

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037045**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.29

(21) Номер заявки
201890753

(22) Дата подачи заявки
2016.09.23

(51) Int. Cl. *A61K 31/132* (2006.01)
A61K 31/131 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ТРИЕНТИНА ДЛЯ ДОСТАВКИ МЕДИ В ИШЕМИЗИРОВАННУЮ ТКАНЬ

(31) PCT/CN2015/090528

(32) 2015.09.24

(33) CN

(43) 2018.08.31

(86) PCT/CN2016/099852

(87) WO 2017/050271 2017.03.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИННОЛАЙФ КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:
Кан Юйцзянь Джеймс (CN)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) ZHANG, Lin et al. "Protection of the heart by treatment with a divalent-copper-selective chelator reveals a novel mechanism underlying cardiomyopathy in diabetic rats", *Cardiovascular Diabetology*, Vol. 12, 31 December 2013 (2013-12-31), page 123

SHAO, Tongxian et al. "Change and influence of content of zinc and copper in acute myocardial ischemic", *Journal of Luoyang Medical College*, Vol. 18, No. 01, 31 March 2000 (2000-03-31), ISSN: 1672-688X, pages 15-17

WO-A1-2004017957

CN-A-103467577

US-A1-2014171508

(57) В изобретении предлагаются способы восстановления и регенерации ишемизированной ткани путем промотирования перераспределения и повторного использования меди в ткани в результате введения композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин, такой как триентин. В изобретении предлагаются способы и композиции для повышения внутриклеточного содержания меди и/или индуцирования восстановления ишемизированной ткани у индивидуума. Повышенное содержание меди в ишемизированной ткани может усиливать медь-зависимую транскрипционную активность индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) и восстановление ткани.

037045

B1

037045
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет заявки на международный патент № PCT/CN2015/090528, зарегистрированной 24 сентября 2015 г., содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее.

Предоставление перечня последовательностей в текстовом файле в формате ASCII

Содержание представленного далее текстового файла в формате ASCII включено в настоящее изобретение путем ссылки на читаемый с помощью компьютера (CRF) перечень последовательностей (название файла: OP160744.160921.sequence listing.txt).

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к восстановлению и регенерации ишемизированной ткани путем применения композиций, включающих тетрамин, такой как триентин.

Уровень техники

Активация индуцируемых при гипоксии факторов (HIF) является первоначальным и первичным молекулярным ответом человеческого организма на гипоксический или ишемический инсульт. Индуцируемый при гипоксии транскрипционный фактор HIF-1 принадлежит к семейству HIF и обуславливает экспрессию различных генов (таких как VEGF), которые вовлечены во множественные адаптивные ответные реакции клеток на гипоксию и/или ишемию, включая ангиогенез. HIF-1 включает две субъединицы, а именно HIF-1 α и HIF-1 β . В условиях гипоксии/ишемии HIF-1 α аккумулируется в клеточном ядре с образованием гетеродимера с HIF-1 β , который инициирует транскрипцию генов, регулирующих последующие звенья сигнальных каскадов.

Однако при хронической ишемии сердечной мышцы поврежденный миокард обычно характеризуется пониженной плотностью капилляров и угнетением ангиогенеза. Защитные механизмы, такие как механизмы, индуцируемые в результате аккумуляции HIF-1 α при острых ишемических инсультах, не действуют в условиях хронической ишемии в результате мобилизации меди из миокарда, вызываемой продолжительной ишемией. Ранее было показано, что транскрипционная активность HIF-1 требует участия следовых количеств меди. У пациентов с хронической ишемической кардиомиопатией, даже если уровни HIF-1 α в ишемизированной миокардиальной ткани постоянно повышаются, подавлена экспрессия генов, регулируемых с помощью HIF-1, таких как VEGF. Потеря кардиальной меди блокирует активацию аккумулярованного HIF-1 α , и исчерпание запасов меди в сердечной мышце хорошо коррелирует со степенью дисфункции сердца у таких пациентов. Кроме того, пониженное содержание кардиальной меди сопровождается высоким уровнем содержания меди в крови у пациентов с ишемическими заболеваниями миокарда. Поэтому считают, что медь высвобождается из миокарда в кровоток в форме, которая не может быть повторно использована ишемизированным миокардом. Это резкое поступление меди из миокарда в кровоток в неусвояемой для миокарда форме является, как полагают, главной причиной подавления транскрипционной активности HIF-1 α , которая сопровождает продолжительную ишемию миокарда. Следовательно, у пациентов с хроническими ишемическими заболеваниями миокарда вследствие потери доступной для миокарда меди может не происходить активации генов, регулируемых с помощью HIF-1, важной стадии восстановления и регенерации ткани. Поэтому промотирование соответствующего распределения меди в ткани может служить эффективной стратегией при лечении различных ишемических заболеваний и состояний.

Триентин представляет собой хорошо известный хелатирующий агент, который применяют для обезвреживания меди. Дигидрохлорид триентина является фармацевтически приемлемой солью триентина, которую широко используют для связывания и удаления избыточного количества меди в организме при лечении болезни Вильсона, в частности, у пациентов, не переносящих пеницилламин. Купер с соавторами (Cooper et al.) описал применение триентина и других соединений, нейтрализующих действие меди, при лечении различных нарушений, в том числе диабета и его осложнений (например, диабетической кардиомиопатии), сердечно-сосудистых заболеваний, нейродегенерации и связанных с митохондриями заболеваний. См., например, патентные документы U.S. Patent No. 7459446, U.S. Patent No. 7928094, international application publication No. WO 2003/077901 A1, international application publication No. WO 2005/058294 A1 и international application publication No. WO 2007/055598 A1.

Содержание всех публикаций, патентов и патентных заявок включено в настоящее изобретение путем ссылок на них.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предлагается способ повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ направленной доставки меди в клетки ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, включающей хелатирующий медь тетра-

мин и ион меди, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

В различных аспектах настоящего изобретения индивидуум имеет нарушенную систему восстановления тканей или индивидуум не имеет нарушенной системы восстановления тканей.

В одном аспекте настоящего изобретения ион меди в композиции образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином, при этом комплекс хелатирующего медь тетрамина и иона меди является кристаллическим веществом.

В одном аспекте настоящего изобретения композиция включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды.

В одном аспекте настоящего изобретения ион меди в композиции не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином.

В некоторых вариантах осуществления любого одного из описанных выше способов эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят перорально.

В некоторых вариантах осуществления любого одного из описанных выше способов эффективное количество композиции включает от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг в сутки хелатирующего медь триентина.

В некоторых вариантах осуществления любого одного из описанных выше способов композицию вводят по меньшей мере два раза в сутки; предпочтительно композицию вводят в течение по меньшей мере приблизительно одного месяца.

В некоторых вариантах осуществления любого одного из описанных выше способов введение композиции приводит к содержанию в крови по меньшей мере приблизительно 0,005 мг/л хелатирующего медь триентина. Предпочтительно введение композиции приводит к содержанию в крови по меньшей мере приблизительно 0,005 мг/л хелатирующего медь триентина в течение по меньшей мере приблизительно 1 недели.

В некоторых вариантах осуществления любого одного из описанных выше способов дополнительно проводят постоянный контроль внутриклеточного содержания меди у индивидуума. Кроме того, осуществляют корректировку дозирования композиции, исходя из внутриклеточного содержания меди у индивидуума.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей эффективное количество хелатирующего медь триентина, ион меди и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ, стабилизаторов, разбавителей.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. Предпочтительно фармацевтическая композиция представлена в форме таблетки, капсулы или пилюли.

Далее, изобретение включает применение композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, при производстве лекарственного препарата для повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань. Дополнительно, изобретение относится к применению композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, при производстве лекарственного препарата для направленной доставки меди в клетки ишемизированной ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

Кроме того, изобретение включает применение композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, при производстве лекарственного препарата для усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) в ишемизированной ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань. Кроме того, изобретение включает применение композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, для повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается применение композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, для направленной доставки меди в клетки ишемизированной ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается применение композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, для усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) в ишемизированной ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

Кроме того, предлагается набор, включающий композицию тетрамина, включающую хелатирующий медь тетрамин и ион меди, упаковку, и инструкцию по применению для лечения заболевания или состояния, связанного с ишемическим поражением ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

Следует иметь в виду, что описанные в настоящем изобретении аспект и варианты осуществления изобретения могут "состоять" и/или "состоять по существу" из аспектов и вариантов осуществления изобретения.

Ссылка в изобретении на "приблизительную" величину или параметр включает (и описывает) разбросы, которые непосредственно относятся к этой величине или параметру. Например, описание, относящееся к "приблизительно X", включает описание "X".

Используемый в изобретении термин "приблизительно X-Y" имеет такое же значение, как "от приблизительно X до приблизительно Y".

Используемые в изобретении и прилагаемых пунктах формулы изобретения формы единственного числа включают и формы множественного числа, если из содержания в явном виде не следует иное.

Для любого специалиста в этой области является очевидным, что индивидуум, которого подвергают исследованию, которого выбирают и/или которого подвергают лечению, является индивидуумом, в отношении которого необходимы такие действия.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 изображена кристаллическая структура комплекса триентина и иона меди, который дополнительно связан с двумя ионами хлора и молекулой воды. Необозначенные атомы являются атомами водорода.

На фиг. 2 приведен примерный набор длин связей, углов связей и торсионных углов для кристаллической структуры, изображенной на фиг. 1.

На фиг. 3 приведены данные по совершенствованию кристаллической структуры кристалла, изображенного в качестве примера на фиг. 1.

На фиг. 4А-4С приведены атомные координаты и анизотропные параметры атомов в уточненной кристаллической структуре фиг. 3.

На фиг. 4А приведены дробные атомные координаты и параметры эквивалентного изотропного замещения неводородных атомов.

На фиг. 4В приведены параметры эквивалентного анизотропного замещения неводородных атомов.

На фиг. 4С приведены атомные координаты и параметры изотропного замещения атомов водорода.

На фиг. 5 графически изображена схема проведения эксперимента в примере 2.

На фиг. 6 графически представлены данные по внутриклеточным концентрациям меди в первичной культуре кардиомиоцитов новорожденных крыс в различных экспериментальных группах в примере 2.

На фиг. 7 графически изображена схема проведения эксперимента в примере 3.

На фиг. 8А показаны обнаруженные методом эхокардиографии морфологические изменения в толщине межжелудочковой перегородки (IVSD) крыс в группах с констрикцией восходящей аорты (ААС) и имитацией операции при проведении лечения или без проведения лечения триентином.

На фиг. 8В показаны обнаруженные методом эхокардиографии морфологические изменения в толщине задней стенки левого желудочка (IVPWD) крыс в группах с констрикцией восходящей аорты (ААС) и имитацией операции при проведении лечения или без проведения лечения триентином.

На фиг. 9А показаны обнаруженные методом эхокардиографии функциональные изменения в фракции выброса левого желудочка (EF) крыс в группах с констрикцией восходящей аорты (ААС) и имитацией операции при проведении лечения или без проведения лечения триентином.

На фиг. 9В показаны обнаруженные методом эхокардиографии функциональные изменения в фракции укорочения левого желудочка (FS) крыс в группах с констрикцией восходящей аорты (ААС) и имитацией операции при проведении лечения или без проведения лечения триентином.

На фиг. 10А приведены средние концентрации меди в тканях сердца крыс в имитационной контрольной группе и в группах с констрикцией восходящей аорты (ААС), подвергнутых и не подвергнутых лечению триентином.

На фиг. 10В приведены средние концентрации меди в плазме крови крыс в имитационной контрольной группе и в группах с констрикцией восходящей аорты (ААС), подвергнутых и не подвергнутых лечению триентином. Исходную высокую концентрацию меди в плазме крови крыс с констрикцией восходящей аорты (ААС) понижали в результате лечения триентином как в группах, подвергаемых лечению высокой дозой триентина (АСС-Tr(H)), так и в группах, подвергаемых лечению низкой дозой триентина (АСС-Tr(L)).

На фиг. 11 графически изображена схема проведения эксперимента в примере 4.

На фиг. 12 показаны обнаруженные методом эхокардиографии изменения в фракции выброса левого желудочка (EF) обезьян макак-резус с сердечной недостаточностью в подвергнутых и не подвергнутых лечению триентином группах.

На фиг. 13 приведены концентрации меди в образцах различных тканей обезьян макак-резус с сердечной недостаточностью в подвергнутых и не подвергнутых лечению триентином группах.

На фиг. 14 графически изображена схема проведения эксперимента в примере 5.

На фиг. 15 показаны обнаруженные методом эхокардиографии изменения во фракции выброса левого желудочка (LVEF) мышей с инфарктом миокарда в подвергнутых и не подвергнутых лечению триентином группах.

На фиг. 16 приведены концентрации меди в образцах различных тканей мышей с инфарктом миокарда в подвергнутых и не подвергнутых лечению триентином группах.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предлагаются способы и композиции для восстановления и регенерации ишемизированной ткани путем промотирования перераспределения и повторного использования меди в ткани. В частности, описаны способы повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, путем введения композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин (такой как триентин) и, необязательно, медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. Описанное изобретение основано на неожиданном обнаружении того, что хелатирующий медь тетрамин (такой как триентин), ранее применяемый для удаления ионов меди и снижения содержаний меди, может промотировать перераспределение меди между ишемизированным миокардом и кровотоком, когда его применяют по любому из способов настоящего изобретения. Триентин, например, может специфически связываться с ишемизированной тканью и способствовать загрузке меди в клетки в ишемизированной ткани. Поэтому триентин и другие хелатирующие медь тетрамины с аналогичными свойствами могут применяться для повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированном миокарде, в результате чего происходит восстановление медь-зависимой транскрипционной активности NIF-1, промотирование восстановления ткани и обратное развитие ишемического инфаркта миокарда. Поэтому описанные в изобретении способы и композиции могут применяться для лечения различных ишемических заболеваний и состояний.

Способы повышения внутриклеточного содержания меди.

Настоящее изобретение в одном аспекте предлагает способ повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин (далее так же называемый "композицией тетрамина"). В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиции тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиции тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг, или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, и введение индивидууму эффективного количества медь-промотирующей композиции, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может увеличивать ввод меди, уменьшать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может изменять распределение меди между органеллами клетки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления композиции тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от прибли-

зительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, и введение индивидууму эффективного количества медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество медь-промотирующей композиции повышает внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, где индивидууму ранее была введена медь-промотирующая композиция, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может увеличивать ввод меди, уменьшать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, где индивидууму ранее вводили эффективное количество медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество медь-промотирующей композиции повышает внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ доставки иона меди в клетки ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В

токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ промотирования перераспределения меди в ткани и повторного использования меди у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующей медь тетрамин, где индивидууму ранее вводили эффективное количество медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующей медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество медь-промотирующей композиции повышает внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточное содержание меди повышают приблизительно более чем на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500% или более в ишемизированной ткани индивидуума по сравнению с внутриклеточным содержанием меди в ишемизированной ткани индивидуума до лечения. В некоторых вариантах осуществления содержание меди (например, суммарное содержание меди) в ишемизированной ткани индивидуума повышают приблизительно более чем на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500% или более по сравнению с содержанием меди в ишемизированной ткани индивидуума до лечения. В некоторых вариантах осуществления способ не понижает внеклеточное содержание меди (например, содержание меди в сыворотке крови) у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ не понижает внеклеточное содержание меди (например, содержание меди в сыворотке крови) у индивидуума приблизительно более чем на 5, 10, 20, 30, 40, 50% или более по сравнению с внеклеточным содержанием меди у индивидуума до лечения. В некоторых вариантах осуществления способ не понижает суммарное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ не понижает суммарное содержание меди у индивидуума приблизительно более чем на 5, 10, 20, 30, 40, 50% или более по сравнению с суммарным содержанием меди у индивидуума до лечения. В некоторых вариантах осуществления после введения композиции тетрамина, индивидуум имеет по меньшей мере приблизительно 50, 60, 70, 80, 90% или более от среднего суммарного содержания меди в сыворотке крови здоровых индивидуумов.

Любой из описанных выше способов может дополнительно включать постоянный контроль (в том числе измерение и определение) содержания меди у индивидуума и корректировку плана лечения на основе данных по содержанию меди. В некоторых вариантах осуществления содержание меди представляет собой внеклеточное содержание меди в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления содержание меди представляет собой содержание меди в сыворотке крови индивидуума. В некоторых вариантах осуществления содержание меди представляет собой внутриклеточное содержание меди в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления содержание меди представляет собой суммарное содержание меди, включающее как содержание Cu^{1+} , так и содержание Cu^{2+} и/или включающее как внутриклеточное, так и внеклеточное содержание меди. В некоторых вариантах осуществления содержание меди представляет собой содержание Cu^{2+} . В некоторых вариантах осуществления содержание меди представляет собой содержание Cu^{1+} . В некоторых вариантах осуществления содержание меди представляет собой содержание свободной (т.е. несвязанной) меди. В некоторых вариантах осуществления содержание меди включает в себя как содержание свободной меди, так и содержание связанной с белком меди. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает постоянный контроль внутриклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает корректировку дозу (в том числе, например, эффективного количества, частоты введения и их комбинации) композиция тетрамина на основе данных по внутриклеточному содержанию меди у индивидуума.

Различные содержания меди могут постоянно контролироваться либо отдельно, либо в комбинации, до и/или после каждой стадии введения, и соответствующие содержания меди до и после введения композиций тетрамина могут быть подвергнуты сравнению для определения, повышается ли или пони-

жается содержание меди в результате применяемого плана лечения. В некоторых вариантах осуществления содержание меди, измеренное после введения композиции тетрамина, сравнивают с заданным содержанием меди, для того чтобы определить, требуется ли дополнительное повышение содержание меди. Заданное содержание меди может представлять собой минимальное содержание меди (такое как внутриклеточное содержание меди или внеклеточное содержание меди), которое необходимо для усиления медь-зависимой транскрипционной активности HIF и/или для индуцирования одного или более процессов восстановления ишемизированной ткани. План лечения может быть скорректирован (включая рассмотрение таких вопросов, как, например, необходимость введения медь-промотирующей композиции, доза, частота и продолжительность введения композиции тетрамина и, необязательно, медь-промотирующей композиции и т.д.) на основе любого одного из внеклеточного содержания меди в ишемизированной ткани, содержания меди в сыворотке крови индивидуума, внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани, других содержаний меди у индивидуума и их комбинаций. Кроме того, для оценки плана лечения, может постоянно контролироваться степень восстановления пораженной ишемией ткани. Способы постоянного контроля восстановления пораженной ишемией ткани описаны в разделе "Способы индуцирования восстановления ткани", которые могут включать, но этим не ограничиваясь, оценки патологических, гистологических или молекулярных маркеров, связанных с ишемическим поражением ткани.

В некоторых вариантах осуществления любого одного из описанных в изобретении способов (в том числе способов в разделе "Способы индуцирования восстановления ткани), способ дополнительно включает постоянный контроль внутриклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточное содержание меди у индивидуума нуждается в дополнительном повышении после введения композиции тетрамина, если внутриклеточное содержание меди составляет по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более процентов ниже заданного внутриклеточного содержания меди. В некоторых вариантах осуществления, когда внутриклеточное содержание меди нуждается в дополнительном повышении, план лечения индивидуума корректируют путем любого из следующих действий или их комбинации: (a) продолжают введение композиции тетрамина; (b) вводят композицию тетрамина при более высокой дозе; или (c) вводят композицию тетрамина при более высокой частоте дозирования. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает корректирование дозы (в том числе, например, эффективного количества, частоты введения и их комбинации) композиции тетрамина на основе внутриклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает постоянный контроль внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления внеклеточное содержание меди у индивидуума нуждается в дополнительном повышении после введения композиции тетрамина, если внеклеточное содержание меди у индивидуума снижается по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более после введения композиции тетрамина, или если внеклеточное содержание меди у индивидуума составляет по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более ниже заданного внеклеточного содержания меди. В некоторых вариантах осуществления, когда внеклеточное содержание меди у индивидуума нуждается в повышении, план лечения индивидуума дополнительно корректируют путем любого из следующих действий или их комбинации: (a) вводят композицию тетрамина, включающую ион меди, когда композиция тетрамина при применяемом плане лечения не включает ион меди; (b) вводят медь-промотирующую композицию, когда применяемый план лечения не включает введения медь-промотирующей композиции; (c) увеличивают дозу медь-промотирующей композиции; (d) увеличивают частоту введения дозы медь-промотирующей композиции; (e) вводят другую медь-промотирующую композицию или (f) прекращают введение композиции тетрамина индивидууму.

Содержания меди могут быть определены и/или могут постоянно контролироваться любым известным методом. Например, содержание меди может быть количественно определено методом атомной абсорбционной спектrophотометрии, методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICPMS) или методом рентгеновской микроскопии испускания, индуцированного белком (PIXE). См., например, публикации Cooper G.J.S. et al. *Diabetes* (2004), 53:2501-2508; Lu J. et al. *Drug Metabolism and Disposition* (2007), 35(2):221-227; и патентный документ US Patent Publication No. 20100160428A1. Например, суммарное содержание меди в образце ишемизированной ткани может быть измерено, используя гомогенизированный образец ишемизированной ткани (такой как ишемизированная ткань, гомогенизированная с помощью азотной кислоты), который включает как внутриклеточное, так и внеклеточное содержимое ишемизированной ткани. Внутриклеточное содержание меди в образце ишемизированной ткани может быть измерено, используя клетки, выделенные из образца ишемизированной ткани, и клетки затем лизируют для высвобождения внутриклеточного содержимого перед анализом. Внеклеточное содержание меди у индивидуума может быть измерено, используя образец физиологической жидкости, в том числе, но этим не ограничиваясь, сыворотку крови, плазму, цереброспинальную жидкость, лимфу и слезь. В некоторых вариантах осуществления сыворотку крови используют для постоянного контроля внеклеточного содержания меди. В некоторых вариантах осуществления биопсию печени используют для определения содержания метаболизированной меди у индивидуума. Метод спектроскопии электрон-

ного парамагнитного резонанса, например, может быть использован для определения степени окисления (Cu^{1+} в сравнении с Cu^{2+}) меди в образце и для определения процентного содержания меди в каждой степени окисления в образце. Так, например, содержание Cu^{2+} может быть рассчитано, используя долю Cu^{2+} в образце и суммарное содержание меди, включающее как содержание Cu^{1+} , так и содержание Cu^{2+} . Аналогично, содержание Cu^{1+} может быть рассчитано, используя долю Cu^{1+} в образце и суммарное содержание меди, включающее как содержание Cu^{1+} , так и содержание Cu^{2+} . В некоторых вариантах осуществления измеряют концентрацию церулоплазмينا в сыворотке и/или концентрацию белка сывороточного альбумина, например используя методы на основе антител (например, вестерн-блоттинг, ELISA и другие подобные методы) для постоянного контроля содержания меди, которая доступна для усвоения и/или повторного использования ишемизированной тканью. В некоторых вариантах осуществления образец поперечного среза ишемизированной ткани может быть использован для измерения как внутриклеточного, так и внеклеточного содержания меди, используя методы рентгенофлуоресцентной визуализации (XRF).

Описанные в изобретении способы могут обычно применяться для перераспределения меди (в том числе, например, для повышения внутриклеточного содержания меди и/или доставки меди в клетки) в различных ишемизированных тканях. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань выбирают из группы, состоящей из ишемизированной сердечной ткани, ишемизированной ткани печени, ишемизированной ткани головного мозга, ишемизированной легочной ткани, ишемизированной ткани почки, ишемизированной кожной ткани, ишемизированной ткани пищеварительного тракта и ишемизированной ткани скелетной мышцы (такой как ишемизированная ткань конечности). В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная сердечная ткань. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная ткань головного мозга.

Способы индуцирования восстановления ткани.

Настоящее изобретение в одном аспекте предлагает способ индуцирования по меньшей мере одного (в том числе, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более) процесса восстановления ткани в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования по меньшей мере одного (в том числе, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более) процесса восстановления ткани в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, и эффективного количества медь-промотирующей композиции, которое может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования по меньшей мере одного (в том числе, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более) процесса восстановления ткани в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, и эффективного количества медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых

вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования по меньшей мере одного (в том числе, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более) процесса восстановления ткани в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, где индивидууму было введено ранее эффективное количество медь-промотирующей композиции которое может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования по меньшей мере одного (в том числе, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более) процесса восстановления ткани в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, где индивидууму ранее вводили эффективное количество медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления любого одного из описанных выше способов индуцирования восстановления ткани по меньшей мере один процесс (например, по меньшей мере два процесса) восстановления ткани включает индуцирование миграции стволовых клеток в ишемизированную ткань, в том числе, но этим не ограничиваясь, мезенхимальных стволовых клеток (MSC), мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSC), мультипотентных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS) или стволовых клеток, образующихся в различных тканях. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один процесс (например, по меньшей мере два процесса) восстановления ткани включает индуцирование дифференцировки стволовых клеток в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один процесс (например, по меньшей мере два процесса) восстановления ткани включает индуцирование регенерации ткани в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один процесс (например, по меньшей мере два процесса) восстановления ткани включает обратное развитие повреждения в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один процесс (например, по меньшей мере два процесса) восстановления ткани включает восстановление микроокружения нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один процесс (например, по меньшей мере два процесса) восстановления ткани включает индуцирование сигнальной молекулы, которая инициирует регенерацию ткани. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один процесс (например, по меньшей мере два процесса) восстановления ткани включает усиление медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) в ишемизированной ткани.

Описанные в изобретении способы могут применяться для индуцирования процессов восстановле-

ния ткани (в том числе, например, усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) и/или индуцирования миграции стволовых клеток в ишемизированную ткань) в различных типах ишемизированных тканей. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань выбирают из группы, состоящей из ишемизированной сердечной ткани, ишемизированной ткани печени, ишемизированной ткани головного мозга, ишемизированной легочной ткани, ишемизированной ткани почки, ишемизированной кожной ткани, ишемизированной ткани пищеварительного тракта и ишемизированной ткани скелетной мышцы (такой как ишемизированная ткань конечности). В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная сердечная ткань. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная ткань головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования миграции (т.е. хоуминга) стволовых клеток в ишемизированную ткань индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования миграции (т.е. хоуминга) стволовых клеток в ишемизированную ткань индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, и эффективного количества медь-промотирующей композиции, которое может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования миграции (т.е. хоуминга) стволовых клеток в ишемизированную ткань индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, и эффективного количества медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования миграции (т.е. хоуминга) стволовых клеток в ишемизированную ткань индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, где индивидууму было введено ранее эффективное количество медь-промотирующей композиции, которое может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать вы-

ведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования миграции (т.е. хоуминга) стволовых клеток в ишемизированную ткань индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующую медь тетрамин, где индивидууму ранее вводили эффективное количество медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующей медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки представляют собой мезенхимальные стволовые клетки (MSC), мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (BMSC), мультипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) или стволовые клетки, образующиеся в различных тканях. В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки, образующиеся в тканях, представляют собой стволовые клетки, образующиеся в жировой ткани, стволовые клетки, образующиеся в сердечной ткани, или стволовые клетки, образующиеся в ткани пупочного канатика. В других вариантах осуществления стволовые клетки представляют собой взрослые стволовые клетки. В конкретных аспектах, взрослые стволовые клетки представляют собой кроветворные стволовые клетки, стволовые клетки молочной железы, кишечинальные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки в плаценте, жировой ткани, легком, костном мозге, крови, вартонове студне пупочного канатика или зубах (например, периваскулярной нише пульпы зуба и соединительной связки периодонта), эндотелиальные стволовые клетки, нейрональные стволовые клетки, взрослые стволовые клетки органов обоняния, стволовые клетки нейрального гребня или зародышевые стволовые клетки (например, стволовые клетки в семеннике).

В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки мигрируют *in vivo* из компартмента органа или ткани к месту ишемического повреждения в другом компартменте органа или ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани. Например, мезенхимальные стволовые клетки (MSC) могут мигрировать из костного мозга (BM), пуповинной крови (UCB), пуповинной стромы (вартонова студня), плаценты и жировой ткани (AT). В других вариантах осуществления мезенхимальные стволовые клетки (MSC) могут быть выделены из компартмента органа или ткани, обогащены и/или обработаны *in vitro* и затем использованы *in vivo* для миграции к месту повреждения органа или ткани.

Методы исследования для измерения миграции клеток, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают, но этим не ограничиваясь, биомаркеры, биолюминесценцию, флуоресценцию, позитронно-эмиссионную томографию (PET)/компьютерную томографию, и магнитнорезонансную томографию (MRI) *in vivo*. Исследования *in vivo* могут быть валидизированы и подтверждены другими методами, например, иммуногистохимическим исследованием (ИНС) на срезах ткани.

In vivo методы неинвазивной визуализации для исследования миграции стволовых клеток включают визуализирующие частицы с нанесенным слоем золото-декстран, загружаемые в мезенхимальные стволовые клетки (MSC), которые могут быть визуализированы с помощью рентгеноспектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, компьютерной томографии (СТ) или воздействий ультразвука (US). В некоторых вариантах осуществления в стволовые клетки, такие как мезенхимальные стволовые клетки (MSC), загружают биосовместимые наноконструкции, меченые вещества или суперпарамагнитные частицы со свойствами, позволяющим осуществлять визуализацию клеток рентгеноспектроскопией, компьютерной томографией (СТ), воздействием ультразвука (US), позитрон-эмиссионной томографией (PET) или магнитнорезонансной томографией (MRI). В некоторых вариантах осуществления миграция стволовых клеток может быть исследована такими методами, как наложение лигатуры и прокол слепой кишки (CLP). Например, проведение CLP на химерной мыши с зеленым флуоресцентным белком (GFP) позволяет наблюдать поведение мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSC) на фоне абдоминального сепсиса. Сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS), проточная цитометрия и иммуногистохимическое исследование могут быть использованы для отслежи-

вания миграции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSC) в периферическую кровь, легкое, печень, рану на коже и первичный очаг ишемического повреждения. Поведение мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSC) может быть соотнесено с временем повреждения, а также с локальным (используя полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (RT-PCR)) и системным содержанием цитокинов и хемокинов. Отслеживание миграции стволовых клеток может помочь выяснить вклад мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSC) в восстановлении и регенерацию локального и удаленного органа и ткани после ишемического поражения ткани.

В некоторых вариантах осуществления миграция стволовых клеток может постоянно контролироваться с помощью меченых клеток, вводимых индивидууму. Для того чтобы пометить стволовые клетки используют такие подходы, как введение изотопных меток и окрашивание. В некоторых вариантах осуществления методы введения метки включают введение стволовых клеток самцов самкам, вследствие чего Y хромосома может являться трекером; введение стволовых клеток вида А виду В, вследствие чего специфические гены вида А могут являться трекером для клеток; нанесение метки на стволовые клетки с помощью рКН26, BrdU или других красителей, вследствие чего стволовые клетки можно отслеживать по окраске или по специфическим ферментативным реакциям с трекером.

В некоторых вариантах осуществления для отслеживания стволовых клеток *in vivo* используют изотопные метки. Стволовые клетки могут отслеживаться с помощью изотопов, которыми метят клетки, но следует отметить, что при этом необходимо учитывать проблемы техники безопасности и период полураспада радиоизотопа. Другие *in vivo* методы отслеживания стволовых клеток включают, но этим не ограничиваясь, окрашивание клеток с помощью красителей для клеток, таких как DiD, прижизненную визуализацию поверхности клеток организма методом микроскопии флуоресценции с двухфотонным возбуждением, прижизненную визуализацию поверхности специфических клеток организма трансгенных животных методом микроскопии флуоресценции с двухфотонным возбуждением, нанесение меток на клетки с помощью частиц супермагнитного оксида железа (SPIO) и отслеживание трекера методом магнитно-резонансной томографии (MRI) и другие методы. Стволовые клетки могут быть помечены с помощью многих флуоресцентных красителей и затем введены животным. Незадолго до проведения эксперимента по отслеживанию, органы-мишени могут быть заморожены, из них приготовлены срезы, и эти срезы изучают непосредственно методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Этот метод отслеживания не требует слишком большого количества меченых клеток (10^6 клеток/кролик), поэтому аутологичные клетки могут отслеживаться в естественных условиях для органов и тканей.

Введение метки в стволовые клетки может быть осуществлено, например, с помощью одного единственного трекера, такого как рКН26. рКН26 является жирорастворимым красителем, и при использовании рКН26 в качестве метки он не проходит через клеточную мембрану. Поэтому рКН26 применяют для прижизненной визуализации. Описанный в изобретении метод отслеживания может включать в себя введение множества меток с помощью 2 или 3 красителей. В некоторых вариантах осуществления для введения множества меток используют ядерный трекер (DAPI, Hoechst) плюс мембранный трекер. Ядерный трекер подтверждает присутствие ядер клеток и одновременно отображает мембранный трекер рКН26. В некоторых вариантах осуществления для введения множества меток используют два мембранных трекера, например, Dio (3) и рКН26. Эти трекеры метят клетки посредством аналогичных механизмов, но имеют различные длины волн возбуждения и излучения, что позволяет одновременно подтвердить миграцию (т.е. хоуминг) стволовых клеток (таких как мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (BMSC)) по двум различным флуоресцентным сигналам. В этом методе отслеживания только перекрывающиеся сигналы с различными длинами волн (такие как красные и зеленые сигналы) считают сигналами хоуминга.

Многие виды тканей животных являются автофлуоресцирующими, и наиболее распространенной автофлуоресценцией в природных тканях является зеленая флуоресценция. Клетки сердечной ткани имеют относительно низкую флуоресценцию, но их флуоресценция является достаточно сильной, для того чтобы создавать помехи при наблюдениях. Обрезанная кромка срезов всегда имеет самую сильную флуоресценцию. Для исключения помех только зеленые и красные перекрывающиеся сигналы могут быть отнесены к сигналам слежения. Красная флуоресценция является более подходящей для статистического анализа с помощью величины интегральной оптической плотности (IOD) ввиду ее специфичности (кроме случаев очевидной погрешности сигналов красной флуоресценции).

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования дифференцировки стволовых клеток в ишемизированной ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с

хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму медь-промотирующей композиции, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум предварительно вводит медь-промотирующую композицию, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка способна к дифференцировке в мезенхимный тип клеток, в том числе в остеобласты, адипоциты, хондроциты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, энтероциты, остеоциты, нейрциты, гепатоциты, нефроциты, миоциты (скелетной мышцы и гладкой мышцы) и кардиомиоциты. В других вариантах осуществления стволовая клетка способна к дифференцировке в клетки немезодермального происхождения, в том числе в бета-клетки, гепатоциты и нейроны. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

Хорошо известные методы анализа могут применяться для выявления процесса дифференцировки стволовых клеток и фенотипов дифференцированных стволовых клеток (таких как мезенхимальные стволовые клетки, например, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга), в том числе, но этим не ограничиваясь, щелочная фосфатаза и окрашивание ализариновым красным S для остеобластов, окрашивание масляным красным O для адипоцитов и окрашивание альциановым синим для хондрогенеза. Дифференцировка стволовых клеток, таких как мезенхимальные стволовые клетки, в клетки различных типов может быть также исследована путем анализа экспрессии гена. Например, анализ транскрипции позволяет идентифицировать специфические гены, вовлеченные в остеогенную дифференцировку (FHL2, ITGA5, Fgf18), хондрогенез (FOXO1A) и теногенез (Smad8). В некоторых вариантах осуществления мезенхимальные стволовые клетки могут порождать большие количества клеток в результате широкомаштабного роста.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования регенерации ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму медь-промотирующей композиции, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму предварительно вводят медь-промотирующую композицию, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления способ индуцирует пролиферацию клеток в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления способ индуцирует ангиогенез в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления способ индуцирует созревание кровеносных сосудов в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет достигать двух или более из описанных выше эффектов. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

Описанная в изобретении регенерация ткани может быть исследована, например, в организме, в котором часть ткани повреждена или удалена. Описанную в изобретении композицию тетрамина затем вводят в организм и определяют степень регенерации ткани. Степень регенерации ткани можно сравнить со степенью регенерации, наблюдаемой при введении в организм контрольного вещества или в случае

отсутствия лечения. Другие параметры, которые могут быть определены при исследовании регенерации ткани, включают, но этим не ограничиваясь, симптомы или результаты лечения, такие как боль или источники боли, признаки или симптомы воспаления, конечная степень регенерации и качество регенерации. В некоторых вариантах осуществления исследование в изобретении регенерации ткани включает оценку одного или более параметров функционирования органа, таких как один или более маркеров функционирования сердца, один или более маркеров функционирования почек и один или более маркеров функционирования головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления один или более из следующих параметров при анализе регенерации и восстановления сердечной ткани могут быть использованы для оценки описанных в изобретении способов: (1) количество восстановленной ткани или масса миокарда и венечной сосудистой системы; (2) число и размер восстановленных миоцитов и сосудов; (3) интеграция вновь образовавшихся миоцитов и сосудов с окружающим их миокардом и (4) происхождение регенерированных миокардиальных структур. В одном аспекте может быть проведена магнитно-резонансная томография (MRI) для исследования области рубцевания, глобальной функции левого желудочка, регионарной функции (подвижности и утолщения стенки) и регионарной вентрикулярной перфузии. В другом аспекте магнитно-резонансную томографию (MRI) используют для выявления и/или подтверждения присутствия новых сосудов, ткани или клеток, которые улучшают функцию желудочка. В еще одном аспекте, может быть проведено гистопатологическое исследование для определения области рубцевания и идентификации и количественной оценки c-kit положительных стволовых клеток сердца. Гистопатологическое исследование также позволяет получить данные по распределению, размеру и плотности новых сосудов и кардиомиоцитов. Гистопатологическое исследование дает возможность документально подтвердить процесс восстановления на уровне ткани и на клеточном уровне. Например, проводят испытания для оценки, в гистологических срезах при инфаркте, плотности микрососудистой сети (vWF-положительные сосуды/мм²), BrdU положительных клеток и c-kit положительных клеток.

Количественное определение плотности микрососудистой сети с использованием фактора фон Виллебранда (vWF) позволяет определить количество новых кровеносных сосудов, образовавшихся в зоне инфаркта. BrdU положительные клетки характеризуют пролиферацию клеток, в том числе клеток сердца. Тесты на C-kit положительные клетки показывают количество стволовых клеток в выбранных гистологических срезах при инфаркте.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования обратного развития повреждения в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму медь-промотирующей композиции, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму предварительно вводят медь-промотирующую композицию, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

Обратное развитие повреждения ткани может быть исследовано подходящим методом, например, детектированием клеточных маркеров гомеостаза здоровой ткани и/или устойчивого повреждения ткани (например, иммуногистохимическим методом или измерением уровней ДНК и транскриптов), измерением площади повреждения или объема повреждения или оценкой любых клинически релевантных показателей. Например, обратное развитие повреждения сердечной ткани в подвергнутой инфаркту ткани может быть измерено путем подсчета числа клеток, например числа миоцитов, фибробластов или количества образовавшихся рубцов, или с помощью функциональных исследований производительности или структурных аспектов функции сердца, включая конечное диастолическое давление в левом желудочке

(LVEDP), диастолическое давление в левом желудочке (LVDP), максимальную скорость нарастания давления в левом желудочке в ранней фазе систолы (dp/dt), минимальную скорость нарастания давления в левом желудочке в ранней фазе систолы (dp/dt), массу левого желудочка, объем камеры и диастолическое напряжение стенки. В общем случае раскрытый в изобретении способ, как указано, индуцирует обратное развитие повреждения в ишемизированной ткани, если он приводит в результате к значительному изменению (например, по меньшей мере в 2 раза) любой такой клинической оценки или любой ее комбинации. В некоторых вариантах осуществления способ индуцирует обратное развитие фиброза в ишемизированной ткани. Фиброз представляет собой аномальное накопление фиброзной ткани, которое может происходить как часть процесса заживления раны в поврежденной ткани. Такое повреждение ткани может быть результатом физической травмы, воспаления, инфекции, воздействия токсинов и других причин.

Фиброзные ткани накапливаются в сердце и кровеносных сосудах в результате гипертонии, гипертензивной кардиопатии, атеросклероза и инфаркта миокарда. Высокое кровяное давление или гипертония может вызываться рядом факторов и часто приводит к развитию гипертензивной кардиопатии (HHD), которая в свою очередь может вызывать остановку сердца и инфаркт миокарда. Аналогично, атеросклероз и другие ишемические заболевания сердца также часто приводят к остановке сердца. Эти сердечно-сосудистые заболевания все характеризуются накоплением внеклеточной матрицы или фиброзного отложения, которые приводят к потере эластичности сосудистой сети и к потере эластичности самой сердечной ткани. Это отложение фиброзного материала является ответной реакцией на повреждение, вызываемое гипертензивным и/или склеротическим состоянием, но эффекты этой ответной реакции также оказывают негативное воздействие на эластичность сосудов и ткани сердца, а также вызывают гипертрофию желудочков. В ряде случаев повышенный кардиальный фиброз при сердечно-сосудистом заболевании нарушает или изменяет сигналы, передаваемые кардиомиоцитам через каркас для поддержки тканей сердца, что впоследствии приводит к нарушению эффективности сердечной деятельности и способствует остановке сердца и инфаркту миокарда.

В соответствии с настоящим изобретением профили экспрессии генов, дифференциально регулируемые при повреждении ткани, могут быть использованы для оценки обратного развития повреждения ткани в раскрытом в изобретении способе лечения.

Например, микроматричный анализ экспрессии гена может быть основан на анализе клеток человека (таких как фибробласты и кардиомиоциты), подвергнутых воздействию выбранных стимулов, приводящем к изменениям внеклеточной аккумуляции коллагена и пролиферации, отличительным признакам фиброза. Могут быть выбраны такие стимулы, которые имитируют стимулы при тканеспецифическом фиброзе. Профили экспрессии генов, связанные с фиброзом (например, фиброзом печени, фиброзом легкого, фиброзом ткани сердца, диабетической нефропатией и фиброзом почек), могут затем быть использованы для исследования фиброза и обратного развития фиброзного повреждения ткани. В других вариантах осуществления профили экспрессии генов, связанные с обратным развитием фиброза (например, при лечении, известном, по меньшей мере, для частичного обратного развития фиброза), могут быть использованы для исследования фиброза и обратного развития фиброзного повреждения ткани.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ восстановления микроокружения клеток нейروفибриллы и нейросекреторных клеток в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму медь-промотирующей композиции, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму предварительно вводят медь-промотирующую композицию, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах

осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

Микроокружение представляет собой сложную сеть как структурных клеток, так и воспалительных клеток, цитокинов, белков и факторов роста. В случае ишемии, связанной с фиброзными заболеваниями или состояниями сердца, сердце включает резидентные структурные клетки, такие как кардиомиоциты, эпителиальные клетки, фибробласты, и резидентные клетки-предшественники кардиомиоцитов и клетки, секретирующие цитокины. В процессе развития фиброза эти клетки взаимодействуют с факторами фиброза. В конкретных аспектах в создании фиброзной среды важную роль играют фибробласты и миофибробласты, так как они выделяют избыточный коллаген и матричные материалы, которые приводят к необратимому образованию рубцов. Молекулы межклеточной адгезии и лиганды внеклеточного матрикса являются важными факторами в фиброзном микроокружении и промотируют фиброз и дифференцировку фибробластов. В некоторых вариантах осуществления исследуют опосредованную адгезией активацию сигнального пути в микроокружении ткани. Например, дифференцировка и миграция клеток происходят в ответ на механические раздражители из микроокружения, такие как жесткость окружающей матрицы. В одном аспекте исследуют и модулируют эластичность ткани или матриц культур мезенхимальных стволовых клеток (MSC) для промотирования хоуминга стволовых клеток в ишемическую поврежденную ткань, дифференцировки стволовых клеток в месте ишемического повреждения, восстановления ткани и/или обратного развития повреждения ткани. В одном варианте осуществления мягкие матрицы вызывают дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (MSC) в нейрон-подобные клетки, тогда как жесткие матрицы вызывают дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (MSC) в миогенные клетки. В одном аспекте исследуют внеклеточный матрикс и его компоненты в месте ишемического повреждения, для того чтобы выяснить, промотирует ли микроокружение миграцию стволовых клеток к месту повреждения ткани, дифференцировку стволовых клеток в месте ишемического повреждения, восстановление ткани и/или обратное развитие повреждения ткани.

В некоторых вариантах осуществления измеряют изменения в клетках в условиях их естественного окружения, для того чтобы выяснить эффективность и/или токсичность раскрытого в изобретении способа лечения. В некоторых вариантах осуществления исследуют и/или модулируют микроокружение стволовых клеток в донорной ткани или органе (таком как, костный мозг) и в месте ишемического повреждения, для того чтобы промотировать миграцию стволовых клеток к месту повреждения, дифференцировку стволовых клеток в месте ишемического повреждения, восстановление ткани и/или обратное развитие повреждения ткани. Местное микроокружение ткани может быть исследовано путем окрашивания белка (методом иммуногистохимии (IHC) и иммунофлуоресценции (IF)) и путем окрашивания РНК методом либо хромогенной, либо флуоресцентной гибридизации *in situ* (ISH). Например, гипоксическое микроокружение может быть выявлено окрашиванием маркера гипоксии, окрашиванием маркера эндотелиальных клеток, исследованием плотности микрососудистой сети и исследованием проксимального окружения. Микроокружение ткани может быть также исследовано с использованием органных культур или органотипических культур, описанных в публикации Benbrook, 2006, *Drug Discovery Today: Disease Models*, 3(2):143-148.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования сигнальной молекулы, которая инициирует регенерацию ткани в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму медь-промотирующей композиции, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму предварительно вводят медь-промотирующую композицию, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

Описанные в изобретении подходящие сигнальные молекулы включают, но этим не ограничиваясь, HIF-1, VEGF, SDF-1, CXCR4, CXCL12 (также называемый SDF-1 α), MMP, HGF/c-met, TGF- β 1, IL-1 β , TNF- α , CCR1, CCR4, CCR7, CCR10, CCR9, CXCR5, CXCR6, CD44, CD54, CD56, CD106, E-кадгерин, P-селектин, интегрины, такие как интегрин-бета1 и CD49a, b, c, e, f (интегрины α 1, 2, 3, 4, 6) и лиганды интегрин, такие как VCAM и ICAM.

Ось SDF-1/CXCR4 является одним из важнейших механизмов хоуминга стволовых клеток. SDF-1 (фактор стромальных клеток 1 или CXCL12), принадлежащий к семейству CXС-хемокинов, представляет собой белок, секретируемый малой молекулой. Экспрессия SDF-1 регулируется с помощью HIF-1 (индуцируемого гипоксией фактора-1). HIF-1 состоит из HIF-1 α и HIF-1 β /ARNT (ядерного транслокатора с арильным углеводородным рецептором, ARNT). HIF-1 β стабилен в цитоплазме, поэтому экспрессия и накопление HIF-1 α определяет активность HIF-1. В условиях нормоксии происходит синтез белка HIF-1 α и его быстрая деградация под воздействием системы убиквитин-протеасома. Проллигидроксилазы (PHD) гидроксилируют HIF-1 α , и гидроксилированный HIF-1 α распознается белком-супрессором опухолевого роста фон Хиппель-Линдау (pVHL), который образует убиквитин-протеин лигазу, которая таргетирует HIF-1 α на деградацию белка. После ишемического поражения ткани, поврежденная область является гипоксической, и она ингибирует активность проллигидроксилазы (PHD), что способствует накоплению HIF-1 α и транслокации его в ядро, где HIF-1 α димеризуется с HIF-1 β с образованием HIF-1, объединяется с другими факторами и инициирует транскрипцию генов-мишеней. Поврежденные ткани экспрессируют высокий уровень SDF-1 и высвобождают SDF-1 в кровоток, создавая градиент концентрации между поврежденной областью и отдаленной частью кровотока. В результате градиент направляет CXCR4 экспрессируемые стволовые клетки, включая мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (BMSC), к поврежденным тканям.

Когда сердце находится в состоянии хронической гипоксии, кровь в коронарных артериях не может удовлетворить потребности миокарда. Хроническая ишемия может вызвать фиброз миокарда, уменьшить плотность сети микроартерий, ухудшить нагнетание крови и привести, в конечном счете, к ишемическому инфаркту миокарда. При хронической ишемии активность HIF-1 ограничена, что приводит к ингибированию экспрессии ангиогенных факторов, которые регулируются с помощью HIF-1. В результате невозможно восстановить кровоток и может произойти инфаркт.

Обычно активность HIF-1 в тканях, поврежденных в результате ишемии, временно ограничена. Как в экспериментах на животных, так и при клинических испытаниях было показано, что при сердечной ишемии в поврежденных тканях сразу после повреждения накапливается HIF-1 α , но затем его содержание постепенно уменьшается. Активность HIF-1 падает даже быстрее, чем содержание HIF-1, что приводит к уменьшению экспрессии факторов, регулируемых HIF-1, таких как VEGF и SDF-1, после транзиторного повышения активности. Благодаря регуляции с помощью HIF-1, экспрессия SDF-1 достигает максимального значения на первый или второй день после инфаркта миокарда. Затем экспрессия SDF-1 постепенно уменьшается и достигает исходного уровня приблизительно через один месяц. Поскольку SDF-1 является одним из мобилизаторов хоуминга стволовых клеток, снижение уровня SDF-1 приводит к снижению и даже исчезновению хоуминга стволовых клеток.

Важно отметить, что защитные механизмы, индуцируемые с помощью HIF-1 α , которые активируются в условиях острой ишемии, функционируют иначе, чем в условиях длительной ишемии. В условиях длительной ишемии уровни белка HIF увеличиваются в ишемизированном миокарде, тогда как гены, регулируемые HIF (такие как VEGF), супрессируются, что приводит к уменьшению реваскуляризации и нарушению регенерации. Потеря меди снижает связывание HIF-1 α с последовательностью гипоксия-респонсивного элемента (HRE) генов-мишеней и с P300, компонентом транскрипционного комплекса HIF-1. Кроме того, медь существенно мобилизуется из миокарда в кровь после продолжительной ишемии. Эта мобилизация меди в коронарный поток чутко сопровождает длительную, но не кратковременную сердечную ишемию. Потеря меди в миокарде коррелирует со степенью утраты сердечных функций. Следовательно, даже при условии повышенного содержания белка HIF не происходит повышения регуляции HIF-контролируемых генов из-за потери меди в миокарде. Элементы в следовых количествах, такие как медь, могут приводить к активации HIF-1, включающей синтез HIF-1 α , стабилизацию, транслокацию из цитозоля в ядро, связывание с последовательностью HRE генов-мишеней и образование транскрипционного комплекса HIF-1. Поэтому медь-зависимая транскрипционная активность HIF-1, включающая медь-зависимую индукцию генов-мишеней HIF-1 или медь-зависимую репрессию генов-мишеней HIF-1, может играть важную роль в восстановлении ишемизированных тканей. Описанные в изобретении способы могут применяться для индуцирования одной или нескольких сигнальных молекул, таких как HIF-1 α и медь-зависимые HIF-1 (такие как HIF-1 α) гены-мишени.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается способ усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуще-

ствления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления способ индуцирует экспрессию по меньшей мере одного медь-зависимого HIF-1 гена мишени в ишемизированной ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ репрессирует экспрессию по меньшей мере одного медь-зависимого HIF-1 гена мишени в ишемизированной ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один медь-зависимый HIF-1 ген-мишень выбирают из группы, состоящей из VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 и BNIP3. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, и эффективного количества медь-промотирующей композиции, которое может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления способ индуцирует экспрессию по меньшей мере одного медь-зависимого HIF-1 гена мишени в ишемизированной ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ репрессирует экспрессию по меньшей мере одного медь-зависимого HIF-1 гена мишени в ишемизированной ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один медь-зависимый HIF-1 ген-мишень выбирают из группы, состоящей из VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 и BNIP3. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, и эффективного количества медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления способ индуцирует экспрессию по меньшей мере одного медь-зависимого HIF-1 гена мишени в ишемизированной ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ репрессирует экспрессию по меньшей мере одного медь-зависимого HIF-1 гена мишени в ишемизированной ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один медь-зависимый HIF-1 ген-мишень выбирают из группы, состоящей из VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 и BNIP3. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, где индивидууму было введено ранее эффективное количество медь-промотирующей композиции, которое может повышать

внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления способ индуцирует экспрессию по меньшей мере одного медь-зависимого HIF-1 гена-мишени в ишемизированной ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ репрессирует экспрессию по меньшей мере одного медь-зависимого HIF-1 гена мишени в ишемизированной ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один медь-зависимый HIF-1 ген-мишень выбирают из группы, состоящей из VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 и BNIP3. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, где индивидууму ранее вводили эффективное количество медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления способ индуцирует экспрессию по меньшей мере одного медь-зависимого HIF-1 гена-мишени в ишемизированной ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ репрессирует экспрессию по меньшей мере одного медь-зависимого HIF-1 гена мишени в ишемизированной ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере, один медь-зависимый HIF-1 ген-мишень выбирают из группы, состоящей из VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 и BNIP3. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В научной литературе описаны HIF-1 гены-мишени. См., например, публикацию Benita Y. et al., (2009), *Nucleic Acids Research*, 37(14):4587-4602; Shen C. et al., (2008), *J. Biol. Chem.*, 280: 20580-20588; Elvidge G.P. et al., (2006), *J. Biol. Chem.*, 281:15215-15266; Manalo D.J. et al., (2005), *Blood*, 105: 659-669; при этом HIF-1 гены-мишени включены в изобретение путем ссылки на них. Регуляция транскрипции с помощью HIF-1 субпопуляции HIF-1 генов-мишеней зависит от меди, и субпопуляцию HIF-1 генов-мишеней называют в изобретении медь-зависимыми HIF-1 генами-мишенями. Регуляция транскрипции с помощью HIF-1 некоторых генов-мишеней HIF-1 не зависит от меди. См., например, публикацию Zhang Z. et al., (2014), *Metallomics*, 6(10):1889-93. Примеры медь-зависимых HIF-1 генов мишеней включают, но этим не ограничиваясь, фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH), транспортер глюкозы 1 (GLUT1), фосфоглицераткиназу 1 (PGK1) и BCL2/аденовирус E1B 19 кДа белок-взаимодействующий белок 3 (BNIP3).

Медь-зависимая транскрипционная активность HIF-1, рассматриваемая в настоящем изобретении, включает индукцию или репрессию (т.е. транскрипционную регуляцию) экспрессии медь-зависимых HIF-1 генов-мишеней в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления медь-зависимая транскрипционная активность HIF-1 (например, кратность индукции или репрессии медь-зависимого гена-мишени HIF-1) снижается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более в ишемизированной ткани индивидуума до проведения лечения по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления медь-зависимая транскрипционная активность HIF-1 (например, кратность индукции или репрессии медь-зависимого гена-мишени HIF-1) в ишемизированной ткани индивидуума восстанавливается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с контрольным уровнем после проведения лечения индивидуума. Контрольный уровень медь-зависимой транскрипционной активности HIF-1 может основываться на сумме индукции или репрессии гена-мишени HIF-1 в здоровой ткани в условиях острой ишемии или при состояниях гипоксии сопоставимого уровня по сравнению с нормальными условиями (например, отсутствие повреждений или нормальные условия снабжения кислородом). Медь-зависимая транскрипционная активность HIF-1 может быть определена путем сравнения уровня экспрессии (например, уровня РНК и/или уровня белка) медь-зависимого HIF-1 гена-мишени в ишемизированной ткани с уровнем экспрессии медь-зависимого HIF-1 гена-мишени в

здоровой ткани. Уровни экспрессии РНК могут быть измерены любым из известных методов, включающих, но этим не ограничиваясь, полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (RT-PCR), количественную RT-PCR, микроматричный анализ и методы секвенирования РНК. Уровни экспрессии белка могут быть измерены любым из известных методов, включающих, но этим не ограничиваясь, методы на основе применения антител (такие как вестерн-блоттинг и ELISA) и количественные протеомические методы (такие как количественная масс-спектрометрия).

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования по меньшей мере двух (в том числе, например, по меньшей мере любого из 3, 4, 5, 6, 7 или более) процессов восстановления ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, где по меньшей мере два процесса восстановления ткани выбирают из группы, состоящей из индуцирования миграции стволовых клеток, таких как мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, в ишемизированную ткань, индуцирование дифференцировки стволовых клеток в ишемизированной ткани, индуцирования регенерации ткани в ишемизированной ткани, индуцирования сигнальной молекулы, которая инициирует регенерацию ткани, обратного развития повреждения в ишемизированной ткани, восстановления микроокружения клеток нейрофибрилла и нейросекреторных клеток в ишемизированной ткани и усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1). В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму медь-промотирующей композиции, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму предварительно вводят медь-промотирующую композицию, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования миграции стволовых клеток (таких как мезенхимальные стволовые клетки (MSC), например, мезенхимальные стволовые клетки головного мозга (BMSC)) в ишемизированную ткань и индуцирования дифференцировки стволовых клеток в ишемизированной ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования миграции стволовых клеток (таких как мезенхимальные стволовые клетки (MSC), например, мезенхимальные стволовые клетки головного мозга (BMSC)) в ишемизированную ткань и индуцирования регенерации ткани в ишемизированной ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования миграции стволовых клеток (таких как мезенхимальные стволовые клетки (MSC), например, мезенхимальные стволовые клетки головного мозга (BMSC)) в ишемизированную ткань, индуцирования дифференцировки стволовых клеток в ишемизированной ткани, и индуцирования регенерации ткани в ишемизированной ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для

снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму медь-промотирующей композиции, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму предварительно вводят медь-промотирующую композицию, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования восстановления ишемизированной ткани (или улучшения функции ишемизированной ткани) у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань выбирают из группы, состоящей из ишемизированной сердечной ткани, ишемизированной ткани печени, ишемизированной ткани головного мозга, ишемизированной легочной ткани, ишемизированной ткани почки, ишемизированной кожной ткани, ишемизированной ткани пищеварительного тракта и ишемизированной ткани скелетной мышцы (такой как ишемизированная ткань конечности). В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная сердечная ткань. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная ткань головного мозга. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования восстановления ишемизированной ткани (или улучшения функции ишемизированной ткани) у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, и эффективного количества медь-промотирующей композиции, которое может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань выбирают из группы, состоящей из ишемизированной сердечной ткани, ишемизированной ткани печени, ишемизированной ткани головного мозга, ишемизированной легочной ткани, ишемизированной ткани почки, ишемизированной кожной ткани, ишемизированной ткани пищеварительного тракта и ишемизированной ткани скелетной мышцы (такой как ишемизированная ткань конечности). В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная сердечная ткань. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная ткань головного мозга. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования восстановления ишемизированной ткани (или улучшения функции ишемизированной ткани) у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, и эффективного количества медь-

промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и медь-промотирующую композицию вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань выбирают из группы, состоящей из ишемизированной сердечной ткани, ишемизированной ткани печени, ишемизированной ткани головного мозга, ишемизированной легочной ткани, ишемизированной ткани почки, ишемизированной кожной ткани, ишемизированной ткани пищеварительного тракта и ишемизированной ткани скелетной мышцы (такой как ишемизированная ткань конечности). В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная сердечная ткань. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная ткань головного мозга. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования восстановления ишемизированной ткани (или улучшения функции ишемизированной ткани) у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, где индивидууму было введено ранее эффективное количество медь-промотирующей композиции, которое может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань выбирают из группы, состоящей из ишемизированной сердечной ткани, ишемизированной ткани печени, ишемизированной ткани головного мозга, ишемизированной легочной ткани, ишемизированной ткани почки, ишемизированной кожной ткань, ишемизированной ткани пищеварительного тракта и ишемизированной ткани скелетной мышцы (такой как ишемизированная ткань конечности). В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная сердечная ткань. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная ткань головного мозга. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования восстановления ишемизированной ткани (или улучшения функции ишемизированной ткани) у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин, где индивидууму ранее вводили эффективное количество медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводили медь-промотирующую композицию приблизительно за 1 день, за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня, за 5 дней, за 6 дней, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели или более до введения композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань выбирают из группы, состоящей из ишемизированной сердечной ткани, ишемизированной ткани печени, ишемизированной ткани головного мозга, ишемизированной легочной ткани, ишемизированной ткани почки, ишемизированной кожной ткань, ишемизированной ткани пищеварительного тракта и ишемизированной ткани скелетной мышцы (такой как ишемизированная ткань конечности). В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная сердечная ткань. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная ткань головного мозга. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

Кроме того, предлагаются способы лечения заболевания или состояния, связанного с ишемическим поражением ткани, используя любой из описанных в изобретении способов.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ лечения ишемической сердечной недостаточности у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин (такой как триентин). В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят в течение по меньшей мере приблизительно 1 месяца (например, по меньшей мере приблизительно 3 месяцев или по меньшей мере приблизительно 6 месяцев). В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет функцию выброса левого желудочка (LVEF) не более чем приблизительно 35% от нормального уровня. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет сердечную недостаточность класса II или класса III (на основе классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (New York Heart Association) или функциональной классификации (Functional classification NYHA)).

Сердечная недостаточность любого класса или стадии, которая имеет ишемическое происхождение (например, ишемическая сердечная недостаточность), может быть подвергнута лечению описанными в изобретении способами. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет сердечную недостаточность I класса NYHA ишемического происхождения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет ишемическую сердечную недостаточность II класса NYHA ишемического происхождения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет ишемическую сердечную недостаточность III класса NYHA ишемического происхождения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет ишемическую сердечную недостаточность IV класса NYHA ишемического происхождения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет ишемическую сердечную недостаточность класса A NYHA ишемического происхождения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет ишемическую сердечную недостаточность класса B NYHA ишемического происхождения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет ишемическую сердечную недостаточность класса C NYHA ишемического происхождения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет ишемическую сердечную недостаточность класса D NYHA ишемического происхождения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет один или несколько симптомов ишемической сердечной недостаточности, таких как утомление, учащенное сердцебиение, одышка или ограничение физической активности. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет один или несколько симптомов сердечно-сосудистого заболевания. В некоторых вариантах осуществления индивидуум был госпитализирован в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20, 25, 30 и более дней.

Эффективность любого из описанных в изобретении способов может быть дополнительно определена путем оценки степени восстановления ишемизированной ткани. Восстановление ткани можно оценить, например, по площади повреждения или объему повреждения. Восстановление поврежденной ткани у пациента может быть оценено, используя любой клинически релевантный стандарт. Например, восстановление поврежденной ткани можно измерить путем подсчета числа клеток, например числа миоцитов, фибробластов, или количества рубцов или с помощью функциональных анализов производительности или структурных аспектов сердечной функции, включая конечное диастолическое давление в левом желудочке (LVEDP), диастолическое давление в левом желудочке (LVDP), максимальную скорость нарастания давления в левом желудочке в ранней фазе систолы (dp/dt), минимальную скорость нарастания давления в левом желудочке в ранней фазе систолы (dp/dt), массу левого желудочка, объем камеры и диастолическое напряжение стенки. В целом, считается, что описанный в изобретении способ восстанавливает поврежденную ткань, если в результате существенно (например, по меньшей мере в 2 раза) изменится любая такая клиническая оценка или любая комбинация оценок.

Для исследования восстановления ткани может быть применен любой подходящий метод (методы). Например, могут применяться методы для оценки заживления ткани, для оценки функциональности восстановленной ткани и для оценки клеточного роста в ткани. Для определения степени заживления ткани может быть проведено гистологическое исследование и окрашивание клеток с целью выявления размножения посеянных клеток и/или улучшения гистологического признака. В ряде случаев могут быть собраны участки ткани и обработаны фиксатором, таким как, например, нейтральный забуференный раствор формалина. Такие участки ткани могут быть обезвожены, залиты парафином и секционированы микротомом для гистологического анализа. Срезы могут быть окрашены гематоксилином и эозином (H & E) и затем помещены на предметные стекла для микроскопической оценки морфологии и насыщенности клетками. В некоторых случаях могут применяться физиологические исследования для оценки подвижности ткани и функциональности после проведения лечения предложенными в изобретении способами и веществами. Например, могут быть проведены испытания механических свойств *in vitro* для измерения работы при сгибании (WOF) или угла сгибания восстановленной ткани сухожилия или восстановленного сустава. Исследования *in vivo* могут включать функциональную оценку органов, оценку симптомов или

методы визуализации.

В некоторых вариантах осуществления функцию ткани и/или органа до, во время или после применения раскрытого в настоящем изобретении способа лечения можно оценить любым одним или более из следующих методов: биохимическим исследованием по меньшей мере одного биомаркера, указывающего на улучшение функции ткани, такими методами, как проточная цитометрия, иммунофлуоресценция, ELISA, введение люминесцентной метки, гибридизация, амплификация нуклеиновой кислоты или вестерн-блоттинг; исследованиями функции клеток, такими как исследования апоптоза клеток, исследования некроза и исследования жизнеспособности клеток, включая окрашивание аннексином V с иммунофлуоресцентным определением или определением проточной цитометрией, определение активности каспазы, исследования гипоксии, исследование с помощью терминального дезоксиуридинового мечения концов (TUNEL), электрофоретическое расщепление ДНК клеток, количество палочковидных клеток при воздействии H_2O_2 , количественная оценка экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции и измерение некротической области путем окрашивания гематоксилином и эозином; исследованиями образования рубцов, включая подсчет числа фибробластических клеток в поврежденной области или пораженной инфарктом области, измерение отложения коллагена и уровня других матричных белков, связанных с образованием рубца; исследованиями миграции стволовых клеток или клеток-предшественников в поврежденную область и любыми другими клинически значимыми исследованиями функции органов.

В некоторых вариантах осуществления сердечная функция может быть оценена по одному или более из следующих показателей: механические свойства миоцитов и слияние клеток, например, частотность распределения размеров миоцитов, пиковое укорочение, скорость укорочения и повторного удлинения, и оценка слияние клеток (количество X-хромосом); производительность или структурные аспекты сердечной функции, включая конечное диастолическое давление в левом желудочке (LVEDP), диастолическое давление в левом желудочке (LVDP), максимальную скорость нарастания давления в левом желудочке в ранней фазе систолы (dp/dt), минимальную скорость нарастания давления в левом желудочке в ранней фазе систолы (dp/dt), массу левого желудочка, объем камеры и диастолическое напряжение стенки, и сравнение пациентов с инфарктом миокарда, подвергавшихся лечению и не подвергавшихся лечению; регенерация миокарда, например состав регенерированного миокарда, оценка BrdU-положительных клеток в области инфаркта у субъектов, подвергавшихся лечению, по сравнению с субъектами, не подвергавшихся лечению, и миозин-положительные клетки в области инфаркта у субъектов, подвергавшихся лечению, по сравнению с субъектами, не подвергавшихся лечению; структурные показатели сердца, такие как размер инфаркта, степень фиброза и гипертрофия кардиомиоцитов. В конкретных вариантах осуществления раскрытый в изобретении способ дополнительно включает измерение одного или более показателей сердечной функции, где указанными показателями сердечной функции являются измеренный по изменению импеданса грудной клетки сердечный выброс сердца (CO), сердечный индекс (CI), давление заклинивания в легочной артерии (PAWP), % фракции укорочения (% FS), фракции выброса (EF), фракции выброса левого желудочка (LVEF); конечный диастолический диаметр левого желудочка (LVEDD), конечный систолический диаметр левого желудочка (LVESD), сократительная способность (dP/dt), снижение функции предсердий или желудочков, увеличение эффективности прокачки, снижение скорости потери эффективности прокачки, снижение потери гемодинамической функции или уменьшение осложнений, связанных с кардиомиопатией по сравнению с контролем.

В некоторых вариантах осуществления может быть оценена функция мозга до, во время или после применения раскрытого в изобретении способа лечения, путем проведения неврологического тестирования или электрофизиологического исследования, например, исследования уменьшения отношения сигнал/шум, или биохимического исследования, например, путем анализа по меньшей мере одного биомаркера, характеризующего функцию органа, функцию ткани и/или функцию клеток центральной или периферической нервной системы. Примеры электрофизиологических методов включают электроэнцефалографию (EEG), электрокардиографию (EKG), электромиографию (EMG), событийно-обусловленные потенциалы мозга (ERP), вызванные потенциалы мозга (EP), магнитоэнцефалографию (MEG) и исследование проводимости нервов (NCS). В других вариантах осуществления функция мозга может быть оценена любым одним или более из следующих методов или показателей: по общей умственной деятельности, например, на основе тестирования по сокращенной шкале интеллекта Векслера и по шкале-III интеллекта Векслера для взрослых; по основному вниманию, например, на основе тестирования на запоминание цифровой последовательности, пространственных подтестов по шкале-III памяти Векслера; по сложному вниманию (кратковременной памяти), например, на основе тестирования на запоминание цифровой последовательности, последовательности номеров букв и арифметических подтестов по шкале-III интеллекта Векслера для взрослых; по способности к целенаправленной деятельности, например, на основе висконсинского теста сортировки карточек, теста В на построение маршрута, теста Струпа, теста "Лондонская башня", теста на азартные игры, тестирования по поведенческой шкале лобных систем и Айова-шкале функции лобовой доли; по памяти (визуальной и вербальной), например, на основе тестирования по шкале-III памяти Векслера, теста Рея на слухоречевое заучивание, калифорнийского теста-II на слухоречевое заучивание, уточненного теста на кратковременную зрительную память; по регуляции отрицательных эмоций, например, на основе тестирования по многостадийному личностному опроснику-2 уни-

верситета штата Миннесота, теста Струпа на аффективные расстройства, тестирования по поведенческой шкале лобных систем и Айова-шкале функции лобовой доли; по интерпретации эмоциональных стимулов, например, диагностическим анализом невербального поведения (DANVA); по скорости обработки информации, например, на основе индекса скорости обработки информации (поиска символов, кодирования) при тестировании по интеллектуальной шкале-III Векслера для взрослых, на основе теста на построение маршрута и теста на сопоставление символов и цифр; по речи, например, на основе бостонского теста на наименование; путем использования контролируемого устного теста на словесную ассоциацию; путем использования теста на семантическую вербальную беглость и испытания на мультилингвальную афазию; путем использования визуально-конструкционных тестов, таких как тест комплексной фигуры Рея-Остеррица, подтесты на деление на группы и группировку предметов при тестировании по интеллектуальной шкале-III Векслера для взрослых; и путем использования тестов на пространственную ориентацию, таких как матричные рассуждения при тестировании по интеллектуальной шкале-III Векслера и тест на суждение об ориентации линии.

В некоторых вариантах осуществления проводят исследования характеристик состояния скелетной мышцы до, во время или после применения раскрытого в изобретении способа лечения. В некоторых вариантах осуществления характеристики состояния скелетной мышцы включают боль в мышцах, повреждение мышц, метаболические изменения при физической нагрузке и реорганизацию цитоскелета. Функция скелетной мышцы может представлять собой мышечную силу, выносливость мышц, адаптацию к тренировке, нормальное состояние мышцы, которое позволяет двигаться суставам, или стандартный физиологический метаболизм и функцию скелетной мышцы у здорового млекопитающего. Может быть измерена любая функциональная переменная скелетной мышцы, в том числе мышечная сила (максимальная сила, возникающая при конкретном движении), выносливость мышц (максимальное количество сокращений, которые могут быть выполнены с заданной частотой и силой) и мощность мышц (сила/время, максимальный эффект, создаваемый мышцей). Типичные специфические для мышц функции включают, но этим не исчерпывая, дифференцировку миообластов, детерминацию миообластов, развитие мышц, сокращение мышц, саркомерные изменения, слияние миообластов, развитие соматических мышц и миогенез.

В некоторых вариантах осуществления оценивают фиброз скелетной мышцы пациента. Существует ряд методов определения состояния фиброза скелетной мышцы, включая взятие биоптата мышечной ткани у пациента и гистохимическое или иммуногистохимическое исследование биоптата, окрашенного красителями, чувствительными к присутствию фиброзной ткани. Примеры гистохимического исследования включают окрашивание, например, гематоксилином и эозином (H & E), трихромом и аденозинтрифосфатазой (например, при pH 4,3, 4,65 и 10,4). Типичные антитела, которые могут быть использованы для введения метки в мышечные волокна для иммуногистохимического исследования, включают, например, миозин, коллаген типа IV, ламинин, фибронектин и дистрофии. В качестве варианта, может быть использован функциональный метод определения степени поражения фиброзом скелетной мышцы пациента. Функциональный метод включает проведение одного или более набора тестов и физических измерений у пациента. Такие тесты и измерения обычно включают тесты на неврологическую эффективность, оценки мышечной силы, равновесия, походки, осанки, сенсорной координации и тесты на функцию легких, например, жизненную емкость легких и емкость форсированного выдоха, причем все они могут быть проведены с помощью хорошо известных методов. В некоторых вариантах осуществления восстановление ткани можно оценить по уровню (уровням) экспрессии одной или более сигнальных молекул, описанных в изобретении. Подходящие биомаркеры в качестве индикаторов восстановления ткани включают, но этим не ограничиваясь, биомаркер повреждения ДНК, биомаркер воспалительного ответа, биомаркер повреждения ткани, биомаркер восстановления поврежденной ткани или гематологический суррогатный маркер, такой как p53, p21, GADD45a, ATM, фосфорилированный H2AX-гистон, IL-6, CRP, SAA, IL-1, IL-5, IL-10, KC/GRO, IFN, IL-2, IL-4, TNF-альфа, IL-12, IL-3, IL-7, IL-6, бета-амилазы слюны, цитрулированные белки, S100B, SP-D, BPI, TSP, CA15-3, CDBB, CKMB, CKMM, FABP2, GFAP, NSE, CD5, CD-16b, CD20, CD177, CD26, CD27, CD40, CD45, Flt-3L, G-CSF, KFG, EPO, TPO, GM-CSF или SDF-1 α .

Медь (включая ион меди) является регулятором одного или более факторов (например, факторов транскрипции), участвующих в восстановлении повреждения ткани и/или в регенерации ткани, и, следовательно, восстановление ткани можно оценить путем оценки любого одного или более из этих факторов. Регулируемые медью факторы включают, но этим не ограничиваясь, белки гомеостаза меди, такие как Ctr 1, Ctr 3, DMT1, Atox 1, ATP7A/7B, Cox 17, CCS, Sco 1/2, Cox 11, глутаматные рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDAR), белок-предшественник амилоида (APP), домен гена MURR1 метаболизма меди (COMMD1), X-связанный ингибитор апоптоза (XIAP), гомоцистеин (Hcy), субъединица II цитохром-с-оксидазы (COX II), субъединица I цитохром-с-оксидазы (COX I), FGF-1, VEGF, ангиопоэтин (такой как ANG1 или ANG2), фибронектин, коллагеназа, MMPs-TIMPs, эластин, PDGF и eNOS; внутриклеточные Cu-связывающие белки, такие как цитохром-с-оксидаза C (CCO), супероксиддисмутаза (SOD), металлотионеин (MT), глутатион (GSH), допамин- β -монооксигеназа (DBH), пептидилглицин- α -

амидирующая монооксигеназа (PAM), тирозиназа, фенилаланингидроксилаза, диаминооксидаза, гестин и гликопротеин хрящевого матрикса; внеклеточные Cu-связывающие белки, такие как церулоплазмин (CP), лизилоксидаза (LOX), альбумин (ALB), транкуппермин, аминоксидаза, факторы свертывания крови V и VIII, ферроксидаза II, внеклеточная супероксиддисмутаза и внеклеточный металлотионеин. Регулируемые медью факторы раскрыты в публикации Zheng et al., Role of copper in regression of cardiac hypertrophy, Pharmacol. Ther. doi:10.1016/j.pharmthera. 2014.11.014 (2014), содержание которой включено в изобретение путем ссылки на нее. В некоторых вариантах осуществления медь или ион меди регулирует транскрипционную активность одного или более HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1 и сигнальные сети, регулируемые этими факторами транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления анализируют уровень и/или активность одного или более описанных в изобретении факторов, регулируемых медью, у индивидуума после его лечения с помощью раскрытой в изобретении терапевтической или профилактической композиции. В некоторых вариантах осуществления определяют уровень и/или активность одного или более HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1 и затем находят их взаимосвязь с ответом индивидуума на воздействие терапевтической или профилактической композиции. В некоторых вариантах осуществления ответ обнаруживают путем измерения клеточных маркеров гомеостаза нормальной ткани и/или стойкого повреждения ишемизированной ткани (например, путем иммуногистохимического анализа или измерения уровней ДНК и транскрипта), путем измерения площади повреждения или объема повреждения, или оценки любых клинически значимых показателей. Таким образом, в конкретных аспектах, уровень и/или активность одного или более регулируемых медью факторов (таких как HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1) можно использовать в качестве биомаркера конечной точки ответа индивидуума на описанную в изобретении схему терапевтического или профилактического лечения.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько раскрытых в изобретении регулируемых медью факторов могут быть использованы в прогностическом тесте для анализа и прогнозирования ответа на раскрытые в изобретении композицию тетрамина или на способ лечения или профилактики. Например, уровень и/или активность одного или более HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1 могут указывать на вероятность того, что у индивидуума будет достигнут положительный ответ на раскрытую в изобретении лечебную или профилактическую композицию, и лечебную или профилактическую композицию можно вводить индивидууму. И наоборот, если уровень и/или активность одного или более HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1 указывает на то, что у индивидуума, с большой долей вероятности, не будет достигнут ответ или будет достигнут отрицательный ответ на лечебную или профилактическую композицию, то может быть предписан альтернативный курс лечения. Отрицательный ответ может означать либо отсутствие эффективного ответа, либо наличие токсичных побочных эффектов. Ответ на терапевтическое или профилактическое лечение может быть предсказан при проведении предварительного исследования, в котором субъектов в любой из следующих групп генотипируют: в группе, в которой достигается положительный ответ на режим лечения, в группе, в которой практически отсутствует ответ на режим лечения, и в группе, в которой достигается отрицательный ответ на режим лечения (например, проявляется один или более побочных эффектов). Эти группы представлены в качестве примеров, и могут быть проанализированы и другие группы и подгруппы. На основе результатов этих анализов индивидуума генотипируют, для того чтобы предсказать, будет ли он или она иметь положительный ответ на режим лечения, практически не иметь положительного ответа на режим лечения или иметь отрицательный ответ на режим лечения. Поэтому в некоторых вариантах осуществления уровень и/или активность одного или более HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1 могут быть использованы в качестве индикаторов ответа индивидуума на описанную в изобретении схему терапевтического или профилактического лечения. Индикаторы ответа можно оценивать до, во время и/или после применения схемы терапевтического или профилактического лечения. Например, один или более индикаторов ответа могут быть оценены во время интервалов между дозированием при продолжительном введении, для того чтобы оценить, достигается ли положительный ответ у индивидуума при продолжительном лечении или требуется альтернативное лечение.

Описанные выше прогностические тесты могут применяться при клинических испытаниях. Используя описанные в изобретении способы, могут быть идентифицированы один или более индикаторов ответа (например, HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1). Затем может быть проведен скрининг потенциальных участников клинических испытаний композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин и, необязательно, медь-промотирующую композицию, содержащую ион меди, для того чтобы выявить тех индивидуумов, которые с большой долей вероятности будут иметь положительный ответ на композицию тетрамина, и исключить тех индивидуумов, у которых с большой долей вероятности будут проявляться побочные эффекты. Таким образом, может быть измерена эффективность лечения у индивидуумов, у которых достигается положительный ответ на композицию тетрамина, без снижения результатов измерений из-за включения в клинические испытания индивидуумов, у которых, с большой долей вероятности, не будет достигнут положительный ответ в процессе исследования, и без риска возникновения нежелательных проблем безопасности.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования восстановления ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, без повышения экспрессии VEGF в месте инъекции, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования роста кровеносных сосудов в направлении места ишемического повреждения у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования роста кровеносных сосудов в направлении места ишемического повреждения у индивидуума, без повышения экспрессии VEGF в месте инъекции, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму медь-промотирующей композиции, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму предварительно вводят медь-промотирующую композицию, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань выбирают из группы, состоящей из ишемизированной сердечной ткани, ишемизированной ткани печени, ишемизированной ткани головного мозга, ишемизированной легочной ткани, ишемизированной ткани почки, ишемизированной кожной ткани, ишемизированной ткани пищеварительного тракта и ишемизированной ткани скелетной мышцы (такой как ишемизированная ткань конечности). В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная сердечная ткань. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная ткань головного мозга. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

Образование и рост кровеносных сосудов в ткани может происходить путем ангиогенеза и/или васкулогенеза. В некоторых вариантах осуществления кровеносные сосуды включают капилляроподобные структуры, функция которых заключается в поддержке переноса крови. В некоторых вариантах осуществления ангиогенез включает процесс, принимающий участие в росте новых кровеносных сосудов из уже существующих сосудов, ангиогенез в результате прорастания, образование нового кровеносного сосуда путем прорастания существующих, или ангиогенез в результате разделения (интуссусцепции), образование нового кровеносного сосуда путем разделения существующих сосудов. В некоторых вариантах осуществления васкулогенез включает в себя процесс, связанный с формированием совершенно новых кровеносных сосудов в результате пролиферации эндотелиальных стволовых клеток, например, образование новых кровеносных сосудов, которых ранее не существовало.

В некоторых вариантах осуществления для образования и роста кровеносных сосудов необходимы сигналы от факторов роста и других белков, которые непосредственно контролируют процесс, таких как ангиопоэтин (например, Ang-1 и Ang-2), эфрин (Eph), факторы роста эндотелия сосудов (например, VEGF-A и VEGF-C), фактор роста тромбоцитов (PDGF), факторы роста фибробластов (например, FGF-1 и FGF-2), фактор- α некроза опухоли (TNF- α), интерлейкин (IL), моноцитарный хемотактический белок-1 (MCP-1) (также известный как CCL-2), трансформирующий фактор роста- α (TGF- α), трансформирующий фактор роста- β (например, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 и TGF- β 4), эндостатин, вазохибин, хемокины, тромбоспондин, ангиостатин, молекулы адгезии сосудистого эндотелия (например, VCAM-1), матричные металлопротеиназы (например, MMP-2 и MMP-9), интегрин, кадгерин, активаторы плазминогена и ингибиторы активатора плазминогена.

В некоторых вариантах осуществления рост кровеносных сосудов исследуют путем измерения эндотелиальной пролиферации клеток, которая необходима для развития капилляров, у интактного животного. В некоторых вариантах осуществления действие вводимой композиции тетрамина, включающей

хелатирующий медь тетрамин, на эндотелиальную пролиферацию может быть оценено путем прямого подсчета клеток, синтеза ДНК и/или по метаболической активности.

Например, эндотелиальные клетки могут быть выделены из места ишемического повреждения и исследованы на скорость их пролиферации после лечения композицией тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В других вариантах осуществления пролиферация эндотелиальных клеток в месте ишемического повреждения может постоянно контролироваться путем введения в клетки метки и измерения количества клеток, синтеза ДНК и/или метаболической активности *in situ*. В других вариантах осуществления индивидууму могут быть введены меченые эндотелиальные клетки, и можно постоянно контролировать *in situ* пролиферацию меченых эндотелиальных клеток в месте ишемического повреждения. В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки метят радиоизотопом, флуоресцентным веществом или маркером, которые могут быть специфически обнаружены, например, с помощью антитела. В конкретных вариантах осуществления клетки метят [³H] тимидином или бромдезоксисуридином (BrdU).

В некоторых вариантах осуществления исследуют рост кровеносных сосудов путем измерения миграции эндотелиальных клеток, которые разрушают базальную мембрану и мигрируют в направлении химических градиентов, обусловленных проангиогенными факторами роста, например, при ангиогенезе в результате прорастания. В некоторых вариантах осуществления метят эндотелиальные клетки в месте ишемического повреждения, и постоянно контролируют *in vivo* миграцию клеток. В других аспектах субъекту вводят меченые эндотелиальные клетки и постоянно контролируют *in vivo* их миграцию в место ишемического повреждения. В других аспектах в месте ишемического повреждения могут быть выделены эндотелиальные клетки, и их миграционные свойства могут быть исследованы с помощью ряда анализов *in vitro*, включая анализ в камере Бойдена, анализ под слоем агарозы, анализ заживления раны, анализ с тефлоновым барьером, анализ кинетики фагоцитоза с помощью трекера и другие подобные анализы.

В некоторых вариантах осуществления рост кровеносных сосудов исследуют путем измерения эндотелиальных клеток, образующих трубочки с просветом для тока крови, т.е. тубулогенез. В некоторых вариантах осуществления рост кровеносных сосудов исследуют с помощью анализа аортального кольца. Анализ аортального кольца для исследования роста кровеносных сосудов описан в публикации Li et al., "Copper promotion of ангиогенез in isolated rat aortic ring: role of vascular endothelial growth factor", *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(2014), 44-49, содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее. Прорастающие из аортального кольца микрососуды тесно взаимодействуют с резидентными макрофагами, перидитами и фибробластами в упорядоченной последовательности, которая имитирует ангиогенез у интактного животного. В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки не были предварительно отобраны путем пассирования и поэтому находятся в состоянии покоя, подобном состоянию интактного животного. Другие исследования ангиогенеза, которые учитывают ангиогенные функции (такие как деградация матрицы, миграция, пролиферация, образование трубочек), включают анализ эмбрионидных тел, исследование плюсневой кости мышей и другие подобные анализы.

В некоторых вариантах осуществления исследования *in vivo* используют для измерения роста кровеносных сосудов после введения композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. Эти исследования включают, но этим не ограничиваясь, анализ ангиогенеза в роговице, анализ хориоандаллантаисной мембраны цыпленка и анализ в слое матригеля. Например, роговица является единственной тканью организма, которая лишена сосудов и является прозрачной, что делает ее идеальной для наблюдения за ангиогенезом. В некоторых вариантах осуществления микросферы или губки, содержащие проангиогенные молекулы (например, раскрытую в изобретении композицию тетрамина, включающую хелатирующий медь тетрамин), могут быть имплантированы в стромальные карманы, созданные хирургическим путем. Вростание новых сосудов из периферической лимбальной сосудистой системы может ежедневно контролироваться, что позволяет определить скорости ангиогенеза. При анализе в слое матригеля, матригель, содержащий раскрытую в изобретении композицию тетрамина (с ионами меди или без них), может быть имплантирован индивидууму в месте или вблизи места ишемического повреждения, а затем слой матригеля удаляют для визуализации кровеносных сосудов. В некоторых вариантах осуществления эндотелиальные клетки метят одним или более маркерами и исследуют *in vivo* их пролиферацию, миграцию, тубулогенез, образование кровеносных сосудов и/или рост кровеносных сосудов в месте ишемического повреждения, например, с использованием соответствующего метода визуализации.

Комбинированная терапия.

Описанная выше композиция тетрамина, необязательно, в комбинации с медь-промотирующей композицией может быть использована в качестве единственного лекарственного средства или как часть комбинированной терапии со стволовыми клетками или индукторами стволовых клеток для индуцирования восстановления ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления предлагается способ индуцирования восстановления ткани (или улучшения функции ткани) у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий а) введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин; и б) введение индивидууму эффективного количества стволовых клеток (таких как мезенхимальные стволовые клетки (MSC), например мезенхи-

мальные стволовые клетки костного мозга (BMSC)) или индуктора стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму эффективного количества стволовых клеток (таких как мезенхимальные стволовые клетки (MSC), например, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (BMSC)). В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму эффективного количества индуктора стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму медь-промотирующей композиции, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму предварительно вводят медь-промотирующую композицию, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань выбирают из группы, состоящей из ишемизированной сердечной ткани, ишемизированной ткани печени, ишемизированной ткани головного мозга, ишемизированной легочной ткани, ишемизированной ткани почки, ишемизированной кожной ткани, ишемизированной ткани пищеварительного тракта и ишемизированной ткани скелетной мышцы (такой как ишемизированная ткань конечности). В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная сердечная ткань. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная ткань головного мозга. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления описанные в изобретении стволовые клетки представляют собой мезенхимальные стволовые клетки (MSC), мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (BMSC), мультипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) или стволовые клетки, образующиеся в ткани. В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки, образующиеся в ткани, представляют собой стволовые клетки, образующиеся в жировой ткани, стволовые клетки, образующиеся в сердечной ткани, или стволовые клетки, образующиеся в ткани пупочного канатика. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка является индуктором взрослой стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления взрослые стволовые клетки представляют собой кроветворные стволовые клетки, стволовые клетки молочной железы, кишечинальные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки в плаценте, жировой ткани, легком, костном мозге, крови, вартонове студне пупочного канатика или зубах (например, периваскулярной нише пульпы зуба и соединительной связки периодонта), эндотелиальные стволовые клетки, нейрональные стволовые клетки, взрослые стволовые клетки органов обоняния, стволовые клетки нейрального гребня или зародышевые стволовые клетки (например, стволовые клетки в семеннике).

В некоторых вариантах осуществления описанный в изобретении индуктор стволовых клеток, является индуктором мезенхимальных стволовых клеток (MSC), мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSC), мультипотентных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS) или стволовых клеток, образующихся в ткани, таких как стволовые клетки, образующиеся в жировой ткани, стволовые клетки, образующиеся в сердечной ткани, или стволовые клетки, образующиеся в ткани пупочного канатика. В некоторых вариантах осуществления индуктор стволовых клеток является индуктором взрослых стволовых клеток, таких как кроветворные стволовые клетки, стволовые клетки молочной железы, кишечинальные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки в плаценте, жировой ткани, легком, костном мозге, крови, вартонове студне пупочного канатика или зубах (например, периваскулярной нише пульпы зуба и соединительной связки периодонта), эндотелиальные стволовые клетки, нейрональные стволовые клетки, взрослые стволовые клетки органов обоняния, стволовые клетки нейрального гребня или зародышевые стволовые клетки (например, стволовые клетки в семеннике).

В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки или индуктор стволовых клеток вводятся системно. В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки или индуктор стволовых клеток вво-

дят локально в ишемизированную ткань. В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки или индуктор стволовых клеток вводят локально в место, которое не является местом ишемического повреждения.

В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки (или индуктор стволовых клеток), композицию тетрамина (с ионами меди или без ионов меди) и, необязательно, медь-промотирующую композицию вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления описанные в изобретении стволовые клетки (или индуктор стволовых клеток) и композицию тетрамина (с ионами меди или без ионов меди) и, необязательно, медь-промотирующую композицию вводят последовательно в любом подходящем порядке.

После того как описанные в изобретении стволовые клетки (или индуктор стволовых клеток), композицию тетрамина (с ионами меди или без ионов меди) и, необязательно, медь-промотирующую композицию вводят млекопитающему (например, человеку), в некоторых вариантах осуществления постоянно контролируют присутствие и/или биологическую активность клеток любым из известных методов. В некоторых вариантах осуществления клетки мигрируют *in vivo* из ишемизированной ткани индивидуума, и присутствие и/или биологическую активность клеток на пути к месту повреждения участка ткани постоянно контролируют и/или регулируют.

Несмотря на то, что описанные в изобретении способы в целом применимы ко всем аспектам восстановления ткани, тем не менее, следует иметь в виду, что способы комбинированной терапии могут быть использованы для любой одной или более из следующих целей: для индуцирования миграции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга к ишемизированной ткани, для индуцирования дифференцировки стволовых клеток в ишемизированной ткани, для индуцирования регенерации ткани в ишемизированной ткани, для индуцирования сигнальной молекулы, которая инициирует регенерацию ткани, для усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1), для обратного развития повреждения на месте ишемического повреждения и для восстановления микроокружения нейрофибрилла клеток и нейросекреторных клеток в месте ишемического повреждения.

Способы предотвращения и профилактического использования.

В изобретении также предлагаются способы предотвращения повреждения ишемизированной ткани у индивидуума, включающие введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань выбирают из группы, состоящей из ишемизированной сердечной ткани, ишемизированной ткани печени, ишемизированной ткани головного мозга, ишемизированной легочной ткани, ишемизированной ткани почки, ишемизированной кожной ткани, ишемизированной ткани пищеварительного тракта и ишемизированной ткани скелетной мышцы (такой как ишемизированная ткань конечности). В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная сердечная ткань. В некоторых вариантах осуществления ишемизированную ткань является ишемизированная ткань головного мозга. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления ион меди в композиции тетрамина не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму медь-промотирующей композиции, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму предварительно вводят медь-промотирующую композицию, которая может повышать внеклеточное содержание меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция представляет собой ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция может повышать усвоение меди, понижать выведение меди и/или снижать токсичность цинка. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ предотвращения ишемической сердечной недостаточности у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции тетрамина, включающей хелатирующий медь тетрамин (такой как триентин). В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции является недостаточным для снижения

внуклеточного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг (например, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг, или от приблизительно 150 до приблизительно 350 мг) в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят два раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят в течение по меньшей мере приблизительно 1 месяца (например, по меньшей мере в течение приблизительно 3 месяцев или по меньшей мере приблизительно 6 месяцев). В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет функцию выброса левого желудочка (LVEF) не более чем 35% на исходном уровне. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет сердечную недостаточность класса II или класса III (по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации или функциональной классификации NYHA). В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет содержание в плазме натрийуретического пептида В-типа (BNP) по меньшей мере приблизительно 150 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет содержание NT-проBNP (N-терминального предшественника BNP) не менее чем приблизительно 600 пг/мл.

Используемый в изобретении термин "предотвращение" включает в себя обеспечение профилактических мер в отношении возникновения или повторного проявления заболевания у индивидуума, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого еще не было диагностировано это заболевание. В некоторых вариантах осуществления предлагаемые в изобретении клетки и композиции применяют для замедления развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания, такого как повреждение ткани.

Для профилактики или лечения заболевания выбор соответствующей дозы или способа введения зависит от типа заболевания, подлежащего лечению, тяжести и хода заболевания, независимо от того, вводят ли эти клетки в профилактических или терапевтических целях, проведенной ранее терапии, истории болезни индивидуума и ответа индивидуума на композицию тетрамина и/или на клетки, а также от решения лечащего врача. Композиции тетрамина, медь-промотирующая композиции, стволовые клетки и индукторы стволовых клеток в некоторых вариантах осуществления могут вводиться индивидууму в одно время или в течение нескольких курсов лечения.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагаются композиции и способы лечения и предотвращения повреждения ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления раскрытые в изобретении композиции тетрамина, медь-промотирующие композиции и/или клетки вводят до, во время и/или после лечения, которое должно вызвать или может вызвать повреждение ткани у индивидуума, и введение предотвращает или уменьшает повреждение ишемизированной ткани, связанное с лечением, таким как лучевая терапия и химиотерапия рака.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в изобретении композиция тетрамина или способ предотвращают повреждение ишемизированной ткани или уменьшают площадь, объем или продолжительность повреждения ишемизированной ткани путем индуцирования миграции (например, хоуминга) стволовых клеток в ткань, даже после того, как ткань у индивидуума по иным причинам утратила присущую ей способность самопроизвольно рекрутировать стволовые клетки. В вариантах осуществления введение композиции тетрамина и/или клеток по настоящему изобретению инициирует ряд других процессов, приводящих к повышенной устойчивости к повреждению ишемизированной ткани, включающих, например, индуцирование дифференцировки стволовых клеток на участке ткани, индуцирование регенерации ткани на участке ткани, индуцирование сигнальной молекулы, которая инициирует регенерацию ткани, усиление медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1), обратное развитие повреждения в месте начального ишемического повреждения до возникновения дополнительного повреждения и/или восстановление микроокружения нейрофибриллов в клетках и нейросекреторных клеток на участке ткани.

Например, ишемия или инфаркт миокарда могут привести к необратимой утрате функции сердечной ткани с возможным ухудшением насосной функции и к смерти. Окклюзия коронарного сосуда приводит к прекращению кровоснабжения зависимой капиллярной системы. Без питания и кислорода кардиомиоциты погибают и подвергаются некрозу. Возникает воспаление окружающей ткани с инвазией воспалительных клеток и фагоцитозом клеточного дебриса. Происходит фиброзное рубцевание, и пораженная область сердца теряет свою сократительную силу. Без медицинского вмешательства единственным способом для сердечной мышцы компенсировать потерю ткани является гипертрофия оставшихся кардиомиоцитов (накопление клеточного белка и сократительных элементов внутри клетки). Эндокринные, метаболические (спирт) или инфекционные (вирусный миокардит) средства и средства для лечения рака также приводят к гибели клеток и, следовательно, к снижению функции миокарда. В некоторых вариантах осуществления раскрытые в изобретении композиция тетрамина или способ предотвращают ишемическое повреждение сердечной ткани или уменьшают площадь, объем или продолжительность ишемического повреждения сердечной ткани. В некоторых вариантах осуществления раскрытая в изобретении композиция тетрамина индуцирует миграцию (например, хоуминг) и/или удержание мезенхимальных стволовых клеток (например, мезенхимальных стволовых клеток костного мозга) в ишемизированной сердечной ткани. В некоторых вариантах осуществления, в случаях ишемии или инфаркта мио-

карда, сердечная мышца может компенсировать потерю ткани путем дифференцировки стволовых клеток в кардиомиоциты, тем самым предотвращая или уменьшая гипертрофию сердца и дальнейшее повреждение сердечной ткани.

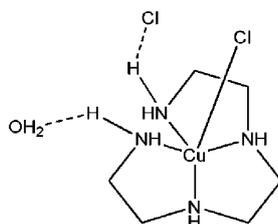
Композиции тетрамина.

Кроме того, в изобретении предлагаются композиции тетрамина (в том числе фармацевтические композиции), включающие хелатирующий медь тетрамин (такой как триентин), для повышения внутриклеточного содержания меди, для доставки меди в клетки, для индуцирования по меньшей мере одного (например, по меньшей мере любого из 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более) процесса восстановления ткани, для индуцирования миграции стволовых клеток или усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани. Любая из композиций тетрамина, необязательно, в комбинации с медь-промотирующей композицией и/или стволовыми клетками (или индуктором стволовых клеток) может быть использована в описанных выше способах.

В некоторых вариантах осуществления предлагается композиция тетрамина, включающая хелатирующий медь тетрамин или его фармацевтически приемлемую соль. Рассматриваемый в настоящем изобретении хелатирующий медь тетрамин (такой как триентин) включает в себя, но этим не ограничиваясь, само по себе соединение хелатирующего медь тетрамина, его фармацевтически приемлемые соли, его активные метаболиты, его пролекарства и его производные. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является аналогом триентина, таким как тетрамин формулы (II), описанный в разделе "Медь и способные к образованию хелата с медью тетрамины". В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина не включает следового количества элемента, такого как медь. В некоторых вариантах осуществления композиция может хелатировать ион меди в крови и доставлять ион меди в клетки ишемизированной ткани.

В некоторых вариантах осуществления предлагается композиция тетрамина, включающая смесь хелатирующего медь тетрамина и иона меди. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает смесь триентина и иона меди. В некоторых вариантах осуществления мольное отношение хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) к иону меди составляет приблизительно любое одно из 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 или 1:100. В некоторых вариантах осуществления мольное отношение хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) к иону меди составляет приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления мольное отношение хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) к иону меди составляет приблизительно любое одно из 50:1-100:1, 20:1-50:1, 10:1-20:1, 5:1-10:1, 4:1-5:1, 3:1-4:1, 2:1-3:1, 1:1-2:1, 1:2-1:1, 1:3-1:2, 1:4-1:3, 1:5-1:4, 1:10-1:5, 1:20-1:10, 1:50-1:20, 1:100-1:50, 1:100-1:10, 1:10-1:1, 1:1-10:1, 10:1-100:1 или 1:10-10:1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть ионов меди находится в форме комплекса с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления ион меди не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином.

В некоторых вариантах осуществления предлагается композиция тетрамина, включающая комплекс хелатирующего медь тетрамина и иона меди. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает комплекс триентина и иона меди. В некоторых вариантах осуществления стехиометрическое отношение хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) к иону меди составляет приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления комплекс хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) и иона меди является кристаллическим. В некоторых вариантах осуществления кристаллический комплекс хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) и иона меди является термодинамически устойчивым полиморфом. Различные термодинамически устойчивые полиморфы кристаллического комплекса могут быть описаны специфическим набором геометрических структур, постоянными решетками, пространственными группами и структурными координатами, которые могут быть определены известными методами, такими как рентгеноструктурная кристаллография. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс формулы (I)



Формула (I)

где Cu обозначает ион меди и пунктирные линии изображают водородные связи.

В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, где кристаллический комплекс имеет кристаллическую структуру, изображенную на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления кристаллическая структура имеет длину связей, углы связей и торсионные углы, приведенные на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления кристаллический комплекс включает кристаллы с пространственной группой и параметрами, приведенными на фиг. 3. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, где кристаллическая структура кристаллического комплекса определяется атомными координатами, приведенными на фиг. 4А-4С.

В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает комплекс хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) и иона меди, где комплекс не является кристаллическим. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина дополнительно включает ион меди, не входящий в комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления мольное отношение иона меди, не входящего в комплекс с хелатирующим медь тетрамином, к комплексу составляет приблизительно любое одно из 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 или 1:100. В некоторых вариантах осуществления мольное отношение иона меди, не входящего в комплекс с хелатирующим медь тетрамином, к комплексу составляет приблизительно любое одно из 1:2-1:1, 1:3-1:2, 1:4-1:3, 1:5-1:4, 1:10-1:5, 1:20-1:10, 1:50-1:20, 1:100-1:50, 1:100-1:10 или 1:10-1:1. В некоторых вариантах осуществления процентное количество суммарной меди в композиции тетрамина, которое находится в комплексе с хелатирующим медь тетраминем (таким как триентин) составляет приблизительно любое одно из 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100%. В некоторых вариантах осуществления процентное количество суммарной меди в композиции тетрамина, которое находится в комплексе с хелатирующим медь тетраминем (таким как триентин) составляет приблизительно любое одно из 1-5%, 5-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 1-10%, 10-50%, 50-80% или 80%-100%. В некоторых вариантах осуществления процентное количество суммарного хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) в композиции тетрамина, которое находится в комплексе с ионом меди, составляет по меньшей мере приблизительно любое одно из 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100%. В некоторых вариантах осуществления процентное количество суммарного хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) в композиции тетрамина, которое находится в комплексе с ионом меди, составляет по меньшей мере приблизительно любое одно из 1-5%, 5-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 1-10%, 10-50%, 50-80% или 80-100%. В некоторых вариантах осуществления ион меди, который не находится в комплексе с хелатирующим медь тетрамином (таким как триентин), присутствует в виде соли, такой как сульфат меди, хлорид меди, оксид меди, нитрат меди, ацетат меди, формиат меди, глюконат меди, хелаты меди с аминокислотами и другие подобные соли.

В некоторых вариантах осуществления предлагается композиция тетрамина, включающая хелатирующий медь тетрамин и ион меди, где ион меди не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает триентин и ион меди, где ион меди не образует комплекс с триентином. В некоторых вариантах осуществления ион меди присутствует в виде соли, такой как сульфат меди, хлорид меди, оксид меди, нитрат меди, ацетат меди, формиат меди, глюконат меди, хелаты меди с аминокислотами и другие подобные соли. В некоторых вариантах осуществления мольное отношение хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) к иону меди составляет приблизительно любое одно из 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 или 1:100. В некоторых вариантах осуществления мольное отношение хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) к иону меди составляет приблизительно любое одно из 50:1-100:1, 20:1-50:1, 10:1-20:1, 5:1-10:1, 4:1-5:1, 3:1-4:1, 2:1-3:1, 1:1-2:1, 1:2-1:1, 1:3-1:2, 1:4-1:3, 1:5-1:4, 1:10-1:5, 1:20-1:10, 1:50-1:20, 1:100-1:50, 1:100-1:10, 1:10-1:1, 1:1-10:1, 10:1-100:1 или 1:10-10:1.

Многие параметры композиции тетрамина, в том числе, но этим не ограничиваясь, химическая структура хелатирующего медь тетрамина, отношение хелатирующего медь тетрамина к меди в композиции тетрамина, взаимодействия иона меди с хелатирующим медь тетрамином (например, образуется ли комплекс, является ли комплекс кристаллическим и т.д.), могут влиять на способность композиции тетрамина доставлять (например, выгружать) медь в клетки в ишемизированной ткани. Например, хелатирующий медь тетрамин может иметь конфигурацию (в том числе дентатность хелатообразующего лиганда, донорные связывающие группы и размер пустот), которая способствует обратимому связыванию иона меди. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает хелатирующий медь тетрамин с достаточно низким сродством к иону меди внутри клеток в ишемизированной ткани, где композиция тетрамина диссоциирует и выгружает ион меди внутри клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина включает дополнительные соединения и/или средства, которые усиливают выгрузку иона меди в клетках в ишемизированной ткани.

Кроме того, предлагаются фармацевтические композиции, включающие любую из описанных в изобретении композиций тетрамина и один или более фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательные вещества, стабилизаторы, разбавители и/или другие хорошо известные вещества, для применения в описанных для применения способах.

Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, включающая хелатирующий медь тетрамин и ион меди. В некоторых вариантах осуществления предлагается фармацевтическая композиция, включающая триентин и ион меди.

В некоторых вариантах осуществления предлагается фармацевтическая композиция, включающая комплекс хелатирующего медь тетрамина и иона меди. В некоторых вариантах осуществления предлагается фармацевтическая композиция, включающая комплекс триентина и иона меди. В одном из вариантов осуществления комплекс хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) и иона меди является кристаллическим. В некоторых вариантах осуществления кристаллический комплекс хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) и иона меди является термодинамически устойчивым полиморфом. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды. В одном из вариантов осуществления комплекс хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) и иона меди не является кристаллическим.

В некоторых вариантах осуществления предлагается фармацевтическая композиция, включающая хелатирующий медь тетрамин и ион меди, где по меньшей мере часть (например, по меньшей мере приблизительно любая из 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более) иона меди не находится в комплексе с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления предлагается фармацевтическая композиция, включающая триентин и ион меди, где по меньшей мере часть (например, по меньшей мере приблизительно любая из 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более) иона меди не находится в комплексе с триентином. В некоторых вариантах осуществления предлагается фармацевтическая композиция, включающая хелатирующий медь тетрамин и ион меди, где ион меди не образует комплекса с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления предлагается фармацевтическая композиция, включающая триентин и ион меди, где ион меди не образует комплекса с хелатирующим медь триентином. В некоторых вариантах осуществления ион меди, не находящийся в комплексе с хелатирующим медь тетрамином, присутствует в виде соли, такой как сульфат меди, хлорид меди, оксид меди, нитрат меди, ацетат меди, формиат меди, глюконат меди, хелаты меди с аминокислотами и другие подобные соли.

Любая из описанных в изобретении фармацевтических композиций может применяться для повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, для индуцирования по меньшей мере двух (например, любых из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более) процессов восстановления ткани, для усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) и/или для лечения (в том числе предотвращения) любого заболевания или состояния, связанного с ишемическим поражением ткани.

Описанные в изобретении фармацевтические композиции могут быть приготовлены в форме растворов, эмульсий, суспензий, дисперсий или комплексов включения, например, с циклодекстринами, в подходящих фармацевтических растворителях или носителях или в форме пилюль, таблеток, леденцов, суппозиторий, пакетиков, драже, гранул, порошков, порошков для приготовления растворов или капсул вместе с твердыми носителями, используя хорошо известные традиционные методы приготовления различных дозированных форм. Фармацевтические композиции вариантов осуществления могут быть введены с помощью соответствующего способа доставки, такого как пероральный, парентеральный, ректальный, назальный, местный или окулярный способы введения, или с помощью ингаляции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию приготавливают для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию приготавливают для парентерального введения (такого как внутривенное введение).

Для перорального введения фармацевтическая композиция может быть представлена в твердой форме, такой как таблетка или капсула, или в виде раствора, эмульсии или суспензии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию приготавливают в форме таблетки, капсулы или пилюли. Пероральные таблетки могут включать активный ингредиент (ингредиенты), смешанный с совместимыми фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, такими как разбавители, дезинтегрирующие вещества, связующие вещества, смазывающие вещества, подсластители, ароматизаторы, окрашивающие вещества и консерванты. Подходящие инертные наполнители включают карбонат натрия и кальция, фосфат натрия и кальция, лактозу, крахмал, сахар, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и другие подобные вещества. Примеры жидких пероральных вспомогательных веществ включают этанол, глицерин, воду и другие подобные вещества. Примерами дезинтегрирующих веществ являются крахмал, поливинилпирролидон (PVP), крахмалгликолят натрия, микрокристаллическая целлюлоза и альгиновая кислота. Связующие вещества могут включать крахмал и желатин. Смазывающее вещество, если оно присутствует, может представлять собой стеарат магния, стеариновую кислоту или тальк. При необходимости, на таблетку может быть нанесено покрытие из такого материала, как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, для замедления всасывания в желудочно-кишечном тракте или может быть нанесено энтеросолюбильное покрытие. Пероральные составы могут представлять собой дискретные элементы, такие как капсулы, облатки или таблетки, каждый из которых содер-

жит заданное количество активного ингредиента, представлять собой порошок или гранулы; представлять собой раствор или суспензию в водной жидкости или неводной жидкости или представлять собой жидкую эмульсию типа масло-в-воде или жидкую эмульсию вода-в-масле. Активный ингредиент может также находиться в форме болуса, электуария или пасты.

Таблетка может быть изготовлена путем прессования или формования, необязательно, с одним или несколькими вспомогательными веществами. Прессованные таблетки могут быть получены путем прессования на соответствующей установке активного ингредиента в сыпучем состоянии, таком как порошок или гранулы, необязательно смешанного со связующим веществом (например, повидоном, желатином, гидроксипропилметилцеллюлозой), смазывающим веществом, инертным разбавителем, консервантом, дезинтегрирующим веществом (например, крахмал гликолят натрия, сшитым повидоном, сшитой карбоксиметилцеллюлозой натрия), поверхностно-активным веществом или диспергирующим веществом. Формованные таблетки могут быть изготовлены путем формования на соответствующей установке смеси порошкообразного соединения, увлажненного с помощью инертного жидкого разбавителя. На таблетке может быть, необязательно, нанесено покрытие или насечка, и таблетки могут быть изготовлены таким образом, чтобы они обеспечивали медленное или контролируемое высвобождение активного ингредиента, используя, например, гидроксипропилметилцеллюлозу в различных пропорциях для получения требуемого профиля высвобождения.

Капсулы для перорального введения включают твердые и мягкие желатиновые капсулы. Для приготовления твердых желатиновых капсул активный ингредиент (ингредиенты) может быть смешан с твердым, полутвердым или жидким разбавителем. Мягкие желатиновые капсулы могут быть получены путем смешивания активного ингредиента с водой, маслом, таким как арахисовое масло или оливковое масло, жидким парафином, смесью моно- и диглицеридов короткоцепочечных жирных кислот, полиэтиленгликолем 400 или пропиленгликолем. Капсулы могут также содержать желатин, оксиды железа, стеариновую кислоту и диоксид титана в качестве неактивных ингредиентов.

Жидкости для перорального введения могут быть в форме суспензий, растворов, эмульсий или сиропов, или могут быть лиофилизированы, или могут находиться в форме сухого продукта для растворения в воде или другой подходящей среде перед использованием. Такие жидкие композиции могут, необязательно, содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как суспендирующие вещества (например, сорбит, метилцеллюлоза, альгинат натрия, желатин, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гель стеарата алюминия и другие подобные вещества); неводные среды, например масло (например, миндальное масло или фракционированное кокосовое масло), пропиленгликоль, этиловый спирт или вода; консерванты (например, метил или пропил-п-гидроксibenзоат или сорбиновая кислота); смачивающие средства, такие как лецитин, и, при необходимости, ароматизаторы или окрашивающие вещества.

Для парентерального применения, в том числе внутривенного, внутримышечного, интраперитонеального, интраназального или подкожного введения, композиции тетрамина могут быть приготовлены в стерильных водных растворах или суспензиях, забуференных до подходящего значения pH и изотоничности, или в парентерально приемлемом масле. Подходящие водные среды включают раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Такие формы могут быть представлены в виде лекарственной формы с разовой дозой, такой как ампулы или одноразовые инъекционные устройства, в виде многодозовых лекарственных форм, таких как флаконы, из которых может быть извлечена соответствующая доза, или в виде твердой формы или предварительно приготовленного концентрата, который может быть использован для приготовления инъекционной композиции. Составы, подходящие для парентерального, в том числе внутривенного, введения включают водные и неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые обеспечивают составу изотоничность с кровью предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие вещества и загустители. Составы могут быть представлены в виде однодозовых или многодозовых контейнеров, например герметичных ампул и флаконов, и могут храниться в лиофилизированном состоянии, при котором требуется только добавление стерильной жидкой среды, например воды для инъекций, непосредственно перед использованием. Растворы и суспензии для немедленной инъекции могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток описанного выше типа.

Дозирование и способы введения.

При применении *in vivo* любого из описанных в изобретении способов лечения композицию тетрамина (в том числе фармацевтическую композицию) и, необязательно, медь-промотирующую композицию и/или стволовые клетки (или индуктор стволовых клеток) вводят индивидууму в эффективных количествах. "Эффективное количество" представляет собой, по меньшей мере, минимальную концентрацию, необходимую для достижения поддающегося измерению улучшения или предотвращения заболевания или состояния, связанного с ишемическим поражением ткани. В настоящем изобретении эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как степень ишемического повреждения у индивидуума, характеристика используемой конкретной композиции тетрамина, иона меди и/или стволовых клеток (или индукторов стволовых клеток), например, их терапевтический индекс, ха-

рактеристика индивидуума (например, возраст, пол, вес и история болезни). Эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтические положительные эффекты значительно превосходят любые токсичные или вредные эффекты, возникающие при лечении. В случае профилактического применения положительные или желаемые результаты включают такие результаты, как устранение или снижение риска, облегчение тяжести или отсрочка начала заболевания или состояния, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания или состояния, их осложнения и промежуточные патологические фенотипы, возникающие при развитии заболевания или состояния. В случае терапевтического применения положительные или желаемые результаты включают такие клинические результаты, как уменьшение одного или нескольких симптомов, вызванных заболеванием или состоянием, повышение качества жизни людей, страдающих от этого заболевания, снижение дозы других лекарственных препаратов, необходимых для лечения болезни, усиление действия другого лекарственного препарата, например, путем таргетирования, замедление прогрессирования заболевания и/или продление срока выживания.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина (например, фармацевтической композиции) и, необязательно, в комбинации с эффективным количеством медь-промотирующей композиции является эффективным для достижения увеличения более чем приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500% и более внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани у индивидуума по сравнению с внутриклеточным содержанием меди в ишемизированной ткани у индивидуума до лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина (например, фармацевтической композиции) и, необязательно, в комбинации с эффективным количеством медь-промотирующей композиции является эффективным для достижения увеличения более чем приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500% и более суммарного содержания меди в ишемизированной ткани у индивидуума по сравнению с суммарным содержанием меди в ишемизированной ткани у индивидуума до лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиционной тетрамина (например, фармацевтическая композиция) и, необязательно, в сочетании с эффективным количеством медь-промотирующей композиции не уменьшают внеклеточное содержание меди (например, меди в крови) у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина (например, фармацевтической композиции) и, необязательно, в комбинации с эффективным количеством медь-промотирующей композиции не снижает внеклеточного содержания меди (например, меди в крови) у индивидуума приблизительно более чем на 5, 10, 20, 30, 40, 50% или более по сравнению с внеклеточным содержанием меди у индивидуума до лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина (например, фармацевтической композиции) и, необязательно, в комбинации с эффективным количеством медь-промотирующей композиции не уменьшает суммарного содержания меди у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина (например, фармацевтической композиции) и, необязательно, в комбинации с эффективным количеством медь-промотирующей композиции не уменьшает суммарного содержания меди у индивидуума приблизительно более чем на 5, 10, 20, 30, 40, 50% или более по сравнению с суммарным содержанием меди у индивидуума до лечения.

Эффективное количество может быть введено в результате одного или более введений. Исходя из медицинской практики понятно, что эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может быть достигнуто или может быть не достигнуто при использовании в комбинации с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Так, например, "эффективное количество" может рассматриваться в контексте введения одного или нескольких терапевтических средств, и можно считать, что одно средство введено в эффективном количестве, если в сочетании с одним или более другими средствами может быть достигнут или достигается требуемый результат.

Эффективное количество, дозы и режим дозирования композиции тетрамина в отдельности или в комбинации с медь-промотирующей композицией (такой как ион меди) и/или со стволовыми клетками (или индуктором стволовых клеток) может быть определено во время доклинических испытаний и клинических испытаний хорошо известными терапевтам и врачам-клиницистам методами. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) в композиции тетрамина составляет приблизительно менее чем 0,5, 5, 10, 25, 50, 80, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 500, 600 или 1200 мг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) в композиции тетрамина составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 10 мг, от приблизительно 10 до приблизительно 25 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 50 мг, от приблизительно 50 до приблизительно 75 мг, от приблизительно 75 до приблизительно 100 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 125 мг, от приблизительно 125 до приблизительно 150 мг, от приблизительно 150 до приблизительно 175 мг, от приблизительно 175 до приблизительно 200 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 225 мг, от приблизительно 225 до приблизительно 250 мг, от приблизительно 250 до приблизительно 275 мг, от приблизительно 275 до приблизительно 300 мг,

от приблизительно 300 до приблизительно 350 мг, от приблизительно 350 до приблизительно 400 мг, от приблизительно 400 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 500 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 600 до приблизительно 1200 мг, от приблизительно 1200 до приблизительно 2400 мг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мг, от приблизительно 50 до приблизительно 100 мг, от приблизительно 10 до приблизительно 125 мг, от приблизительно 80 до приблизительно 200 мг, от приблизительно 150 до приблизительно 300 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 300 мг, от приблизительно 300 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 200 мг, от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг, или от приблизительно 80 приблизительно до 400 мг, или от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг хелатирующего медь тетрамина (например, в форме дихлоридной соли) в сутки для пациента-человека.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) в композиции тетрамина (такой как фармацевтическая композиция) включает по меньшей мере приблизительно 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15 или 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) в композиции тетрамина (такой как фармацевтическая композиция) включает приблизительно менее чем 35, 30, 25, 20, 18, 15, 10, 5, 2,5, 2, 1, 0,5 или 0,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество хелатирующего медь тетрамина в композиции тетрамина составляет любое одно из от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 15 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 30 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 40 мг/кг или от приблизительно 20 до приблизительно 35 мг/кг в сутки. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет не более чем приблизительно 20 мг/кг в сутки, например, приблизительно 18 мг/кг в сутки для обезьян макак-резус. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет не более чем от приблизительно 15 до приблизительно 35 мг/кг в сутки для мыши.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество хелатирующего медь тетрамина (такого как триентин) в фармацевтической композиции (например, в стандартной дозированной форме) находится в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 300 мг, например, от приблизительно 80 до приблизительно 150 мг, от приблизительно 80 до приблизительно 200 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 300 мг или от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг. В некоторых вариантах осуществления концентрация медь-хелатирующего тетрамина (такого как триентин) в фармацевтической композиции является разбавленной (приблизительно 0,1 мг/мл) или высокой (приблизительно 100 мг/мл), в том числе, например, любой одной от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/мл, от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/мл.

Примеры частоты дозирования включают, но этим не ограничиваясь, любую одну частоту из четырех раз в сутки, трех раз в сутки, двух раз в сутки, одного раза в сутки, одного раза в два дня, одного раза в три дня, одного раза в четыре дня, одного раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина (такую как фармацевтическая композиция) вводят по меньшей мере приблизительно 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз или 7 раз (т.е. ежедневно) в неделю. В некоторых вариантах осуществления интервалы между каждым введением составляют менее чем приблизительно 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня, 1 день, 12, 6, 4 или 3 ч. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят ежедневно. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят по меньшей мере два раза в день. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят по меньшей мере один раз, в том числе, например, по меньшей мере 2 раза, 3 раза или 4 раза в день.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина в сочетании с частотой дозирования являются достаточными для поддержания высокой концентрации тетрамина (такого как триентин) у индивидуума, например, в крови или в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления высокая концентрация тетрамина является концентрацией, которая усиливает медь-зависимую транскрипционную активность NIF-1, или индуцирует по меньшей мере один (в том числе по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более) процесс восстановления ткани. В некоторых вариантах осуществления введение композиции тетрамина (такой как фармацевтическая композиция) приводит по меньшей мере к концентрации приблизительно 0,005 мг/л (в том числе, например, по меньшей мере приблизительно 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 или 5,0 мг/л) хелатирующего медь тетрамина в крови. Концентрация тетрамина в биологическом образце (таком как кровь или биоптат ишемизированной ткани) может быть определена с помощью известных методов, таких как флуоресцентная спектроскопия, масс-спектрометрия и хроматографические методы, или путем измерения уровня меченого тетрамина.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина в сочетании с частотой дозирования обеспечивают поддержание высокой концентрации тетрамина (такого как триентин) у индивидуума в течение по меньшей мере приблизительно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ч или более. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина в сочетании с час-

той дозирования обеспечивают поддержание высокой концентрации тетрамина (такого как триентин) у индивидуума в течение по меньшей мере приблизительно 8 ч.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет приблизительно по меньшей мере 1, 2, 5, 10, 12, 15, 18, 20, 30, 40, 50 мг/кг/сутки или более триентина в композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет не более чем 1, 2, 5, 10, 12, 15, 18, 30, 40 или 50 мг/кг/сутки триентина в композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 1 до приблизительно 2 мг/кг/сутки, от приблизительно 2 до приблизительно 5 мг/кг/сутки, от приблизительно 5 до приблизительно 10 мг/кг/сутки, от приблизительно 10 до приблизительно 15 мг/кг/сутки, от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг/сутки, от приблизительно 20 до приблизительно 30 мг/кг/сутки, от приблизительно 30 до приблизительно 50 мг/кг/сутки, от приблизительно 1 до приблизительно 5 мг/кг/сутки, от приблизительно 5 до приблизительно 15 мг/кг/сутки, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/кг/сутки или от приблизительно 1 до приблизительно 18 мг/кг/сутки триентина в композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет приблизительно 18 мг/кг/сутки триентина в композиции тетрамина. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции тетрамина составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/кг/сутки триентина в композиции тетрамина.

Введение композиции тетрамина (такой как фармацевтическая композиция) может осуществляться на протяжении длительного периода времени, например, от приблизительно одной недели до приблизительно нескольких лет. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина (такую как фармацевтическая композиция) вводят на протяжении периода времени по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 или 84 месяцев или более. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина (такую как фармацевтическая композиция) вводят на протяжении по меньшей мере приблизительно одного месяца, в том числе, например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 или более месяцев. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина (такую как фармацевтическая композиция) вводят на протяжении по меньшей мере приблизительно одного месяца, и где композицию тетрамина вводят по меньшей мере один раз (например, два раза, три раза или четыре раза) в сутки. В некоторых вариантах осуществления введение композиции тетрамина (в том числе фармацевтической композиции) приводит по меньшей мере к содержанию приблизительно 0,005 мг/л (в том числе, например, по меньшей мере приблизительно 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 или 5,0 мг/л) хелатирующего медь тетрамина в крови в течение по меньшей мере приблизительно 1 недели (в том числе, например, в течение по меньшей мере приблизительно 2 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 6 месяцев, 12 месяцев или более).

Любая из описанных в изобретении композиций тетрамина (например, фармацевтических композиций) может быть введена индивидууму (такому как человек) различными способами, включающими, например, внутривенное, внутриартериальное, интраперитонеальное, внутрилегочное, пероральное, ингаляционное, интравезикулярное, внутримышечное, интратрахеальное, подкожное, интраокулярное, интратекальное, трансмукозальное, трансдермальное, внутрипухоловое введение, прямую инъекцию в стенку кровеносного сосуда, интракраниальное или внутримозговое введение. В некоторых вариантах осуществления может быть использована лекарственная форма с непрерывным замедленным высвобождением композиции тетрамина (такой как фармацевтическая композиция). В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят непосредственно в ишемизированную ткань (например, используя описанные в изобретении способы прямой доставки). В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина вводят хирургическим методом, таким как ангиопластика.

В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина (такая как фармацевтическая композиция) может быть введена вместе со вторым терапевтическим соединением и/или со второй терапией. Доза и частота дозирования композиции тетрамина (такой как фармацевтическая композиция) и второго соединения могут быть скорректированы в течение курса лечения на основе заключения лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления первое и второе лекарственные средства вводят одновременно, последовательно или параллельно. Используемое в изобретении "одновременное введение" может указывать на то, что первое средство и второе средство при комбинированной терапии вводят с временным интервалом не более чем приблизительно 15 мин, например, не более чем приблизительно 10, 5 или 1 мин. Когда первое и второе лекарственные средства вводят одновременно, первое и второе лекарственные средства могут содержаться в одной и той же композиции (например, композиции, включающей как первое, так и второе лекарственное средство) или в отдельных композициях (например, первое лекарственное средство содержится в одной композиции, а второе лекарственное средство содержится в другой композиции). "Последовательное введение" может указывать на то, что первое средство и второе средство при комбинированной терапии вводят с временным интервалом более чем приблизительно 15 мин, например, более чем приблизительно 20, 30, 40, 50, 60 мин или более. Либо первое лекарственное средство, либо второе лекарственное средство может вводиться первым по порядку. Первое и второе

лекарственные средства содержатся в отдельных композициях, которые могут быть расфасованы в одни и те же или разные упаковки или наборы. Параллельное введение может указывать на то, что введение первого указанного средства и введение второго лекарственного средства при комбинированной терапии перекрываются друг с другом. При отдельном введении фармацевтическая композиция и второе соединение могут быть введены с различной частотой дозирования или с различными интервалами. Например, композиция тетрамина (такая как фармацевтическая композиция) может быть введена один раз в сутки, в то время как второе соединение может вводиться более или менее часто. В некоторых вариантах осуществления может быть использована лекарственная форма композиции тетрамина и/или второго соединения с непрерывным замедленным высвобождением. Известны различные композиции и устройства для достижения замедленного высвобождения. Может быть использована комбинация описанных в изобретении конфигураций введения. В некоторых вариантах осуществления вторым соединением является ион меди (например, соль меди или хелат меди). В некоторых вариантах осуществления второй лекарственный препарат включает стволовые клетки или индуктор стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления индивидууму дополнительно вводят эффективное количество медь-промотирующей композиции, включающей ион меди. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество медь-промотирующей композиции, вводимой индивидууму, является достаточным для повышения внеклеточного содержания меди у индивидуума приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300% или более по сравнению с внеклеточным содержанием меди у индивидуума до лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество медь-промотирующей композиции, вводимой индивидууму, является достаточным для повышения суммарного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300% или более по сравнению с суммарным содержанием меди в ишемизированной ткани индивидуума до лечения.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество медь-промотирующей композиции, вводимой индивидууму, является достаточным для повышения внеклеточного содержания меди у индивидуума приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300% или более по сравнению с внеклеточным содержанием меди у индивидуума до лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество медь-промотирующей композиции, вводимой индивидууму, является достаточным для повышения суммарного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300% или более по сравнению с суммарным содержанием меди в ишемизированной ткани индивидуума до лечения. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция, которая не включает ион меди, может быть использована для повышения внеклеточного содержания меди. Например, медь-промотирующая композиция может увеличивать ввод меди, уменьшать выведение меди и/или снижать токсичность цинка.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество иона меди в медь-промотирующей композиции, включающей ион меди, лежит в следующих диапазонах: от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,1 мг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 мг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 1 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 2 мг, от приблизительно 2 до приблизительно 3 мг, от приблизительно 3 до приблизительно 4 мг, от приблизительно 4 до приблизительно 5 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 8 мг, от приблизительно 8 до приблизительно 10 мг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 1 мг или от приблизительно 0,1 до приблизительно 2,5 мг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество иона меди в медь-промотирующей композиции, вводимой индивидууму, включает по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 мкг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество иона меди в медь-промотирующей композиции, вводимой индивидууму, включает менее чем приблизительно 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 30, 20, 10 или 5 мкг/кг.

В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующую композицию вводят один или два раза в день. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующую композицию вводят с такой же частотой дозирования и в течение такого же периода времени, как и композицию тетрамина. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующую композицию вводят с отличающейся частотой дозирования и/или в течение отличающегося периода времени по сравнению с композицией тетрамина. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующую композицию вводят перорально. Эффективное количество и частота дозирования медь-промотирующей композиции могут быть определены во время доклинических и клинических испытаний методами, хорошо известными терапевтам и врачам-клиницистам.

После того как достигнуто улучшение состояния пациента, доза может быть скорректирована для профилактического или поддерживающего лечения. Например, доза или частота введения, или и то, и другое, могут быть уменьшены в зависимости от симптомов до уровня, при котором поддерживается требуемый терапевтический или профилактический эффект. Разумеется, что если в результате симптомы были облегчены до соответствующего уровня, то лечение может быть прекращено. Однако пациентам может потребоваться интермиттирующая терапия на долгосрочной основе после любого повторного

проявления симптомов. Пациентам может также потребоваться длительное лечение на долгосрочной основе.

Известны различные прямые методы доставки лекарственных средств, и они могут быть использованы для введения композиции тетрамина (такой как фармацевтическая композиция) и/или медь-промотирующей композиции.

В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и/или медь-промотирующую композицию доставляют с помощью микропузырька. В некоторых вариантах осуществления ион меди доставляют с помощью наночастиц на основе пептидов, включающих медь. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и/или медь-промотирующую композицию доставляют или таргетируют в ишемизированную ткань пассивно посредством физического воздействия, индуцирующего высвобождение или доставку в ишемизированную ткань, обеспечиваемого наночастицами (или микросферами).

В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и/или медь-промотирующую композицию доставляют путем непосредственного введения композиции тетрамина и/или медь-промотирующей композиции в ишемизированную ткань. В некоторых вариантах осуществления раскрываемые в изобретении композиции тетрамина и/или медь-промотирующую композицию вводят перорально к месту ишемического поражения ткани. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина и/или медь-промотирующая композиция всасывается через пищеварительный тракт. В одном аспекте всасываемую композицию и/или ион меди таргетируют (путем активного таргетирования или пассивного таргетирования) на место ишемического повреждения, и ее высвобождение происходит локально в месте ишемического повреждения с обеспечением эффективной локальной концентрации композиции тетрамина и/или медь-промотирующей композиции для восстановления ткани. В некоторых вариантах осуществления перорально доставляемый ион меди образует соединение или комплекс с белком, пептидом, аминокислотой или моно-, ди- или полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления ион меди образует соединение или комплекс с одним или более полимерами. В других вариантах осуществления ион меди находится в металлорганическом соединении, таком как низкомолекулярное металлорганическое соединение.

В некоторых вариантах осуществления раскрытая в изобретении композиция с замедленной доставкой включает инъекционные препараты пролонгированного действия (например, инъекции на масляной основе, инъекцируемые суспензии, инъекцируемые микросферы и инъекцируемые *in situ* системы), содержащие композицию тетрамина и/или композицию меди, вещества и полимеры для инъекций в депо-форме, выпускаемые промышленностью инъекции в депо-форме, и инъекцируемые системы доставки с замедленным высвобождением. В конкретных вариантах осуществления раскрытая в изобретении композиция с замедленной доставкой включает полимерную матрицу, из которой лекарственное средство высвобождается в результате диффузии и/или разложения полимерной матрицы. Поэтому характеристика высвобождения лекарственного средства определяется, главным образом, полимерной матрицей, а также содержанием загруженного лекарственного средства и методом изготовления. В некоторых вариантах осуществления в препаратах с замедленным высвобождением используют биоразлагаемый полимер. В этом случае препараты с замедленным высвобождением не требуют их последующего хирургического удаления из организма субъекта. Обычно такие препараты медленно разлагаются и абсорбируются в организме пациента и, в конечном счете, удаляются с другими растворимыми метаболическими отходами жизнедеятельности.

В некоторых вариантах осуществления используют полимерную инъекцируемую депо-систему для доставки *in situ*-образующегося импланта, содержащего композицию тетрамина и/или композицию меди, на место ишемического повреждения. *In situ*-образующие имплант системы обычно изготавливают из биоразлагаемых продуктов, которые могут быть инъекцированы с помощью шприца в организм, и после инъекции застывают с образованием твердого биоразлагаемого импланта. В некоторых вариантах осуществления имплант формируют из термопластичных пастообразных масс, *in situ* сшитых полимеров, путем *in situ* осаждения полимера, термически индуцируемого гелеобразования или *in situ* отверждения органелл. Механизм формирования депо из термопластичных паст заключается в образовании полутвердого вещества в результате охлаждения до температуры тела после инъекцирования в организм в расплавленной форме. Сшитые трехмерные полимерные структуры могут быть получены *in situ* различными способами, образуя твердые полимерные системы или гели. Методы для *in situ* сшитых систем включают свободнорадикальные реакции, обычно инициируемые нагреванием или абсорбцией фотонов, или межмолекулярные взаимодействия между небольшими катионами и полимерными анионами. *In situ* формирования могут быть получены в результате осаждения полимера из раствора. Водонерастворимый и биоразлагаемый полимер солибилизируют в биосовместимом органическом растворителе, к которому добавляют лекарственное средство, получая раствор или суспензию после смешения. Когда эту композицию инъекцируют в организм, смешивающийся с водой органический растворитель рассеивается и вода проникает в органическую фазу. Это приводит к разделению фаз и осаждению полимера, образуя депо в месте инъекции. Термически индуцируемые системы гелеобразования демонстрируют термообратимые золь/гель переходы, и характеризуются нижней критической температурой растворения. Они являются жидкостями при комнатной температуре и образуют гель при нижней критической температурой растворения и

более высоких температурах. *In situ* отверждение органелл включает водонерастворимые амфифильные липиды, которые набухают в воде и образуют различные типы лиотропных жидких кристаллов.

В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и/или медь-промотирующую композицию инъецируют в место ишемического повреждения, например, путем прямой чрескожной пункции, с помощью установленного хирургическим путем катетера или путем межпозвоночной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и/или медь-промотирующую композицию доставляют непосредственно в место ишемического повреждения путем использования импланта, стента или пластинки, на которые нанесен слой композиции тетрамина и/или медь-промотирующей композиции, или импланта, импрегнированного композицией тетрамина и/или медь-промотирующей композицией. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и/или медь-промотирующую композицию доставляют непосредственно в место ишемического повреждения путем медленного высвобождения композиции тетрамина и/или медь-промотирующей композиции из внутрисосудистого стента, соединенного с источником композиции тетрамина и/или медь-промотирующей композиции. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и/или медь-промотирующую композицию доставляют непосредственно в место ишемического повреждения путем точного таргетирования липосомы или донорно-акцепторного комплекса. В некоторых вариантах осуществления композицию тетрамина и/или медь-промотирующую композицию доставляют в место ишемического повреждения, используя физиотерапевтический метод, ультразвук, лекарственный электрофорез, ультразвуковое усиление проникновения, электропорацию и/или применение губки. Применение композиции тетрамина и/или клеток в месте ишемического повреждения может быть местным (например, через кожу), может быть в некоторой локализации в поврежденной ткани, которая находится внутри поверхности тела, или и тем и другим методом. Например, композиция тетрамина и/или медь-промотирующая композиция может быть доставлена путем электрофореза через кровеносный сосуд, эндотелиальный клеточный слой или другие внутренние ткани в место ишемического повреждения для обеспечения эффективной локальной концентрации композиции тетрамина и/или медь-промотирующей композиции для восстановления ткани.

В некоторых вариантах осуществления раскрытая в изобретении композиция с замедленным высвобождением включает биоразлагаемый полимер для контролируемой доставки композиции тетрамина и/или медь-промотирующей композиции. Подходящие биоразлагаемые полимеры обычно включают полилактиды (PLA), полигликолиды (PGA), сополимер лактид-гликолид (PLGA), поли(ϵ -капролактон) (PCL), полигликонат, полиангидриды, полиортоэфир, поли(диоксанон) и полиалкилцианоакрилаты. В некоторых вариантах осуществления композиция с замедленным высвобождением включает инъецируемые биоразлагаемые микросферы, такие как PLGA микросферы, PCL микросферы, полиангидридные микросферы, полиортоэфирные микросферы и полиалкилцианоакрилатные микросферы.

В конкретных вариантах осуществления целый ряд различных типов медьсодержащих соединений может быть использован для локализованной доставки медь-промотирующей композиции непосредственно в место ишемического повреждения. Примерами подходящих растворов, содержащих ион меди, являются растворы хлорида меди(I), хлорида меди(II), ацетата меди и сульфата меди. В некоторых вариантах осуществления медь образует соединение или комплекс с белком, пептидом, аминокислотой, моно-, ди- или полисахаридом, одним или более полимерами, или с малой молекулой, и соединение или комплекс используют для непосредственной локализованной доставки в место ишемического повреждения. В некоторых вариантах осуществления металлорганическое соединение, содержащее ион меди, используют для непосредственной локализованной доставки в место ишемического повреждения.

В некоторых вариантах осуществления концентрация ионов меди в медь-промотирующей композиции, используемой для локализованной доставки непосредственно в место повреждения, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 10 мкМ, от приблизительно 10 до приблизительно 20 мкМ, от приблизительно 20 до приблизительно 40 мкМ, от приблизительно 40 до приблизительно 60 мкМ, от приблизительно 60 до приблизительно 80 мкМ, от приблизительно 80 до приблизительно 100 мкМ, от приблизительно 100 до приблизительно 200 мкМ, от приблизительно 200 до приблизительно 400 мкМ, от приблизительно 400 до приблизительно 600 мкМ, от приблизительно 600 до приблизительно 800 мкМ, от приблизительно 800 до приблизительно 1 мМ, от приблизительно 1 до приблизительно 5 мМ, от приблизительно 5 до приблизительно 10 мМ, от приблизительно 10 до приблизительно 20 мМ, от приблизительно 20 до приблизительно 40 мМ или от приблизительно 40 до приблизительно 60 мМ. Концентрация иона меди может быть определена во время доклинических испытаний и клинических испытаний методами, хорошо известными терапевтам и врачам-клиницистам.

Медь и способные к образованию хелата с медью тетрамины.

Термины "медь", "ион меди" и "элементарная медь" используются в изобретении взаимозаменяемо. В биологических системах, ионы меди обычно существуют в двух степенях окисления, в форме одновалентной меди (Cu^{1+} , медь(I) или восстановленная) и двухвалентной меди (Cu^{2+} , медь(II) или окисленная). В некоторых вариантах осуществления медь включает обе формы одновалентной и двухвалентной меди. В некоторых вариантах осуществления медь является двухвалентной (Cu^{2+}). В некоторых вариантах осуществления медь является одновалентной (Cu^{1+}). В некоторых вариантах осуществления медь представляет собой свободный ион, т.е. не связанный или в комплексе с другой молекулой, такой как белок,

или с низкомолекулярной органической молекулой. В некоторых вариантах осуществления медь находится в форме соли. В некоторых вариантах осуществления медь присутствует в форме соли, выбранной из сульфата меди, хлорида меди, оксида меди, глюконата меди и хелатов меди с аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления медь присутствует в форме комплексного иона. В некоторых вариантах осуществления медь находится в металлорганическом соединении, таким как низкомолекулярное металлорганическое соединение. В некоторых вариантах осуществления медь находится в комплексе с хелатирующим медь тетрамином. В некоторых вариантах осуществления медь представляет собой комплексный ион, включающий различные виды ионов, образовавшийся в результате введения меди в клетку, ткань или организм в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления медь образует соединение или комплекс с белком, пептидом, аминокислотой или моно-, ди- или полисахаридом. Важные связываемые медью белки, обнаруживаемые в биологических системах, включают, но этим не ограничиваясь, цитохром-с-оксидазу (CсO), медь-цинк супероксиддисмутазу (Cu, Zn-SOD), дофамин β -гидроксилазу (DBH), белок приона (PrP), тирозиназу, X-сцепленный ингибитор апоптоза белка (XIAP), лизилоксидазу, металлотионеин (MT) и церулоплазмин. В некоторых вариантах осуществления медь находится в форме, не доступной для усвоения или использования ишемизированной тканью, например, в комплексе с церулоплазмином. В некоторых вариантах осуществления медь находится в форме, доступной для усвоения или использования ишемизированной тканью. В некоторых вариантах осуществления раскрытая в изобретении медь является индуктором транскрипционной активности HIF-1.

Медь-промотирующая композиция, включающая описанный выше любой вид иона меди, может быть использована в описанных в изобретении способах. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция включает Cu^{2+} . В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция включает Cu^{1+} . В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция включает ион меди в форме соли (например, любой или комбинации, выбранной из сульфата меди, хлорида меди, оксида меди, глюконата меди и хелатов меди с аминокислотами). В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция включает металлорганическое соединение. В некоторых вариантах осуществления медь-промотирующая композиция не включает ион меди или соединения меди.

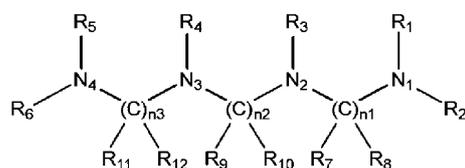
"Содержание меди", на которое ссылаются в любом из описанных в изобретении способов, может относиться к концентрации любого одного из описанных в изобретении видов соединений меди, например, Cu^{2+} , Cu^{1+} , или концентрации суммарной меди (например, Cu^{1+} и Cu^{2+} и/или свободной или несвязанной меди). В некоторых вариантах осуществления содержание меди относится к содержанию двухвалентной меди. В некоторых вариантах осуществления содержание меди относится к содержанию меди, которая находится в форме, доступной для усвоения или использования ишемизированной тканью.

"Хелатирующий медь тетрамин" относится к соединению тетрамина, связывающему медь или образующему хелат с медью. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин связывает Cu^{2+} . В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин связывает Cu^{1+} . В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин проявляет специфичность (т.е. имеет более высокое сродство) к Cu^{2+} по сравнению с Cu^{1+} . В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин образует комплекс с ионом меди в плоско-квадратной, искаженной плоско-квадратной, тригонально-пирамидальной, квадратно-пирамидальной искаженной октаэдральной конфигурации. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин изменяет равновесие между Cu^{1+} и Cu^{2+} в клетках или организмах. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин может изменять (например, понижать) содержание меди (например, суммарное содержание меди) у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин может изменять (например, понижать) содержание меди (например, суммарное содержание меди) в крови индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин может повышать внутриклеточное содержание меди (например, суммарное содержание меди или содержание двухвалентной меди). В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин может повышать концентрацию меди в форме, доступной для ишемизированной ткани у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин может изменять направление внутриклеточной направленной миграции и/или транспорта меди между тканями или между органами. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин специфически связывается с ишемизированной тканью и/или усваивается ишемизированной тканью, такой как ишемизированная сердечная ткань. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин (в том числе его комплекс с медью) способен проникать через мембрану. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин (в том числе его комплекс с медью) растворим в жирах. В некоторых вариантах осуществления стехиометрическое отношение хелатирующего медь тетрамина к меди в его комплексе составляет приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин обратимо связывает ион меди. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин связывает ион меди с достаточно низким сродством внутри клеток в ишемизированной ткани, что позволяет разгрузку или диссоциацию иона меди.

Любой хелатирующий медь тетрамин, который может повышать внутриклеточное содержание меди, может быть использован в описанных в изобретении способах. Хелатирующий медь тетрамин может относиться к самим его соединениям, фармацевтически приемлемым солям, активным метаболитам, производным и пролекарствам, а также к стереоизомеру, энантиомерам, рацемическим смесям и другим подобным соединениям, при наличии соответствующей возможности. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является линейным. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является разветвленным. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является циклическим. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин выбирают из триэтилтетрамина (2,2,2-тетрамина), 2,3,2-тетрамина и 3,3,3-тетрамина.

В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является триентином. "Триентин" также называют триэтилтетрамином, 2,2,2-тетрамином, N,N'-бис-(2-аминоэтил)-1,2-этандиамином, 1,8-диамино-3,6-дизаоктаном, 3,6-дизаоктан-1,8-диамином, 1,4,7,10-тетразадеканом, триеном, ТЕТА, ТЕСЗА, N,N'-бис-(аминоэтил)этилендиамином, N,N'-бис-(2-аминоэтил)этандиамином и N,N'-бис-(2-аминоэтил)этилендиамином. В некоторых вариантах осуществления триентин является соединением формулы $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, или его фармацевтически приемлемой солью.

Другие способные к образованию хелата с медью тетрамины с аналогичными свойствами хелатирования меди могут включать, но этим не ограничиваясь, соединения формулы (II) и их фармацевтически приемлемые соли:



Формула (II)

В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является ациклическим соединением формулы (II), где R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ и R₆ независимо выбирают из H, CH₃, C₂-C₁₀-линейного или разветвленного алкила, C₃-C₁₀-циклоалкила, C₁-C₆-алкил-C₃-C₁₀-циклоалкила, арила, моно-, ди-, три-, тетра- и пентазамещенного арила, гетероарила, конденсированного арила, C₁-C₆-алкиларила, C₁-C₆-алкил моно-, ди-, три-, тетра- и пентазамещенного арила, C₁-C₅-алкилгетероарила, C₁-C₆-алкил конденсированного арила, CH₂COOH, CH₂SO₃H, CH₂PO(OH)₂, CH₂P(CH₃)O(OH); n₁, n₂ и n₃ независимо выбирают из 2 или 3 и R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ и R₁₂ независимо выбирают из H, CH₃, C₂-C₁₀-линейного или разветвленного алкила, C₃-C₁₀-циклоалкила, C₁-C₆-алкил-C₃-C₁₀-циклоалкила, арила, моно-, ди-, три-, тетра- и пентазамещенного арила, гетероарила, конденсированного арила, C₁-C₆-алкиларила, C₁-C₆-алкил моно-, ди-, три-, тетра- и пентазамещенного арила, C₁-C₅-алкилгетероарила, C₁-C₆-алкил конденсированного арила. Кроме того, один или несколько из R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ или R₆ могут быть функционализированы для присоединения, например, к пептидам, белкам, полиэтиленгликолям и другим таким химическим структурным элементам с целью модификации общей фармакокинетики, эффективности доставки и/или периода полувыведения конструкций. Примеры такой функционализации включают, но этим не ограничиваясь, C₁-C₁₀-алкил-CO-пептид, C₁-C₁₀-алкил-CO-белок, C₁-C₁₀-алкил-CO-PEG, C₁-C₁₀-алкил-NH-пептид, C₁-C₁₀-алкил-NH-белок, C₁-C₁₀-алкил-NH-CO-PEG, C₁-C₁₀-алкил-S-пептид, C₁-C₁₀-алкил-S-белок. Кроме того, один или несколько из R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ или R₁₂ могут быть функционализированы для присоединения, например, к пептидам, белкам, полиэтиленгликолям и другим таким химическим структурным элементам с целью модификации общей фармакокинетики, эффективности доставки и/или периода полувыведения конструкций. Примеры такой функционализации включают, но этим не ограничиваясь, C₁-C₁₀-алкил-CO-пептид, C₁-C₁₀-алкил-CO-белок, C₁-C₁₀-алкил-CO-PEG, C₁-C₁₀-алкил-NH-пептид, C₁-C₁₀-алкил-NH-белок, C₁-C₁₀-алкил-NH-CO-PEG, C₁-C₁₀-алкил-S-пептид и C₁-C₁₀-алкил-S-белок.

В некоторых вариантах осуществления хелатирующий медь тетрамин является циклическим соединением формулы (II), где R₁ и R₆ соединены друг с другом с образованием мостиковой группы (CR₁₃R₁₄)_{n4} и где R₂, R₃, R₄ и R₅ независимо выбирают из H, CH₃, C₂-C₁₀-линейного или разветвленного алкила, C₃-C₁₀-циклоалкила, C₁-C₆-алкил-C₃-C₁₀-циклоалкила, арила, моно-, ди-, три-, тетра- и пентазамещенного арила, гетероарила, конденсированного арила, C₁-C₆-алкиларила, C₁-C₆-алкил моно-, ди-, три-, тетра- и пентазамещенного арила, C₁-C₅-алкилгетероарила, C₁-C₆-алкил конденсированного арила, CH₂COOH, CH₂SO₃H, CH₂PO(OH)₂, CH₂P(CH₃)O(OH); n₁, n₂ и n₃ независимо выбирают из 2 или 3 и R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ и R₁₄ независимо выбирают из H, CH₃, C₂-C₁₀-линейного или разветвленного алкила, C₃-C₁₀-циклоалкила, C₁-C₆-алкил-C₃-C₁₀-циклоалкила, арила, моно-, ди-, три-, тетра- и пентазамещенного арила, гетероарила, конденсированного арила, C₁-C₆-алкиларила, C₁-C₆-алкил моно-, ди-, три-, тетра- и пентазамещенного арила, C₁-C₅-алкилгетероарила, C₁-C₆-алкил конденсированного арила. Кроме того, один или несколько из R₂, R₃, R₄ или R₅ могут быть функционализированы для присоединения, например, к пептидам, белкам, полиэтиленгликолям и другим таким химическим структурным элементам с целью модификации общей фармакокинетики, эффективности доставки и/или периода полувыведения конструкций.

ведения конструкций. Примеры такой функционализации включают, но этим не ограничиваясь, C₁-C₁₀-алкил-СО-пептид, C₁-C₁₀-алкил-СО-белок, C₁-C₁₀-алкил-СО-PEG, C₁-C₁₀-алкил-NH-пептид, C₁-C₁₀-алкил-NH-белок, C₁-C₁₀-алкил-NH-СО-PEG, C₁-C₁₀-алкил-S-пептид, C₁-C₁₀-алкил-S-белок. Кроме того, один или несколько из R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ и R₁₄ могут быть функционализированы для присоединения, например, к пептидам, белкам, полиэтиленгликолям и другим таким химическим структурным элементам с целью модификации общей фармакокинетики, эффективности доставки и/или периода полувыведения конструкций. Примеры такой функционализации включают, но этим не ограничиваясь, C₁-C₁₀-алкил-СО-пептид, C₁-C₁₀-алкил-СО-белок, C₁-C₁₀-алкил-СО-PEG, C₁-C₁₀-алкил-NH-пептид, C₁-C₁₀-алкил-NH-белок, C₁-C₁₀-алкил-NH-СО-PEG, C₁-C₁₀-алкил-S-пептид и C₁-C₁₀-алкил-S-белок.

"Фармацевтически приемлемые соли" относятся к солям, полученным из фармацевтически приемлемых нетоксичных оснований или кислот, в том числе неорганических или органических оснований и неорганических или органических кислот и других подобных оснований и кислот. Когда, например, соединение обладает свойствами основания, соли могут быть получены из фармацевтически приемлемых нетоксичных кислот, в том числе из неорганических и органических кислот. Такие кислоты включают, например, уксусную, бензолсульфоновую, бензойную, камфорсульфоновую, лимонную, этансульфоновую, фумаровую, глюконовую, глутаминовую, бромистоводородную, хлористоводородную, изэтиновую, молочную, малеиновую, яблочную, миндальную, метансульфоновую, слизевую, азотную, памовую, пантотеновую, фосфорную, янтарную, серную, винную, п-толуолсульфоновую кислоту и другие подобные кислоты. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли хелатирующего медь тетрамина выбирают из гидрохлоридной соли (например, триэтилететрамина дигидрохлорида), сукцинатной соли (например, триэтилететрамина дисукцината), малеатной соли (например, триэтилететрамина тетрамаалеата) и фумаратной соли (например, триэтилететрамина тетрафумарата). Хелатирующий медь тетрамин, такой как триентин, может быть также в форме четвертичных аммониевых солей, в которых атом азота несет подходящую органическую группу, такую как алкильный, алкенильный, алкинильный или аралкильный фрагмент. Метаболиты хелатирующего медь тетрамина могут включать, но этим не ограничиваясь, ацетилированные метаболиты, такие как N-ацетил-триэтилететрамин (например, моноацетилтриэтилететрамин).

Производные хелатирующего медь тетрамина могут включать, но этим не ограничиваясь, PEG-модифицированные тетрамины (такие как триентин-PEG).

Хелатирующий медь тетрамин, в том числе триентин, может быть получен, используя любой из ряда известных методов химического синтеза, выделения и очистки. Например, см. патентные документы U.S. Pat. No. 4806517, U.S. Pat. No. 4550209, U.S. Pat. No. 5225599, U.S. Pat. No. 4766247, European Patent No. EP262562, U.S. Patent No. 8394992 и U.S. Pat. Publication No. US20130108709 A1.

Индивидуум, имеющий ишемическое поражение ткани.

Описанное в изобретении "ишемическое поражение ткани" относится к повреждению ткани, включающей, например, кардиоваскулярную ткань, ткань печени, ткань головного мозга, ткань скелетной мышцы и другие подобные ткани, что приводит к ограничению кровоснабжения ткани, вызывающему недостаток кислорода и глюкозы, необходимых для клеточного метаболизма в ткани. Повреждение может подразумевать любое число патологических состояний или травму под воздействием внешнего фактора, приводящих к нарушению кровообращения. В некоторых вариантах осуществления ишемическое поражение ткани представляет собой сердечно-сосудистую ишемию. В некоторых вариантах осуществления ишемическое поражение ткани представляет собой ишемию головного мозга или ишемический инсульт. В некоторых вариантах осуществления ишемическое поражение ткани представляет собой ишемию конечностей, такую как ишемия нижних конечностей. В некоторых вариантах осуществления ишемическое поражение ткани представляет собой ишемию кишечника, такую как ишемический колит или мезентеральный тромбоз. В некоторых вариантах осуществления ишемическое поражение ткани представляет собой ишемию кожи. В некоторых вариантах осуществления ишемическое поражение ткани связано с эмболией, тромбозом, аневризмой, травмой, инфарктом миокарда, заболеванием митрального клапана, хронической фибрилляцией предсердий, кардиомиопатией, протезированием, компрессионным синдромом верхней апертуры грудной клетки, атеросклерозом, гипогликемией, тахикардией, гипотонией, сжатием кровеносного сосуда опухолью, серповидноклеточной анемией, обморожением, артериовенозной мальформацией, окклюзионным заболеванием периферических артерий, разрывом важных кровеносных сосудов, анемией, диабетом, язвами диабетической стопы, некротизирующим энтероколитом, язвенным колитом, болезнью Крона, воспалительным заболеванием кишечника, рестенозом (после ангиопластики или установки стента) или панкреатитом. В некоторых вариантах осуществления ишемическое поражение ткани связано с кардиомиопатией. В некоторых вариантах осуществления ишемическое поражение ткани связано с инфарктом миокарда. В некоторых вариантах осуществления ишемическое поражение ткани связано с диабетом.

Описанные в изобретении способы поэтому, обычно применяют при многих заболеваниях, при которых происходит ишемическое поражение ткани. Эти заболевания включают, но этим не ограничиваясь, инфаркт миокарда, кардиомиопатию, аневризму, стенокардию, аортальный стеноз, аортит, аритмии, артериосклероз, артериит, асимметричную гипертрофию перегородки (ASH), атеросклероз, фибрилля-

цию и трепетание предсердий, бактериальный эндокардит, синдром Барлоу (пролапс митрального клапана), брадикардию, болезнь Бюргера (облитерирующий тромбангиит), кардиомегалию, кардит, заболевание сонной артерии, коарктацию аорты, врожденные пороки сердца, застойную сердечную недостаточность, заболевание коронарной артерии, синдром Эйзенменгера, эмболию, эндокардит, эритромелалгию, фибрилляцию, фиброзномышечную дисплазию, блокаду сердца, шум в сердце, гипертонию, гипотонию, идиопатическое обызвествление артерии у детей, синдром Кавасаки (синдром кожно-слизистых лимфоузлов, заболевание кожно-слизистых лимфоузлов, детский полиартериит), метаболический синдром, микроваскулярную стенокардию, миокардит, пароксизмальную предсердную тахикардию (ПАТ), узелковый периартериит (полиартериит, нодозный полиартериит), перикардит, заболевание периферических кровеносных сосудов, критическую ишемию конечностей, флебит, стеноз легочного ствола (легочный стеноз), болезнь Рейно, стеноз почечной артерии, реноваскулярную гипертонию, ревматическое поражение сердца, диабетическую васкулопатию, дефекты перегородки, "немую" ишемию, синдром Х, тахикардию, артерит Такаясу, тетралогию Фалло, транспозицию магистральных сосудов, атрезию трехстворчатого клапана, общего артериального ствола, порок клапана сердца, варикозные язвы, варикозное расширение вен, васкулит, дефект межжелудочковой перегородки, синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта, дефект формирования перегородки атриовентрикулярного канала, острую ревматическую лихорадку, острый ревматический перикардит, острый ревматический эндокардит, острый ревматический миокардит, хронические ревматические заболевания сердца, заболевания митрального клапана, митральный стеноз, ревматическую митральную недостаточность, заболевания аортального клапана, заболевания других эндокардиальных структур, ишемическую болезнь сердца (острую и подострую), стенокардию, острую легочно-сердечную недостаточность, эмболию легких, хроническую легочно-сердечную недостаточность, кифосколиотическое заболевание сердца, миокардит, эндокардит, эндомикардиальный фиброз, субэндокардиальный фиброэластоз, атриовентрикулярную блокаду, сердечную аритмию, миокардиальную дегенерацию, цереброваскулярное заболевание, заболевание артерий, артериол и капилляров или заболевание вен и лимфатических сосудов; приобретенное повреждение головного мозга, травматическое повреждение головного мозга, инсульт (в том числе ишемический, внутричерепной геморагический, субарахноидальный геморагический), повреждения от гипоксии, метаболические нарушения, энцефалит и повреждения головного мозга в результате инфекции. В конкретных вариантах осуществления заболевания, которые вызывают ишемическое поражение ткани, включают системный саркоидоз, заболевание или состояние кожи, синдром Лефгрена, заболевание или состояние легки, заболевание или состояние сердца, заболевание или состояние глаз, заболевание или состояние печени, заболевание или состояние скелетных мышц и заболевание или состояние почек. Настоящее изобретение, таким образом, также включает лечение любого из заболеваний, используя описанные в изобретении способы.

Описанный в изобретении "индивидуум", "субъект" или "пациент" относится к млекопитающему, такому как мыши, крысы, кролики, кошки, собаки, свиньи, коровы, быки, овцы, козы, лошади, обезьяны и другие низшие приматы, и люди, к позвоночному, такому как рыба, и к птице, такой как цыпленок. Млекопитающие могут включать сельскохозяйственных животных, животных для спортивных соревнований, грызунов и домашних животных. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является человек.

Описанные в изобретении способы могут применяться в отношении индивидуума, имеющего одно или более повреждений ишемизированной ткани, включая, но этим не ограничиваясь, ишемическое повреждение миокарда, ишемическое повреждение головного мозга, ишемическое повреждение спинного мозга, ишемическое повреждение мышцы, ишемическое повреждение скелета, острый канальцевый некроз, ишемическое повреждение кишечника, ишемическое повреждение легкого, ишемическое повреждение печени, ишемическое повреждение почек, ишемическое повреждение кожи, грыжу, сосудистые анастомозы, атеросклеротическую бляшку, гемангиому и после травматического повреждения, нанесенного тупым предметом, или проникающего травматического повреждения.

В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из описанных в изобретении способов, индивидуум не имеет нарушенной системы восстановления тканей. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет нарушенную систему восстановления тканей. Индивидуумы с нарушенной системой восстановления тканей могут иметь одну или более из следующих характеристик: (а) преклонный возраст (например, по меньшей мере около 60 лет, в том числе, например, по меньшей мере около 65, 70, 75, 80, 85, 90 лет или более); (b) хроническое поражение ткани (например, индивидуум, который имеет поражение ткани в течение по меньшей мере уже 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 или 24 месяцев); (с) дефицит стволовых клеток; (d) отсутствие миграции (т.е. хоуминга) стволовых клеток; (е) нарушенная система восстановления ткани и (f) один или более из следующих симптомов или состояний: потеря памяти, низкая или пониженная двигательная способность (в том числе, но этим не ограничиваясь, низкая или пониженная способность прикладывать физические усилия, низкая или пониженная скоростная выносливость, гибкость и подвижность суставов), гипестезия, мышечная слабость, потеря слуха и хроническое растяжение сухожилия.

В некоторых вариантах осуществления возраст индивидуума составляет по меньшей мере около 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 лет или более. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет возраст

моложе приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 лет. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет хроническую ишемию. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет отток меди из ишемизированной ткани (такой как ишемизированный миокард) в кровоток. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет снижение содержания (менее чем приблизительно на 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%) меди в ишемизированная ткань. В некоторых вариантах осуществления пониженное содержание меди в ишемизированной ткани обусловлено хроническими ишемическими состояниями. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет репрессированную транскрипционную активность HIF-1.

В некоторых вариантах осуществления индивидуума выбирают для лечения на основе его или ее показателей по содержанию меди, таких как внутриклеточное содержание меди, внеклеточное содержание меди, суммарное содержание меди и содержание меди в сыворотке (т.е. в крови). Индивидуумы с хроническими ишемическими состояниями обычно имеют низкое внутриклеточное содержание меди в ишемизированной ткани, например, приблизительно меньше на 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10% или менее, чем среднее внутриклеточное содержание меди в соответствующей ткани здоровых индивидуумов. Содержание меди в сыворотке, например, суммарное содержание меди в сыворотке, содержание меди, связанной с белком (например, с церулоплазмином), в сыворотке или свободной (т.е. не связанной) меди в сыворотке для индивидуумов с хроническими ишемическими состояниями является обычно выше (например, приблизительно в 1,2 раза, 1,5 раза, 1,75 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или более), чем среднее содержание меди в сыворотке здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления до введения композиции тетрамина, индивидуум имеет суммарное содержание меди в сыворотке по меньшей мере приблизительно 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 250, 300 мкг/дл или более. В некоторых вариантах осуществления до введения композиции тетрамина, индивидуум имеет суммарное содержание меди в сыворотке не больше чем приблизительно 1 раз, 1,2 раза, 1,5 раза, 1,75 раза или 2 раза по сравнению со средним суммарным содержанием меди в сыворотке здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления до введения композиции тетрамина, индивидуум имеет суммарное содержание меди в сыворотке не более чем приблизительно 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 250, 300 мкг/дл. В некоторых вариантах осуществления после введения композиции тетрамина, индивидуум имеет по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90% или более от среднего суммарного содержания меди в сыворотке здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления после введения композиции тетрамина, индивидуум имеет по меньшей мере суммарное содержание меди в сыворотке приблизительно 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 или 150 мкг/дл.

В некоторых вариантах осуществления индивидуума выбирают для лечения на основе его или ее показателей по уровню активности HIF-1. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет репрессированную транскрипционную активность HIF-1 генов-мишеней в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет высокий уровень (например, уровень белка или РНК) HIF-1 α в ишемизированной ткани, но репрессированную транскрипционную активность HIF-1 генов-мишеней в ишемизированной ткани. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет хроническую ишемию, которая приводит к репрессированной активности HIF-1.

Наборы и готовые изделия.

В настоящем изобретении также предлагаются наборы, лекарственные препараты, композиции и лекарственные формы с разовой дозой для применения в любом из описанных в изобретении способах.

Предлагаемые в изобретении наборы включают один или более контейнеров, включающих любую одну из описанных в изобретении композиций тетрамина (включая фармацевтические композиции) и/или другое средство (средства), и в некоторых вариантах осуществления дополнительно включают инструкции по применению в соответствии с любым из описанных в изобретении способами. Набор может дополнительно включать описание методики выбора индивидуума, подходящего для лечения. Инструкции, которыми снабжены наборы согласно изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или на листке-вкладыше (например, на листке бумаги, вложенном в набор), но также допустимо использование инструкций, которые можно прочесть с помощью компьютера (например, инструкции на магнитном или оптическом носителе для хранения информации).

Например, в некоторых вариантах осуществления набор включает а) композицию тетрамина, включающую хелатирующий медь тетрамин (такой как триентин) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель; и, необязательно, б) инструкции по введению композиции тетрамина для лечения заболевания или состояния, связанного с ишемическим поражением ткани.

В некоторых вариантах осуществления набор включает а) композицию тетрамина, включающую хелатирующий медь тетрамин (такой как триентин) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель; б) медь-промотирующую композицию, включающую ион меди (например, CuSO_4 или CuCl_2) и фармацевтически приемлемый носитель; и, необязательно, в) инструкции по введению композиции тетрамина и медь-промотирующей композиции для лечения заболевания или состояния, связанного с ишемическим поражением ткани.

Наборы по изобретению находятся в подходящих упаковках. Подходящие упаковки включают, но этим не ограничиваясь, флаконы, бутылочки, сосуды, эластичную упаковку (например, герметизирован-

ные пакеты из полиэтилентерефталата или пластика) и другие подобные упаковки. В наборы могут не обязательно вложены и другие компоненты, такие как буферы и пояснительная информация. Соответственно, в настоящем изобретении также предлагаются готовые изделия, которые включают флаконы (например, герметизированные флаконы), бутылочки, сосуды, эластичную упаковку и другие подобные изделия.

В некоторых вариантах осуществления наборы включают один или более компонентов, которые облегчают доставку композиции тетрамина, медь-промотирующей композиции и/или дополнительных терапевтических средств индивидууму. Например, в некоторых вариантах осуществления набор включает компоненты, которые облегчают доставку композиции тетрамина и/или медь-промотирующей композиции внутрь пораженной ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления набор включает, например, шприцы и иглы, подходящие для доставки клеток индивидууму, и другие подобные изделия. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина и/или медь-промотирующая композиция может содержаться в наборе в контейнере или в одном, или более флаконах. В некоторых вариантах осуществления набор включает компоненты, которые облегчают внутривенную или внутриартериальную доставку композиции тетрамина и/или медь-промотирующей композиции индивидууму. В некоторых вариантах осуществления композиция тетрамина и/или медь-промотирующая композиция может содержаться, например, в бутылке или контейнере (например, контейнере для крови или аналогичном контейнере, способном вмещать приблизительно до 1,5 л раствора, включающего клетки), и набор дополнительно включает систему для инфузии и иглы, подходящие для доставки композиции тетрамина и/или медь-промотирующей композиции индивидууму.

Инструкции относительно применения композиций обычно включают информацию в отношении дозы, режима дозирования и способа введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут представлять собой разовые дозы, многодозовые упаковки (например, многодозовые фасовки) или кратные дозы от разовой дозы. Например, могут предлагаться наборы, которые содержат достаточные дозы раскрытого в изобретении хелатирующего медь тетрамина для обеспечения эффективного лечения индивидуума в течение продолжительного периода времени, например, в течение недели, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 6 недель, 8 недель, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или более.

Наборы могут также включать множество разовых доз фармацевтических композиций и инструкций для использования и упаковки с количествами, достаточными для хранения и применения в аптеках, например, больничных аптеках и рецептурных аптеках.

Кроме того, предлагаются лекарственные препараты, композиции и лекарственные формы с разовой дозой, которые могут применяться в описанных в изобретении способах.

Следующие далее неограничивающие примеры дополнительно иллюстрируют композиции и способы по настоящему изобретению. Для специалистов в этой области является очевидным, что в рамках объема и сущности этого изобретения возможно существование и других вариантов осуществления. Далее изобретение будет описано более подробно с помощью следующих неограничивающих примеров. Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но, разумеется, их никоим образом не следует рассматривать в качестве ограничений для объема изобретения.

Примеры

Пример 1. Кристаллическая структура комплекса триентина с ионом меди.

Кристаллизовали комплекс, включающий дихлорид триентина, ион меди и воду. Выбрали подходящий монокристалл (150116_s2_lzh_m) и регистрировали рентгенограммы монокристалла на дифрактометре Xcalibur Eos. В процессе снятия рентгенограмм поддерживали температуру кристалла при 143,00-143,10 К. Используя программное обеспечение Olex2 (Dolomanov et al., (2009), J. Appl. Cryst. 42:339-341), была решена структура с помощью программы решения кристаллических структур Superflip (Palatinus et al., (2008), J. Appl. Cryst. 41:975-984; Palatinus et al., (2012), J. Appl. Cryst. 45:575-580) с использованием алгоритма Charge Flipping и уточнена с помощью программного пакета для уточнения кристаллических структур ShelXL (Sheldrick G.M. (2008), Acta Cryst. A64:112-122), используя алгоритм минимизации методом наименьших квадратов. Эмпирическая формулу комплекса в каждой элементарной ячейке была определена как $C_6H_{20}Cl_2CuN_4O$. Уточненная кристаллическая структура и ее параметры приведены на фиг. 1-3 и 4А-4С.

Пример 2. Внутриклеточная доставка меди в кардиомиоциты с помощью триентина и комплекса триентин-медь.

В этом примере описывается исследование доставки меди *in vitro* в кардиомиоциты с помощью триентина и комплекса триентин-медь. Блок-схема проведения эксперимента показана на фиг. 5.

Первичные культуры кардиомиоцитов новорожденных крыс культивировали в бессывороточной модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), при 37°C, 10% CO₂ в течение 48 ч. Затем клетки переносили в бессывороточную DMEM и культивировали при 37°C, 10% CO₂ в течение 12 ч, затем клетки разделяли на пять экспериментальных групп (одну контрольную группу и четыре лечебные группы). В контрольной группе клетки культивировали в

бессывороточной DMEM в течение еще 6 ч при 37°C, 10% CO₂. В четырех лечебных группах клетки инкубировали в течение 6 ч при 37°C, 10% CO₂ только с CuCl₂, только с триентином, с комплексом триентин-медь и смесью триентина и CuCl₂ соответственно при конечной концентрации 10 мкМ триентина и/или 10 мкМ меди. Комплекс триентин-медь синтезировали своими силами и исследовали методом масс-спектрометрии и методом рентгеноструктурного анализа (XRD). Комплекс триентин-медь имел композицию и структуру, описанную в примере 1. Смесью триентина и меди получали путем добавления равных количеств молей триентина и CuCl₂ в бессывороточную DMEM при конечной концентрации 10 мкМ при 37°C в течение 24 ч до того, как смесь использовали для обработки кардиомиоцитов новорожденных крыс.

После обработки, клетки собирали с помощью скребка, три раза промывали ледяным PBS, содержащим 10 мМ ЭДТА (Sigma, США), для того чтобы быть уверенными в том, что вся внеклеточная медь была полностью удалена, и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин. Осадки клеток лизировали с использованием 1% раствора SDS (Beoytime, CN). Лизаты разделяли на две части. Одну часть обрабатывали концентрированной азотной кислотой при 50°C в течение 72 ч и анализировали методом атомной абсорбции с атомизацией в графитовой печи для определения концентрации внутриклеточной меди. Другую часть использовали для определения общей концентрации белка методом анализа белка с бицинониновой кислотой (Bio-Rad, USA). Концентрацию внутриклеточной меди в каждой лечебной группе нормализовали к общей концентрации белка.

На фиг. 6 приведены нормализованные внутриклеточные концентрации меди в пяти экспериментальных группах. Все данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD). Для первоначального анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ, а для сравнения между несколькими группами использовали тест Стьюдента-Ньюмана-Кейлса. Различия между экспериментальными группами считались значимыми при $P < 0,05$. Как показано на фиг. 6, концентрация внутриклеточной меди в группе, подвергавшейся лечению комплексом триентин-медь (т.е. Cu-триентин), и в группе, подвергавшейся лечению смесью триентина и CuCl₂ (т.е. Cu+триентин), значительно возрастала по сравнению с контрольной группой, и увеличение внутриклеточных концентраций меди в этих двух группах были более явно выраженными, чем в случае применения только CuCl₂. Примечательно, что смесь триентина и CuCl₂ (т.е. Cu+триентин) приводила к наибольшему увеличению внутриклеточной концентрации меди при всех исследованных условиях, что указывает на то, что триентин может транспортировать медь из среды с высоким содержанием меди, окружающей клетки, в кардиомиоциты.

Пример 3. Терапия с помощью триентина в экспериментальной модели патологической гипертрофии сердца на крысах.

В этом примере описан эксперимент *in vivo* для оценки эффективности терапии с помощью триентина патологической гипертрофии сердца у крыс линии Sprague-Dawley. Для моделирования патологической гипертрофии сердца у крыс проводили операцию по сужению аорты. На фиг. 7 показана блок-схема проведения эксперимента.

1.1. Формирование патологической сердечной гипертрофии у крыс.

Перед хирургическим вмешательством, всем испытуемым крысам инъецировали интраперитонеально 10% хлоральгидрат (0,35 мг/кг), чтобы вызвать седативный эффект. Волосы, покрывающие левую часть грудной клетки, тщательно выбривали перед операцией. Для вентиляции проводили эндотрахеальную интубацию. Для достижения дыхательного объема от 1,2 до 1,5 мл осуществляли вспомогательную искусственную вентиляцию легких. Частота дыхания составляла приблизительно 80/мин, и отношение вдоха и выхода составляло 1:1.

Во время операции крысу укладывали в положение лежа на правом боку и крысу помещали под стереомикроскоп. Зону операции изолировали асептическим способом. Изоляцию осуществляли с помощью одного куска одноразовой стерильной салфетки.

Операционное поле слегка надрезали по середине до линии левого второго межреберного пространства, и делали поперечный разрез 1-1,5 см в направлении от левой стороны передней части грудины. Подкожную ткань и мышечные плоскости рассекали до плевры, входя в плевральное пространство. Вставляли ватную палочку, чтобы прочистить плевральное пространство и отодвинуть легкое от операционного поля для предотвращения травмы легких, и затем межреберный разрез расширяли с помощью ретрактора, для того чтобы вскрыть грудную клетку и обнажить тимус и жировую клетчатку.

После того как тимус и жировую клетчатку отделяли, обнажали крупные сосуды в верхней части ушка левого предсердия. Восходящую часть аорты иссекали из артериальной вены направо. Место сужения располагали на восходящей аорте между аортальным клапаном и брахиоцефальной артерией.

Восходящую аорту подвергали констрикции с помощью иглы 20 размера (с внешним диаметром 0,9 мм). Восходящую аорту и иглу перевязывали одним куском хирургической нити 6-0. Иглу затем быстро удаляли, для того чтобы образовался просвет в стенозированной аорте.

Перед закрытием грудной клетки удаляли ретрактор грудной клетки и тимус и жировую клетчатку возвращали в их нормальное положение. Полость грудной клетки закрывали путем сближения второго и третьего ребер с помощью двух швов нейлоновых нитей размера 3-0. Для предотвращения возникнове-

ния обильного кровотечения и пневмоторакса предпринимали меры для исключения вероятности прокола дилатированного сердца и повреждения легкого во время стягивания ребер. Легкие повторно раздували путем отключения подачи воздуха в аппарат искусственной вентиляции легких в течение 1-2 с, используя палец руки при закрытии межреберного разреза, для того чтобы воздух мог быть удален из плевральной полости. После закрытия межреберного разреза, разрезы мышц и кожи закрывали послойно с помощью швов шелковой нити размера 5-0 и очищали стерильным способом. Эндотрахеальную трубку убирали после восстановления самостоятельного дыхания. Для облегчения боли после хирургической операции вводили внутримышечно обезболивающее средство дезоцин (0,8 мг/кг) и затем один раз в сутки в течение следующих 2 дней.

1.2. Эхокардиография.

Для эхокардиографических измерений крыс успокаивали путем интраперитонеальной инъекции седативного средства 10% хлоралгидрата (0,35 мг/кг). Через 4 месяца после операции по сужению аорты и через 1, 3 и 5 недель после проведения лечения триентином снимали серию эхокардиограмм с использованием преобразователя 11,5 МГц (Vivid 7 Dimension, GE). Определяли толщину межжелудочковой перегородки (IVSD) и толщину задней стенки левого желудочка (LVPWD), используя двумерный режим, путем измерения коротких осей площадей поперечных сечений и длины левого желудочка.

Фракцию выброса (EF) и фракцию укорочения (FS) левого желудочка оценивали одноплоскостным методом Симпсона.

Непосредственно регистрировали конечно-диастолический объем левого желудочка (LVEDV), конечно-систолический объем левого желудочка (LVESV), конечно-диастолический внутренний диаметр (LVID_d) и конечно-систолический внутренний диаметр (LVID_s). EF и FS рассчитывали по следующим формулам:

$$EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100\%,$$

$$FS = (LVID_d - LVID_s) / LVID_d \times 100\%.$$

1.3. Лечение триентином.

Через четыре месяца после операции обнаруживали концентрическую гипертрофию левого желудочка и интерстициальный фиброз миокарда. Формирование модели патологической гипертрофии сердца подтверждали ультразвуковыми оценками морфологии и функций сердца. Лечение триентином начинали после подтверждения состояния патологической гипертрофии сердца. Группу с констрикцией восходящей аорты (AAC) подразделяли на три группы: контрольную группу (группу NS) и две группы лечения триентином (группу Tr (H) и группу Tr (L)). Крыс в имитационной группе подвергали такому же хирургическому вмешательству, за исключением стадий констрикции восходящей аорты. Крыс в имитационной группе также подразделяли на три группы: контрольную группу (группу NS) и две группы лечения триентином (группу Tr (H) и группу Tr (L)). Крыс в контрольных группах обрабатывали физиологическим раствором. В группах лечения триентином триентин вводили перорально два раза в сутки. Вводили две дозы триентина (дозу в расчете на дигидрохлорид триентина), 45 мг/кг/сутки (группа Tr (H)) и 90 мг/кг/сутки (группа Tr (L)). Лечение продолжали в течение 6 недель.

Методика эксперимента и результаты, представленные в следующих разделах настоящего примера, относятся к лечению композицией триентина, которая состоит в основном из гидрохлорида триентина. Тот же протокол эксперимента используется для оценки терапевтической эффективности других композиций триентина для лечения гипертрофии сердца в экспериментальной модели на крысах. Например, в одном эксперименте, в дополнение к лечению триентином, в группах лечения триентином крыс с констрикцией восходящей аорты (AAC) также перорально вводили добавку меди (такую как хлорид меди) в дозе 54 мг/кг/сутки в течение 6 недель. В другом эксперименте комплекс триентин-медь примера 1 используют для лечения крыс с констрикцией восходящей аорты (AAC) в группе лечения триентином при дозе 120 мг/кг/сутки при пероральном введении в течение 6 недель.

1.4. Оценки морфологии и функции сердца.

Морфологию и функцию сердца оценивали с помощью эхокардиографии и измеряли концентрации меди в плазме (т.е. обнаружение в крови) для оценки терапевтической эффективности лечения триентином в соответствии с блок-схемой, показанной на фиг. 7.

Кроме того, получают срезы сердечной ткани крыс после их умерщвления в конце экспериментов. На срезах ткани проводят иммуногистохимические эксперименты. Измеряют плотность капиллярной сети на срезах сердечной ткани и определяют изменения содержания коллагена. Измеряют уровни мРНК и белка HIF-1 α и его мишеней, таких как VEGF и VEGFR-1, в пораженной инфарктом ткани, в пограничной зоне пораженной инфарктом ткани и в сердечной ткани, удаленной от пораженной инфарктом области.

1.5. Концентрация меди в сердечной ткани.

Образцы тканей быстро замораживали и хранили при -80°C перед лиофилизацией. После лиофилизации и обработки тканей азотной кислотой, образец был бесцветным или светло-желтым и прозрачным без видимого осадка или остатка. В каждую емкость добавляли воду высшей степени очистки для разбавления HNO₃ до концентрации 2% для последующего анализа концентраций меди. Концентрации меди

определяли спектрометрическим методом атомной абсорбции с применением графитовой печи (ICE3500, Thermo) в соответствии с программой, приведенной в табл. 1.

Таблица 1

Программа спектрометрической атомной абсорбции
с применением графитовой печи

Температура (°C)	Время (сек)	Расход аргона (л/мин)
90	20	0,2
120	20	0,2
850	20	0,2
2100	3	0
2500	3	0,2

1.6. Статистический анализ.

Все данные выражали в виде средних величин \pm SD. Вариацию каждого параметра сравнивали между различными экспериментальными группами, используя критерий Левена для оценки однородности дисперсии и коэффициент вариаций (CV). Использовали пакет программ для статистического анализа SPSS 14,0 (SPSS, Chicago, IL) и значимым различием считали различие, для которого значения P составляли $<0,05$.

2. Результаты.

2.1. Морфология и функция сердца.

Эхокардиографические исследования показали, что после лечения триентином обратное развитие патологической гипертрофии сердца происходило на морфологическом уровне. После 3 недель лечения значительно уменьшались толщина межжелудочковой перегородки (IVSD) и толщина задней стенки левого желудочка (LVPWD). С увеличением продолжительности лечения, эффект лечения триентином становился еще более очевидным. Когда крыс с констрикцией восходящей аорты (AAC) подвергали лечению в течение 5 недель, величины IVSD и LVPWD были почти нормальными по сравнению с величинами, которые достигались в имитационных группах. Как показано на фиг. 8A и 8B, в соответствии с результатами постоянными контроля, в подвергаемых лечению группах наблюдалась тенденция к значительному снижению величин IVSD и LVPWD с течением времени. Напротив, в контрольной группе, величины IVSD и LVPWD стабильно возрастали со временем.

Несмотря на то, что параметры функции сердца, фракция выброса (EF) и фракция укорочения (FS) находились в пределах нормы для всех экспериментальных групп вследствие компенсаторных эффектов, тем не менее на фиг. 9A и 9B показано, что в случае подвергнутых лечению триентином групп величины EF и FS колебались не очень значительно. В отличие от этого, в случае неподвергнутых лечению групп наблюдалась выраженная тенденция к снижению величин EF и FS.

Концентрации меди в плазме и миокарде крыс в подвергнутых различному лечению группах определяли методом атомно-абсорбционной спектрометрии. Как показано на фиг. 10A, концентрация меди снижалась в гипертрофированном миокарде крыс, подвергнутых операциям по констрикции восходящей аорты (AAC). После лечения триентином в течение 6 недель увеличивались концентрации меди в тканях сердца подвергнутых лечению крыс. Столбец диаграммы на фиг. 10A, соответствующий группе AAC-Tr, демонстрирует среднюю концентрацию меди в сердечной ткани крыс с констрикцией восходящей аорты (AAC), которым вводили как высокую дозу триентина, так и низкую дозу триентина (т.е. объединенные вместе группы AAC-Tr (H) и AAC-Tr (L)).

Вследствие оттока меди из сердечных тканей крыс с констрикцией восходящей аорты (AAC), концентрации меди в плазме крыс с констрикцией восходящей аорты (AAC) были выше, чем у крыс в имитационной группе. Однако после лечения триентином в течение 6 недель, как показали измерения в разные моменты времени в ходе лечения (т.е. каждые две недели), высокая концентрация меди в плазме крыс с констрикцией восходящей аорты (AAC) со временем значительно уменьшалась. В отличие от этого, концентрация меди в плазме крыс в имитационной группе оставалась достаточно стабильной в течение всего курса лечения (фиг. 10B).

3. Обсуждение.

В данном исследовании использовали триентин для повышения концентрации меди в тканях гипертрофированного сердца крыс. Результаты показали, что триентин способен промотировать перераспределение и повторное использование меди в ткани и восстанавливать морфологию и функции гипертрофированного сердца. В результате лечения триентином у крыс с гипертрофией сердца может также увеличиваться транскрипционная активность HIF-1 и плотность сети капилляров в пораженных инфарктом сердечных тканях. Кроме того, эхокардиографические исследования показали, что на протяжении всего периода лечения триентином поддерживались нормальные функции сердца. Результаты этого эксперимента убедительно свидетельствуют о том, что лечение триентином по настоящему изобретению может обеспечивать эффективную доставку меди в ишемизированные ткани сердца *in vivo* для лечения гипертрофии сердца.

Пример 4. Исследование лечения триентином в экспериментальной модели сердечной недостаточности после ишемического инфаркта сердца на обезьянах макак-резус.

В этом примере описывается эксперимент *in vivo* по оценке эффективности лечения триентином в модели сердечной недостаточности у обезьян макак-резус. Сердце у обезьяны макак в очень большой степени напоминает сердце человека с точки зрения внутреннего строения, электрической активности, распределения коронарных артерий, коронарного коллатерального кровообращения, а также его размещения и прикрепления в грудной полости. Таким образом, модель сердечной недостаточности на обезьянах макак-резус является хорошей моделью для оценки эффективности лечения сердечно-сосудистых заболеваний у людей. В этом эксперименте ишемический инфаркт миокарда моделировали путем хирургической операции по наложению лигатуры на коронарную артерию. После операции ишемическая сердечная ткань постепенно заменялась коллагеновым волокном и становилась пораженной инфарктом тканью. Через год после операции, непораженная инфарктом сердечная ткань у животного не могла компенсировать функции, утраченные пораженной инфарктом сердечной ткани, и в результате формировалась модель сердечной недостаточности. Затем обезьянам обеспечивали лечение триентином с целью лечения сердечной недостаточности.

1.1. Формирование сердечной недостаточности у обезьян макак-резус.

Перед хирургическим вмешательством всем пациентам внутримышечно инъецировали 5 мг/кг кетамина и 0,2 мг/кг мидазолама для достижения седативного эффекта. Волосы, покрывающие грудную клетку и конечности в местах крепления электродов, тщательно выбривали для проведения операции и для улучшения регистрации результатов электрокардиографии (ЭКГ). Регистрировали стандартные биполярные и униполярные отведения электрокардиограммы. Из исследования исключали животных с аномальной ЭКГ, таких как животные с тахикардией (более 200 ударов/мин), аритмией и очевидными отклонениями сегмента ST от базовой линии.

Постоянно осуществляли контроль путем проведения стандартных неинвазивных измерений, включающих снятие электрокардиограммы, измерение артериального давления с помощью манжеты, пульсовую оксиметрию и капнографию (Dash3000, GE, USA.) и в вены пациентов устанавливали катетеры. Все обезьяны, подвергавшиеся хирургическому вмешательству, были сначала интубированы после анестезии, вызванной внутривенной инфузией фентанила (10 мкг/кг), мидазолама (0,2 мг/кг), пропофола (1 мг/кг) и векурония (0,1 мг/кг). Вспомогательную искусственную вентиляцию легких проводили с помощью управляемой искусственной вентиляции легких с управляемым давлением для достижения в конце спокойного выдоха CO₂ от 35 до 40 мм рт. ст. Давление при вдохе устанавливали в пределах от 12 до 20 см H₂O. Частота дыхания составляла 40/мин, и отношение вдох/выдох составляло 1:2.

Для поддержания состояния анестезии во время хирургической операции, разбавляли 2 мл фентанила (0,1 мг) и 10 мл пропофола (100 мг) до 20 мл физиологическим раствором. Смесь непрерывно инфузионно вводили шприцевым насосом со скоростью 5-10 мл/ч. Скорость насоса корректировали в зависимости от состояния анестезии и продолжительности операции. Артериальный катетер вставляли в бедренную артерию с постоянно находящейся в нем иглой и соединяли с системой постоянного контроля давления для постоянного инвазивного контроля артериального давления во время операции. Как правило, пульсацию бедренной артерии регистрировали посередине между верхней передней подвздошнойостью и лонным сращением. Операционную зону асептически изолировали. Изоляцию осуществляли с помощью четырех одноразовых стерильных простыней.

Операционное поле слегка разрезали посередине до линии левого четвертого межреберного пространства, и делали поперечный разрез 4-5 см наружу из левой стороны передней части грудины. Монополярную диатермию применяли как для разрезания тканей, так и с целью коагуляции. Подкожную ткань и мышечные слои рассекали до плевры, входя в плевральное пространство, и затем разрез расширяли, раскрывая хирургические щипцы. Вставляли палочку с ватным тампоном для очистки плеврального пространства и для того чтобы отодвинуть легкое от отверстия, и затем расширяли межреберный разрез для открытия грудной клетки и обнажения перикарда.

Обнажали сердце посредством торакотомического разреза (4-5 см) пространства левого четвертого межреберья и определяли вершину и левое ушко сердца. Эпикардиальный конец левой передней нисходящей артерии (LAD) принимали за нулевой уровень; начало левой передней нисходящей артерии (LAD) под левым ушком сердца принимали за уровень 100. Лигатуру накладывали на 60% левой передней нисходящей артерии (LAD). Кроме того, у некоторых обезьян также накладывали лигатуру на главную диагональную артерию параллельно месту лигирования на левой передней нисходящей артерии (LAD), если место разветвления диагональной артерии находилось выше места наложения лигатуры.

Артерию подвергали окклюзии в течение 1 мин с последующей реперфузией в течение 5 мин, и этот цикл окклюзия-реперфузия повторяли 3 раза перед окончательным наложением лигатуры. После окончательного лигирования, постоянно контролировали разницу в движении стенки левого желудочка, изменения цвета передней стенки желудочка и изменения электрокардиограммы и артериального давления, для того чтобы быть уверенным, что лигирование было успешным. После окончательного лигирования, в левое ушко сердца быстро вводили метиленовый синий (1 мл) с помощью шприца объемом 1,0 мл. Дефект наполнения метиленовым синим указывал на завершение лигирования, а также позволял

предсказать область ишемии.

Перед закрытием грудной клетки постоянно контролировали в течение 45 мин состояние сердца. Для поддержки функций сердца инфузионно вводили добутамин (3-5 мкг/кг·мин) и, в случае необходимости, применяли дефибриллятор (HEARTSTART XL, Philips). Принимали меры для предотвращения возможности повреждения сердца во время закрытия перикарда. С целью антиадгезионной обработки в перикардальную камеру инфузионно вводили гиалуронат натрия. Перикард и плевру закрывали путем наложения швов с помощью полиэтиленовых нитей 4-0. Межреберный разрез закрывали, накладывая швы шелковой нитью. Для предотвращения возникновения пневмоторакса принимали меры, исключая возможность повреждения легкого во время закрытия межреберного пространства. Легкие повторно раздували и закрывали межреберный разрез, для того чтобы воздух мог быть удален из плевральной полости. После закрытия межреберного разреза в подкожное пространство вводили по каплям физиологический раствор и легкое снова заполняли воздухом, чтобы убедиться, что разрез грудной клетки закрыт плотно. Разрезы мышц и кожи послойно закрывали с помощью швов шелковой нити № 2-0 и стерильно очищали. После восстановления самостоятельного дыхания интубационную трубку удаляли. Надрез покрывали стерильной марлей и повязкой. Для облегчения боли вводили внутримышечно трамадол (2 мг/кг). Повязку меняли через день и швы удаляли через неделю после операции.

1.2. Постоянный контроль электрокардиограммы (ЭКГ).

ЭКГ с 12 отведениями (MAC8000, GE, США) каждой обезьяны регистрировали в положении лежа на спине на момент до операции, сразу после операции (длительность всей хирургической операции приблизительно 2 ч) и через четыре недели и восемь недель после операции, используя педиатрические электроды, при скорости движения бумаги 25 мм/с и амплитуде 10 мм/мВ. Стенка грудной клетки обезьяны была недостаточно широка, для того чтобы на ней можно было одновременно расположить 6 грудных отведений даже с педиатрическими электродами. Поэтому 6 грудных отведений разделяли на две группы: V1, V3 и V5 регистрировали в одной группе, а V2, V4 и V6 регистрировали в другой группе.

1.3. Эхокардиография.

Проводили двумерные эхокардиографические измерения на стандартных апикальных 2-камерных и 4-камерных изображениях с тремя последовательными сердечными циклами. Частоту кадров поддерживали от 70 до 100 кадров/с. Всех обезьян подвергали трансторакальной эхокардиографической оценке с помощью преобразователя 10,3 МГц (P10-4, Siemens ACUSON Antares System, German) в левом боковом положении в момент времени до операции и через четыре недели и через восемь недель после операции.

Фракцию выброса (EF) левого желудочка оценивали с помощью одноплоскостного метода Симпсона. Непосредственно регистрировали конечно-диастолический объем левого желудочка (LVEDV) и конечно-систолический объем левого желудочка (LVESV) и рассчитывали величину EF следующим образом: $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100\%$. Систолический объем крови (SV) левого желудочка рассчитывался следующим образом: $SV = LVEDV - LVESV$.

1.4. Лечение триентином.

Через один год после операции ишемизированная ткань сердца полностью заменялась коллагеновым волокном и превращалась в пораженную инфарктом ткань. Формирование модели сердечной недостаточности подтверждали ультразвуковыми оценками функций сердца. Затем проводили лечение триентином. В группе, подвергавшейся лечению триентином, каждой обезьяне перорально вводили триентин два раза в сутки. Доза триентина составляла 18 мг/кг/сутки. Это лечение продолжали в течение восьми недель. Обезьяны в не подвергавшейся лечению группе (т.е. в контрольной группе) не подвергались никакому лечению. Для оценки терапевтической эффективности триентина, исследовали функции и морфологию сердца в соответствии с блок-схемой, приведенной на фиг. 11.

Методика эксперимента и результаты, представленные в следующих разделах настоящего примера, относятся к лечению композицией триентина, которая состоит в основном из гидрохлорида триентина. Тот же протокол эксперимента используется для оценки терапевтической эффективности других композиций триентина для лечения сердечной недостаточности в экспериментальной модели на обезьянах макак-резус. Например, в одном эксперименте, в дополнение к лечению триентином, в группах лечения триентином обезьян резус-макак с сердечной недостаточностью также перорально вводили добавку меди (такую как хлорид меди) в дозе 16,5 мг/кг в сутки в течение 6 недель. В другом эксперименте комплекс триентин-медь примера 1 используют для лечения обезьян макак-резус с сердечной недостаточностью в группе лечения при дозе 36,7 мг/кг/сутки при пероральном введении в течение 6 недель.

1.5. Гистопатологические исследования.

Обезьян умерщвляют путем внутривенной инъекции хлорида калия (10%, 10 мл) и проводят полное вскрытие каждой обезьяны. Собранные сердца промывают и тщательно проверяют на видимые повреждения и фиксируют в 10% растворе формальдегида. Затем сердце разрезают на шесть блоков от вершины до основания вдоль длинной оси. Толщина каждого блока составляет 0,5 см. Поверхность каждого среза сглаживают и унифицируют во время рассечения, и срезы маркируют с помощью привязанной бирки. Тонкие срезы разрезают и окрашивают по Массону и гематоксилином/эозином для микроскопических исследований.

Иммуногистохимическое исследование.

Срезы тканей исследуют иммуногистохимическими методами для обнаружения HIF-1, VEGFA и VEGFR1. Следующие антитела используют в указанном порядке: мышинное моноклональное антитело против человеческого HIF-1 α (ab16066, Abcam); мышинное моноклональное антитело против человеческого VEGFA (sc-57496, Santa Cruz); кроличье моноклональное антитело против человеческого VEGFR1 (1303-12, Epitomics); мышинное моноклональное антитело против человеческого CD31 (Maixin bio-tech company, Fuzhou). Демаскировку HIF-1 α проводят методом теплового индуцирования демаскирования антигена при высоком давлении с использованием ЭДТА (pH 9,0), демаскировку VEGF и VEGFR1 проводят методами микроволнового теплового индуцирования демаскирования антигена с использованием цитраного буферного раствора (pH 6,0) и демаскировку CD31 проводят методом микроволнового теплового индуцирования демаскирования антигена с использованием ЭДТА. Рабочие концентрации антител являются следующими: 1:800 для анти-HIF-1 α , 1:100 для анти-VEGF и 1:100 для анти-VEGFR1. При иммуногистохимических исследованиях образцы отрицательного контроля инкубируют с PBS вместо первого антитела. CD31 является маркером эндотелиальных клеток. Метку Ki-67 исследуют методом иммунофлуоресценции с использованием конфокальной микроскопии.

Плотность капиллярной сети.

Плотности капиллярной сети срезов ткани оценивают следующим образом. Сначала под оптическим микроскопом с 100-кратным увеличением определяют поле зрения с максимальным распределением капилляров и затем отбирают 5 рандомизированных полей зрения под оптическим микроскопом с 200-кратным увеличением для определения плотности капиллярной сети. Капилляр определяется как просвет с диаметром меньшим, чем сумма 8 диаметров эритроцитов. Измерение выполняется двумя независимыми специалистами.

Полуколичественный анализ экспрессии белка.

Иммуногистохимические препараты исследуют под оптическим микроскопом, и изображения регистрируются и используются для определения уровней экспрессии белка полуколичественным методом с использованием программного обеспечения для анализа изображений Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics). Препараты разных групп оцениваются двумя независимыми специалистами. Изображения из 5 рандомизированных полей зрения пограничной области инфаркта и удаленных областей от инфаркта на каждом препарате регистрируются под оптическим микроскопом с 400-кратным увеличением.

1.6. Вестерн-блоттинг.

Приготовление ткани.

Сердце удаляют из грудной клетки. Тщательно рассматривают стенку левого желудочка, и отбирают образцы тканей из пораженной инфарктом области, пограничной области и отдаленных областей. Пораженную инфарктом область можно отличить от не пораженных инфарктом областей по ее бледному внешнему виду. Пограничная область определяется как область от 1 мм внутрь пораженной инфарктом области до 3 мм за пределами пораженной инфарктом области. Удаленные области определяются как области, находящиеся на расстоянии более 3 мм от пораженной инфарктом области. Образцы сохраняют в жидком азоте для анализа вестерн-блоттингом.

Вестерн-блоттинг.

Экстракты белков получают после измельчения каждой ткани в жидком азоте и лизирования измельченной ткани в буфере для лизиса RIPA (Beyotime, CN), содержащем 1% полной смеси ингибиторов протеаз без EDTA (Roche, DE), в течение 40 мин на льду. Концентрацию белка определяют с помощью набора для анализа белка Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC, 23227, USA). Равные количества белка (30 мкг) из каждого образца солибилизируют в буфере для образцов 5 \times додецилсульфата натрия (SDS) и разделяют на полиакриламидных гелях, содержащих 10% додецилсульфата натрия (SDS) и 8% полиакриламида. Затем белки электрофоретически переносят на мембрану из поливинилиденфторида (Bio-Rad, USA). Мембраны блокируют в течение 1 ч в смеси Tris-забуференный физиологический раствор/Tween 20 (TBST) (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl и 0,1% Tween 20), содержащей 5% обезжиренного сухого молока (блокирующий раствор), и инкубируют в течение ночи при 4 $^{\circ}$ C с соответствующими первичными антителами, такими как анти-HIF-1 α (Abcam, ab113642, США), анти-VEGF (Santa Cruz, sc57496, США) и анти-VEGFR-1 (Abcam, ab32152, USA), разбавленными в блокирующем растворе в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. После промывки с помощью TBST мембраны инкубируют в течение 1 ч при 37 $^{\circ}$ C с соответствующими вторичными антителами. Белки-мишени визуализируют с использованием хемоллюминесцентного субстрата пероксидазы хрена (HRP) (Millipore, США) и анализируют с помощью денситометрии, используя программное обеспечение QUANTITY ONETM.

1.7. Уровни мРНК HIF-1 генов-мишеней.

Для определения транскрипционной активности HIF-1 в ишемизированном миокарде определяют уровни мРНК HIF-1 α , генов-мишеней HIF-1, таких как VEGF и VEGFR-1 (также известных как Flt-1), методом полимеразной цепной реакции в масштабе реального времени (RT-PCR).

Выделяют общую РНК из каждого образца, используя реагент TRIZOL[®] (Invitrogen, 15596-026, USA) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. 1 мкг общей РНК подвергают обратной

транскрипции, используя набор реагентов PRIMESCRIPT™ RT reagent Kit (TaKaRa, RR037A, Japan) при 37°C в течение 15 мин, затем при 85°C в течение 5 с и при 4°C в течение 5 мин. Реакции RT-PCR в реальном времени проводили с использованием набора SYBR® Premix Ex Taq™ II kit (TaKaRa, RR820A, Japan). Для амплификации HIF-1 α , VEGF и VEGFR1 кДНК фрагментов образцы обрабатывают, используя систему реального времени BIO-RAD CFX96 со следующей программой: денатурация при 95°C в течение 30 с, затем 35 циклов при 95°C в течение 5 с и при 60°C в течение 30 с. Анализируют результаты логарифмической линейной части на кривой роста и проводят относительную количественную оценку, используя метод 2- $\Delta\Delta$ CT. Уровни экспрессии каждого из генов HIF-1 α , VEGF и VEGFR1 нормализуют к уровню экспрессии актина в каждом образце. Для каждого образца запускают по меньшей мере три репликации. Последовательности праймеров приведены в табл. 2.

Таблица 2

Последовательности праймеров RT-PCR

Ген-мишень		Последовательности праймеров
HIF-1 α обезьяны	прямой праймер	GTCTGCAACATGGAAGGTATTG (SEQ ID NO: 1)
	обратный праймер	GCAGGTCATAGGTGGTTTCT (SEQ ID NO: 2)
VEGF обезьяны	прямой праймер	GAGCTTCCTACAGCACAAACA (SEQ ID NO: 3)
	обратный праймер	CCAGGACTTATACCGGGATTTC (SEQ ID NO: 4)
VEGFR1 обезьяны	прямой праймер	GGGTCACATCACCTAACATCAC (SEQ ID NO: 5)
	обратный праймер	CCTTCTGCTGTCCAGATTAC (SEQ ID NO: 6)
Актин обезьяны	прямой праймер	CCACGAAACTACCTTCAACTCC (SEQ ID NO: 7)
	обратный праймер	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT (SEQ ID NO: 8)

1.8. Концентрация меди в сердце.

Образцы тканей быстро замораживали и хранили при -80°C перед лиофилизацией. После лиофилизации и обработки тканей азотной кислотой образец был бесцветным или светло-желтым и прозрачным без видимого осадка или остатка. В каждую емкость добавляли воду высшей степени очистки для разбавления HNO₃ до концентрации 2% для последующего анализа концентраций меди. Концентрации меди определяли спектрометрическим методом атомной абсорбции с применением графитовой печи (ICE3500, Thermo) в соответствии с программой, приведенной в табл. 1 примера 3.

1.9. Статистический анализ.

Все данные выражали в виде средних величин \pm SD. Вариацию каждого параметра сравнивали между различными экспериментальными группами, используя критерий Левена для оценки однородности дисперсии и коэффициент вариаций (CV). Использовали пакет программ для статистического анализа SPSS 14,0 (SPSS, Chicago, IL), и значимым различием считали различие, для которого значения P составляли <0,05.

2. Результаты.

2.1. Функции сердца.

Эхокардиографические исследования показали, что после лечения триентином фракция выброса левого желудочка с течением времени значительно увеличилась. Однако в группе, не подвергавшейся лечению, фракция выброса левого желудочка с течением времени уменьшалась. См. фиг. 12.

2.2. Концентрации меди в пораженном инфарктом сердце.

Концентрации меди в миокарде определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии. Как показано на фиг. 13, концентрации меди значительно увеличились после лечения триентином в образцах ткани из области инфаркта и пограничной области в подвергавшейся лечению группе по сравнению с концентрациями меди в не подвергавшейся лечению группе. В отличие от этого, концентрации меди в образцах тканей в отдаленных областях сопоставимы с концентрациями меди в подвергавшейся лечению триентином группе и в группе, не подвергавшейся лечению.

3. Обсуждение.

Ишемия миокарда приводит к накоплению HIF-1 α и к истощению содержания меди. В условиях ишемии, накопленный HIF α не может быть активирован транскрипцией HIF, потому что медь необходима для формирования транскрипционного комплекса HIF и для взаимодействия HIF с последовательностями HIF элемента ответа на гипоксию (HRE) в генах-мишенях. Поэтому, несмотря на то, что в ишемизированном миокарде происходит накопление HIF, тем не менее дефицит меди блокирует HIF-регулируемую экспрессию генов, вовлеченных в ангиогенез, что приводит к подавлению ангиогенеза в миокарде. Этот эффект приводит к инфаркту миокарда, который далее прогрессирует в сердечную недостаточность.

В настоящем исследовании применяли триентин для увеличения концентрации меди в очаговых ишемизированных тканях для лечения инфаркта миокарда. Результаты показали, что триентин способствует перераспределению и повторному использованию меди в тканях. Кроме того, эхокардиографические исследования показали, что после лечения триентином улучшались функции сердца. Доза триентина в этом эксперименте составляла 18 мг/кг в сутки для обезьян макак-резус, что эквивалентно приблизительно 420 мг в сутки для человека. По сравнению с типичными дозами триентина, используемыми для снижения содержания меди в сыворотке крови у пациентов с заболеванием Вильсона (от 500-700 до максимално 1500 мг/сутки для педиатрических больных и от 750-1250 до максимално 2000 мг/сутки для взрослых пациентов), доза, используемая в этом эксперименте, намного ниже. Результаты этого эксперимента убедительно свидетельствуют о том, что описанное в изобретении лечение низкими дозами триентина является эффективным способом доставки меди *in vivo* для лечения инфаркта миокарда.

Пример 5. Лечение триентином ишемического инфаркта миокарда в экспериментальной модели на мышах.

В этом эксперименте экспериментальную модель ишемического инфаркта миокарда на мышах формировали путем проведения хирургической операции по установке постоянной лигатуры на коронарную артерию. Через 4 недели после операции ишемизированная сердечная ткань замещалась коллагеновым волокном и превращалась в пораженную инфарктом ткань. Лечение триентином проводили, как описано в протоколе, приведенном на фиг. 14.

Лечение триентином применяли в четырех группах мышей с моделируемым заболеванием путем внутривенного введения триентина два раза в сутки в дозе 16,75, 33,49, 55,94 или 78,25 мг/кг в сутки. Это лечение продолжалось в течение 4 недель. В не подвергавшейся лечению группе триентин не вводили.

Эхокардиография.

Для оценки терапевтической эффективности триентина исследовали функции сердца методом эхокардиографии. Всех мышей подвергали трансторакальной эхокардиографической оценке с помощью преобразователя 12 МГц (i13L, Vivid7, GE Ultrasound). Фракцию выброса (EF) левого желудочка оценивали одноплоскостным методом Симпсона. Непосредственно регистрировали конечно-диастолический объем левого желудочка (LVEDV) и конечно-систолический объем левого желудочка (LVESV), и рассчитывали величину EF следующим образом: $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100\%$.

Концентрация меди в сердце.

Образцы тканей быстро замораживали и хранили при -80°C перед лиофилизацией. После лиофилизации и обработки тканей азотной кислотой образец был бесцветным или светло-желтым и прозрачным без видимого осадка или остатка. В каждую емкость добавляли воду высшей степени очистки для разбавления HNO₃ до концентрации 2% для последующего анализа концентраций меди. Концентрации меди определяли спектрометрическим методом атомной абсорбции с применением графитовой печи (ICE3500, Thermo) в соответствии с программой, приведенной в табл. 1 примера 3.

Результаты.

Показатели сердечной деятельности, обнаруженные методом эхокардиографии, показали, что функция сердца, измеряемая фракцией выброса левого желудочка у мышей, подвергнутых лечению триентином, улучшилась при лечении более низкими дозами триентина, и такое улучшение уменьшалось при лечении более высокими дозами триентина (см. фиг. 15). Показатель улучшения фракции выброса достигал максимального значения при дозе 33,49 мг/кг в сутки, а затем уменьшался даже при более высокой дозе. Результаты этого эксперимента позволяют предположить, что лечение инфаркта миокарда триентином эффективно в узком диапазоне низких доз. Как показано на фиг. 16, концентрация меди в пораженной инфарктом области значительно увеличилась в ответ на лечение триентином. Примечательно, что в группе лечения с дозой 33,49 мг/кг в сутки содержание меди в пораженной инфарктом области было самым высоким.

Обсуждение.

В настоящем исследовании применяли последовательно возрастающие дозы триентина для лечения ишемического инфаркта миокарда у мышей. Результаты показали, что в группе, подвергавшейся лечению триентином в дозе 33,49 мг/кг в сутки, содержание меди в пораженной инфарктом области было

самым высоким среди всех экспериментальных групп, что соответствует наивысшему показателю улучшения фракции выброса, наблюдаемому в этой группе, по сравнению с другими экспериментальными группами. При испытании более высоких доз триентина не наблюдалось дальнейшего улучшения содержания меди в пораженной инфарктом области или фракции выброса.

Исследованные в этом эксперименте дозы 16,75, 33,49, 55,94 и 78,25 мг/кг в сутки эквивалентны приблизительно дозам 150, 300, 500 и 700 мг в сутки для человека. В отличие от этого, доза триентина, используемая для лечения болезни Вильсона путем уменьшения содержания меди в сыворотке крови у этих пациентов, составляет от 500-700 до максимально 1500 мг/сутки для педиатрических больных и от 750-1250 до максимально 2000 мг/сутки для взрослых пациентов. Таким образом, определенная в этом эксперименте доза триентина, обеспечивающая наивысшую эффективность восполнения содержания меди в ишемизированной сердечной ткани и восстановления функций сердца, значительно ниже дозы, применяемой при лечении пациентов с болезнью Вильсона. Результаты этого эксперимента убедительно доказывают, что лечение триентином инфаркта миокарда эффективно в узком диапазоне низких доз.

Не ссылаясь в качестве дополнительных доказательств на какую-либо теорию или гипотезу, тем не менее можно сделать вывод, что триентин может служить в качестве средства доставки меди для переноса меди из ткани или окружающей среды с высокой концентрацией (такой как, сыворотка крови после ишемии) в обедненную медью ишемизированную ткань в сердце, тем самым уменьшая дефицит меди в ишемизированной ткани и улучшая состояние при сердечно-сосудистых заболеваниях. В нескольких публикациях описывается повышенное содержание меди в сыворотке крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, особенно при инфаркте миокарда. См., например, публикации ES Ford. *Am. J. Epidem.* 151(12):1182 (2000); E. Gomez et al. *J. Trace Elements Med. Biol.* 14:65-70 (2000); and Singh M.M. et al. *Angiology-Journal of Vascular Diseases*, 504-506 (1985)

Пример 6. Клиническое исследование лечения триентином пациентов с сердечной недостаточностью.

Клиническое исследование проводится для оценки клинических эффектов лечения низкими дозами триентина пациентов с сердечной недостаточностью. Основной целью исследования является оценка до и после лечения эффективности триентина по сравнению с плацебо при лечении пациентов с сердечной недостаточностью.

Исследование представляет собой рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование пациентов с сердечной недостаточностью (например, с сердечной недостаточностью II и III класса по функциональной классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации) с уменьшенной фракцией выброса (например, $LVEF \leq 35\%$). Пациентам в контрольной группе назначают стандартное лечение (SOC) плюс два раза в сутки плацебо. Пациентам в группе лечения назначают стандартное лечение (SOC) плюс пероральное введение триентина два раза в сутки в дозе 150 мг. Пациентов оценивают при обследовании на начальном этапе (на неделе 0), в ходе курса лечения и после лечения.

Первичной конечной точкой исследования может быть выживание, госпитализация, связанная с сердечной недостаточностью, или изменение биомаркера, связанного с сердечной недостаточностью. Например, уровни циркулирующих натрийуретических пептидов в динамике во времени были использованы для стратификации риска сердечной недостаточности и, следовательно, могут служить биомаркерами для оценки тяжести сердечной недостаточности.

Вторичные конечные точки исследования могут включать изменение структуры и функции сердца от исходного уровня до конца лечения. Структура и функция сердца может быть определена с помощью эхокардиографии. Примеры количественных показателей, которые могут служить вторичными конечными точками, включают конечно-диастолический объем левого желудочка, фракцию выброса левого желудочка и отношение E/E'. Вторичные конечные точки исследования могут дополнительно включать функциональное состояние, основанное на тесте 6-минутной ходьбы, изменения симптомов (класс NYHA) и показатели качества жизни.

Содержания меди в сыворотке крови и другие биомаркеры могут постоянно контролироваться в качестве третичных конечных точек исследования.

Безопасность оценивается путем рассмотрения спонтанных нежелательных явлений (AE), сообщенных субъектом, и других соответствующих медицинских оценок и оценок безопасности, таких как основные показатели жизнедеятельности, ЭКГ, лабораторные анализы и другие показатели.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

2. Способ направленной доставки меди в клетки ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

3. Способ по п.1 или 2, где индивидуум имеет нарушенную систему восстановления тканей.

4. Способ по п.1 или 2, где индивидуум не имеет нарушенной системы восстановления тканей.

5. Способ по любому из пп.1-4, где ион меди в композиции образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином.

6. Способ по п.5, где комплекс хелатирующего медь тетрамина и иона меди является кристаллическим веществом.

7. Способ по п.6, где композиция включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды.

8. Способ по любому из пп.1-4, где ион меди в композиции не образует комплекс с хелатирующим медь тетрамином.

9. Способ по любому одному из пп.1-8, где эффективное количество композиции является недостаточным для снижения внеклеточного содержания меди у индивидуума.

10. Способ по любому одному из пп.1-9, где композицию вводят перорально.

11. Способ по любому одному из пп.1-10, где эффективное количество композиции включает от приблизительно 80 до приблизительно 450 мг в сутки хелатирующего медь триентина.

12. Способ по любому одному из пп.1-11, где композицию вводят по меньшей мере два раза в сутки.

13. Способ по любому одному из пп.1-12, где композицию вводят в течение по меньшей мере приблизительно одного месяца.

14. Способ по любому одному из пп.1-13, где введение композиции приводит к содержанию в крови по меньшей мере приблизительно 0,005 мг/л хелатирующего медь триентина.

15. Способ по любому одному из пп.1-14, где введение композиции приводит к содержанию в крови по меньшей мере приблизительно 0,005 мг/л хелатирующего медь триентина в течение по меньшей мере приблизительно одной недели.

16. Способ по любому одному из пп.1-15, дополнительно включающий постоянный контроль внутриклеточного содержания меди у индивидуума.

17. Способ по п.16, дополнительно включающий корректировку дозирования композиции, исходя из внутриклеточного содержания меди у индивидуума.

18. Фармацевтическая композиция, включающая эффективное количество хелатирующего медь триентина, ион меди и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ, стабилизаторов, разбавителей.

19. Фармацевтическая композиция по п.18, где композиция включает кристаллический комплекс триентина и иона меди, в котором ион меди хелатирован четырьмя аминогруппами триентина с образованием плоской квадратной структуры, и где кристаллический комплекс дополнительно включает два иона хлора и молекулу воды.

20. Фармацевтическая композиция по п.18 или 19, где фармацевтическая композиция представлена в форме таблетки, капсулы или пилюли.

21. Применение композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, при производстве лекарственного препарата для повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

22. Применение композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, при производстве лекарственного препарата для направленной доставки меди в клетки ишемизированной ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

23. Применение композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, при производстве лекарственного препарата для усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуци-

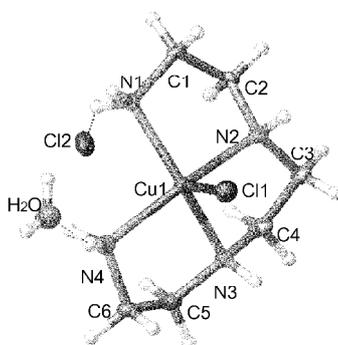
руемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) в ишемизированной ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

24. Применение композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, для повышения внутриклеточного содержания меди в ишемизированной ткани индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

25. Применение композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, для направленной доставки меди в клетки ишемизированной ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

26. Применение композиции, включающей хелатирующий медь тетрамин и ион меди, для усиления медь-зависимой транскрипционной активности индуцируемого при гипоксии фактора 1 (HIF-1) в ишемизированной ткани у индивидуума, имеющего ишемическое поражение ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.

27. Набор, включающий композицию тетрамина, включающую хелатирующий медь тетрамин и ион меди, упаковку и инструкцию по применению для лечения заболевания или состояния, связанного с ишемическим поражением ткани, где хелатирующий медь тетрамин представляет собой триентин, а ишемизированная ткань представляет собой ишемизированную сердечную ткань.



Фиг. 1

Длины связей

Атом	Атом	Длина/Å	Атом	Атом	Длина/Å
C1	C2	1.525 (7)	C5	N3	1.473 (5)
C1	N1	1.482 (6)	C6	N4	1.470 (5)
C2	N2	1.480 (5)	C11	Cu1	2.4741 (12)
C3	C4	1.520 (6)	Cu1	N1	2.026 (4)
C3	N2	1.483 (6)	Cu1	N2	2.035 (4)
C4	N3	1.480 (6)	Cu1	N3	2.026 (4)
C5	C6	1.523 (6)	Cu1	N4	2.033 (4)

Углы связей

Атом	Атом	Атом	Угол/°	Атом	Атом	Атом	Угол/°
N1	C1	C2	106.6 (4)	N3	Cu1	N2	84.54 (15)
N2	C2	C1	106.6 (4)	N3	Cu1	N4	84.82 (15)
N2	C3	C4	106.6 (4)	N4	Cu1	C11	106.67 (11)
N3	C4	C3	109.1 (4)	N4	Cu1	N2	146.08 (15)
N3	C5	C6	107.2 (4)	C1	N1	Cu1	107.6 (3)
N4	C6	C5	108.9 (4)	C2	N2	C3	115.7 (4)
N1	Cu1	C11	99.60 (11)	C2	N2	Cu1	107.0 (3)
N1	Cu1	N2	84.60 (16)	C3	N2	Cu1	105.4 (3)
N1	Cu1	N3	163.99 (15)	C4	N3	Cu1	109.4 (3)
N1	Cu1	N4	97.79 (15)	C5	N3	C4	115.0 (4)
N2	Cu1	C11	106.25 (11)	C5	N3	Cu1	105.9 (3)
N3	Cu1	C11	94.72 (10)	C6	N4	Cu1	108.8 (3)

Торсионные углы

А	В	С	Д	Угол/°	А	В	С	Д	Угол/°
C1	C2	N2	C3	-161.8 (4)	C5	C6	N4	Cu1	31.5 (4)
C1	C2	N2	Cu1	44.7 (4)	C6	C5	N3	C4	168.4 (4)
C2	C1	N1	Cu1	-42.4 (4)	C6	C5	N3	Cu1	47.6 (4)
C3	C4	N3	C5	-89.9 (4)	N1	C1	C2	N2	58.3 (4)
C3	C4	N3	Cu1	29.1 (4)	N2	C3	C4	N3	-52.7 (5)
C4	C3	N2	C2	167.4 (4)	N3	C5	C6	N4	-53.3 (5)
C4	C3	N2	Cu1	49.4 (4)					

Фиг. 2

Таблица 1. Кристаллические данные и уточнение структуры для 150116_s2_lzh_m

Идентификационный код	150116_s2_lzh_m
Эмпирическая формула	$C_6H_{20}Cl_2CuN_4O$
Молек. масса по фор. соед.	298.70
Температура/К	143.00(10)
Кристаллическая система	Орторомбическая
Пространственная группа	$P2_12_12_1$
a/Å	7.0684(2)
b/Å	10.5124(4)
c/Å	16.5540(5)
α /°	90
β /°	90
γ /°	90
Объем/Å ³	1230.05(7)
Z	4
$\rho_{\text{расчит.}}$ мг/мм ³	1.613
М/мм ³	2.188
F(000)	620.0
Размер кристалла/мм ³	0.3 × 0.2 × 0.2
Излучение	MoK α ($\lambda = 0.71073$)
2 θ диапазон для регистр. данных	6.264 to 52.738°
Диапазон индексов	$-8 \leq h \leq 6, -13 \leq k \leq 8, -13 \leq l \leq 20$
Измеренные отражения	3978
Независимые отражения	2139 [$R_{\text{int}} = 0.0266, R_{\text{sigma}} = 0.0500$]
Данные/ограничения/параметры	2139/0/135
Согласие при выравнивании по F ²	1.039
Конечные R индексы [$\geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0314, wR_2 = 0.0651$
Конечные R индексы [все данные]	$R_1 = 0.0364, wR_2 = 0.0679$
Наибольшее различие пик/впадина/e Å ³	0.42/-0.35
Параметр Флэка	0.007(13)

Фиг. 3

Таблица 2. Фракционные координаты атомов (x 104) и эквивалентные изотропные параметры замещения (Å²×10³) для 150116_s2_lzh_m. Узкв определяется как 1/3 следа ортогонализованного тензора Uij

Атом	x	y	z	U (eq)
C1	-3466(6)	-5730(5)	-7456(3)	21.1(11)
C2	-3528(6)	-4378(5)	-7122(3)	19.7(11)
C3	-1517(6)	-3062(5)	-6194(3)	21.2(11)
C4	387(7)	-3175(5)	-5773(3)	21.1(11)
C5	-122(6)	-4630(4)	-4606(3)	16.4(11)
C6	-180(6)	-6052(4)	-4434(3)	16.3(11)
C11	1894.2(15)	-6628.5(12)	-6795.6(7)	20.4(3)
Cu1	-916.8(7)	-5709.6(6)	-6122.9(3)	14.05(15)
N1	-2985(5)	-6574(4)	-6769(2)	17.6(9)
N2	-1635(5)	-4137(4)	-6772(2)	15.4(8)
N3	584(5)	-4472(4)	-5437(2)	15.7(9)
N4	-1272(5)	-6685(4)	-5073(2)	14.8(8)
C12	-5193.7(14)	-5164.0(11)	-4787.6(8)	22.9(3)
O1	-1646(6)	-9247(4)	-7027(3)	29.4(9)

Фиг. 4A

Таблица 3. Анизотропные параметры замещения ($\text{\AA}^2 \times 103$) для 150116_s2_lzh_m. Анизотропный экспоненциальный фактор замещения принимает форму:

$$-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U_{11} + 2hka^* b^* U_{12} + \dots]$$

Атом	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
C1	21(2)	25(3)	14(2)	4(3)	-4.4(19)	0(2)
C2	18(2)	26(3)	15(2)	4(3)	-0.1(18)	2(2)
C3	32(2)	14(2)	19(2)	3(2)	0(2)	8(2)
C4	30(2)	13(3)	19(2)	3(2)	2(2)	-2(2)
C5	19(2)	17(3)	13(2)	-4(2)	-0.4(19)	1(2)
C6	18(2)	18(3)	12(2)	4(2)	-4.0(19)	2(2)
C11	20.6(5)	20.0(7)	20.7(6)	-1.4(6)	3.0(5)	4.1(5)
Cu1	16.6(3)	11.9(3)	13.6(3)	0.0(3)	-1.3(3)	0.3(3)
N1	19.2(19)	17(2)	16(2)	1.1(19)	0.5(18)	0.2(18)
N2	16.5(17)	16(2)	13.4(18)	-0.9(19)	-0.1(15)	-0.2(18)
N3	16.1(17)	13(2)	18(2)	0.9(18)	-1.7(15)	3.9(18)
N4	12.5(17)	13(2)	18(2)	0.7(18)	-0.7(15)	-1.2(16)
C12	15.2(5)	17.7(6)	35.6(7)	-0.7(6)	-1.4(5)	0.5(5)
O1	40(2)	24(2)	24(2)	-6(2)	1.6(19)	-3(2)

Фиг. 4B

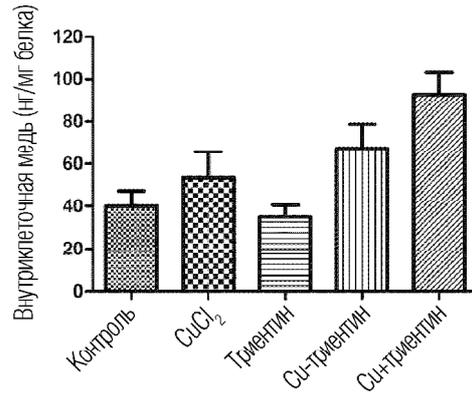
Координаты атомов водорода и изотропные параметры замещения ($\text{\AA}^2 \times 103$) для 150116_s2_lzh_m

Атом	x	y	z	U(экв)
H1A	-4684	-5962	-7682	25
H1B	2516	5797	7877	25
H2A	-3796	-3774	-7550	24
H2B	-4499	-4303	-6711	24
H3A	-2537	-3109	-5803	25
H3B	-1607	-2257	-6478	25
H4A	1398	-3011	-6156	25
H4B	472	-2552	-5343	25
H5A	-1376	-4265	-4555	20
H5B	713	-4206	-4227	20
H6A	1095	-6392	-4418	20
H6B	-768	-6205	-3913	20
H1C	-2548	-7392	-6966	21
H1D	-4090	-6712	-6433	21
H2	-716	-4011	-7208	19
H3	1922	-4716	-5453	19
H4C	-2602	-6704	-4929	17
H4D	-838	-7554	-5139	17
H1E	-1310(90)	-9410(70)	-6580(40)	70(30)
H1F	-1840(70)	-9780(50)	-7280(30)	17(17)

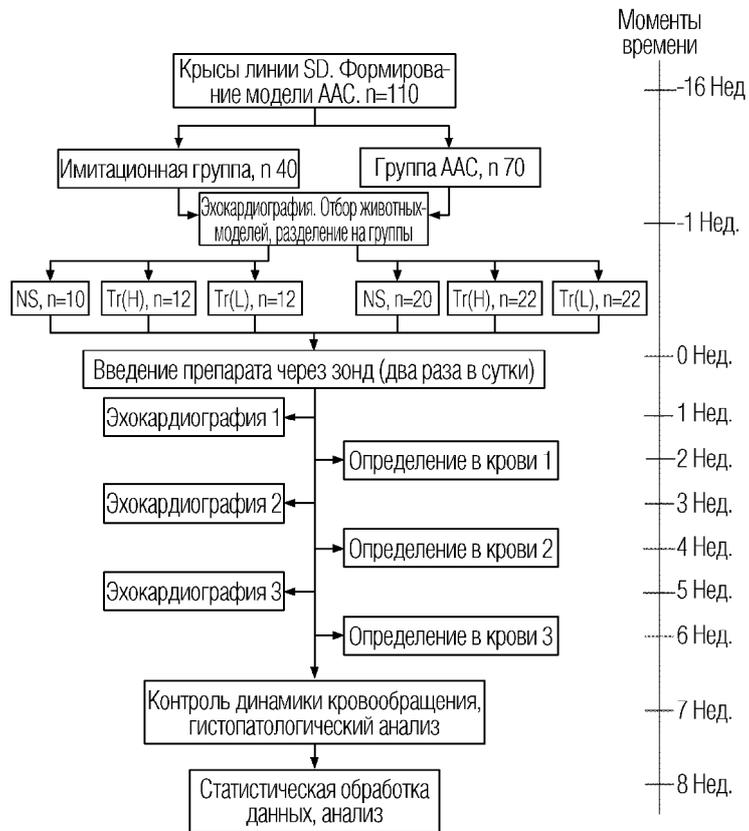
Фиг. 4C



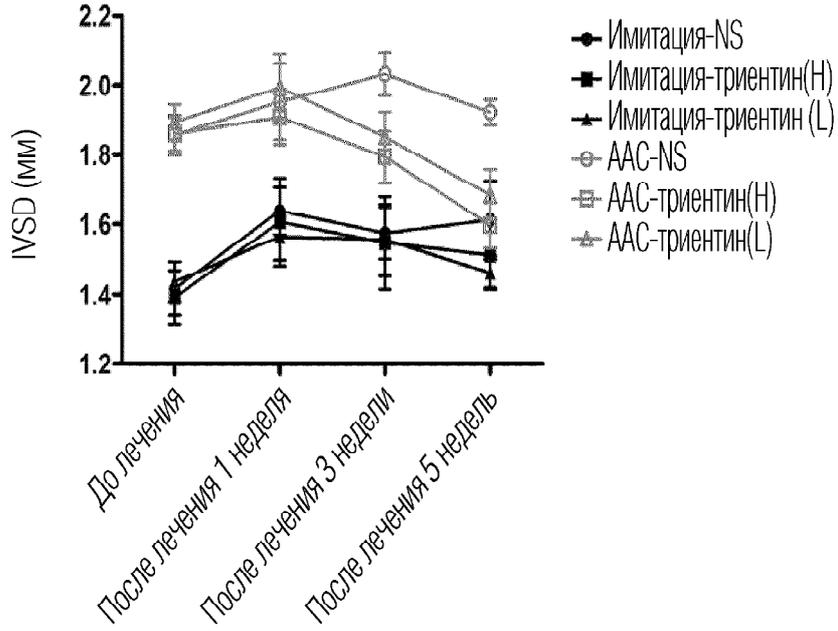
Фиг. 5



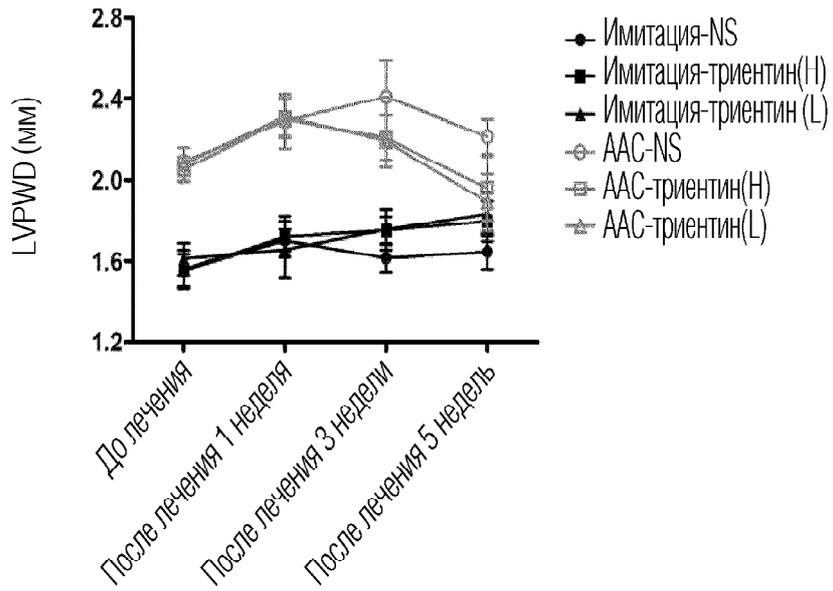
Фиг. 6



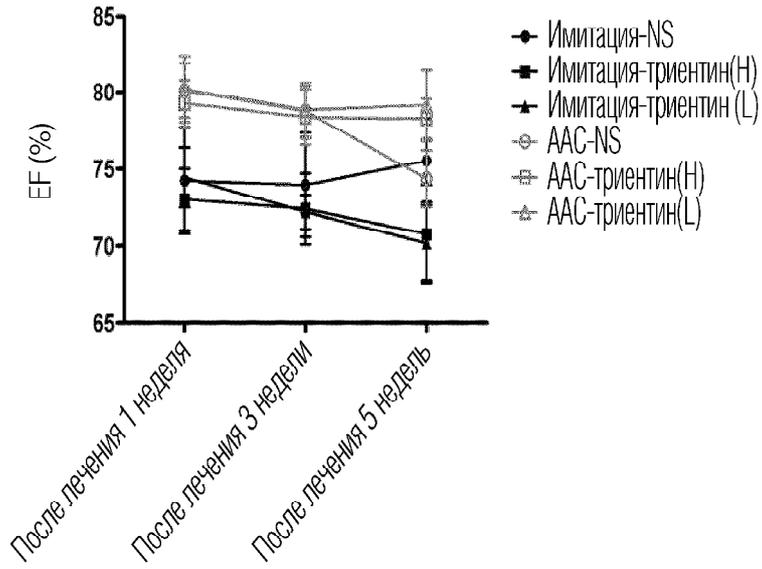
Фиг. 7



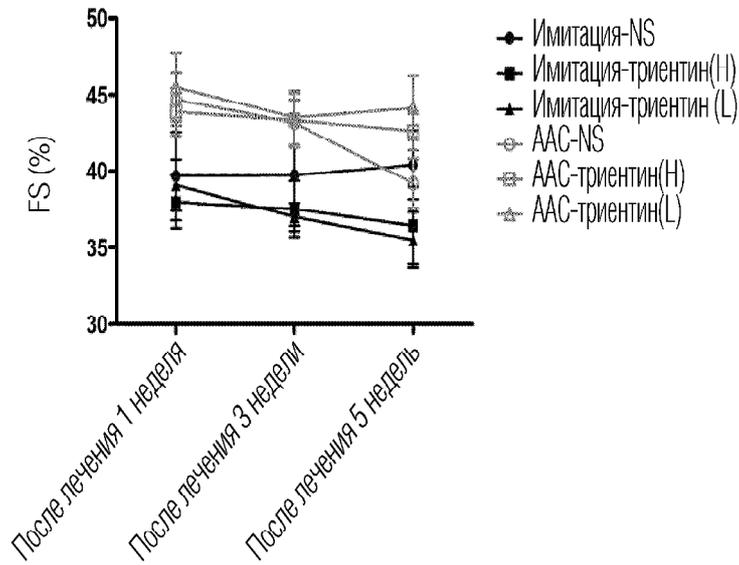
Фиг. 8А



Фиг. 8В

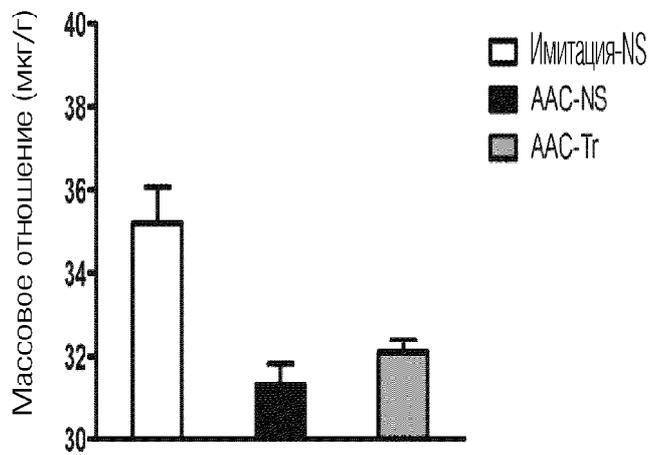


Фиг. 9А

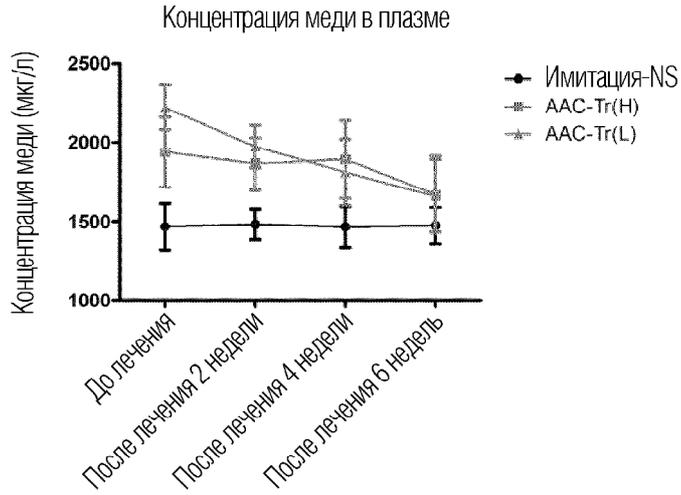


Фиг. 9В

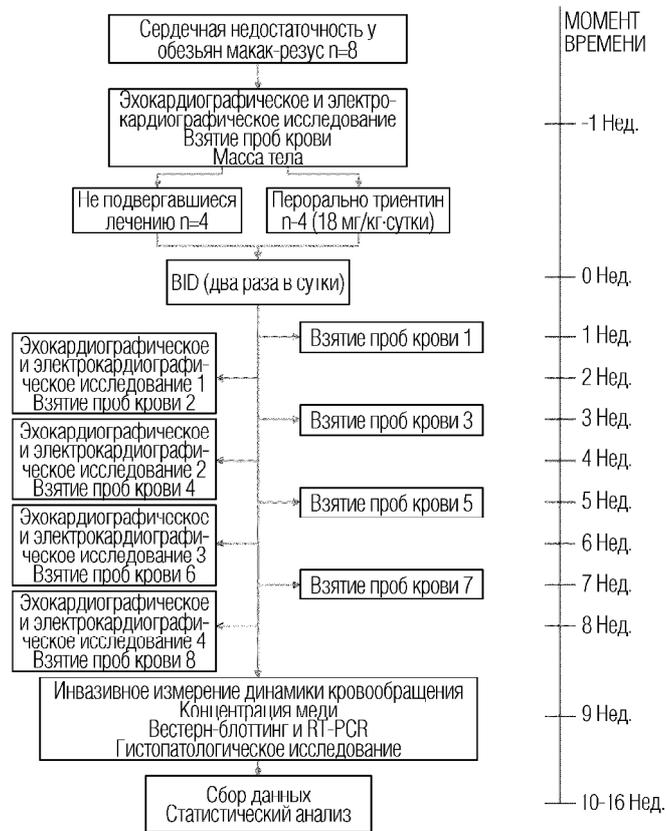
Концентрация меди в ткани сердца



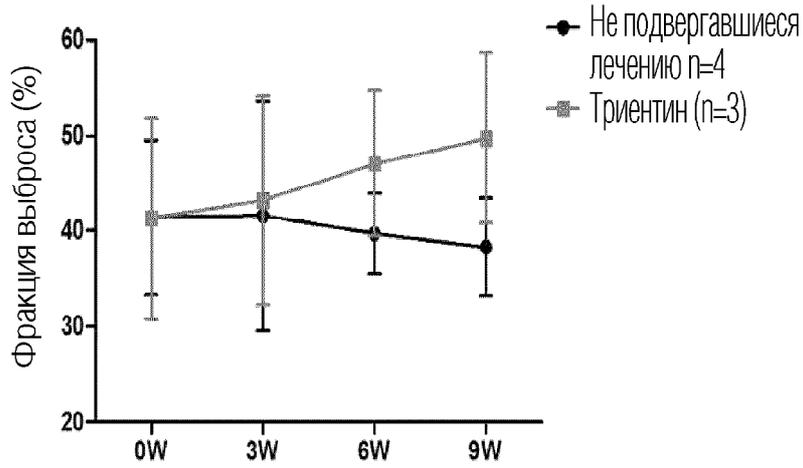
Фиг. 10А



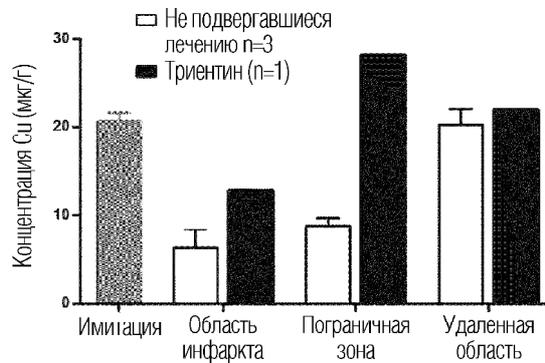
Фиг. 10В



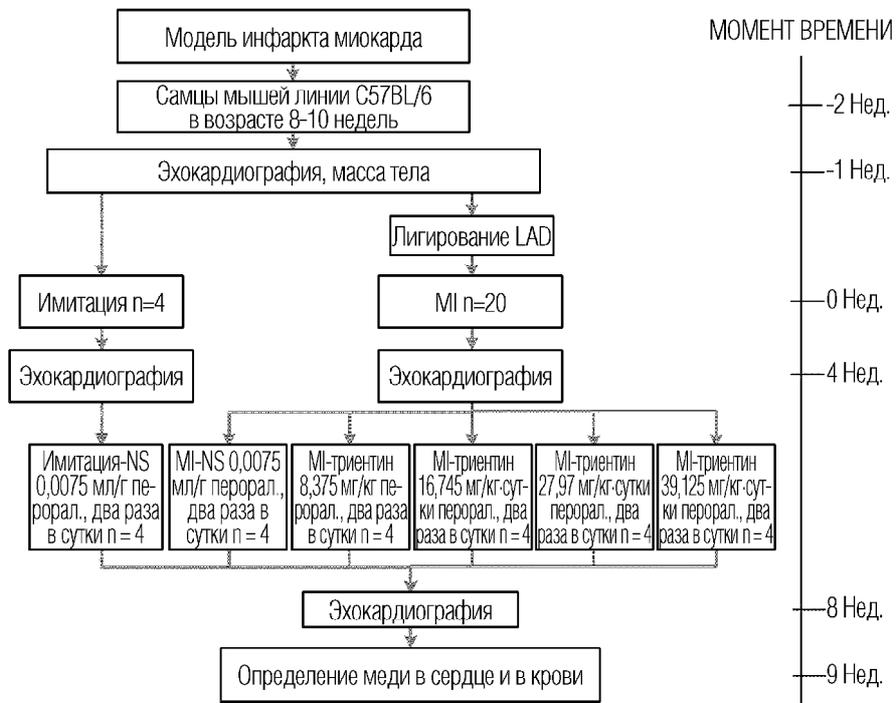
Фиг. 11



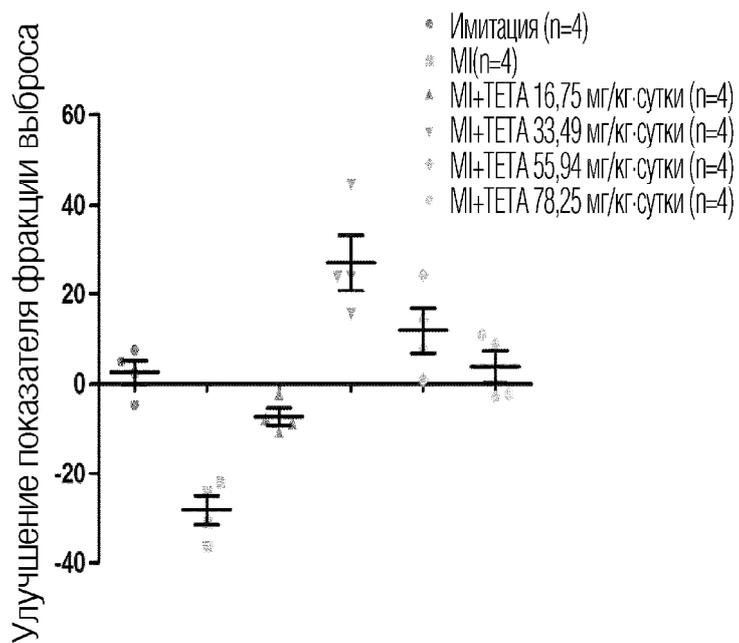
Фиг. 12



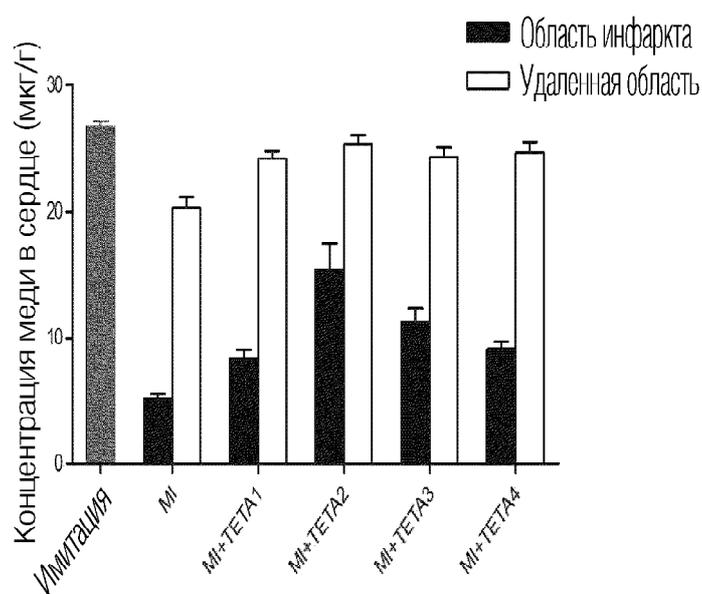
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

