

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292319** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.22

(22) Дата подачи заявки
2021.02.09

(51) Int. Cl. **A61K 35/34** (2015.01)
C12N 5/073 (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01)
A61K 35/545 (2015.01)
A61P 9/02 (2006.01)
A61P 9/06 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ АРИТМИЙ, СВЯЗАННЫХ С ПРИЖИВЛЕНИЕМ ТРАНСПЛАНТАТА

(31) **62/972,330**

(32) **2020.02.10**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/017220**

(87) **WO 2021/163037 2021.08.19**

(71) Заявитель:
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ ВАШИНГТОН;
ВАНДЕРБИЛТ ЮНИВЕРСИТИ (US)**

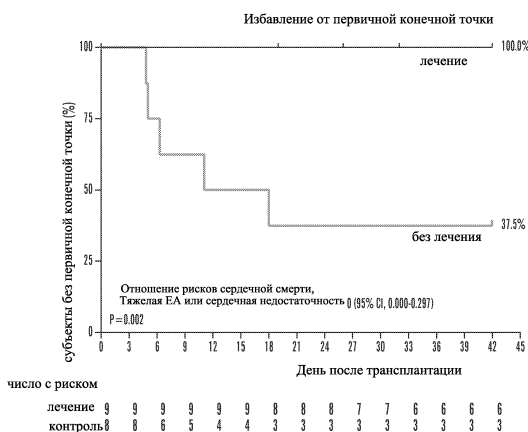
(72) Изобретатель:

**Кноллманн Бйорн, Тайс Роберт Скотт,
Маклеллан Уильям Робб, Накамура
Кента, Мюрри Чарлз И. (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Джермакян Р.В. (RU)**

(57) В изобретении раскрыты способы и композиции, относящиеся к лечению и профилактике аритмии, связанной с приживлением трансплантата, эффективным количеством амиодарона и ивабрадина. Кроме того, в настоящем документе описан способ трансплантации кардиомиоцитов, причем способ предусматривает введение дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов в сердечную ткань субъекта, нуждающегося в этом, и введение субъекту количества амиодарона и количества ивабрадина, эффективного для уменьшения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, у субъекта.



A1

202292319

202292319

A1

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ АРИТМИЙ, СВЯЗАННЫХ С ПРИЖИВЛЕНИЕМ ТРАНСПЛАНТАТА

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственную заявку

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет согласно 35 U.S.C. § 119(e) в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/972330, поданной 10 февраля 2020 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники настоящего изобретения

[0002] Настоящее изобретение относится к способам лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0003] Сердечно-сосудистое заболевание остается основной причиной смерти как мужчин, так и женщин во всем мире и показывает быстрый рост в развивающихся странах. Заместительная терапия кардиомиоцитами является областью активного исследования для лечения сердечно-сосудистых заболеваний и может восстановить функцию сердца после инфаркта миокарда. Стволовые клетки человека, культивируемые *in vitro*, могут служить исходным материалом для получения кардиомиоцитов человека для приживления в поврежденном сердце. Однако существуют осложнения, связанные с приживлением сердечного трансплантата, одним из которых является незрелость дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов, что может привести к развитию транзиторных аритмий сердца. Способ профилактики и лечения аритмий, вызванных сердечным трансплантатом, необходим для улучшения результатов пациентов после заместительной терапии кардиомиоцитами.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0004] Способы, описанные в настоящем документе, частично относятся к открытию, что комбинация лечения амиодароном и ивабрадином улучшает выживаемость и снижает бремя аритмии у субъектов, получающих сердечные трансплантаты. Способы, описанные в настоящем документе, уменьшают транзиторные аритмии, связанные с

трансплантатом, и значительно улучшают безопасность и выживаемость субъектов, получавших лечение обоими антиаритмическими средствами.

[0005] Согласно одному аспекту в настоящем документе описан способ лечения или облегчения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, у субъекта-реципиента сердечного трансплантата кардиомиоцитов, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества амиодарона и эффективного количества ивабрадина.

[0006] Согласно одному варианту осуществления этого или любого другого аспекта сердечный трансплантат кардиомиоцитов содержит дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты. Согласно другому варианту осуществления дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты дифференцированы из индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток или из эмбриональных стволовых (ES) клеток.

[0007] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта сердечный трансплантат кардиомиоцитов получают из стволовых клеток, аутологичных по отношению к субъекту.

[0008] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта сердечный трансплантат кардиомиоцитов получают из стволовых клеток, аллогенных по отношению к субъекту.

[0009] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта амиодарон и ивабрадин вводят одновременно с сердечным трансплантатом кардиомиоцитов.

[0010] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение амиодарона начинают до введения трансплантата кардиомиоцитов. Согласно одному варианту осуществления введение можно проводить, например, за 1 день до, за 2 дня до, за 3 дня до, за 4 дня до, за 5 дней до, за 6 дней до или за 7 дней или более до трансплантации.

[0011] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение ивабрадина начинают до введения трансплантата кардиомиоцитов. Согласно одному варианту осуществления введение можно проводить, например, за 1 день до, за 2 дня до, за 3 дня до, за 4 дня до, за 5 дней до, за 6 дней до или за 7 дней или более до трансплантации.

[0012] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение как амиодарона, так и ивабрадина начинают до введения сердечного трансплантата кардиомиоцитов. Согласно одному варианту осуществления введение можно проводить, например, за 1 день до, за 2 дня до, за 3 дня до, за 4 дня до, за 5 дней до, за 6 дней до или за 7 дней или более до трансплантации. Согласно другому варианту

осуществления амиодарон можно вводить раньше, чем ивабрадин, например, на 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней или 6 дней раньше.

[0013] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение ивабрадина начинают одновременно с введением сердечного трансплантата кардиомиоцитов или после него.

[0014] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение амиодарона начинают одновременно с введением сердечного трансплантата кардиомиоцитов или после него.

[0015] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение амиодарона представляет собой однократное болюсное введение.

[0016] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение представляет собой непрерывное или повторяющееся введение.

[0017] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение представляет собой пероральное введение и/или внутривенную инъекцию.

[0018] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта амиодарон вводят перорально при дозе 100-800 мг три раза в день.

[0019] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта амиодарон вводят посредством IV болюса при дозе 100-300 мг.

[0020] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта амиодарон вводят до концентрации в сыворотке от 1,5 до 2,5 мкг/мл.

[0021] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта ивабрадин вводят перорально при дозе от 5 до 15 мг два раза в день.

[0022] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта ивабрадин вводят при тахикардии.

[0023] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта ивабрадин вводят для поддержания частоты сердечных сокращений в состоянии покоя менее или равной 150 ударов в минуту (bpm). Согласно другому варианту осуществления ивабрадин вводят для поддержания частоты сердечных сокращений в состоянии покоя от 60 до 150 bpm, например, 60-140 bpm, 60-130 bpm, 60-120 bpm, 60-110 bpm, 60-100 bpm, 60-90 bpm или 60-80 bpm.

[0024] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение амиодарона и ивабрадина снижает учащенное сердцебиение после трансплантации, наблюдаемое у реципиента трансплантата, на по меньшей мере 10% по сравнению с субъектом, получающим трансплантат клеток того же типа без введения амиодарона и ивабрадина.

[0025] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение амиодарона и ивабрадина сокращает долю времени, в течение которого субъект страдает аритмией, связанной с приживлением трансплантата, на по меньшей мере 10% по сравнению с субъектом, получающим трансплантат кардиомиоцитов того же типа без введения амиодарона и ивабрадина. Согласно другому варианту осуществления доля времени, в течение которого субъект страдает аритмией, связанной с приживлением трансплантата, сокращается на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более.

[0026] Согласно другому аспекту в настоящем документе описан способ трансплантации кардиомиоцитов, причем способ предусматривает: а) введение дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов в сердечную ткань субъекта, нуждающегося в этом, и b) введение субъекту количества амиодарона и количества ивабрадина, эффективного для уменьшения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, у субъекта.

[0027] Согласно одному варианту осуществления этого или любого другого аспекта аритмия, связанная с приживлением трансплантата, уменьшается у субъекта по сравнению с субъектом, получающим дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты без введения амиодарона и ивабрадина.

[0028] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты дифференцированы *in vitro* из эмбриональных стволовых клеток или из iPS клеток.

[0029] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта iPS клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

[0030] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта iPS клетки являются аллогенными по отношению к субъекту.

[0031] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта амиодарон и ивабрадин вводят одновременно с дифференцированными *in vitro* кардиомиоцитами.

[0032] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение амиодарона начинают до введения дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов.

[0033] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение ивабрадина начинают до введения дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов.

[0034] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение как амиодарона, так и ивабрадина начинают до введения дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов.

[0035] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение ивабрадина начинают одновременно с введением дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов или после него.

[0036] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение амиодарона начинают одновременно с введением дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов или после него.

[0037] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение ивабрадина представляет собой однократное болюсное введение.

[0038] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение представляет собой непрерывное или повторяющееся введение.

[0039] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение амиодарона и ивабрадина является кратковременным.

[0040] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение амиодарона и ивабрадина прекращают после того, как бремя аритмии, связанной с приживлением трансплантата, достигает нуля, без рецидива аритмии.

[0041] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта введение представляет собой пероральное введение и/или внутривенную (IV) инъекцию.

[0042] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта амиодарон вводят перорально при дозе 100-800 мг три раза в день.

[0043] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта амиодарон вводят посредством IV болюса при дозе 100-300 мг.

[0044] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта амиодарон вводят до концентрации в сыворотке от 1,5 до 2,5 мкг/мл.

[0045] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта ивабрадин вводят перорально при дозе от 5 до 15 мг два раза в день.

[0046] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта ивабрадин вводят при тахикардии.

[0047] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта ивабрадин вводят для поддержания частоты сердечных сокращений в состоянии покоя менее или равной 150 ударов в минуту (bpm).

[0048] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта приблизительно от 10 миллионов кардиомиоцитов до приблизительно 10 миллиардов кардиомиоцитов вводят субъекту.

[0049] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта субъектом является человек.

[0050] Согласно другому варианту осуществления этого или любого другого аспекта субъект страдает или имеет риск развития сердечно-сосудистого заболевания или сердечного приступа. Согласно другому варианту осуществления сердечно-сосудистое заболевание или сердечный приступ выбраны из группы, состоящей из атеросклеротической болезни сердца, инфаркта миокарда, кардиомиопатии, аритмии сердца, стеноза клапана, врожденного порока сердца, хронической сердечной недостаточности, регургитации, ишемической болезни, мерцания и полиморфной желудочковой тахикардии.

[0051] Согласно другому аспекту в настоящем документе раскрыта композиция, содержащая дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты, амиодарон и ивабрадин.

Краткое описание чертежей

[0052] На **фиг. 1A-1B** показано, что терапия амиодароном и ивабрадином снижает частоту сердечных сокращений и бремя аритмии у свиней, которым приживили сердечные трансплантаты, по сравнению с свиньями без лечения, которым приживили сердечные трансплантаты. На **фиг. 1A** показана средняя частота сердечных сокращений у свиней, получавших лечение амиодароном/ивабрадином (черные квадраты, амиодарон $\pm$ ивабрадин, $n = 6$), по сравнению со свиньями, не получавшими лечение (белые кружки, без антиаритмических средств, $n = 6$) в течение курса терапии при приживлении трансплантата (дней). На **фиг. 1B** показано среднее время в процентах аритмии, наблюдаемое у свиней, получавших лечение амиодароном/ивабрадином (черные квадраты, амиодарон $\pm$ ивабрадин, $n = 6$), по сравнению со свиньями, не получавшими лечение (белые кружки, без антиаритмических средств, $n = 6$), в течение курса терапии при приживлении трансплантата (дней).

[0053] На **фиг. 2** показан процент сердечной выживаемости у получавших лечение (сплошная черная линия, амиодарон $\pm$ ивабрадин, $n = 6$) и не получавших лечение свиней (пунктирные линии, без антиаритмических средств, $n = 6$) с сердечными трансплантатами.

[0054] На **фиг. 3-14** показана частота сердечных сокращений и % аритмии для каждой отдельной свиньи, которой приживили сердечный трансплантат в присутствии и без лечения амиодароном/ивабрадином. Частота сердечных сокращений, выраженная в

виде ударов в минуту, показана серым цветом на левой вертикальной оси чертежей. Бремя аритмии, представленное как время в процентах при аритмии по сравнению с нормальным синусовым ритмом, обозначено черными кружками на правой вертикальной оси.

[0055] Свиньи, получившие лечение антиаритмическими средствами, показаны на **фиг. 3-8**. Лечение амиодароном показано черной полосой в верхней части каждого графика, а лечение ивабрадином показано полосой в рамке.

[0056] Свиньи, получившие сердечный трансплантат, но не получавшие антиаритмического лечения, показаны на **фиг. 9-14**.

[0057] На **фиг. 15** показан вариант осуществления антиаритмических режимов дозирования для свиней (свинья) и человека. BID: два раза в день; PO: пероральное введение.

[0058] На **фиг. 16** показана блок-схема плана исследования. Фаза 1 состояла всего из девяти субъектов, четыре из которых использовали для изучения естественного течения аритмии, связанной с приживлением трансплантата (EA), а пять использовали для скрининга семи антиаритмических препаратов-кандидатов. Было обнаружено, что амиодарон и ивабрадин обладают перспективными признаками эффекта и подлежат дальнейшему изучению. Фаза 2 включала 19 пациентов: девять пациентов получали лечение амиодароном и ивабрадином, восемь пациентов не получали лечение и два пациента получили инфаркт с имитационной трансплантацией и не получали антиаритмического лечения.

[0059] На **фиг. 17** показана временная шкала исследования испытания лекарственного средства фазы 2 хронического лечения амиодароном и добавочной терапией ивабрадином. Инфаркт миокарда (MI) индуцировали 90-минутной баллонной окклюзией середины левой передней нисходящей артерии за две недели до трансплантации кардиомиоцитов, полученных из эмбриональных стволовых клеток (день 0). Все субъекты получали мультилекарственную иммуносупрессию. Группа лечения получала контроль частоты и ритма с помощью комбинированного перорального амиодарона и дополнительного перорального ивабрадина.

[0060] На **фиг. 18** показаны уровни амиодарона в плазме свиней. Уровни амиодарона измеряли в плазме способом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии. Хронический пероральный прием амиодарона у шести свиней прекращали после достижения электрического созревания и стабилизации аритмии, связанной с приживлением. Концентрации амиодарона в сыворотке определяли еженедельно, в том числе через 3–4 недели после прекращения приема препарата.

[0061] На **фиг. 19** показаны различные морфологии аритмии, связанной с приживлением трансплантата, (ЕА) у одной свиньи. У этой одной свиньи (субъект 12) наблюдали примеры нормального синусового ритма (NSR) и трех морфологий ЕА, напоминающих ускоренный узловой ритм (AJR), желудочковую тахикардию (VT) и ускоренный идиовентрикулярный ритм (AIVR). Необходимо обратить внимание на изменение частоты, электрической оси и продолжительности QRS. Непрерывная запись ритма демонстрирует множественные очаги генерации импульсов трансплантатами hESC-CM, взаимодействующими на различных уровнях проводящей системы хозяина, с вызовом ЕА. В контрольной хирургической группе не было отмечено устойчивых аритмий.

[0062] На **фиг. 20** показаны гистология и расположение трансплантата hESC-CM. Левая панель: гистологические срезы, окрашенные пикросириусом красным для выявления коллагена (инфаркт) и быстрым зеленым для выявления жизнеспособного миокарда. Соседние срезы, помеченные сTnT человека, идентифицируют трансплантированный трансплантат hESC-CM в неокрашенном миокарде свиньи и рубцовой ткани. Срезы, как обработанные, так и не обработанные, получали на 42-й день после трансплантации. Правая панель: трансплантированные трансплантаты hESC-CM были расположены подобным образом между лечением (закрашенный квадрат) и отсутствием лечения (незакрашенный кружок) и были успешно нацелены на инфарктную и перинфарктную области передней стенки.

[0063] На **фиг. 21А-21В** демонстрирует острые эффекты амиодарона и ивабрадина на аритмию, связанную с приживлением трансплантата. Амиодарон был эффективен в качестве внутривенного болюса для восстановления нормального сердечного ритма аритмии, связанной с приживлением трансплантата, до нормальной синусовой или более низкой частоты сердечных сокращений (**фиг. 21А**). При пероральном введении ивабрадин значительно замедлял ЕА, но не приводил к восстановлению нормального сердечного ритма (**фиг. 21В**). Эти данные подтверждают комбинированную антиаритмическую стратегию амиодарона и ивабрадина для контроля ритма и частоты ЕА.

[0064] На **фиг. 22А-22В** показано антиаритмическое лечение амиодароном и ивабрадином аритмии, связанной с приживлением трансплантата, у свиньи. (**Фиг. 22А**) Кривая Каплана-Мейера для отсутствия первичного исхода сердечной смерти, нестабильной ЕА или сердечной недостаточности была значительно улучшена при лечении по сравнению с отсутствием лечения ($p=0,002$). Временные метки на линии лечения указывают на внесердечную смерть из-за условно-патогенной инфекции (19-й и 26-й дни) или запланированной эвтаназии (30-й день). (**Фиг. 22В**) Кривая Каплана-Мейера для общей выживаемости показывает статистически пограничное улучшение при лечении по

сравнению с отсутствием лечения ($p=0,051$). *Смерть от пневмоцистной пневмонии.
 **Смерть от свиного цитомегаловируса. Сокращения: CI, 95% доверительный интервал.

[0065] На **фиг. 23A-23F** демонстрирует влияние антиаритмического лечения на частоту сердечных сокращений и бремя аритмии. Объединенная среднесуточная частота сердечных сокращений (**фиг. 23A**) и объединенное среднесуточное бремя аритмии (**фиг. 23B**) при лечении (черный цвет) по сравнению с отсутствием лечения (серый цвет). На 30-й день после трансплантации не наблюдали существенной разницы в частоте сердечных сокращений или бремени аритмии между лечением и отсутствием лечения. Ложная трансплантация (светло-серый) не вызывала тахикардии или аритмии. Средняя среднесуточная частота сердечных сокращений на уровне субъекта (**фиг. 23C**) и бремя аритмии (**фиг. 23D**) для антиаритмического лечения (черный), без лечения (светло-серый) и ложной трансплантации (серый). Неожиданная смерть или эвтаназия обозначены черным символом. Пиковая частота сердечных сокращений (**фиг. 23E**) и пиковое бремя аритмии (**фиг. 23F**) были значительно снижены при лечении (черный цвет) по сравнению с отсутствием лечения (светло-серый). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

[0066] На **фиг. 24A-24B** показано, что трансплантированный трансплантат hESC-СМ взаимодействует с диффузной проводящей системой Пуркинье в миокарде свиньи. Волокна Пуркинье распределены в виде сетчатой сети по всему нативному миокарду свиньи (**фиг. 24A**). Субэндокардиальный и интрамиокардиальный коннексин 40 (Cx40) + волокна Пуркинье (PF, белые) в поперечном срезе свободной стенки левого желудочка, шкала 2 мм. Интрамиокардиальные PF показаны с большим увеличением. Дальнейшее увеличенное изображение областей, обведенных белым прямоугольником, показывает, что Cx40 локализуется в щелевых контактах клеток Пуркинье, которые демонстрируют более низкое содержание саркомера (F-актин) (i.) и отсутствие Т-трубочек (WGA) (ii.), в отличие от окружающих кардиомиоцитов, масштабная линейка 20 мкм. Трансплантат hPSC-кардиомиоцитов, помеченный специфичным для человека медленным скелетным тропонином I сердца (ssTnI), взаимодействует с Cx40+ (белыми) PF (**фиг. 24B**). При большом увеличении области, заключенные в рамки, показывают пример трансплантата Пуркинье-переходных клеток (i., белая стрелка) и прямых взаимодействий Пуркинье-трансплантат (ii., белая стрелка), масштабная линейка 500 мкм (вверху) или 50 мкм (снизу).

[0067] На **фиг. 25** показано, что коннексин 40 специфически окрашивает волокна Пуркинье. Коннексин 40 (Cx40) маркирует волокна Пуркинье (PF) и локализуется в щелевых контактах PF, которые демонстрируют более низкое содержание саркомера (F-актин) и отсутствие Т-трубочек (WGA), в отличие от окружающих кардиомиоцитов, масштабная линейка 20 мкм.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0068] Одна из основных проблем заместительной терапии сердечными клетками для лечения сердечно-сосудистых заболеваний состоит в том, что кардиомиоциты, полученные из стволовых клеток человека (кардиомиоциты ES и iPS), не обладают функциональной зрелостью для полной интеграции с нативной тканью сердца. В результате аритмии, связанные с приживлением трансплантата, появляются вскоре после трансплантации дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов, в течение этого времени реципиент подвергается риску внезапной сердечной смерти и сердечной недостаточности. Через несколько недель у субъектов, перенесших процедуру трансплантации, наблюдается возвращение к нормальному синусовому ритму, что отражает созревание *in vivo* трансплантированных кардиомиоцитов. Для того, чтобы избежать аритмогенности и улучшить выживаемость после приживления сердечного трансплантата необходима достаточная электрическая интеграция с миокардом хозяина.

[0069] Способы, описанные в настоящем документе, частично относятся к открытию, что комбинация лечения амиодароном и ивабрадином улучшает выживаемость и снижает бремя аритмии у субъектов, получающих сердечные трансплантаты. Способы, описанные в настоящем документе, уменьшают транзиторные аритмии, связанные с трансплантатом, и значительно улучшают безопасность и выживаемость субъектов, получавших лечение обоими антиаритмическими средствами.

Определения

[0070] Для удобства ниже приведены значения некоторых терминов и фраз, используемых в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Если не указано иное или иное не следует из контекста, следующие термины и фразы включают значения, указанные ниже. Определения приведены для помощи в описании конкретных вариантов осуществления и не предназначены для ограничения настоящего изобретения, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение. Если существует явное несоответствие между использованием термина в данной области техники и его определением, приведенным в настоящем документе, определение, приведенное в описании, имеет преимущественную силу.

[0071] Определения общих терминов в области клеточной и молекулярной биологии и биохимии можно найти в The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); Robert S. Porter *et*

al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908); and Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006; Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305); Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 1936113414); Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005; and Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737), содержание которых в каждом случае включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0072] В контексте настоящего изобретения «лечение» сердечного нарушения, сердечного заболевания, события или повреждения сердца (например, инфаркта миокарда), относится к терапевтическому вмешательству, которое улучшает сердечную функцию, уменьшает аритмию, связанную с приживлением трансплантата, и/или усиливает приживление кардиомиоцитов, и/или усиливает трансплантацию кардиомиоцитов, или васкуляризацию трансплантата в обрабатываемой области, тем самым улучшая функцию, например, сердца. То есть «лечение» сердца направлено на функцию сердца (например, усиление функции в области инфаркта) и/или другой области, на которую воздействуют композициями, описанными в настоящем документе. Терапевтический подход, который улучшает функцию сердца, например, по оценке путем измерения снижения частоты сердечных сокращений и/или частоты аритмий по меньшей мере на 10%, предпочтительно снижения по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90%, 100% или более, например, в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз или более, вплоть до и включая полную функцию, относительно соответствующего контроля, рассматривается как эффективное лечение. Для того, чтобы рассматриваться в качестве эффективного лечения, эффективное лечение не обязательно должно излечивать или непосредственно воздействовать на основную причину заболевания или нарушения сердца.

[0073] В контексте настоящего изобретения термин «кратковременное» применительно к лечению амиодароном и ивабрадином аритмии, связанной с приживлением трансплантата, означает лечение только до тех пор, пока аритмия, связанная с приживлением трансплантата, продолжает возникать. В настоящем документе показано, что лечение этой комбинацией лекарственных средств снижает бремя аритмии, связанной с приживлением трансплантата, и может быть безопасно прекращено после исключения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, без рецидива аритмии. Таким образом, хотя точные сроки, вероятно, будут различаться для разных субъектов, согласно некоторым вариантам осуществления кратковременное лечение будет составлять порядка от недель (например, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель или менее) до месяцев (например, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца или менее) после трансплантации.

[0074] В контексте настоящего изобретения термин «профилактика» или «предотвращение», когда он используется в отношении заболевания, нарушения или его симптомов, относится к снижению вероятности того, что у индивидуума разовьется заболевание или нарушение, например, сердечная недостаточность после инфаркта миокарда в качестве одного примера. Вероятность развития заболевания или нарушения снижается, например, когда у человека, имеющего один или несколько факторов риска заболевания или нарушения, заболевание либо не развивается, либо такое заболевание или нарушение развивается в более позднее время или с меньшей степенью тяжести на основе статистических данных по сравнению с популяцией, имеющей те же факторы риска и не получающей лечение, как описано в настоящем документе. Отсутствие развития симптомов заболевания или развитие сниженных (например, на по меньшей мере 10% по клинически принятой шкале для данного заболевания или нарушения) или отсроченных (например, на дни, недели, месяцы или годы) симптомов рассматривается как эффективная профилактика.

[0075] Термины «пациент», «субъект» и «индивидуум» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к животному, в частности к человеку, которому проводят лечение, включая профилактическое лечение. В контексте настоящего изобретения термин «субъект» относится к человеку и животным, отличным от человека. Термины «животные, отличные от человека» и «млекопитающие, отличные от человека», используются в настоящем документе взаимозаменяемо и включают всех позвоночных, например, млекопитающих, таких как приматы, отличные от человека (особенно высшие приматы), овца, собака, грызуны (например, мыши или крысы), морская свинка, коза, свинья, кошка, кролики, коровы, и немлекопитающих, таких как куры, амфибии, рептилии и т.д. Согласно одному варианту осуществления любого из аспектов субъектом является

человек. Согласно другому варианту осуществления любого из аспектов субъект представляет собой экспериментальное животное или животное-заменитель в качестве модели заболевания. Согласно другому варианту осуществления любого из аспектов субъект представляет собой домашнее животное, включая животных-компаньонов (например, собаки, кошки, крысы, свиньи, морские свинки, хомяки и т.д.). Субъект может ранее получать лечение сердечно-сосудистого заболевания или сердечного приступа или никогда не получать лечение сердечно-сосудистого заболевания или сердечного приступа. У субъекта может быть ранее диагностировано сердечно-сосудистое заболевание или у него никогда не диагностировалось сердечно-сосудистое заболевание.

[0076] В контексте настоящего изобретения термин «человеческая стволовая клетка» относится к человеческой клетке, которая может самообновляться и дифференцировать по меньшей мере в один тип клеток. Термин «человеческая стволовая клетка» охватывает линии стволовых клеток человека, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (iPS), эмбриональные стволовые клетки человека, плюрипотентные клетки человека, мультипотентные стволовые клетки человека, амниотические стволовые клетки, плацентарные стволовые клетки или взрослые стволовые клетки.

[0077] В контексте настоящего изобретения термин «дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты» относится к кардиомиоцитам, которые генерируются в культуре, как правило, путем поэтапной дифференцировки из клетки-предшественника, такой как эмбриональная стволовая клетка человека, индуцированная плюрипотентная стволовая клетка, клетка ранней мезодермы, клетка мезодермы латеральной пластинки или сердечная клетка-предшественник.

[0078] В контексте настоящего изобретения термин «антиаритмическое» или «антиаритмическое средство» относится к любому средству (например, низкомолекулярному или фармацевтической композиции), которое снижает возникновение, частоту и/или тяжесть аритмии сердца. Антиаритмические средства можно применять для лечения нерегулярного сердечного ритма, для снижения частоты сердечных сокращений при тахикардии, увеличения частоты сердечных сокращений при брадикардии, или они иным образом способствуют нормальному синусовому ритму и предотвращают внезапную сердечную смерть.

[0079] Термин «происходит из», используемый в отношении стволовой клетки, означает, что стволовая клетка была получена путем перепрограммирования дифференцированной клетки в фенотип стволовой клетки. Термин «происходит из», используемый в отношении дифференцированной клетки, означает, что клетка является

результатом дифференцировки, например, дифференцировки *in vitro* стволовой клетки. В контексте настоящего изобретения «iPSC-СМ» или «кардиомиоциты, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток» используются взаимозаменяемо для обозначения кардиомиоцитов, происходящих из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

[0080] Фразу «фармацевтически приемлемый» используют в настоящем документе для обозначения тех агентов, соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск.

[0081] Термины «уменьшение», «уменьшенный», «снижение» или «ингибирование» используют в настоящем документе для обозначения снижения или уменьшения свойства, уровня или другого параметра на статистически значимую величину. Согласно некоторым вариантам осуществления «уменьшение», «уменьшенный», «снижение» или «ингибирование» в общем означают снижение по меньшей мере на 10% по сравнению с контрольным уровнем (например, отсутствие данного лечения) и могут включать, например, снижение на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или более. В контексте настоящего изобретения «снижение» или «ингибирование» не включает полное ингибирование или снижение по сравнению с контрольным уровнем. «Полное ингибирование» представляет собой 100% ингибирование по сравнению с контрольным уровнем. Снижение предпочтительно может быть до уровня, принятого в пределах диапазона нормы для индивидуума без данного нарушения.

[0082] В контексте настоящего изобретения термины «увеличенный», «увеличение», «увеличивает», или «усиление», или «активация» в общем означают увеличение свойства, уровня или другого параметра на статистически значимую величину,

во избежание каких-либо сомнений термины «увеличенный», «увеличение», «увеличивает», или «усиление», или «активация» означают увеличение на по меньшей мере по меньшей мере 10% по сравнению с контрольным уровнем, например, увеличение на по меньшей мере приблизительно 20%, или по меньшей мере приблизительно 30%, или по меньшей мере приблизительно 40%, или по меньшей мере приблизительно 50%, или по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 90% или вплоть до и включая 100% увеличение или любое увеличение между 10-100% по сравнению с контрольным уровнем, или увеличение по меньшей мере приблизительно в 2 раза, или увеличение по меньшей мере приблизительно в 3 раза, или увеличение по меньшей мере приблизительно в 4 раза, или увеличение по меньшей мере приблизительно в 5 раз, или увеличение по меньшей мере приблизительно в 10 раз, увеличение по меньшей мере приблизительно в 20 раз, увеличение по меньшей мере приблизительно в 50 раз, увеличение по меньшей мере приблизительно в 100 раз, увеличение по меньшей мере приблизительно в 1000 раз или более по сравнению с контрольным уровнем.

[0083] В контексте настоящего изобретения «контрольный уровень» относится к уровню маркера или параметра в нормальной, в остальном незатронутой клеточной популяции или ткани (например, клетках, тканях или биологическом образце, полученном у здорового субъекта, или биологическом образце, полученном у субъекта в предшествующий момент времени, например, клетка, ткань или биологический образец, полученный у пациента до того, как ему был поставлен диагноз заболевания, или биологический образец, который не контактировал со средством или композицией, раскрытыми в настоящем документе).

[0084] В контексте настоящего изобретения термин «соответствующий контроль» относится к необработанной, в остальном идентичной клетке, субъекту, организму или популяции (например, клетке, ткани или биологическому образцу, которые не подвергались контакту со средством или композицией, описанными в настоящем документе) по сравнению с клеткой, тканью, биологическим образцом или популяцией, подвергнутыми контакту или обработанными данным лечением. Например, подходящим контролем может быть субъект или ткань, которые не были подвергнуты введению амиодарона и ивабрадина.

[0085] Термин «статистически значимый» или «значительно» относится к статистической значимости и в общем означает разницу в два стандартных отклонения (2SD) или более.

[0086] В контексте настоящего изобретения термин «содержащий» означает, что в дополнение к определенным представленным элементам также могут присутствовать

другие элементы. Использование слова «содержащий» указывает на включение, а не на ограничение.

[0087] Термин «состоящий из» относится к композициям, способам и их соответствующим компонентам, как описано в настоящем документе, которые исключают любой элемент, не упомянутый в этом описании варианта осуществления.

[0088] В контексте настоящего изобретения термин «состоящий по существу из» относится к тем элементам, которые необходимы для данного варианта осуществления. Термин допускает присутствие дополнительных элементов, которые существенно не влияют на основные и новые или функциональные характеристики этого варианта осуществления изобретения.

[0089] Форма единственного числа включает форму множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Точно так же слово «или» включает «и», если из контекста явно не следует иное. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Слово «например» происходит от латинского слова «*example gratia*» и используется в настоящем документе для обозначения неограничивающего примера. Таким образом, слово «например» является синонимом термина «для примера».

[0090] Кроме того, если иное не требуется контекстом, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число.

[0091] За исключением рабочих примеров или там, где указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакции, используемые в настоящем документе, следует понимать, как измененные во всех случаях термином «приблизительно». Термин «приблизительно» при использовании в связи с процентами может означать $\pm 1\%$.

Сердечно-сосудистые заболевания

[0092] Сердечно-сосудистое заболевание представляет собой заболевание, которое поражает сердце и/или систему кровообращения субъекта. Неограничивающие примеры сердечных заболеваний включают атеросклеротическую болезнь сердца, кардиомиопатию, аритмии сердца, врожденный порок сердца, инфаркт миокарда, сердечную недостаточность, сердечную гипертрофию, стеноз клапана, регургитацию, ишемическую болезнь, мерцание и полиморфную желудочковую тахикардию. Симптомы сердечно-сосудистых заболеваний могут включать без ограничения обморок, утомляемость, одышку,

боль в груди и сердцебиение. Сердечно-сосудистое заболевание обычно диагностируют с помощью медицинского осмотра, анализов крови и/или электрокардиограммы (ЭКГ). Аномальная ЭКГ является признаком того, что у субъекта аномальный сердечный ритм или сердечная аритмия. Способы диагностики аритмий известны в данной области техники.

[0093] Термин «сердечное событие» относится к случаю повреждения миокарда, инфаркта миокарда, мерцания желудочков, стеноза, аритмии и т.п.

[0094] Электрофизиологическая и сократительная функция сердца является строго контролируемым процессом. Когда регуляция ионных каналов или сократительная функция в сердечной клетке или ткани нарушены, это может привести к аритмиям сердца, которые иногда могут быть смертельными. Сердечно-сосудистые заболевания остаются ведущей причиной смерти во всем мире.

[0095] Кардиомиоциты, полученные из стволовых клеток человека, стали перспективным средством лечения сердечно-сосудистых заболеваний и повреждений сердца в результате инфаркта миокарда. Однако функциональная зрелость дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов в существующих моделях обычно отсутствует, и эти кардиомиоциты могут вызывать аритмии после приживления трансплантата.

[0096] Согласно одному аспекту в настоящем документе описан способ лечения сердечно-сосудистого заболевания. Согласно другому аспекту в настоящем документе описан способ лечения или облегчения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, у субъекта-реципиента сердечного трансплантата кардиомиоцитов, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества амиодарона и эффективного количества ивабрадина.

[0097] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов субъект страдает или имеет риск развития сердечно-сосудистого заболевания или сердечного приступа.

[0098] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов субъект, страдающий сердечно-сосудистым заболеванием, нуждается в сердечном трансплантате или получил его. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта имеется или диагностирована аритмия, связанная с приживлением трансплантата. Согласно некоторым аспектам в настоящем документе описан способ профилактики или снижения аритмии, связанной с приживлением трансплантата.

[0099] Аритмия, связанная с приживлением трансплантата, представляет собой новый и аберрантный сердечный ритм, который возникает после введения трансплантата сердечных клеток или кардиомиоцитов. Аритмии, связанные с приживлением

трансплантата, наблюдаются после трансплантации сердечного трансплантата и, как правило, временно сохраняются в течение нескольких дней или недель. Аритмия, связанная с приживлением трансплантата, может вызвать внезапную сердечную смерть и сердечную недостаточность у субъекта.

[00100] Способы лечения сердечно-сосудистых заболеваний и аритмий известны в данной области техники. Один классический пример терапевтических средств, используемых при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, особенно аритмий, включает антиаритмические средства.

Кардиомиоциты для сердечного приживления

[00101] Сердечный трансплантат вводит кардиомиоциты в место сердечного повреждения в сердце. Квалифицированный врач может определить место повреждения способами, известными в данной области техники. Первичной целью приживления сердечного трансплантата является обеспечение электрической и механической стабильности поврежденного миокарда, что не может быть достигнуто только с помощью медикаментозного лечения.

[00102] Далее описаны различные источники и стволовые клетки, которые можно использовать для получения кардиомиоцитов для приживления у субъекта.

[00103] Стволовые клетки представляют собой клетки, которые сохраняют способность самообновляться посредством митотического деления клеток и могут дифференцироваться в более специализированные типы клеток. Три широких типа стволовых клеток млекопитающих включают эмбриональные стволовые (ES) клетки, обнаруживаемые в бластоцистах, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), перепрограммированные из соматических клеток, и взрослые стволовые клетки, обнаруживаемые во взрослых тканях. Другие источники плюрипотентных стволовых клеток могут включать стволовые клетки амниотического или плацентарного происхождения. Плюрипотентные стволовые клетки могут дифференцировать в клетки любого из трех зародышевых пластов.

[00104] Кардиомиоциты, применимые в композициях и способах, описанных в настоящем документе, могут быть дифференцированы как из эмбриональных стволовых клеток, так и из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, среди прочего. Согласно одному варианту осуществления в композициях и способах, представленных в настоящем документе, используют кардиомиоциты человека, дифференцированные из эмбриональных стволовых клеток. В качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам осуществления композиции и способы, представленные в настоящем документе,

не охватывают получение или использование кардиогенных клеток человека, полученных из клеток, взятых из жизнеспособного эмбриона человека.

[00105] *Эмбриональные стволовые клетки*: Эмбриональные стволовые клетки и способы их получения хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Trounson A O *Reprod Fertil Dev* (2001) 13: 523, Roach M L *Methods Mol Biol* (2002) 185: 1, and Smith A G *Annu Rev Cell Dev Biol* (2001) 17:435. Термин «эмбриональная стволовая клетка» используют для обозначения плюрипотентных стволовых клеток внутренней клеточной массы эмбриональной бластоцисты (см., например, патенты США № 5843780, 6200806). Подобным образом такие клетки могут быть получены из внутренней клеточной массы бластоцист, полученных в результате переноса ядра соматических клеток (см., например, патенты США № 5945577, 5994619, 6235970).

[00106] Клетки, полученные из эмбриональных источников, могут включать эмбриональные стволовые клетки или линии стволовых клеток, полученные из банка стволовых клеток или другого признанного депозитного учреждения. Другие способы получения линий стволовых клеток включают способы, предусматривающие применение бластомерной клетки эмбриона на ранней стадии до образования бластоцисты (приблизительно на стадии 8 клеток). Такие способы соответствуют методу преимплантационной генетической диагностики, обычно практикуемому в клиниках вспомогательной репродукции. Одиночную бластомерную клетку культивируют совместно с установленными линиями ES-клеток, а затем отделяют от них с образованием полностью компетентных линий ES-клеток.

[00107] Недифференцированные эмбриональные стволовые (ES) клетки легко распознаются специалистами в данной области техники, и обычно они проявляются в двух измерениях при микроскопии в виде колоний клеток с высокими соотношениями ядро/цитоплазма и заметными ядрами. Согласно некоторым вариантам осуществления кардиомиоциты человека, описанные в настоящем документе, не происходят из эмбриональных стволовых клеток или каких-либо других клеток эмбрионального происхождения.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC)

[00108] Согласно некоторым вариантам осуществления в композициях и способах, описанных в настоящем документе, применяют кардиомиоциты, дифференцированные *in vitro* из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Преимущество применения iPSC для получения кардиомиоцитов для композиций, описанных в настоящем документе, состоит в том, что при желании клетки могут быть получены у того же субъекта, которому

должны быть введены желаемые кардиомиоциты человека. То есть соматическая клетка может быть получена у субъекта, перепрограммирована в индуцированную плюрипотентную стволовую клетку, а затем повторно дифференцирована в кардиомиоцит человека для введения субъекту (например, аутологичные клетки). Поскольку кардиомиоциты (или их дифференцированное потомство) в основном происходят из аутологичного источника, риск отторжения трансплантата или аллергических реакций снижается по сравнению с использованием клеток другого субъекта или группы субъектов. Хотя это является преимуществом iPS-клеток, согласно альтернативным вариантам осуществления кардиомиоциты, полезные для способов и композиций, описанных в настоящем документе, получены из неаутологичных источников (например, аллогенных). Кроме того, использование iPSC исключает потребность в клетках, полученных из эмбрионального источника. Таким образом, согласно одному варианту осуществления клетки, используемые для получения кардиомиоцитов для применения в способах и композициях, описанных в настоящем документе, не являются эмбриональными стволовыми клетками.

[00109] Хотя дифференцировка обычно необратима в физиологических условиях, в последние годы было разработано несколько способов перепрограммирования соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Иллюстративные способы известны специалистам в данной области техники и кратко описаны ниже.

[00110] Перепрограммирование представляет собой процесс, который изменяет или обращает вспять состояние дифференцировки дифференцированной клетки (например, соматической клетки). Другими словами, перепрограммирование представляет собой процесс обратного направления дифференцировки клетки к более недифференцированному или более примитивному типу клеток. Необходимо отметить, что помещение большого количества первичных клеток в культуру может привести к некоторой потере полностью дифференцированных характеристик. Однако простое культивирование таких клеток, включенных в термин дифференцированные клетки, не делает эти клетки недифференцированными клетками (например, недифференцированными клетками) или плюрипотентными клетками. Переход дифференцированной клетки к плюрипотентности требует перепрограммирования стимула от стимулов, которые приводят к частичной утрате дифференцированного признака при помещении дифференцированных клеток в культуру. Перепрограммированные клетки также обладают способностью к длительному пассированию без потери потенциала роста по сравнению с первичными родительскими клетками, которые обычно обладают способностью к ограниченному числу делений в

культуре.

[00111] Клетка, подлежащая перепрограммированию, может быть либо частично, либо окончательно дифференцирована перед перепрограммированием. Таким образом, клетками могут быть терминально дифференцированные соматические клетки, а также взрослые стволовые клетки или соматические стволовые клетки.

[00112] Согласно некоторым вариантам осуществления перепрограммирование охватывает полный возврат состояния дифференцировки дифференцированной клетки (например, соматической клетки) к плюрипотентному состоянию или мультипотентному состоянию. Согласно некоторым вариантам осуществления перепрограммирование охватывает полный или частичный возврат состояния дифференцировки дифференцированной клетки (например, соматической клетки) в недифференцированную клетку (например, клетку, подобную эмбриональной). Перепрограммирование может привести к экспрессии клетками определенных генов, экспрессия которых в дальнейшем способствует перепрограммированию. Согласно определенным вариантам осуществления, описанным в настоящем документе, перепрограммирование дифференцированной клетки (например, соматической клетки) заставляет дифференцированную клетку принимать недифференцированное состояние со способностью к самообновлению и дифференцировке в клетки всех трех линий зародышевого пласта. Это индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (клетки iPSC или iPS).

[00113] Способы перепрограммирования соматических клеток в iPS-клетки известны в данной области техники. См., например, патенты США № 8129187 B2, 8058065 B2, заявку на патент США 2012/0021519 A1, Singh *et al. Front. Cell Dev Biol.* (2015) и Park *et al. Nature* (2008), которые включены посредством ссылки во всей своей полноте. В частности, iPSC получают из соматических клеток путем введения комбинации перепрограммирующих факторов транскрипции. Факторами перепрограммирования могут быть, например, нуклеиновые кислоты, векторы, малые молекулы, вирусы, полипептиды или любая их комбинация. Неограничивающие примеры факторов перепрограммирования включают Oct4 (октамер-связывающий фактор транскрипции-4), Sox2 (область Y, определяющая пол)-бокс 2, Klf4 (Kruppel-подобный фактор-4) и c-Myc. Факторы (например, LIN28 + Nanog, Esrrb, Pax5 shPHK, C/EBPα, p53 siPHK, UTF1, DNMT shRNA, Wnt3a, SV40 LT(T), hTERT) или химические вещества (например, BIX-01294, BayK8644, RG108, AZA, дексаметазон, VPA, TSA, SAHA, PD025901 + CHIR99021(2i), A-83-01), как было обнаружено, заменяют один или другой фактор перепрограммирования из базовых факторов перепрограммирования или повышают эффективность перепрограммирования.

[00114] Конкретный подход или способ, используемый для получения

плюрипотентных стволовых клеток из соматических клеток (например, любой клетки организма, за исключением клеток зародышевой линии, фибробластов и т.д.), не является критическим для заявленного изобретения. Таким образом, любой способ, который перепрограммирует соматическую клетку в плюрипотентный фенотип, будет подходящим для использования в способах, описанных в настоящем документе.

[00115] Эффективность перепрограммирования (*m.e.* количество перепрограммированных клеток), полученных из популяции исходных клеток, может быть повышена путем добавления различных малых молекул, как показано в Shi, Y., *et al.* (2008) *Cell-Stem Cell* 2:525-528, Huangfu, D., *et al.* (2008) *Nature Biotechnology* 26(7):795-797, и Marson, A., *et al.* (2008) *Cell-Stem Cell* 3:132-135. Некоторые неограничивающие примеры средств, повышающих эффективность перепрограммирования, включают растворимый Wnt, среду, кондиционированную Wnt, BIX-01294 (гистонметилтрансферазу G9a), PD0325901 (ингибитор MEK), ингибиторы ДНК-метилтрансферазы, ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC), вальпроевую кислоту, 5'-азациитидин, дексаметазон, субероиланилид, гидроксамовую кислоту (SAHA), витамин С и трихостатин (TSA), и другие.

[00116] Для того, чтобы подтвердить индукцию плюрипотентных стволовых клеток для применения в способах, описанных в настоящем документе, выделенные клоны можно протестировать на экспрессию одного или нескольких маркеров стволовых клеток. Такая экспрессия в клетке, полученной из соматической клетки, идентифицирует клетки как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Маркеры стволовых клеток могут включать без ограничения SSEA3, SSEA4, CD9, Nanog, Oct4, Fbx15, Ecat1, Esg1, Eras, Gdf3, Fgf4, Cripto, Dax1, Zpf296, Slc2a3, Rex1, Utf1 и Nat1 и другие. Согласно одному варианту осуществления клетка, которая экспрессирует Oct4 или Nanog, идентифицируется как плюрипотентная. Способы обнаружения экспрессии таких маркеров могут включать, например, ОТ-ПЦР и иммунологические способы, которые обнаруживают присутствие кодируемых полипептидов, такие как вестерн-блоты или проточные цитометрические анализы. Согласно некоторым вариантам осуществления обнаружение включает не только ОТ-ПЦР, но также включает обнаружение белковых маркеров. Внутриклеточные маркеры могут быть наилучшим способом идентифицированы с помощью ОТ-ПЦР, в то время как маркеры клеточной поверхности легко идентифицировать, например, с помощью иммуноцитохимии.

[00117] Характер плюрипотентных стволовых клеток выделенных клеток можно подтвердить тестами, оценивающими способность iPSC дифференцироваться в клетки каждого из трех зародышевых пластов. В качестве одного из примеров можно использовать

образование тератомы у голых мышей для оценки плюрипотентного характера выделенных клонов. Клетки вводят голым мышам и проводят гистологию и/или иммуногистохимию опухоли, возникающей из клеток. Например, рост опухоли, содержащей клетки всех трех зародышевых пластов, дополнительно указывает на то, что эти клетки являются плюрипотентными стволовыми клетками.

[00118] *Взрослые стволовые клетки:* Взрослые стволовые клетки представляют собой стволовые клетки, полученные из тканей постнатального или постнеонатального организма или из взрослого организма. Взрослая стволовая клетка структурно отличается от эмбриональной стволовой клетки не только маркерами, которые она экспрессирует или не экспрессирует по сравнению с эмбриональной стволовой клеткой, но также наличием эпигенетических различий, например, различий в паттернах метилирования ДНК. Предполагается, что кардиомиоциты, дифференцированные из взрослых стволовых клеток, также могут быть использованы для сердечных трансплантатов, как описано в настоящем документе. Способы выделения взрослых стволовых клеток известны в данной области техники. См., например, патент США № 9206393 В2 и заявку США № 2010/0166714 А1, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Дифференциация *in vitro*

[00119] В способах и композициях, описанных в настоящем документе, используют дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты. Способы дифференцировки клеточного типа либо из ESC, либо из iPSC известны в данной области техники. См., например, LaFlamme *et al.*, *Nature Biotech* 25:1015-1024 (2007), в которой описана дифференцировка кардиомиоцитов и которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00120] Согласно определенным вариантам осуществления пошаговая дифференцировка ESC или iPSC до кардиомиоцитов протекает в следующем порядке: ESC или iPSC > кардиогенная мезодерма > сердечная клетка-предшественник > кардиомиоциты (см., например, Lian *et al. Nat Prot* (2013), заявку США № 2017/0058263 А1, 2008/0089874 А1, 2006/0040389 А1, патент США № 10155927 В2, 9994812 В2 и 9663764 В2, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. В данной области техники известен ряд протоколов дифференцировки ESC и iPSC в кардиомиоциты. Например, средства могут быть добавлены или удалены из клеточных культуральных сред для прямой дифференцировки в кардиомиоциты пошаговым образом. Неограничивающие примеры факторов и агентов, которые могут способствовать дифференцировке кардиомиоцитов, включают малые молекулы (например, ингибиторы

Wnt, ингибиторы GSK3), полипептиды (например, факторы роста), нуклеиновые кислоты, векторы и структурированные субстраты (например, наноструктура). Добавление факторов роста, необходимых для развития сердечно-сосудистой системы, включая без ограничения фактор роста фибробластов 2 (FGF2), трансформирующий фактор роста β (TGF β), факторы роста надсемейства — активин A и BMP4, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и ингибитор Wnt DKK-1, также могут быть полезны для направления дифференцировки по сердечной линии. Дополнительные примеры факторов и условий, которые способствуют дифференцировке кардиомиоцитов, включают без ограничения добавку B27 без инсулина, среды с клеточным кондиционированием, внешнюю электрическую стимуляцию и субстраты с наноструктурой, среди прочего.

Трансплантаты сердца/кардиомиоцитов

[00121] Согласно одному аспекту в настоящем документе описан способ трансплантации или приживления кардиомиоцитов, причем способ предусматривает: а) введение кардиомиоцитов в сердечную ткань субъекта, нуждающегося в этом, и b) введение субъекту количества амиодарона и количества ивабрадина, эффективного для уменьшения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, у субъекта.

[00122] В контексте настоящего изобретения термин «трансплантация» или «трансплантат» используется в контексте помещения клеток, например, кардиомиоцитов, как описано в настоящем документе, в организм субъекта с помощью способа или пути, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в желаемом месте, таком как место повреждения или восстановления, таким образом, чтобы был получен желаемый (желаемые) эффект (эффекты). Клетки, например, кардиомиоциты, или их дифференцированное потомство (например, сердечные фибробласты и т.д.) и кардиомиоциты могут быть имплантированы непосредственно или в сердечную ткань реципиента, например, в сайт или рядом с ним, или в сердечную ткань субъекта с сердечным заболеванием. Как понятно специалисту в данной области техники, желательно длительное приживление кардиомиоцитов, поскольку кардиомиоциты в общем не пролиферируют до такой степени, при которой сердце может быть восстановлено после острого повреждения, включая гибель клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки необязательно трансплантируют на или внутри каркаса или биосовместимого материала, который поддерживает жизнеспособность имплантированных кардиомиоцитов и/или, например, помогает удерживать введенные клетки в желаемом сайте приживления или способствует интеграции с нативными сердечными клетками у субъекта. Предпочтительно кардиомиоциты представляют собой кардиомиоциты,

полученные из стволовых клеток человека, или дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты дифференцированы *in vitro* из эмбриональных стволовых клеток или из iPS клеток.

[00123] Каркас представляет собой структуру, состоящую из биосовместимого материала, включая без ограничения гель, лист или решетку, которые могут содержать клетки в желаемом месте, но допускают проникновение или распространение факторов в окружающей среде, необходимой для выживания и функционирования. В данной области техники известен ряд биосовместимых полимеров, подходящих для каркаса.

[00124] Специалист в данной области может определить количество кардиомиоцитов, необходимое для приживления. Согласно некоторым вариантам осуществления от приблизительно 10 миллионов кардиомиоцитов до приблизительно 10 миллиардов кардиомиоцитов вводят субъекту. Для применения согласно различным аспектам, описанным в настоящем документе, эффективное количество кардиомиоцитов человека может содержать по меньшей мере 1×10^7 , по меньшей мере $1,1 \times 10^7$, по меньшей мере $1,2 \times 10^7$, по меньшей мере $1,3 \times 10^7$, по меньшей мере $1,4 \times 10^7$, по меньшей мере $1,5 \times 10^7$, по меньшей мере $1,6 \times 10^7$, по меньшей мере $1,7 \times 10^7$, по меньшей мере $1,8 \times 10^7$, по меньшей мере $1,9 \times 10^7$, по меньшей мере 2×10^7 , по меньшей мере 3×10^7 , по меньшей мере 4×10^7 , по меньшей мере 5×10^7 , по меньшей мере 6×10^7 , по меньшей мере 7×10^7 , по меньшей мере 8×10^7 , по меньшей мере 9×10^7 , по меньшей мере 1×10^8 , по меньшей мере 2×10^8 , по меньшей мере 5×10^8 , по меньшей мере 7×10^8 , по меньшей мере 1×10^9 , по меньшей мере 2×10^9 , по меньшей мере 3×10^9 , по меньшей мере 4×10^9 , по меньшей мере 5×10^9 , по меньшей мере 6×10^9 , по меньшей мере 7×10^9 , по меньшей мере 8×10^9 , по меньшей мере 9×10^9 , по меньшей мере 1×10^{10} или более кардиомиоцитов для приживления.

[00125] Для того, чтобы уменьшить начало и тяжесть аритмии, связанной с приживлением, у субъекта, получающего сердечный трансплантат кардиомиоцитов, способы, описанные в настоящем документе, дополнительно предусматривают введение субъекту эффективного количества амиодарона и эффективного количества ивабрадина. Комбинация этих антиаритмических средств продемонстрирована в настоящем документе в рабочих примерах для уменьшения и лечения аритмии, связанной с приживлением трансплантата.

[00126] Амиодарон представляет собой антиаритмическое средство III класса, назначаемое для лечения остановки сердца, желудочковой тахикардии и мерцательной аритмии. Аналоги и производные амиодарона известны в данной области техники, см., например, патенты США №7799799 B2, 9018250 B2; и Carlsson *et al. J Med Chem.* 2002 Jan

31;45(3):623-30, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Предполагается, что аналоги и производные амиодарона также могут быть полезны для лечения аритмий, связанных с приживлением трансплантата.

[00127] Механизм действия амиодарона состоит в том, что препарат ингибирует потенциалзависимые калиевые каналы и потенциалзависимые кальциевые каналы, что, в свою очередь, приводит к пролонгированию фазы 3 сердечного потенциала действия. В частности, амиодарон ингибирует порообразующую субъединицу калиевого ионного канала $K_{v11.1}$ (кодируется геном *KCNH2*) и ингибирует потенциалзависимый кальциевый канал (кодируется геном *CACNA2D2*). Однако также было показано, что амиодарон ингибирует активность потенциалзависимых натриевых каналов, что может способствовать проаритмическому потенциалу лекарственного средства.

[00128] Введение амиодарона проявляет активность, подобную бета-блокатору, которая состоит в том, что он снижает частоту сердечных сокращений при введении субъекту. Клинические эффекты амиодарона включают удлинение интервала QT посредством увеличения рефрактерных периодов желудочков, пучков Гиса и волокон Пуркинье. Хотя этот эффект полезен для лечения аритмий, таких как мерцательная аритмия, этот эффект может стать проаритмическим. В данной области техники хорошо известно, что амиодарон и другие антиаритмические средства могут приводить к лекарственному удлинению интервала QT в зависимости от дозы и схемы лечения. Это может усугубляться при сочетании с другими лекарственными средствами или антиаритмическими средствами.

[00129] Ивабрадин представляет собой антиаритмическое средство класса I_f , применяемое для лечения стенокардии, тахикардии и сердечной недостаточности. Аналоги и производные ивабрадина известны в данной области техники. См., например, патенты США № 7879842, 7361650, 7867996 и 7361649, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Предполагается, что определенные аналоги и производные ивабрадина также могут быть полезными для описанных в настоящем документе способов.

[00130] Известно, что ивабрадин ингибирует f-каналы (также известные как каналы HCN) в сердце. Существует 4 изоформы каналов HCN, кодируемых генами *HCN HCN1-HCN4*. Основная функция f-тока (I_f) в сердце заключается в поддержании пейсмекерной активности в SA узле. Блокирование f-каналов ивабрадином приводит к общему снижению частоты сердечных сокращений.

[00131] Комбинация амиодарона с ивабрадином, как описано в настоящем документе, снижает частоту и бремя аритмии у субъектов с трансплантатами

кардиомиоцитов. Эта комбинация антиаритмических средств предполагала улучшение выживаемости субъектов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, как показано в рабочих примерах.

Введение и эффективность

[00132] Согласно одному аспекту в настоящем документе описаны способы лечения или облегчения сердечного заболевания, нарушения, события или повреждения, предусматривающие введение кардиомиоцитов субъекту, нуждающемуся в этом, и введение эффективного количества амиодарона и ивабрадин. Согласно некоторым вариантам осуществления способы, описанные в настоящем документе, предотвращают предполагаемое нарушение, например, аритмию, связанную с приживлением трансплантата.

[00133] Согласно другому аспекту в настоящем документе описаны способы лечения или облегчения аритмии, связанной с приживлением трансплантата.

[00134] Антиаритмическое средство, описанное в настоящем документе, можно вводить любым подходящим путем, который приводит к снижению бремени аритмии у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов термин «введение» относится к введению фармацевтической композиции, содержащей одно или несколько средств. Введение можно проводить путем прямой инъекции (например, непосредственного введения в клетку или ткань-мишень), подкожной инъекции, внутримышечной инъекции, пероральной или назальной доставки или их комбинации субъекту, нуждающемуся в этом.

[00135] Как раскрыто выше, клетки вводят непосредственно в сердечную ткань. Антиаритмические средства, например, амиодарон и ивабрадин, можно вводить любым подходящим способом, включая без ограничения пероральное, парентеральное, внутривенное (IV), внутримышечное, подкожное, трансдермальное, через дыхательные пути (аэрозоль), легочное, кожное, местное или инъекционное введение. Введение может быть местным или системным.

[00136] Введение амиодарона и ивабрадина может быть внутривенным или пероральным для обоих лекарственных средств. Таким образом, предполагается, что оба лекарственных средства (или их аналог) можно вводить перорально, оба внутривенно или одно перорально, а другое внутривенно в любой комбинации. Однако для простоты введения и соблюдения пациентом режима оба лекарственных средства предпочтительно вводят перорально.

[00137] В контексте настоящего изобретения «эффективное количество» относится к количеству амиодарона и/или ивабрадина или его аналога, необходимому для облегчения аритмии, связанной с приживлением трансплантата. Посредством профилактики или облегчения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, можно облегчить приживление и интеграцию приживляемых клеток, а также можно улучшить клинический результат для субъекта, включая снижение риска сердечной недостаточности или внезапной сердечной смерти. Под «облегчением» в этом контексте понимают снижение бремени аритмии по меньшей мере на 10% по сравнению с аритмией, возникающей или ожидаемой без введения амиодарона и ивабрадина, как описано в настоящем документе. Бремя аритмии может быть рассчитано, как описано в рабочих примерах в настоящем документе или как известно в данной области техники. Бремя аритмии без описанного режима введения лекарственных средств может составлять 75% или более. Оно может быть снижено по меньшей мере на 10% при введении амиодарона и ивабрадин. Понятно, что для любого конкретного случая подходящее «эффективное количество» может быть определено специалистом в данной области техники, используя только рутинные эксперименты.

[00138] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов введение амиодарона и ивабрадина или их аналога снижает ускоренную частоту сердечных сокращений в состоянии покоя после трансплантации, которую испытывает реципиент трансплантата, на по меньшей мере 10% или более, 20% или более, 30% или более, 40% или более, 50% или более, 60% или более по сравнению с субъектом, получающим трансплантат клеток того же типа без введения амиодарона и ивабрадина или их аналога.

[00139] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов введение амиодарона и ивабрадина или их аналога снижает бремя аритмии, связанной с приживлением трансплантата, т.е. снижает долю времени, в течение которого субъект страдает аритмией, связанной с приживлением трансплантата, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 99% или более по сравнению с субъектом, получающим трансплантат кардиомиоцитов того же типа без введения амиодарона и ивабрадина. В то время как по меньшей мере 10% снижение рассматривают как эффективное лечение, предполагается, что введение амиодарона и ивабрадина позволяет полностью прекратить аритмию, связанную с приживлением трансплантата.

[00140] Эффективная доза может быть первоначально оценена на основе анализов клеточных культур, а диапазон доз может быть определен посредством исследований на

животных (например, свиньях). Данные, полученные в результате анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при определении диапазона доз для применения у людей. Доза таких антиаритмических средств предпочтительно находится в пределах диапазона циркулирующих концентраций, который включает ED₅₀ с небольшой токсичностью или без токсичности. Доза может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути применения или введения.

[00141] В общем, композиции вводят таким образом, что амиодарон применяют или вводят при дозе от по меньшей мере 50 мг, по меньшей мере 100 мг, по меньшей мере 150 мг, по меньшей мере 200 мг, по меньшей мере 250 мг, по меньшей мере 300 мг, по меньшей мере 350 мг, по меньшей мере 400 мг, по меньшей мере 450 мг, по меньшей мере 500 мг, по меньшей мере 550 мг, по меньшей мере 600 мг, по меньшей мере 650 мг, по меньшей мере 700 мг, по меньшей мере 750 мг, по меньшей мере 800 мг, по меньшей мере 850 мг, по меньшей мере 900 мг до приблизительно 1000 мг.

[00142] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов амиодарон или его аналог вводят перорально при дозе 100-800 мг три раза в день. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов амиодарон вводят посредством IV болюса при дозе 100-300 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов амиодарон вводят до концентрации в сыворотке от 1,5 до 2,5 мкг/мл.

[00143] Согласно некоторым вариантам осуществления, ивабрадин вводят при дозе от по меньшей мере 1 мг, по меньшей мере 2 мг, по меньшей мере 3 мг, по меньшей мере 4 мг, по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 6 мг, по меньшей мере 7 мг, по меньшей мере 8 мг, по меньшей мере 9 мг, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 11 мг, по меньшей мере 12 мг, по меньшей мере 13 мг, по меньшей мере 14 мг, по меньшей мере 15 мг, по меньшей мере 16 мг, по меньшей мере 17 мг, по меньшей мере 18 мг, по меньшей мере 19 мг до приблизительно 20 мг.

[00144] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов ивабрадин его аналог вводят перорально при дозе от 5 до 15 мг два раза в день.

[00145] Согласно некоторым вариантам осуществления введение амиодарона представляет собой однократное болюсное введение. Согласно некоторым вариантам осуществления введение представляет собой непрерывное или повторяющееся введение. Согласно некоторым вариантам осуществления введение представляет собой пероральное введение и/или внутривенную инъекцию. Согласно некоторым вариантам осуществления амиодарон вводят перорально при дозе 100-800 мг три раза в день. Согласно некоторым вариантам осуществления, амиодарон вводят посредством IV болюса при дозе 100-300 мг.

Согласно некоторым вариантам осуществления амиодарон вводят до концентрации в сыворотке от 1,5 до 2,5 мкг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления ивабрадин вводят перорально при дозе от 5 до 15 мг два раза в день. Согласно некоторым вариантам осуществления ивабрадин вводят при тахикардии. Согласно некоторым вариантам осуществления ивабрадин вводят для поддержания частоты сердечных сокращений в состоянии покоя менее или равной 150 ударов в минуту (bpm). Согласно некоторым вариантам осуществления введение амиодарона и ивабрадина является кратковременным. Согласно некоторым вариантам осуществления введение амиодарона и ивабрадина прекращают после того, как бремя аритмии, связанной с приживлением трансплантата, достигает нуля, без рецидива аритмии.

[00146] Антиаритмические средства, амиодарон и ивабрадин или их аналог, описанные в настоящем документе, применяют в комбинации для лечения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, и/или сердечно-сосудистого заболевания. В контексте настоящего изобретения термин «в комбинации» означает, что две (или более) разные терапии доставляют субъекту в ходе страдания субъекта нарушением, например, две или более терапии доставляют после того, как субъекту был поставлен диагноз нарушения (сердечно-сосудистого заболевания или аритмии, связанной с приживлением трансплантата) и до того, как нарушение было вылечено или устранено, или лечение было прекращено по другим причинам. Согласно некоторым вариантам осуществления доставка одной терапии все еще происходит, когда начинается доставка второй, так что существует перекрытие в введении. Это иногда упоминается в настоящем документе как «одновременно» или «одновременная доставка». Согласно другим вариантам осуществления доставка одной терапии заканчивается до того, как начинается другая терапия. Согласно некоторым вариантам осуществления этого случая лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, вторая терапия является более эффективной, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второй терапии, или вторая терапия уменьшает симптомы в большей степени, чем если бы вторую терапию проводили без первой терапии, или аналогичная ситуация наблюдается для первой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления доставку проводят таким образом, что уменьшение симптома или другого параметра, связанного с нарушением, больше, чем то, которое наблюдалось бы при применении одной терапии без другой. Эффект двух терапий может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или более чем аддитивным. Доставка может быть такой, что эффект первой доставленной терапии все еще можно обнаружить при второй доставке. Антиаритмические средства, описанные в настоящем документе, и/или по меньшей мере одну дополнительную терапию

можно вводить одновременно, в одной и той же или в отдельных композициях или последовательно. Для последовательного введения амиодарон, описанный в настоящем документе, можно вводить первым, а ивабрадин можно вводить вторым, или порядок введения можно изменить на обратный. Средство и/или другие терапевтические средства, процедуры или модальности можно вводить в периоды активного нарушения (например, во время аритмии, связанной с приживлением трансплантата) или в период ремиссии или менее активного заболевания (например, до или после приживления). Антиаритмические средства можно вводить до трансплантации сердца, одновременно с лечением, после лечения или во время обострения сердечно-сосудистого заболевания после приживления трансплантата.

[00147] При введении в комбинации амиодарон и ивабрадин можно вводить в количестве или при дозе, которые выше, ниже или равны количеству или дозе каждого антиаритмического средства, используемого по отдельности, например, в качестве монотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления вводимое количество или доза амиодарона, ивабрадина или обоих ниже (например, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%), чем количество или доза каждого антиаритмического средства, используемого индивидуально. Согласно другим вариантам осуществления количество или доза амиодарона, ивабрадина или обоих, которые приводят к желаемому эффекту (например, лечению сердечно-сосудистого заболевания), ниже (например, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50% ниже), чем количество или доза каждого средства по отдельности, необходимые для достижения такого же терапевтического эффекта.

[00148] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов амиодарон и ивабрадин или их аналог вводят одновременно с трансплантатом кардиомиоцитов. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов введение амиодарона начинают до введения трансплантата кардиомиоцитов. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов введение ивабрадина начинают до введения трансплантата кардиомиоцитов. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов введение как амиодарона, так и ивабрадина начинают до введения трансплантата кардиомиоцитов. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов введение ивабрадина начинают одновременно с введением трансплантата кардиомиоцитов или после него. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов введение амиодарона начинают одновременно с введением трансплантата кардиомиоцитов или после него.

[00149] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов введение амиодарона начинают за по меньшей мере 1 часа, по меньшей мере 5 часов, по меньшей мере 10 часов, по меньшей мере 15 часов, по меньшей мере 20 часов, по меньшей мере 1 день, по меньшей мере 2 дня, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 4 дня, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней до трансплантации. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов введение ивабрадина начинают за по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 5 часов, по меньшей мере 10 часов, по меньшей мере 15 часов, по меньшей мере 20 часов, по меньшей мере 1 день, по меньшей мере 2 дня, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 4 дня, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней до трансплантации.

[00150] Согласно некоторым вариантам осуществления, любого из аспектов ивабрадин вводят по мере необходимости для контроля частоты сердечных сокращений, т.е. для ограничения или контроля тахикардии, которая обычно возникает при аритмии, связанной с приживлением трансплантата. В таких вариантах осуществления амиодарон вводят либо до (например, начиная с 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней, 1 дня), либо одновременно с введением трансплантата и продолжают после трансплантации.

[00151] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов амиодарон вводят по меньшей мере один раз в день, два раза в день, три раза в день, или более. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов ивабрадин вводят по меньшей мере один раз в день, два раза в день, три раза в день, или более.

[00152] Согласно дополнительным вариантам осуществления другие типы антиаритмических средств можно вводить одновременно или в дополнение к амиодарону и ивабрадину для содействия лечению субъекта.

[00153] Согласно определенным вариантам осуществления амиодарон и/или ивабрадин или их аналоги можно вводить по мере необходимости для контроля частоты сердечных сокращений у субъекта и для облегчения по меньшей мере одного симптома аритмии, связанной с приживлением трансплантата. Доза композиции, описанной в настоящем документе, может быть определена врачом и скорректирована при необходимости в соответствии с наблюдаемыми эффектами лечения. Что касается продолжительности и частоты лечения, то практикой опытных клиницистов является контроль за пациентами для того, чтобы определить, когда лечение дает терапевтический эффект, и определить, следует ли увеличивать или уменьшать дозу, увеличивать или

уменьшать частоту введения, прекращать лечение, возобновлять лечение или внести другие изменения в схему лечения.

[00154] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов способы, описанные в настоящем документе, предусматривают введение эффективного количества амиодарона и ивабрадина субъекту для того, чтобы облегчить по меньшей мере один симптом аритмии, связанной с приживлением трансплантата, и/или сердечно-сосудистого заболевания. В контексте настоящего изобретения термин «облегчение по меньшей мере одного симптома сердечно-сосудистого заболевания» или «облегчение по меньшей мере одного симптома аритмии, связанной с приживлением трансплантата» означает облегчение любого состояния или симптома, связанного с сердечно-сосудистым заболеванием (например, утомляемости, одышки, обморока, боли в груди) и включает, например, снижение самой аритмии. По сравнению с эквивалентным необработанным контролем такое снижение составляет на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более, как измерено любым стандартным способом.

[00155] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов после начальной схемы лечения лечение можно проводить менее часто. Например, введение ежедневно в течение трех недель, введение может быть сокращено до введения через день, каждые три дня, еженедельно или менее часто, в зависимости от наличия у субъекта аритмии. В качестве альтернативы дозирование можно оставить таким же частым, но уменьшить количество (количества).

[00156] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из аспектов у субъекта сначала диагностируют сердечно-сосудистое заболевание или нарушение до введения трансплантата кардиомиоцитов, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта сначала диагностируют риск развития сердечного заболевания (например, повреждения миокарда) или нарушения до введения клеток.

[00157] Согласно некоторым вариантам осуществления ивабрадин или его аналог вводят при тахикардии. Частота сердечных сокращений взрослого человека в состоянии покоя в общем составляет от 60 до 100 ударов в минуту (bpm). Тахикардия представляет собой частоту сердечных сокращений в состоянии покоя выше указанной. Однако, в то время как частота сердечных сокращений в состоянии покоя составляет от 60 до 100 bpm, пациенты в общем могут переносить частоту менее 150 bpm. Таким образом, ивабрадин можно назначать при тахикардии после трансплантации с целью поддержания частоты сердечных сокращений в состоянии покоя от 100 до 150 bpm, предпочтительно менее 140 bpm, менее 130 bpm, менее 120 bpm или менее 110 bpm.

[00158] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[00159] Следует понимать, что настоящее раскрытие не ограничивается конкретной методологией, протоколами, реагентами и т.д., описанными в настоящем документе, и поэтому может варьироваться. Используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения.

[00160] Все указанные патенты и другие публикации непосредственно включены в настоящий документ посредством ссылки с целью описания и раскрытия, например, методологий, описанных в таких публикациях, которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением. Эти публикации предоставлены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в этом отношении не должно быть истолковано как признание того, что изобретатели не имеют права предшествовать такому раскрытию в силу предшествующего раскрытия или по любой другой причине. Все заявления о дате или представлении о содержании этих документов основаны на информации, доступной заявителям, и не являются признанием правильности дат или содержания этих документов.

[00161] Некоторые варианты осуществления технологии, описанной в настоящем документе, могут быть определены в соответствии с любым из следующих пронумерованных пунктов:

1. Способ лечения или облегчения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, у субъекта-реципиента сердечного трансплантата кардиомиоцитов, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества амиодарона и эффективного количества ивабрадина.

2. Способ согласно пункту 1, где сердечный трансплантат кардиомиоцитов содержит дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты.

3. Способ согласно пункту 2, где дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты дифференцированы из индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток или из эмбриональных стволовых (ES) клеток.

4. Способ согласно любому из пунктов 1-3, где сердечный трансплантат кардиомиоцитов получают из стволовых клеток, аутологичных по отношению к субъекту.

5. Способ согласно любому из пунктов 1-3, где сердечный трансплантат кардиомиоцитов получают из стволовых клеток, аллогенных по отношению к субъекту.

6. Способ согласно любому из пунктов 1-5, где амиодарон и ивабрадин вводят одновременно с сердечным трансплантатом кардиомиоцитов.

7. Способ согласно любому из пунктов 1-5, где введение амиодарона начинают до введения сердечного трансплантата кардиомиоцитов.

8. Способ согласно любому из пунктов 1-5, где введение ивабрадина начинают до введения сердечного трансплантата кардиомиоцитов.

9. Способ согласно любому из пунктов 1-5, где введение как амиодарона, так и ивабрадина начинают до введения сердечного трансплантата кардиомиоцитов.

10. Способ согласно любому из пунктов 1-5, где введение ивабрадина начинают одновременно с введением сердечного трансплантата кардиомиоцитов или после него.

11. Способ согласно любому из пунктов 1-5, где введение амиодарона начинают одновременно с введением сердечного трансплантата кардиомиоцитов или после него.

12. Способ согласно любому из пунктов 1-11, где введение амиодарона представляет собой однократное болюсное введение.

13. Способ согласно любому из пунктов 1-11, где введение представляет собой непрерывное или повторяющееся введение.

14. Способ согласно любому из пунктов 1-13, где введение представляет собой пероральное введение и/или внутривенную инъекцию.

15. Способ согласно любому из пунктов 1-14, где амиодарон вводят перорально при дозе 100-800 мг три раза в день.

16. Способ согласно любому из пунктов 1-14, где амиодарон вводят посредством IV болюса при дозе 100-300 мг.

17. Способ согласно любому из пунктов 1-15, где амиодарон вводят до концентрации в сыворотке от 1,5 до 2,5 мкг/мл.

18. Способ согласно любому из пунктов 1-17, где ивабрадин вводят перорально при дозе от 5 до 15 мг два раза в день.

19. Способ согласно любому из пунктов 1-18, где ивабрадин вводят при тахикардии.

20. Способ согласно любому из пунктов 1-19, где ивабрадин вводят для поддержания частоты сердечных сокращений в состоянии покоя менее или равной 150 ударов в минуту (bpm).

21. Способ согласно любому из пунктов 1-20, где введение амиодарона и ивабрадина снижает учащенное сердцебиение после трансплантации, наблюдаемое у реципиента трансплантата, на по меньшей мере 10% по сравнению с субъектом, получающим трансплантат клеток того же типа без введения амиодарона и ивабрадина.

22. Способ согласно любому из пунктов 1-21, где введение амиодарона и ивабрадина сокращает долю времени, в течение которого субъект страдает аритмией, связанной с приживлением трансплантата, на по меньшей мере 10% по сравнению с субъектом, получающим трансплантат кардиомиоцитов того же типа без введения амиодарона и ивабрадина.

23. Способ согласно любому из пунктов 1-22, где введение амиодарона и ивабрадина является кратковременным.

24. Способ согласно любому из пунктов 1-22, где введение амиодарона и ивабрадина прекращают после того, как бремя аритмии, связанной с приживлением трансплантата, достигает нуля, без рецидива аритмии.

25. Способ трансплантации кардиомиоцитов, причем способ предусматривает:

а) введение дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов в сердечную ткань субъекта, нуждающегося в этом,

б) введение субъекту количества амиодарона и количества ивабрадина, эффективного для уменьшения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, у субъекта.

26. Способ согласно пункту 25, где аритмия, связанная с приживлением трансплантата, уменьшается у субъекта по сравнению с субъектом, получающим дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты без введения амиодарона и ивабрадина.

27. Способ согласно любому из пунктов 25 или 26, где дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты дифференцированы *in vitro* из эмбриональных стволовых клеток или из iPS клеток.

28. Способ согласно пункту 27, где iPS клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

29. Способ согласно пункту 27, где iPS клетки являются аллогенными по отношению к субъекту.

30. Способ согласно любому из пунктов 25-29, где амиодарон и ивабрадин вводят одновременно с дифференцированными *in vitro* кардиомиоцитами.

31. Способ согласно любому из пунктов 25-29, где введение амиодарона начинают до введения дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов.

32. Способ согласно любому из пунктов 25-29, где введение ивабрадина начинают до введения дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов.

33. Способ согласно любому из пунктов 25-29, где введение как амиодарона, так и ивабрадина начинают до введения дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов.

34. Способ согласно любому из пунктов 25-29, где введение ивабрадина начинают одновременно с введением дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов или после него.

35. Способ согласно любому из пунктов 25-29, где введение амиодарона начинают одновременно с введением дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов или после него.

36. Способ согласно любому из пунктов 25-35, где введение ивабрадина представляет собой однократное болюсное введение.

37. Способ согласно любому из пунктов 25-36, где введение представляет собой непрерывное или повторяющееся введение.

38. Способ согласно любому из пунктов 25-37, где введение представляет собой пероральное введение и/или внутривенную (IV) инъекцию.

39. Способ согласно любому из пунктов 25-38, где амиодарон вводят перорально при дозе 100-800 мг три раза в день.

40. Способ согласно любому из пунктов 25-39, где амиодарон вводят посредством IV болюса при дозе 100-300 мг.

41. Способ согласно любому из пунктов 25-40, где амиодарон вводят до концентрации в сыворотке от 1,5 до 2,5 мкг/мл.

42. Способ согласно любому из пунктов 25-41, где ивабрадин вводят перорально при дозе от 5 до 15 мг два раза в день.

43. Способ согласно любому из пунктов 25-42, где ивабрадин вводят при тахикардии.

44. Способ согласно любому из пунктов 25-43, где ивабрадин вводят для поддержания частоты сердечных сокращений в состоянии покоя менее или равной 150 ударов в минуту (bpm).

45. Способ согласно любому из пунктов 25-44, где введение амиодарона и ивабрадина является кратковременным.

46. Способ согласно любому из пунктов 25-45, где введение амиодарона и ивабрадина прекращают после того, как бремя аритмии, связанной с приживлением трансплантата, достигает нуля, без рецидива аритмии.

47. Способ согласно любому из пунктов 1-46, где приблизительно от 10 миллионов кардиомиоцитов до приблизительно 10 миллиардов кардиомиоцитов вводят субъекту.

48. Способ согласно любому из пунктов 1-47, где субъектом является человек.

49. Способ согласно любому из пунктов 1-48, где субъект страдает или имеет риск развития сердечно-сосудистого заболевания или сердечного приступа.

50. Способ согласно пункту 49, где сердечно-сосудистое заболевание или сердечный приступ выбран из группы, состоящей из атеросклеротической болезни сердца, инфаркта

миокарда, кардиомиопатии, аритмии сердца, стеноза клапана, врожденного порока сердца, хронической сердечной недостаточности, регургитации, ишемической болезни, мерцания и полиморфной желудочковой тахикардии.

51. Композиция, содержащая дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты, амиодарон и ивабрадин.

Примеры

Пример 1. Терапия амиодарон/ивабрадин снижает аритмии, связанные с приживлением трансплантата

[00162] Заместительная терапия кардиомиоцитами является областью активных исследований и может восстановить функцию сердца после инфаркта миокарда. Плюрипотентные стволовые клетки человека (hPSC) могут служить исходным материалом для получения кардиомиоцитов человека *in vitro*. Модели инфаркта миокарда на крупных животных продемонстрировали восстановительный потенциал этого кандидата в терапевтическое средство (Chong *et al.*, 2014; Shiba *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). Однако кардиомиоциты, полученные из hPSC, являются электрофизиологически незрелыми и вызывают аритмии сердца на моделях крупных животных (см. Romagnuolo *et al.*, 2019). Эти аритмии, связанные с приживлением трансплантата, появляются вскоре после трансплантации кардиомиоцитов, полученных из hPSC, и временно проявляются в течение 3–4 недель, в течение которых реципиент подвергается риску внезапной сердечной смерти и сердечной недостаточности. Предполагается, что наблюдаемое возвращение к нормальному синусовому ритму отражает созревание *in vivo* трансплантированных кардиомиоцитов, полученных из hPSC, и предполагает полную электрическую интеграцию с миокардом хозяина.

[00163] Уменьшение этих транзиторных аритмий, связанных с приживлением трансплантата, может значительно улучшить профиль безопасности этого терапевтического средства у пациентов с инфарктом миокарда. Несмотря на то, что существует ряд антиаритмических лекарственных средств, доступных для пациентов с сердечными заболеваниями, предсказать их эффективность при заместительной терапии кардиомиоцитами сложно, поскольку трансплантация незрелых кардиомиоцитов не схожа ни с какой естественной сердечной патологией или предшествующей терапией. В результате идентификация одного или нескольких антиаритмических лекарственных средств, эффективных для этой цели, должна быть определена эмпирически. В настоящей заявке описана комбинация двух лекарственных средств, которые снижают учащенное

сердцебиение и бремя аритмии, вызванное трансплантацией кардиомиоцитов, полученных из hPSC, у свиней.

[00164] Модель эксперимента: Юкатанских миниатюрных свиней массой 30-40 кг использовали для моделирования инфаркта миокарда. С этой целью животных подвергали 90-минутной окклюзии левой передней нисходящей коронарной артерии с помощью баллона для чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики. Имплантированное электрокардиографическое устройство позволяло осуществлять непрерывный дистанционный мониторинг сердца на протяжении всего исследования. Кардиомиоциты, полученные из hPSC, вводили через две недели после инфаркта, и свиней подвергали иммуносупрессии для предотвращения иммунного отторжения трансплантированных клеток. Всего доставляли 500 миллионов кардиомиоцитов посредством чрескожных трансэндокардиальных инъекций. В этой модели продолжительность посттрансплантационного исследования составляла по меньшей мере 30 дней. Контрольная группа ($n = 6$) не получала антиаритмические лекарственные средства. Группа лечения ($n = 6$) получала комбинированную терапию антиаритмических лекарственных средств, состоящую из нагрузочной и поддерживающей дозы амиодарона до целевых уровней в сыворотке крови 1,5 и 2,5 мкг/мл и перорального приема ивабрадина 5–15 мг два раза в день.

[00165] Новое открытие: было обнаружено, что применение терапии амиодарон/ивабрадин снижает учащенное сердцебиение и бремя аритмии у свиней, получавших лечение. Это отражено в следующих объединенных данных для обработанных и контрольных животных в ходе исследования (**фиг. 1A-1B**). Наиболее неожиданным результатом было влияние комбинаций амиодарона/ивабрадина на смертность (**фиг. 2**). Без терапии амиодароном/ивабрадином две из шести контрольных свиней умерли от мерцания желудочков (**фиг. 9, фиг. 11**), а четыре выжили (**фиг. 10, фиг. 12-14**). Напротив, ни одна из шести свиней, получавших амиодарон и ивабрадин, не умерла от сердечно-сосудистых осложнений (**фиг. 3-8**).

[00166] Результаты: в настоящем документе представлены данные для отдельных животных в этом исследовании (**фиг. 1A-14**). Необходимо отметить, что последние два животных в группе лечения (амиодарон $\pm$ ивабрадин) подвергались умерщвлению из-за осложнений, связанных с иммуносупрессией (реактивация CMV-инфекции), и не имели сердечной этиологии (**фиг. 7-8**).

[00167] Таким образом, результаты, представленные в настоящем документе, показывают, что терапия амиодароном и ивабрадином снижает частоту сердечных сокращений и бремя аритмии у животных, которым пересадили сердечные трансплантаты,

по сравнению с животными, не получавшими лечения (**фиг. 1А-1В**), а комбинация этих антиаритмических средств улучшила выживаемость животных, которые получали заместительную клеточную терапию (**фиг. 2**).

Ссылочные источники

[00168] Chong, JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, Mahoney WM, Van Biber B, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem HP, Laflamme MA, Murry CE (2014) Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510(7504):273-277.

[00169] Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, Couture L, Vogel KW, Astley CA, Baldessari A, Ogle J, Don CW, Steinberg ZL, Seslar SO, Tuck SA, Tsuchida H, Naumova A, Lyu MS, Lee J, Hailey DW, Reinecke H, Pabon L, Fryer BH, MacLellan WR, Thies RS, Murry CE (2018) Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nature Biotech* 36(7):597-605.

[00170] Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sanchez A, Qiang B, Barry J, Laskary A, Qi X, Masse S, Magtibay K, Kawajiri H, Wu J, Sadikov TV, Rothberg J, Panchalingham KM, Titus E, Ren-Ke L, Zandstra PW, Wright GA, Nanthakumar K, Ghugre NR, Keller G, Laflamme MA (2019) Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes regenerate the infarcted pig heart but induce ventricular tachyarrhythmias. *Stem Cell Reports* 12:1-15

[00171] Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U (2016) Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538(7625):388-391.

Пример 2. Антиаритмические лекарственные средства, протестированные для лечения аритмий, связанных с приживлением трансплантатов

[00172] Юкатанских миниатюрных свиней массой 30-40 кг использовали для моделирования инфаркта миокарда. С этой целью животных подвергали 90-минутной окклюзии левой передней нисходящей коронарной артерии с помощью баллона для чрескожной транслуминальной коронарной ангиопластики. Имплантированное электрокардиографическое устройство позволяло осуществлять непрерывный дистанционный мониторинг сердца на протяжении всего исследования. Кардиомиоциты, полученные из hPSC, вводили через две недели после инфаркта, и свиней подвергали иммуносупрессии для предотвращения иммунного отторжения трансплантированных

клеток. Всего доставляли 500 миллионов кардиомиоцитов посредством чрескожных трансэндокардиальных инъекций. Контрольные группы не получали какие-либо антиаритмические лекарственные средства, в то время как группы лечения получали антиаритмические лекарственные средства, указанные в **Таблице 1**. Протестировали ряд антиаритмических лекарственных средств для определения их эффективности для лечения и профилактики аритмий, связанных с приживлением трансплантата. В **Таблице 1** приведены эти результаты (ниже).

[00173] Таблица 1. Исследования антиаритмических средств

Протестированная модель	Антиаритмическое средство	Концентрация	Результат
Свинья	Лидокаин (Ib)	100 мг IV	Умеренный эффект HR, редко кардиоверсия
Свинья	Флекаинид (Ic)	2 мг/кг PO, 4 мг/кг PO, 6 мг/кг PO, 10 мг/кг PO	Нет ответа на бремя HR или EA
Свинья	Пропафенон (Ic)	1 мг/кг IV, 2 мг/кг IV, 3 мг/кг IV	Нет ответа на HR, транзиторная кардиоверсия * Рвота с ограничением дозы
Свинья	Амиодарон (III)	150 мг IV	Умеренный эффект HR, частая кардиоверсия
Свинья	Соталол (III)	1 мг/кг PO, 2 мг/кг PO, 4 мг/кг PO	Нет ответа на бремя HR или EA
Свинья	Метопролол (β_1 AR)	5 мг IV, 25 мг PO BID, 50 мг PO BID, 75 мг PO BID	Умеренный эффект HR (IV только), нет ответа на бремя EA
Свинья	Ивабрадин (I _r)	2,5 мг PO, 5 мг PO BID, 10 мг	Сильный дозозависимый эффект

		PO BID, 15 мг BID; 1 мг/кг IV, 2 мг/кг IV	HR* (только PO), отсутствие реакции на бремя ЕА *Тяжелая синусовая брадикардия, событие R-on-T и полиморфная VT
Свинья	Дантролен (RyR ₁)	2 мг/кг IV	Нет ответа на бремя HR или ЕА
Не относящийся к человеку примат	Верапамил (CCB)		Внезапная сердечная смерть

[00174] При введении отдельно амиодарон оказывает умеренное влияние на снижение частоты сердечных сокращений и приводит к кардиоверсии. Ивабрадин был способен замедлять частоту сердечных сокращений, но не оказывал существенного влияния на снижение бремени аритмии на моделях приживления трансплантата. Дополнительные протестированные антиаритмические средства оказывали умеренное влияние или не оказывали существенного влияния на частоту сердечных сокращений или снижение бремени аритмии на животной модели приживления трансплантата.

[00175] Было обнаружено, что среди протестированных лекарственных средств комбинация амиодарона и перорального ивабрадина оказалась наиболее эффективной для снижения как частоты сердечных сокращений, так и бремени аритмии у свиней. В частности, следующие схемы терапии амиодароном и ивабрадином оказались наиболее эффективными на животной модели приживления трансплантата (*см. также фиг. 15*).

Свинья

[00176] Контроль ритма/частоты **Амиодарон** 200–1200 мг BID PO, начало день трансплантации -7

[00177] Титрование до минимальной точки 1,5–2,5 мкг/мл

[00178] Контроль частоты **Ивабрадин** 2,5–15 мг PO BID при HR $\geq$ 150

[00179] Титрование до точки HR <125 bpm

[00180] Для сравнения типичные клинические дозы амиодарона и ивабрадина для человека перечислены ниже:

Человек

[00181] Контроль ритма/частоты **Амиодарон** 100–800 мг TID PO, начало день трансплантации -7

[00182] Контроль частоты **Ивабрадин** 5–15 мг PO BID при тахикардии.

[00183] Таким образом, специфическая комбинация амиодарона и ивабрадина снижает частоту сердечных сокращений и снижает бремя аритмии, связанной с приживлением трансплантата, у животных, получавших клеточную терапию, по сравнению с животными, которые не получали лечение амиодароном и ивабрадином (фиг. 1А-2).

Пример 3. Фармакологическая терапия аритмии, связанной с приживлением трансплантата, вызванной трансплантацией кардиомиоцитов человека

[00184] **Предпосылки:** аритмии, связанные с приживлением трансплантата, (ЕА) наблюдали в исследованиях на крупных животных при интрамиокардиальной трансплантации кардиомиоцитов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека (hPSC-CM), при инфаркте миокарда. Хотя риск, вызванный с ЕА, является временным, он является препятствием для клинической реализации.

[00185] **Способы:** hPSC-CM трансплантировали в сердце свиньи, подвергшееся инфаркту, хирургическим или чрескожным путем, чтобы вызвать ЕА. После скрининга антиаритмических лекарственных средств проводили проспективное исследование для определения эффективности комбинации амиодарона и ивабрадина для предотвращения сердечной смерти и подавления ЕА.

[00186] **Результаты:** ЕА наблюдали у всех субъектов, и лечение амиодароном-ивабрадином было хорошо переносимым. Ни у одного из подвергнутых лечению субъектов не было первичной конечной точки сердечной смерти, нестабильной ЕА или сердечной недостаточности по сравнению с 5/8 (62,5%) в контрольной группе (отношение рисков 0,00; 95% доверительный интервал, 0–0,297; $p = 0,002$). Общая выживаемость, включая две смерти в группе лечения от инфекции, показала улучшение при лечении (отношение рисков 0,21; 95% доверительный интервал, 0,03–1,01; $p = 0,05$). Без лечения пик частоты сердечных сокращений в среднем составлял 305 ± 29 ударов в минуту, в то время как у подвергнутых лечению животных пиковая частота сердечных сокращений была значительно ограничена до 185 ± 9 ударов в минуту ($p = 0,001$). Точно так же лечение снизило пиковое бремя ЕА от $96,8 \pm 2,9\%$ до $76,5 \pm 7,9\%$ ($p = 0,03$). Антиаритмическое лечение безопасно прекращали приблизительно через месяц лечения без рецидива аритмии.

[00187] **Заключение:** риск аритмии, связанной с приживлением трансплантата, и связанных с ней последствий после трансплантации hPSC-CM может быть значительно

снижен посредством комбинированной терапии лекарственными средствами амиодарон и ивабрадин.

Введение

[00188] Инфаркт миокарда (MI) остается основной причиной сердечной недостаточности и смерти в США и во всем мире (1). В ходе MI безвозвратно теряется приблизительно один миллиард кардиомиоцитов, что часто приводит к изнурительной сердечной недостаточности. Существующие способы лечения могут замедлить возникновение и прогрессирование сердечной недостаточности, но ни один из них не заменяет утраченный миокард, за исключением ортотопической трансплантации сердца, доступность и показания к которой остаются ограниченными (2). Плюрипотентные стволовые клетки человека (hPSC, включая эмбриональные стволовые клетки [ESC] и их перепрограммированные родственники, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC)) являются возобновляемым источником кардиомиоцитов (CM). Трансплантация кардиомиоцитов, полученных из hPSC (hPSC-CM), в инфаркт миокарда у небольших животных, мышей, крыс, морских свинок, продемонстрировала стабильное приживание трансплантата (3-7). Описаны ремускуляризация и функциональные преимущества у перенесших инфаркт приматов, не относящихся к человеку (NHP) после трансплантации человеческих плюрипотентных стволовых клеток hPSC-CM (8-10). В дополнение к функциональной ремускуляризации человеческий трансплантат васкуляризируется и электромеханически соединяется с миокардом хозяина в течение одного месяца после трансплантации и остается стабильным в течение по меньшей мере до трех месяцев.

[00189] Хотя у небольших животных аритмии не наблюдали, авторы настоящего изобретения и другие постоянно наблюдали эктопические аритмии после трансплантации hPSC-CM у NHP (8-10) и свиней (11), которые в настоящем изобретении упоминаются как аритмии, связанные с приживлением трансплантата (EA). EA в общем являются транзиторными, возникают в течение недели после трансплантации и, как правило, спонтанно исчезают через один месяц. Основываясь на электрическом картировании, ускоренной стимуляции и исследованиях кардиоверсии, EA, по-видимому, возникают фокально в трансплантате или миокарде вокруг трансплантата и функционируют как автоматические очаги, а не повторяющиеся пути (9,11). Хотя EA достаточно хорошо переносится у NHP, группа Laflamme (11) сообщила, что EA может привести к летальному исходу у некоторых свиней. По этой причине EA стала самым большим препятствием для клинической реализации трансплантации кардиомиоцитов человека (12).

[00190] Поскольку свинья показывает повышенную чувствительность к ЕА и поскольку является хорошо зарекомендовавшей себя моделью в исследованиях сердечно-сосудистой системы (13) и клеточной терапии (14), большой размер которой позволяет использовать катетеры для чрескожной доставки, подходы для снижения риска и последствий ЕА были испытаны на этой крупной животной модели. На первой стадии исследования проводили скрининг группы антиаритмических средств. Амiodарон и ивабрадин были признаны независимо друг от друга как наиболее многообещающие лекарственные средства для контроля ритма и частоты сердечных сокращений, соответственно. Вторую стадию исследования проводили для определения эффекта комбинированного лечения амiodароном и ивабрадином. Представляет интерес тот факт, что этот режим уменьшал частоту внезапной сердечной смерти, а также подавлял тахикардию и аритмию.

Способы

Продукция hESC-CM

[00191] В этом исследовании использовали две линии hESC. Исходным субъектам вводили кардиомиоциты, полученные из H7 (WiCell), которые культивировали, размножали и дифференцировали в суспензионной культуре, как описано ранее (8, 9, 15). Большинство испытуемых получали кардиомиоциты, полученные RUES2 (Университет Рокфеллера), в формате перемешиваемой суспензионной культуры. Кратко, hESC RUES2 культивировали с образованием агрегатов и размножали в коммерчески доступных средах (Gibco Essential 8). Для сердечной дифференцировки адаптированные к суспензии плюрипотентные агрегаты индуцировали для дифференцировки в RPMI-1640 (Gibco), MCDB-131 (Gibco) или M199 (Gibco) с добавлением B-27 (Gibco) или сывороточного альбумина путем временного использования низкомолекулярных ингибиторов GSK-3 и ингибиторов сигнального пути Wnt/ β -катенина (Tocris). За 24 часа до криоконсервации hESC-CM RUES2 подвергали тепловому шоку для повышения их выживаемости после сбора, криоконсервации, оттаивания и трансплантации. Агрегаты кардиомиоцитов диссоциировали обработкой Liberase TH (Fisher) и TrypLE (Gibco) и криоконсервировали в CryoStor CS10 (Stem Cell Technologies) с добавлением 10 мкМ Y-27632 (Stem Cell Technologies) с применением морозильной камеры с жидким азотом с регулируемой скоростью. Приблизительно за 3 ч до трансплантации криоконсервированные hESC-CM извлекали из криогенного хранилища (от -150°C до -196°C) и оттаивали на водяной бане при 37°C (2 мин $\pm$ 30 с). RPMI-1640 с добавлением B-27 и ≥ 200 единиц Кунитца/мл ДНКазы I (Millipore) добавляли к клеточной суспензии для разбавления среды для криоконсервации.

Последующие стадии промывки проводили с использованием базовой среды RPMI-1640 в постепенно меньших объемах для того, чтобы концентрировать клеточную суспензию. Для последней стадии центрифугирования клеточный осадок ресуспендировали в достаточном объеме RPMI-1640 до достижения целевой плотности клеток для инъекции $\sim 0,3 \times 10^9$ клеток/мл в 1,6 мл. В одном случае большую дозу клеток ресуспендировали в среде RPMI с добавлением сывороточного альбумина до плотности $0,43 \times 10^9$ клеток/мл приблизительно в 2,3 мл. Конечный объем клеточной суспензии определяли по результатам подсчета образцов, отобранных перед последней стадией центрифугирования. Подсчет клеток проводили, как описано ранее, с достижением конечной общей дозы 500×10^6 живых клеток (9).

Модель исследования

[00192] Цель этого исследования состояла в том, чтобы определить фармакологический режим для ослабления аритмий после терапии сердечной ремускуляризации. Это исследование было разработано в виде двух фаз: первая для наблюдения за естественным течением ЕА и скрининга различных антиаритмических средств на предмет эффективности, а вторая для проверки эффективности (**фиг. 16**). Все субъекты представляли собой кастрированных самцов юкатанских миниатюрных свиней массой 30–40 кг в возрасте 6–13 месяцев (S&S Farms). В фазе 1 девять субъектов подвергли сердечной ремускуляризации с помощью 500×10^6 hESC-CM, доставляемых путем прямых хирургических трансэпикардиальных инъекций или позже путем чрескожных трансэндокардиальных инъекций. За первыми четырьмя субъектами (один без инфаркта и трое с инфарктом) наблюдали для того, чтобы изучить естественное течение ЕА и установить клинические конечные точки и параметры для фазы 2 исследования лекарственного средства. Последующим пяти субъектам систематически вводили антиаритмические средства с непрерывным мониторингом электрокардиографии (ЭКГ) для определения влияния на ритм и частоту (**таблица 2**). Среди девяти субъектов в фазе 1 наблюдали высокую смертность: у шести из девяти развилось мерцание желудочков (VF) или сердечная недостаточность, вызванная тахикардией, что потребовало эвтаназии. VF была связана с частыми неустойчивыми эпизодами нестабильной ЕА >350 ударов в минуту (bpm) и сердечной недостаточностью с хронически повышенной частотой сердечных сокращений >150 ударов в минуту, которая может быть вызвана тахикардией. Основываясь на многообещающих результатах Фазы 1, Фазу 2 начинали как проспективное пилотное испытание лекарственного средства для предотвращения смертности, связанной с ЕА.

Таблица 2. Лекарственное средство, доза и эффекты

Лекарственное средство	Доза	Эффект
Лидокаин (Ib)	100 мг IV	Умеренный эффект HR, редко кардиоверсия
Флекаинид (Ic)	2 мг/кг PO, 4 мг/кг PO, 6 мг/кг PO, 10 мг/кг PO	Нет ответа на бремя HR или EA
Пропафенон (Ic)	1 мг/кг IV, 2 мг/кг IV, 3 мг/кг IV	Нет ответа на HR, транзиторная кардиоверсия *
Амиодарон (III)	150 мг IV	Умеренный эффект HR, частая кардиоверсия
Соталол (III)	1 мг/кг PO, 2 мг/кг PO, 4 мг/кг PO	Нет ответа на бремя HR или EA
Метопролол (β_1AR)	5 мг IV, 25 мг PO BID, 50 мг PO BID, 75 мг PO BID	Умеренный эффект HR (IV только), нет ответа на бремя EA
Ивабрадин (I_f)	2,5 мг PO, 5 мг PO BID, 10 мг PO BID, 15 мг BID; 1 мг/кг IV, 2 мг/кг IV	Сильный дозозависимый эффект HR (только пероральный прием)**, нет ответа на бремя EA

* Тяжелую тошноту/рвоту наблюдали при применении в терапевтических дозах, что ограничивало клиническое применение

** Тяжелая брадикардия

Сокращения: β_1 AR- β_1 -адренорецептор, BID-два раза в день, HR-частота сердечных сокращений, EA-аритмия, связанная с приживлением трансплантата; I_f-f-ток, PO-перорально, RyR₁-рианодиновый рецептор 1, VT-желудочковая тахикардия

[00193] На 2-ой фазе проводили антиаритмическое исследование с двумя лекарственными средствами, амиодароном и ивабрадином, в которое включали еще 15 субъектов (семь с лечением, шесть без лечения и два с ложным трансплантатом), перенесших МИ и чрескожную ремускуляризацию hESC-СМ через две недели после МИ. Двух дополнительных субъектов подвергали МИ с инъекцией носителя для того, чтобы они служили в качестве ложных контролей трансплантата (фиг. 16, фиг. 17). В качестве первичной конечной точки определяли комбинированную сердечная смерть (либо

спонтанная смерть от аритмии или сердечной недостаточности, либо клинически направленная эвтаназия, вызванная тахикардией >350 ударов в минуту или признаками сердечной недостаточности). Предварительно заданными вторичными конечными точками были подавление тахикардии, процент времени аритмии (бремя аритмии) и исключение аритмии, называемое электрическим созреванием и определяемое как бремя аритмии $<25\%$ в течение 48 часов последовательно. Антиаритмическую терапию прекращали после электрического созревания или на 30-й день после трансплантации, в зависимости от того, что наступало раньше. Для того, чтобы предотвратить чрезмерную смертность, лечение титровали для поддержания целевой частоты сердечных сокращений и бремени аритмии на уровне <150 bpm и $<25\%$, соответственно. Основываясь на раннем опыте того, что тахикардия >350 bpm часто перерождалась в VF, субъектов гуманно умерщвляли, если частота сердечных сокращений достигала >350 bpm. Непрерывную телеметрическую ЭКГ контролировали в течение восьми недель (две недели после МИ и шесть недель после трансплантации). Следует отметить, что субъекты 1 и 2 (без лечения) и 3 и 4 (лечение) получали H7 hESC-CM, а субъектам 1, 2 и 3 проводили хирургическую трансплантацию перед чрескожной доставкой. Субъекта 5 подвергали эвтаназии на 37-й день в качестве заранее определенной конечной точки после электрического созревания, прежде чем продолжительность исследования была увеличена до 6 недель после трансплантации для расширенного вымывания и контроля лечения.

Содержание животных

[00194] Все протоколы были одобрены и проводились в соответствии с Управлением по защите животных Вашингтонского университета (UW) и Институциональным комитетом по уходу и использованию животных. Животные получали воду по своему усмотрению и питание два раза в день (лабораторная диета-5084 для лабораторных свиней). При хирургических процедурах анестезию вызывали комбинацией внутримышечного буторфанола, ацепромазина и кетамина. Животных интубировали и подвергали механической вентиляции с использованием изофлурана и кислорода для поддержания хирургического уровня анестезии. Показатели жизнедеятельности непрерывно контролировали на протяжении каждой процедуры. Все животные получали подкожно бупренорфин SR-Lab (ZooPharm) для послеоперационной анальгезии и подвергались эвтаназии внутривенным введением Euthasol (Virbac). Все патологоанатомические исследования проводили слепым методом сертифицированным ветеринарным патологоанатомом.

Свиная модель инфаркта миокарда

[00195] Чрескожное ишемическое/реперфузионное повреждение индуцировали, как описано ранее для NHP (9), с модификацией для свиной модели. В бедренном треугольнике делали разрез длиной 5–8 см, и бедренную артерию обнажали путем тупой диссекции. Перед получением сосудистого доступа вводили гепарин для достижения терапевтической антикоагуляции (время активированного свертывания >250 с). В бедренную артерию вводили и закрепляли систему проводника/интродьюсера 5-French (Terumo Medical). На протяжении всей процедуры контролировали непрерывную ЭКГ, инвазивное артериальное давление, пульсоксиметрию и капнографию. Внутривенно вводили амиодарон 150 мг и лидокаин 100 мг в виде однократных болюсов до ишемии, чтобы свести к минимуму риск аритмии. Под флюороскопическим контролем (OEC 9800 Plus, GE Medical Systems) катетер 5-French Judkins right 2 или косо-поперечный катетер (Boston Scientific) продвигали в восходящую аорту для избирательного захвата устья левой главной коронарной артерии. Коронарную ангиографию выполняли с помощью ручных инъекций контраста (Visipaque), и 0,035-дюймовый коронарный проводник (Runthrough NS Extra Floppy, Terumo Medical) помещали в дистальный отдел левой передней нисходящей коронарной артерии (LAD). Затем баллонный катетер для ангиопластики подходящего размера помещали в середину LAD дистально относительно первой диагональной ветви артерии и надували до минимального давления, необходимого для полной обструкции дистального кровотока, что подтверждается ангиографией. Ишемию подтверждали подъемом сегмента ST на ЭКГ. Животных поддерживали под анестезией с вентиляционной и гемодинамической поддержкой в течение 90 минут, после чего баллон сдували для восстановления дистальной перфузии, что снова подтверждали рентгеноскопией и ЭКГ. Животное наблюдали на предмет реперфузионных аритмий и подвергали внешней кардиоверсии, если возникало мерцание желудочков. До выздоровления всем субъектам имплантировали устройства телеметрии и устанавливали центральный венозный катетер. Кратко, открывали наружную яремную вену в яремной борозде и вводили центральный венозный катетер 5-French (Access Technologies), который был туннелирован в дорсальную предлопаточную область. Передатчик телеметрии (ЕМКА easyTEL+) имплантировали в подкожный карман с использованием того же разреза в яремной борозде, и подкожные электроды были проложены туннелем, чтобы захватить сердце от верхней части до основания. Общая процедурная смертность, включая инфаркт, составила $<10\%$.

Терапия ремускуляризации сердца

[00196] Трансплантацию клеток трем первоначальным субъектам (1–3) проводили путем прямой трансэпикардальной инъекции в перинфарктную область, как описано ранее для NHP с небольшими изменениями (9). Кратко, проводили частичную срединную стернотомию для того, чтобы обнажить пораженную инфарктом переднюю часть левого желудочка. Кисетные швы предварительно накладывали в пяти дискретных местах, стягиваемых LAD, нацеленных на центральную область ишемии и латеральные пограничные зоны. После тугого затягивания кисетного шнура вокруг иглы проводили три инъекции по 100 мкл, каждая путем частичного извлечения и латерального перемещения, всего 15 инъекций для доставки общей дозы 500×10^6 hESC-CM. Всем последующим субъектам (4–19) трансплантировали клетки с помощью чрескожной трансэндокардиальной инъекции с использованием платформы NOGA-MyoStar (BioSense Webster), чтобы сначала составить карту области инфаркта в левом желудочке, а затем выполнить 16 дискретных эндокардиальных инъекций по 100 мкл каждая для общей дозы 500×10^6 hESC-CM. Инъекции выполняли только при отличном расположении и стабильности петли, подъеме сегмента ST и наличии преждевременного сокращения желудочков (PVC) с введением иглы в соответствующее место по электроанатомической карте и монополярному напряжению. Как при хирургической, так и при чрескожной трансплантации клеток две трети инъекций вводили в перинфарктную пограничную зону, определяемую визуально или по монополярному напряжению 5–7,5 мВ, а оставшуюся треть вводили в центральную зону ишемии, определяемую визуально или по монополярному напряжению <5 мВ. У двух субъектов (9 и 10) был инфаркт в соответствии с протоколом, но они получили ложные инъекции носителя RMI-1640 без клеток, чтобы служить в качестве ложных контролей трансплантата.

Иммуносупрессивная терапия

[00197] Все субъекты получали схему иммуносупрессии из трех лекарственных средств для предотвращения отторжения ксенотрансплантата, как описано ранее с модификацией (9). Для первоначальной схемы (субъекты 1–6) за пять дней до трансплантации клеток начинали пероральное введение циклоспорина А для поддержания минимального уровня в сыворотке >400 нг/мл (примерно 250–1000 мг два раза в день) на протяжении всего исследования. За два дня до трансплантации пероральный прием метилпреднизолона начинали с дозы 3 мг/кг в течение двух недель, затем дозу титровали до 1,5 мг/кг до конца исследования. В день трансплантации абатацепт (CTLA4-Ig, Bristol-Myers Squibb) 12,5 мг/кг вводили внутривенно и затем вводили дозу каждые две недели. Из-

за осложнений, связанных с иммуносупрессией (главным образом свиной цитомегаловирус и пневмоцистная пневмония), минимальный уровень циклоспорина А снижали до >300 нг/мл, а метилпреднизолон снижали до 1,0 мг/кг у субъектов 7–19 без гистологических признаков отторжения. Всем субъектам назначали профилактический пероральный цефалексин для предотвращения инфицирования постоянного центрального венозного катетера. После того, как у субъекта 3 развилась пневмоцистная пневмония, добавляли профилактический сульфаметоксазол/триметоприм. Профилактический валганцикловир и пробиотики добавляли после того, как у субъекта 6 была обнаружена активация эндогенного свиного цитомегаловируса.

Антиаритмическое лечение

[00198] Субъектам лечения назначали пероральный амиодарон в дозе 1000–1200 мг перорально два раза в день, начиная с семи дней до трансплантации клеток, с последующей поддерживающей дозой 400–1000 мг перорально два раза в день для поддержания стационарного уровня в плазме 1,5–4,0 мкг/мл (**фиг. 18**). Ивабрадин начинали с 2,5 мг перорально два раза в день, когда устойчивая тахикардия достигала ≥ 150 bpm, и титровали дозу каждые 3 дня до 15 мг два раза в день при целевой частоте сердечных сокращений <125 bpm. Все субъекты, кроме одного (субъект 1), нуждались в дополнительном приеме ивабрадина для дополнительного контроля частоты сердечных сокращений. Прием антиаритмических лекарственных средств прекращали после достижения электрического созревания или на 30-й день после трансплантации, в зависимости от того, что наступало раньше, чтобы обеспечить вымывание лечения и оценить рецидив аритмии. Все испытуемые переносили антиаритмический режим без осложнений. Субъекты без лечения и контрольные субъекты с ложной трансплантацией не получали антиаритмические лекарственные средства после процедуры МТ, но в остальном получали всю иммуносупрессию и стандартный уход.

Контроль лекарственного средства амиодарона

[00199] Новый анализ жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии был разработан для амиодарона для контроля стабильных уровней в сыворотке на свиной модели и определения перорального дозирования для обеспечения эффективности и предотвращения дозозависимой токсичности. Целевой уровень в сыворотке крови 1,5–4,0 мкг/мл экстраполировали на основе предыдущих исследований фармакокинетики у человека (16,17). Кинетику элиминации после прекращения пероральной терапии

амиодароном также изучали путем определения еженедельных минимальных концентраций у 6 свиней (субъекты 6, 7, 8, 13, 14, 16) (**фиг. 18**).

Анализ электрокардиографии (ЭКГ)

[00200] Телеметрическую ЭКГ непрерывно контролировали в режиме реального времени с момента инфаркта миокарда для выявления первичной конечной точки сердечной смерти или нестабильной ЕА. Автоматизированную количественную оценку частоты сердечных сокращений и бремени аритмии выполняли в автономном режиме сертифицированным кардиологом с использованием программного пакета esgAUTO 3.3.5.10 (ЕМКА Technologies). Аритмию определяли как эктопическую систолу (например, преждевременное сокращение желудочков) или ритм (например, идиовентрикулярный ритм, желудочковая тахикардия). ЕА обычно наблюдали как устойчивую и неустойчивую желудочковую тахикардию различной частоты и морфологии, но она также включала медленные и узкие сложные эктопические ритмы (**фиг. 19**). Частота сердечных сокращений и время аритмии измеряли в течение двух минут подряд каждые пять минут (подсчитывали 40% общего ритма) и представляли как среднесуточные значения.

Гистологический анализ

[00201] Гистологические исследования проводили, как подробно описано ранее, с модификацией (8,9). Кратко, сердца, фиксированные параформальдегидом, рассекали для удаления предсердий и правого желудочка, прежде чем делать поперечные срезы по короткой оси с интервалами 2,5 мм. Массы всего сердца, левого желудочка и каждого среза получали перед дальнейшим разделением на тканевые кассеты. Затем ткань обрабатывали, заливали в парафин и делали срезы толщиной 4 мкм для окрашивания. Для морфометрии области инфаркта идентифицировали окрашиванием пикросириусом красным, трансплантат человека идентифицировали с помощью анти-человеческого сердечного тропонина Т, окрашивали с использованием авидин-биотиновой реакции (ABC набор, VectorLabs) с последующей хромогенной детекцией с помощью диаминобензидина (Sigmafast, Sigma Life Science) (**фиг. 20**). Слайды оцифровывали с помощью сканера целых слайдов (Nanozoomer, Hamamatsu), и изображения просматривали и экспортировали с помощью NDP.view 2.6.13 (Hamamatsu). Области инфаркта и трансплантата анализировали с использованием специально написанного алгоритма на платформе программного обеспечения с открытым исходным кодом ImageJ (18). Кратко, после извлечения изображений в формате TIFF (19) передний план изображения сегментировали с помощью порогового значения, полученного из распределения яркости его пикселей, в результате

чего получали бинарную маску, очерчивающую отображаемый участок ткани. Последующая деконволюция цвета с помощью порогового значения оттенка, яркости и насыщенности позволила сегментировать области, окрашенные красителем Picro-Sirius Red, или области, иммуномеченные для сердечного тропонина-Т человека. Для того, чтобы отделить рубец от диффузного фиброза, применяли пороговое значение размера частиц. Размер инфаркта и размер трансплантата рассчитывали как (процент площади $\times$ вес блока), суммировали для всего желудочка и выражали в процентах от массы левого желудочка или массы инфаркта, соответственно. См. дополнительные способы окрашивания волокон Пуркинье.

Статистический анализ

[00202] Статистический анализ и построение графиков проводили с использованием программного обеспечения Prism 8.4.2 (GraphPad) и Stata 15 (StataCorp, College Station, Texas). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Сравнения проводили с использованием двустороннего t-критерия Стьюдента с порогом значимости $P < 0,05$, если не указано иное. Графики погрешностей показывают, как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего для частоты сердечных сокращений и бремени аритмии изменяется с течением времени в двух группах лечения. На графиках Каплана-Мейера показаны кривые выживаемости для первичной конечной точки сердечной смерти, нестабильной ЕА или сердечной недостаточности, а также для смертности от всех причин. Модели пропорциональной регрессии Кокса использовали для оценки отношения рисков (HR) между двумя группами лечения, для основного исхода и для смертности. Значимость основана на тесте отношения правдоподобия, а доверительные интервалы для HR вычисляют путем инвертирования теста правдоподобия на основе изменения члена смещения в процедуре stcox в Stata.

Результаты

Чрескожная доставка hESC-СМ на свиной модели инфаркта

[00203] Эндокардиальная доставка на основе катетера hESC-СМ была безопасной и эффективной для ремускуляризации сердца свиньи после инфаркта (**фиг. 20**). Значимых различий в размерах инфаркта миокарда или трансплантата кардиомиоцитов между группами лечения не наблюдали. Средний размер инфаркта для групп лечения и без лечения был сопоставимым и составлял $11,7 \pm 1,1\%$ и $10,5 \pm 2,0\%$ левого желудочка, соответственно ($p=0,59$). Размер трансплантата по отношению к размеру инфаркта также был сопоставимым: $2,3 \pm 0,7\%$ и $2,8 \pm 1,3\%$ для лечения и без лечения, соответственно

($p=0,74$). Доставка hESC-CM успешно нацелена на перинфарктную пограничную зону и центральные области ишемии, как и предполагалось, и привела к трансплантации отдельных трансплантатов hPSC-CM в миокард хозяина, как сообщалось ранее (8-11). Все трансплантаты были расположены в передней, передне-перегородочной и передне-боковой стенках и оказались структурно незрелыми в ранние сроки до 2 недель после трансплантации с увеличением зрелости к концу исследования, как ранее сообщалось для свиньи (11).

Клиническая история аритмии, связанной с приживлением трансплантата

[00204] Блок-схема для всех животных в исследовании показана на **фиг. 16**. У двух субъектов с ложной трансплантацией (9 и 10), перенесших инфаркт миокарда и чрескожно внутрисердечную инъекцию носителя, не было отмечено значительных аритмий. У всех субъектов, получивших трансплантаты кардиомиоцитов человека, развилась ЕА между 2 и 6 днями после трансплантации клеток. Начало ЕА характеризовалось сериями неустойчивых VT, которые обычно прогрессировали до периодов устойчивых VT с частотой от 110 до 250 bpm (**фиг. 19**). VT часто была полиморфной: у одного и того же животного в разное время проявлялись разные электрические оси и тахикардия как с широкими, так и с узкими комплексами. У 4 из 8 животных без лечения ЕА была либо фатальной, либо потребовала эвтаназии из-за заранее определенной конечной точки нестабильной тахикардии (определяемой как устойчивая частота сердечных сокращений >350 bpm). В одном дополнительном случае без лечения (субъект 12) острая сердечная недостаточность была клинически отмечена вскоре после начала ЕА с частотой 300 bpm, и на основании рекомендаций ветеринарного персонала субъект был подвергнут эвтаназии. Признаки сердечной недостаточности впоследствии были подтверждены при вскрытии. Во всех остальных случаях ЕА отмечалась с быстрым ускорением до >350 bpm (субъекты 11 и 12) и в двух случаях с ухудшением до VF перед эвтаназией (субъекты 1 и 2) (**Таблица 3**). Три из четырех аритмических конечных точек произошли в течение первых трех дней развития ЕА, и они произошли, когда тахикардия была почти постоянной. Средняя частота сердечных сокращений достигала пика на 8-й день после трансплантации и начинала снижаться после этого, в то время как бремя аритмии стабилизировалось с 8-го по 16-й день и затем начало нормализоваться. Из трех выживших в группе без лечения у двоих ритм не нормализовался, и в конце исследования у них наблюдали в среднем 42% бремя аритмии (субъекты 15 и 17). Единственный субъект в группе без лечения, у которого нормализовались частота сердечных сокращений и ритм, показал это на 26-й день после трансплантации (субъект 11).

Таблица 3. Результаты субъектов

Субъект	Возраст – лет	Масса – кг	М	Клеточная линия	Подход	cTnT – %	Жизнеспособность – %	Размер инфаркта – %LV	Размер трансплантата – %инфаркта	HR – bpm		Бремя аритмии – % от дня		Исход
										день 7	день 30	день 7	день 30	
Лечение														
3	7,7	34,7	Да	H7	Surg	98%	89%	–	–	72,8	n/a	2,0	n/a	Эвтаназия, день 26 (PCP) Выживание Выживание Эвтаназия, день 19 (pCMV) Выживание Выживание Выживание Выживание Выживание
4	7,6	32,0	Да	H7	Perc	98%	89%	–	–	92,7	93,9	86,0	97,8	
5	7,9	33,0	Да	RUE S2	Perc	91%	89%	–	–	162,6	80,9	25,6	0,5	
6	7,7	33,4	Да	RUE S2	Perc	91%	90%	10,1%	1,4%	99,6	n/a	47,1	n/a	
7	7,7	37,0	Да	RUE S2	Perc	91%	93%	9,6%	0,3%	89,4	78,6	45,8	28,2	
8	10,0	33,5	Да	RUE S2	Perc	86%	88%	15,9%	3,4%	72,8	77,4	67,6	4,7	
15	9,0	33,0	Да	RUE S2	Perc	89%	88%	10,9%	4,2%	79,4	75,7	35,4	44,9	
16	8,8	34,0	Да	RUE S2	Perc	88%	85%	14,6%	0,7%	74,2	68,6	43,9	7,6	
18	12,7	32,5	Да	RUE S2	Perc	94%	75%	9,3%	3,7%	69,0	78,2	1,6	1,6	
Avg± SEM	8,8±0,6	33,7±0,5				90±1 %	87±2 %	11,7±1,1 %	2,3±0,7 %	90,3±9,7	79±2,9	39,5±9,2	26,5±13,4	
Без лечения														
1	8,9	32,0	Нет	H7	Surg	98%	88%	–	–	328,2	n/a	100,0	n/a	Первичная конечная точка день 7 (VF) Первичная конечная точка день 18 (VF) Первичная конечная точка день 12 (EA) Первичная конечная точка день 5 (EA) Выживание
2	10,5	32,0	Да	H7	Surg	98%	90%	–	–	120,2	n/a	62,7	n/a	
11	9,4	33,5	Да	RUE S2	Perc	82%	87%	9,7%	1,1%	165,6	n/a	94,0	n/a	
12	9,5	35,0	Да	RUE S2	Perc	86%	90%	13,2%	1,0%	n/a	n/a	n/a	n/a	
13	9,7	35,5	Да	RUE S2	Perc	87%	83%	16,5%	1,7%	162,0	82,6	95,9	1,9	

14	9,0	33,0	Да	RUE S2	Perc	87%	90%	4,6%	9,1%	n/a	n/a	n/a	n/a	Первичная конечная точка день 6 (ЕА/НФ) Выживание
17	7,0	33,0	Да	RUE S2	Perc	98%	70%	13,5%	0,4%	106,0	115,2	49,1	75,7	Выживание
19	6,4	33,5	Да	RUE S2	Perc	92%	74%	5,4%	3,6%	98,5	84,3	71,5	51,7	Выживание
Avg±	8,8±	33,4±0,4				91±2	84±3%	10,5±2%	2,8±1,3	163,4±	94±10,6	78,9	43,1±21,7	
SEM	0,5					%			%	34,9		±8,5		
P-значение†	0,97	0,73				0,77	0,31	0,59	0,74	0,03	0,09	0,01	0,52	
Ложная трансплантация														
9	8,30	33,5	Да	RUE S2	Perc	n/a	n/a	–	n/a	71,5	67,6	0,8	0,0	Выживание
10	7,77	33,0	Да	RUE S2	Perc	n/a	n/a	–	n/a	76,5	69,4	1,2	0,8	Выживание
Avg±	8,0±	33,3±0,3								74±2,5	68,5±0,9	1,0±	0,4±0,4	
SEM	0,3											0,2		

† Лечение по сравнению с отсутствием лечения

Аббревиатуры: bpm -удары в минуту, ЕА-аритмия, связанная с приживлением трансплантата, hESC-СМ- кардиомиоциты, полученные из эмбриональных стволовых клеток человека, HF-сердечная недостаточность, HR- частота сердечных сокращений, МІ-инфаркт миокарда, surg-хирургический, РСР-пневмоцистная пневмония; рCMV- свиной цитомегаловирус, перс-чрескожный, VF-мерцание желудочков

Скрининг лекарственных средств на предмет антиаритмического действия

[00205] В фазе 1 исследования проводили скрининг шести канонических антиаритмических средств, широко воздействующих на натриевые каналы, калиевые каналы и бета-адренорецепторы: лидокаин (Ib, ингибитор натриевых каналов), флекаинид (Ic, ингибитор натриевых каналов), пропафенон (Ic, ингибитор натриевых каналов), амиодарон (III, ингибитор калиевых каналов), соталол (III, ингибитор калиевых каналов) и метопролол (ингибитор β 1-адренергических рецепторов) для воздействия на частоту сердечных сокращений и ритм ЕА. Кроме того, исследовали антагонист f-тока/HCN4 канала ивабрадин (**Таблицы 1 и 2**). Эта серия не должна была быть окончательной, а скорее предназначалась для быстрого выявления агентов-кандидатов. Животных доставляли в лабораторию в состоянии ЕА, анестезировали и изучали эффекты кратковременного внутривенного введения антиаритмических средств. В трех случаях внутривенное введение амиодарона успешно привело к кардиоверсии неустойчивой ЕА от >350 bpm до более низкой частоты сердечных сокращений, как правило, до синусового ритма, хотя и ненадолго (**фиг. 21А**). Пероральный ивабрадин продемонстрировал сильное дозозависимое

воздействие на частоту сердечных сокращений, но не восстанавливал синусовый ритм (**фиг. 21В**). Пять других лекарственных средств не показали значительного эффекта в этом скрининге (лидокаин, флекаинид, соталол и метопролол). Пропафенон ненадолго снижал частоту сердечных сокращений и восстанавливал синусовый ритм при двух воздействиях лекарственными средствами, но это лекарственное средство было связано со значительной желудочно-кишечной токсичностью и не изучалось в дальнейшем (данные не представлены).

Амиодарон-ивабрадин повышает выживаемость

[00206] Предполагали, что хроническое применение амиодарона в сочетании с ивабрадином уменьшит комбинированную первичную конечную точку сердечной смерти, неустойчивой $EA > 350$ bpm и сердечной недостаточности во 2 фазе исследования. Всего в исследование были включены девять субъектов подвергавшихся лечению, восемь субъектов не подвергавшихся лечению и два субъекта с ложной трансплантацией с аналогичными подобными исходными уровнями и характеристиками трансплантации клеток (**Таблица 3**). Как подробно описано в разделе «Способы», животные с лечением получали болюсные и поддерживающие дозы амиодарона, а ивабрадин вводили по мере необходимости для поддержания частоты сердечных сокращений < 150 bpm. Все субъекты лечения (100%) выжили без первичной сердечной конечной точки по сравнению с 3/8 (37,5%) субъектов, не получавших лечения (**фиг. 22А**). Отношение рисков первичной конечной точки составило 0,000 (95% CI, 0,000–0,297; $p = 0,002$) при антиаритмическом лечении. Следует отметить, что у двух субъектов лечения (3 и 6) произошла несердечная смерть на 19 и 26 дни после трансплантации из-за осложнений, связанных с иммуносупрессией (пнеумоцистная пневмония и свиной цитомегаловирус, соответственно). Анализ общей выживаемости по назначению лечения также показал благоприятный эффект для группы лечения с отношением рисков 0,212 (95% CI, 0,030–1,007; $p = 0,051$) (**фиг. 22В**).

Подавление тахикардии и бремени аритмии

[00207] Объединенные и индивидуальные данные уровня у субъекта частоты сердечных сокращений и бремени аритмии приведены на **фиг. 23А-23В и 23С-23D**, соответственно. Средняя частота сердечных сокращений была значительно ниже при антиаритмическом лечении по сравнению с отсутствием лечения. Средняя частота сердечных сокращений достигала пика на 7-й день после трансплантации у животных без лечения и составляла 163 ± 35 bpm, тогда как в группе лечения частота сердечных сокращений составляла в среднем 90 ± 10 bpm ($p = 0,03$) (**Таблица 3 и фиг. 23**). Частота

сердечных сокращений у животных с лечением существенно не отличалась от нормальной частоты сердечных сокращений в состоянии покоя до МП и трансплантации (84 ± 1 bpm, $p = 0,21$). После трансплантации пиковая частота сердечных сокращений в среднем составляла 305 ± 29 ударов в минуту у животных без лечения, тогда как лечение значительно ограничивало тахикардию до 185 ± 9 ударов в минуту ($p=0,001$) (**фиг. 23Е**). Бремя аритмии определяли как процент дней, проведенных с аритмией. Лечение снизило пиковое бремя аритмии от $96,8 \pm 2,9\%$ до $76,5 \pm 7,9\%$ ($p=0,03$) (**фиг. 23F**). Никаких различий в частоте сердечных сокращений или бремени аритмии не было отмечено на 30-й день после трансплантации, поскольку большая часть аритмий были исключены независимо от лечения (**фиг. 23А-23В**) ($p=0,09$ и $p=0,52$, соответственно).

[00208] Антиаритмическое лечение было безопасно прекращено ко дню 30 у всех субъектов лечения, достигших электрического созревания без рецидива аритмии (**фиг. 23**). У двух субъектов лечения и двух субъектов без лечения (3, 4 и 15, 17, соответственно) не произошло электрического созревания, и к концу исследования у них наблюдалась выраженная аритмия. У этих четырех животных частота сердечных сокращений хорошо контролировалась независимо от лечения, и они выжили до завершения исследования. Средняя концентрация амиодарона в сыворотке была субтерапевтической и составляла $0,42 \pm 0,12$ мкг/мл в течение 1 недели после прекращения приема (**фиг. 19**).

Взаимодействие трансплантата с проводящей системой Пуркинье хозяина

[00209] Микроскопия трансплантата hESC-CM в миокарде свиньи демонстрирует взаимодействие с диффузной проводящей системой Пуркинье сердца свиньи-хозяина (**фиг. 24**). В соответствии с предыдущими сообщениями (20, 21) сетчатая сеть интрамуральных волокон Пуркинье (PF) по всему левому желудочку (**фиг. 24А**, видеоданные, которые не показаны, подтверждают сетчатую сеть по всему нативному миокарду свиньи) локализуется вблизи трансплантатов hESC-CM (**фиг. 24В**, видеоданные, которые не показаны, подтверждают, что hPSC-кардиомициты, маркированные медленным скелетным тропонином I (ssTnI), как наблюдали, взаимодействуют с коннексином 40+ волокон Пуркинье). Коннексин 40 (Cx40) специфически окрашивает щелевые контакты клеток Пуркинье (20, 22), где, как и ожидалось, наблюдается более низкое содержание саркомера и отсутствие Т-трубочек (**фиг. 25**).

Обсуждение

[00210] Интрамиокардиальная трансплантация hPSC-CM является многообещающей стратегией ремускуляризации подвергнутого инфаркту сердца и восстановления функции (2). Такая терапия для профилактики и лечения сердечной недостаточности стала бы значительным шагом вперед в решении большой неудовлетворенной потребности. Исследования на крупных животных продемонстрировали долгосрочную эффективность, но также выявили значительный сигнал безопасности транзиторных, но потенциально фатальных аритмий. Как было показано в более ранних исследованиях (9–11), ЕА является предсказуемым осложнением терапии ремускуляризации инфаркта миокарда (23). У NHP ЕА обычно проявляется в виде тахикардии с широкими комплексами и вариабельной электрической осью (8, 9), что было недавно воспроизведено у свиней в лаборатории Laflamme (11). ЕА описана в настоящем документе как полиморфная из-за наблюдаемых изменений электрической оси в виде эктопии, происходящей из разных фокусов трансплантата. Представляет интерес тот факт, что у свиной наблюдали VT с узкими комплексами, которая чередовалась с тахикардией с широкими комплексами, что не наблюдается у NHP. Без ограничения теорией, гистология нативного и трансплантированного свиного миокарда подтверждает гипотезу о том, что удары с широкими комплексами происходят от трансплантатов, контактирующих с миокардом рабочего типа с медленной проводимостью, и что удары с узкими комплексами возникают, когда трансплантаты контактируют с интрамуральными волокнами Пуркинье, которые диффузно проникают в сердце свиной (20,21). Все 17 субъектов, которым трансплантировали 500×10^6 hESC-CM, продемонстрировали значительное бремя аритмии, которая, хотя обычно является транзиторной, была связана с высокой смертностью у свиней. В этом исследовании наблюдали более высокую заболеваемость и смертность, связанные с ЕА, по сравнению с недавним исследованием Laflamme и его коллег (11). Это отражает различия у модели юкатанских миниатюрных свиней чрескожной доставки клеток или клеточного продукта. Эксперименты, описанные в настоящем документе, предполагают два основных механизма сердечной заболеваемости. Во-первых, быстрая ЕА >350 bpm может привести к фатальному мерцанию желудочков, а во-вторых, у свиней с хронической тахикардией >230 bpm обычно развивается сердечная недостаточность (24). Следовательно, первичная конечная точка включала эти параметры для того, чтобы ограничить чрезмерную смертность в антиаритмическом испытании.

[00211] Комбинированное антиаритмическое лечение с исходным амиодароном и дополнительным ивабрадином безопасно предотвращало комбинированную первичную конечную точку сердечной смерти, нестабильной ЕА и сердечной недостаточности у всех субъектов, получавших лечение, что указывает на то, что риск ЕА можно снизить с

помощью фармакологии. Лечение было связано со значительным уменьшением пиковой тахикардии и аритмии. Как только субъекты испытали устойчивое улучшение бремени аритмии, называемое электрическим созреванием, антиаритмическая терапия была успешно отменена у всех субъектов. Таким образом, кратковременное лечение амиодароном и ивабрадином повышало электрическую стабильность до тех пор, пока трансплантаты не становились менее аритмогенными.

[00212] Без ограничения теорией, механизм положительного эффекта антиаритмического лечения может быть связан с подавлением автоматизма, снижением как частоты сердечных сокращений, так и бремени аритмии. Лекарственные средства были особенно эффективны на ранней стадии ЕА, которая сопряжена с наибольшим риском ухудшения состояния до VF. Электрофизиологические исследования, проведенные на NHP (9) и свинье (11), соответственно, позволяют предположить, что этиологией VF является повышенный фокальный автоматизм, а не макрореципрокный, обычно наблюдаемый при клинической желудочковой тахикардии (25). По мере того как ЕА становилась нестабильной у животных без лечения, частота сердечных сокращений быстро увеличивалась до >350 bpm, и не исключалась возможность того, что это увеличение может быть отдельным механизмом, например, автоматическим, ведущим к повторному возникновению. Это объясняет, почему лечение успешно подавляло нестабильные и фатальные аритмии, но не могло полностью предотвратить ЕА. Эффективность ивабрадина в отношении ЕА для контроля частоты сердечных сокращений позволяет предположить, что его фармакологическая мишень, I_f -ток, переносимый каналом HCN4, который в высокой степени экспрессируется в незрелых кардиомиоцитах и hPSC-CM (26), может быть важным медиатором. Ивабрадин сам по себе никогда не излечивал ЕА, предполагая, что I_f -ток является модулятором частоты, но не единственным источником аритмии. Напротив, амиодарон хронически уменьшал бремя ЕА и явно восстанавливал синусовый ритм в некоторых экспериментах с острой инфузией (фиг. 21A-21B). Хотя амиодарон классифицируется главным образом как блокатор K^+ -каналов, хорошо известно, что он также блокирует Na^+ -каналы, Ca^{2+} -каналы и β -адренорецепторы (27). Таким образом, хотя это никоим образом не уменьшает важность открытия раскрытой в настоящем документе эффективной комбинации лекарственных средств, трудно получить представление о механизме ЕА на основании эффективности амиодарона. Исчезновение ЕА совпадает с созреванием трансплантата, полученного из стволовых клеток (8,9,28) и предполагается, что окно аритмогенности может отражать период созревания трансплантата *in vivo* до достижения состояния, более похожего на миокард хозяина (26, 29-33). Дополнительные стратегии, такие как стимулирование созревания перед трансплантацией, редактирование

генов и модулирование взаимодействия хозяин/клетка, могут обеспечить дополнительные средства контроля аритмии. Дальнейшее исследование механизма, лежащего в основе ЕА, будет ускорено посредством разработки платформ с более высокой пропускной способностью для проведения генетических, фармакологических и электрофизиологических исследований перед фенотипированием на моделях крупных животных.

[00213] Аритмия, связанная с приживлением трансплантата, является наиболее значительным препятствием для клинической реализации терапии ремускуляризации сердца. Естественная история ЕА, вытекающая из NHP и более поздних данных о свиньях, предполагает, что после исчезновения ЕА риск дальнейшей аритмии является низким. Это исследование является доказательством концепции того, что клинически значимая антиаритмическая медикаментозная терапия может успешно подавлять фатальные аритмии и контролировать тахикардию для достижения электрического покоя. Это важный шаг вперед в отношении клинической безопасности трансплантации кардиомиоцитов для ремускуляризации сердца.

[00214] Это исследование демонстрирует, что ЕА реагирует на фармакологическую супрессию. В исследовании вводили клинически значимые дозы амиодарона и ивабрадина.

Заключение

[00215] В этом исследовании с использованием свиной модели сердечной ремускуляризации инфаркта повсеместно наблюдали ЕА, которая была связана со значительной смертностью. Длительное лечение амиодароном в сочетании с дополнительным ивабрадином успешно предотвращало комбинированную первичную конечную точку, состоящую из сердечной смерти, нестабильной ЕА и сердечной недостаточности. Общая выживаемость была значительно улучшена при антиаритмическом лечении и связана с контролем частоты сердечных сокращений и ритма.

Пример 5. Дополнительные способы

Пилотный антиаритмический скрининг на свиньях

[00216] Пять свиней, перенесших инфаркт, подвергли трансплантации hESC-CM, при этом у всех была обнаружена стереотипная ЕА. Субъектам несколько раз вводили антиаритмические лекарственные средства и наблюдали за острым ответом путем непрерывного мониторинга ЭКГ. Внутривенные лекарственные средства вводили в виде болюсной дозы в течение 2 минут. Пероральные лекарственные средства вводили под непосредственным наблюдением в минимальном количестве яблок, яблочного пюре или

тыквенного пюре при ежедневном кормлении и дозировали ежедневно для повышения дозы. Между средствами был предусмотрен период вымывания, равный по меньшей мере три дня. Амиодарон вводили в качестве последнего средства для тестирования, учитывая пролонгированный период полувыведения и кинетику элиминации. Все средства протестировали на по меньшей мере двух субъектах.

Гистология волокон Пуркинье

[00217] Для получения тонких срезов ткань вырезали и обрезали до размеров 1 см × 1 см × 3 мм, мгновенно замораживали в изопентане и заливали в OCT (TissueTek). Срезы толщиной 10 мкм погружали в 100% метанол при температуре -20°C на 15 минут и окрашивали стандартным методом иммунофлуоресценции с использованием красителей, описанных ниже. Изображения получали на конфокальном микроскопе Leica SP8.

[00218] Для толстых срезов кусочки ткани размером 1 см × 1 см × 3 мм, содержащие трансплантат, инкубировали в 100% метаноле при 20°C в течение 1 часа, регидратировали (80% метанол, 60% метанол, 0% метанол, разбавляли в PBS, 15 минут инкубировали при -20°C для каждого реагента). 150 мкм срезы вырезали на вибраторе Leica VT1200s и окрашивали стандартным методом иммунофлуоресценции с использованием красителей, описанных ниже. Окрашенные срезы затем очищали с помощью BABB, как сообщалось ранее (34), и визуализировали на конфокальном микроскопе Leica SP8 с размером z-шага 1 мкм.

Окрашивание волокон Пуркинье

[00219] Срезы окрашивали следующими реагентами: Hoechst 33342 (DNA, Thermo Fisher Scientific, #62249), агглютинин зародышей пшеницы -Oregon Green (WGA, Thermo Fisher Scientific, #W6748), фаллоидин -647 (F-Actin, Thermo Fisher Scientific, #A22287), анти-коннексин 40 (Cx40, Alpha Diagnostics, #CXN40A) или анти-медленный скелетный тропонин I (ss-TnI, Novus, #NBP2-46170) с одним из двух антикроличьих вторичных антител (Alexa Fluor 555/647, Thermo Fisher Scientific, #A-31570/A-31573).

Ссылочные источники

- [00220] 1. Collaborators GBDCoD. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018;392:1736-1788.
- [00221] 2. Nakamura K, Murry CE. Function Follows Form- A Review of Cardiac Cell Therapy. *Circ J* 2019;83:2399-2412.

- [00222] 3. Caspi O, Huber I, Kehat I et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1884-93.
- [00223] 4. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007;25:1015-24.
- [00224] 5. Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ et al. Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 2012;489:322-5.
- [00225] 6. van Laake LW, Passier R, Monshouwer-Kloots J et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res* 2007;1:9-24.
- [00226] 7. Shiba Y, Filice D, Fernandes S et al. Electrical Integration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Guinea Pig Chronic Infarct Model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014;19:368-381.
- [00227] 8. Chong JJ, Yang X, Don CW et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 2014;510:273-7.
- [00228] 9. Liu YW, Chen B, Yang X et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol* 2018;36:597-605.
- [00229] 10. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T et al. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 2016;538:388-391.
- [00230] 11. Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sanchez A et al. Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias. *Stem Cell Reports* 2019;12:967-981.
- [00231] 12. Eschenhagen T, Bolli R, Braun T et al. Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation* 2017;136:680-686.
- [00232] 13. Lelovas PP, Kostomitsopoulos NG, Xanthos TT. A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2014;53:432-8.
- [00233] 14. van der Spoel TI, Jansen of Lorkeers SJ, Agostoni P et al. Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2011;91:649-58.
- [00234] 15. Chen VC, Ye J, Shukla P et al. Development of a scalable suspension culture for cardiac differentiation from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 2015;15:365-75.

- [00235] 16. Staubli M, Bircher J, Galeazzi RL, Remund H, Studer H. Serum concentrations of amiodarone during long term therapy. Relation to dose, efficacy and toxicity. *Eur J Clin Pharmacol* 1983;24:485-94.
- [00236] 17. Mostow ND, Rakita L, Vrobel TR, Noon DL, Blumer J. Amiodarone: correlation of serum concentration with suppression of complex ventricular ectopic activity. *Am J Cardiol* 1984;54:569-74.
- [00237] 18. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* 2015;82:518-29.
- [00238] 19. Deroulers C, Ameisen D, Badoual M, Gerin C, Granier A, Lartaud M. Analyzing huge pathology images with open source software. *Diagn Pathol* 2013;8:92.
- [00239] 20. Garcia-Bustos V, Sebastian R, Izquierdo M, Molina P, Chorro FJ, Ruiz-Sauri A. A quantitative structural and morphometric analysis of the Purkinje network and the Purkinje-myocardial junctions in pig hearts. *J Anat* 2017;230:664-678.
- [00240] 21. Panescu D, Kroll M, Brave M. Limitations of animal electrical cardiac safety models. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2014;2014:6483-6.
- [00241] 22. Pallante BA, Giovannone S, Fang-Yu L et al. Contactin-2 expression in the cardiac Purkinje fiber network. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;3:186-94.
- [00242] 23. Yu JK, Franceschi W, Huang Q, Pashakhanloo F, Boyle PM, Trayanova NA. A comprehensive, multiscale framework for evaluation of arrhythmias arising from cell therapy in the whole post-myocardial infarcted heart. *Sci Rep* 2019;9:9238.
- [00243] 24. Chow E, Woodard JC, Farrar DJ. Rapid ventricular pacing in pigs: an experimental model of congestive heart failure. *Am J Physiol* 1990;258:H1603-5.
- [00244] 25. Josephson M, Marchlinski F, Buxton A et al. Electrophysiologic basis for sustained ventricular tachycardia: role of reentry. *Tachycardias: Mechanisms, Diagnosis, Treatment* Philadelphia, Pa: Lea and Febiger 1984:305-323.
- [00245] 26. Karbassi E, Fenix A, Marchiano S et al. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol* 2020.
- [00246] 27. Waks JW, Zimetbaum P. Antiarrhythmic Drug Therapy for Rhythm Control in Atrial Fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2017;22:3-19.
- [00247] 28. Kadota S, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. In Vivo Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Neonatal and Adult Rat Hearts. *Stem Cell Reports* 2017;8:278-289.
- [00248] 29. Marchiano S, Bertero A, Murry CE. Learn from Your Elders: Developmental Biology Lessons to Guide Maturation of Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Pediatr Cardiol* 2019;40:1367-1387.

- [00249] 30. Guo Y, Pu WT. Cardiomyocyte Maturation: New Phase in Development. *Circ Res* 2020;126:1086-1106.
- [00250] 31. Kannan S, Kwon C. Regulation of cardiomyocyte maturation during critical perinatal window. *J Physiol* 2020;598:2941-2956.
- [00251] 32. Maroli G, Braun T. The long and winding road of cardiomyocyte maturation. *Cardiovasc Res* 2020.
- [00252] 33. Ichimura H, Kadota S, Kashiwara T et al. Increased predominance of the matured ventricular subtype in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in vivo. *Sci Rep* 2020;10:11883.
- [00253] 34. El-Nachef D, Oyama K, Wu YY, Freeman M, Zhang Y, MacLellan WR. Repressive histone methylation regulates cardiac myocyte cell cycle exit. *J Mol Cell Cardiol* 2018;121:1-12.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или облегчения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, у субъекта-реципиента сердечного трансплантата кардиомиоцитов, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества амиодарона и эффективного количества ивабрадина.

2. Способ по п. 1, где сердечный трансплантат кардиомиоцитов содержит дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты.

3. Способ по п. 2, где дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты дифференцированы из индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток или из эмбриональных стволовых (ES) клеток.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где сердечный трансплантат кардиомиоцитов получают из стволовых клеток, аутологичных по отношению к субъекту.

5. Способ по любому из пп. 1-3, где сердечный трансплантат кардиомиоцитов получают из стволовых клеток, аллогенных по отношению к субъекту.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где амиодарон и ивабрадин вводят одновременно с сердечным трансплантатом кардиомиоцитов.

7. Способ по любому из пп. 1-5, где введение амиодарона начинают до введения сердечного трансплантата кардиомиоцитов.

8. Способ по любому из пп. 1-5, где введение ивабрадина начинают до введения сердечного трансплантата кардиомиоцитов.

9. Способ по любому из пп. 1-5, где введение как амиодарона, так и ивабрадина начинают до введения сердечного трансплантата кардиомиоцитов.

10. Способ по любому из пп. 1-5, где введение ивабрадина начинают одновременно с введением сердечного трансплантата кардиомиоцитов или после него.

11. Способ по любому из пп. 1-5, где введение амиодарона начинают одновременно с введением сердечного трансплантата кардиомиоцитов или после него.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где введение амиодарона представляет собой однократное болюсное введение.

13. Способ по любому из пп. 1-11, где введение представляет собой непрерывное или повторяющееся введение.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где введение представляет собой пероральное введение и/или внутривенную инъекцию.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где амиодарон вводят перорально при дозе 100-800 мг три раза в день.

16. Способ по любому из пп. 1-14, где амиодарон вводят посредством IV болюса при дозе 100-300 мг.

17. Способ по любому из пп. 1-15, где амиодарон вводят до концентрации в сыворотке от 1,5 до 2,5 мкг/мл.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где ивабрадин вводят перорально при дозе от 5 до 15 мг два раза в день.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где ивабрадин вводят при тахикардии.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где ивабрадин вводят для поддержания частоты сердечных сокращений в состоянии покоя менее или равной 150 ударов в минуту (bpm).

21. Способ по любому из пп. 1-20, где введение амиодарона и ивабрадина снижает учащенное сердцебиение после трансплантации, наблюдаемое у реципиента трансплантата, на по меньшей мере 10% по сравнению с субъектом, получающим трансплантат клеток того же типа без введения амиодарона и ивабрадина.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где введение амиодарона и ивабрадина сокращает долю времени, в течение которого субъект страдает аритмией, связанной с приживлением трансплантата, на по меньшей мере 10% по сравнению с субъектом, получающим сердечный трансплантат кардиомиоцитов того же типа кардиомиоцитов без введения амиодарона и ивабрадина.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где введение амиодарона и ивабрадина является кратковременным.

24. Способ по любому из пп. 1-22, где введение амиодарона и ивабрадина прекращают после того, как бремя аритмии, связанной с приживлением трансплантата, достигает нуля, без рецидива аритмии.

25. Способ трансплантации кардиомиоцитов, причем способ предусматривает:

а) введение дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов в сердечную ткань субъекта, нуждающегося в этом;

б) введение субъекту количества амиодарона и количества ивабрадина, эффективного для уменьшения аритмии, связанной с приживлением трансплантата, у субъекта.

26. Способ по п. 25, где аритмия, связанная с приживлением трансплантата, уменьшается у субъекта по сравнению с субъектом, получающим дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты без введения амиодарона и ивабрадина.

27. Способ по любому из пп. 25 или 26, где дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты дифференцированы *in vitro* из эмбриональных стволовых клеток или из iPS клеток.

28. Способ по п. 27, где iPS клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

29. Способ по п. 27, где iPS клетки являются аллогенными по отношению к субъекту.

30. Способ по любому из пп. 25-29, где амиодарон и ивабрадин вводят одновременно с дифференцированными *in vitro* кардиомиоцитами.

31. Способ по любому из пп. 25-29, где введение амиодарона начинают до введения дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов.

32. Способ по любому из пп. 25-29, где введение ивабрадина начинают до введения дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов.

33. Способ по любому из пп. 25-29, где введение как амиодарона, так и ивабрадина начинают до введения дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов.

34. Способ по любому из пп. 25-29, где введение ивабрадина начинают одновременно с введением дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов или после него.

35. Способ по любому из пп. 25-29, где введение амиодарона начинают одновременно с введением дифференцированных *in vitro* кардиомиоцитов или после него.

36. Способ по любому из пп. 25-35, где введение ивабрадина представляет собой однократное болюсное введение.

37. Способ по любому из пп. 25-36, где введение представляет собой непрерывное или повторяющееся введение.

38. Способ по любому из пп. 25-37, где введение представляет собой пероральное введение и/или внутривенную (IV) инъекцию.

39. Способ по любому из пп. 25-38, где амиодарон вводят перорально при дозе 100-800 мг три раза в день.

40. Способ по любому из пп. 25-39, где амиодарон вводят посредством IV болюса при дозе 100-300 мг.

41. Способ по любому из пп. 25-40, где амиодарон вводят до концентрации в сыворотке от 1,5 до 2,5 мкг/мл.

42. Способ по любому из пп. 25-41, где ивабрадин вводят перорально при дозе от 5 до 15 мг два раза в день.

43. Способ по любому из пп. 25-42, где ивабрадин вводят при тахикардии.

44. Способ по любому из пп. 25-43, где ивабрадин вводят для поддержания частоты сердечных сокращений в состоянии покоя менее или равной 150 ударов в минуту (bpm).

45. Способ по любому из пп. 25-44, где введение амиодарона и ивабрадина является кратковременным.

46. Способ по любому из пп. 25-45, где введение амиодарона и ивабрадина прекращают после того, как бремя аритмии, связанной с приживлением трансплантата, достигает нуля, без рецидива аритмии.

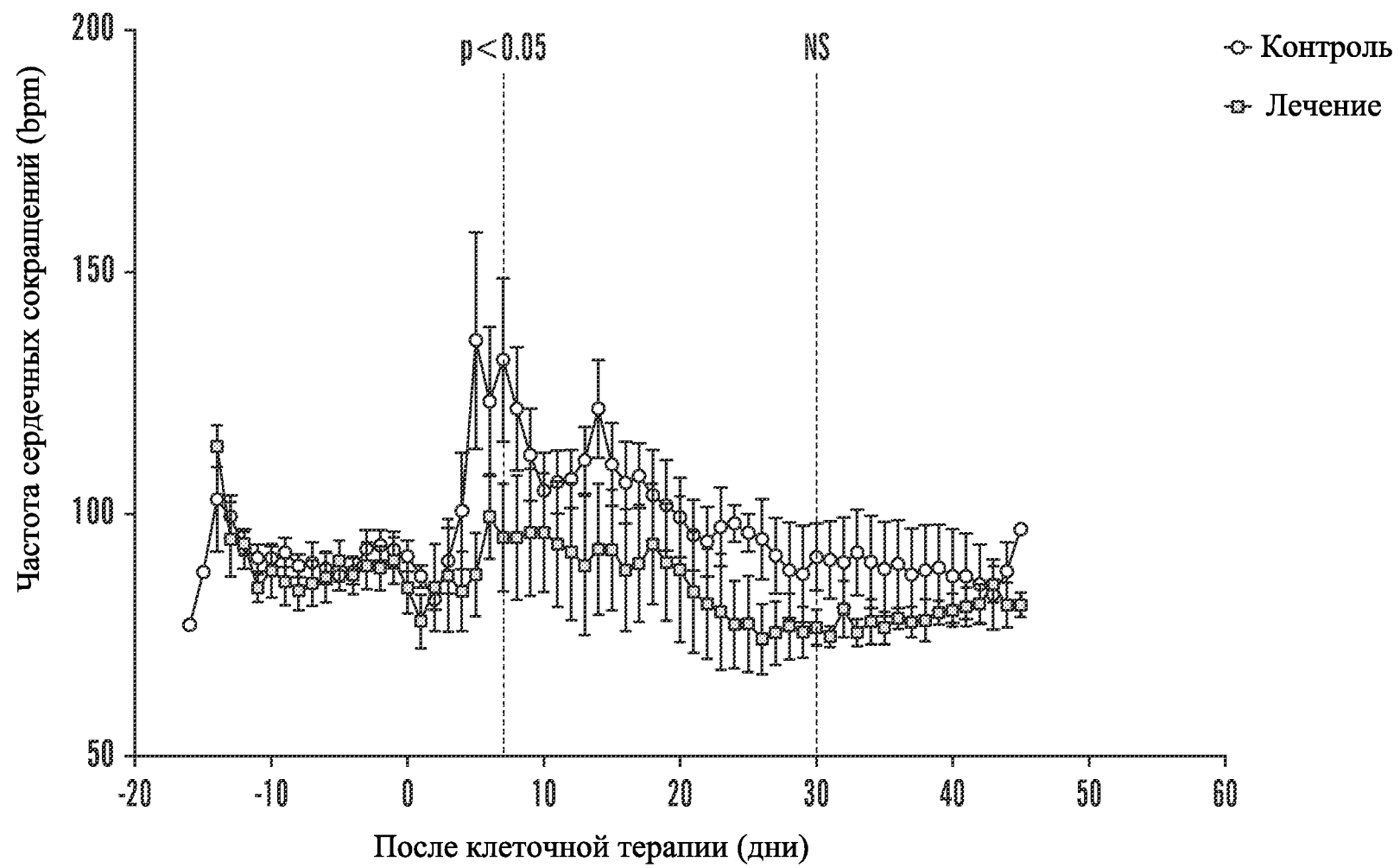
47. Способ по любому из пп. 1-46, где приблизительно от 10 миллионов кардиомиоцитов до приблизительно 10 миллиардов кардиомиоцитов вводят субъекту.

48. Способ по любому из пп. 1-47, где субъектом является человек.

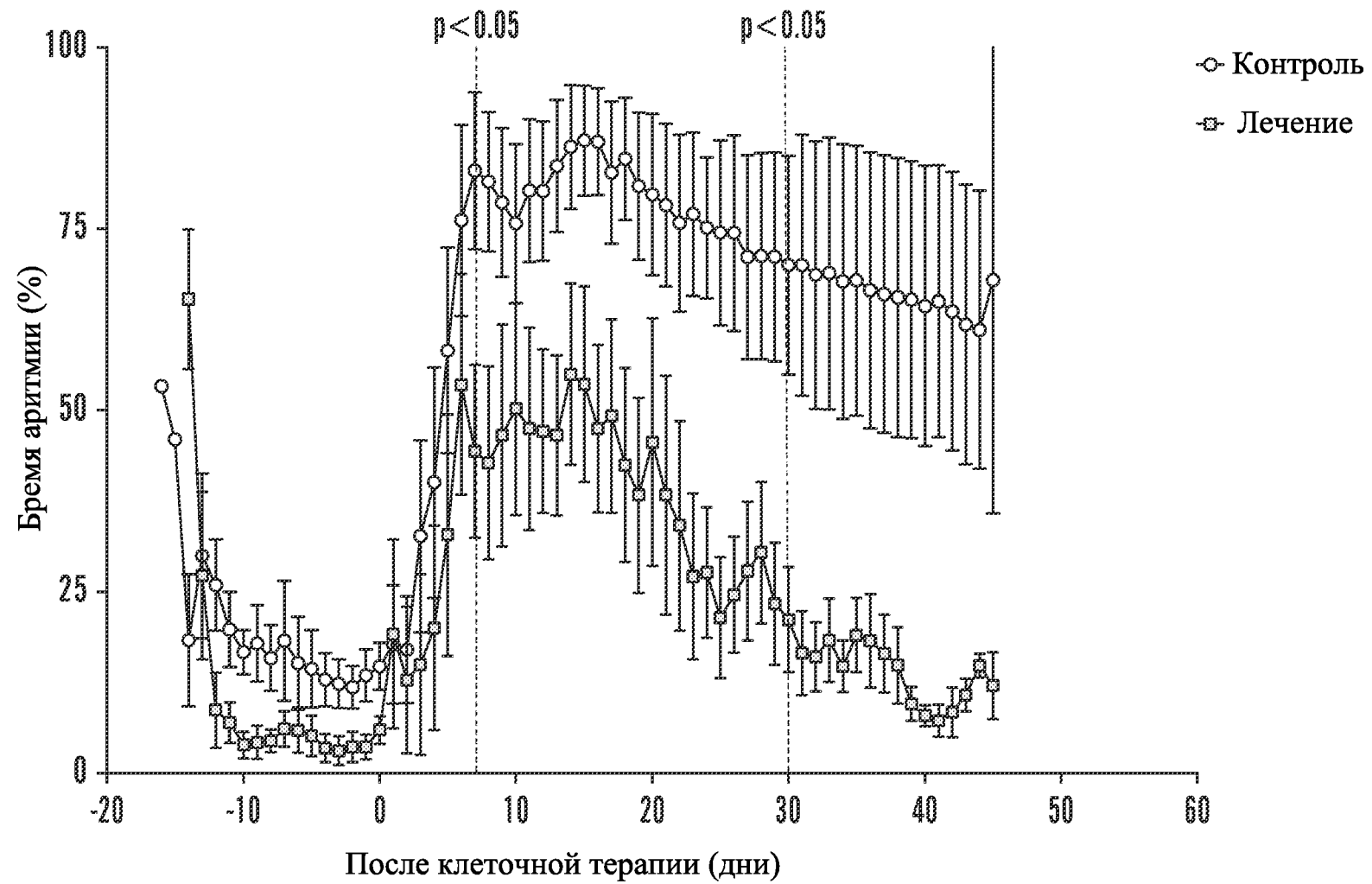
49. Способ по любому из пп. 1-48, где субъект страдает или имеет риск развития сердечно-сосудистого заболевания или сердечного приступа.

50. Способ по п. 49, где сердечно-сосудистое заболевание или сердечный приступ выбран из группы, состоящей из атеросклеротической болезни сердца, инфаркта миокарда, кардиомиопатии, аритмии сердца, стеноза клапана, врожденного порока сердца, хронической сердечной недостаточности, регургитации, ишемической болезни, мерцания и полиморфной желудочковой тахикардии.

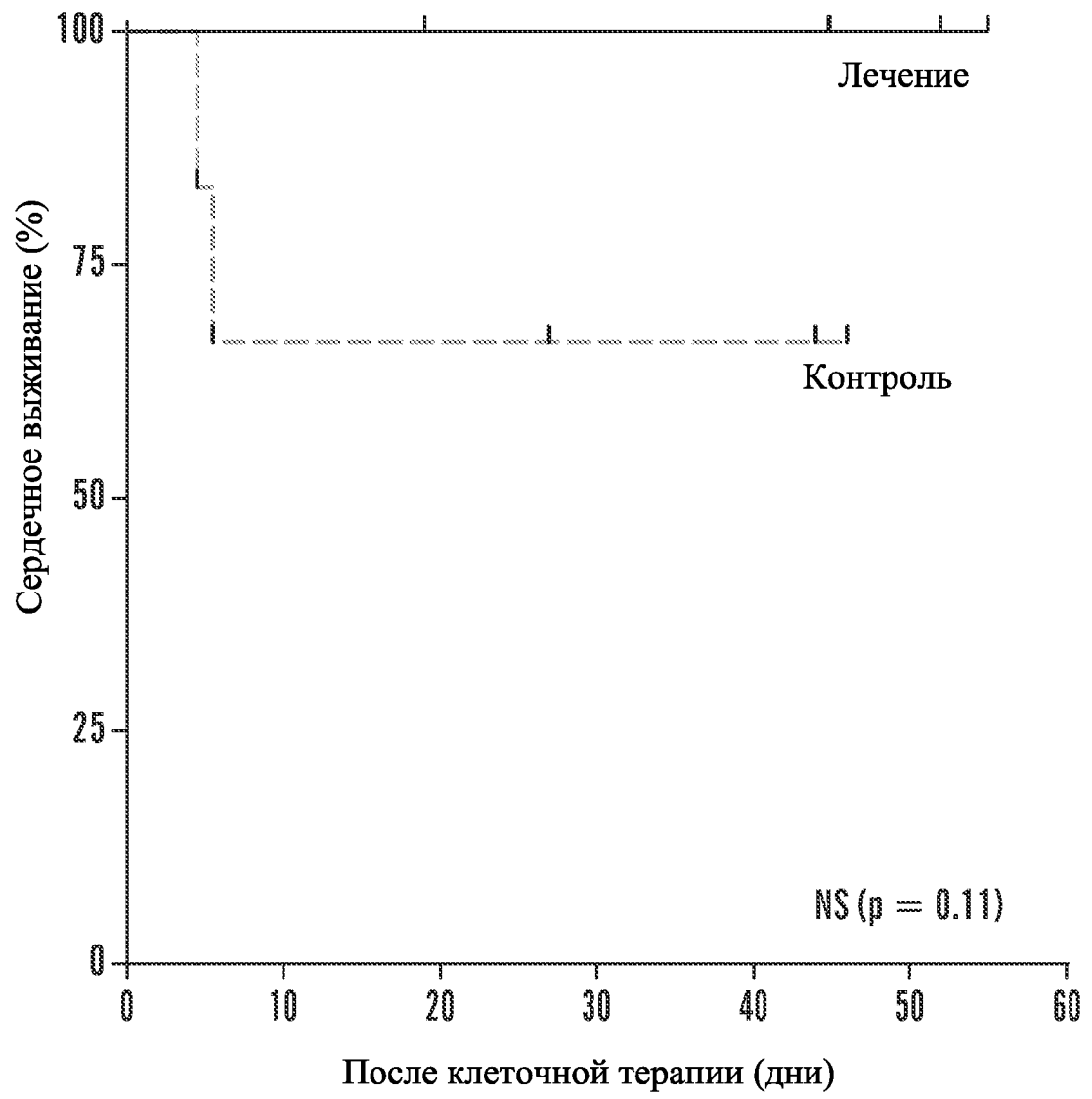
51. Композиция, содержащая дифференцированные *in vitro* кардиомиоциты, амиодарон и ивабрадин.



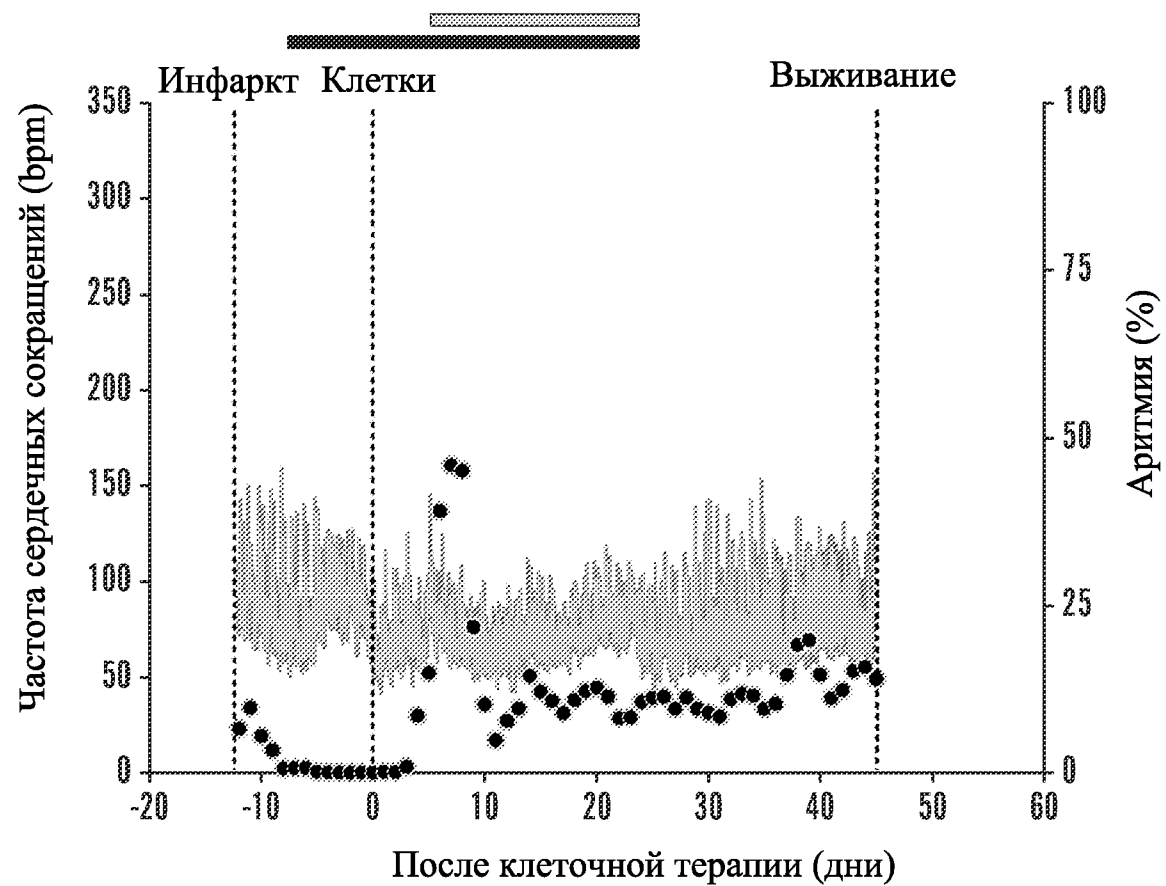
Фиг. 1А



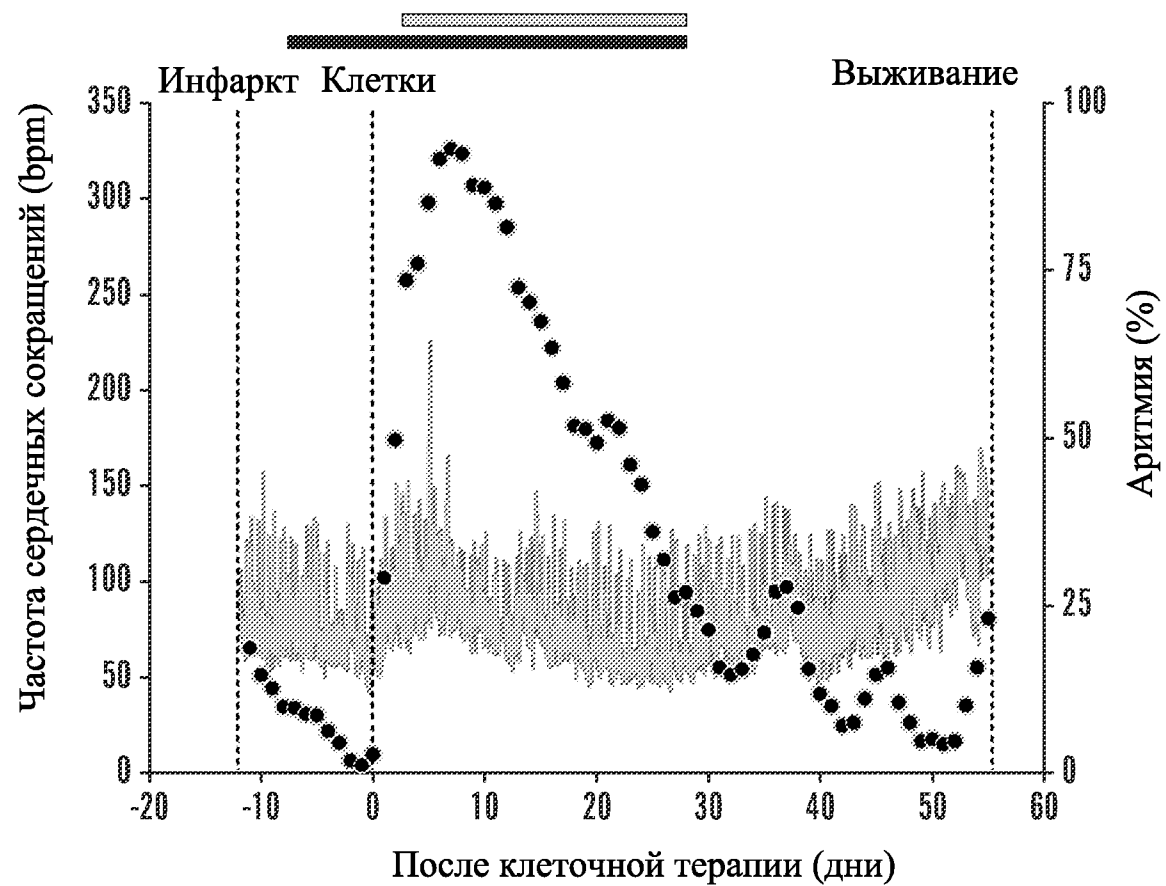
Фиг. 1В



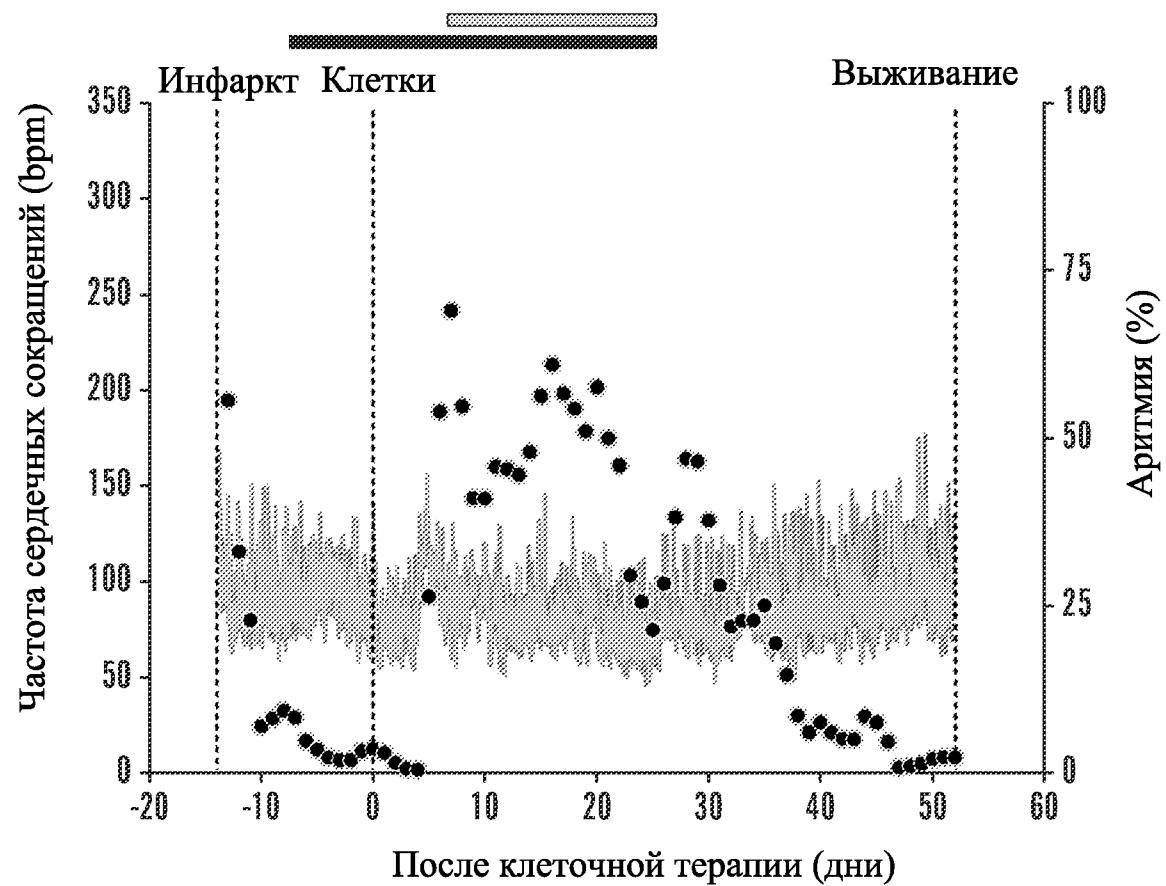
Фиг. 2



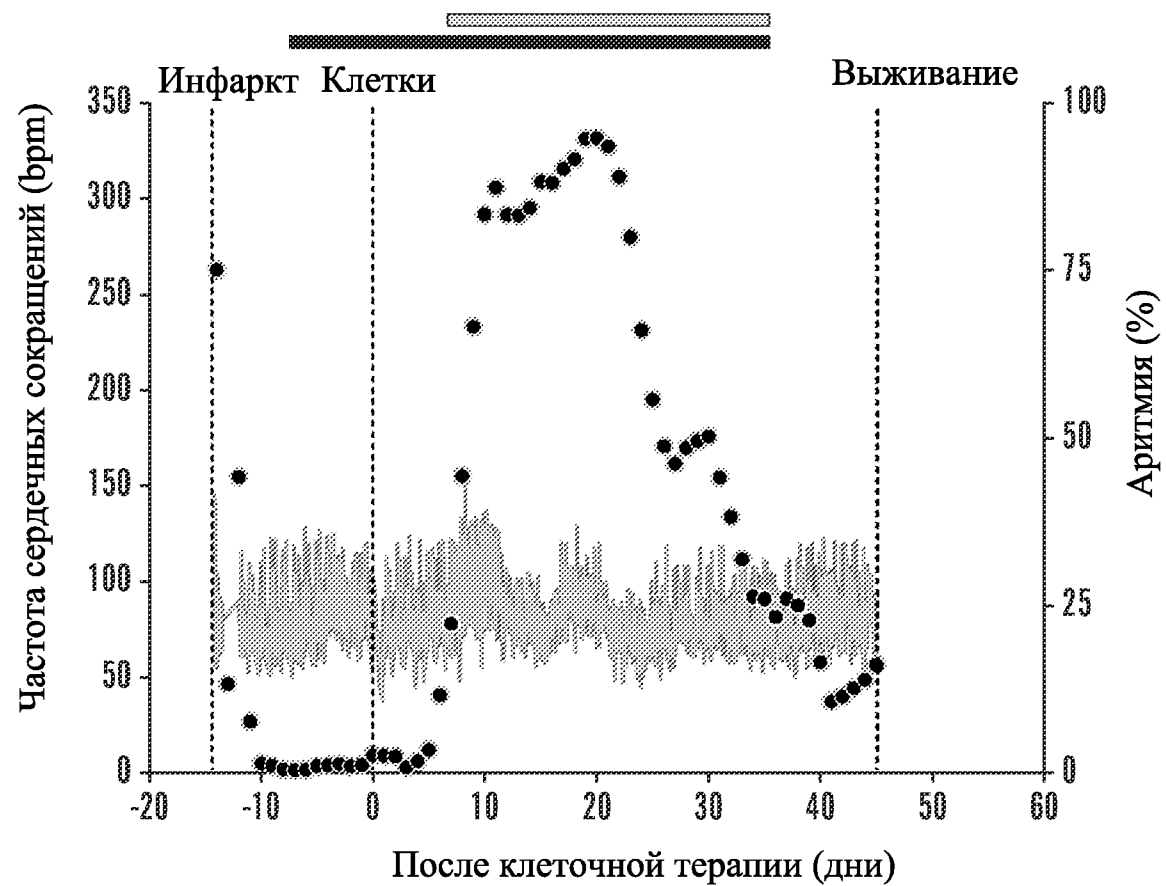
Фиг. 3



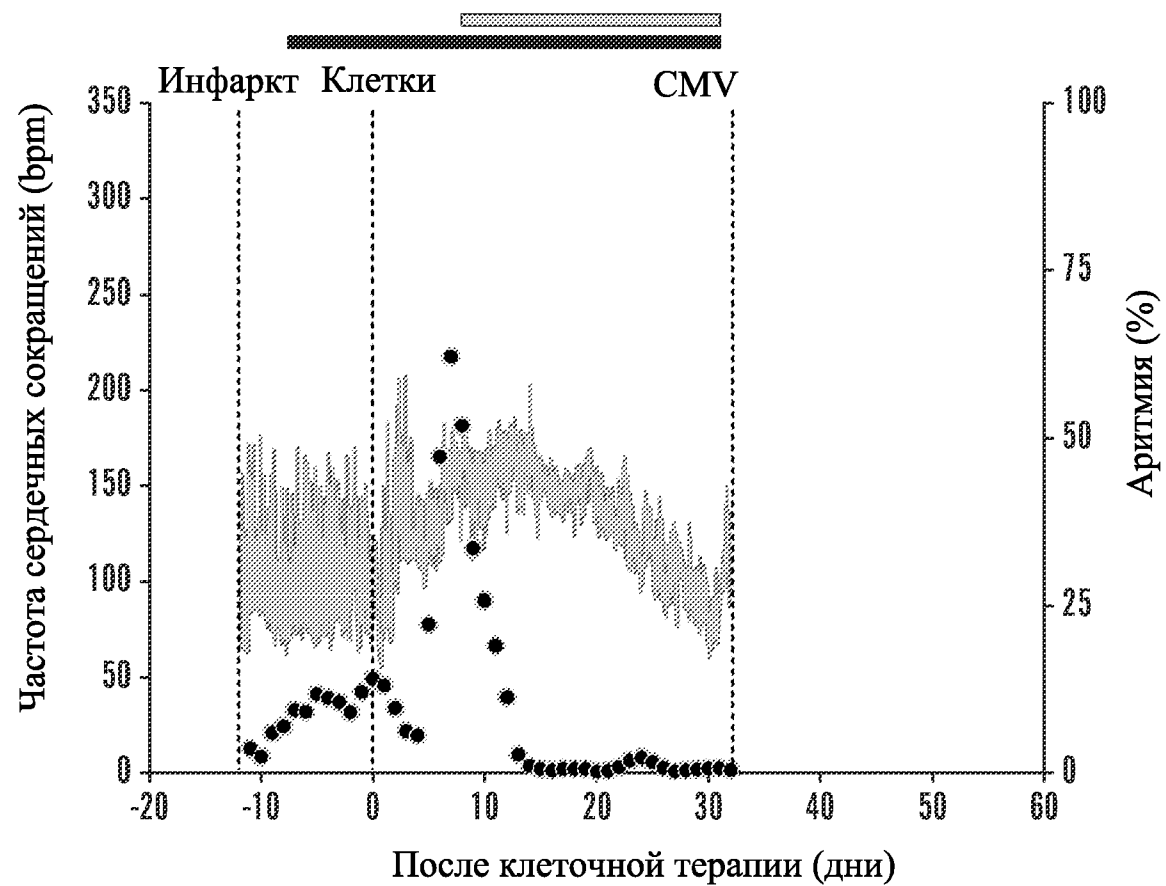
Фиг. 4



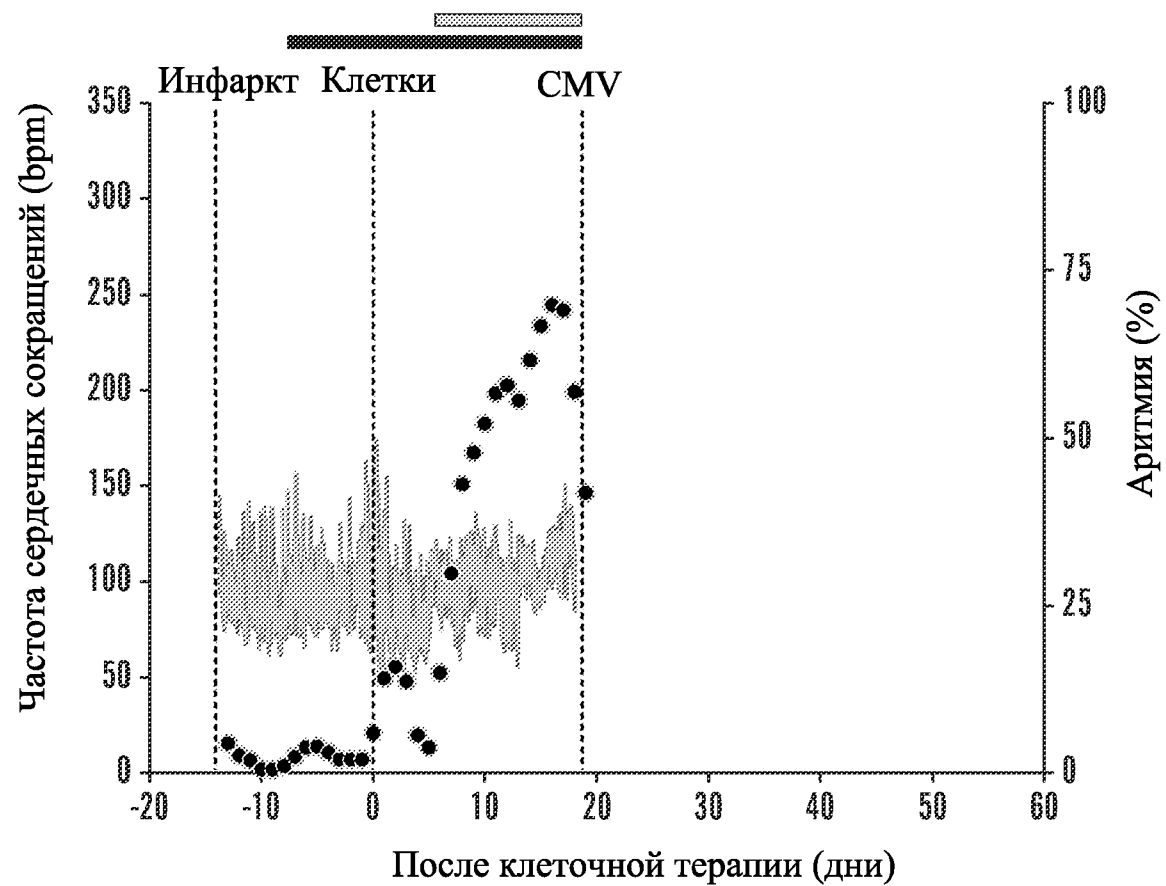
Фиг. 5



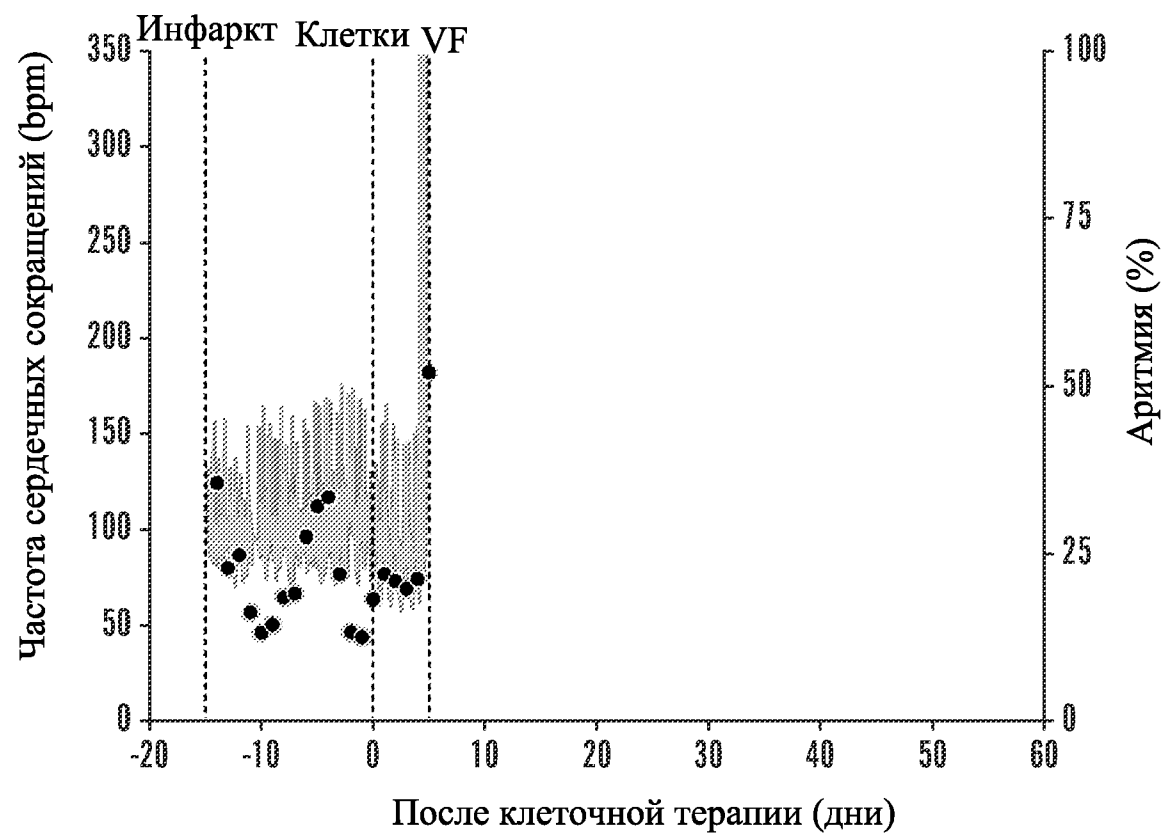
Фиг. 6



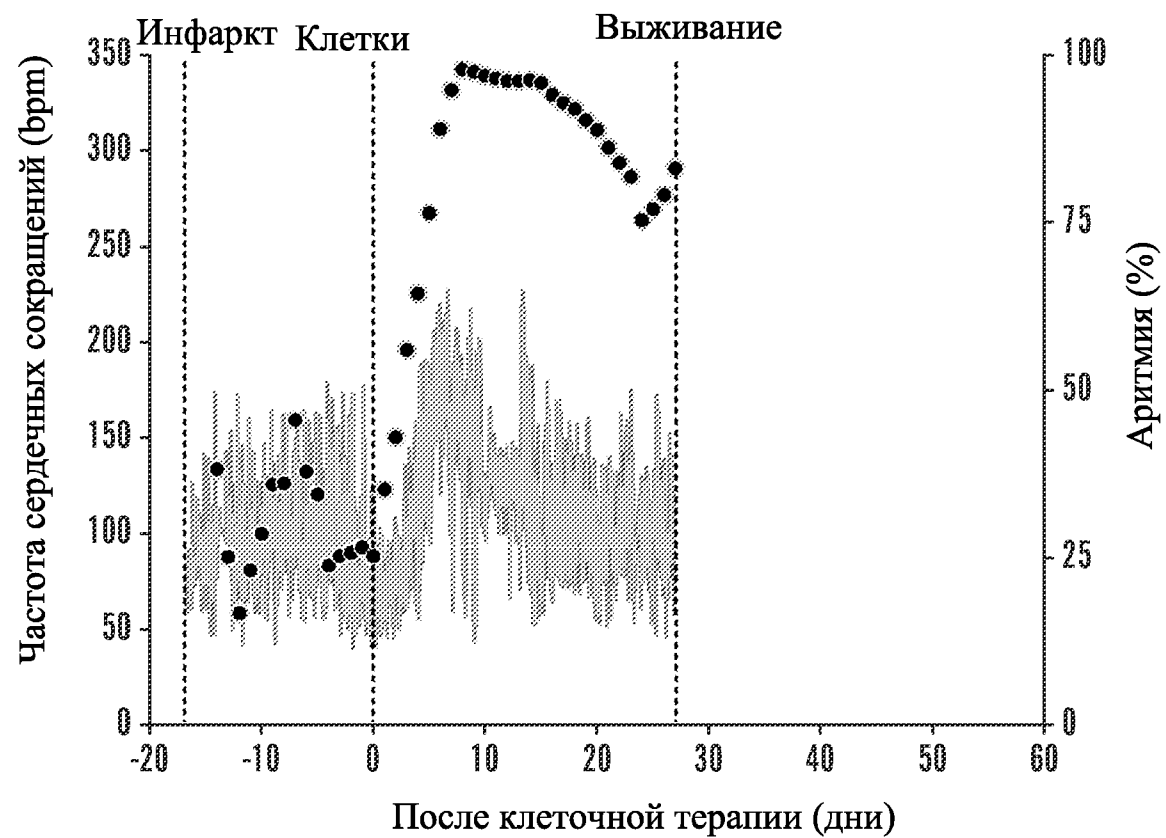
Фиг. 7



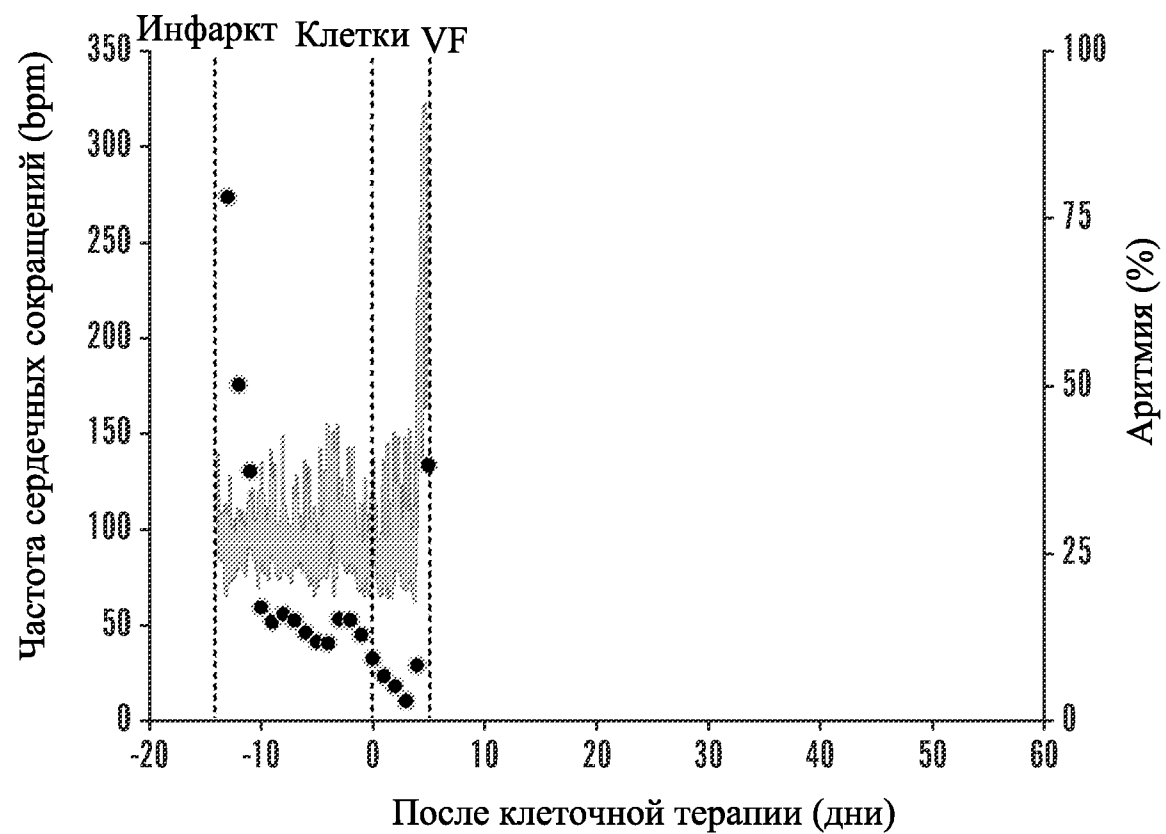
Фиг. 8



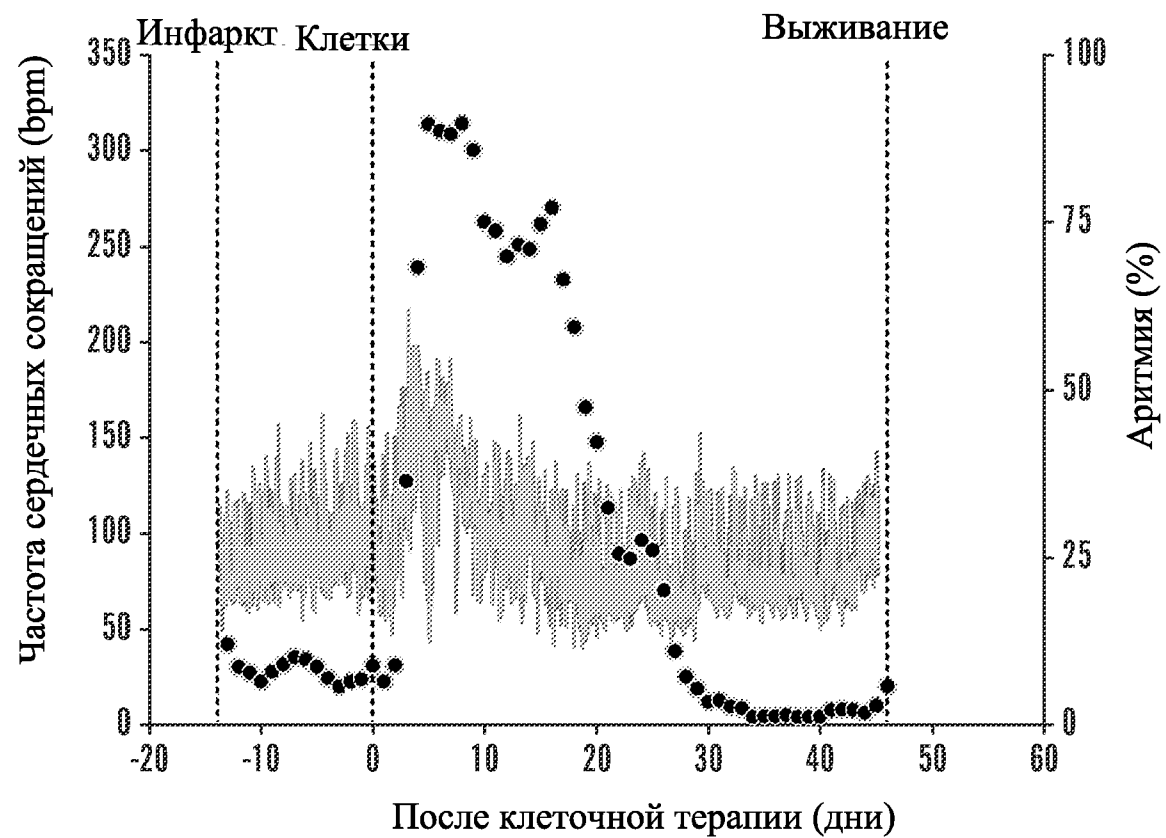
Фиг. 9



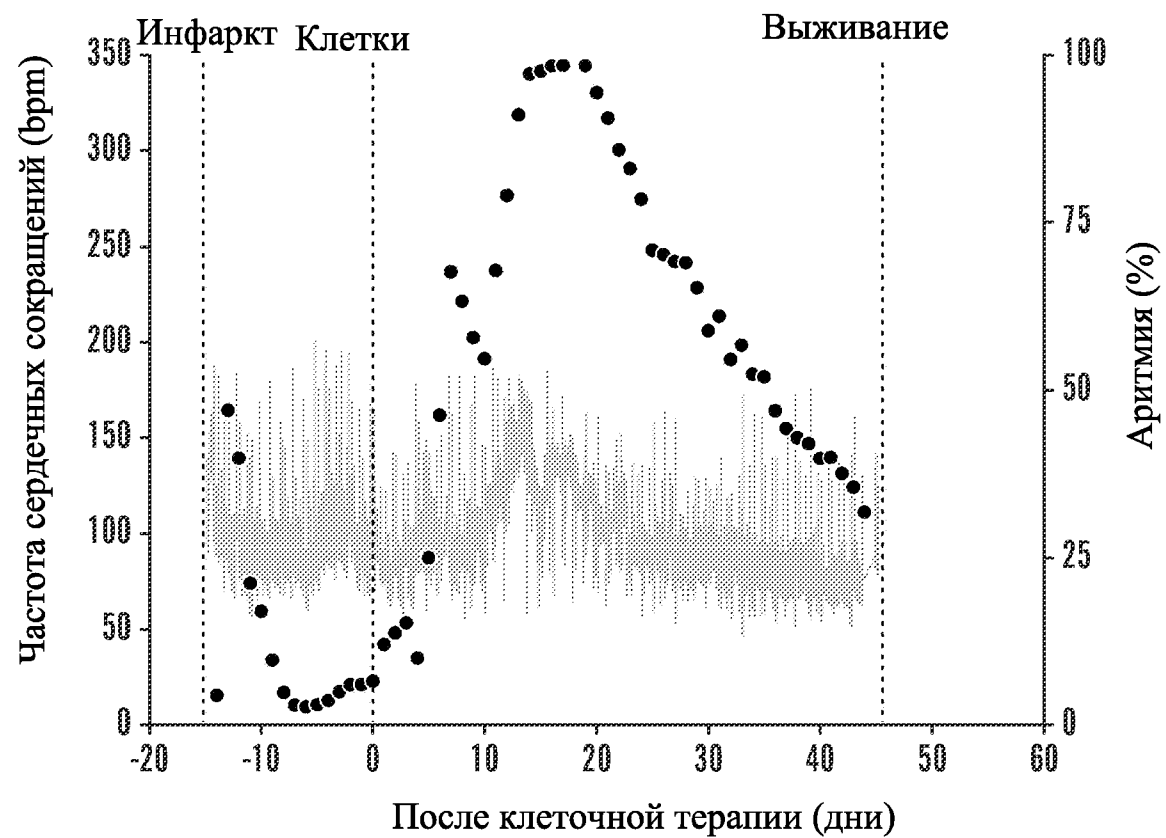
Фиг. 10



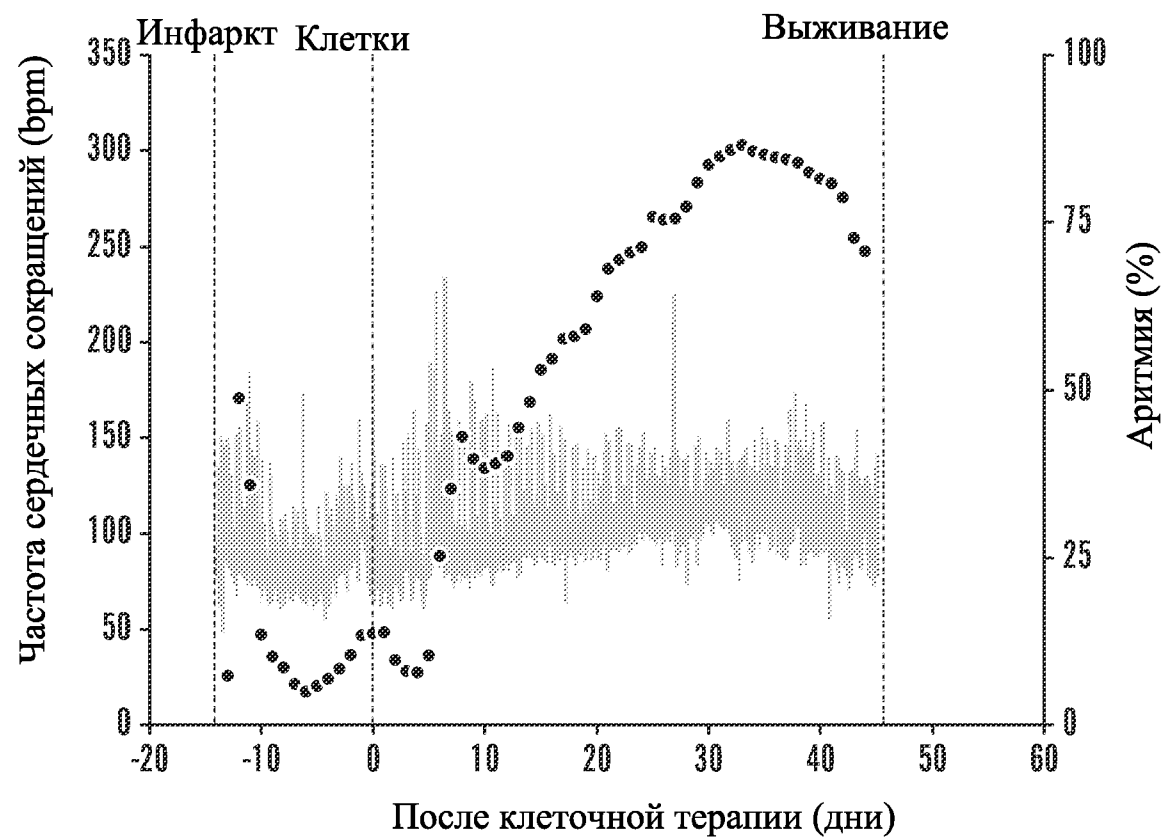
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

Режим дозирования антиаритмических средств

Свинья

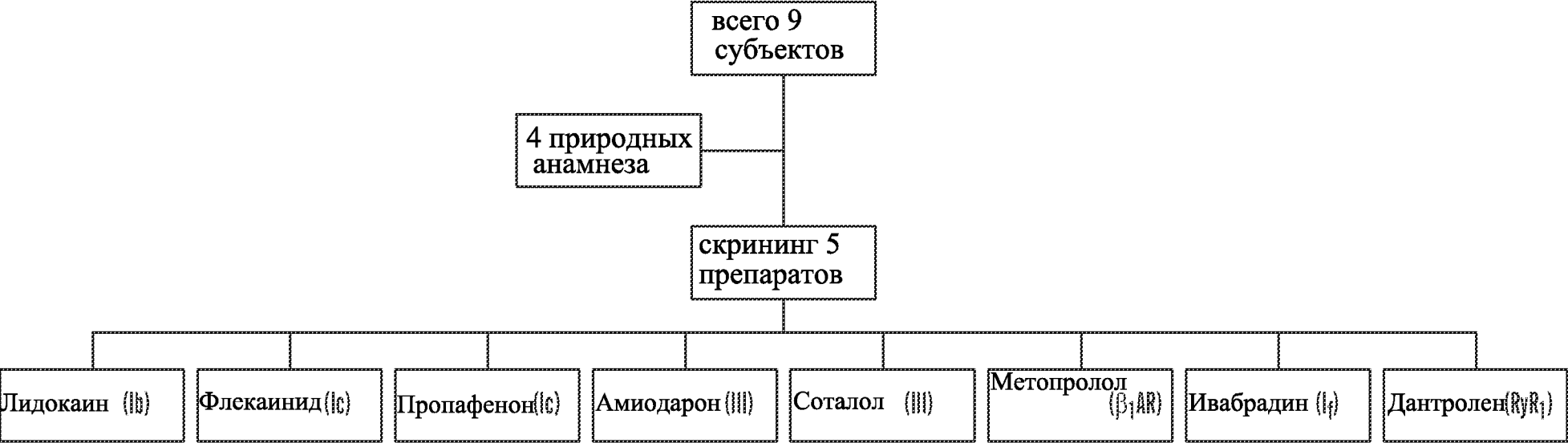
- Контроль ритма/частоты
Амиодарон 200–1200 мг BID PO, начало день трансплантации -7
Титрование до минимальной точки 1,5–2,5 мкг/мл
Амиодарон 150 мг IV болюс при острой аритмии
- Контроль частоты
Ивабрадин 2,5–15 мг PO BID при HR больше или равной 150
Титрование до точки HR менее 150 bpm

Человек

- Контроль ритма/частоты
Амиодарон 100–800 мг TID PO, начало день трансплантации -7
Амиодарон от 100 до 300 мг IV болюс при острой аритмии
- Контроль частоты
Ивабрадин 5–15 мг PO BID при тахикардии

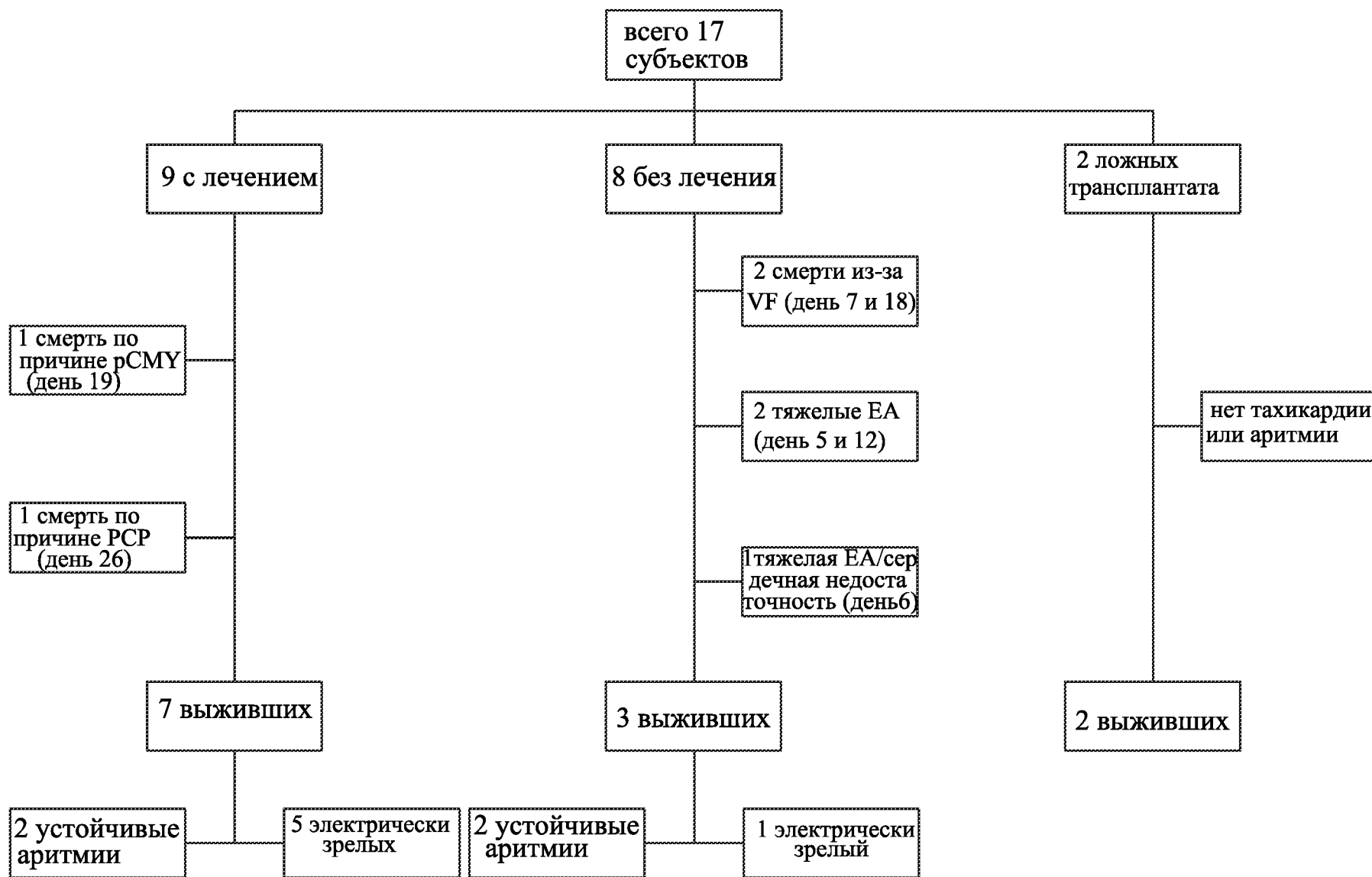
Фиг. 15

Фаза 1

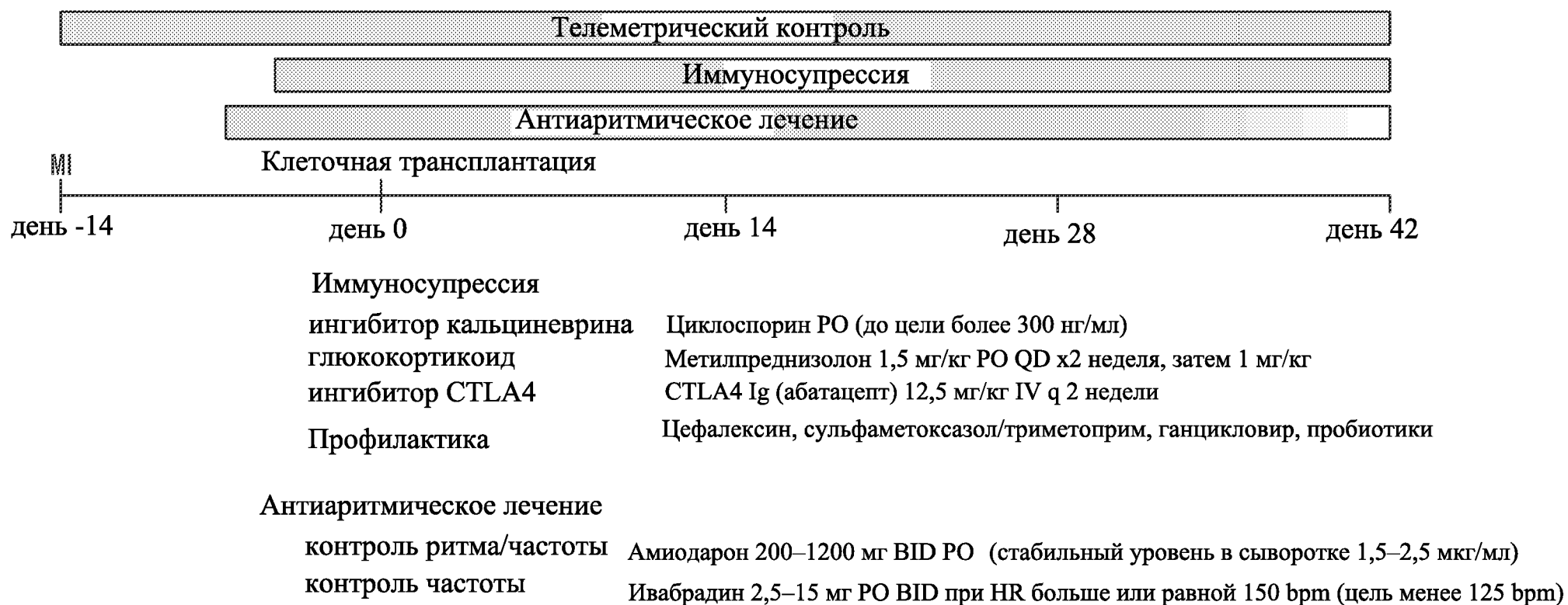


Фиг. 16

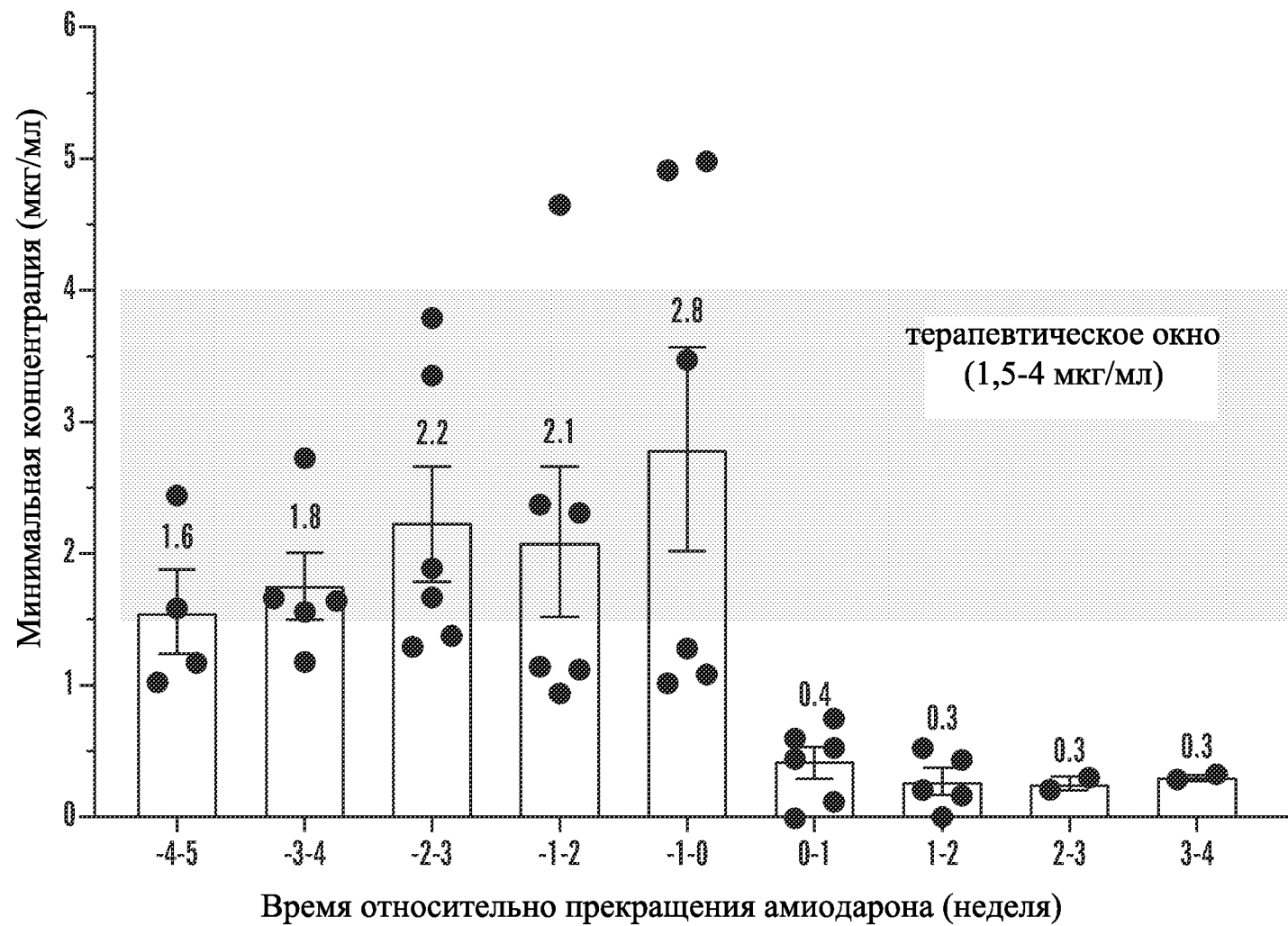
Фаза 2



Фиг. 16 (продолжение)



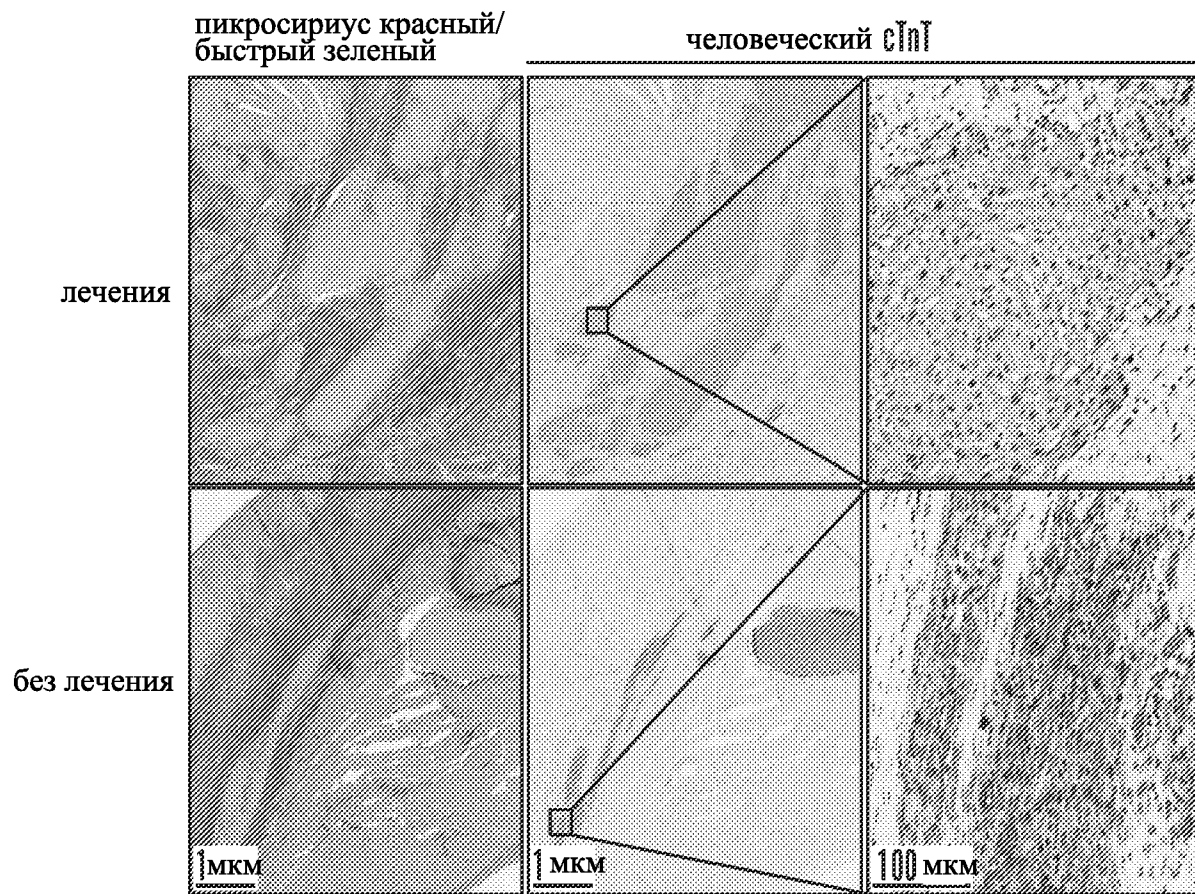
Фиг. 17



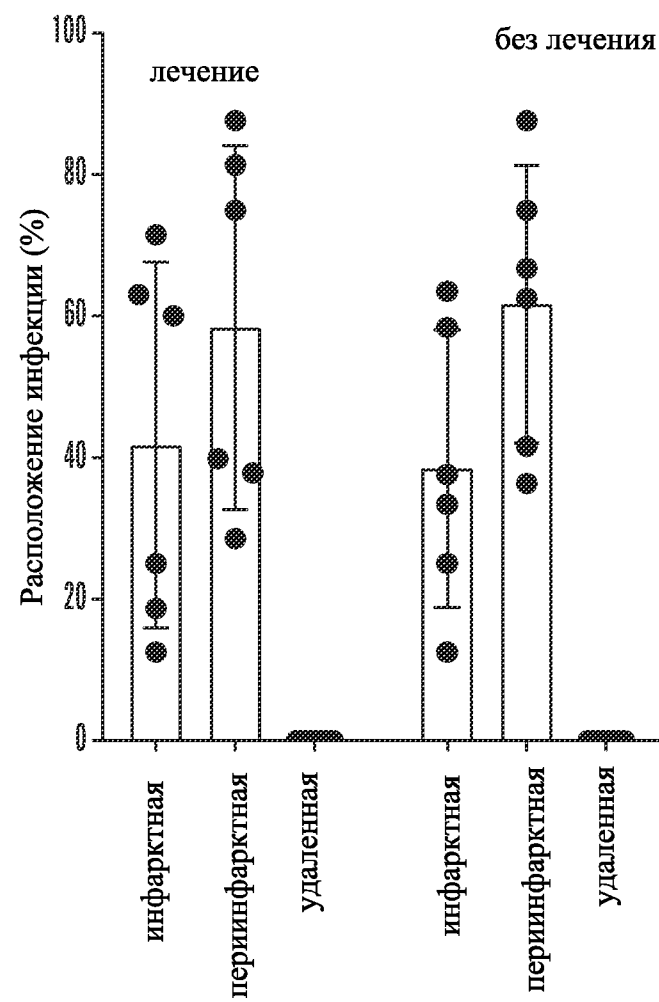
Фиг. 18

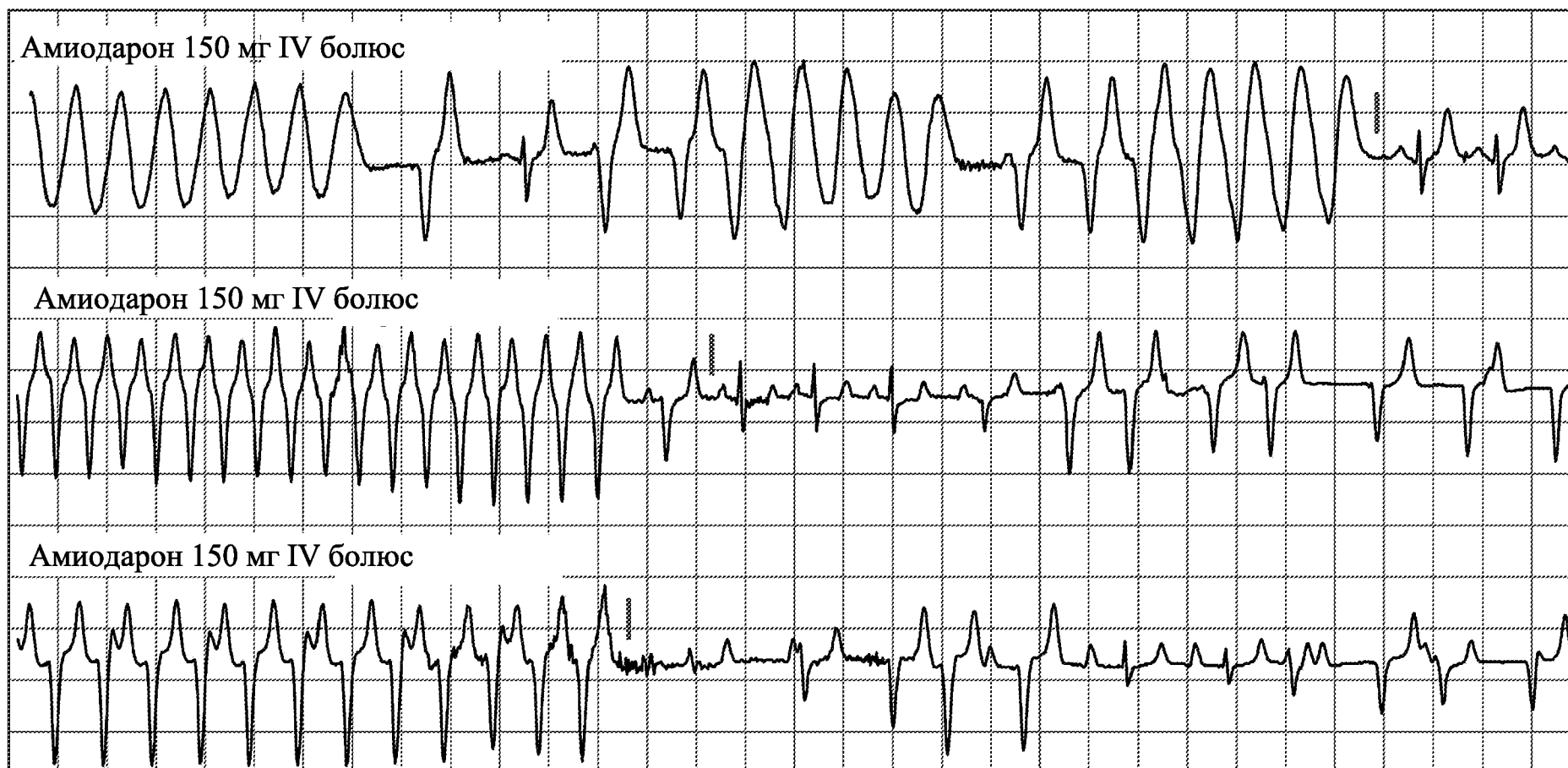


Фиг. 19



Фиг. 20

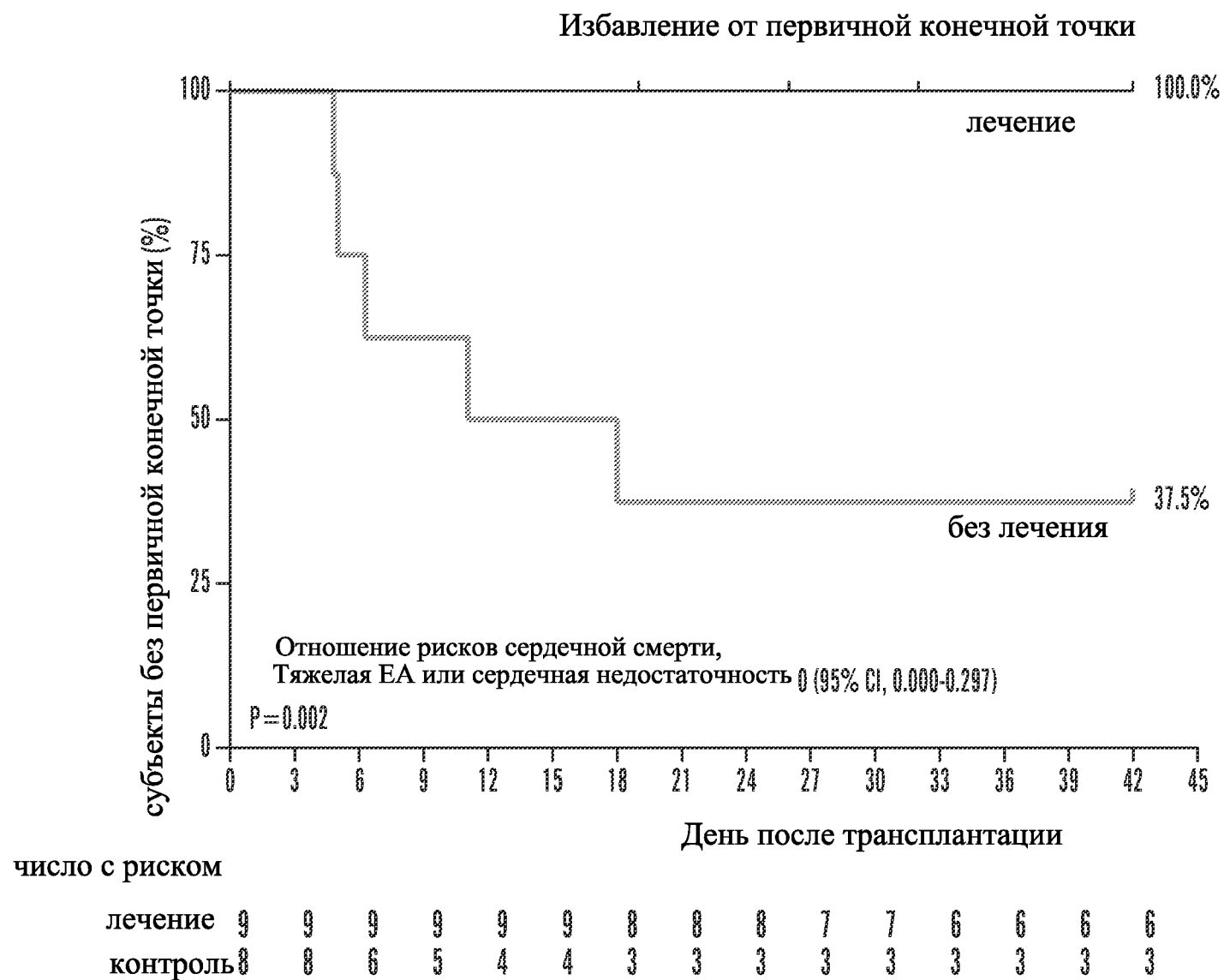




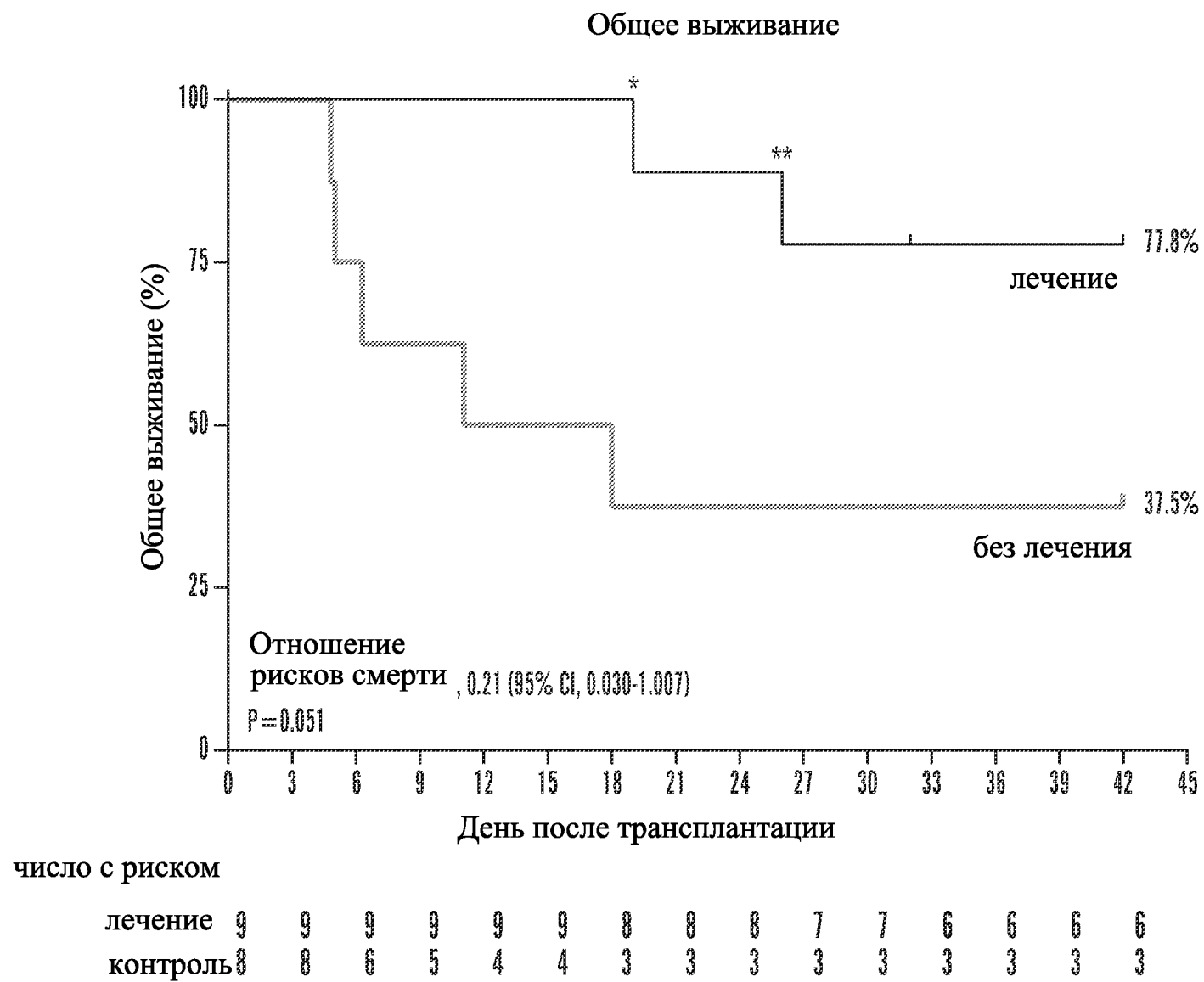
Фиг. 21А



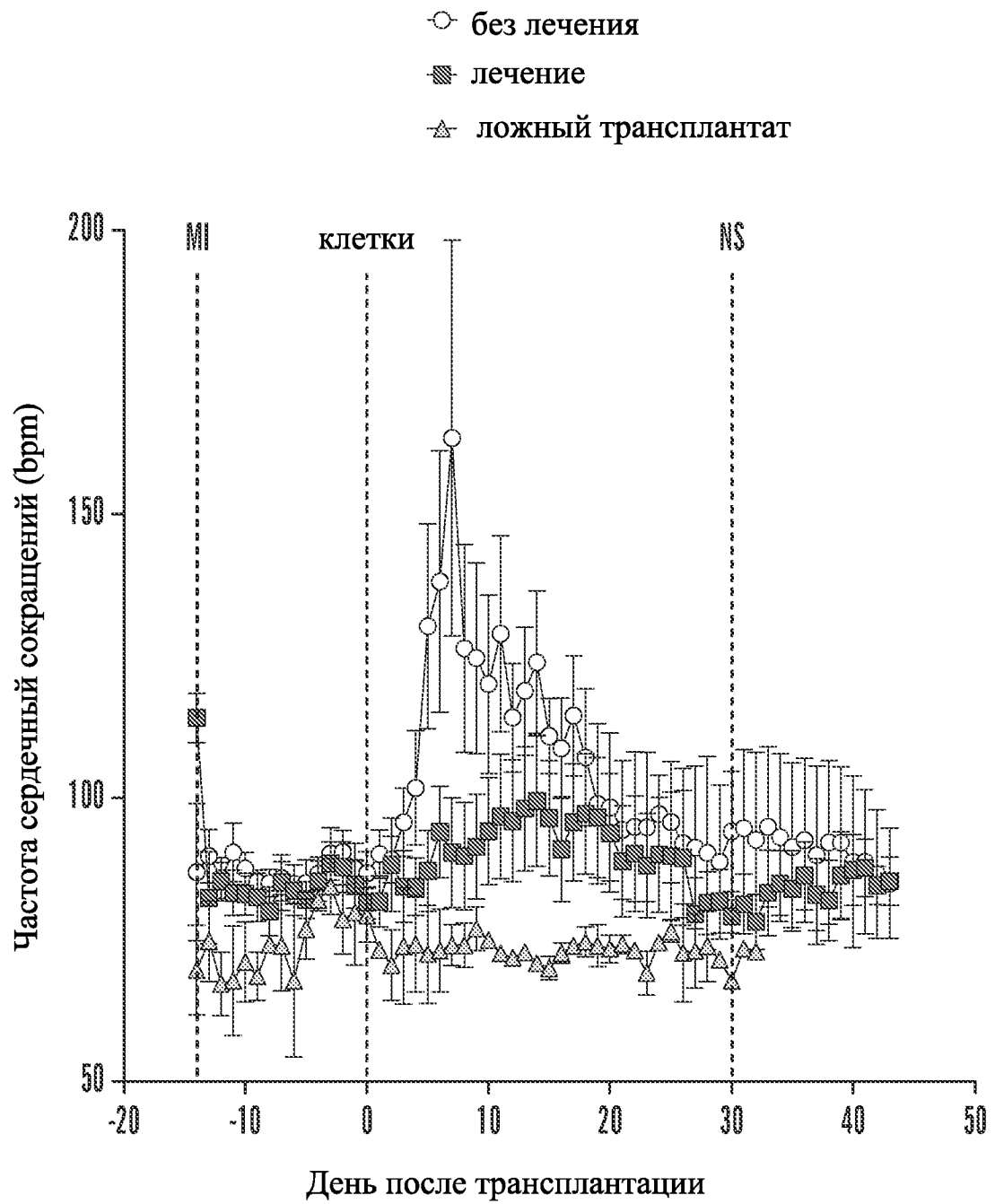
Фиг. 21В



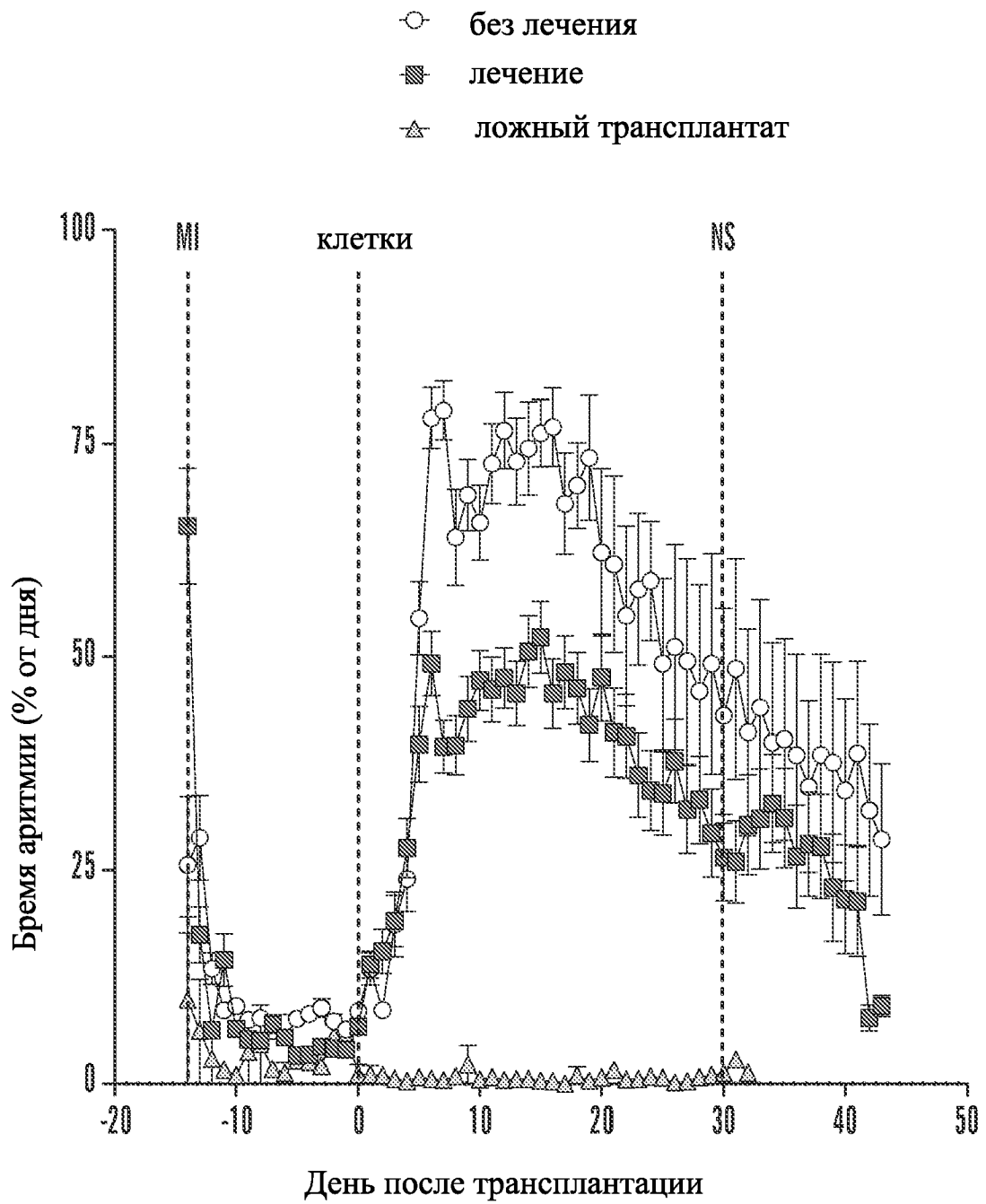
Фиг. 22А



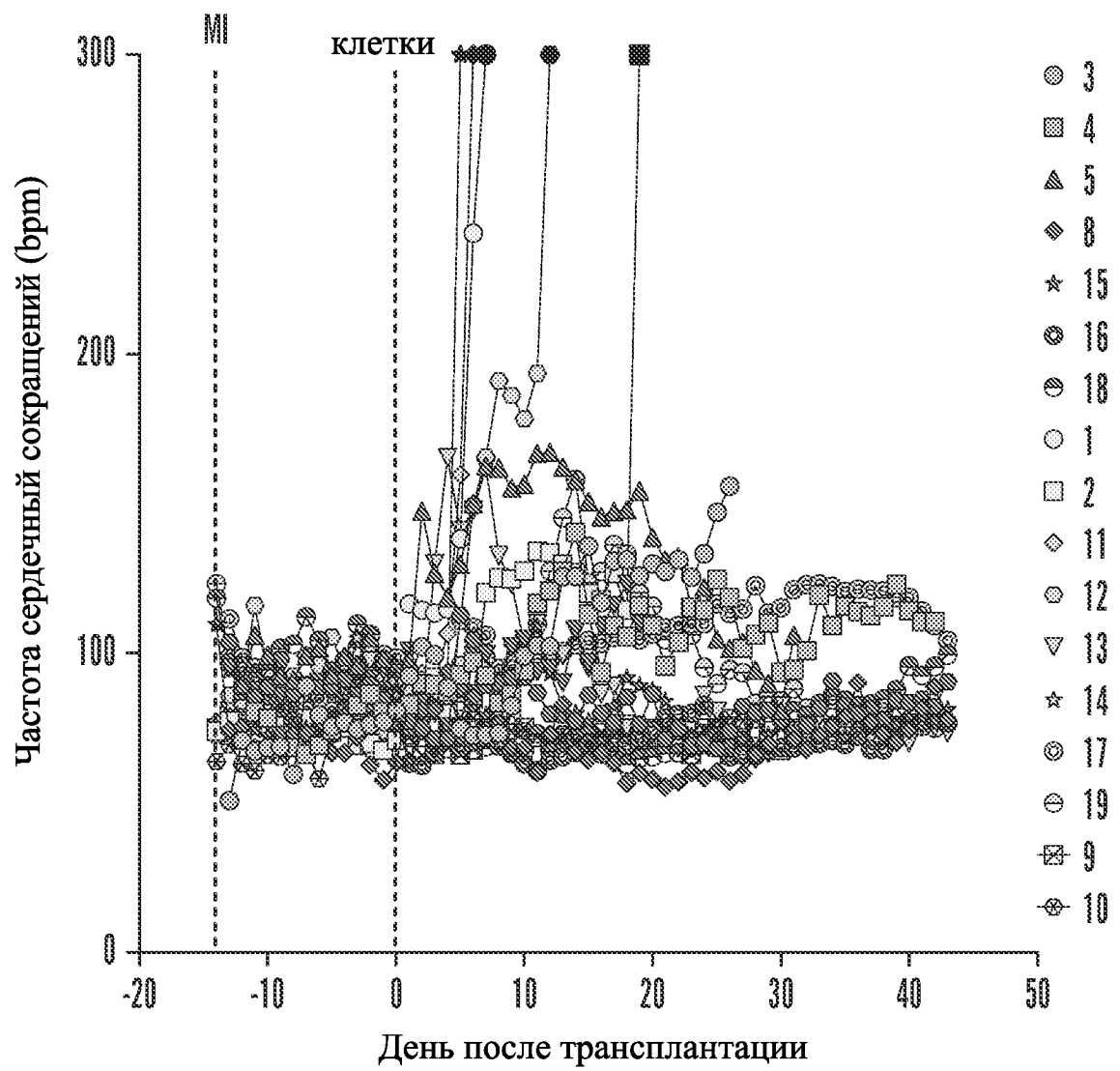
Фиг. 22В



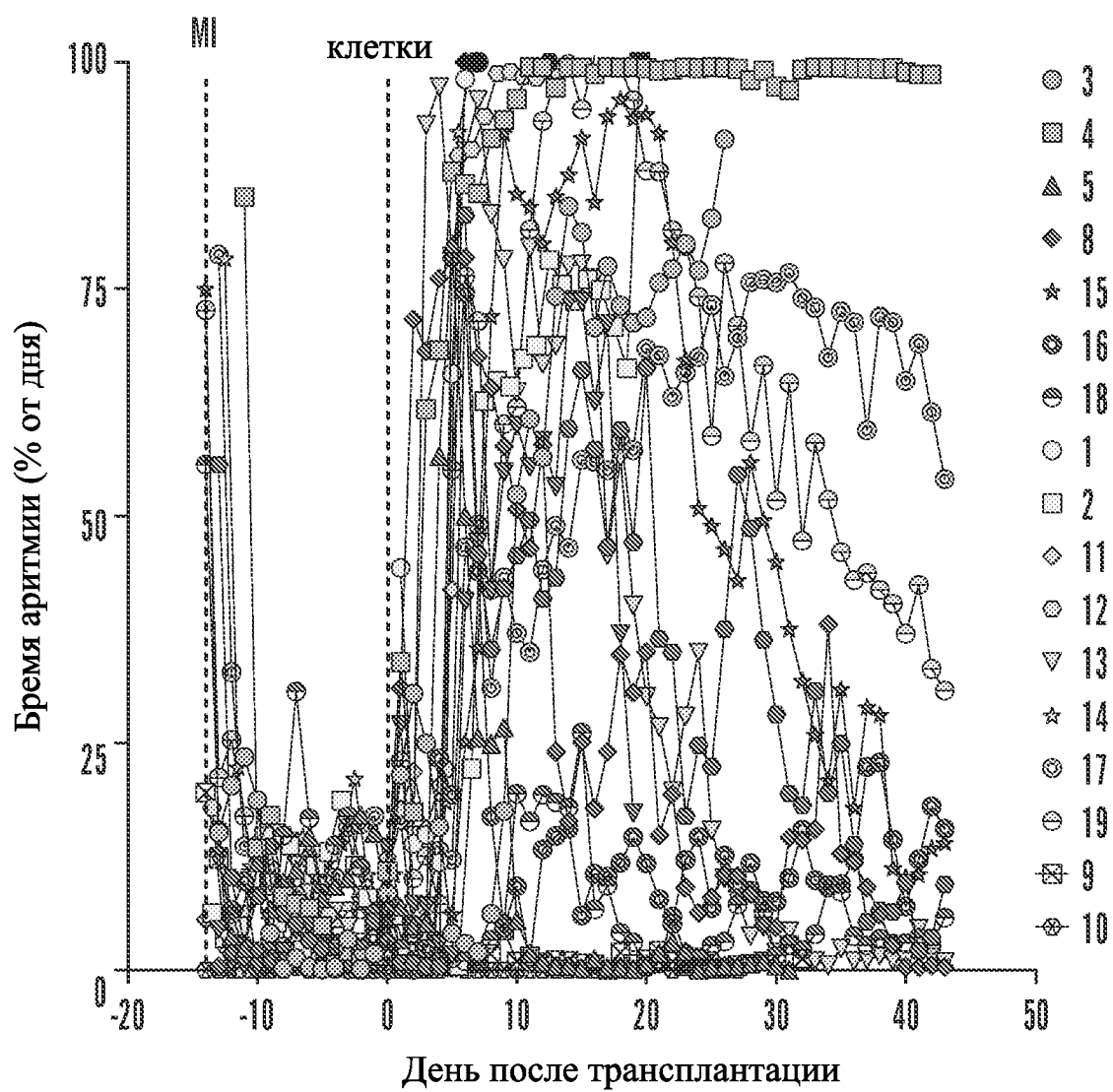
Фиг. 23А

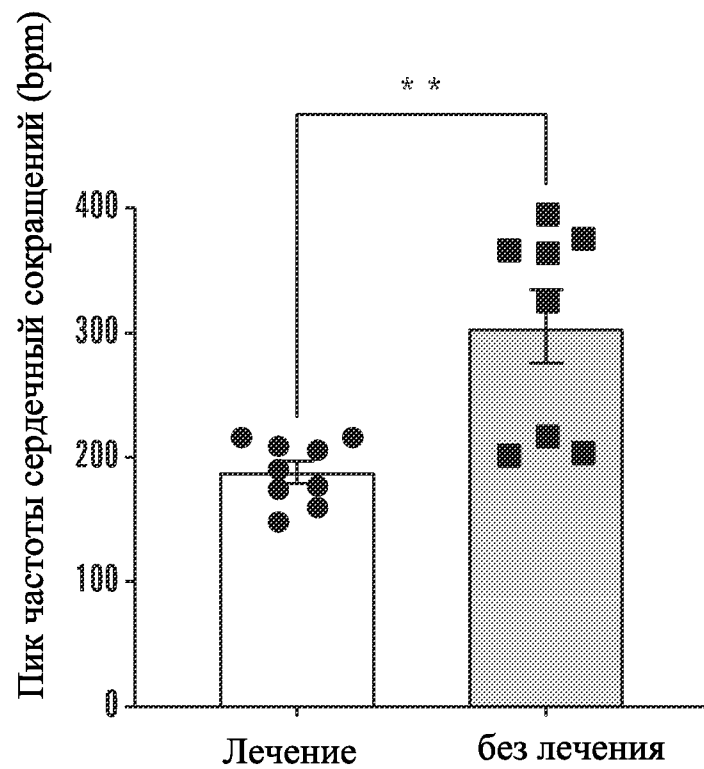


Фиг. 23В

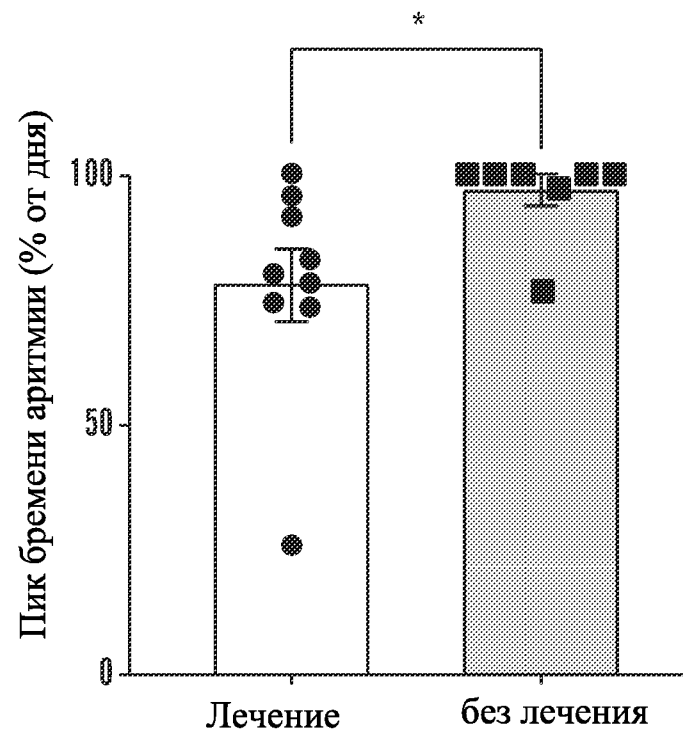


Фиг. 23С

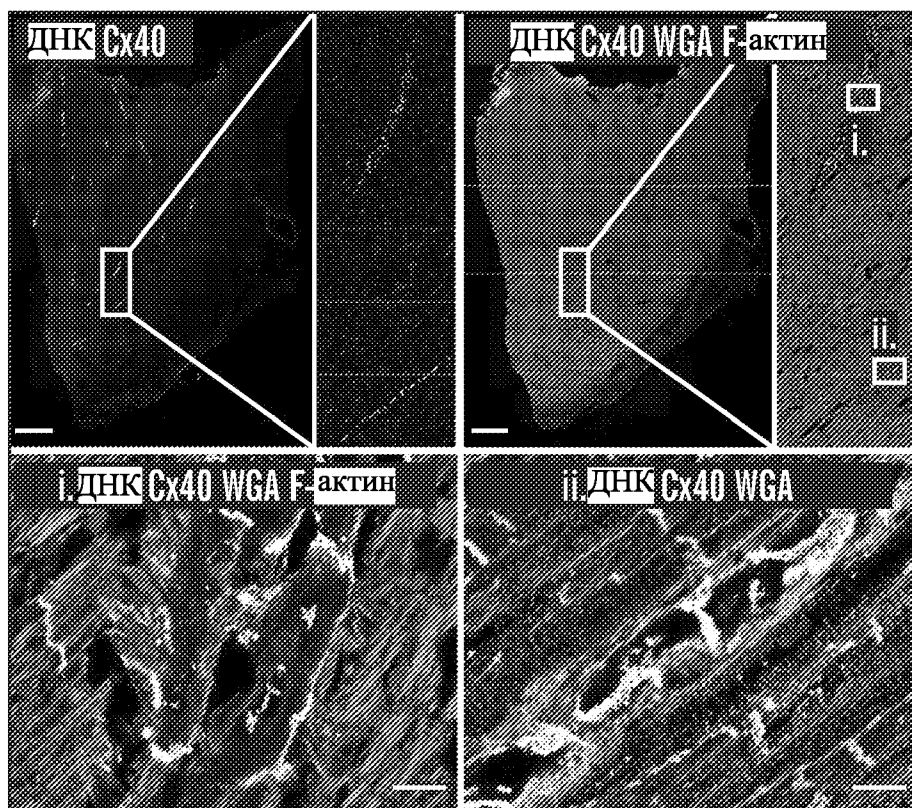




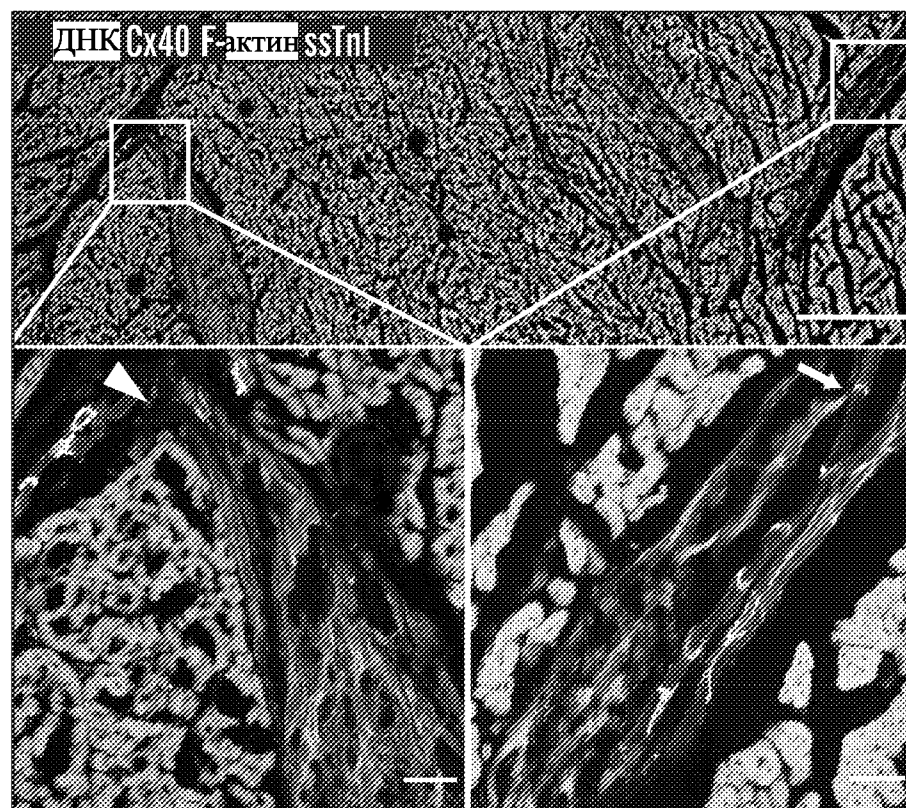
Фиг. 23Е



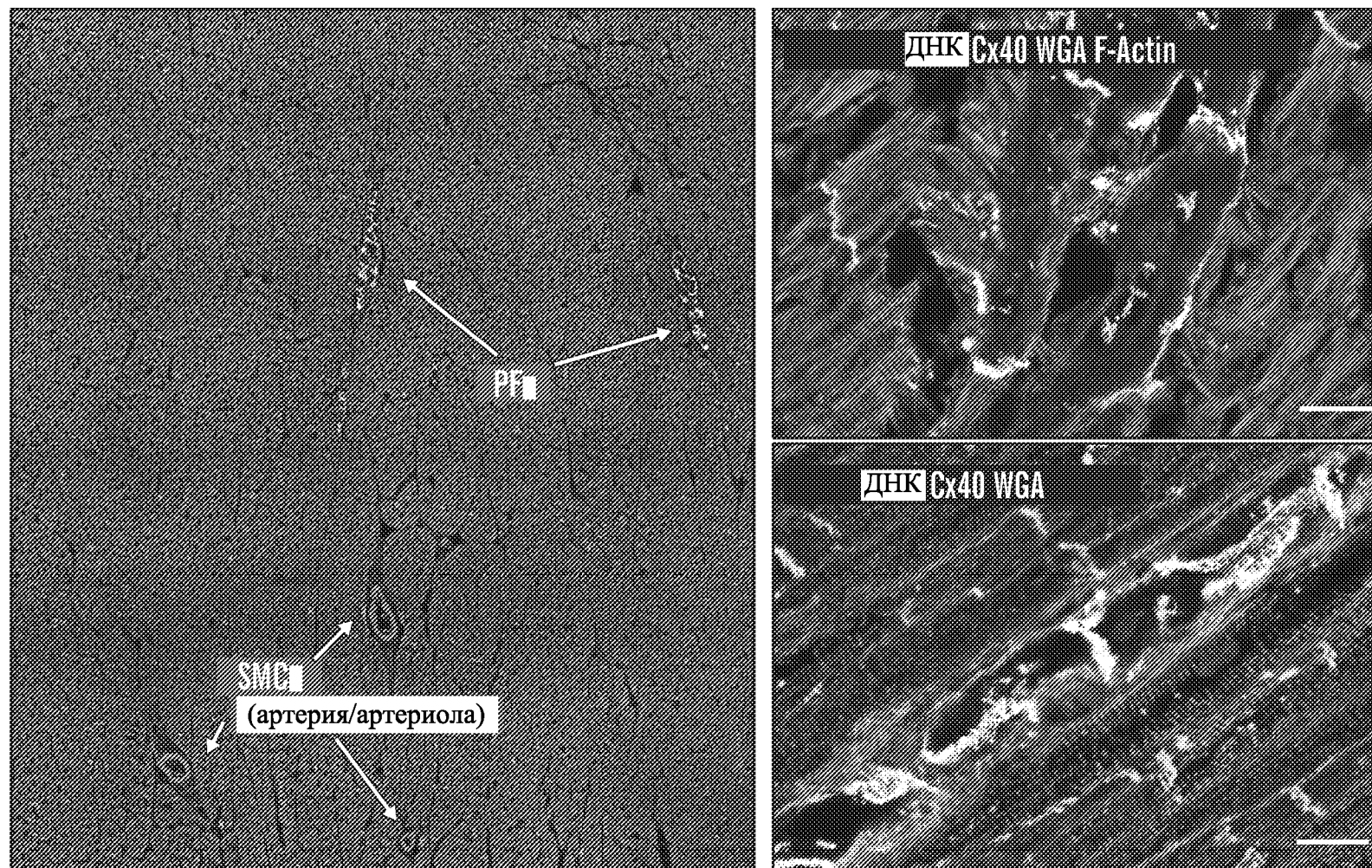
Фиг. 23F



Фиг. 24А



Фиг. 24В



Фиг. 25