

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290632** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.05.13

(51) Int. Cl. *C12N 5/0775* (2010.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.27

(54) **АКТИВИРОВАННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТЕЙ**

(86) PCT/IB2019/057182

(87) WO 2021/038275 2021.03.04

(71) Заявитель:
**ЦЕЛЛИН ТЕКНОЛОДЖИС ОЮ;
ТААСТАВА КИРУРГИА КЛИНИК
АС (ЕЕ)**

(72) Изобретатель:

**Лоог Андрус, Казанцева Екатерина,
Вазар Олави, Мерен Тиит, Вазар
Триин, Раик Март (ЕЕ)**

(74) Представитель:

**Ловцов С.В., Гавриков К.В., Коптева
Т.В., Левчук Д.В., Стукалова В.В.,
Ясинский С.Я. (RU)**

(57) Изобретение относится к мезенхимальным стволовым клеткам, обработанным метамизолом, для лечения ишемии конечностей у пациента-человека. В настоящем изобретении предусмотрен фармацевтический продукт для роста при ангиогенезе с целью замены окклюзированных кровеносных сосудов для предупреждения ампутации конечностей. Секретия ангиогенных факторов роста VEGFA, HGF, bFGF, TEK стимулируется, а уровни провоспалительных цитокинов IL6, CXCL8, CCL2, IL1-RN снижаются посредством активации мезенхимальных стволовых клеток (MSC). В соответствии с результатами обработки MSC продуцируют белки и сигнальные молекулы для роста новых кровеносных сосудов, которые ускоряют рост новых артерий.

A1

202290632

202290632

A1

АКТИВИРОВАННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТЕЙ

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Прогресс и успех клеточной терапии зависят от технологий, которые дают возможность манипулировать стволовыми клетками посредством стимуляции пролиферации, дифференцировки и интеграции в регенерирующие ткани и органы. С выделенными стволовыми клетками можно манипулировать на разных стадиях процедур клеточной терапии, включая выделение клеток, размножение клеток, кондиционирование к трансплантации и после трансплантации. Настоящее изобретение относится к применению клинически одобренных противовоспалительных средств для модуляции активности мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани. Модуляция секреции различных факторов роста, включая ангиогенные факторы и цитокины, а также модуляция метаболической активности могут быть использованы для разработки эффективных фармацевтических продуктов на основе MSC для лечения различных патологических состояний.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Мезенхимальные стволовые клетки (MSC) характеризуются своей способностью дифференцироваться в различные клеточные линии *in vitro* и выполнять иммуномодулирующую функцию в регенеративных процессах (Augello & De Bari, 2010), (Shi et al., 2010). В отличие от фармацевтических лекарственных средств, которые доставляют определенный активный компонент в определенной дозе, MSC оказывают терапевтические эффекты в результате секреции различных биологически активных соединений в ответ на внешнюю стимуляцию (Ma et al., 2014). Растворенные факторы, продуцируемые MSC, участвуют в воспалительных процессах и процессах неоваскуляризации, оказывая глубокое воздействие на повреждение и регенерацию тканей. К числу заболеваний, которые можно лечить с помощью MSC, относятся, например, иммунные и неиммунные нарушения, такие как инфаркт миокарда, сахарный диабет, реакция «трансплантат против хозяина» и цирроз печени (Wei et al., 2013) (Shi et al., 2010). Понимание иммуномодулирующих свойств MSC и того, как воспалительное микроокружение влияет на их функцию, имеет огромное значение для разработки более эффективных стратегий повышения терапевтической эффективности MSC с целью

создания местных и/или системных условий для стимуляции заживления и регенерации тканей.

Заболевание периферических артерий представляет собой состояние, характеризующееся ограниченным поступлением кислорода и глюкозы вследствие нарушения функции кровеносных сосудов. Заболевание периферических сосудов обычно поражает артерии и на наиболее поздних стадиях вызывают критическую ишемию конечностей (CLI). В настоящее время наиболее распространенные терапевтические варианты включают фармакологические виды лечения и хирургическое вмешательство (Norgren et al., 2007), (Hamdy et al., 2013), (Cull et al., 2014). Нестероидные противовоспалительные лекарственные средства и инъекции синтетических глюкокортикоидов широко используются для ослабления боли и воспаления у пациентов с CLI. Однако во многих случаях результатом прогрессирования заболевания является гангрена и ампутация конечностей. Разработка новых прогрессивных видов терапии может улучшить клинический исход и повысить уровень жизни пациентов. Клинический потенциал MSC для лечения ишемических состояний был описан в нескольких животных моделях и в клинических испытаниях ранней фазы у человека (Liew & O'Brien, 2012). Эффективность и безопасность применения MSC для лечения острых ишемических нарушений демонстрируют большой потенциал. Терапевтическая эффективность MSC зависит от их способности обеспечивать иммуномодулирующие и ангиогенные факторы для подавления воспаления и стимуляции ангиогенеза. Неактивированные MSC экспрессируют низкие уровни иммуносупрессорных факторов, однако местные условия в месте инъекций влияют на их функциональность. Для улучшения терапевтического эффекта MSC были разработаны различные стратегии. Стимуляцию MSC посредством $IFN\gamma$ или $TNF\alpha$ использовали для индукции секреции иммуномодулирующих факторов (Crop et al., 2010). Кроме того, сверхэкспрессия CXCR4 в MSC приводит к более эффективному хоумингу MSC в ишемизированную ткань по сравнению с немодифицированными клетками (Cheng et al., 2008). Таким образом, иммуносупрессорное и ангиогенное действие MSC можно стимулировать изменением условий в пораженной/патологической ткани или предварительной обработкой MSC перед привитием. Поскольку пациенты с ишемией конечностей получают лечение различными противовоспалительными лекарственными средствами, понимание влияния этих лекарственных средств на противовоспалительную и ангиогенную функцию MSC чрезвычайно важно. Действие большинства NSAID основано на блокаде синтеза простагландинов посредством ингибирования фермента циклооксигеназы. Известно, что простагландин PGE2 является одним из важных соединений, секретируемых MSC и

отвечающих за модуляцию воспаления. Однако влияние NSAID на комплекс метаболических реакций и секрецию противовоспалительных и ангиогенных факторов при противовоспалительной терапии MSC неизвестно.

Влияние NSAID (парацетамола, метамизола (анальгина), кетопрофена и диклофенака) и глюкокортикоида преднизолона, применяемых в клинической практике для лечения ишемических нарушений, в терапевтических дозах на клеточный цикл, метаболическую активность, а также на экспрессию ангиогенных и воспалительных цитокинов AdMSC были проанализированы и будут описаны далее в данном документе.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Целью настоящего изобретения является создание фармацевтического продукта для роста при ангиогенезе с целью замены окклюзированных кровеносных сосудов для предупреждения ампутации конечностей.

Авторы настоящего изобретения разработали протоколы для стимуляции мезенхимальных стволовых клеток к секретированию регуляторов, которые влияют на регенерацию в ишемизированной конечности и улучшают неоваскулогенез и ангиогенез. Обработка MSC метамизолом (анальгином)), активным ингредиентом которого является метамизол, изменяет клеточный цикл, стимулирует синтез ангиогенных трофических факторов VEGF, HGF, TEK и bFGF, снижает экспрессию воспалительных цитокинов и хемокинов, таких как IL6, IL1RN, CCL2, IL8/CXCL8.

Применение крысиных моделей ишемии конечностей показывает, что обработка MSC метамизолом (анальгином) перед трансплантацией стимулирует неоваскулогенез и ангиогенез оперированной конечности.

В соответствии со следующими примерами исследований, AdMSC являются перспективным и многообещающим источником клеток для клеточной терапии для лечения критической ишемии конечностей (CLI). Несмотря на многообещающие предварительные исследования применения MSC для лечения больных с CLI, потенциал MSC является не очень эффективным и возникает много вопросов о целесообразности их применения в клинической практике. Недавно было показано, что кондиционирование и предварительная активация MSC значительно улучшают их иммунологический и терапевтический потенциал. В настоящем изобретении предусмотрена новая стратегия лечения CLI посредством предварительной активации AdMSC NSAID метамизолом (анальгином). Примирование AdMSC метамизолом влияет на пролиферацию и метаболическую активность AdMSC, изменяет клеточные циклы, динамически модулирует профиль экспрессии воспалительных цитокинов и хемокинов и индуцирует

экспрессию ангиогенных маркеров, важных в контексте лечения заболевания. Доклинические эксперименты на крысах показали, что AdMSC, активированные метамизолом (анальгином), были более эффективны для их терапевтического применения для лечения ишемии конечностей благодаря их ускоренному и надежному неоартериогенезу и неоангиогенезу.

В соответствии с настоящим изобретением секреция ангиогенных факторов роста VEGFA, HGF, bFGF, TEK стимулируется, а уровни провоспалительных цитокинов IL6, CXCL8, CCL2, IL1-RN снижаются посредством активации мезенхимальных стволовых клеток (MSC).

Настоящее изобретение относится к мезенхимальным стволовым клеткам, обработанным метамизолом, для лечения ишемии конечностей у пациента-человека. Фармацевтический продукт по настоящему изобретению содержит обработанные метамизолом мезенхимальные стволовые клетки. Продукт находится в форме для инъекций и предпочтительно содержит 1 миллион клеток на кг массы тела пациента. Клетки вводят в количестве 0,75 – 1,5 млн на кг массы тела пациента. Клетки, обработанные метамизолом, находятся в микроконцентрациях.

Настоящее изобретение также раскрывает способ получения продукта, содержащего обработанные метамизолом мезенхимальные стволовые клетки. Способ предусматривает следующие стадии:

- сбор жировой ткани
- отделение мезенхимальных стволовых клеток от жировой ткани
- размножение MSC
- воздействие на MSC активным ингредиентом

В соответствии с исследованиями, обработка MSC метамизолом дает преимущества и предпосылки для того, чтобы продукт был эффективным.

В результате обработки MSC продуцируют белки и сигнальные молекулы для роста новых кровеносных сосудов, которые ускоряют рост новых артерий. Влияние различных лекарственных средств на MSC и лекарственное средство метамизол, применяемое в настоящем изобретении, было изучено и будет описано далее в данном документе. Продукт по настоящему изобретению был успешно испытан на животных.

Уже известно, что стволовые клетки участвуют в неоангиогенезе и неоартериогенезе, и целью предыдущих лабораторных исследований и экспериментов на животных был поиск наиболее эффективной комбинации лекарственных средств на основе клеток. Поскольку время имеет определяющее значение для пациентов с критической ишемией нижних конечностей, важно найти лекарственное средство на

основе клеток, которое оказывает наиболее быстрое воздействие. Хотя продукт по настоящему изобретению до сих пор испытывали только на животных, в соответствии с предшествующим уровнем техники считается, что он оказывает такой же эффект на пациентов-людей.

Краткое описание чертежей

Прилагаемые фигуры изображают следующее:

Фиг. 1. Анализ метаболической активности MSC на основе WST, обработанных противовоспалительными лекарственными средствами (AID).

Поглощение измеряли при 440 нм через 2 часа инкубации с реагентом WST-1 для контрольных и обработанных AID (парацетамол, метамизол (анальгин), диклофенак, кетопрофен, преднизолон) AdMSC. Метаболическую активность AdMSC измеряли через 1, 2, 3 и 5 дней после обработок.

Фиг. 2. Анализ клеточного цикла контрольных и обработанных AID AdMSC. Обработанные AID и контрольные AdMSC окрашивали йодидом пропидия (PI) через 24 часа после обработки и анализировали посредством проточной цитометрии с применением BD Accuri C6.

Фиг. 3. Эффекты AID в отношении экспрессии ангиогенных маркеров в AdMSC.

Уровни экспрессии mRNA VEGFA, HGF, bFGF и TEK в AdMSC, обработанных AID в течение 24 часов, измеряли в трех повторностях посредством RT-qPCR и нормализовали по отношению к уровням экспрессии mRNA GAPDH. Данные для клеток, обработанных AID, рассчитывали по отношению к контрольным необработанным AdMSC, и результаты представлены в логарифмической шкале. Положительные значения указывали на повышение, а отрицательные значения на снижение уровней mRNA по сравнению с контрольными необработанными клетками.

Фиг. 4. Относительная экспрессия mRNA генов воспаления в AdMSC, стимулированных LPS и обработанных AID в течение 24 часов, представлена в виде тепловой карты. Уровни экспрессии измеряли в трех повторностях посредством RT-qPCR и нормализовали по отношению к уровням экспрессии mRNA GAPDH. Данные, полученные на основе AdMSC, стимулированных LPS и обработанных AID, рассчитывали в виде относительной кратной разницы по сравнению с клетками, обработанными LPS, и преобразовывали в логарифмическую шкалу. Количественные изменения в экспрессии генов представлены цветом: красный цвет указывает на повышение экспрессии, в то время как синий цвет указывает на снижение экспрессии. Данные экспрессии визуализировали с применением программного обеспечения GENE-E.

Фиг. 5. Изменения воспалительных факторов в культуральных средах. Уровни секретируемых IL6, CXCL8, CCL2 и IL1RN измеряли в кондиционированной среде контрольных, стимулированных LPS и стимулированных LPS и обработанных парацетамолом или преднизолоном AdMSC посредством ELISA через 24, 48 и 72 ч, и представляли в виде нормализованных значений по отношению к контрольному зонду через 24 ч.

Фиг. 6. Тепловая карта профиля экспрессии генов воспаления в стимулированных LPS и обработанных AID AdMSC. Уровни экспрессии mRNA генов воспаления в AdMSC, стимулированных LPS и обработанных AID в течение 48 ч (A) и 72 ч (B), рассчитывали в виде кратной разницы по сравнению с AdMSC, обработанными LPS, и представляли в виде тепловых карт. Уровни экспрессии mRNA генов воспаления измеряли в трех повторностях посредством RT-qPCR, нормализовали по отношению к уровням mRNA GAPDH и преобразовывали в логарифмическую шкалу. Положительные значения (красного цвета) указывают на более высокую экспрессию, а отрицательные значения (синего цвета) на более низкую экспрессию по сравнению с контрольными AdMSC, обработанными LPS.

Фиг. 7. Корреляционный анализ между ангиографией и разницей перфузии. На (A) изображены различия в васкулогенезе и перфузии, на (B) продемонстрированы различия в артериогенезе и перфузии. Сплошная линия регрессии является подогнутой, а пунктирная линия соответствует 95% доверительному интервалу.

Фиг. 8. Анализ выживаемости Каплана-Мейера в группах обработки. Пунктирные линии представляют 95% доверительный интервал. BEAULI n = 8, CYTORI n = 13, MSC n = 8, MSCD n = 8 и SALINE n = 16.

Фиг. 9. Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) различий перфузии между группами обработки. На (A) изображены данные до операции, на (B) продемонстрированы данные непосредственно после операции, на (C) изображены данные через 3 дня после операции, на (D) изображены данные через 7 дней после операции, и на (E) представлены данные через 14 дней после операции. BEAULI – группа оперированных и получавших липоаспират животных; CYTORI – группа животных, получавших клетки, полученные из системы Cytori Celllution 800/CRS; MSC – мезенхимальные стволовые клетки, выделенные и экспандированные в лаборатории; MSCD – мезенхимальные стволовые клетки, обработанные 10 мкМ метамизола (анальгин); солевой р-р – контрольные животные, обработанные 0,9% раствором NaCl.

Фиг. 10. Односторонний анализ дисперсии васкулогенеза и артериогенеза между группами обработки. (A) Васкулогенный и (B) артериогенный анализ дисперсии. BEAULI

– группа оперированных и получавших липоаспират животных; CYTORI – группа животных, получавших клетки, полученные из системы Cytori Celllution 800/CRS; MSC – мезенхимальные стволовые клетки, выделенные и экспандированные в лаборатории; MSCD – мезенхимальные стволовые клетки, примированные 10 мкМ метамизола (анальгин); солевой р-р – контрольные животные, обработанные 0,9% раствором NaCl.

Фиг. 11. Ангиография, полученная на основе серии животных, обработанных MSCD.

Фиг. 12. Ангиография, полученная на основе серии животных, обработанных MSC.

AID влияет на метаболическую активность и прогрессирование клеточного цикла MSC

Анализ влияния парацетамола (4,4 мМ), диклофенака (10 мкМ), метамизола (анальгина) (10 мкМ), кетопрофена (50 мкМ) и преднизолона (0,1 мкМ) на метаболическую активность проводили с использованием пула AdMSC, выделенных от по меньшей мере трех доноров, для снижения влияния вариации доноров. Данные анализа метаболической активности (WST-1) продемонстрировали, что AID незначительно изменяют метаболическую активность AdMSC (Фиг. 1). В течение первых 48 часов все проанализированные AID стимулировали метаболическую активность AdMSC. Обработка метамизолом (анальгином) значительно стимулировала клеточный метаболизм в первые 24 часа, в то время как все изучаемые лекарственные средства демонстрировали длительный супрессорный эффект в отношении метаболической активности AdMSC (Фиг. 1).

Влияние лекарственных средств на изменения клеточного цикла, измеряемые посредством проточной цитометрии, показано на Фиг. 2. По сравнению с необработанными контрольными клетками (фаза G0/G1 - 82%), процент клеток в фазе G0/G1 существенно не изменился при обработке диклофенаком (81%), кетопрофеном (80%) и преднизолоном (77%) (Фиг. 2). Процент клеток в фазе G0/1 был ниже в культурах, обработанных метамизолом (анальгином) (65%) и парацетамолом (71%), в то время как процент клеток в фазе G2/M клеточного цикла в этих культурах был повышен (Фиг. 2). Полученные результаты показывают, что метамизол (анальгин) и парацетамол являются единственными изученными лекарственными средствами, которые влияют на клеточный цикл, поскольку они приводили к накоплению AdMSC в фазе G2/M.

Таким образом, все исследованные AID влияли на метаболическую активность AdMSC, тогда как метамизол (анальгин) и парацетамол незначительно влияли также на прогрессирование клеточного цикла.

AID влияет на экспрессию ангиогенных факторов

Многочисленные растворенные факторы, продуцируемые MSC, участвуют в регуляции ангиогенеза и неоваскуляризации *in vivo* (Estrada et al., 2009). С другой стороны, было обнаружено, что MSC ингибируют ангиогенез при определенных условиях (Otsu et al., 2009). Кроме того, было показано, что трофические факторы VEGF и bFGF стимулируют ангиогенез при лечении ишемии (Leung et al., 1989). Было проанализировано влияние AID на экспрессию ангиогенных факторов в AdMSC. Различные AID по-разному влияли на экспрессию ангиогенных факторов, стимулируя или подавляя их экспрессию. Обработка AdMSC метамизолом (анальгином) и кетопрофеном приводила к повышению экспрессии mRNA VEGFA, HGF, bFGF и ТЕК (Фиг. 3), диклофенак не оказывал влияния, парацетамол и преднизолон ингибировали экспрессию VEGFA и HGF. Кроме того, парацетамол индуцировал bFGF, но значительно подавлял экспрессию ТЕК, в то время как преднизолон оказывал противоположный эффект (Фиг. 3).

Влияние AID на экспрессию иммуномодулирующих факторов

Ряд воспалительных цитокинов и хемокинов, секретируемых MSC, участвуют в процессе иммунорегуляции, за счет чего осуществляется воздействие на иммунокомпетентные клетки. Количественные различия в уровнях цитокинов, секретируемых MSC, определяют локальные условия микроокружения и вызывают противовоспалительную реакцию. Выявление профилей воспалительных биомаркеров в ответ на терапию MSC в сочетании с обработкой AID может прогнозировать последствия такого вмешательства для иммунологического статуса в целом. Было проанализировано влияние обработок AID на воспалительный профиль AdMSC на уровне экспрессии белков и генов.

Воздействие на AdMSC парацетамола, диклофенака, метамизола (анальгина), кетопрофена и преднизолона в стандартных условиях культивирования оказывает незначительное влияние на синтез и секрецию иммуномодулирующих факторов (Табл. 1). Только парацетамол приводил к значительному снижению уровней IL6, CXCL8/IL8 и CCL2 в культуральной среде по сравнению с необработанными клетками.

Для имитации воспалительных условий, AdMSC подвергали воздействию липополисахарида (LPS) до обработки AID. Уровни воспалительных цитокинов IL6,

CXCL8, CCL2 и IL1RN повышались после обработки LPS (Табл. 1). Затем AdMSC, обработанные LPS, подвергали воздействию AID для изучения их влияния на цитокины при воспалительных состояниях.

Парацетамол и преднизолон значительно снижали уровни IL6 и CXCL8 в культурах AdMSC, стимулированных LPS (Табл. 1). Ингибирующее действие метамизола (анальгина) было обнаружено на экспрессию CCL2 и IL1RN. В отличие от этого, кетопрофен и диклофенак стимулировали экспрессию IL6 и CXCL8 в культурах AdMSC, стимулированных LPS. Интересным является то, что воздействие кетопрофена и диклофенака на AdMSC не оказывало влияния на уровни CCL2.

Таблица 1. Секреция воспалительных факторов AdMSC в ответ на обработки AID. Концентрации в пг/мл секретируемых белков IL6, CXCL8, CCL2 и IL1RN измеряли в среде контрольных, стимулированных LPS и обработанных AID в течение 24 ч AdMSC посредством ELISA.

Таблица 1 Обработки MSC	концентрация, пг/мл			
	IL6	CXCL8	CCL2	IL-1RN
Контроль	40 ± 2	277 ± 12,7	96 ± 3,2	2,3 ± 0,03
парацетамол	0	11 ± 0,1	8 ± 0,4	11,0 ± 0,65
диклофенак	50 ± 1	284 ± 19,6	64 ± 8,4	14,5 ± 0,29
метамизол (анальгин)	30 ± 1	341 ± 4,7	109 ± 3,2	3,9 ± 0,03
кетопрофен	10 ± 1	301 ± 0,3	165 ± 23,4	0
преднизолон	30 ± 2	35 ± 0,1	100 ± 12,2	7,3 ± 0,20
контроль + LPS	210 ± 22	2373 ± 109	461 ± 19,9	61 ± 18
LPS + парацетамол	90 ± 14	623 ± 41	270 ± 29,9	33 ± 9
LPS + диклофенак	390 ± 4	2807 ± 361	437 ± 16,8	17 ± 2
LPS + метамизол (анальгин)	180 ± 29	1816 ± 121	313 ± 43,9	12 ± 1
LPS + кетопрофен	440 ± 143	2509 ± 68	451 ± 31,8	12 ± 0,5
LPS + преднизолон	50 ± 12	402 ± 51	314 ± 23,2	33 ± 2

Эффекты AID на экспрессию mRNA воспалительных цитокинов в AdMSC анализировали с применением методики RT-qPCR. Результаты анализов визуализировали в виде графика тепловой карты с использованием платформы GENE-E (Фиг. 4). Кратковременная обработка AdMSC посредством AID оказывала влияние на экспрессию воспалительных цитокинов. Воздействие на AdMSC всех изученных AID в течение 24 часов значительно снижало уровни IL-1RN, IDO1 и хемокинов CXCL9 и CXCL10, при этом индуцировалась экспрессия mRNA IL4 (Фиг. 4). Экспрессию провоспалительных

цитокинов CCL2, CCL3, TNF, IL6, IL1A и IL1B подавляли обработкой кетопрофеном и метамизолом (анальгином). Обработки NSAID оказывают противоположное влияние на экспрессию различных членов семейства TGF β , в то время как TGF β 1 и TGF β 3 подавлялись, а экспрессия TGF β 2 стимулировалась после обработки парацетамолом и диклофенаком (Фиг. 4). В целом эти данные указывают на то, что различные AID по-разному изменяют профиль транскриптома AdMSC даже при кратковременной обработке, стимулируя или подавляя экспрессию специфических воспалительных цитокинов.

Для изучения того, демонстрируют ли обработки AID индуцированных LPS AdMSC длительные изменения уровней цитокинов, анализировали влияние парацетамола и преднизолона на уровни цитокинов в культуральной среде. Даже однократная обработка индуцированных LPS AdMSC в условиях дефицита сыворотки значительно влияло на их цитокиновый профиль (Фиг. 5). Уровни CCL2, IL6 и IL-1RN повышались в среде контрольных необработанных AdMSC в течение 3 дней. Активация AdMSC посредством LPS индуцировала экспрессию CCL2, CXCL8, IL6 и IL-1RN в каждый анализируемой временной точке. Наши результаты показывают, что обработка парацетамолом снижала уровни CCL2 в обработанных LPS культурах по сравнению с контрольными культурами и не оказывала значительного влияния на экспрессию CXCL8, IL6 и IL-1RN в течение определенного времени (Фиг. 5). В случае экспрессии CCL2 и IL6 эффекты обработки преднизолоном были противоположны парацетамолу, вероятно, в связи с различными механизмами этих лекарственных средств. Таким образом, преднизолон значительно стимулировал экспрессию CCL2 во всех временных точках, в то же время ингибировал IL-1RN и умеренно индуцировал уровни IL6 через 72 часа после обработки (Фиг. 5).

Эффекты повторных обработок AID (48 и 72 часа) на экспрессию mRNA цитокинов в AdMSC анализировали с применением методики RT-qPCR. Дифференциальная экспрессия генов цитокинов представлена в виде тепловой карты на Фиг. 6. Результаты анализа показали различный профиль экспрессии генов цитокинов между двумя временными точками. При воздействии различных лекарственных средств наблюдали сложный паттерн экспрессии про- и противовоспалительных факторов. Хотя экспрессия большинства провоспалительных цитокинов, таких как IL1B, CXCL9 или CCL2, снижалась при обработках AID, уровни некоторых факторов (TNF или MIF) со временем восстанавливались, демонстрируя их динамическую регуляцию при обработках лекарственными средствами. Однако стабильной индуцированной экспрессии противовоспалительных факторов (IL4, TNFAIP6, IDO1) не наблюдали.

В целом, эти данные указывают на то, что экспрессия воспалительных факторов может быть значительно изменена различными AID в зависимости от времени.

Создание животной модели мышечной ишемии с использованием ADRC, полученных из Cytorig, в качестве референтной системы

Цель доклинического исследования состояла в том, чтобы оценить условия и клетки, которые лучше всего способствуют неоангиогенезу и неоартериогенезу, путем сравнения различным образом выделенных и кондиционированных AdMSC человека. Эти типы доклинических исследований предполагают использование модели ишемии задней конечности (HLIM), где восстановление реваскуляризации ишемизированной мышцы происходит за счет регенеративного потенциала вводимых лекарственных средств (клеток), а не за счет собственной регенерационной способности животного. Это окно ишемии должно длиться по меньшей мере 2-3 недели. Кроме того, в модели была успешно разработана модель HLIM Хеллингмана, которая хорошо подходит для тестирования AdMSC в отношении регенерации *in vivo*.

Приготовление суспензии для обработки

BEAULI: Липоаспират, полученный с помощью body-jet (медицинская стандартная клитическая практика у человека лечения дефектов мягких тканей). Липоаспират получают с помощью водоструйной липоаспирации. Собранный жир аккуратно отделяют от оставшейся жидкости с помощью LipoCollector® или FillerCollector® и незамедлительно используют для пересадки жира. Эту методику использовали в качестве клинического стандарта для переноса жировых клеток.

CYTORI: Липоаспират, полученный посредством водоструйной липоаспирации, обрабатывали посредством системы Cytorig Celllution 800/CRS (Cytorig Therapeutics INC.). Регенеративные клетки, полученные из Cytorig Cellusion, являются золотым стандартом в регенеративной медицине для обогащения жирового трансплантата, а также для улучшения ангиогенеза в областях трансплантата. Система Cytorig Celllution 800/CRS использует липоаспират, расщепляет коллагеназой, промывает и отделяет регенеративные клетки посредством центрифугирования. Перед инъекцией количество ядерных клеток анализировали посредством счетчика клеток. Среднюю дозу живых ядерных клеток подсчитывали с применением Nucleocounter NC100 (Chemometec). Среднее количество живых ядерных клеток составило $0,9 \times 10^6$ клеток/мл.

MSC: AdMSC человека получали из свежесыводенной подкожной жировой ткани и характеризовали, как сообщалось ранее (Lin et al., 2007). Для каждого введения пул AdMSC от по меньшей мере 3 индивидуумов и число пассажей до 3 выращивали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко, с низким содержанием глюкозы (DMEM-LG)

(Gibco, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (PAA, Пашинг, Австрия) и 1% пенициллин-стрептомицина (PEST) (Life Technologies). Достигая приблизительно 80-90% конfluenceности, клетки собирали и использовали 2×10^5 клеток на животное.

MSCD: AdMSC выращивали в стандартных культуральных условиях, как описано ранее, до 80-90% конfluenceности, среду меняли на DMEM-LG, содержащую 1% FBS и 1% PEST за 12 ч до обработки, стимулировали LPS (0,1 мкг/мл; Sigma-Aldrich, Штайнхайм, Германия) в течение 2 часов, интенсивно промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и обрабатывали метамизолом (анальгином) (10 мкМ) в течение 24 часов. Собирали клетки и использовали 2×10^5 клеток на животное.

Солевой раствор: в контрольной серии крысам вводили солевой раствор (0,9% NaCl).

Исследования на животных

Для доклинических исследований на животных испытывали четыре различных обработки – BEAULI, CYTORI, MSC и MSCD. В каждой серии оперировали 11 животных – 8 животных, которым вводили различные клетки в икроножную мышцу, и 3 контрольных животных, которым вводили солевой раствор. Дополнительно оперировали отдельную контрольную серию из 6 животных.

Все эксперименты на животных разрабатывали в соответствии с Европейской директивой 2010/63/EC, местным законодательством по защите животных (LoKS) и одобряли Этическим комитетом Министерства сельского хозяйства Эстонии (в настоящее время Министерство сельского хозяйства).

Самок крыс Sprague-Dawley (SD) содержали в стандартных условиях вивария (2-4 животных на клетку в помещении с контролируемой температурой ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) и влажностью ($55 \pm 10\%$) с циклом 12:12 свет:темнота). Животные получали свободный доступ к стандартной поддерживающей диете для грызунов и воде.

В нашей серии использовали взрослых крыс (в возрасте 4 ± 1 месяца ($n=50$) и в одной серии в возрасте 12-13 месяцев ($n=11$)). Подробную информацию о количестве и размерах групп см. в разделе «Статистический анализ».

Хирургический способ

Животных оперировали в положении лежа на спине под общей анестезией (кетамин (100 мг/мл; Vetoquinol, Франция) в смеси с медетомидином (1 мг/мл; Syva, Испания) 75 мг/кг и 0,5 мг/кг соответственно, вводимые внутривенно). Разрез

выполняли на правой конечности. Обнажали наружную подвздошную артерию, бедренную артерию, подколенную артерию и все боковые ветви. Для окклюзии артерий и боковых ветвей использовали танталовые микроклипсы различных размеров. Танталовые микроклипсы являются хорошими маркерами во время ангиографического исследования. Для резекции подвздошных и бедренных артерий и вен использовали электрокоагуляцию. В икроножную мышцу животным вводили 0,4 мл клеточной суспензии в группах обработки или 0,9% физиологического раствора в контрольных группах. Кожу закрывали узловыми швами и фиксировали кожными степлерами. Анестезию снимали атипамезолом (5 мг/мл; Syva, Испания) в дозе 1 мг/кг подкожно. Животных ежедневно взвешивали, наблюдали за симптомами боли и давали анальгетики в период восстановления (бупренорфин (0,3 мг/мл; Richterpharma AG, Австрия) 0,01-0,03 мг/кг каждые 6-12 часов по мере необходимости в течение минимального периода времени в первые три дня в комбинации с кетопрофеном (10 мг/мл; Merial, Франция) по 5 мг/кг каждые 24 часа по мере необходимости в течение минимум пяти дней. Эвтаназию применяли, когда потеря массы превышала 20% или наблюдались кумулятивные признаки сильной боли и дистресса или агонического состояния.

Лазерные доплеровские измерения перфузии крови

Животные находились под общей анестезией (глубокая хирургическая в дни хирургического вмешательства и половинная доза только для измерения перфузии). Шерсть в области измерения удаляли с помощью электробритвы и крема для удаления волос. Животных помещали на нагретую терморегулируемую поверхность и выдерживали их при температуре 37 °С в течение 5 минут. Для измерений использовали PeriCam PSI (Perimed AB). Расстояние для измерения составляло 15 см. Измерения проводили на нагретой поверхности с контролируемой температурой. На обеих конечностях выбирали область, представляющую интерес (ROI). Измерения проводили до операции, непосредственно после операции и через 3, 7 и 14 дней после операции. Поскольку разные животные отличаются по перфузии, несмотря на стандартное состояние, для анализа использовали разницу и сравнительную разницу между оперированной и контрольной конечностями одного и того же животного.

Ангиография

Ангиографию выполняли в день 14 после операции. Животные находились под общим наркозом, в положении на спине, на обогреваемой поверхности с контролируемой температурой. Срединный разрез выполняли в брюшной стенке, где обнажали брюшную

аорту. Набор MicroSlide (Galt Medical Corp) вместе с контрастным веществом Omnipaque 300 использовали для канюляции аорты. Цифровую субтракционную ангиографию выполняли с применением Ziehm Vision RFD, 20 кВт (Ziehm Imaging GmbH).

Результаты ангиографии анализировали два сосудистых хирурга, которые не имели представление о группах исследования. При анализе подсчитывали общее количество обнаруживаемых сосудов, а также количество извитых сосудов для того, чтобы обнаружить неоартериогенез отдельно от васкулогенеза.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли посредством программного обеспечения для статистического анализа Microsoft Excel и JMP10.0 SAS. Линейную регрессию использовали для анализа связи между васкуло- или артериогенезом и перфузией. Метод Каплана-Мейера использовали для анализа выживаемости, а однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для сравнения средних различий перфузии и среднего значения новых кровеносных сосудов между различными группами обработки. Для сравнения средних значений использовали апостериорные тесты Даннета для сравнения групп обработки с контрольной группой с солевым раствором. При отсутствии изменения (менее 3 перфузионных единиц) разницы перфузии до и после операции моделирование ишемии у животного считали неудачным и все эти случаи (3 контрольных животных, получавших физиологический раствор) исключали из статистического анализа. Имели место две серии животных, получавших CYTORI – в одной из них использовали более старых крыс, но, поскольку не было статистически значимых различий в каких-либо измерениях между более старыми и более молодыми крысами, получавшими CYTORI, эти две серии из 8 животных рассматривали в качестве одной группы обработки ($n = 16$).

Результаты

Корреляционный анализ между измерениями перфузии крови с помощью лазерной доплерографии и данными ангиографии показан на Фиг. 7.

Имеется статистически значимая отрицательная корреляция между разницей перфузии (перфузия в контрольной конечности – перфузия в оперированной конечности), измеряемой через 7 дней после операции, и как васкуло-, так и артериогенезом (ангиографию выполняли через 14 дней после операции). $R = 0,51$; p -значение 0,0031 для васкулогенеза и $R = 0,46$; p -значение 0,0095 для артериогенеза соответственно, $n = 31$ для обоих. Как и ожидалось, корреляционный анализ показывает, что чем лучше происходила

перфузия оперированной конечности, тем больше наблюдали новых кровеносных сосудов.

Анализ выживаемости показан на Фиг. 8.

Статистически значимая разница в выживаемости между различными группами обработки отсутствовала.

Анализ различий перфузии показан на Фиг. 9.

Как видно из Фиг. 9, статистически значимых различия между группами до, непосредственно после и через 3 дня после операции отсутствовали. Через 7 дней наблюдается статистически значимое улучшение MSCD, а через 14 дней в группе CYTORI по сравнению с контролем, обработанным солевым раствором, с P-значениями 0,0008 и 0,0322 соответственно. Анализ показал, что у животных, обработанных MSC, примированных метамизолом (анальгином) (группа исследования MSCD), восстановление перфузии крови происходило быстрее, чем в других группах, уже на седьмой день после операции (P-значение 0,0008). Разница между группами MSC и солевого раствора статистически незначима, вероятно, вследствие небольшого размера группы MSC (только 3 животных из 8 дожили до дня 7).

Анализ васкулогенеза между различными группами обработки клеток показан на Фиг. 10.

Для животных, обработанных CYTORI, MSC и MSCD, наблюдали значительно лучший неоангиогенез по сравнению с животными контрольной группы, получавшими солевой раствор (P-значения меньше 0,0001 для всех групп как для васкулогенеза, так и для артериогенеза; в то время как для артериогенного анализа группы MSC P-значение составляет 0,034).

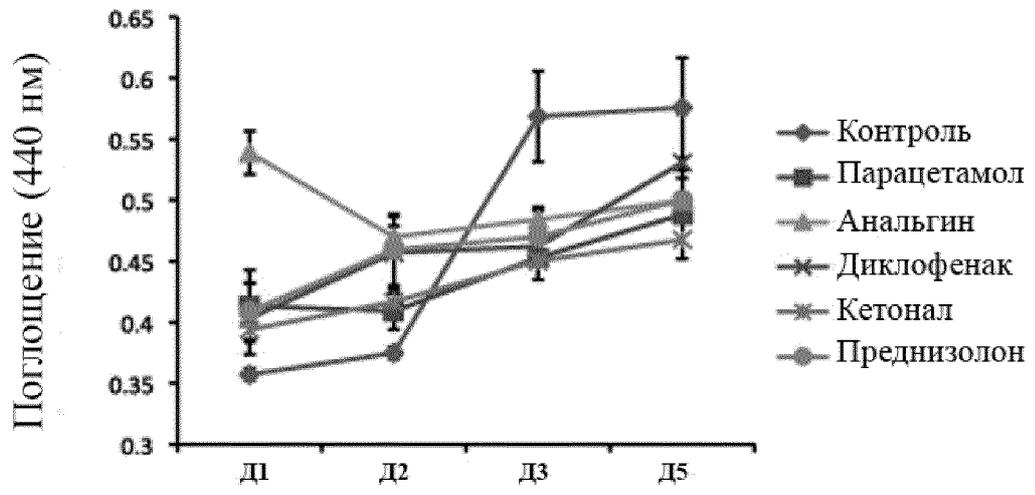
Два сосудистых хирурга, которые не знали об обработке, проанализировали результаты ангиографии. При анализе подсчитывали общее количество всех обнаруживаемых сосудов и количество извитых сосудов (доля всех сосудов) для оценки общего васкулогенеза и неоартериогенеза соответственно. Из ангиографических изображений хорошо видно, что у животных, обработанных MSC и MSCD, наблюдали эффективный неоартериогенез и неоангиогенез на оперированной конечности.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

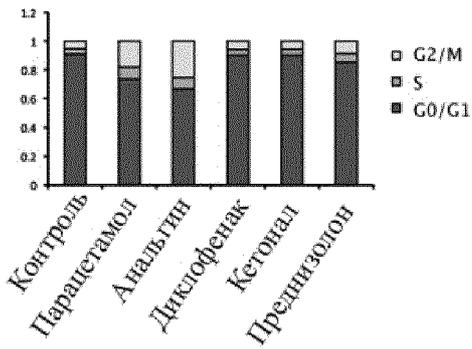
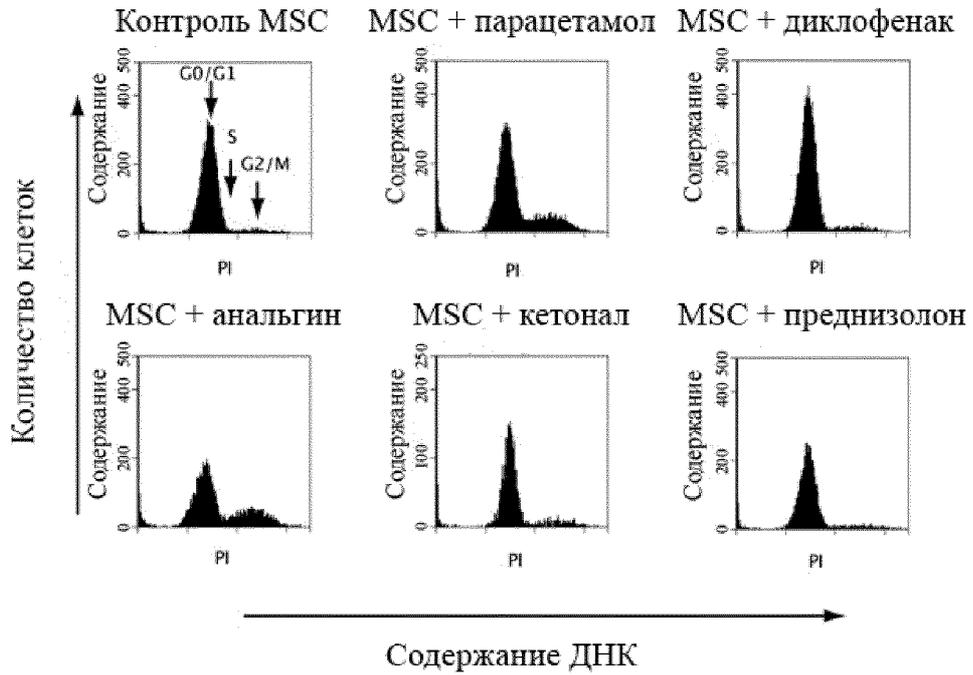
1. Мезенхимальные стволовые клетки, обработанные метамизолом.
2. Мезенхимальные стволовые клетки по п. 1 для лечения ишемии конечностей.
3. Продукт, содержащий мезенхимальные стволовые клетки, обработанные метамизолом, для лечения ишемии конечностей пациента.
4. Продукт по п. 3, где продукт вводят в дозе 1 миллион клеток на кг массы тела пациента.
5. Продукт по пп. 3 и 4, где клетки вводят в количестве 0,75-1,5 миллионов на кг массы тела пациента.
6. Продукт по пп. 3-5, где клетки, обработанные метамизолом, находятся в микроконцентрациях.
7. Продукт по пп. 3-6, где пациентом является человек.
8. Способ получения продукта по п. 4, где способ включает следующие стадии:
 - сбор жировой ткани
 - выделение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани
 - размножение MSC
 - воздействие на MSC активным ингредиентом
9. Способ по п. 8, где активный ингредиент представляет собой метамизол.
10. Способ стимуляции секреции ангиогенных факторов роста VEGFA, HGF, bFGF, TEK и снижения уровня провоспалительных цитокинов IL6, CXCL8, CCL2, IL1-RN посредством активации мезенхимальных стволовых клеток (MSC).
11. Способ по п. 10, где мезенхимальные стволовые клетки активируют метамизолом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

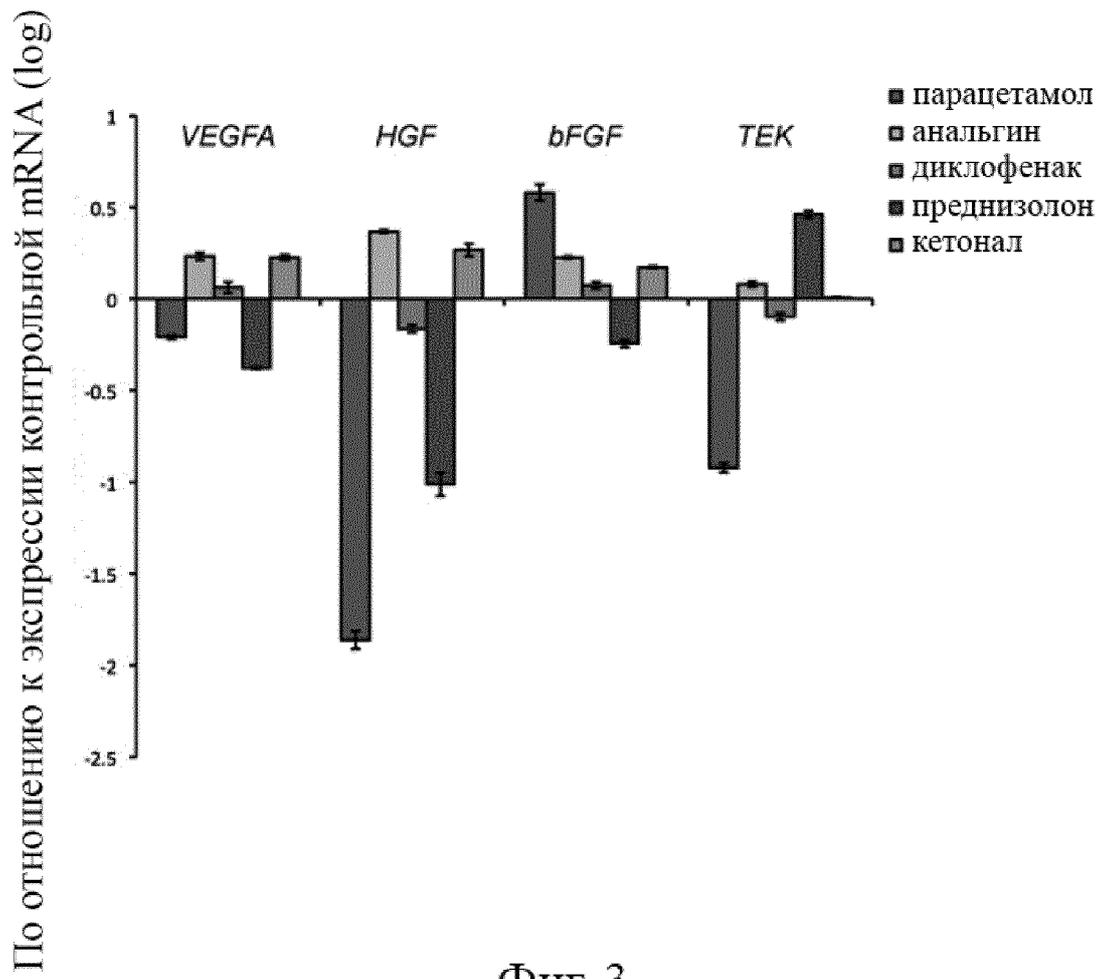
1. Продукт, содержащий мезенхимальные стволовые клетки, обработанные метамизолом, для лечения ишемии конечностей человека.
2. Продукт по п. 1, где продукт вводят в дозе 1 миллион клеток на кг массы тела пациента.
3. Продукт по п. 1, где клетки вводят в количестве 0,75-1,5 миллионов на кг массы тела пациента.
4. Продукт по пп. 2-3, где клетки, обработанные метамизолом, находятся в микроконцентрациях.
5. Способ получения продукта по п. 1, где способ включает следующие стадии:
 - сбор жировой ткани
 - выделение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани
 - размножение MSC
 - воздействие на MSC активным ингредиентом
6. Способ по п. 5, где активный ингредиент представляет собой метамизол.
7. Способ стимуляции секреции ангиогенных факторов роста VEGFA, HGF, bFGF, TEK и снижения уровня провоспалительных цитокинов IL6, CXCL8, CCL2, IL1-RN посредством активации мезенхимальных стволовых клеток (MSC) метамизолом.



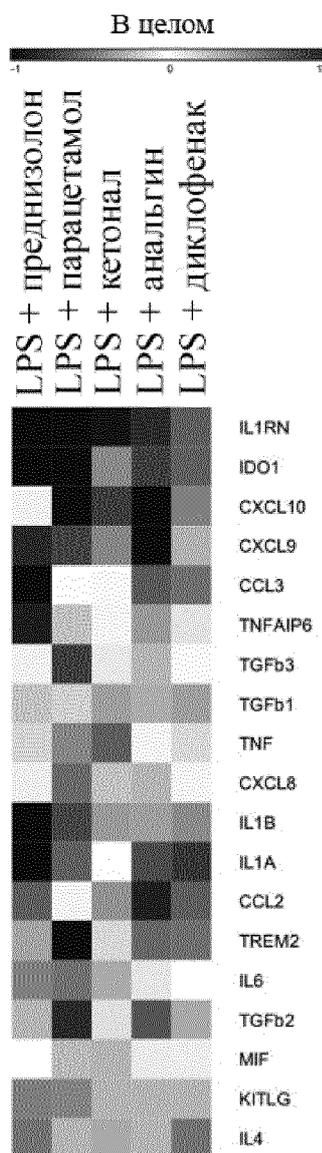
Фиг. 1



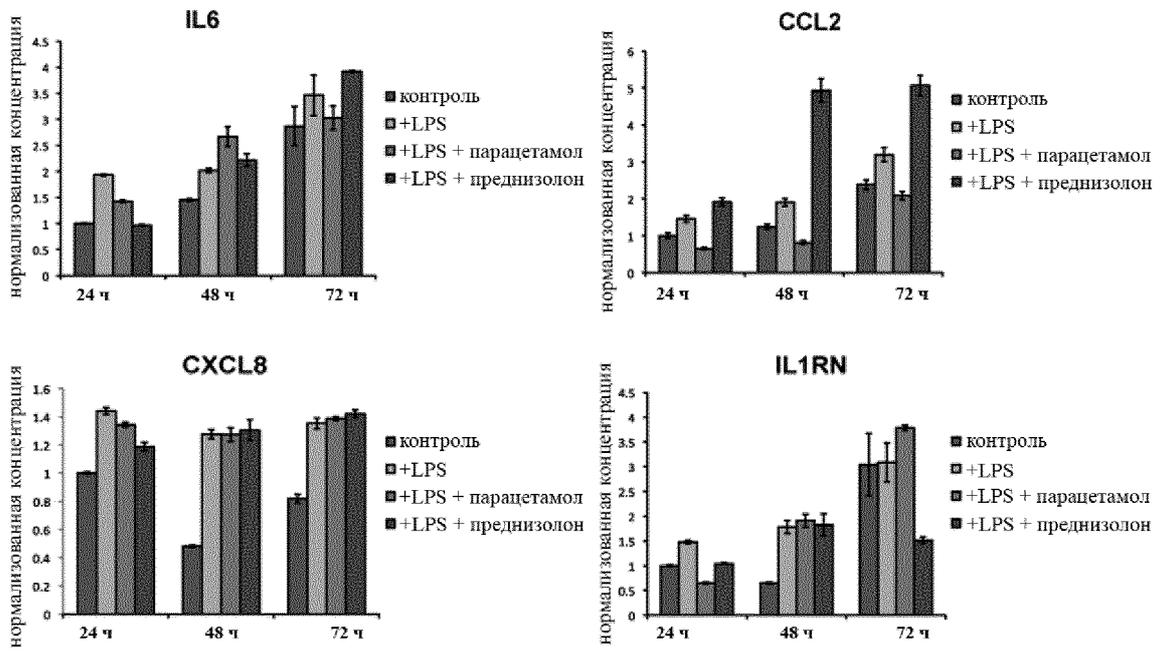
Фиг. 2



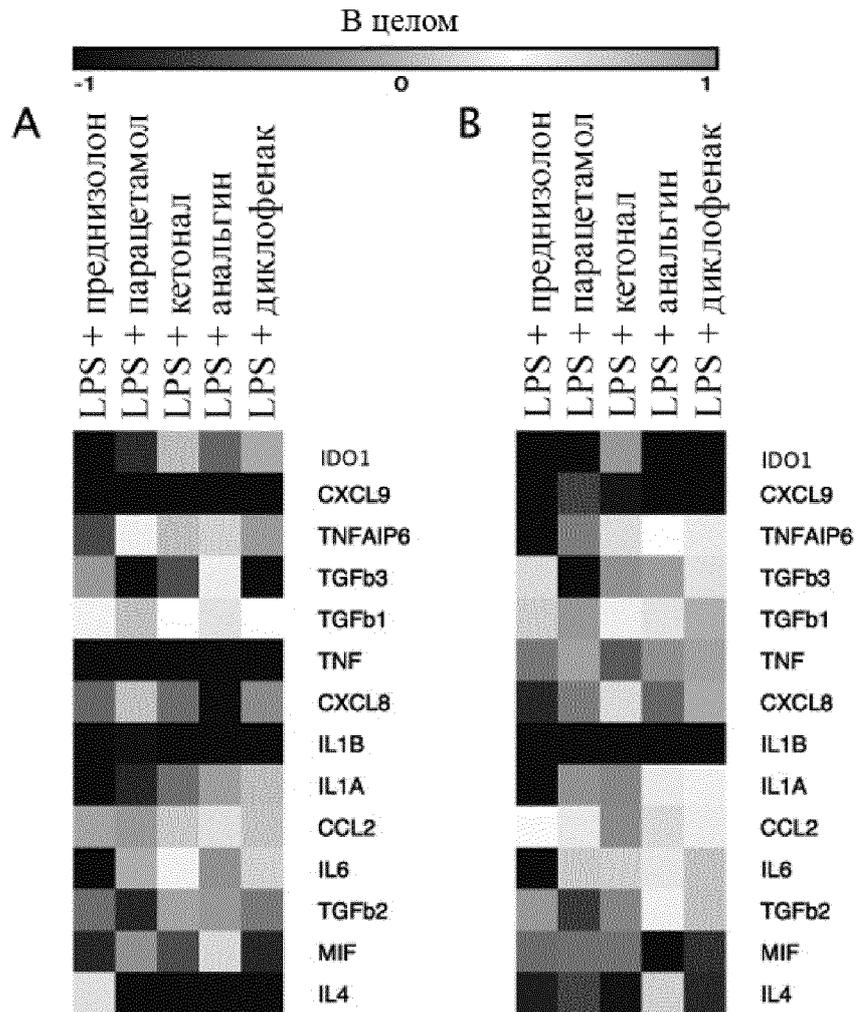
Фиг. 3



Фиг. 4

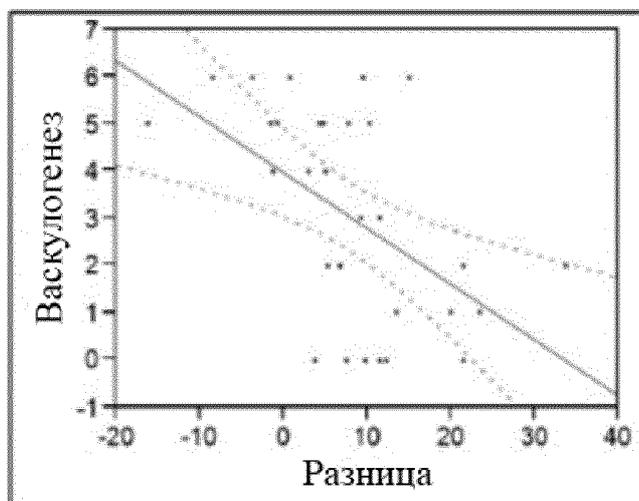


Фиг. 5

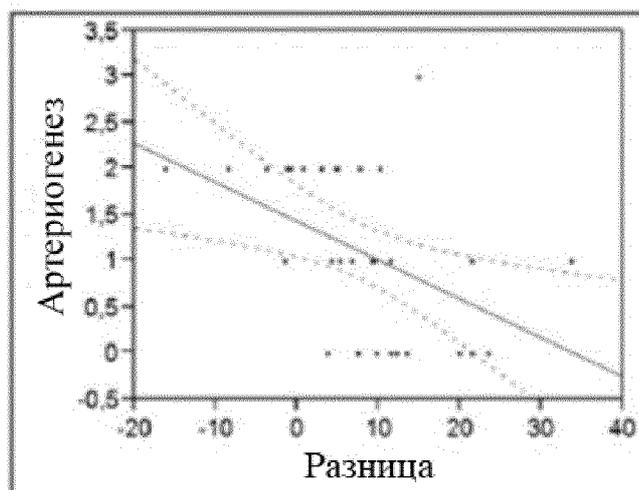


Фиг. 6

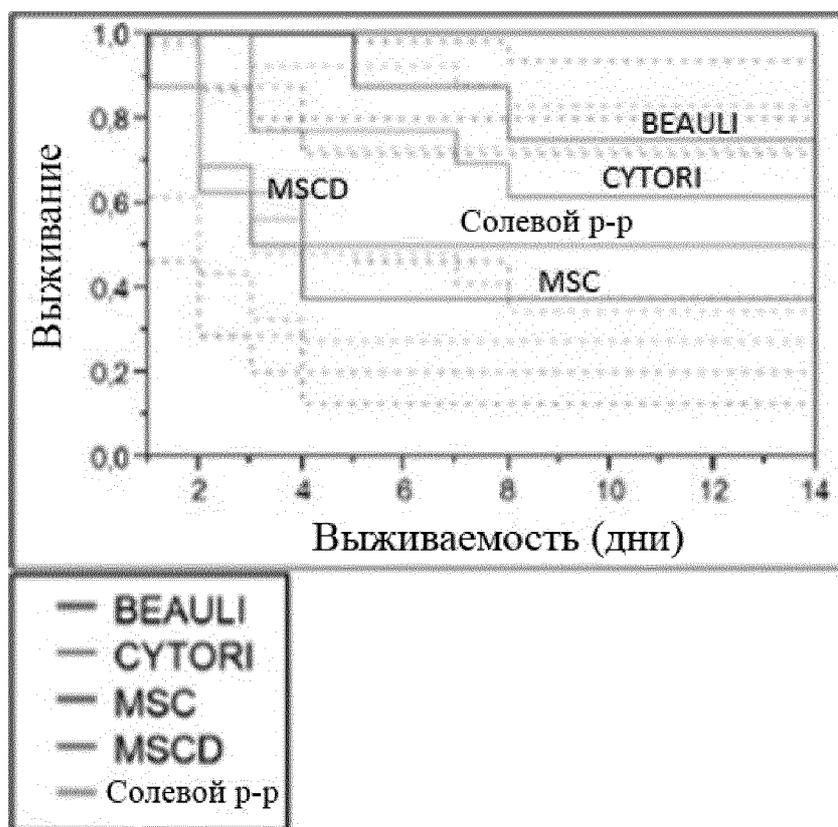
А



В

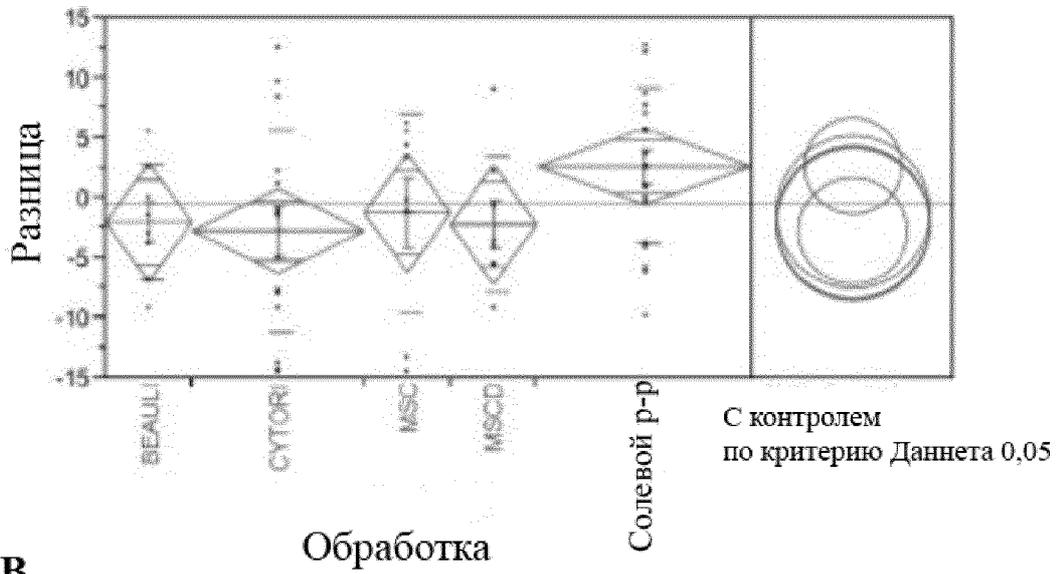


Фиг. 7

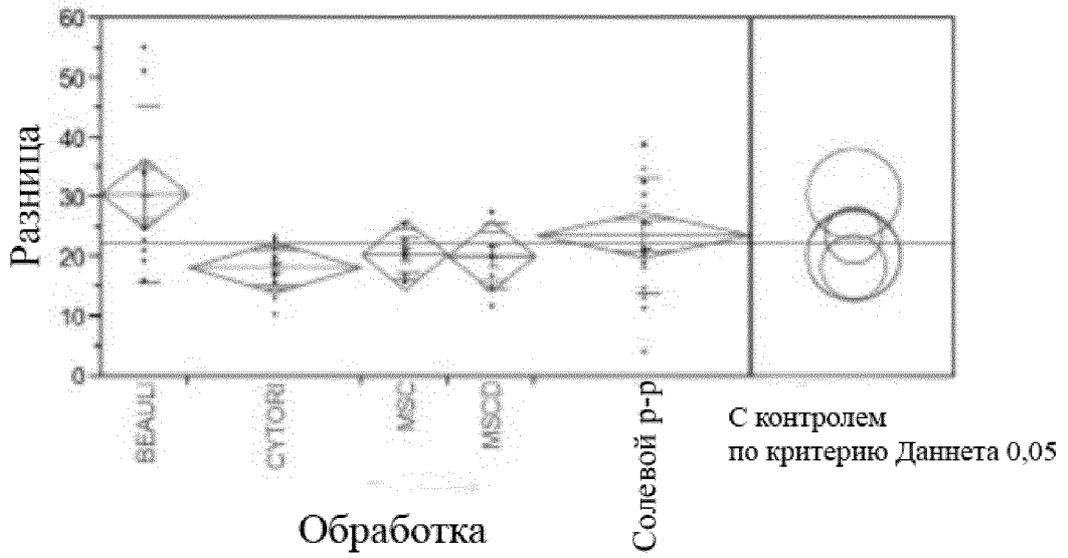


Фиг. 8

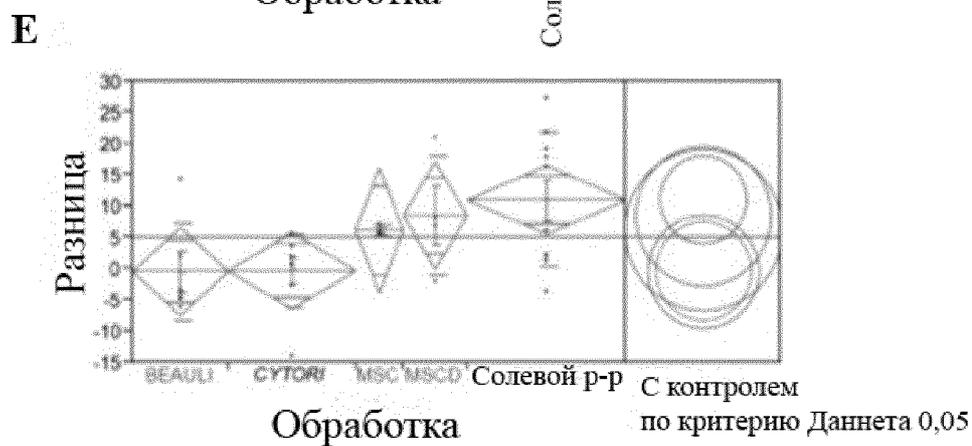
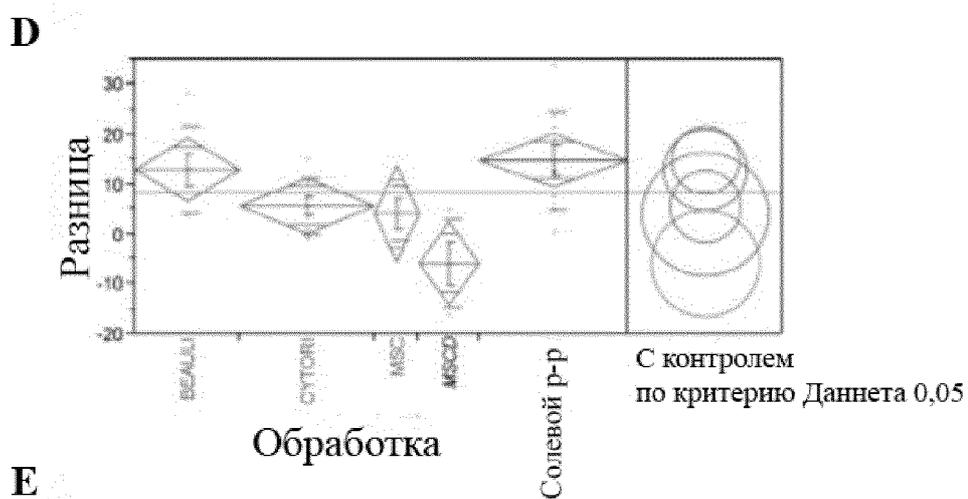
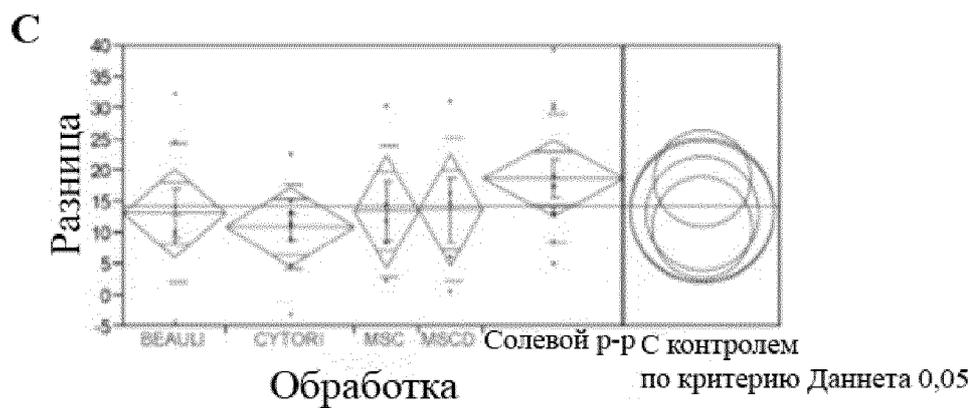
А



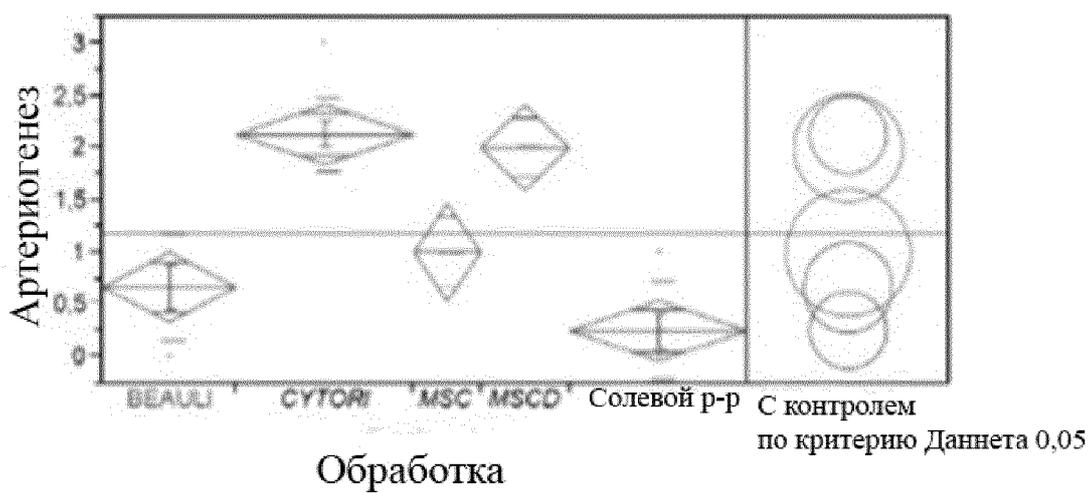
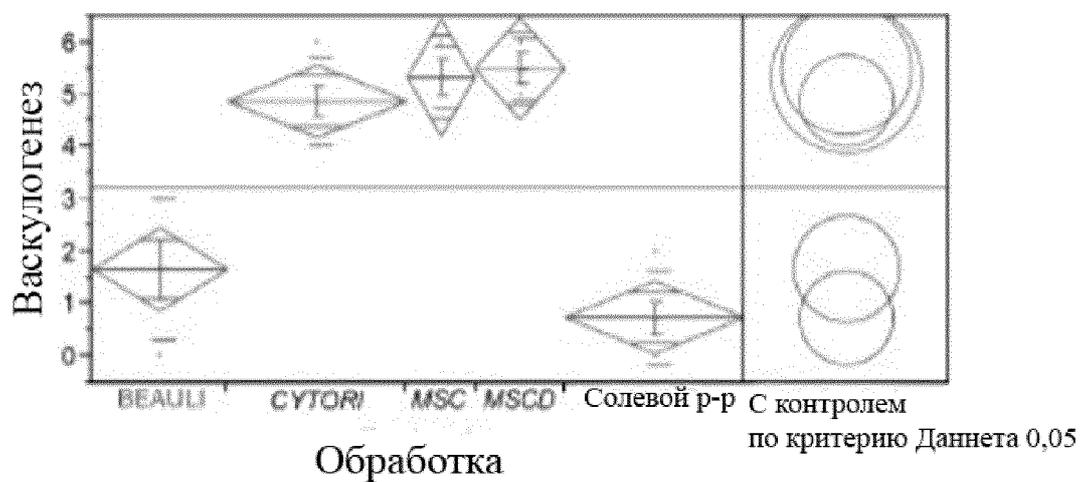
В



Фиг. 9



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12