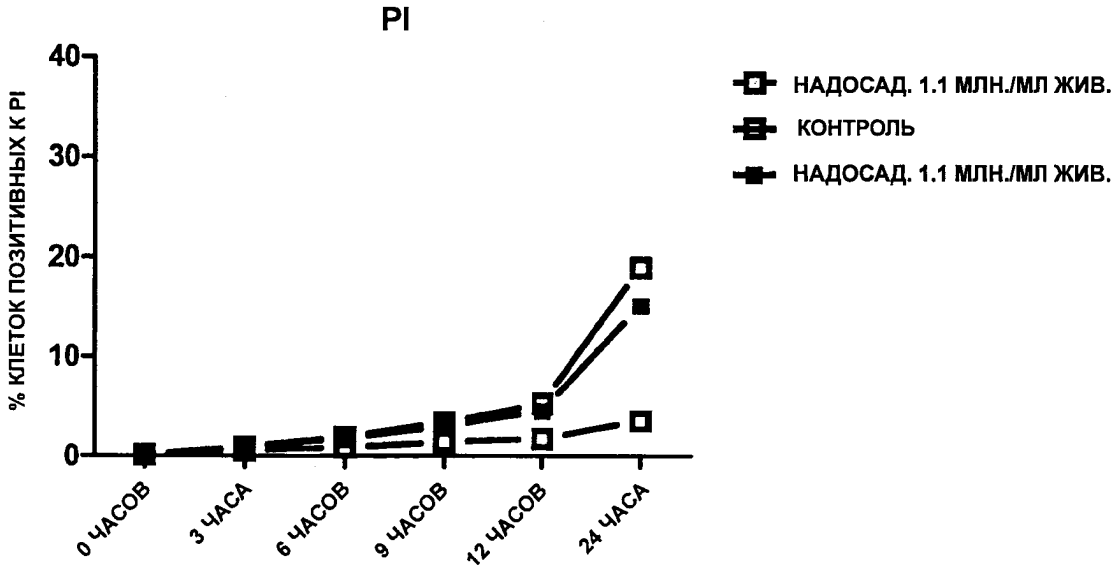
Фиг. 11



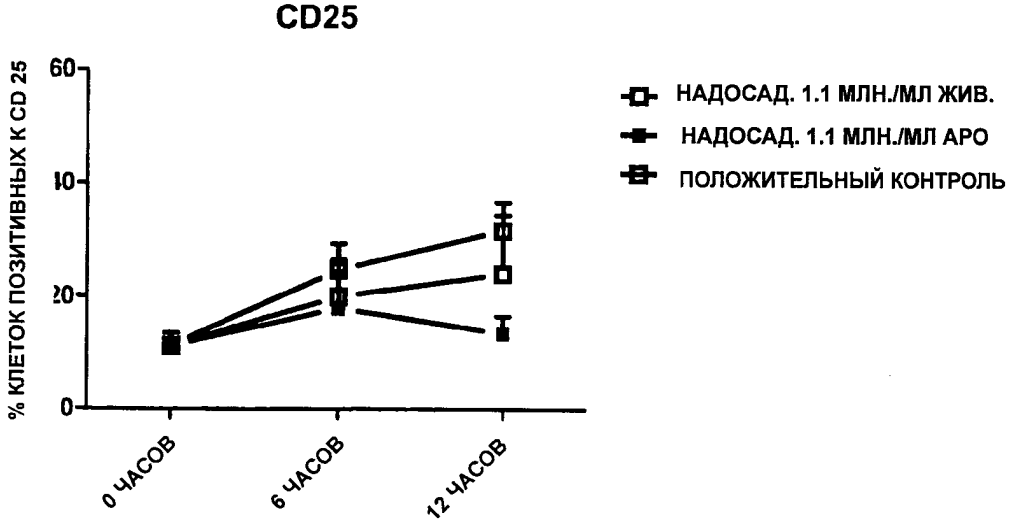
Фиг. 11(продолжение)



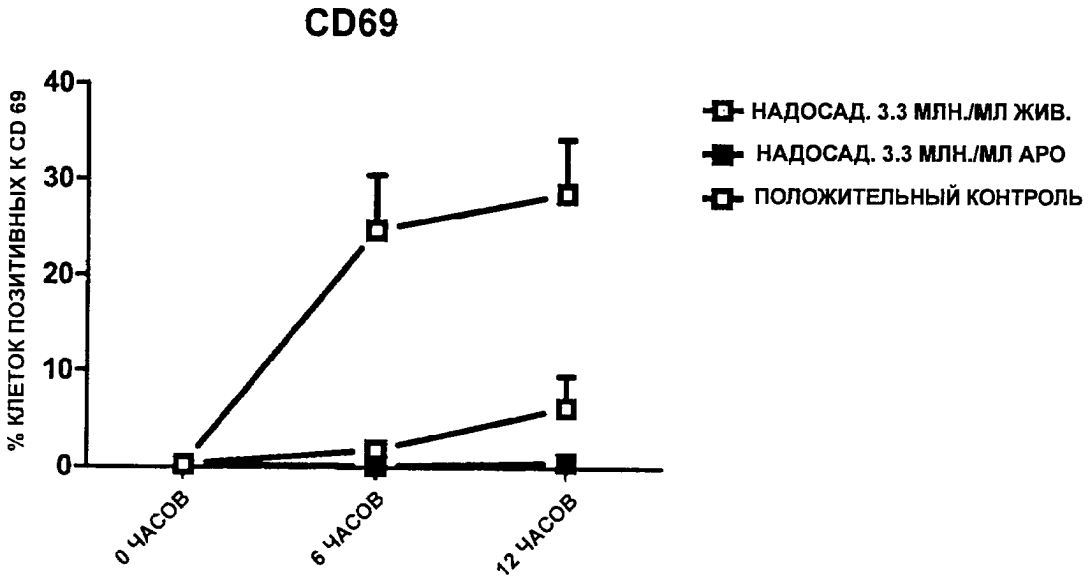
Фиг. 12



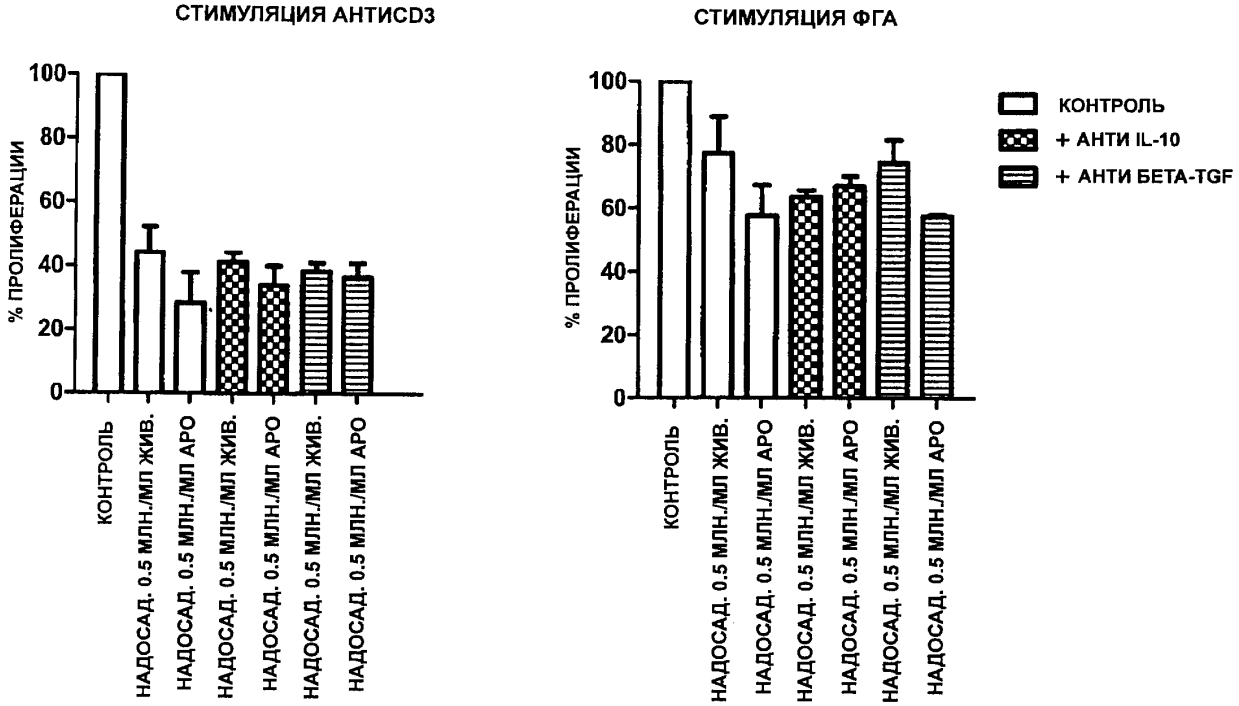
Фиг. 12 (продолжение)



Фиг. 13



Фиг. 13 (продолжение)



Фиг. 14