



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.25

(21) Номер заявки
201692254

(22) Дата подачи заявки
2015.06.09

(51) Int. Cl. **C12N 5/071** (2010.01)
C12N 5/078 (2010.01)

(54) ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ (ИМП) КЛЕТКИ

(31) **1410504.3**

(32) **2014.06.12**

(33) **GB**

(43) **2017.06.30**

(86) **PCT/GB2015/051673**

(87) **WO 2015/189587 2015.12.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕЛЛ ТЕРАПИ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Реджинальд Аджан, Эванс Мартин
Джон, Султан Сабена (GB)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) ABDI REZA ET AL.: "Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes", DIABETES, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, US, vol. 57, no. 7, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 1759-1767, XP008098188, ISSN: 0012-1797, DOI: 10.2337/DB08-0180

HEBA ABDELRAZIK ET AL.: "Mesenchymal stem cells expanded in human platelet lysate display a decreased inhibitory capacity on T- and NK-cell proliferation and function", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 41, no. 11, 1 November 2011 (2011-11-01), pages 3281-3290, XP55053525, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.201141542

CAPELLI C. ET AL.: "Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts", BONE MARROW TRANSPLANTATION, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 40, no. 8, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 785-791, XP002545732,

ISSN: 0268-3369, DOI:10.1038/SJ.BMT.1705798, [retrieved on 2007-08-06], cited in the application

KARUSSIS ET AL.: "Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): A proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases", JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHING CO, AMSTERDAM, NL, vol. 265, no. 1-2, 11 January 2008 (2008-01-11), pages 131-135, XP022419440, ISSN: 0022-510X

YOO K.H. ET AL.: "Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues", CELLULAR IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 259, no. 2, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 150-156, XP026614283, ISSN: 0008-8749, DOI: 10.1016/J.CELLIMM.2009.06.010, [retrieved on 2009-06-23]

KAREN ENGLISH: "Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation", IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY, vol. 91, no. 1, 23 October 2012 (2012-10-23), pages 19-26, XP55208784, ISSN: 0818-9641, DOI: 10.1038/icb.2012.56

ALMA J. NAUTA AND WILLEM E. FIBBE: "Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 110, no. 10, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 3499-3506, XP007913721, ISSN: 0006-4971, DOI:10.1182/BLOOD-2007-02-069716, [retrieved on 2007-07-30]

"ESGCT and FSGT Collaborative Congress Helsinki, Finland, September 17-20, 2015, Abstracts", HUMAN GENE THERAPY, 17 September 2015 (2015-09-17), XP055215257, ISSN: 1043-0342, DOI:10.1089/hum.2015.29008.abstracts, Abstract OR001; page 2, Abstract P211; page 89

(57) Изобретение относится к иммуномодулирующим прогениторным (ИМП) клеткам и их применению в терапии.

Область техники

Изобретение относится к иммуномодулирующим прогениторным (ИМП) клеткам и их применению в терапии.

Уровень техники

Мезодермальные клетки происходят из ряда тканей и выступают в качестве поддерживающей структуры для других типов клеток. Так, например, костный мозг состоит как из гемопоэтических клеток, так и из клеток мезенхимального происхождения. Ранее были описаны и охарактеризованы два основных типа мезенхимальных клеток, а именно: (i) мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и их предшественники и (ii) мезенхимальные клетки-предшественники (МКП), обнаруженные в костном мозге. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют собой мультипотентные зрелые стволовые клетки. МСК дифференцируются с образованием различных специализированных клеток, присутствующих в скелетных тканях. Например, они могут дифференцироваться в клетки хряща (хондроциты), клетки кости (остеобласты) и клетки жировой ткани (адипоциты).

МСК применяются в различных способах лечения, таких как лечение возрастной макулярной дегенерации (ВМД) и инфаркта миокарда. После введения пациенту МСК, как правило, мигрируют (или возвращаются) к пораженной ткани и оказывают свое терапевтическое действие посредством паракринного сигналинга и способствуя выживанию, восстановлению и регенерации прилегающих клеток в указанной пораженной ткани.

Современные способы лечения, как правило, включают инфузию смеси субтипов МСК, некоторые из которых не осуществляют эффективной миграции к целевой ткани. Это влечет за собой необходимость применения высоких доз клеток, что может привести к нецелевым побочным эффектам и побочным эффектам, связанным с вводимым объемом. МСК, как правило, получают из костного мозга, и поэтому получение больших количеств клеток является затруднительным.

Краткое описание изобретения

Изобретение относится к новому типу клеток, который не был ранее идентифицирован или выделен, иммуномодулирующим прогениторным клеткам. Эти ИМП клетки достаточно обособлены и отличаются от МСК и МКП по своему составу, функциям и характеристикам, обеспечивающим повышенную иммуномодулирующую активность.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили новые иммуномодулирующие прогениторные (ИМП) клетки, имеющие специфичный паттерн экспрессии маркеров. В частности, ИМП клетки экспрессируют МСC A/B, CD304 (нейропилин 1), CD178 (лиганд FAS), CD289 (толл-подобный рецептор 9), CD363 (сфингозин-1-фосфатный рецептор 1), CD99, CD181 (C-X-C-хемокиновый рецептор типа 1; CXCR1), рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R), CXCR2 и CD126. ИМП клетка экспрессирует значительно большие количества указанных маркеров, чем мезенхимальная стволовая клетка (МСК). Указанные ИМП клетки согласно настоящему изобретению могут быть выделены из моноклеарных клеток (МК), таких как МК периферической крови. Указанные ИМП клетки способны к эффективной миграции к пораженным тканям и их восстановлению. В частности, они способны к хоумингу, адгезии, трансмиграции, пролиферации, ангиогенному действию и паракринному сигналингу.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложена иммуномодулирующая прогениторная (ИМП) клетка, экспрессирующая детектируемые количества МСC A/B, CD304 (нейропилина 1), CD178 (лиганда FAS), CD289 (толл-подобного рецептора 9), CD363 (сфингозин-1-фосфатного рецептора 1), CD99, CD181 (C-X-C-хемокинового рецептора типа 1; CXCR1), рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R), CXCR2 и CD126.

Также согласно настоящему изобретению предложены

популяция из двух или более ИМП клеток согласно настоящему изобретению;

популяция иммуномодулирующих прогениторных (ИМП) клеток, в которой:

- (i) по меньшей мере 90% клеток популяции экспрессирует детектируемые количества МСC A/B,
- (ii) по меньшей мере 60% клеток популяции экспрессирует детектируемые количества CD304 (нейропилина 1),
- (iii) по меньшей мере 45% клеток популяции экспрессирует детектируемые количества CD178 (лиганда FAS),
- (iv) по меньшей мере 10% клеток популяции экспрессирует детектируемые количества CD289 (толл-подобного рецептора 9),
- (v) по меньшей мере 15% клеток популяции экспрессирует детектируемые количества CD363 (сфингозин-1-фосфатного рецептора 1),
- (vi) по меньшей мере 20% клеток популяции экспрессирует детектируемые количества CD99,
- (vii) по меньшей мере 80% клеток популяции экспрессирует детектируемые количества CD181 (C-X-C-хемокинового рецептора типа 1; CXCR1),
- (viii) по меньшей мере 30% клеток популяции экспрессирует детектируемые количества рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R),
- (xi) по меньшей мере 60% клеток популяции экспрессирует детектируемые количества CXCR2 и
- (x) по меньшей мере 5% клеток популяции экспрессирует детектируемые количества CD126;

фармацевтическая композиция, содержащая (а) ИМП клетку согласно настоящему изобретению и (b) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, одну или более липосом и/или один или более микропузырьков;

способ получения популяции ИМП клеток согласно изобретению, включающий (а) культивирование моноклеарных клеток (МК) в условиях, при которых индуцируется дифференцировка указанных МК в ИМП клетки, и (b) отбор и культивирование тех ИМП клеток, которые имеют паттерн экспрессии, описанный выше, и, тем самым, получение популяции согласно настоящему изобретению;

способ восстановления пораженной ткани пациента, включающий введение указанному пациенту популяции согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, при этом указанная популяция или композиция содержит терапевтически эффективное количество клеток, и, тем самым, лечение указанной пораженной ткани пациента;

популяция согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению для применения в способе восстановления пораженной ткани пациента; и

популяция согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения повреждения или заболевания сердца, кости, хряща, сухожилия, связки, печени, почки или легкого пациента.

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что различные варианты применения описанных в настоящем изобретении продуктов и способов могут быть адаптированы для конкретных нужд в данной области техники. Следует также понимать, что терминология, использованная в настоящем документе, служит исключительно в целях описания конкретных вариантов реализации настоящего изобретения и не предназначена для ограничения.

Кроме того, в описании и прилагаемой формуле изобретения неопределенные и определенные формы единственного числа включают формы множественного числа, за исключением случаев, когда в контексте явно указано иное. Так, например, термин "клетка" включает "клетки", термин "ткань" включает две и более таких тканей, термин "пациент" включает двух и более таких пациентов и тому подобное.

Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в настоящем документе вне зависимости от того, приведены они выше или ниже, полностью включены в описание посредством ссылок.

ИМП клетка согласно настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению предложена иммуномодулирующая прогениторная (ИМП) клетка. Указанная ИМП клетка экспрессирует детектируемые количества MIC A/B, CD304 (нейропилина 1), CD178 (лиганда FAS), CD289 (толл-подобного рецептора 9), CD363 (сфингозин-1-фосфатного рецептора 1), CD99, CD181 (C-X-C-хемокинового рецептора типа 1; CXCR1), рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R), CXCR2 и CD126.

MIC обеспечивает адаптацию клеток и их иммунологические параметры в контексте воспаления путем снижения их восприимчивости к разрушению натуральными киллерами (NK).

CD304 (альтернативное название нейропилина 1) представляет собой корецептор фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor (VEGF)) и играет важную роль в ангиогенезе, выживаемости клеток, клеточной миграции и инвазии.

CD178 (альтернативное название лиганд FAS) поддерживает клеточный фенотип и контролирует дифференцировку. Он также способен индуцировать пролиферацию клеток. Хотя лиганд FAS известен главным образом как элемент апоптозного сигналинга, было показано, что клетки, экспрессирующие FAS и лиганд FAS, устойчивы к FAS-индуцированному апоптозу.

CD289 (альтернативное название толл-подобный рецептор 9) участвует в модуляции иммунного ответа и может облегчать миграцию клеток к ткани-мишени.

Длительная активация CD363 (альтернативное название сфингозин-1-фосфатный рецептор) привела к увеличению приживления клеток *in vivo*. CD363 также стимулирует ангиогенез, модулирует хоуминг клеток, модулирует направленную миграцию и миграцию клеток и регулируют хемотаксис.

CD99 участвует в клеточной адгезии и трансмиграции.

Существует два класса рецепторов интерлейкина-8 (IL-8): CXCR1 (или CD181) и CXCR2. Оба типа рецепторов связывают IL-8 с высокой аффинностью, в отличие от других CXC-хемокинов. В отношении функции было показано, что CXCR1 и CXCR2 играют важную роль в пролиферации, миграции, инвазии и ангиогенезе. В пораженных тканях происходит высвобождение множества растворимых воспалительных факторов, таких как фактор, ингибирующий миграцию (migration inhibitory factor (MIF)) макрофагов и интерлейкин-8, и эти факторы могут привлекать ИМП клетки согласно изобретению (и другие клетки, участвующие в воспалении) к пораженной ткани посредством связывания с CXCR1 и/или CXCR2.

EGF-R участвует в миграции, адгезии и пролиферации клеток.

CD126 (альтернативное название IL-6R1) повышает иммунную привилегированность.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению обладают множеством преимуществ. Ключевые из указанных преимуществ будут обобщены здесь. Тем не менее, дополнительные преимущества станут очевидными из обсуждения, приведенного ниже.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению обеспечивают преимущество, состоящее в воз-

возможности их применения для восстановления пораженных тканей пациентов. Указанные ИМП клетки способны эффективно мигрировать (или осуществлять хоуминг) к пораженной ткани и оказывать противовоспалительное действие в указанной ткани. Более подробное обсуждение этого вопроса приведено ниже. Одной из наиболее важных способностей ИМП клеток является способность миграции (или хоуминга) к поврежденным зонам, которая включает хемотаксис. Эта способность основана на хемокиновом сигналинге и включает такие механизмы, как качение, адгезия и трансмиграция. Противовоспалительное действие ИМП клеток способствует выживанию, восстановлению и регенерации прилегающих клеток пораженной ткани. Указанные клетки также способны оказывать паракринное влияние, такое как секреция ангиогенных, хемотаксических и антиапоптотических факторов. Более подробное обсуждение этого вопроса также приведено ниже.

Как описано в более подробном обсуждении ниже, указанные ИМП клетки получают из мононуклеарных (МК) клеток, таких как периферические МК, взятые у индивидуумов, таких как человеческие индивидуумы. Поскольку ИМП клетки получают из МК, они могут быть легко получены (например, из периферической крови) и могут быть аутологичными для пациента, проходящего лечение, и, тем самым, можно избежать риска иммунологического отторжения у указанного пациента.

В принципе, возможно получение неограниченного количества ИМП клеток от единственного индивидуума, поскольку могут быть получены различные образцы МК (например, различные образцы крови). Безусловно, возможно получение очень больших количеств ИМП клеток от единственного индивидуума. Исходя из этого указанные ИМП клетки согласно настоящему изобретению могут быть получены в больших количествах.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению получают в клинически релевантных условиях, например в отсутствие следовых количеств эндотоксинов и других веществ, загрязняющих окружающую среду, а также продуктов животного происхождения, таких как эмбриональная телячья сыворотка. Благодаря этому ИМП клетки согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для введения пациентам.

Поскольку ИМП клетки согласно настоящему изобретению получают из МК, они являются, по существу, гомологичными и могут быть аутологичными. Они также позволяют избежать изменчивости от донора к донору, которая часто возникает при применении МСК. Многочисленные популяции ИМП клеток согласно настоящему изобретению могут быть получены из единственного образца, взятого у пациента до начала любого другого лечения, такого как химиотерапия или лучевая терапия. Вследствие этого ИМП клетки согласно настоящему изобретению могут позволить избежать любого неблагоприятного воздействия таких способов лечения.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению могут быть получены быстро. ИМП клетки могут быть получены из МК менее чем за 30 дней, например примерно за 22 дня.

Получение ИМП клеток из МК позволяет избежать моральных и этических аспектов, связанных с применением мезенхимальных стволовых клеток МСК, полученных из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению, как правило, получают из МК человека. Таким образом, ИМП клетки согласно настоящему изобретению, как правило, представляют собой клетки человека. В качестве альтернативы указанные ИМП клетки могут быть получены из МК других животных или млекопитающих, например животных, выращиваемых в коммерческих целях, таких как лошади, крупный рогатый скот, овцы или свиньи, от лабораторных животных, таких как мыши или крысы, или от домашних животных, таких как кошки, собаки, кролики или морские свинки.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению могут быть определены как иммуномодулирующие прогениторные клетки с помощью стандартных методов, известных в данной области техники, включая экспрессию линейно-специфичных маркеров, структурные и функциональные характеристики. Указанные ИМП клетки будут экспрессировать детектируемые количества маркеров клеточной поверхности, известные в качестве характерных для ИМП клеток. Обсуждение этого вопроса приведено ниже.

Для ИМП клеток согласно настоящему изобретению могут быть успешно пройдены тесты на дифференцировку *in vitro* для подтверждения принадлежности указанных клеток к мезодермальной линии дифференцировки. Такие тесты включают, но не ограничены ими, тест на адипогенную дифференцировку, тест на остеогенную дифференцировку и тест на нейрогенную дифференцировку (Zaim M. et al., *Ann. Hematol.* 2012 Aug; 91(8): 1175-86).

ИМП клетки согласно настоящему изобретению не являются стволовыми клетками. В частности, они не являются МСК. Они терминально дифференцированы. Хотя в правильно подобранных условиях они могут быть принудительно дифференцированы *in vitro*, например в клетки хряща или кости, как правило, они не дифференцируются *in vivo*. ИМП клетки согласно настоящему изобретению оказывают действие путем миграции к пораженной ткани и осуществления паракринного сигналинга в пораженной ткани. В частности, указанные ИМП клетки предпочтительно способны к индукции противовоспалительных эффектов в пораженной ткани. Более подробное обсуждение этого вопроса приведено ниже.

Для ИМП клеток согласно настоящему изобретению, как правило, характерна веретеновидная форма. Указанные ИМП клетки, как правило, представляют собой фибробластоподобные клетки, т.е. у этих

клеток небольшое тело и несколько длинных тонких отростков. Диаметр указанных клеток, как правило, составляет от примерно 10 до примерно 20 мкм.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению отличны от известных типов клеток, включая МСК, благодаря их паттерну экспрессии маркеров. Указанные ИМП клетки экспрессируют детектируемые количества МС А/В, CD304 (нейропилина 1), CD178 (лиганда FAS), CD289 (толл-подобного рецептора 9), CD363 (сфингозин-1-фосфатного рецептора 1), CD99, CD181 (С-Х-С-хемокинового рецептора типа 1; CXCR1), рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R), CXCR2 и CD126. Указанные ИМП клетки предпочтительно экспрессируют повышенные количества этих маркеров в сравнении с МСК. Это может быть определено путем сравнения уровня экспрессии/количества маркеров в ИМП клетке согласно настоящему изобретению с уровнем экспрессии/количества маркеров в МСК с помощью одинаковых техник в одинаковых условиях. Подходящие для применения МСК коммерчески доступны. МСК, применяемые для сравнения, предпочтительно представляют собой МСК человека. МСК человека коммерчески доступны от компании Mesoblast® Ltd., Osiris Therapeutics® Inc. или Lonza®. Предпочтительны МСК человека от компании Lonza®. Такие клетки применяли для сравнения в разделе "Примеры". Указанные МСК могут быть получены от любого из животных или млекопитающих, рассмотренных выше.

Указанные ИМП клетки предпочтительно экспрессируют детектируемые количества МС А/В, CD304 (нейропилина 1), CD178 (лиганда FAS), CD289 (толл-подобного рецептора 9), CD363 (сфингозин-1-фосфатного рецептора 1), CD99, CD181 (С-Х-С-хемокинового рецептора типа 1; CXCR1), рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R), CXCR2 и CD126 в сравнении с МСК. Указанные ИМП клетки предпочтительно экспрессируют повышенные количества всех десяти указанных маркеров в сравнении с МСК.

Для определения детектируемой экспрессии или повышенной экспрессии различных маркеров, рассмотренных выше (и ниже), могут быть применены стандартные способы, известные в данной области техники. Подходящие способы включают, но не ограничены ими, иммуноцитохимию, иммунохимические анализы, проточную цитометрию, такую как сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS), полимеразную цепную реакцию (ПЦР), такую как ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Подходящие для применения иммунохимические анализы включают, но не ограничены ими, белковый иммуноблоттинг (Western blotting), иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunoassays (ELISA), ИФА), метод иммуноферментных пятен (enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT), методы иммуноанализа с ферментным усилением, радиоаллергосорбентные тесты (РАСТ), радиоиммунологические анализы, анализ связывания радиоактивного лиганда и иммунофлуоресценцию. Белковый иммуноблоттинг, ИФА и ОТ-ПЦР являются количественными методами, и потому могут быть применены для измерения уровня экспрессии различных маркеров в случае их наличия. Применение высокопроизводительной FACS (HT-FACS) описано в разделе "Примеры". Экспрессию или повышенную экспрессию любого из маркеров предпочтительно осуществлять с помощью HT-FACS. Антитела и флуоресцентно меченые антитела для всего разнообразия маркеров, рассмотренных в настоящем документе, коммерчески доступны.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно демонстрируют среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) антител, составляющую по меньшей мере 300, например по меньшей мере 350 или по меньшей мере 400, для МС А/В, СИФ, составляющую по меньшей мере 210, например по меньшей мере 250 или по меньшей мере 300, для CD304 (нейропилина 1), СИФ, составляющую по меньшей мере 221, например по меньшей мере 250 или меньшей мере 300, для CD178 (лиганда FAS), СИФ, составляющую по меньшей мере 186, например по меньшей мере 200 или по меньшей мере 250, для CD289 (толл-подобного рецептора 9), СИФ, составляющую по меньшей мере 181, например по меньшей мере 200 или по меньшей мере 250, для CD363 (сфингозин-1-фосфатного рецептора 1), СИФ, составляющую по меньшей мере 184, например по меньшей мере 200 или по меньшей мере 250, для CD99, СИФ, составляющую по меньшей мере 300, например по меньшей мере 350 или по меньшей мере 400, для CD181 (С-Х-С-хемокинового рецептора типа 1; CXCR1), СИФ, составляющую по меньшей мере 173, например по меньшей мере 200 или по меньшей мере 250, для рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R), СИФ, составляющую по меньшей мере 236, например по меньшей мере 250 или по меньшей мере 300, для CXCR2 и СИФ, составляющую по меньшей мере 160, например по меньшей мере 200 или по меньшей мере 250, для CD126. Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) представляет собой меру интенсивности, усредненный по времени поток энергии в ваттах на квадратный метр. Это единица измерения системы СИ. Главным образом, СИФ для каждого маркера измеряют с помощью HT-FACS. СИФ для каждого маркера предпочтительно измеряют с помощью HT-FACS, как описано в разделе "Примеры".

В дополнение к описанным выше десяти маркерам ИМП клетки согласно настоящему изобретению, как правило, экспрессируют детектируемые количества одного или более других маркеров, приведенных в табл. 1 в разделе "Примеры". Указанные ИМП клетки могут экспрессировать детектируемые количества любого числа и комбинации этих маркеров.

Указанные ИМП клетки предпочтительно экспрессируют детектируемые количества одного или более из

CD267, CD47, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD340, Notch2, CD49b, CD63, CD58, CD44, CD49c, CD105, CD166, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 и CD276.

Указанные ИМП клетки экспрессируют детектируемые количества одного или более из CD10, CD111, CD267, CD47, CD273, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD55, CD340, CD91, Notch2, CD175s, CD82, CD49b, CD95, CD63, CD245, CD58, CD108, B2-микроглобулина, CD155, CD298, CD44, CD49c, CD105, CD166, CD230, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD59, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 и CD276.

Указанные ИМП клетки могут экспрессировать детектируемые количества любого числа и комбинации этих маркеров. Указанные ИМП клетки предпочтительно экспрессируют детектируемые количества всех этих маркеров.

Указанные ИМП клетки экспрессируют детектируемые количества одного или более из CD156b, CD61, CD202b, CD130, CD148, CD288, CD337, SSEA-4, CD349 и CD140b.

Указанные ИМП клетки более предпочтительно экспрессируют детектируемые количества одного или более из

CD156b, CD61, CD202b, CD130, CD148, CD288, CD337, SSEA-4, CD349, CD140b, CD10, CD111, CD267, CD47, CD273, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD55, CD340, CD91, Notch2, CD175s, CD82, CD49b, CD95, CD63, CD245, CD58, CD108, B2-микроглобулина, CD155, CD298, CD44, CD49c, CD105, CD166, CD230, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD59, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 и CD276.

Указанные ИМП клетки могут экспрессировать детектируемые количества любого числа и комбинации этих маркеров. Указанные ИМП клетки предпочтительно экспрессируют детектируемые количества всех этих маркеров.

Указанные ИМП клетки предпочтительно экспрессируют детектируемые количества одного или более из

CD72, CD133, CD192, CD207, CD144, CD41b, FMC7, CD75, CD3e, CD37, CD158a, CD172b, CD282, CD100, CD94, CD39, CD66b, CD158b, CD40, CD35, CD15, PAC-1, CLIP, CD48, CD278, CD5, CD103, CD209, CD3, CD197, HLA-DM, CD20, CD74, CD87, CD129, CDw329, CD57, CD163, TPBG, CD206, CD243 (BD), CD19, CD8, CD52, CD184, CD107b, CD138, CD7, CD50, HLA-DR, CD158e2, CD64, DCIR, CD45, CLA, CD38, CD45RB, CD34, CD101, CD2, CD41a, CD69, CD136, CD62P, TCR альфа-бета, CD16b, CD1a, ITGB7, CD154, CD70, CDw218a, CD137, CD43, CD27, CD62L, CD30, CD36, CD150, CD66, CD212, CD177, CD142, CD167, CD352, CD42a, CD336, CD244, CD23, CD45RO, CD229, CD200, CD22, CDH6, CD28, CD18, CD21, CD335, CD131, CD32, CD157, CD165, CD107a, CD1b, CD332, CD180, CD65 и CD24.

Указанные ИМП клетки могут экспрессировать детектируемые количества любого числа и комбинации этих маркеров. Указанные ИМП клетки предпочтительно экспрессируют детектируемые количества всех этих маркеров.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно способны к миграции к конкретной пораженной ткани пациента. Другими словами, при введении указанных клеток пациенту с пораженной тканью, указанные клетки способны к миграции (или хоумингу) к указанной пораженной ткани. Это является преимуществом, так как означает, что указанные клетки могут быть введены стандартными путями, например внутривенно, и затем они будут направленно действовать на пораженную зону. Необходимость доставки клеток к указанной пораженной ткани отсутствует. Указанное поражение может быть обусловлено повреждением или заболеванием, как более подробно описано ниже.

Указанная конкретная ткань предпочтительно представляет собой ткань сердца, кости, хряща, сухожилия, связки, печени, почки или легкого. Это применимо не только к миграции, но также к адгезии, трансмиграции, пролиферации, противовоспалительному действию и ангиогенезу, как более подробно описано ниже.

Способность ИМП клеток согласно настоящему изобретению к миграции к пораженной ткани может быть измерена с применением стандартных способов исследования, известных в данной области техники. Подходящие для применения способы включают, но не ограничены ими, геномную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР с репортерными генами или без них) и различные способы меченая.

ОТ-ПЦР представляет собой самый эффективный и простой способ отслеживать ИМП клетки согласно настоящему изобретению, находящиеся внутри организма пациента. Для этой цели могут быть использованы маркеры трансдуцированного трансгена или собственные маркеры донора, и в нескольких

исследованиях на пациентах были получены сигналы, специфичные для трансплантированных клеток. Как правило, указанные результаты являются полуколичественными.

В качестве альтернативы, ИМП клетки согласно настоящему изобретению могут быть окрашены целевым красителем, таким как флуоресцентный краситель, и возможно осуществление их мониторинга в организме пациента благодаря сигналу от этого красителя. Такие способы являются обычными в данной области техники.

Миграцию (или хоуминг), как правило, определяют путем измерения числа клеток, которые достигают пораженной ткани. Они также могут быть измерены опосредованно, путем подсчета клеток, накапливаемых в легких (а не в пораженной ткани).

В пораженных тканях сердца происходит высвобождение воспалительных хемокинов и цитокинов, таких как стромальный клеточный фактор (stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)), интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor (VEGF)) и фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor (HGF)). Кроме того, инфаркт миокарда повышает уровень VEGF и эритропоэтина (erythropoietin (EPO)). CXCR4 связывается со своим лигандом SDF-1, и затем ИМП клетки согласно настоящему изобретению, экспрессирующие CXCR4, мигрируют по градиенту SDF-1, создаваемый пораженной тканью сердца. Другие пораженные ткани, такие как ткань кости, также вырабатывают SDF-1. Если конкретная пораженная ткань представляет собой ткань сердца, ИМП клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно экспрессируют детектируемое количество CXCR4 или экспрессируют повышенное количество CXCR4 в сравнении с МСК.

Если конкретная пораженная ткань представляет собой ткань кости, ИМП клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно экспрессируют детектируемые количества ТРФ-бета 3, костного морфогенетического белка-6 (bone morphogenetic protein-6 (BMP-6)), SOX-9, коллагена-2, CD117 (c-kit), лиганда 12 хемокина (С-С мотив) (CCL12), CCL7, интерлейкина-8 (IL-8), тромбоцитарного фактора роста А (platelet-derived growth factor-A (PDGF-A)), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF), IGF-1, фактора роста гепатоцитов (HGF), PDGF-R α , PDGF-R β , CXCR4, С-С-хемокинового рецептора типа 1 (CCR1), рецептора IGF-1 (IGF-1R), рецептора фактора роста гепатоцитов (HGFR), CXCL12 и NF- κ B. ИМП клетки согласно настоящему изобретению, способные к хоумингу в костной ткани, предпочтительно экспрессируют повышенные количества одного или более из или даже всех из этих факторов в сравнении с мезенхимальными стволовыми клетками МСК. Детектируемая экспрессия этих маркеров может быть измерена, как описано выше.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно способны прикрепляться к конкретной пораженной ткани пациента. Способы анализа прикрепления и адгезии известны в данной области техники (Humphries, *Methods Mol. Biol.*, 2009;522:203-10).

ИМП клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно способны к трансмиграции через эндотелий сосудов к конкретной пораженной ткани пациента. Способы анализа трансмиграции известны в данной области техники (Muller and Luscinskas, *Methods Enzymol.*, 2008; 443: 155-176).

ИМП клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно способны к пролиферации в конкретной пораженной ткани пациента. Способы анализа пролиферации известны в данной области техники. Такие анализы коммерчески доступны, например, от компании Life Technologies®.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно способны к стимуляции ангиогенеза в конкретной пораженной ткани пациента. Способы анализа ангиогенеза известны в данной области техники (Auerback et al., *Clin. Chem.*, 2003 Jan; 49(1):32-40).

ИМП клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно способны оказывать противовоспалительное действие в конкретной пораженной ткани пациента. Способность ИМП клеток согласно настоящему изобретению оказывать противовоспалительное действие может быть измерена с применением стандартных анализов, известных в данной области техники. Подходящие для применения способы включают, но не ограничены ими, иммуноферментный анализ (ИФА) для определения секреции цитокинов, усиленные реакции смешанных лейкоцитов и положительную регуляцию костимулирующих молекул и маркеры созревания, определяемые с помощью проточной цитометрии. Конкретные способы, которые могут быть применены, описаны в разделе "Примеры". Определяемые цитокины, как правило, представляют собой интерлейкины, такие как интерлейкин-8 (IL-8), селектины, молекулы адгезии, такие как молекула межклеточной адгезии-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)), и хемотаксические белки, такие как моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1) и фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа). Способы анализа для этих цитокинов коммерчески доступны. Противовоспалительные факторы предпочтительно детектировать и определять с помощью анализа на платформе Luminex®, описанного в разделе "Примеры". Такие анализы коммерчески доступны от компании Life Technologies®.

Указанные ИМП клетки секретируют детектируемые количества одного или более из интерлейкина-6 (IL-6), IL-8, хемокина 10 с мотивом С-Х-С (CXCL10; индуцированного интерфероном-гамма белка 10; IP-10), лиганда 2 хемокина (С-С мотив) (CCL2; моноцитарного хемотаксического белка-1; MCP-1) и

лиганда 5 хемокина (С-С мотив) (CCL5; регулируемого активацией, нормально экспрессируемого и секретируемого Т-клетками; RANTES). Указанные ИМП клетки могут экспрессировать детектируемые количества любого числа и комбинации этих факторов. Указанные ИМП клетки предпочтительно секретруют все эти маркеры.

Указанные ИМП клетки предпочтительно секретируют повышенное количество одного или более из IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 и RANTES в сравнении с МСК. Указанные ИМП клетки могут секретировать повышенные количества любого числа и комбинации этих факторов. Указанные ИМП клетки предпочтительно экспрессируют повышенные количества всех этих маркеров.

Предпочтительно указанные ИМП клетки секретируют пониженное количество интерлейкина-10 (IL-10) и/или IL-12 в сравнении с мезенхимальными стволовыми клетками МСК. IL-10 и IL-12 представляют собой провоспалительные цитокины.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению более предпочтительно способны к миграции к пораженной ткани пациента и оказывают противовоспалительное действие в пораженной ткани. Это позволяет эффективно вылечивать поражение и уменьшает количество клеток, необходимое для введения.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению будут экспрессировать множество различных других маркеров в дополнение к описанным выше. Некоторые из них будут оказывать содействие ИМП клеткам в их способности мигрировать к пораженной ткани и оказывать противовоспалительное действие, достигая ее. Любая из ИМП клеток согласно настоящему изобретению может дополнительно экспрессировать детектируемые уровни одного или более из: (i) инсулиноподобного ростового фактора 1 (insulin-like growth factor-1 (IGF-1)), (ii) рецептора IGF-1; (iii) С-С-хемокинового рецептора типа 1 (CCR1), (iv) стромального клеточного фактора 1 (SDF-1), (v) гипоксия-индуцируемого фактора 1 альфа (ГИФ-1 альфа), (vi) Akt1 и (vii) фактора роста гепатоцитов (HGF) и/или гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ).

Рецепторы IGF-1 активизируют способность к миграции по градиенту IGF-1. Один из механизмов, благодаря которым IGF-1 увеличивает миграцию, заключается в увеличении количества CXCR4 на поверхности клеток, что делает их более чувствительными к сигналингу SDF-1. Обсуждение этого вопроса приведено ниже.

CCR1 представляет собой рецептор CCL7 (ранее известный как MCP3), который усиливает хоуминг МСК и повышает их способность к приживлению (и следовательно, можно предполагать, что они обладают тем же действием в отношении ИМП клеток согласно настоящему изобретению) и может повышать плотность капилляров поврежденного миокарда посредством паракринного сигналинга.

ГИФ-1 альфа активирует сигнальные пути, которые увеличивают доставку кислорода и активируют адаптивные способствующие выживанию ответы. Среди множества генов-мишеней ГИФ-1 альфа присутствуют эритропоэтин (ЕРО), эндотелии и VEGF (вместе с его рецептором Flk-1). ИМП клетки, экспрессирующие или экспрессирующие повышенное количество ГИФ-1 альфа, будут демонстрировать повышенную экспрессию паракринных стимуляторов, например, некоторых факторов роста эндотелия сосудов, которые могут способствовать формированию более терапевтически активного субтипа. Как более подробно описано ниже, ИМП клетки согласно настоящему изобретению могут быть прекондиционированы для формирования более терапевтически активного субтипа посредством культивирования в условиях гипоксии (содержание кислорода менее 20%), таких как, например, в условиях содержания кислорода примерно 2% или примерно 0%.

Akt1 представляет собой внутриклеточную серин/треониновую протеинкиназу, играющую ключевую роль во множестве клеточных процессов, таких как метаболизм глюкозы, клеточная пролиферация, апоптоз, транскрипция и клеточная миграция. Было показано, что гиперэкспрессия Akt1 препятствует апоптозу в МСК крыс, и она будет иметь тот же эффект в ИМП клетках согласно настоящему изобретению. Защита от апоптоза усилит терапевтическое действие указанных ИМП клеток.

Было показано, что гиперэкспрессия МСК HGF предотвращает постишемическую сердечную недостаточность за счет ингибирования апоптоза посредством кальциневрин-опосредованного пути и ангиогенеза. HGF и Г-КСФ оказывают в этом отношении синергичное действие. МСК с высоким уровнем экспрессии HGF и его рецептора c-met также обладают высокой способностью к миграции в пораженную ткань, достигаемой посредством гормонального, паракринного и аутокринного сигналинга. То же будет справедливо для ИМП клеток согласно настоящему изобретению, экспрессирующих HGF и/или Г-КСФ.

Указанные ИМП клетки могут экспрессировать детектируемые количества одного или более из (i)-(vii), описанных выше. ИМП клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно экспрессируют повышенное в сравнении с МСК количество одного или более из (i)-(vii). Способы количественного анализа для клеточных маркеров описаны выше. Детектируемая экспрессия этих маркеров и их количества могут быть определены как описано выше.

Любая из ИМП клеток согласно настоящему изобретению может экспрессировать детектируемые количества одного или более из: (i) фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), (ii) трансформирующего ростового фактора бета (ТРФ-β), (iii) инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), (iv) фактора роста фибробластов (FGF), (v) фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α), (vi) интерферона гамма (ИФН-γ) и

гласно настоящему изобретению или другие типы клеток. Указанная ИМП клетка является, по существу, выделенной, если она смешана с носителями или разбавителями, такими как культуральная среда, которые не будут препятствовать ее применению по назначению. В качестве альтернативы, ИМП клетка согласно настоящему изобретению может быть представлена в составе матрицы для роста или иммобилизована на поверхности, как описано ниже.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению может быть выделены с помощью различных методов, включая методы, основанные на применении антител. Клетки могут быть выделены с помощью методов негативной и позитивной селекции, в основе которых лежит связывание моноклональных антител с поверхностными маркерами, представленными на поверхности указанной ИМП клетки (см. выше). Следовательно, указанные ИМП клетки могут быть обособлены с применением любого метода, основанного на применении антител, включая сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS) и сепарацию клеток с помощью магнитных бусин.

Как более подробно описано ниже, указанные ИМП клетки могут быть подвергнуты воздействию *ex vivo*. Таким образом, указанные клетки могут быть трансфицированы или нагружены терапевтическим или диагностическим агентом, а затем применены в терапевтических целях в рамках способов согласно настоящему изобретению.

Популяция согласно настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению также предложена популяция, состоящая из двух или более ИМП клеток согласно настоящему изобретению. Любое число клеток может присутствовать в указанной популяции. Популяция согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит по меньшей мере около 5×10^5 ИМП клеток согласно настоящему изобретению. Указанная популяция более предпочтительно содержит по меньшей мере примерно 1×10^6 , по меньшей мере примерно 2×10^6 , по меньшей мере примерно $2,5 \times 10^6$, по меньшей мере примерно 5×10^6 , по меньшей мере примерно 1×10^7 , по меньшей мере примерно 2×10^7 , по меньшей мере примерно 5×10^7 , по меньшей мере примерно 1×10^8 по меньшей мере примерно 2×10^8 ИМП клеток согласно настоящему изобретению. В некоторых случаях указанная популяция может содержать по меньшей мере примерно $1,0 \times 10^7$, по меньшей мере примерно $1,0 \times 10^8$, по меньшей мере примерно $1,0 \times 10^9$, по меньшей мере примерно $1,0 \times 10^{10}$, по меньшей мере примерно $1,0 \times 10^{11}$ по меньшей мере примерно $1,0 \times 10^{12}$ ИМП клеток согласно изобретению или даже больше.

Указанная популяция, содержащая две или более ИМП клеток согласно настоящему изобретению, может содержать другие клетки в дополнение к ИМП клеткам согласно настоящему изобретению. Тем не менее, по меньшей мере 70% клеток в указанной популяции составляют ИМП клетки согласно настоящему изобретению. Более предпочтительно по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98% или по меньшей мере примерно 99% клеток в указанной популяции составляют ИМП клетки согласно настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению также предложены конкретные популяции ИМП клеток. Согласно настоящему изобретению предложена популяция иммуномодулирующих прогениторных (ИМП) клеток, в которой:

- (i) по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 97% и более предпочтительно по меньшей мере 97,1% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества MHC A/B,
- (ii) по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 65% и более предпочтительно по меньшей мере 65,2% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества CD304 (нейропилина 1),
- (iii) по меньшей мере 45%, предпочтительно по меньшей мере 51% и более предпочтительно по меньшей мере 51,6% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества CD178 (лиганда FAS),
- (iv) по меньшей мере 10%, предпочтительно по меньшей мере 11% и более предпочтительно по меньшей мере 11,3% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества CD289 (толл-подобного рецептора 9),
- (v) по меньшей мере 15%, предпочтительно по меньшей мере 18% и более предпочтительно по меньшей мере 18,7% указанной популяции экспрессируют детектируемые количества CD363 (сфингозин-1-фосфатного рецептора 1),
- (vi) по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 24% и более предпочтительно по меньшей мере 24,8% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества CD99,
- (vii) по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества CD181 (C-X-C-хемокинового рецептора типа 1; CXCR1),
- (viii) по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 33% и более предпочтительно по меньшей мере 33,3% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R),
- (ix) по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 68% и более предпочтительно по меньшей мере 68,8% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества CXCR2; и

(х) по меньшей мере 5%, предпочтительно по меньшей мере 7% и более предпочтительно по меньшей мере 7,05% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества CD126.

Указанные клетки в этих предпочтительных популяциях могут дополнительно экспрессировать детектируемые количества любого из маркеров, описанных выше, относительно ИМП клеток согласно настоящему изобретению. Указанные клетки в этих предпочтительных популяциях могут обладать любыми из обеспечивающих преимущества свойств указанных ИМП клеток, описанных выше.

По меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, клеток в указанной популяции предпочтительно экспрессируют детектируемые количества одного или более из

CD10, CD111,

CD267, CD47, CD273, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD55, CD340, CD91, Notch2, CD175s,

CD82, CD49b, CD95, CD63, CD245, CD58, CD108, B2-микроглобулина, CD155, CD298, CD44,

CD49c, CD105, CD166, CD230, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD59, CD73, CD81, CD90,

CD98, CD147, CD151 и CD276.

По меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, клеток в указанной популяции могут экспрессировать детектируемые количества любого числа и комбинаций этих маркеров. По меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, клеток в указанной популяции предпочтительно экспрессируют детектируемые количества всех этих маркеров.

По меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, клеток в указанной популяции предпочтительно экспрессируют детектируемые количества одного или более из

CD156b, CD61, CD202b, CD130, CD148, CD288, CD337, SSEA-4, CD349 и CD140b.

По меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, клеток указанной популяции могут экспрессировать детектируемые количества любого числа и комбинаций этих маркеров. По меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, клеток в указанной популяции предпочтительно экспрессируют детектируемые количества всех этих маркеров.

По меньшей мере 70%, например по меньшей мере 75%, клеток в указанной популяции предпочтительно экспрессируют детектируемые количества одного или более из CD318, CD351, CD286, CD46, CD119 и CD132. По меньшей мере 70%, например по меньшей мере 75%, клеток в указанной популяции могут экспрессировать детектируемые количества любого числа и комбинаций этих маркеров. По меньшей мере 70%, например по меньшей мере 75%, клеток в указанной популяции предпочтительно экспрессируют детектируемые количества всех этих маркеров.

1% или менее, например 0,5% или менее, клеток в указанной популяции предпочтительно экспрессируют детектируемые количества одного или более из

CD72, CD133,

CD192, CD207, CD144, CD41b, FMC7, CD75, CD3e, CD37, CD158a, CD172b, CD282, CD100,

CD94, CD39, CD66b, CD158b, CD40, CD35, CD15, PAC-1, CLIP, CD48, CD278, CD5, CD103,

CD209, CD3, CD197, HLA-DM, CD20, CD74, CD87, CD129, CDw329, CD57, CD163, TPBG,

CD206, CD243 (BD), CD19, CD8, CD52, CD184, CD107b, CD138, CD7, CD50, HLA-DR, CD158e2,

CD64, DCIR, CD45, CLA, CD38, CD45RB, CD34, CD101, CD2, CD41a, CD69, CD136, CD62P,

TCR альфа-бета, CD16b, CD1a, ITGB7, CD154, CD70, CDw218a, CD137, CD43, CD27, CD62L,

CD30, CD36, CD150, CD66, CD212, CD177, CD142, CD167, CD352, CD42a, CD336, CD244,

CD23, CD45RO, CD229, CD200, CD22, CDH6, CD28, CD18, CD21, CD335, CD131, CD32, CD157,

CD165, CD107a, CD1b, CD332, CD180, CD65 и CD24.

1% или менее, а именно 0,5% или менее клеток в указанной популяции предпочтительно экспрессируют детектируемые количества любого числа и комбинаций этих маркеров. 1% или менее, а именно 0,5% или менее клеток в указанной популяции предпочтительно экспрессируют детектируемые количества всех этих маркеров.

В любом из вариантов реализации, описанных выше, в котором популяции определены с указанием % клеток, экспрессирующих определенные маркеры, указанная популяция предпочтительно содержит по меньшей мере 5000 клеток, например по меньшей мере 6000, по меньшей мере 7000, по меньшей мере 8000, по меньшей мере 9000, по меньшей мере 10000, по меньшей мере 20000, по меньшей мере 30000 или по меньшей мере 40000 клеток. Эти популяции могут содержать любое число клеток, описанных выше.

Любая из указанных популяций клеток, описанных в настоящем документе, может быть разбавлена другими клетками перед применением. Например, популяция может быть объединена с кровью пациента, моноклеарными клетками (МК), МСК, прогениторными клетками мезодермальной линии дифференцировки (ПКМЛД) или их комбинацией. ПКМЛД описаны в заявке PCT/GB2012/051600 (опубликованной как WO 2013/005053).

Популяции согласно настоящему изобретению обеспечивают преимущества для терапии, как описано ниже. Указанная способность производить популяции, содержащие большое число ИМП клеток согласно настоящему изобретению представляет собой одно из ключевых преимуществ согласно настоящему изобретению. Настоящее изобретение делает возможным лечение пациентов популяцией клеток, большинство из которых, если не все, эффективно мигрируют к целевой ткани и оказывают противовоспалительное действие, достигая ее. Это делает возможным применение низких доз клеток и позволяет избегать нецелевых побочных эффектов и побочных эффектов, связанных с вводимым объемом.

Популяция согласно настоящему изобретению предпочтительно гомологична. Другими словами, все ИМП клетки в указанной популяции генетически и фенотипически идентичны. Указанная популяция предпочтительно является аутологичной или аллогенной, как описано выше.

Тем не менее, указанная популяция также может быть семиаллогенной. Семиаллогенные популяции главным образом получают из моноклеарных клеток от двух или более пациентов, иммунологически совместимых с пациентом, которому будет введена указанная популяция. Другими словами, все клетки в указанной популяции предпочтительно являются генетически идентичными или достаточно генетически идентичными, так что популяция иммунологически совместима с пациентом, которому будет введена указанная популяция. Поскольку ИМП клетки согласно настоящему изобретению могут быть получены от пациента, они могут являться аутологичными для пациента, подлежащего лечению (т.е. генетически идентичными пациенту или достаточно генетически идентичными, чтобы быть совместимыми для введения указанному пациенту).

Популяция согласно настоящему изобретению может быть выделена, по существу, выделена, очищена или, по существу, очищена. Популяция выделена или очищена, если она полностью свободна от любых других компонентов, таких как культуральная среда и другие клетки. Указанная популяция, по существу, выделена, если к ней примешаны носители или разбавители, такие как культуральная среда, которая не будет препятствовать ее применению по назначению. Ниже более подробно рассмотрены другие носители и разбавители. По существу, выделенная или, по существу, очищенная популяция не содержит клеток, отличных от ИМП клеток согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации указанная популяция согласно настоящему изобретению может быть представлена в составе матрицы для культивирования клеток или иммобилизована на поверхности, как описано ниже.

Указанную популяцию, как правило, культивируют *in vitro*. Методы культивирования клеток хорошо известны специалисту в данной области техники. Указанные клетки можно культивировать в стандартных условиях при 37°C, 5% CO₂ в культуральной среде без сыворотки. Указанные клетки предпочтительно культивировать в условиях пониженного содержания кислорода, как более подробно описано ниже. Указанные клетки можно культивировать в любом подходящем культуральном флаконе или сосуде, включая лунки планшета, такого как стандартный 6-луночный планшет. Такие планшеты коммерчески доступны в компании Fisher scientific, компании-поставщике VWR, Nunc, Starstedt или Falcon. Как правило, вместимость лунок составляет от примерно 1 мл до примерно 4 мл.

Указанный культуральный флакон, сосуд или лунка, внутри которой указанную популяцию содержат или культивируют, могут быть модифицированы для облегчения обслуживания указанных ИМП клеток. Например, указанные культуральный флакон, сосуд или лунка могут быть модифицированы для облегчения обслуживания клеток, например путем добавления матрикса для культивирования клеток. Указанный культуральный флакон, сосуд или лунка могут быть модифицированы для обеспечения возможности прикрепления ИМП клеток или для обеспечения возможности иммобилизации ИМП клеток на поверхности. Одна или более поверхностей могут быть покрыты белками внеклеточного матрикса, такими как ламинин или коллаген, или любыми другими молекулами захвата, которые связываются с клетками и иммобилизуют или фиксируют их на поверхности (поверхностях).

Указанная популяция может быть модифицирована *ex vivo* с помощью любых методов, описанных в настоящем документе. Например, указанная популяция может быть трансфицирована или нагружена терапевтическими или диагностическими агентами. Затем указанная популяция может быть применена в способах лечения, более подробно описанных ниже.

Способ получения ИМП клетки согласно изобретению.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения популяции согласно настоящему изобретению. Указанный способ включает культивирование моноклеарных клеток (МК) в условиях, при которых индуцируется дифференцировка указанных МК в ИМП клетки. Указанный способ включает отбор и культивирование ИМП клеток, экспрессирующих детектируемые количества MHC A/B, CD304 (нейропилина 1), CD178 (лиганда FAS), CD289 (толл-подобного рецептора 9), CD363 (сфингозин-1-фосфатного рецептора 1), CD99, CD181 (C-X-C-хемокинового рецептора типа 1; CXCR1), рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R), CXCR2 и CD126. Отобранные клетки могут экспрессировать детектируемые количества или повышенные количества любого из маркеров и факторов, описанных выше, относительно клеток согласно настоящему изобретению.

Моноклеарные клетки (МК) и способы их выделения известны в данной области техники. Указанные МК могут представлять собой первичные МК, выделенные из костного мозга. Указанные МК предпочтительно представляют собой МК периферической крови (МКПК), такие как лимфоциты и/или

макрофаги. МКПК могут быть выделены из крови с помощью гидрофильного полисахарида, такого как Ficoll®. Например, МКПК могут быть выделены из крови с помощью Ficoll-Paque® (коммерчески доступная среда для фракционирования клеток крови в градиенте плотности), как описано в разделе "Примеры".

Перед культивированием МК могут быть обработаны смесью для обогащения мезенхимальными стволовыми клетками. Указанная смесь предпочтительно содержит антитела, которые распознают CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b (которые представлены на поверхности нежелательных клеток) и компонент красных кровяных телец. Такая смесь образует сшивки между нежелательными клетками и красными кровяными тельцами, формируя иммунные розетки, которые могут быть удалены с требуемых МК. Предпочтительной смесью является RosetteSep®.

Условия, подходящие для индукции дифференцировки МК в мезенхимальные клетки (ткани, в основном происходящей из мезодермы), известны в данной области техники. Например, подходящие условия описаны в публикации Capelli C. et al. (Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. Bone Marrow Transplantation, 2007. 40: p. 785-791). Эти условия также можно применять для индукции дифференцировки МК в ИМП клетки в соответствии с настоящим изобретением.

Указанный способ предпочтительно включает культивирование МК с лизатом тромбоцитов для индукции дифференцировки МК в ИМП клетки. Словосочетание лизат тромбоцитов предназначено для обозначения комбинации природных факторов роста, содержащихся в тромбоцитах, высвобожденных посредством лизирования этих тромбоцитов. Лизис может быть осуществлен химическим способом (т.е. посредством CaCl_2), посредством осмоса (с применением дистиллированной H_2O) или с помощью процедур замораживания/оттаивания. Лизат тромбоцитов может быть получен из цельной крови, как описано в патенте США № 5198357. Лизат тромбоцитов предпочтительно должен быть приготовлен, как описано в заявке PCT/GB12/052911 (опубликованной как WO 2013/076507). Лизат тромбоцитов предпочтительно представляет собой лизат тромбоцитов человека.

В предпочтительном варианте реализации стадия (а) указанного способа согласно настоящему изобретению включает культивирование МК в среде, содержащей лизат тромбоцитов, в течение достаточного периода времени для индукции дифференцировки МК в ИМП клетки. Указанный достаточный период времени, как правило, составляет от примерно 15 до примерно 25 дней, предпочтительно примерно 22 дня. Указанная среда предпочтительно содержит примерно 20% или менее лизата тромбоцитов по объему, например примерно 15% или менее по объему или примерно 10% или менее по объему. Указанная среда предпочтительно содержит от примерно 5% до примерно 20% лизата тромбоцитов по объему, например от примерно 10% до примерно 15% по объему. Указанная среда предпочтительно содержит примерно 10% лизата тромбоцитов по объему.

В предпочтительном варианте реализации стадия (а) указанного способа согласно настоящему изобретению включает воздействие на МК смесью для обогащения мезенхимальными стволовыми клетками с последующим культивированием МК в среде, содержащей лизат тромбоцитов, в течение достаточного периода времени для индукции дифференцировки МК в ИМП клетки. Указанный достаточный период времени, как правило, составляет от примерно 15 до примерно 25 дней, предпочтительно примерно 22 дня.

На стадии (а) указанная среда предпочтительно представляет собой среду MEM (Minimum Essential Medium). Среда MEM коммерчески доступна в различных источниках, включая Sigma-Aldrich. Указанная среда предпочтительно дополнительно содержит одну или более добавок из гепарина, L-глутамина и пенициллина/стрептавидина (P/S). Указанный L-глутамин может быть заменен на GlutaMAX® (является коммерчески доступным в компании Life Technologies).

Как описано выше, некоторые из ИМП клеток согласно настоящему изобретению экспрессируют детектируемые количества CXCR4. Экспрессия CXCR4 является цитокин-зависимой и увеличивается при воздействии на клетки фактора стволовых клеток (СКФ), интерлейкина-6 (IL-6), Flt-3-лиганда, фактора роста гепатоцитов (HGF) и IL-3. Среда может содержать один или более из (i) SCF, (ii) IL-6, (iii) Flt-3-лиганда, фактора роста гепатоцитов (iv) и (v) IL-3, например

- (i); (ii); (iii); (iv); (v); (i) и (ii); (i) и (iii); (i) и (iv); (i) и (v); (ii) и (iii); (ii) и (iv); (ii) и (v); (iii) и (iv); (iii) и (v); (iv) и (v); (i), (ii) и (iii); (i), (ii) и (iv); (i), (ii) и (v); (i), (iii) и (iv); (i), (iii) и (v); (i), (iv) и (v); (ii), (iii) и (iv); (ii), (iii) и (v); (ii), (iv) и (v); (iii), (iv) и (v); или (i), (ii), (iii), (iv) и (v).

Любой из (i)-(v) может присутствовать в количестве от примерно 10 до примерно 150 нг/мл.

Стадия (а) предпочтительно включает культивирование МК в условиях, которые обеспечивают возможность прикрепления ИМП клеток. Подходящие условия более подробно рассмотрены выше.

На стадии (а) МК предпочтительно культивируют в условиях низкого содержания кислорода. Указанные МК предпочтительно культивируют в условиях содержания менее примерно 20% кислорода (O_2), например менее примерно 19%, менее примерно 18%, менее примерно 17%, менее примерно 16%, менее примерно 15%, менее примерно 14%, менее примерно 13%, менее примерно 12%, менее примерно 11%, менее примерно 10%, менее примерно 9%, менее примерно 8%, менее примерно 7%, менее примерно 6%,

менее примерно 5%, менее примерно 4%, менее примерно 3%, менее примерно 2% или менее примерно 1% кислорода (O_2). Указанные МК предпочтительно культивируют в условиях содержания от примерно 0% до примерно 19% O_2 , например от примерно 1% до примерно 15% O_2 , от примерно 2% до примерно 10% O_2 или от примерно 5% до примерно 8% O_2 . Указанные МК наиболее предпочтительно культивируют в условиях содержания примерно 0% O_2 . Данные для % кислорода (или % O_2), приведенные выше, относятся к % по объему кислорода в газе, подаваемом клеткам в культуре, например, посредством клеточного инкубатора. Не исключено, что некоторое количество кислорода может просачиваться в инкубатор или проникать при открытии дверцы.

На стадии (а) указанные МК наиболее предпочтительно культивируют в присутствии лизата тромбоцитов и в условиях низкого содержания кислорода. Такая комбинация имитирует естественные условия в пораженной ткани, что приводит к получению более здоровых и терапевтически более действенных клеток. Традиционно культивирование клеток осуществляют при 20-21% кислорода (приблизенно к содержанию кислорода в атмосферном воздухе), но в человеческом теле не существует мест с таким содержанием кислорода. Эпителиальные клетки легких "встречают" такую концентрацию кислорода, но как только кислород растворяется и покидает легкие, она снижается до примерно 17%. Далее она снижается еще больше, до 1-2%, в большинстве тканей, но составляет всего лишь 0,1% в тканях, не содержащих сосудов, таких как хрящевая ткань в суставах.

На стадии (b) указанный способ дополнительно включает отбор и культивирование ИМП клеток, которые обладают необходимым паттерном экспрессии маркеров, описанным выше. Указанные ИМП клетки с необходимым паттерном экспрессии маркеров могут быть отобраны с помощью методов, основанных на применении антител, включая сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS) и сепарацию клеток с помощью магнитных бусин. Предпочтительным является применение FACS. Более предпочтительным является применение HT-FACS.

Любой из способов культивирования ИМП клеток, описанный в отношении стадии (а), в равной степени применим к стадии (b). В частности, указанные клетки культивируют на стадии (b) в присутствии лизата тромбоцитов и в условиях низкого содержания кислорода, как описано в отношении стадии (а).

Как будет ясно из описанного выше, указанный способ согласно настоящему изобретению осуществляют в клинически релевантных условиях, т.е. в отсутствие следовых количеств эндотоксинов и других веществ, загрязняющих окружающую среду, таких как липополисахариды, липопептиды и пептидогликаны и т.д. Благодаря этому ИМП клетки согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для введения пациентам.

Указанные МК предпочтительно должны быть получены от пациента или аллогенного донора. Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения популяции согласно настоящему изобретению, подходящей для введения пациенту, при этом указанный способ включает культивирование МК, полученных от пациента, в условиях, при которых индуцируется дифференцировка указанных МК в ИМП клетки, и (b) отбор и культивирование прогениторных клеток, которые обладают паттерном экспрессии, описанным выше, и, тем самым, получение популяции согласно настоящему изобретению, подходящей для введения пациенту. Указанная популяция будет аутологичной для указанного пациента и, следовательно, при имплантации не произойдет отторжения. Согласно настоящему изобретению также предложена популяция согласно настоящему изобретению, пригодная для введения пациенту и получаемая таким способом.

В качестве альтернативы, согласно настоящему изобретению предложен способ получения популяции согласно настоящему изобретению, подходящей для введения пациенту, при этом указанный способ включает культивирование МК, полученных от другого пациента, иммунологически совместимого с пациентом, которому будут введены указанные клетки, в условиях, при которых индуцируется дифференцировка указанных МК в ИМП клетки, и (b) отбор и культивирование этих ИМП клеток, которые обладают паттерном экспрессии, описанным выше, и, тем самым, получение популяции согласно настоящему изобретению, подходящей для введения пациенту. Указанная популяция будет аллогенной для указанного пациента и, следовательно, вероятность отторжения при имплантации будет снижена. Согласно настоящему изобретению также предложена популяция согласно настоящему изобретению, пригодная для введения пациенту и получаемая таким способом.

Лекарственные средства, способы и терапевтическое применение.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению могут быть применены в способе лечения тела человека или животного. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложена ИМП клетка согласно настоящему изобретению или популяция согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения тела человека или животного путем терапии. В частности, настоящее изобретение относится к применению ИМП клеток согласно настоящему изобретению или популяции согласно настоящему изобретению для восстановления пораженной ткани пациента. Настоящее изобретение также относится к применению ИМП клеток согласно настоящему изобретению или популяции согласно настоящему изобретению для лечения повреждений сердца, кости, хряща, сухожилия, связки, печени, почки или легкого или заболевания пациента.

Согласно настоящему изобретению предложен способ восстановления пораженной ткани пациента,

включающий введение указанному пациенту популяции согласно настоящему изобретению, при этом указанная популяция содержит терапевтически эффективное количество клеток, и, тем самым, лечение указанной пораженной ткани пациента. Согласно изобретению также предложена популяция согласно настоящему изобретению для применения в восстановлении пораженной ткани указанного пациента. Согласно настоящему изобретению также предложено применение популяции согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для восстановления пораженной ткани пациента.

Указанная ткань предпочтительно имеет мезодермальное происхождение. Указанная ткань более предпочтительно представляет собой ткань сердца, кости, хряща, сухожилия, связки, печени, почки или легкого.

Указанное повреждение ткани может возникать в результате повреждения или заболевания. Указанное повреждение или заболевание предпочтительно представляет собой повреждение или заболевание сердца, кости, хряща, сухожилия, связки, печени, почки или легкого пациента. Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения повреждения или заболевания сердца, кости, хряща, сухожилия, связки, печени, почки или легкого пациента, включающий введение указанному пациенту популяции согласно настоящему изобретению, при этом указанная популяция содержит терапевтически эффективное количество клеток, и, тем самым, лечение указанной пораженной ткани пациента. Согласно настоящему изобретению также предложена популяция согласно настоящему изобретению для применения в лечении повреждения или заболевания сердца, кости, хряща, сухожилия, связки, печени, почки или легкого пациента. Согласно настоящему изобретению также предложено применение популяции согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для лечения повреждения или заболевания сердца, кости, хряща, сухожилия, связки, печени, почки или легкого пациента.

Указанное повреждение или заболевание сердца предпочтительно выбраны из инфаркта миокарда (ИМ), гипертрофии левого желудочка, гипертрофии правого желудочка, эмболии, сердечной недостаточности, врожденного порока сердца, заболевания клапана сердца, аритмии или миокардита.

ИМ повышает уровни VEGF и EPO, высвобождаемых миокардом. Кроме того, ИМ связан с воспалительной реакцией, и инфарктная ткань также высвобождает фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), интерлейкин (IL-6) и KC/Gro- α . Экспрессия CCL7 (ранее известный как MCP3), CXCL1, CXCL2 значительно повышена в сердце после инфаркта миокарда (ИМ), и они могут быть вовлечены в регуляцию приживления и хоуминга МСК в инфарктном миокарде.

В модели инфаркта миокарда на мышах было показано значительное увеличение экспрессии гена IL-8, главным образом в первые 2 дня после ИМ. Примечательно, что повышение экспрессии IL-8 преимущественно происходило в области инфаркта и пограничной зоне и лишь в гораздо меньшей степени - в уцелевшем миокарде. При активации CXCR2 MIF демонстрирует хемокиноподобные функции и действует как основной регулятор мобилизации воспалительных клеток и атерогенеза.

Указанное повреждение или заболевание кости предпочтительно выбраны из перелома, перелома Салтера-Харриса, перелома по типу зеленой ветки, костной шпоры, краниосиностоза, синдрома Коффина-Лоури, прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии, фиброзной дисплазии, болезни Фонга (или ногте-надколенного синдрома), гипофосфатазии, синдрома Клиппеля-Фейля, метаболического заболевания кости, ногте-надколенного синдрома, остеоартрита, деформирующего остеоита (или костной болезни Педжета), фиброзно-кистозного остеоита (или Osteitis fibrosa, или костной болезни фон Реклингаузена), лобкового остеоита, конденсирующего остеоита (или Osteitis condensans), конденсирующего остеоита подвздошной кости, рассекающего остеохондрита, несовершенного остеогенеза, остеомалиции, остеомиелита, остеопении, остеопетроза, остеопороза, остеонекроза, поротического гиперостоза, первичного гиперпаратиреоза, почечной остеодистрофии, рака кости, поражения кости, связанного с метастатическим раком, болезни Горама-Стаута, первичного гиперпаратиреоза, периодонтальной болезни и асептического разрыхления протезированных суставов. Рак кости может представлять собой саркому Юинга, множественную миелому, остеосаркому (гигантскую опухоль кости), остеохондрому или остеокластому. Метастатический рак, который приводит к поражению кости может представлять собой рак груди, рак простаты, рак почки, рак легкого и/или Т-клеточный лейкоз взрослых.

Если пораженная ткань представляет собой ткань сердца или ткань кости, указанные ИМП клетки в популяции предпочтительно экспрессируют детектируемые количества CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CXCR1, CXCR2 и CXCR4 и не экспрессируют детектируемые количества CD14, CD34 и CD45. Если конкретная пораженная ткань представляет собой ткань кости, ИМП клетки в популяции предпочтительно экспрессируют детектируемые количества ТРФ-бета 3, костного морфогенетического белка-6 (BMP-6), SOX-9, коллагена-2, CD117 (c-kit), лиганда 12 хемокина (C-C мотив) (CCL12), CCL7, интерлейкина-8 (IL-8), тромбоцитарного фактора роста A (PDGF-A), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF), IGF-1, фактора роста гепатоцитов (HGF), PDGF-R α , PDGF-R β , CXCR4, C-C-хемокинового рецептора типа 1 (CCR1), рецептора IGF-1 (IGF-1R), рецептора фактора роста гепатоцитов (HGFR), CXCL12 и NF- κ B и не экспрессируют детектируемые количества CD14, CD34 и CD45.

Заболевание или расстройство может представлять собой периодонтальную болезнь, эндометриоз

или разрывы мениска.

Во всех случаях ИМП клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно получены от указанного пациента или аллогенного донора. При получении ИМП клеток согласно настоящему изобретению от пациента следует подтвердить, что иммунная система пациента не отторгает указанные ИМП клетки сами по себе. Любая разница между донором и реципиентом в конечном итоге вызовет выведение ИМП клеток, но не раньше, чем они восстановят по меньшей мере часть пораженной ткани.

Настоящее изобретение относится к введению пациенту терапевтически эффективного количества ИМП клеток согласно настоящему изобретению. Терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое облегчает один или несколько симптомов поражения, заболевания или повреждения. Терапевтически эффективное количество предпочтительно представляет собой количество, которое восстанавливает пораженную ткань или лечит заболевание или повреждение. Подходящие количества более подробно рассмотрены ниже.

ИМП клетки согласно настоящему изобретению могут быть введены любому подходящему пациенту. Указанный пациент, как правило, представляет собой пациента-человека. Указанный пациент может представлять собой любое из животных или млекопитающих, упомянутых выше относительно источника ИМП клеток.

Указанный пациент может представлять собой ребенка, подростка или взрослого. О наличии у пациента пораженной ткани может быть известно, или существует подозрение о наличии у него пораженной ткани. Пациент может быть восприимчивым к или подверженным риску соответствующего заболевания или повреждения. Например, у пациента может быть генетическая предрасположенность к сердечной недостаточности.

Настоящее изобретение может быть применено в сочетании с другими средствами и веществами для восстановления пораженных тканей или обеспечения облегчения боли. В некоторых случаях ИМП клетки согласно настоящему изобретению могут быть введены одновременно, последовательно или по отдельности с другими веществами, которые предназначены для восстановления пораженных тканей или обеспечения облегчения боли. Указанные ИМП клетки могут быть применены в сочетании с существующими способами лечения пораженных тканей, и их можно, например, свободно сочетать с такими способами лечения. Таким образом, настоящее изобретение может быть применено для повышения эффективности существующих способов лечения пораженных тканей.

Настоящее изобретение предпочтительно относится к применению ИМП клеток, нагруженных или трансфицированных терапевтическим и/или диагностическим агентом. Терапевтический агент может помогать восстанавливать пораженные ткани. Диагностический агент, например флуоресцентная молекула, может помогать определить местоположение ИМП клетки в организме пациента. Указанные ИМП клетки могут быть нагружены или трансфицированы с применением любого способа, известного в данной области техники. Нагрузка ИМП клеток может быть произведена *in vitro* или *ex vivo*. В каждом случае указанные ИМП клетки могут просто находиться в контакте с агентом в культуре. В качестве альтернативы ИМП клетки могут быть нагружены агентом с помощью связующего вещества для доставки, такого как липосомы. Такие связующие вещества известны в данной области техники.

Трансфекция ИМП клеток может быть произведена *in vitro* или *ex vivo*. В качестве альтернативы стабильная трансфекция может быть произведена на стадии МК, что позволяет ИМП клеткам, экспрессирующим трансген, дифференцироваться из них. Указанные ИМП клетки трансфицированы нуклеиновой кислотой, кодирующей указанный агент. Например, могут быть использованы вирусные частицы или другие векторы, кодирующие указанный агент. Способы для этого известны в данной области техники.

Указанная нуклеиновая кислота служит основой для экспрессии указанного агента в ИМП клетках. Молекула указанной нуклеиновой кислоты будет предпочтительно содержать промотор, который функционально связан с последовательностью, кодирующей указанный агент, и который активен в ИМП клетках или который может быть активирован в ИМП клетках.

В конкретном предпочтительном варианте реализации нуклеиновая кислота, кодирующая указанный агент, может быть доставлена с помощью вирусных частиц. Указанные вирусные частицы могут содержать молекулы направленной доставки для обеспечения эффективной трансфекции. Указанные молекулы направленной доставки, как правило, будут представлены полностью или частично на поверхности вируса для того, чтобы молекулы были способны к направленной доставке вируса к ИМП клеткам.

В таких вариантах реализации может быть применен любой подходящий вирус. Указанный вирус может, например, представлять собой ретровирус, лентивирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус осповакцины или вирус герпеса. В конкретном предпочтительном варианте реализации указанный вирус может представлять собой лентивирус. Указанный лентивирус может представлять собой модифицированный ВИЧ, подходящий для применения в доставке генов. Указанный лентивирус может представлять собой вектор на основе вируса иммунодефицита африканских обезьян (ВИО), вируса иммунодефицита кошек (ВИК) или вируса инфекционной анемии лошадей (ИНАН). Указанный вирус может представлять собой вирус лейкемии мышей Молони (ВЛММ). Вирусы, применяемые в изобретении, предпочтительно являются дефицитными по репликации.

Применение вирусных частиц не является обязательным. Может быть применен любой вектор, спо-

собный к трансфекции ИМП клеток согласно настоящему изобретению, например, обычно применяемой трансфекции плазмидной ДНК или РНК.

Захват конструкции из нуклеиновой кислоты может быть повышен путем нескольких известных методик трансфекции, например, включающих применение трансфекционных агентов. Примеры этих агентов включают катионные агенты, например фосфат кальция и DEAE-декстран, и липофектанты, например реагенты Lipofectamine, Eugene и Transfectam.

Клетка может быть нагружена или трансфицирована в надлежащих условиях. Указанные клетка и агент или вектор могут, например, находиться в контакте в течение периода времени от пяти минут до десяти дней, предпочтительно от часа до пяти дней, более предпочтительно от пяти часов до двух дней и даже более предпочтительно от двенадцати часов до одного дня.

Согласно настоящему изобретению также предложены ИМП клетки, которые были нагружены или трансфицированы агентом, описанным выше. Такие ИМП клетки могут быть применены в терапевтических вариантах реализации согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах реализации МК могут быть получены от пациента, преобразованы в ИМП клетки с помощью настоящего изобретения, нагружены или трансфицированы *in vitro* и затем возвращены в организм того же самого пациента. В таких случаях ИМП клетки, применяемые в настоящем изобретении, будут представлять собой аутологичные клетки и будут полностью совместимы с организмом пациента. В предпочтительном случае клетки, применяемые в настоящем изобретении получены от пациента и обработаны *ex vivo* и возвращены в организм того же самого пациента.

Фармацевтические композиции и введение.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая ИМП клетку согласно настоящему изобретению или популяцию согласно настоящему изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, (ii) одну или более липосом и/или (iii) один или более микропузырьков. Указанная композиция может содержать (i); (ii); (iii); (i) и (ii); (i) и (iii); (ii) и (iii); или (i), (ii) и (iii). Указанную ИМП клетку или популяцию предпочтительно содержат в себе одна или более липосом и/или один или более микропузырьков. Может присутствовать любое количество липосом и/или микропузырьков. Любые числовые значения, рассмотренные выше относительно популяции согласно настоящему изобретению, в равной степени применимы к указанным липосомам и/или микропузырькам. Липосома или микропузырек может содержать одну ИМП клетку или более одной ИМП клетки.

Указанная композиция может содержать любую из ИМП клеток или популяций, упомянутых в настоящем документе и в некоторых вариантах реализации молекулы нуклеиновой кислоты, векторы или вирусы, описанные в настоящем документе. Согласно настоящему изобретению предложен способ восстановления пораженных тканей пациента, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Любой из рассмотренных выше терапевтических вариантов реализации в равной мере применим к данному варианту реализации.

Различные композиции согласно настоящему изобретению могут быть составлены с помощью любого подходящего способа. Получение составов клеток со стандартными фармацевтически приемлемыми носителями и/или вспомогательными веществами может быть осуществлено с применением способов, являющихся обычными в области фармации. Точная природа состава будет зависеть от ряда факторов, включая клетки для введения и желательный путь введения. Подходящие виды составов полностью описаны в справочнике Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, USA.

Указанные клетки могут быть введены любым путем. Подходящие пути включают, но не ограничены ими, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный или другие адекватные пути введения. Если пораженная ткань представляет собой ткань сердца, указанные клетки могут быть введены эндокардиальным, эпикардиальным, внутрижелудочковым, интракоронарным, внутриартериальным, интраперикардиальным или внутривенным путем или ретроградным путем через коронарный синус. Если пораженная ткань представляет собой ткань кости, указанные клетки могут быть введены внутрикостным путем или в зону повреждения, например перелома или заболевания. Если пораженная ткань представляет собой ткань хряща, сухожилия, связки, печени, почек или легкого, клетки могут быть введены непосредственно в указанную ткань. Если пораженная ткань представляет собой ткань легкого, клетки могут быть введены внутрилегочным путем. Если пораженная ткань представляет собой ткань печени или почек, клетки могут быть введены внутрибрюшинным путем. Клетки предпочтительно вводят внутривенно.

Композиции могут быть приготовлены совместно с физиологически приемлемым носителем или разбавителем. Как правило, такие составы приготовлены в виде жидких суспензий клеток. Клетки могут быть смешаны со вспомогательным веществом, которое фармацевтически приемлемо и совместимо с активным ингредиентом. Подходящие вспомогательные вещества представляют собой, например, воду, солевой раствор, декстозу, глицерин и тому подобное, а также их комбинации.

Кроме того, при необходимости фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или

эмульгирующие агенты, pH-буферирующие агенты и/или адъюванты, которые повышают эффективность. Указанная композиция предпочтительно содержит человеческий сывороточный альбумин.

Одним из подходящих носителей или разбавителей является Plasma-Lyte A®. Это стерильный, не-пирогенный изотонический раствор для внутривенного введения. Каждые 100 мл содержит 526 мг хлорида натрия, Фармакопея США (NaCl); 502 мг глюконата натрия ($C_6H_{11}NaO_7$); 368 мг тригидрата ацетата натрия, Фармакопея США ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); 37 мг хлорида калия, Фармакопея США (KCl); и 30 мг хлорида магния, Фармакопея США ($MgCl_2 \cdot H_2O$). Он не содержит антимикробных агентов. Значение pH отрегулировано с помощью гидроксида натрия. Значение pH составляет 7,4 (6,5-8,0).

Указанные ИМП клетки предпочтительно содержат в себе одна или несколько липосом и/или один или несколько микропузырьков. Подходящие липосомы известны в данной области техники. Подходящие липосомы описаны, например, в публикациях Akbarzadeh et al., *Nanoscale Research Letters* 2013, 8:102 и Meghana et al., *International Journal Of Pharmaceutical And Chemical Sciences*, 2012, 1(1): 1-10. Липиды, подходящие для применения при формировании липосом, описаны ниже относительно микропузырьков.

Микропузырьки, их формирование и биомедицинское применение известны в данной области техники (например, Sirsi and Borden, *Bubble Sci. Eng. Technol.*, Nov 2009; 1(1-2): 3-17). Микропузырьки представляют собой пузырьки диаметром менее одного миллиметра и более одного микрометра. Микропузырьки, применяемые в настоящем изобретении, предпочтительно имеют диаметр 8 мкм или менее, например диаметр 7 мкм или менее, диаметр 6 мкм или менее, диаметр 5 мкм или менее, диаметр 4 мкм или менее, диаметр 3 мкм или менее или диаметр 2 мкм или менее.

Указанные микропузырьки могут быть сформированы из любого вещества. Общий состав микропузырьков представляет собой газовое ядро, стабилизированное оболочкой. Газовое ядро может содержать воздух или тяжелый газ, например перфторуглерод, азот или перфторпропан. Тяжелые газы менее растворимы в воде, и поэтому с меньшей долей вероятности из микропузырька происходит их утечка, приводящая к разрушению микропузырька. Микропузырьки с ядрами из тяжелого газа обычно дольше сохраняются в сосудистом русле.

Указанная оболочка может быть сформирована из любого вещества. Материал оболочки предпочтительно содержит белок, поверхностно-активное вещество, липид, полимер или их смесь.

Подходящие белки, включают, но не ограничены ими, альбумин, лизоцим и авидин. Белки в оболочке могут быть химически сшиты, например, посредством связи цистеин-цистеин. Другие типы сшивок известны в данной области техники.

Подходящие поверхностно-активные вещества включают, но не ограничены ими, сорбитол, сорбитан монопальмитат (например, SPAN-40), полисорбатные детергенты (такие как TWEEN-40), смеси SPAN-40 и TWEEN-40 и стеарат сахарозы (моно- и диэфир).

Подходящие полимеры включают, но не ограничены ими, альгинатные полимеры, двойные сложноэфирные полимеры этилидена, сополимер поли(D,L-лактид-со-гликолид) (PLGA), поли(виниловый спирт) (PVA), сополимер полиперфтороксикарбонил-поли(молочная кислота) (PLA-PFO) и другие блок-сополимеры. Блок-сополимеры представляют собой полимерные материалы, в которых две или более мономерных субъединиц полимеризуются вместе с образованием единой полимерной цепи. Блок-сополимеры, как правило, обладают свойствами, которые определены каждой мономерной субъединицей. Однако блок-сополимер может обладать уникальными свойствами, которыми полимеры, образованные из отдельных субъединиц, не обладают. Блок-сополимеры могут быть сконструированы таким образом, что одна из мономерных субъединиц является гидрофобной (т.е. липофильной), в то время как другая (ие) субъединица (ы) гидрофильна (ы) в водных средах. В этом случае блок-сополимер может обладать амфифильными свойствами и может формировать структуру, которая имитирует биологическую мембрану. Блок-сополимер может быть диблоковым (состоящим из двух мономерных субъединиц), но также могут быть построены из более чем двух мономерных субъединиц для формирования более сложных структур, которые ведут себя как амфифилы. Соплимер может представлять собой триблоковый, тетраблоковый или пентаблоковый сополимер. Блок-сополимеры также могут быть сконструированы из субъединиц, которые не классифицированы как липидная составляющая вещества; например, гидрофобный полимер может быть выполнен из силоксановых или других мономеров не на основе углеводов. Гидрофильные составные части блок-сополимера также могут обладать низкой способностью к связыванию белка, которая позволяет образовывать мембрану, обладающую высокой устойчивостью при воздействии неочищенных биологических образцов. Эта единица группы головки также может быть получена из неклассических липидных групп головки.

Может быть применено любое липидное вещество, которое формирует микропузырек. Липидная композиция выбрана таким образом, что микропузырек обладает требуемыми свойствами, такими как поверхностный заряд, плотность упаковки или механические свойства. Указанная липидная композиция может содержать один или несколько различных липидов. Например, указанная липидная композиция может содержать до 100 липидов. Указанная липидная композиция предпочтительно содержит от 1 до 10 липидов. Указанная липидная композиция может содержать липиды естественного происхождения и/или

искусственные липиды.

Указанный липид, как правило, состоит из группы головки, межфазного фрагмента и двух групп гидрофобного хвоста, которые могут быть одинаковыми или различными. Подходящие группы головки включают, но не ограничены ими, нейтральные группы головки, такие как диацилглицериды (ДГ) и церамиды (ЦМ); цвиттерионные группы головки, такие как фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и сфингомиелин (СМ); отрицательно заряженные группы головки, такие как фосфатидилглицерин (ФГ); фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфорные кислоты (ФК) и кардиолипин (КЛ); и положительно заряженные группы головки, такие как триметиламмония пропан (ТАП). Подходящие межфазные фрагменты включают, но не ограничены ими, межфазные фрагменты естественного происхождения, таких как фрагменты на основе глицерина или церамида. Подходящие группы гидрофобного хвоста включают, но не ограничены ими, насыщенные углеводородные цепи, такие как лауриновая кислота (н-додеканоловая кислота), миристиновая кислота (н-тетрадекановая кислота), пальмитиновая кислота (н-гексадекановая кислота), стеариновая кислота (н-стеариновая кислота) и арахидоновая (н-эйкозаноидная); непредельные углеводородные цепи, такие как олеиновая кислота (цис-9-октадеаноидная); и разветвленные углеводородные цепи, такие как фитаноил. Длина цепи и положение и количество двойных связей в непредельных углеводородных цепях может варьировать. Длина цепи и положение и количество боковых цепей, таких как металльные группы, в разветвленной углеводородной цепи может варьировать. Группы гидрофобного хвоста могут быть связаны с межфазным фрагментом посредством эфирной или сложноэфирной связи.

Указанные липиды также могут быть химически модифицированы. Группы головки или хвоста указанных липидов могут быть химически изменены. Подходящие липиды, группы головки которых были химически модифицированы включают, но не ограничены ими, ПЭГ-модифицированные липиды, такие как 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]; функционализированные ПЭГ-липиды, такие как 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[биотинил(полиэтиленгликоль)-2000]; и липиды, модифицированные для конъюгации, такие как 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(сукцинил) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(биотинил). Подходящие липиды, группы хвоста которых были химически модифицированы, включают, но не ограничены ими, полимеризуемые липиды, такие как 1,2-бис(10,12-трикозадиоил)-sn-глицеро-3-фосфохолин; фторированные липиды, такие как 1-пальмитоил-2-(16-фторпальмитоил)-sn-глицеро-3-фосфохолин; дейтерированные липиды, такие как 1,2-дипальмитоил-D62-sn-глицеро-3-фосфохолин; и липиды с простой эфирной связью, такие как 1,2-ди-О-фитонил-sn-глицеро-3-фосфохолин. Указанные липиды могут быть химически модифицированы или функционализированы для облегчения связывания лигандов, рецепторов или антител, как описано выше.

Указанная липидная композиция может содержать одну или более добавок, которые будут влиять на свойства микропузырька. Подходящие добавки включают, но не ограничены ими, жирные кислоты, такие как пальмитиновая кислота, миристиновая кислота и олеиновая кислота; жирные спирты, такие как пальмитиновый спирт, миристиновый спирт и олеиновый спирт; стерин, таких как холестерин, эргостерин, ланостерин, ситостерин и стигмастерин; лизофосфолипиды, например 1-ацил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин; и церамиды.

Оболочка микропузырьков предпочтительно сформирована из фосфолипидов. Подходящие фосфолипиды известны в данной области техники.

Существует несколько коммерчески доступных составов микропузырьков с липидными оболочками, таких как Definity (Lantheus Medical Imaging) и Sonovue® (Bracco Diagnostics).

Указанный микропузырек также может быть сформирован из гибридного полимерного поверхностно-активного вещества, которое обеспечивает формирование полиэлектролитных многослойных (РЕМ) оболочек на предварительно полученном микропузырьке. Указанный предварительно полученный микропузырек покрыт заряженным поверхностно-активным веществом или слоем белка, который служит в качестве субстрата для осаждения РЕМ. Технологию сборки слой-за-слоем применяют для последовательной адсорбции противоположно заряженных полиионов на оболочку микропузырька. Например, РЕМ могут быть осаждены на микропузырьки с помощью поли(аллиламина гидрохлорида) (РАН) и поли(стиролсульфоната) (PSS) для образования полиионной пары. РЕМ-микропузырьки с фосфолипидами, содержащими катионную группу головки триметиламмония пропан (ТАР) в качестве подлежащей оболочки и ДНК и поли(L-лизин) (PLL) в качестве полиионной пары, также были разработаны.

Указанные микропузырьки, как правило, образованы путем создания межфазной поверхности между газом и веществом оболочки микропузырька. Может быть использовано любое из описанных выше веществ. Некоторые вещества, такие как фосфолипиды, спонтанно формируют микропузырьки. Фосфолипиды самостоятельно собираются в микропузырьки. Другие вещества требуют соникации межфазной поверхности, т.е. применения звуковой энергии или звуковых волн к межфазной поверхности. Как правило, применяют ультразвуковые волны. Подходящие способы соникации известны в данной области техники.

Указанный микропузырек может быть нагружен ИМП клетками после формирования микропузырька или во время формирования микропузырька.

Указанные ИМП клетки вводят способом, допустимым для данной лекарственной формы, и в количестве, которое будет терапевтически эффективно. Количество, которое должно быть введено, зависит от субъекта, подлежащего лечению, возможностей иммунной системы субъекта и степени необходимого восстановления. Точное количество ИМП клеток, которое необходимо вводить, может зависеть от решения лечащего врача и может быть индивидуальным для каждого субъекта.

Субъекту может быть введено любое подходящее количество клеток. Например, может быть введено по меньшей мере или примерно $0,2 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$, $4,0 \times 10^6$ или $5,0 \times 10^6$ клеток на кг массы тела пациента. Например, может быть введено по меньшей мере или примерно 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 клеток. В качестве ориентира число клеток согласно настоящему изобретению, которое необходимо вводить, может составлять от 10^5 до 10^9 , предпочтительно от 10^6 до 10^8 . Как правило, каждому пациенту вводят до 2×10^8 ИМП клеток. Может быть введено любое из конкретных количеств, рассмотренных выше в отношении популяции согласно настоящему изобретению. В подобных случаях, когда клетки введены или присутствуют, для содействия выживанию клеток может присутствовать питательная среда. В некоторых случаях клетки согласно настоящему изобретению могут быть предоставлены в замороженных аликвотах, и такие вещества, как ДМСО, могут присутствовать для содействия выживанию во время замораживания. Такие замороженные клетки, как правило, будут разморожены, а затем помещены в буфер или среду для ведения культуры или для введения.

Гибридная композиция.

Одна или более ИМП клеток согласно настоящему изобретению могут стать частью гибридной композиции, как описано в заявке на патент Соединенного Королевства, поданной одновременно с настоящей заявкой (CTL Ref: FIBRE1), и быть предпочтительно введены пациенту как часть такой композиции. В частности, согласно изобретению предложена гибридная композиция, которая содержит:

- (a) одно или более биосовместимых волокон;
- (b) одну или более ИМП клеток согласно настоящему изобретению; и
- (c) один или более биосовместимых компонентов, которые (i) прикрепляют одну или более терапевтических клеток к одному или более указанных волокон и/или заключают в себе одну или более терапевтических клеток и одно или более указанных волокон и/или (ii) способны прикреплять указанную композицию к ткани.

Указанная гибридная композиция согласно настоящему изобретению содержит одно или более биосовместимых волокон. Волокно является биосовместимым, если оно не вызывает каких-либо нежелательных реакций или побочных эффектов, при контакте с поврежденной тканью.

Любое количество биосовместимых волокон может присутствовать в указанной композиции. Указанная композиция может содержать только одно волокно. Указанная композиция, как правило, содержит из более чем одно волокно, например по меньшей мере 2, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000 волокон или даже больше волокон.

Подходящие биосовместимые волокна известны в данной области техники. Одно или несколько биосовместимых волокон могут быть природными или синтетическими. Предпочтительные биосовместимые волокна включают, но не ограничены ими, целлюлозные волокна, коллагеновые волокна, коллаген-гликозаминогликановые волокна, желатиновые волокна, волокна фиброина шелка, одно или более фибриновых волокон, хитозановые волокна, волокна крахмал, альгинатные волокна, гиалуроновые волокна, полоксамерные волокна или их комбинацию. Указанный глюкозаминогликан предпочтительно представляет собой хондроитин. Указанная целлюлоза предпочтительно представляет собой карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу или метилцеллюлозу. Полоксамер предпочтительно представляет собой плуроновую кислоту, необязательно Pluronic F-127.

Если в указанной композиции присутствует более одного такого волокна, популяция волокон может быть однородной. Другими словами, все из указанных волокон в популяции могут быть волокнами одного и того же типа, например целлюлозными волокнами. В качестве альтернативы популяция волокон может быть неоднородной. Другими словами, популяция волокон может содержать различные типы волокон, такие как целлюлозные волокна и коллагеновые волокна.

Указанные одно или более волокон могут иметь любую длину. Указанные одно или более волокон предпочтительно имеют примерно такую же длину, как глубина поражения ткани, которая подлежит лечению с помощью указанной композиции. Длина одного или более волокон предпочтительно разработана таким образом, что указанная композиция может проникнуть в пораженную ткань до предписанной глубины. Одно или более волокон могут иметь любую длину. Нижний предел длины одного или более волокон, как правило, определен диаметром одной или более терапевтических клеток. Подходящие значения длины включают, но не ограничены ими, по меньшей мере 1 мкм в длину, по меньшей мере 10 мкм в длину, по меньшей мере 100 мкм в длину, по меньшей мере 500 мкм в длину, по меньшей мере 1 мм в длину, по меньшей мере 10 мм (1 см) в длину, по меньшей мере 100 мм (10 см) в длину, по меньшей мере 500 мм (50 см) в длину или по меньшей мере 1000 мм (100 см или 1 м) в длину. Одно или более волокон могут быть даже длиннее. Например, указанные одно или более волокон могут иметь длину до 5

или 10 м, например, при применении для восстановления повреждений вдоль кишечного тракта человека, или даже длиннее, при применении для более крупных животных, таких как лошади. Длина одного или более волокон, как правило, определена их целевым назначением и/или их пригодностью к манипуляциям, например выполняемым хирургом, роботом или другими средствами, например посредством магнита.

Указанные одно или более волокон могут быть заряженными. Указанные одно или более волокон предпочтительно положительно заряжены. Указанные одно или более волокон предпочтительно отрицательно заряжены.

Указанные одно или более волокон могут быть магнитными. Указанные одно или более волокон могут быть модифицированы для включения одного или более магнитных атомов или групп. Это делает возможной магнитную направленную доставку указанной композиции. Указанные магнитные атомы или группы могут быть парамагнитными или суперпарамагнитными. Подходящие атомы или группы включают, но не ограничены ими, атомы золота, атомы железа, атомы кобальта, атомы никеля и хелатирующие металлы группы, такие как нитрилтриуксусная кислота, содержащие любые из этих атомов. Хелатирующие металлы группы могут, например, включать группу, выбранную из $-C(=O)O-$, $-C-O-C-$, $-C(=O)-NH-$, $-C(=O)-NH-$, $-C(=O)-CH_2-I$, $-S(=O)_2-$ и $-S-$.

Указанная композиция также содержит один или более биосовместимых компонентов. Указанные один или более биосовместимых компонентов: (i) прикрепляют одну или более терапевтических клеток к одному или более волокон и/или включают в себе одну или более терапевтических клеток и одно или более волокон и/или (ii) способны прикреплять указанную композицию к ткани. Указанные одно или более биосовместимых компонентов могут: (a) прикреплять одну или более терапевтических клеток к одному или более волокнам, (b) включать в себе одну или более терапевтических клеток и одно или более волокон, (c) быть способными прикреплять указанную композицию к ткани, (d) прикреплять одну или более терапевтических клеток к одному или более волокнам и включать в себе одну или более терапевтических клеток и одно или более волокон, (e) прикреплять одну или более терапевтических клеток к одному или более волокнам и быть способными прикреплять указанную композицию к ткани, (f) включать в себе одну или более терапевтических клеток и одно или более волокон и быть способными прикреплять указанную композицию к ткани или (g) прикреплять одну или более терапевтических клеток к одному или более волокнам, включать в себе одну или более терапевтических клеток и одно или более волокон и быть способными прикреплять указанную композицию к ткани.

Компонент является биосовместимым, если он не вызывает каких-либо нежелательных реакций или побочных эффектов при контакте с поврежденной тканью.

В указанной композиции может присутствовать любое количество биосовместимых компонентов. Указанная композиция, как правило, содержит только один компонент или два компонента. Указанная композиция может содержать более двух компонентов, например по меньшей мере 3, меньшей мере 5, меньшей мере 10, меньшей мере 20, по меньшей мере 30, меньшей мере 40, меньшей мере 50 или даже большее число компонентов.

Указанные один или более биосовместимых компонентов предпочтительно содержат биосовместимый адгезив, который прикрепляет одну или более терапевтических клеток к одному или более волокнам. Указанный биосовместимый адгезив может прикреплять одну или более терапевтических клеток (a) к поверхности одного или более волокон (b) ко внутренней части одного или более волокон или (c) как к поверхности, так и ко внутренней части одного или более волокон.

Указанный биосовместимый адгезив может быть натуральным или синтетическим. Подходящие биосовместимые адгезивы известны в данной области техники. Подходящие биосовместимые адгезивы включают, но не ограничены ими, фибрин, фибриновый гель, интегрин, интегриновый гель, кадгерин и кадгериновый гель.

Указанные один или более биосовместимых компонентов предпочтительно содержат биосовместимый гель, в котором заключены одна или более терапевтических клеток и одно или более волокон. Подходящие биосовместимые гели известны в данной области техники. Указанный биосовместимый гель может быть природным или синтетическим. Предпочтительные биосовместимые гели включают, но не ограничены ими, целлюлозный гель, коллагеновый гель, желатиновый гель, фибриновый гель, хитозановый гель, крахмальный гель, альгинатный гель, гиалуроновый гель, агарозный гель, полоксамерный гель или их комбинацию.

Указанный целлюлозный гель может быть образован любой из разновидностей целлюлозы, рассмотренных выше. Концентрация полимера целлюлозы предпочтительно составляет от примерно 1,5 мас./мас.% до примерно 4,0 мас./мас.%, например от примерно 2,0 мас./мас.% до примерно 3,0 мас./мас.%. Указанный полимер целлюлозы предпочтительно имеет молекулярную массу, составляющую от примерно 450000 до примерно 4000000, например от примерно 500000 до примерно 3500000, от примерно 500000 до примерно 3000000 или от примерно 750000 до примерно 2500000 или от примерно 1000000 до примерно 2000000.

Полоксамерный гель предпочтительно представляет собой гель плуроновой кислоты, при необходимости гель Pluronic F-127.

Указанный адгезив или гель предпочтительно имеет вязкость в диапазоне от 1000 до 500000 мПа·с (сП) при комнатной температуре, например от примерно 1500 до примерно 450000 мПа·с при комнатной температуре, от примерно 2000 до примерно 400000 мПа·с при комнатной температуре, от примерно 2500 до примерно 350000 мПа·с при комнатной температуре, от примерно 5000 до примерно 300000 мПа·с при комнатной температуре, от примерно 10000 до примерно 250000 мПа·с при комнатной температуре, от примерно 50000 до примерно 200000 мПа·с при комнатной температуре или от примерно 50000 до примерно 150000 мПа·с при комнатной температуре.

Вязкость представляет собой меру сопротивления адгезива и/или геля, деформации за счет напряжения сдвига или напряжения растяжения. Вязкость может быть измерена с применением любого способа, известного в данной области техники. Подходящие способы включают применение вискозиметра или реометра, но не ограничены им.

Комнатная температура, как правило, составляет от примерно 18°C до примерно 25°C, например от примерно 19°C до примерно 24°C или от примерно 20°C до примерно 23°C или от примерно 21°C до примерно 22°C. Комнатная температура предпочтительно составляет любое из значений: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25°C. Наиболее предпочтительно измерять вязкость при 25°C.

Указанные один или более биосовместимых компонентов предпочтительно содержат биосовместимый адгезив, который прикрепляет одну или более терапевтических клеток к одному или более волокнам, и биосовместимый гель, в котором заключены одна или более терапевтических клеток и одно или более волокон. Например, указанная композиция может содержать фибриновый гель, который прикрепляет одну или более терапевтических клеток к одному или более волокнам и целлюлозный гель, в котором заключены одна или более терапевтических клеток и одно или более волокон.

В любом из вариантов реализации, рассмотренных выше, биосовместимый адгезив и/или биосовместимый гель предпочтительно содержит лизат тромбоцитов. Например, адгезив и/или гель могут представлять собой гель лизата тромбоцитов. Словосочетание "лизат тромбоцитов" предназначено для обозначения комбинации природных факторов роста, содержащихся в тромбоцитах, высвобожденных посредством лизирования этих тромбоцитов. Лизис может быть осуществлен химическим способом (т.е. посредством CaCl_2), посредством осмоса (с применением дистиллированной H_2O) или с помощью процедур замораживания/оттаивания. Лизат тромбоцитов может быть получен из цельной крови, как описано в патенте США № 5198357. Лизат тромбоцитов предпочтительно должен быть приготовлен, как описано в заявке РСТ/GB12/052911 (опубликованной как WO 2013/076507). Например, он может быть приготовлен путем подвергания популяции тромбоцитов по крайней мере одному циклу замораживание-оттаивание, в котором стадию замораживания каждого цикла осуществляют при температуре, меньшей или равной -78°C.

Указанный адгезив и/или гель предпочтительно содержат: (а) лизат тромбоцитов, (b) по меньшей мере один фармацевтически приемлемый полимер и (с) по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое положительно заряженное химическое соединение, выбранное из группы, состоящей из лизина, аргинина, гистидина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аланина, метионина, пролина, серина, аспарагина, цистеина, полиаминокислот, протамина, аминоксидина, ионов цинка и ионов магния, при этом указанная композиция представляет собой водный гель, имеющий вязкость в диапазоне от 1000 до 500000 мПа·с (сП) при комнатной температуре. Указанный фармацевтически приемлемый полимер предпочтительно представляет собой целлюлозу или полоксамер. Это может быть любая из разновидностей из целлюлозы и полоксамеров, рассмотренных выше.

Указанный лизат тромбоцитов предпочтительно представляет собой лизат тромбоцитов человека. Лизат тромбоцитов более подробно рассмотрен выше.

Указанную гибридную композицию предпочтительно содержат в себе одна или более липосом и/или один или более микропузырьков. Такие структуры известны в данной области техники.

Нижеследующие примеры иллюстрируют изобретение.

Примеры

Пример 1. Выделение из костного мозга и периферической крови и наращивание ИМП клеток.

Образец костного мозга разводили буферным физиологическим раствором Хэнка и наслаивали на Ficoll-Paque для выделения мононуклеарных клеток (МК) путем центрифугирования. Указанные МК затем снова ресуспендировали в буферном физиологическом растворе Хэнка и подсчитывали с помощью исключающего анализа с применением 0,4% трипанового синего для оценки жизнеспособности клеток. Клетки высевали в культуральные флаконы T25 (в 5 мл среды для культивирования клеток, α MEM, GlutaMAX, пенициллин-стрептомицин, лизат тромбоцитов, гепарин) и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 . На день 8 указанную среду заменяли. Проводили ежедневный мониторинг клеток на предмет ИМП-подобных клеток и, если они присутствовали, их отбирали с помощью раствора для диссоциации клеток в соответствии с инструкциями производителя и пересевали в те же среды, что указано выше. Клетки криоконсервировали на пассаже 2 в культуральной среде с 10% диметилсульфоксида при -80°C и хранили в жидком азоте для последующего применения.

Пример 2. Анализ методом HT-FACS.

Анализ методом высокопроизводительной сортировки клеток с активированной флуоресценцией (HT-FACS) представляет собой высокопроизводительную скрининговую платформу, которая может быстро характеризовать фенотип клеточной поверхности клеток в суспензии, с более чем 370 маркерами клеточной поверхности, включенными в настоящее время в панель. Эта платформа прошла тщательную проверку и была выполнена на многих типах человеческих тканей и клеток. Указанная панель состоит из 375 антител, специфичных к поверхности клеток человека, нанесенных на поверхности лунок 96-луночных планшетов.

Задача состояла в определении профиля экспрессии поверхностного антигена ИМП клеток человека согласно настоящему изобретению и МСК человека, полученных от компании Lonza®. Платформа высокопроизводительной FACS (HT-FACS) позволяет проводить скрининг 375 поверхностных антигенов.

Одну ампулу криоконсервированных ПК-МСК (1×10^6 клеток/мл) высевали в культуральный флакон T75 см², содержащий 15 мл среды CTL (37°C, 5% CO₂). Клетки выращивали до достижения монослоем конfluence 80-90%, заменяя среду каждые 2-3 дня. Для пассирования клеток среду удаляли и клетки дважды промывали PBS. Клетки обрабатывали 3 мл раствора трипсина 0,25% до открепления. Восемь миллилитров среды добавляли для инактивации трипсина и клетки собирали центрифугированием при 400 g в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в 5 мл среды и высевали в культуральный флакон T175 см², содержащий 30 мл среды CTL (37°C, 5% CO₂). Было необходимо от 8 до 10 культуральных флаконов T175 см² с конfluence 80-90% для сбора 20-30 миллионов клеток (на пассаже 4) для проведения скрининга методом HT-FACS. Для получения достаточного количества "событий" для каждого антитела при анализе методом проточной цитометрии оптимальным является количество жизнеспособных клеток, составляющее примерно 20 миллионов клеток. Для сбора клеток среду удаляли и клетки дважды промывали PBS. Клетки обрабатывали 5 мл раствора трипсина 0,25% до открепления. Среду (8 мл) добавляли для инактивации трипсина и сбора клеток. Клетки центрифугировали при 400 g в течение 5 мин. Содержащий клетки осадок ресуспендировали (одноклеточная суспензия) в общей сложности в 5 мл HBSS (сбалансированного солевого раствора Хэнка без кальция/магния, с 2 mM EDTA и 1% BSA). Для определения общего числа жизнеспособных клеток с помощью исключающего красителя (0,2% трипанового синего) использовали одну аликвоту образца (10 мкл).

100 мкл образца загружали в каждую лунку (примерно 40000 клеток в лунке для обеспечения сбора от 10000 до 20000 событий при проведении анализа методом FACS). Образцы пропускали через BD FACSDiva с дополнительно установленным BD High Throughput Sampler (автоматизированным дозатором). Анализ данных, полученных в ходе анализа методом проточной цитометрии, выполняли с помощью программного обеспечения FlowJo. Результаты представляли на графиках и в электронной таблице Excel, содержащей значения процента положительных клеток и медианной интенсивности флуоресценции (МИФ) для каждого антитела.

Результаты анализа методом HT-FACS

№	Маркер	Альтернативное название:	% ИМП	% МСК Lonza®
1	BLTR-1		6,7	1,37
2	B2- микроглобулин		99,8	100
3	CA9	Карбоангидраза 9	5,22	0
4	CDH3	Кадгерин-3/P-кадгерин	2,93	0,475
5	CDH6	Кадгерин-6	0,6	0,235
6	CDH11	Кадгерин-11	61,6	0,88
7	CDw93		11,5	4,75
8	CDw198	CCR8	10,6	5,17
9	CDw199	CCR9	17,2	2,54
10	CDw210	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина	10,8	0,622

		10 (IL10RA)		
11	CDw218a	Рецептор 1 интерлейкина-18 (IL18R1)	0,384	0
12	CDw329	Иммуноглобулин-подобный лектин, связывающий сиаловую кислоту 9 (Siglec-9)	0,182	0
13	CD1a		0,338	0,28
14	CD1b		0,766	0,745
15	CD1c		15,7	0,926
16	CD1d	R3G1	2,7	0
17	CD2	LFA-2	0,292	0,526
18	CD3		0,158	0
19	CD3e		0,087	0
20	CD4		1,11	0,157
21	CD5	Leu-1	0,151	0,34
22	CD6		1,04	2,68
23	CD7	GP40/Leu-9	0,239	0,24
24	CD8		0,214	0
25	CD8b		4,34	0,705
26	CD9	BTCC-1	38,1	51,9
27	CD10	Неприлизин (NEP) / общий антиген острого лимфобластного лейкоза (CALLA)	90,6	87,1
28	CD11a	ITGAL, LFA-1	1,57	0
29	CD11b	Интегрин альфа-М (ITGAM)	6,24	0
30	CD11c	Интегрин альфа-X (ITGAX)	1,8	0
31	CD13	Аланинаминопептидаза (ANPEP)	100	100
32	CD14		8,03	6,25
33	CD15	SSEA-1	0,137	0,474
34	CD16	Fc-рецептор	10,1	3,73
35	CD16b	Низкоаффинный рецептор Fc-фрагмента IgG, тип IIIb (FCGR3B)	0,331	0
36	CD17	Лактозилцерамид (LacCer)	20,9	0,462
37	CD18	Интегрин бета-2	0,65	0
38	CD19		0,21	0

39	CD20		0,176	0
40	CD21	Рецептор комплемента типа 2 (Cr2)/рецептор вируса Эпштейна-Барра (EBV R)	0,66	0
41	CD22	BL-CAM/Siglec-2	0,596	0
42	CD23	Низкоаффинный Fc-рецептор иммуноглобулина эpsilon (FCER2)	0,551	0,234
43	CD24		0,987	4
44	CD25	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-2 (IL2RA)	1,44	1,67
45	CD26	Дипептидилпептидаза IV (DPP4)	21,3	6,33
46	CD27	Член 7 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF7)	0,409	0
47	CD28		0,643	0
48	CD29	Интегрин бета-1 (ITGB1)	100	100
49	CD30	Член 8 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF8)	0,446	0
50	CD31	PECAM	1,29	0,214
51	CD32	Низкоаффинный рецептор Fc-фрагмента иммуноглобулина гамма, тип IIb	0,698	3,46
52	CD33	Siglec-3	1,25	0,372
53	CD34		0,287	0,885
54	CD35	Рецептор комплемента типа 1 (Cr1)	0,134	0
55	CD36	Гликопротеин тромбоцитов 4/рецептор тромбоспондина	0,458	3,57
56	CD37	Тетраспанин-26 (TSPAN26)	0,0917	0,182
57	CD38	АДФ-рибозилциклаза 1	0,28	0
58	CD39	Эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролаза НТФаза 1	0,126	21,8
59	CD40	Член 5 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF5)	0,132	3,12
60	CD41a		0,293	0
61	CD41b		0,075	0

62	CD42a	Гликопротеин тромбоцитов IX	0,528	0,131
63	CD42b	Альфа-цепь гликопротеина тромбоцитов Ib	7,29	0
64	CD43	Лейкосиалин	0,406	1,81
65	CD44	Эпикан	99,9	99,7
66	CD45	Тирозиновая протеинфосфатаза C рецепторного типа, общий лейкоцитарный антиген	0,271	0
67	CD45RA		5,18	2,99
68	CD45RB		0,283	0,671
69	CD45RO		0,57	0
70	CD46	Мембранный кофакторный белок, трофобластный общий лейкоцитарный антиген	78,1	22,5
71	CD47	Антигенный детерминантный белок клеточной поверхности ОА3	92,3	99,9
72	CD48	SLAM F2	0,141	0,125
73	CD49a	Интегрин альфа-1 (ITGA1)	24	51,5
74	CD49b	Интегрин альфа-2 (ITGA2)	97,7	45,8
75	CD49c	Интегрин альфа-3 (ITGA3)	99,9	99,6
76	CD49d	Интегрин альфа-4 (ITGA4)	93,7	26
77	CD49e	Интегрин альфа-5 (ITGA5)	100	99,8
78	CD49f	Интегрин альфа-6 (ITGA6)	93,3	24,1
79	CD50	ICAM-3	0,244	0,8
80	CD51/CD61		92,7	68
81	CD52	Антиген CAMPATH-1	0,218	0,128
82	CD53		1,66	0,292
83	CD54	ICAM-1	23,1	23,7
84	CD55	Фактор ускорения распада комплемента	94,5	52,5
85	CD56	NCAM	3,05	4,71
86	CD57	Член 1 подсемейства лектиноподобных рецепторов типа G	0,193	0
87	CD58	LFA-3	99,7	98,1

88	CD59	G	100	100
89	CD60b		34	10,9
90	CD61	Интегрин бета-3 ITGB3	81,8	56,7
91	CD62E	Лиганд E-селектина	2,33	1,03
92	CD62L	Лиганд L-селектин	0,432	0,151
93	CD62P	Лиганд P-селектин	0,325	0,924
94	CD63	Ассоциированный с лизосомами мембранный белок 3 (LAMP-3)	99,1	95,8
95	CD64	Высокоафинный Fc-рецептор иммуноглобулина гамма тип I (Fc-гамма-RI)	0,263	0,225
96	CD65		0,825	0
97	CD65s		7,62	0,539
98	CD66	Бета-1-гликопротеин беременности PSGB1	0,474	0,737
99	CD66b		0,129	0
100	CD66c	Молекула клеточной адгезии 6 связанная с раковомэмбриональным антигеном	23,4	7,33
101	CD66d	Молекула клеточной адгезии 3 связанная с раковомэмбриональным антигеном	2,06	0,322
102	CD66e	Молекула клеточной адгезии 5 связанная с раковомэмбриональным антигеном	56,1	13,6
103	CD69	Молекула, индуцирующая активацию (МИА)	0,296	0,279
104	CD70	Член 7 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNFSF7)	0,36	0,187
105	CD71	Белок-рецептор трансферрина 1	51	4,71
106	CD72		0,036	0,334
107	CD73	5'-нуклеотидаза / SH3/SH4	100	99,8
108	CD74	Гамма-цепь антигена гистосовместимости класса II HLA	0,177	0,587
109	CD75	Бета-галактозид-альфа-2,6-сиалилтрансфераза	0,0789	0,304
110	CD77	Лактозилцерамид-4-альфа-галактозилтрансфераза	7,15	2,4
111	CD79a	Альфа-цепь белка ассоциированного с	15,4	0,45

		комплексом рецепторов антигенов В-клеток		
112	CD79b	Бета-цепь белка ассоциированного с комплексом рецепторов антигенов В-клеток	4,87	0,317
113	CD80	Активационный антиген В7-1	2,94	4,57
114	CD81	Тетраспанин-28	100	99,9
115	CD82	Тетраспанин-27	96,3	82,7
116	CD83		27,9	1,34
117	CD84	SLAM F5	7,94	4,1
118	CD85a	Член 3 подсемейства лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов типа В (LIR-3)	6,76	0,971
119	CD85d	Член 2 подсемейства лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов типа В (LIR-3)	17	0,98
120	CD85g	Член 4 подсемейства лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов типа А	47,2	6,15
121	CD85h	Член 2 подсемейства лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов типа А (LILRA2)	15,6	0
122	CD85j	Член 1 подсемейства лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов типа В (LIR-1)	20,6	0,221
123	CD86		24,7	0,702
124	CD87	Рецептор активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR)	0,178	1,61
125	CD88	Рецептор 1 хемотаксического анафилотоксина C5a	1,32	0,352
126	CD89	Fc- рецептор иммуноглобулина альфа	5,73	0,244
127	CD90	Мембранный гликопротеин Thy-1	100	99,3
128	CD91	Белок 1 ассоциированный с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP-1)	95,5	63,4

129	CD92	Белок 1 подобный переносчику холина	35,4	33,3
130	CD94	Антиген натуральных клеток-киллеров CD94 KLRD1	0,121	0,321
131	CD95	CD95L (лиганд) /Член 6 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNFSF6)	98,9	66,7
132	CD96	Белок-антиген повышенной поздней экспрессии на поверхности активированных Т-клеток	21	2,63
133	CD97		1,64	0,434
134	CD98	Малая субъединица 1 активатора транспорта больших нейтральных аминокислот	100	99,9
135	CD99	Гликопротеин E2 поверхности Т-клеток	24,8	0,224
136	CD100	Семафорин-4D	0,103	0,132
137	CD101	Член 2 суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF2)	0,29	0
138	CD102	ICAM-2	9,24	2,91
139	CD103	Интегрин альфа-E (ITGAE)	0,152	0,297
140	CD104	Интегрин бета-4 (ITGB4)	4,06	99,3
141	CD105	Эндоглин (SH2)	99,9	100
142	CD106	VCAM	6,93	4,64
143	CD107a	Ассоциированный с лизосомами мембранный белок 1 (LAMP-1)	0,717	0,337
144	CD107b	Ассоциированный с лизосомами мембранный гликопротеин 2 (LAMP-2)	0,221	0,225
145	CD108	Семафорин-7A	99,7	78
146	CD109		1,89	0,253
147	CD110	Рецептор тромбопоэтина (TPO-R)	55,6	16,6
148	CD111	Медиатор проникновения вируса герпеса C	90,7	0
149	CD112	Связанный с рецептором вируса полиомиелита белок 2	12,1	0,64
150	CD114	Рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора	54,9	4,83

		(ГКСФР/КСФЗР)		
151	CD115	Макрофагальный колониестимулирующий фактор 1 рецептор КСФ-1 рецептор (КСФ-1-Р)	8,41	0
152	CD116	Альфа субъединица рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора ГМ-КСФ-Р-альфа	17	2,61
153	CD117	Рецептор фактора тучных/стволовых клеток Kit (c-kit)	31,5	2,56
154	CD118	Рецептор лейкоингибирующего фактора (LIF-R)	67,4	0
155	CD119	Рецептор 1 интерферона гамма (ИФНгаммаР)	78,5	24,8
156	CD120a	Член 1А суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR1)	38,1	0
157	CD120b	Член 1В суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR2)	1,11	0,297
158	CD121b	Рецептор типа 2 интерлейкина-1 (IL1R2)	39,8	2,75
159	CD122	Бета-субъединица рецептора интерлейкина-2 (IL2RB)	41,7	4,56
160	CD123	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-3 (IL3RA)	46,9	7,06
161	CD124	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-4 (IL4RA)	1,52	0,225
162	CD125	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-5 (IL5RA)	19,5	0
163	CD126	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина 6 (IL-6R 1)	7,05	0,709
164	CD127	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-7 (IL7RA)	18,5	12,5
165	CD129	Рецептор интерлейкина-9 (IL9R)	0,178	0
166	CD130	Бета-субъединица рецептора интерлейкина-6 (IL6RB)	83,6	8,15

167	CD131	Общая бета-субъединица рецепторов цитокинов	0,684	0
168	CD132	Общая гамма-субъединица рецепторов цитокинов (IL2RG)	78,8	3,43
169	CD133	АС-133 (проминин-1)	0,054	0
170	CD134	Член 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFSF4)	8,15	1,29
171	CD135	Рецепторная тирозиновая протеинкиназа FLT3	5,18	0,575
172	CD136	Рецептор стимулирующего макрофаги белка (MSP-R)	0,302	0
173	CD137	Член 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF9)	0,392	0
174	CD137L	Мышиный?	13,5	15,6
175	CD138	Синдекан-1 (SYND1)	0,227	0
176	CD140a	Рецептор тромбоцитарного фактора роста альфа (PDGFRA)	4,1	0,98
177	CD140b	Рецептор тромбоцитарного фактора роста бета (PDGFRB)	89,1	97,8
178	CD141	Тромбомодулин	21	0,385
179	CD142	Тканевой фактор/тромбопластин	0,478	0,555
180	CD143	Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ)	29,3	0
181	CD144	Кадгерин-5	0,0728	0,159
182	CD146	MUC18	94,2	89,5
183	CD147	Базигин	100	100
184	CD148	Рецепторная тирозиновая протеинкиназа эта	84,6	0
185	CD150	Сигнальная молекула лимфоцитарной активации (SLAMF-1)	0,467	0,364
186	CD151	РЕТА-3	100	99,9
187	CD152	Цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA-4)	6,45	5,87
188	CD153	Член 8 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNFSF8)	10,9	1,19

189	CD154	Лиганд CD40	0,357	0,893
190	CD155	Рецептор вируса полиомиелита (PVR)	99,8	100
191	CD156b	Белок 17, содержащий домены дезинтегрина и металлопротеиназ (ADAM-17)	81	36,4
192	CD157	АДФ-рибозилциклаза-2/Антиген стромы костного мозга 1 (BST-1)	0,713	6,33
193	CD158a	Иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров 2DL1	0,0919	0,22
194	CD158b	Иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров 2DL2	0,129	0,195
195	CD158b2	Иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров 2DL3	2,54	0
196	CD158d	Иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров 2DL4	56,3	1,56
197	CD158e2	Иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров 3DL1	0,254	0
198	CD158f	Иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров 2DL5A	25	0
199	CD158i	Иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров 2DS4	21,9	3,12
200	CD159a	NKG2-A/NKG2-B интегральный мембранный белок типа II (KLR-C1)	6,57	0,462
201	CD159c	NKG2-C интегральный мембранный белок типа II (KLR-C2)	2,44	0,917
202	CD160		1,07	0,9
203	CD161	Член 1 подсемейства лектиноподобных рецепторов клеток-киллеров типа В (KLRB1)	5,95	3,64
204	CD162	Гликопротеиновый лиганд 1 Р-селектина (PSGL-1)	13,2	4,41
205	CD163	Богатый цистеином скэвенджер-рецептор типа 1 белок M130	0,197	0
206	CD164	Коровый белок сиаломуцина 24 (MUC-24)	11,9	27

207	CD165		0,716	3,55
208	CD166	Молекула адгезии активированных лейкоцитов	99,9	99,8
209	CD167	Рецептор с дискодиновым доменом типа 2 (DDR2)	0,496	7,69
210	CD169	Сиалоадгезин/Siglec-1	1,76	0,178
211	CD170	Иммуноглобулин-подобный лектин, связывающий сиаловую кислоту 5 (Siglec-5)	11,9	74,3
212	CD171	Молекула адгезии нервных клеток L1 (NCAM-L1)	1,9	0
213	CD172a	Субстрат нерецепторных тирозиновых протеинфосфатаз 1 (SHP-1)	61,8	3,33
214	CD172b	Сигнальный регуляторный белок бета-1 (SIRP-beta-1)	0,0955	0,285
215	CD172g	Сигнальный регуляторный белок гамма (SIRP-gamma)	14,5	7,14
216	CD175s		96,2	27,1
217	CD177	Аллоантиген нейтрофилов человека 2a (HNA-2a)	0,477	0,46
218	CD178	CD95L (лиганд) /Член 6 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNFSF6)	51,6	0,49
219	CD179a		6,31	1,84
220	CD180		0,824	0,478
221	CD181	CXCR1	85	2,55
222	CD182	CXCR2	68,8	4,31
223	CD183	CXCR3	3,08	0
224	CD184	CXCR4	0,219	0,775
225	CD185	CXCR5	6,04	1,39
226	CD186	CXCR6	1,48	41,5
227	CD191	CCR1	12,6	0
228	CD192	CCR2	0,0662	0,0497
229	CD193	CCR3	51	8,16

230	CD194	CCR4	7,13	0
231	CD195	CCR5	1,02	1,94
232	CD196	CCR6	46,3	2,8
233	CD197	CCR7	0,159	0
234	CD200	OX-2 мембранный гликопротеин (MOX-1) / (MOX-2)	0,594	0,912
235	CD201	Эндотелиальный рецептор протенна C	55,7	0,858
236	CD202b	Рецептор ангиопозтина-1 TIE2/TEK	82,7	23,2
237	CD203c	Член 3 семейства эктонуклеотидофосфатаз/фосфодиэстераз (ENPP3)	8,66	0
238	CD204	Макрофагальный скэвенджер-рецептор типов I и II (MSR1)	13,7	1,44
239	CD205	Лимфоцитарный антиген 75 (Ly-75)	4,94	0
240	CD206	Маннозный рецептор макрофагов 1 (MMR)	0,205	0
241	CD207	Член К доменного семейства 4 лектинов типа C (Лангерин)	0,0679	2,7
242	CD208	Ассоциированный с лизосомами мембранный гликопротеин 3 (LAMP-3)	3,27	0
243	CD209		0,153	0
244	CD212	Субъединица бета-1 рецептора интерлейкина-12 (IL12RB1)	0,476	0,127
245	CD213a2	Субъединица альфа-2 рецептора интерлейкина-13 (IL13RA2)	8,7	8
246	CD215	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-15	14,6	0,86
247	CD217	Рецептор интерлейкина-17 типа A (IL17RA)	29,8	35,8
248	CD218b	Акцессорный белок рецептора интерлейкина-18 (IL-18 R-beta)	23,4	0,463
249	CD220	Рецептор инсулина IR	2,93	1,5
250	CD221	Рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 IGF-1R	3,16	1,1

251	CD222	Рецептор инсулиноподобного фактора роста 2 IGF-2R	8,09	0,768
252	CD223	Белок, кодируемый геном активации лимфоцитов 3 (LAG-3)	38,9	0
253	CD226	Акцессорная молекула DNAX 1 (DNAM-1)	1,15	0,22
254	CD227	Муцин-1 (MUC-1)	4,87	5,79
255	CD229	Поверхностный антиген Т-лимфоцитов Ly-9	0,579	5,56
256	CD230	Основной прионовый белок (PrP)	99,9	100
257	CD231	Тетраспанин-7 (TSPAN-7)	34,2	34,8
258	CD234	Антиген Даффи/хемокиновый рецептор (DARC)	7,7	0,397
259	CD235a	Гликофорин-А	55,8	5,11
260	CD243 (BC)		20,8	2,31
261	CD243 (BD)		0,208	0
262	CD244	Рецептор натуральных клеток-киллеров 2B4	0,548	0
263	CD245		99,2	13,3
264	CD249	Глутамиламинопептидаза (EAP)	19,7	0
265	CD252	Член 4 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNFSF7)	21,4	20,6
266	CD253	Член 10 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNFSF10)	44,1	7,07
267	CD254	RANKL, TNFSF11	12,3	3,85
268	CD255		10,1	0,437
269	CD256	Член 13 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNFSF13)	7,94	0,792
270	CD257	Член 13В суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNFSF13B)	63,2	5,03
271	CD258	Член 14 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNFSF14)	3,17	0
272	CD261	Член 10А суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF10A)	30,3	21,4
273	CD262	Член 10В суперсемейства рецепторов фактора	12,1	4,55

		некроза опухоли (TNFRSF10B)		
274	CD263	Член 10C суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF10C)	1,47	0
275	CD264	Член 10D суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF10D)	44,9	9,09
276	CD267	Член 13B суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF13B)	91,8	36,6
277	CD268	Член 13C суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли / (BAFF-R)	64,6	13,5
278	CD269	Член 17 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF17)	8,51	2,4
279	CD270	Член 14 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли	31,6	8,79
280	CD271	Высокоафинный рецептор фактора роста нервов (NGFR)	1,63	10,4
281	CD272	В- и Т-лимфоцитарный аттенуатор	33,2	12,3
282	CD273	Лиганд 2 запрограммированной клеточной гибели 1	92,4	51,7
283	CD274	Лиганд 1 запрограммированной клеточной гибели 1	23,9	1,12
284	CD275	Лиганд ICOS	26	0,904
285	CD276	4Ig-B7-H3	100	97,8
286	CD277	Член A1 суперсемейства 3 бутирофилина	1,55	0
287	CD278	Индукцибельный костимулятор Т-клеток	0,147	0,0836
288	CD279	Белок запрограммированной клеточной гибели 1	5,5	0,492
289	CD281	Толл-подобный рецептор 1	54,7	2,12
290	CD282	Толл-подобный рецептор 2	0,101	0,529
291	CD283	Толл-подобный рецептор 3	68,9	6,92
292	CD284	Толл-подобный рецептор 4	7,94	0,84
293	CD286	Толл-подобный рецептор 6	76,9	11,4
294	CD288	Толл-подобный рецептор 8	85,6	11,2

295	CD289	Толл-подобный рецептор 9	11,3	0,359
296	CD290	Толл-подобный рецептор 11	45,1	9,5
297	CD292	Рецептор типа 1А костного морфогенетического белка	2,39	0,522
298	CD294	Рецептор 2 простагландина D2	8,81	34,1
299	CD295	Рецептор лептина (Lep-R)	49	73,7
300	CD298	Бета-3 субъединица натрий/калий транспортирующая АТФаза	99,8	98,9
301	CD299	Член М доменного семейства 4 лектинов типа С	29,5	1,07
302	CD300a	CMRF35-подобная молекула 8 (CLM-8)	1,82	0,222
303	CD300c	CMRF35-подобная молекула 6 (CLM-6)	37,3	3,76
304	CD300e	CMRF35-подобная молекула 2 (CLM-2)	38,7	0,697
305	CD301	Член А доменного семейства 10 лектинов типа С	3,39	0,626
306	CD303	Член С доменного семейства 4 лектинов типа С	66,8	3,33
307	CD304	Нейропиплин-1 (NRP-1)	65,2	0,502
308	CD305	Ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LIAR-1)	4,12	0,972
309	CD307		7,08	0,305
310	CD309	VEGFR2 / FLK-1 / KDR	34,4	14,2
311	CD312	Содержащий EGF-подобный модуль муциноподобный гормон-рецептор-подобный 2	24,8	12,2
312	CD314	NKG2-D интегральный мембранный белок типа II	38,5	11,6
313	CD317	Антиген стромы костного мозга 2	48,9	25
314	CD318	Содержащий CUB-домен белок 1	71,7	12,3
315	CD319	Член 7 семейства SLAM	27,8	21,9
316	CD321	Узловая молекула адгезии А (JAM-A)	3,81	5,04

317	CD322	Узловая молекула адгезии В (JAM-B/2)	4,37	0,248
318	CD324	Кадгерин-1	17,2	0,387
319	CD325	Кадгерин-2 / N-кадгерин	3,83	0,501
320	CD326	Молекула адгезии эпителиальных клеток (EPCAM)	18,1	0,463
321	CD328	Siglec-7	32	1,99
322	CD332	FGFR2	0,814	0,181
323	CD333	FGFR3	7,78	1,01
324	CD334	FGFR4	1,35	1,76
325	CD335	NCR1	0,669	0,274
326	CD336	NCR2	0,544	0,212
327	CD337		87,3	26,4
328	CD338	Член 2 суперсемейства G транспортеров АТФ-связывающих кассет	49	19,5
329	CD339	«Зазубренный» белок типа 1 (jagged-1)	1,76	1,22
330	CD340	Рецепторная тирозиновая протеинкиназа erbB-2	94,9	41
331	CD344	Frizzled 4	65,5	17,5
332	CD349	Frizzled 9	87,6	80,3
333	CD351	FCAMR	76,4	28,1
334	CD352	SLAMF-6	0,518	0,394
335	CD354	TREM-1	13,6	1,66
336	CD355	Цитотоксическая и регуляторная молекула Т-клеток	10,4	1,24
337	CD357	Член 18 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли	10,4	1,95
338	CD358/DR6		45,1	7,63
339	CD360 (BD)		24,9	3,53
340	CD360 (BL)		33	4,5
341	CD362	Синдекан-2	14,7	0,774
342	CD363	Сфингозин-1-фосфатный рецептор 1	18,7	0,757
343	CLA		0,277	9,23

344	CLIP		0,138	0
345	DCIR		0,264	0,15
346	EGF-R		33,3	2,02
347	FMC7		0,0776	0
348	HLA-ABC		99,9	99,8
349	HLA-A2		3,52	20,9
350	HLA-DM		0,172	0,14
351	HLA-DR		0,247	0,481
352	HPC		2,14	6,31
353	ITGB7		0,34	0,159
354	LTBR	Член 3 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли	34,5	87,6
355	MIC A / B		97,1	0,328
356	Notch1		20,5	4,01
357	Notch2		95,8	22,8
358	Notch3		5,37	2,15
359	PAC-1		0,137	0,971
360	Подопланин		8,81	2,91
361	SSEA-1		20,7	0,395
362	SSEA-1		87,4	2,44
363	Stro-1		18,5	6,27
364	TCR альфа-бета		0,327	0,195
365	TCR гамма-дельта		52,9	11,1
366	TPBG		0,197	0,178
367	VB8 TCR		25,1	3,93
368	VD2 TCR		13,2	12,1
369	fMLP-R		11,4	0,641

Пример 3. Анализ на платформе Luminox.

Анализ на платформе Luminox применяли для количественного определения цитокинов в кондиционированной среде от клеток Lonza и культур ИМП клеток. Данные представлены в пг/мкг РНК для стандартизации данных, имеющих отношение к числу клеток в культуре

	пг/мкг РНК		
Цитокин/хемокин	МСК	ИМП	Результат
IL-6	162,4	596	Увеличение
IL-8	6,9	59,8	Увеличение
IP-10	1,4	13,7	Увеличение
MCP-1	75,8	322,5	Увеличение
RANTES	1,07	125,3	Увеличение
IL-10	0,8	0,1	Снижение
IL-12 (p70)	41,6	21,9	Снижение

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуномодулирующая прогениторная (ИМП) клетка, экспрессирующая на своей поверхности детектируемые количества МІС А/В, CD304 (нейропилина 1), CD178 (лиганда FAS), CD289 (толл-подобного рецептора 9), CD363 (сфингозин-1-фосфатного рецептора 1), CD99, CD181 (С-Х-С-хемокинового рецептора типа 1; CXCR1), рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R), CXCR2 и CD126.

2. ИМП клетка по п.1, отличающаяся тем, что указанная ИМП клетка является аутологичной или аллогенной.

3. Популяция иммуномодулирующих прогениторных (ИМП) клеток, в которой:

(i) по меньшей мере 90% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества МІС А/В,

(ii) по меньшей мере 60% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD304 (нейропилина 1),

(iii) по меньшей мере 45% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD178 (лиганда FAS),

(iv) по меньшей мере 10% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD289 (толл-подобного рецептора 9),

(v) по меньшей мере 15% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD363 (сфингозин-1-фосфатного рецептора 1),

(vi) по меньшей мере 20% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD99,

(vii) по меньшей мере 80% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD181 (С-Х-С-хемокинового рецептора типа 1; CXCR1),

(viii) по меньшей мере 30% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R),

(ix) по меньшей мере 60% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CXCR2, и

(x) по меньшей мере 5% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD126,

причём указанная популяция содержит по меньшей мере две ИМП клетки по п.1.

4. Популяция по п.3, где:

(i) по меньшей мере 97% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества МІС А/В,

(ii) по меньшей мере 65% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD304 (нейропилина 1),

(iii) по меньшей мере 51% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD178 (лиганда FAS),

(iv) по меньшей мере 11% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD289 (толл-подобного рецептора 9),

(v) по меньшей мере 18% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD363 (сфингозин-1-фосфатного рецептора 1),

(vi) по меньшей мере 24% клеток в указанной популяции экспрессируют на своей поверхности детектируемые количества CD99,

(vii) по меньшей мере 85% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества CD181 (CXCR1),

(viii) по меньшей мере 33% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R),

(ix) по меньшей мере 68% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества CXCR2, и

(x) по меньшей мере 7% клеток в указанной популяции экспрессируют детектируемые количества CD126.

5. Популяция по п.3, отличающаяся тем, что указанная популяция включает по меньшей мере 5000 клеток, по меньшей мере 50000 клеток или по меньшей мере 250000 клеток.

6. Фармацевтическая композиция для восстановления повреждённой ткани у пациента, содержащая ИМП клетку по любому из пп.1, 2 или популяцию по любому из пп.3-5, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

7. Способ получения популяции ИМП клеток по любому из пп.3-5, включающий: (i) культивирование моноклеарных клеток (МК) в течение от 15 до 25 дней в среде, содержащей лизат тромбоцитов, менее чем 20% кислорода (O₂) и в условиях, при которых происходит адгезия ИМП клеток и индуцируется дифференцировка указанных МК в ИМП клетки, и (ii) отбор и культивирование тех ИМП клеток, которые имеют паттерн экспрессии, указанный в любом из пп.3-5.

8. Способ по п.7, согласно которому МК представляют собой моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) или первичные МК, выделенные из костного мозга.

9. Применение популяции по любому из пп.3-5 для восстановления поврежденной ткани у пациента или лечения заболевания сердца, кости, хряща, сухожилия, связки, печени, почки или легкого пациента.

10. Применение по п.9, где указанное заболевание сердца выбрано из инфаркта миокарда, гипертрофии левого желудочка, гипертрофии правого желудочка, эмболии, сердечной недостаточности, врожденного порока сердца, заболевания клапана сердца, аритмии или миокардита.

11. Применение по п.9, где указанная популяция является аутологичной или аллогенной.

12. Применение фармацевтической композиции по п.6 для восстановления поврежденной ткани у пациента или лечения заболевания сердца, кости, хряща, сухожилия, связки, печени, почки или легкого пациента.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
