



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 123503

(13) C2

(51) МПК

A61K 31/132 (2006.01)

A61K 31/131 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2018 04201

(22) Дата подання заявки: 23.09.2016

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: 15.04.2021

(31) Номер попередньої
заявки відповідно до
Паризької конвенції: PCT/CN2015/090528

(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: 24.09.2015

(33) Код держави-учасниці
Паризької конвенції,
до якої подано
попередню заявку: CN

(41) Публікація відомостей
про заявку: 10.07.2018, Бюл.№ 13

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: 14.04.2021, Бюл.№ 15

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ PCT/CN2016/099852,
23.09.2016

(72) Винахідник(и):

Кан Юйцзянь Джеймс (CN)

(73) Володілець (володільці):

ІННОЛАЙФ КО., ЛТД.,
846 South Tianfu Avenue, Chengdu, Sichuan
610000, China (CN)

(74) Представник:

Бреус Наталія Володимирівна, реєстр.
№167

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

Zhang Lin et al., "Protection of the heart by
treatment with a divalent-copper-selective
chelator reveals a novel mechanism
underlying cardiomyopathy in diabetic rats" /
Lin Zhang, Marie-Louise Ward, Anthony RJ
Phillips, Shaoping Zhang, John Kennedy,
Bernard Barry, Mark B Cannell, Garth JS
Cooper // Cardiovascular Diabetology. -
31.12.2013. - vol. 12. - no. 1. - P. 1 - 17
Tongxian Shao et al., "Change and influence
of content of zinc and copper in acute
myocardial ischemic" / Shao Tongxian, Zhang
Suya, Ruan Linhai // Journal of Luoyang
Medical College. - 31.03.2000. - vol. 18. - no.
01. - P.15-17, реферат
WO 2004017957A1, 04.03.2004
CN 103467577A, 25.12.2013
US 2014171508A1, 19.06.2014
WO 2006104401 A1, 05.10.2006

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ТРИЕНТИНУ ДЛЯ ДОСТАВКИ МІДІ В ІШЕМІЗОВАНУ ТКАНИНУ

(57) Реферат:

Винахід стосується застосування композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді, де хелатуючий мідь тетрамін являє собою триєнтину для підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді, спрямованої доставки міді, в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, індукування щонайменше двох процесів відновлення тканини, індукування міграції стовбурових клітин та посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1). Винахід також стосується фармацевтичної композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді, де хелатуючий мідь тетрамін являє собою триєнтин, та набору, який включає зазначену композицію.

UA 123503 C2

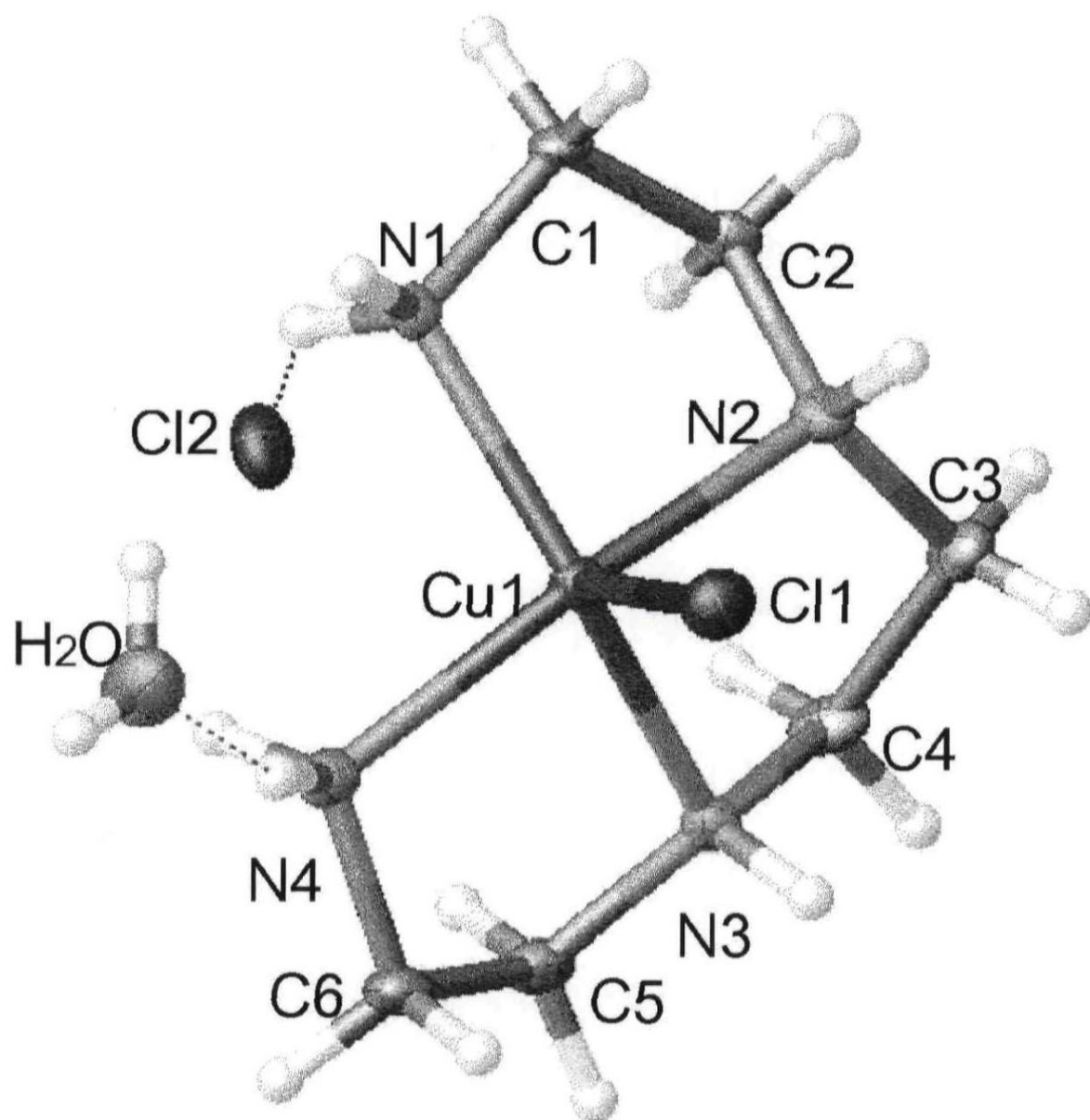


Fig. 1

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

[1] Ця заявка просить пріоритет заявки на міжнародний патент № PCT/CN2015/090528, зареєстрованої 24 вересня 2015 року, зміст якої включено в даний винахід шляхом посилання на неї.

5 НАДАННЯ ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ У ТЕКСТОВОМУ ФАЙЛІ У ФОРМАТІ ASCII

[2] Зміст представленого далі текстового файлу у форматі ASCII включений в даний винахід шляхом посилання на перелік послідовностей, що читається за допомогою комп'ютера (CRF) (назва файлу: OP160744.160921.sequence listing.txt).

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

10 [3] Даний винахід стосується відновлення і регенерації ішемізованої тканини шляхом застосування композицій, що включають тетрамін, такий як триентин.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

[4] Активация індукованих при гіпоксії факторів (HIF) є початковою і первинною молекулярною відповіддю людського організму на гіпоксичний або ішемічний інсульт. Індукований при гіпоксії транскрипційний фактор HIF-1 належить до сімейства HIF і обумовлює експресію різних генів (таких як VEGF), які залучені в множинні адаптивні реакції відповіді клітин на гіпоксію і/або ішемію, включаючи ангиогенез. HIF-1 включає дві субодиниці, а саме HIF-1 α і HIF-1 β . В умовах гіпоксії/ішемії, HIF-1 α акумулюється в клітинному ядрі з утворенням гетеродимеру з HIF-1 β , який ініціює транскрипцію генів, що регулюють подальші ланки сигнальних каскадів.

[5] Однак, при хронічній ішемії серцевого м'яза, ушкоджений міокард звичайно характеризується зниженою щільністю капілярів і пригніченням ангиогенезу. Захисні механізми, такі як механізми, індуковані в результаті акумуляції HIF-1 α при гострих ішемічних інсультах, не діють в умовах хронічної ішемії в результаті мобілізації міді з міокарда, що викликається тривалою ішемією. Раніше було показано, що транскрипційна активність HIF-1 вимагає участі слідових кількостей міді. У пацієнтів із хронічною ішемічною кардіоміопатією, навіть якщо рівні HIF-1 α в ішемізованій міокардіальній тканині постійно підвищуються, пригнічена експресія генів, регульованих за допомогою HIF-1, таких як VEGF. Втрата кардіальної міді блокує активацію акумульованого HIF-1 α , і вичерпання запасів міді в серцевому м'язі добре корелює зі ступенем дисфункції серця у таких пацієнтів. Крім того, знижений вміст кардіальної міді супроводжується високим рівнем вмісту міді в крові у пацієнтів з ішемічними захворюваннями міокарда. Тому, вважають, що мідь вивільняється з міокарда в кровотік у формі, яка не може бути повторно використана ішемізованим міокардом. Це різке надходження міді з міокарда в кровотік у незасвоєній для міокарда формі є, як вважаються, головною причиною пригнічення транскрипційної активності HIF-1 α , яка супроводжує тривалу ішемію міокарда. Отже, у пацієнтів із хронічними ішемічними захворюваннями міокарда внаслідок втрати доступної для міокарда міді може не відбутися активації генів, регульованих за допомогою HIF-1, важливої стадії відновлення і регенерації тканини. Тому, промотування відповідного розподілу міді в тканині може служити ефективною стратегією при лікуванні різних ішемічних захворювань і станів.

40 [6] Триентин являє собою добре відомий хелатуючий агент, який застосовують для знешкодження міді. Дигідрохлорид триентину є фармацевтично прийнятною сіллю триентину, яку широко використовують для зв'язування і видалення надлишкової кількості міді в організмі при лікуванні хвороби Вільсона, зокрема у пацієнтів, що не переносять пеніциламін. Купер зі співавторами (Cooper et al.) описав застосування триентину і інших сполук, які нейтралізують дію міді, при лікуванні різних порушень, у тому числі діабету і його ускладнень (наприклад, діабетичної кардіоміопатії), серцево-судинних захворювань, нейродегенерації і пов'язаних з мітохондріями захворювань. Див., наприклад, патентні документи U.S. Patent № 7459446, U.S. Patent № 7928094, international application publication № WO 2003077901 A1, international application publication № WO 2005058294 A1 і international application publication № WO 2007055598 A1.

[7] Зміст усіх публікацій, патентів і патентних заявок включений в даний винахід шляхом посилань на них.

СУТЬ ВІНАХОДУ

55 [8] У даному винаході пропонуються способи підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді або індукування відновлення ішемізованої тканини у індивідуума шляхом введення композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин).

[9] В одному аспекті даного винаходу, пропонується спосіб підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин). Крім того, пропонується застосування композиції,

яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), при виробництві лікарського препарату для підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, і композиція, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), застосовувана для підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій

5 тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини.

[10] В одному аспекті даного винаходу, пропонується спосіб спрямованої доставки міді в клітини ішемізованої тканини у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин). Крім того, пропонується застосування композиції, яка включає хелатуючий

10 мідь тетрамін (такий як триентин), при виробництві лікарського препарату для спрямованої доставки міді в клітини ішемізованої тканини у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, і композиція, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), застосовувана для спрямованої доставки міді в клітини ішемізованої тканини у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини.

[11] В одному аспекті даного винаходу, пропонується спосіб індукування щонайменше двох процесів відновлення ішемізованої тканини індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. Крім того, пропонується застосування композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), при виробництві лікарського препарату для індукування

20 щонайменше двох процесів відновлення в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, і композиція, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), застосовувана для індукування щонайменше двох процесів відновлення ішемізованої тканини індивідуума, що має ішемічне ураження тканини.

[12] В одному аспекті даного винаходу, пропонується спосіб індукування міграції стовбурових клітин в ішемізовану тканину у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. Крім того, пропонується застосування композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), при виробництві лікарського препарату для індукування міграції

25 стовбурових клітин в ішемізовану тканину у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, і композиція, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), застосовувана для індукування міграції стовбурових клітин в ішемізовану тканину у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини.

[13] В одному аспекті даного винаходу, пропонується спосіб посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. Крім того, пропонується застосування композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), при виробництві лікарського препарату для посилення мідезалежної транскрипційної активності

35 індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, і композиція, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), застосовувана для посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини.

[14] У деяких варіантах здійснення будь-якого одного з описаних вище способів, індивідуум має порушену систему відновлення тканин. У деяких варіантах здійснення індивідуум не має

45 порушеної системи відновлення тканин.

[15] У деяких варіантах здійснення будь-якого одного з описаних вище способів, ішемізовану тканину вибирають із групи, що складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту

50 і ішемізованої тканини кінцівки.

[16] У деяких варіантах здійснення будь-якого одного з описаних вище способів, хелатуючий мідь тетрамін являє собою триентин.

[17] У деяких варіантах здійснення будь-якого одного з описаних вище способів, композиція додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення комплекс хелатуючого мідь тетраміну і іона міді є кристалічним. У деяких варіантах здійснення композиція включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково

55 включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції не утворює комплекс з хелатуючим мідь тетраміном.

[18] У деяких варіантах здійснення будь-якого одного з описаних вище способів, спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості іона міді.

[19] У деяких варіантах здійснення будь-якого одного з описаних вище способів, ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума.

5 [20] У деяких варіантах здійснення будь-якого одного з описаних вище способів, композицію вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції включає від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (у тому числі, наприклад, будь-яку кількість від приблизно 80 мг до приблизно 150 мг, від приблизно 80 мг до приблизно 200 мг, від приблизно 200 мг до 10 приблизно 300 мг, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг, приблизно 80 мг, приблизно 100 мг, приблизно 125 мг, приблизно 150 мг, приблизно 200 мг, приблизно 250 мг, приблизно 300 мг, приблизно 350 мг або приблизно 400 мг) хелатуючого мідь тетраміну на добу. У деяких 10 варіантах здійснення композицію вводять щонайменше два рази на добу (у тому числі, наприклад, приблизно два рази, три рази або чотири рази на добу). У деяких варіантах здійснення композицію вводять протягом щонайменше приблизно одного місяця (у тому числі, 15 наприклад, протягом приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 або більше місяців).

[21] У деяких варіантах здійснення будь-якого одного з описаних вище способів, введення композиції приводить до вмісту в крові щонайменше приблизно 0,005 мг/л (у тому числі, наприклад, щонайменше до будь-якого приблизного вмісту з 0,01 мг/л, 0,05 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 20 мг/л, 1,0 мг/л, 2,0 мг/л, 3,0 мг/л, 4,0 мг/л і 5 мг/л) хелатуючого мідь тетраміну. У деяких варіантах здійснення введення композиції приводить до вмісту в крові щонайменше приблизно 0,005 мг/л хелатуючого мідь тетраміну протягом щонайменше приблизно 1 тижня (у тому числі, наприклад, щонайменше приблизно протягом 2 тижнів, 1 місяця, 2 місяців, 3 місяців, 4 місяців, 6 місяців, 12 місяців або більше).

[22] У деяких варіантах здійснення будь-якого одного з описаних вище способів, спосіб 25 додатково включає постійний контроль внутрішньоклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає коректування дози (у тому числі, наприклад, ефективної кількості, частоти введення і їх комбінації) композиції, виходячи із внутрішньоклітинного вмісту міді у індивідуума.

[23] В іншому аспекті даного винаходу пропонується фармацевтична композиція, яка 30 включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін являє собою триентин. У деяких варіантах здійснення композиція включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води.

35 [24] У деяких варіантах здійснення будь-якої однієї з описаних вище фармацевтичних композицій, фармацевтичну композицію приготують у формі таблетки, капсули або пігулки.

[25] Крім того, пропонується композиції, набори і готові вироби, застосовувані в описаних у винаході способах.

40 [26] Слід мати на увазі, що описані в даному винаході аспекти і варіанти здійснення винаходу можуть "складатися" і/або "складатися по суті" з аспектів і варіантів здійснення винаходу.

[27] Посилання у винаході на "приблизну" величину або параметр включає (і описує) розкиди, які безпосередньо належать до цієї величини або параметра. Наприклад, опис, що належить до "приблизно Х", включає опис "Х".

45 [28] Використовуваний у винаході термін "приблизно Х-У" має таке ж значення, як "від приблизно Х до приблизно У".

[29] Використовувані у винаході і прикладених пунктах формули винаходу форми однини включають і форми множини, якщо зі змісту в явному вигляді не випливає інше.

50 [30] Для будь-якого фахівця в цій галузі є очевидним, що індивідуум, якого піддають дослідженню, якого вибирають і/або якого піддають лікуванню, є індивідуумом, відносно якого необхідні такі дії.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

55 [31] На фігурі 1 зображена кристалічна структура комплексу триентину і іона міді, який додатково зв'язаний із двома іонами хлору і молекулою води. Непозначені атоми є атомами водню.

[32] На фігурі 2 наведений зразковий набір довжин зв'язків, кутів зв'язків і торсіонних кутів для кристалічної структури, зображеної на фігурі 1.

[33] На фігурі 3 наведені дані по вдосконалюванню кристалічної структури кристала, зображеного як приклад на фігурі 1.

[34] На фігурах 4А-4С наведені атомні координати і анізотропні параметри атомів в уточненій кристалічній структурі фігури 3. На фігурі 4А наведені дробові атомні координати і параметри еквівалентного ізотропного заміщення неводневих атомів. На фігурі 4В наведені параметри еквівалентного анізотропного заміщення неводневих атомів. На фігурі 4С наведені атомні координати і параметри ізотропного заміщення атомів водню.

[35] На фігурі 5 графічно зображена схема проведення експерименту в прикладі 2.

[36] На фігурі 6 графічно представлені дані по внутрішньоклітинних концентраціях міді в первинній культурі кардіоміоцитів новонароджених щурів у різних експериментальних групах у прикладі 2.

[37] На фігурі 7 графічно зображена схема проведення експерименту в прикладі 3.

[38] На фігурі 8А показані виявлені методом ехокардіографії морфологічні зміни в товщині міжшлуночкової перегородки (IVSD) щурів у групах з констрикцією висхідної аорти (AAC) і імітацією операції при проведенні лікування або без проведення лікування триентином.

[39] На фігурі 8В показані виявлені методом ехокардіографії морфологічні зміни в товщині задньої стінки лівого шлуночка (IVPWD) щурів у групах з констрикцією висхідної аорти (AAC) і імітацією операції при проведенні лікування або без проведення лікування триентином.

[40] На фігурі 9А показані виявлені методом ехокардіографії функціональні зміни у фракції викиду лівого шлуночка (EF) щурів у групах з констрикцією висхідної аорти (AAC) і імітацією операції при проведенні лікування або без проведення лікування триентином.

[41] На фігурі 9В показані виявлені методом ехокардіографії функціональні зміни у фракції укорочення лівого шлуночка (FS) щурів у групах з констрикцією висхідної аорти (AAC) і імітацією операції при проведенні лікування або без проведення лікування триентином.

[42] На фігурі 10А наведені середні концентрації міді в тканинах серця щурів в імітаційній контрольній групі і у групах з констрикцією висхідної аорти (AAC), підданих і не підданих лікуванню триентином.

[43] На фігурі 10В наведені середні концентрації міді в плазмі крові щурів в імітаційній контрольній групі і у групах з констрикцією висхідної аорти (AAC), підданих і не підданих лікуванню триентином. Вихідну високу концентрацію міді в плазмі крові щурів з констрикцією висхідної аорти (AAC) знижували в результаті лікування триентином як у групах, що піддаються лікуванню високою дозою триентину (ACC-Tr(H)), так і в групах, що піддаються лікуванню низькою дозою триентину (ACC-Tr(L)).

[44] На фігурі 11 графічно зображена схема проведення експерименту в прикладі 4.

[45] На фігурі 12 показані виявлені методом ехокардіографії зміни у фракції викиду лівого шлуночка (EF) мавп макак-резус із серцевою недостатністю в підданих і не підданих лікуванню триентином групах.

[46] На фігурі 13 наведені концентрації міді в зразках різних тканин мавп макак-резус із серцевою недостатністю в підданих і не підданих лікуванню триентином групах.

[47] На фігурі 14 графічно зображена схема проведення експерименту в прикладі 5.

[48] На фігурі 15 показані виявлені методом ехокардіографії зміни у фракції викиду лівого шлуночка (LVEF) мишей з інфарктом міокарда в підданих і не підданих лікуванню триентином групах.

[49] На фігурі 16 наведені концентрації міді в зразках різних тканин мишей з інфарктом міокарда в підданих і не підданих лікуванню триентином групах.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

[50] У даному винаході пропонуються способи і композиції для відновлення і регенерації ішемізованої тканини шляхом промотування перерозподілу і повторного використання міді в тканині. Зокрема, описані способи підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, шляхом введення композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), і, необов'язково, мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. Описаний винахід оснований на несподіваному виявленні того, що хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), раніше застосовуваний для видалення іонів міді і зниження вмістів міді, може промотувати перерозподіл міді між ішемізованим міокардом і кровоотоком, коли його застосовують за будь-яким зі способів даного винаходу. Триентин, наприклад, може специфічно зв'язуватися з ішемізованою тканиною і сприяти завантаженню міді в клітини в ішемізованій тканині. Тому, триентин і інші хелатуючі мідь тетраміни з аналогічними властивостями можуть застосовуватися для підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованому міокарді, у результаті чого відбувається відновлення мідезалежної транскрипційної активності HIF-1, промотування відновлення тканини і зворотний розвиток ішемічного інфаркту міокарда. Тому,

описані у винаході способи і композиції можуть застосовуватися для лікування різних ішемічних захворювань і станів.

Способи підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді

[51] Даний винахід в одному аспекті пропонує спосіб підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (далі також називана "композицією тетраміну"). У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триєнтину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триєнтину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[52] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і введення індивідууму ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може збільшувати введення міді, зменшувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може змінювати розподіл міді між органами клітини. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять одночасно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[53] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і введення індивідууму ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять одночасно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість мідепромотуючої композиції підвищує позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[54] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму раніше була введена мідепромотуюча композиція, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може збільшувати введення міді, зменшувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або

більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[55] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму раніше вводили ефективну кількість мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість мідепромотуючої композиції підвищує позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[56] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб доставки іона міді в клітини ішемізованої тканини індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[57] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб доставки іона міді в клітини ішемізованої тканини індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і введення індивідууму ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може збільшувати введення міді, зменшувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять одночасно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[58] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб доставки іона міді в клітини ішемізованої тканини індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і введення індивідууму ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять одночасно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість мідепромотуючої композиції підвищує позаклітинний

вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[59] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб доставки іона міді в клітини ішемізованої тканини індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму раніше була введена мідепромотуюча композиція, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може збільшувати введення міді, зменшувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[60] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб доставки іона міді в клітини ішемізованої тканини індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму раніше вводили ефективну кількість мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість мідепромотуючої композиції підвищує позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[61] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб промотування перерозподілу міді в тканині і повторного використання міді у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[62] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб промотування перерозподілу міді в тканині і повторного використання міді у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і введення індивідууму ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може збільшувати введення міді, зменшувати виведення міді і/або знижувати

токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять одночасно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[63] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб промотування перерозподілу міді в тканині і повторного використання міді у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і введення індивідууму ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять одночасно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість мідепромотуючої композиції підвищує позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[64] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб промотування перерозподілу міді в тканині і повторного використання міді у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму раніше була введена мідепромотуюча композиція, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може збільшувати введення міді, зменшувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[65] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб промотування перерозподілу міді в тканині і повторного використання міді у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму раніше вводили ефективну кількість мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість мідепромотуючої композиції підвищує позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[66] У деяких варіантах здійснення внутрішньоклітинний вміст міді підвищують приблизно більше ніж на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % або більше в ішемізованій тканині індивідуума в порівнянні з внутрішньоклітинним вмістом міді в ішемізованій тканині індивідуума до лікування. У деяких варіантах здійснення вміст міді (наприклад, сумарний вміст міді) в ішемізованій тканині індивідуума підвищують приблизно більше ніж на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % або більше у порівнянні зі вмістом міді в ішемізованій тканині індивідуума до лікування. У деяких варіантах здійснення спосіб не знижує позаклітинний вміст міді (наприклад, вміст міді в сироватці крові) у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб не

знижує позаклітинний вміст міді (наприклад, вміст міді в сироватці крові) у індивідуума приблизно більше ніж на 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % або більше у порівнянні з позаклітинним вмістом міді у індивідуума до лікування. У деяких варіантах здійснення спосіб не знижує сумарний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб не знижує

сумарний вміст міді у індивідуума приблизно більше ніж на 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % або більше у порівнянні із сумарним вмістом міді у індивідуума до лікування. У деяких варіантах здійснення, після введення композиції тетраміну, індивідуум має щонайменше приблизно 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більше від середнього сумарного вмісту міді в сироватці крові здорових індивідуумів.

[67] Будь-який з описаних вище способів може додатково включати постійний контроль (у тому числі вимірювання і визначення) вмісту міді у індивідуума і коректування плану лікування на основі даних по вмісту міді. У деяких варіантах здійснення вміст міді являє собою позаклітинний вміст міді в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення вміст міді являє собою вміст міді в сироватці крові індивідуума. У деяких варіантах здійснення вміст міді являє собою внутрішньоклітинний вміст міді в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення вміст міді являє собою сумарний вміст міді, що включає як вміст Cu^{1+} , так і вміст Cu^{2+} , і/або включає як внутрішньоклітинний, так і позаклітинний вміст міді. У деяких варіантах здійснення вміст міді являє собою вміст Cu^{2+} . У деяких варіантах здійснення вміст міді являє собою вміст Cu^{1+} . У деяких варіантах здійснення вміст міді являє собою вміст вільної (тобто незв'язаної) міді. У деяких варіантах здійснення вміст міді включає як вміст вільної міді, так і вміст зв'язаної з білком міді. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає постійний контроль внутрішньоклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає коректування дози (у тому числі, наприклад, ефективної кількості, частоти введення і їх комбінації) композиції тетраміну на основі даних по внутрішньоклітинному вмісту міді у індивідуума.

[68] Різні вмісти міді можуть постійно контролюватися або роздільно, або в комбінації, до і/або після кожної стадії введення і відповідні вмісти міді до і після введення композицій тетраміну можуть бути піддані порівнянню для визначення, підвищується чи знижується вміст міді в результаті застосовуваного плану лікування. У деяких варіантах здійснення вміст міді, виміряний після введення композиції тетраміну, порівнюють із заданим вмістом міді для того, щоб визначити, чи вимагається додаткове підвищення вмісту міді. Заданий вміст міді може являти собою мінімальний вміст міді (такий як внутрішньоклітинний вміст міді або позаклітинний вміст міді), який необхідний для посилення мідезалежної транскрипційної активності HIF і/або для індукування одного або більше процесів відновлення ішемізованої тканини. План лікування може бути скоректований (включаючи розгляд таких питань як, наприклад, необхідність введення мідепромотуючої композиції, доза, частота і тривалість введення композиції тетраміну і, необов'язково, мідепромотуючої композиції і так далі) на основі будь-якого одного з позаклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині, вмісту міді в сироватці крові індивідуума, внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині, інших вмістів міді у індивідуума і їх комбінацій. Крім того, для оцінки плану лікування, може постійно контролюватися ступінь відновлення ураженої ішемією тканини. Способи постійного контролю відновлення ураженої ішемією тканини описані в розділі "Способи індукування відновлення тканини", які можуть включати, але цим не обмежуючи, оцінки патологічних, гістологічних або молекулярних маркерів, пов'язаних з ішемічним ураженням тканини.

[69] У деяких варіантах здійснення будь-якого одного з описаних у винаході способів (у тому числі способів у розділі "Способи індукування відновлення тканини"), спосіб додатково включає постійний контроль внутрішньоклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення внутрішньоклітинний вміст міді у індивідуума потребує додаткового підвищення після введення композиції тетраміну, якщо внутрішньоклітинний вміст міді становить щонайменше приблизно на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більше процентів нижче заданого внутрішньоклітинного вмісту міді. У деяких варіантах здійснення, коли внутрішньоклітинний вміст міді потребує додаткового підвищення, план лікування індивідуума коректують шляхом будь-якої з наступних дій або їх комбінації: (а) продовжують введення композиції тетраміну; (b) вводять композицію тетраміну при більш високій дозі; або (c) вводять композицію тетраміну при більш високій частоті дозування. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає коректування дози (у тому числі, наприклад, ефективної кількості, частоти введення і їх комбінації) композиції тетраміну на основі внутрішньоклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає постійний контроль позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення позаклітинний вміст міді у індивідуума потребує додаткового підвищення після введення композиції тетраміну, якщо

позаклітинний вміст міді у індивідуума знижується щонайменше приблизно на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більше після введення композиції тетраміну або якщо позаклітинний вміст міді у індивідуума становить щонайменше приблизно на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більше процентів нижче заданого позаклітинного вмісту міді. У деяких варіантах здійснення, коли позаклітинний вміст міді у індивідуума потребує підвищення, план лікування індивідуума додатково коректують шляхом будь-якої з наступних дій або їх комбінації: (a) вводять композицію тетраміну, яка включає іон міді, коли композиція тетраміну при застосовуваному плані лікування не включає іон міді; (b) вводять мідепромотуючу композицію, коли застосовуваний план лікування не включає введення мідепромотуючої композиції; (c) збільшують дозу мідепромотуючої композиції; (d) збільшують частоту введення дози мідепромотуючої композиції; (e) вводять іншу мідепромотуючу композицію; або (f) припиняють введення композиції тетраміну індивідууму.

[70] Вмісті міді можуть бути визначені і/або можуть постійно контролюватися будь-яким відомим методом. Наприклад, вміст міді може бути кількісно визначений методом атомної абсорбційної спектрофотометрії, методом мас-спектрометрії з індуктивно зв'язаною плазмою (ICPMS) або методом рентгенівської мікроскопії випромінювання, індукованого білком (PIXE). Див., наприклад, публікації Cooper G.J.S. et al. Diabetes (2004), 53:2501-2508; Lu J. et al. Drug Metabolism and Disposition (2007), 35(2):221-227; і патентний документ US Patent Publication № 20100160428A1. Наприклад, сумарний вміст міді в зразку ішемізованої тканини може бути вимірний, використовуючи гомогенізований зразок ішемізованої тканини (такий як ішемізована тканина, гомогенізована за допомогою азотної кислоти), який включає як внутрішньоклітинний, так і позаклітинний вміст ішемізованої тканини. Внутрішньоклітинний вміст міді в зразку ішемізованої тканини може бути вимірний, використовуючи клітини, виділені зі зразка ішемізованої тканини, і клітини потім лізують для вивільнення внутрішньоклітинного вмісту перед аналізом. Позаклітинний вміст міді у індивідуума може бути вимірний, використовуючи зразок фізіологічної рідини, у тому числі, але цим не обмежуючи, сироватку крові, плазму, цереброспінальну рідину, лімфу і слизу. У деяких варіантах здійснення сироватку крові використовують для постійного контролю позаклітинного вмісту міді. У деяких варіантах здійснення біопсію печінки використовують для визначення вмісту метаболізованої міді у індивідуума. Метод спектроскопії електронного парамагнітного резонансу, наприклад, може бути використаний для визначення ступеня окиснення (Cu^{1+} у порівнянні з Cu^{2+}) міді в зразку і для визначення процентного вмісту міді в кожному ступені окиснення в зразку. Так, наприклад, вміст Cu^{2+} може бути розрахований, використовуючи частку Cu^{2+} у зразку і сумарний вміст міді, що включає як вміст Cu^{1+} , так і вміст Cu^{2+} . Аналогічно, вміст Cu^{1+} може бути розрахований, використовуючи частку Cu^{1+} у зразку і сумарний вміст міді, що включає як вміст Cu^{1+} , так і вміст Cu^{2+} . У деяких варіантах здійснення вимірюють концентрацію церулоплазміну в сироватці і/або концентрацію білка сироваткового альбуміну, наприклад, використовуючи методи на основі антитіл (наприклад, вестерн-блотинг, ELISA і інші подібні методи) для постійного контролю вмісту міді, яка доступна для засвоєння і/або повторного використання ішемізованою тканиною. У деяких варіантах здійснення зразок поперечного зрізу ішемізованої тканини може бути використаний для вимірювання як внутрішньоклітинного, так і позаклітинного вмісту міді, використовуючи методи рентгенофлуоресцентної візуалізації (XRF).

[71] Описані у винаході способи можуть звичайно застосовуватися для перерозподілу міді (у тому числі, наприклад, для підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді і/або доставки міді в клітини) у різних ішемізованих тканинах. У деяких варіантах здійснення ішемізовану тканину вибирають із групи, що складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту і ішемізованої тканини скелетного м'яза (такої як ішемізована тканина кінцівки). У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована серцева тканина. У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована тканина головного мозку.

Способи індукування відновлення тканини

[72] Даний винахід в одному аспекті пропонує спосіб індукування щонайменше одного (у тому числі, наприклад, щонайменше 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більше) процесу відновлення тканини в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триєнтину і іона міді,

у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[73] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування щонайменше одного (у тому числі, наприклад, щонайменше 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більше) процесу відновлення тканини в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[74] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування щонайменше одного (у тому числі, наприклад, щонайменше 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більше) процесу відновлення тканини в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять одночасно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[75] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування щонайменше одного (у тому числі, наприклад, щонайменше 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більше) процесу відновлення тканини в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму була введена раніше ефективна кількість мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[76] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування щонайменше одного (у тому числі, наприклад, щонайменше 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більше) процесу відновлення тканини в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму раніше вводили ефективну кількість мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3

дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[77] У деяких варіантах здійснення будь-якого одного з описаних вище способів індукування відновлення тканини, щонайменше один процес (наприклад, щонайменше два процеси) відновлення тканини включає індукування міграції стовбурових клітин в ішемізовану тканину, у тому числі, але цим не обмежуючи, мезенхімальних стовбурових клітин (MSC), мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (BMSC), мультипотентних стовбурових клітин, індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPS) або стовбурових клітин, що утворюються в різних тканинах. У деяких варіантах здійснення щонайменше один процес (наприклад, щонайменше два процеси) відновлення тканини включає індукування диференціювання стовбурових клітин в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення щонайменше один процес (наприклад, щонайменше два процеси) відновлення тканини включає індукування регенерації тканини в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення щонайменше один процес (наприклад, щонайменше два процеси) відновлення тканини включає зворотний розвиток ушкодження в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення щонайменше один процес (наприклад, щонайменше два процеси) відновлення тканини включає відновлення мікрооточення нейрофібрилярних клітин і нейросекреторних клітин в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення щонайменше один процес (наприклад, щонайменше два процеси) відновлення тканини включає індукування сигнальної молекули, яка ініціює регенерацію тканини. У деяких варіантах здійснення щонайменше один процес (наприклад, щонайменше два процеси) відновлення тканини включає посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) в ішемізованій тканині.

[78] Описані у винаході способи можуть застосовуватися для індукування процесів відновлення тканини (у тому числі, наприклад, посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) і/або індукування міграції стовбурових клітин в ішемізовану тканину) у різних типах ішемізованих тканин. У деяких варіантах здійснення ішемізовану тканину вибирають із групи, що складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту і ішемізованої тканини скелетного м'яза (такої як ішемізована тканина кінцівки). У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована серцева тканина. У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована тканина головного мозку.

[79] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування міграції (тобто хоумінгу) стовбурових клітин в ішемізовану тканину індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триєнтину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триєнтину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[80] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування міграції (тобто хоумінгу) стовбурових клітин в ішемізовану тканину індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати

засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[81] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування міграції (тобто хоумінгу) стовбурових клітин в ішемізовану тканину індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять одночасно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[82] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування міграції (тобто хоумінгу) стовбурових клітин в ішемізовану тканину індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму була введена раніше ефективна кількість мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[83] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування міграції (тобто хоумінгу) стовбурових клітин в ішемізовану тканину індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму раніше вводили ефективну кількість мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[84] У деяких варіантах здійснення стовбурові клітини являють собою мезенхімальні стовбурові клітини (MSC), мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку (BMSC), мультипотентні стовбурові клітини, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPS) або стовбурові клітини, що утворюються в різних тканинах. У деяких варіантах здійснення стовбурові клітини, що утворюються в тканинах, являють собою стовбурові клітини, що утворюються в жировій тканині, стовбурові клітини, що утворюються в серцевій тканині, або стовбурові клітини, що утворюються в тканині пупкового канатика. В інших варіантах здійснення стовбурові клітини являють собою дорослі стовбурові клітини. У конкретних аспектах, дорослі стовбурові клітини являють собою кровотворні стовбурові клітини, стовбурові клітини молочної залози, інтестинальні стовбурові клітини, мезенхімальні стовбурові клітини в плаценті, жировій тканині, легені, кістковому мозку, крові, вартонових драгках пупкового канатика або зубах (наприклад, периваскулярній ніші пульпи зуба і з'єднувальній зв'язці періодонта), ендотеліальні стовбурові клітини, нейрональні стовбурові клітини, дорослі стовбурові клітини органів нюху,

стовбурові клітини нейрального гребеня або зародкові стовбурові клітини (наприклад, стовбурові клітини в сім'янику).

[85] У деяких варіантах здійснення стовбурові клітини мігрують *in vivo* з компартменту органа або тканини до місця ішемічного ушкодження в іншому компартменті органа або тканини індивідуума, що має ішемічне ураження тканини. Наприклад, мезенхімальні стовбурові клітини (MSC) можуть мігрувати з кісткового мозку (BM), пуповинної крові (UCB), пуповинної строми (вартонових драглів), плаценти і жирової тканини (AT). В інших варіантах здійснення мезенхімальні стовбурові клітини (MSC) можуть бути виділені з компартменту органа або тканини, збагачені і/або оброблені *in vitro* і потім використані *in vivo* для міграції до місця ушкодження органа або тканини.

[86] Методи дослідження для вимірювання міграції клітин, які можуть бути використані в даному винаході, включають, але цим не обмежуючи, біомаркери, біолюмінесценцію, флуоресценцію, позитронно-емісійну томографію (PET)/комп'ютерну томографію і магнітно-резонансну томографію (MRI) *in vivo*. Дослідження *in vivo* можуть бути валідизовані і підтверджені іншими методами, наприклад імуногістохімічним дослідженням (IHC) на зрізах тканини.

[87] *In vivo* методи неінвазивної візуалізації для дослідження міграції стовбурових клітин включають візуалізуючі частинки з нанесеним шаром золото-декстран, завантажувані в мезенхімальні стовбурові клітини (MSC), які можуть бути візуалізовані за допомогою рентгеноспектроскопії, спектроскопії комбінаційного розсіювання, комп'ютерної томографії (CT) або впливів ультразвуку (US). У деяких варіантах здійснення в стовбурові клітини, такі як мезенхімальні стовбурові клітини (MSC), завантажують біосумісні наноконструкції, мічені речовини або суперпарамагнітні частинки із властивостями, що дозволяють здійснювати візуалізацію клітин рентгеноспектроскопією, комп'ютерною томографією (CT), впливом ультразвуку (US), позитронно-емісійною томографією (PET) або магнітно-резонансною томографією (MRI). У деяких варіантах здійснення міграція стовбурових клітин може бути досліджена такими методами як накладення лігатури і прокол сліпої кишки (CLP). Наприклад, проведення CLP на химерній миші із зеленим флуоресцентним білком (GFP) дозволяє спостерігати поведінку мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (BMSC) на фоні абдомінального сепсису. Сортуння флуоресцентно активованих клітин (FACS), проточна цитометрія і імуногістохімічне дослідження можуть бути використані для відстеження міграції мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (BMSC) у периферичну кров, легеню, печінку, рану на шкірі і первинний осередок ішемічного ушкодження. Поведінка мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (BMSC) може бути співвіднесена із часом ушкодження, а також з локальним (використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією (RT-PCR)) і системним вмістом цитокінів і хемокінів. Відстеження міграції стовбурових клітин може допомогти з'ясувати внесок мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (BMSC) у відновлення і регенерацію локального і віддаленого органа і тканини після ішемічного ураження тканини.

[88] У деяких варіантах здійснення міграція стовбурових клітин може постійно контролюватися за допомогою мічених клітин, що вводяться індивідууму. Для того, щоб помітити стовбурові клітини, використовують такі підходи як введення ізотопних міток і забарвлення. У деяких варіантах здійснення методи введення мітки включають введення стовбурових клітин самців самкам, внаслідок чого Y-хромосома може бути трекером; введення стовбурових клітин виду А виду В, внаслідок чого специфічні гени виду А можуть бути трекером для клітин; нанесення мітки на стовбурові клітини за допомогою рKH26, BrdU або інших барвників, внаслідок чого стовбурові клітини можна відслідковувати по забарвленню або по специфічних ферментативних реакціях із трекером.

[89] У деяких варіантах здійснення для відстеження стовбурових клітин *in vivo* використовують ізотопні мітки. Стовбурові клітини можуть відслідковуватися за допомогою ізотопів, якими мітять клітини, але слід зазначити, що при цьому необхідно враховувати проблеми техніки безпеки і період напіврозпаду радіоізотопу. Інші *in vivo* методи відстеження стовбурових клітин включають, але цим не обмежуючи, забарвлення клітин за допомогою барвників для клітин, таких як DID, прижиттєву візуалізацію поверхні клітин організму методом мікроскопії флуоресценції із двофотонним збудженням, прижиттєву візуалізацію поверхні специфічних клітин організму трансгенних тварин методом мікроскопії флуоресценції із двофотонним збудженням, нанесення міток на клітини за допомогою частинок супермагнітного оксиду заліза (SPIO) і відстеження трекера методом магнітно-резонансної томографії (MRI), і інші методи. Стовбурові клітини можуть бути помічені за допомогою багатьох флуоресцентних барвників і потім введені тваринам. Незадовго до проведення експерименту по відстеженню,

органи-мішені можуть бути заморожені, з них приготовлені зрізи, і ці зрізи вивчають безпосередньо методом конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Цей метод відстеження не вимагає занадто великої кількості мічених клітин (10^6 клітин/кролика), тому аутологічні клітини можуть відслідковуватися в природних умовах для органів і тканин.

[90] Введення мітки в стовбурові клітини може бути здійснене, наприклад, за допомогою одного єдиного трекера, такого як rKH26. rKH26 є жиророзчинним барвником, і при використанні rKH26 як мітки він не проходить через клітинну мембрану. Тому, rKH26 застосовують для прижиттєвої візуалізації. Описаний у винаході метод відстеження може включати введення множини міток за допомогою 2 або 3 барвників. У деяких варіантах здійснення для введення множини міток використовують ядерний трекер (DAPI, Hoechst) плюс мембранний трекер. Ядерний трекер підтверджує присутність ядер клітин і одночасно відображає мембранний трекер rKH26. У деяких варіантах здійснення для введення множини міток використовують 2 мембранні трекери, наприклад Dio (3) і rKH26. Ці трекери мітять клітини за допомогою аналогічних механізмів, але мають різні довжини хвиль збудження і випромінювання, що дозволяє одночасно підтверджувати міграцію (тобто хоумінг) стовбурових клітин (таких як мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку (BMSC)) по 2 різних флуоресцентних сигналах. У цьому методі відстеження, тільки сигнали, що перекриваються, з різними довжинами хвиль (такі як червоні і зелені сигнали) вважають сигналами хоумінгу.

[91] Багато видів тканин тварин є автофлуоресцюючими, і найпоширенішою автофлуоресценцією у природних тканинах є зелена флуоресценція. Клітинки серцевої тканини мають відносно низьку флуоресценцію, але їх флуоресценція є достатньо сильною для того, щоб створювати перешкоди при спостереженнях. Обрізана кромка зрізів завжди має найсильнішу флуоресценцію. Для виключення перешкод, тільки зелені і червоні сигнали, що перекриваються, можуть бути віднесені до сигналів спостереження. Червона флуоресценція є більш придатною для статистичного аналізу за допомогою величини інтегральної оптичної густини (IOD) через її специфічність (крім випадків очевидної похибки сигналів червоної флуоресценції).

[92] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування диференціювання стовбурових клітин в ішемізованій тканині, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму мідепротуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму попередньо вводять мідепротуючу композицію, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення мідепротуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепротуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепротуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення стовбурова клітина здатна до диференціювання в мезенхімний тип клітин, у тому числі в остеобласти, адипоцити, хондроцити, ендотеліальні клітини, епітеліальні клітини, ентероцити, остеоцити, нейроцити, гепатоцити, нефроцити, міоцити (скелетного м'яза і гладкого м'яза) і кардіоміоцити. В інших варіантах здійснення стовбурова клітина здатна до диференціювання в клітини немезодермального походження, у тому числі в бета-клітини, гепатоцити і нейрони. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[93] Добре відомі методи аналізу можуть застосовуватися для виявлення процесу диференціювання стовбурових клітин і фенотипів диференційованих стовбурових клітин (таких як мезенхімальні стовбурові клітини, наприклад мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку), у тому числі, але цим не обмежуючи, лужна фосфатаза і забарвлення алізариним

червоним S для остеобластів, забарвлення масляним червоним O для адипоцитів і забарвлення альціановим синім для хондроцитів. Диференціювання стовбурових клітин, таких як мезенхімальні стовбурові клітини, у клітини різних типів може бути також досліджене шляхом аналізу експресії гена. Наприклад, аналіз транскрипції дозволяє ідентифікувати специфічні гени, залучені в остеогенне диференціювання (FHL2, ITGA5, Fgf18), хондрогенез (FOXC1A) і теногенез (Smad8). У деяких варіантах здійснення мезенхімальні стовбурові клітини можуть породжувати більші кількості клітин у результаті великомасштабного росту.

[94] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування регенерації тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентинном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму мідепротуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму попередньо вводять мідепротуючу композицію, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення мідепротуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепротуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепротуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення спосіб індукує проліферацію клітин в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення спосіб індукує ангиогенез в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення спосіб індукує дозрівання кровоносних судин в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення спосіб дозволяє досягати двох або більше із описаних вище ефектів. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[95] Описана у винаході регенерація тканини може бути досліджена, наприклад, в організмі, у якому частина тканини ушкоджена або видалена. Описану у винаході композицію тетраміну потім вводять в організм і визначають ступінь регенерації тканини. Ступінь регенерації тканини можна порівняти зі ступенем регенерації, що спостерігається при введенні в організм контрольної речовини або у випадку відсутності лікування. Інші параметри, які можуть бути визначені при дослідженні регенерації тканини, включають, але цим не обмежуючи, симптоми або результати лікування, такі як біль або джерела болю, ознаки або симптоми запалення, кінцевий ступінь регенерації і якість регенерації. У деяких варіантах здійснення дослідження у винаході регенерації тканини включає оцінку одного або більше параметрів функціонування органа, таких як один або більше маркерів функціонування серця, один або більше маркерів функціонування нирок і один або більше маркерів функціонування головного мозку.

[96] У деяких варіантах здійснення один або більше із наступних параметрів при аналізі регенерації і відновлення серцевої тканини можуть бути використані для оцінки описаних у винаході способів: (1) кількість відновленої тканини або маса міокарда і веневої судинної системи; (2) число і розмір відновлених міоцитів і судин; (3) інтеграція знову утворених міоцитів і судин з оточуючим їх міокардом; і (4) походження регеноерованих міокардіальних структур. В одному аспекті, може бути проведена магнітно-резонансна томографія (MRI) для дослідження області рубцювання, глобальної функції лівого шлуночка, регіонарної функції (рухливості і стовщення стінки) і регіонарної вентрикулярної перфузії. В іншому аспекті, магнітно-резонансну томографію (MRI) використовують для виявлення і/або підтвердження присутності нових судин, тканини або клітин, які поліпшують функцію шлуночка. У ще одному аспекті, може бути проведено гістопатологічне дослідження для визначення області рубцювання і ідентифікації і кількісної оцінки c-kit-позитивних стовбурових клітин серця. Гістопатологічне дослідження також дозволяє одержати дані по розподілу, розміру і щільності нових судин і кардіоміоцитів. Гістопатологічне дослідження дає можливість документально підтвердити процес відновлення на рівні тканини і на клітинному рівні. Наприклад, проводять випробування для оцінки, у гістологічних зрізах при інфаркті, щільності мікросудинної сітки (vWF-позитивні судини/мм²),

BrdU-позитивних клітин і c-kit-позитивних клітин. Кількісне визначення щільності мікросудинної сітки з використанням фактора фон Віллебранда (vWF) дозволяє визначити кількість нових кровоносних судин, що утворилися в зоні інфаркту. BrdU-позитивні клітини характеризують проліферацію клітин, у тому числі клітин серця. Тести на c-kit-позитивні клітини показують

кількість стовбурових клітин в вибраних гістологічних зрізах при інфаркті.

[97] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування зворотного розвитку ушкодження в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триєнтину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триєнтину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму попередньо вводять мідепромотуючу композицію, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[98] Зворотний розвиток ушкодження тканини може бути досліджений придатним методом, наприклад детектуванням клітинних маркерів гомеостазу здорової тканини і/або стійкого ушкодження тканини (наприклад, імуногістохімічним методом або вимірюванням рівнів ДНК і транскриптів), вимірюванням площі ушкодження або об'єму ушкодження або оцінкою будь-яких клінічно релевантних показників. Наприклад, зворотний розвиток ушкодження серцевої тканини в підданій інфаркту тканині може бути виміряне шляхом підрахунку числа клітин, наприклад числа міоцитів, фіброblastів або кількості рубців, що утворилися, або за допомогою функціональних досліджень продуктивності або структурних аспектів функції серця, включаючи кінцевий діастолічний тиск у лівому шлуночку (LVEDP), діастолічний тиск у лівому шлуночку (LVDP), максимальну швидкість наростання тиску в лівому шлуночку в ранній фазі систоли (dp/dt), мінімальну швидкість наростання тиску в лівому шлуночку в ранній фазі систоли (dp/dt), масу лівого шлуночка, об'єм камери і діастолічне напруження стінки. У загальному випадку, розкритий у винаході спосіб, як зазначено, індукує зворотний розвиток ушкодження в ішемізованій тканині, якщо він приводить у результаті до значної зміни (наприклад, щонайменше в 2 рази) будь-якої такої клінічної оцінки або будь-якої їх комбінації. У деяких варіантах здійснення спосіб індукує зворотний розвиток фіброзу в ішемізованій тканині. Фіброз являє собою аномальне накопичення фіброзної тканини, яке може відбуватися як частина процесу загоєння рани в ушкодженій тканині. Таке ушкодження тканини може бути результатом фізичної травми, запалення, інфекції, впливу токсинів і інших причин.

[99] Фіброзні тканини накопичуються в серці і кровоносних судинах у результаті гіпертонії, гіпертензивної кардіопатії, атеросклерозу і інфаркту міокарда. Високий кров'яний тиск або гіпертонія може викликатися рядом факторів і часто призводить до розвитку гіпертензивної кардіопатії (HHD), яка у свою чергу може викликати зупинку серця і інфаркт міокарда. Аналогічно, атеросклероз і інші ішемічні захворювання серця також часто призводять до зупинки серця. Ці серцево-судинні захворювання всі характеризуються накопиченням позаклітинної матриці або фіброзного відкладання, які призводять до втрати еластичності судинної сітки і до втрати еластичності самої серцевої тканини. Це відкладання фіброзного матеріалу є реакцією відповіді на ушкодження, що викликається гіпертензивним і/або склеротичним станом, але ефекти цієї реакції відповіді також впливають на еластичність судин і тканини серця, а також викликають гіпертрофію шлуночків. У ряді випадків, підвищений кардіальний фіброз при серцево-судинному захворюванні порушує або змінює сигнали, що

передаються кардіоміоцитам через каркас для підтримання тканин серця, що надалі призводить до порушення ефективності серцевої діяльності і сприяє зупинці серця і інфаркту міокарда.

[100] Відповідно до даного винаходу, профілі експресії генів, диференційно регульовані при ушкодженні тканини, можуть бути використані для оцінки зворотного розвитку ушкодження тканини в розкритому у винаході способі лікування. Наприклад, мікроматричний аналіз експресії гена може бути оснований на аналізі клітин людини (таких як фібробласти і кардіоміоцити), підданих впливу вибраних стимулів, що призводить до змін позаклітинної акумуляції колагену і проліферації, відмітних ознак фіброзу. Можуть бути вибрані такі стимули, які імітують стимули при тканинспецифічному фіброзі. Профілі експресії генів, пов'язані з фіброзом (наприклад, фіброзом печінки, фіброзом легені, фіброзом тканини серця, діабетичною нефропатією і фіброзом нирок), можуть потім бути використані для дослідження фіброзу і зворотного розвитку фіброзного ушкодження тканини. В інших варіантах здійснення профілі експресії генів, пов'язані зі зворотним розвитком фіброзу (наприклад, при лікуванні, відомому щонайменше для часткового зворотного розвитку фіброзу), можуть бути використані для дослідження фіброзу і зворотного розвитку фіброзного ушкодження тканини.

[101] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб відновлення мікрооточення клітин нейрофібрили і нейросекреторних клітин в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму попередньо вводять мідепромотуючу композицію, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[102] Мікрооточення являє собою складну мережу як структурних клітин, так і запальних клітин, цитокінів, білків і факторів росту. У випадку ішемії, пов'язаної з фіброзними захворюваннями або станами серця, серце включає резидентні структурні клітини, такі як кардіоміоцити, епітеліальні клітини, фібробласти, і резидентні клітини-попередники кардіоміоцитів і клітини, секретуючі цитокіни. У процесі розвитку фіброзу ці клітини взаємодіють із факторами фіброзу. У конкретних аспектах у створенні фіброзного середовища важливу роль відіграють фібробласти і міофібробласти, оскільки вони виділяють надлишковий колаген і матричні матеріали, які приводять до необоротного утворення рубців. Молекули міжклітинної адгезії і ліганди позаклітинного матриксу є важливими факторами у фіброзному мікрооточенні і промотують фіброз і диференціювання фібробластів. У деяких варіантах здійснення досліджують опосередковану адгезією активацію сигнального шляху в мікрооточенні тканини. Наприклад, диференціювання і міграція клітин відбуваються у відповідь на механічні подразники з мікрооточення, такі як жорсткість оточуючої матриці. В одному аспекті, досліджують і модулюють еластичність тканини або матриць культур мезенхімальних стовбурових клітин (MSC) для промотування хоумінгу стовбурових клітин в ішемічну ушкоджену тканину, диференціювання стовбурових клітин у місці ішемічного ушкодження, відновлення тканини і/або зворотного розвитку ушкодження тканини. В одному варіанті здійснення м'які матриці викликають диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин (MSC) у нейроноподібні клітини, тоді як жорсткі матриці викликають диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин (MSC) у міогенні клітини. В одному аспекті, досліджують позаклітинний матрикс і його компоненти в місці ішемічного ушкодження для того, щоб з'ясувати, чи промотує

мікрооточення міграцію стовбурових клітин до місця ушкодження тканини, диференціювання стовбурових клітин у місці ішемічного ушкодження, відновлення тканини і/або зворотний розвиток ушкодження тканини.

[103] У деяких варіантах здійснення вимірюють зміни в клітинах в умовах їх природного оточення для того, щоб з'ясувати ефективність і/або токсичність розкритого у винаході способу лікування. У деяких варіантах здійснення досліджують і/або модулюють мікрооточення стовбурових клітин у донорній тканині або органі (такому як кістковий мозок) і в місці ішемічного ушкодження для того, щоб промотувати міграцію стовбурових клітин до місця ушкодження, диференціювання стовбурових клітин у місці ішемічного ушкодження, відновлення тканини і/або зворотний розвиток ушкодження тканини. Місцеве мікрооточення тканини може бути досліджене шляхом забарвлення білка (методом імуногістохімії (IHC) і імуофлуоресценції (IF)) і шляхом забарвлення РНК методом або хромогенної, або флуоресцентної гібридизації *in situ* (ISH). Наприклад, гіпоксичне мікрооточення може бути виявлене забарвленням маркера гіпоксії, забарвленням маркера ендотеліальних клітин, дослідженням щільності мікросудинної сітки і дослідженням проксимального оточення. Мікрооточення тканини може бути також досліджене з використанням органних культур або органотипічних культур, описаних у публікації Benbrook, 2006, *Drug Discovery Today: Disease Models*, 3(2):143-148.

[104] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування сигнальної молекули, яка ініціює регенерацію тканини в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триєнтину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триєнтину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму попередньо вводять мідепромотуючу композицію, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[105] Описані у винаході придатні сигнальні молекули включають, але цим не обмежуючи, HIF-1, VEGF, SDF-1, CXCR4, CXCL12 (також називаний SDF-1 α), MMP, HGF/c-met, TGF- β 1, IL-1 β , TNF- α , CCR1, CCR4, CCR7, CCR10, CCR9, CXCR5, CXCR6, CD44, CD54, CD56, CD106, Е-кадгерин, Р-селектин, інтегрини, такі як інтегрин-бета1 і CD49a, b, c, e, f (інтегрини α 1, 2, 3, 4, 6) і ліганди інтегрину, такі як VCAM і ICAM.

[106] Вісь SDF-1/CXCR4 є одним з найважливіших механізмів хоумінгу стовбурових клітин. SDF-1 (фактор стромальних клітин 1 або CXCL12), що належить до сімейства CXС-хемокінів, являє собою білок, секретований малою молекулою. Експресія SDF-1 регулюється за допомогою HIF-1 (індукованого гіпоксією фактора-1). HIF-1 складається з HIF-1 α і HIF-1 β /ARNT (ядерного транслокатора з арильним вуглеводневим рецептором, ARNT). HIF-1 β стабільний у цитоплазмі, тому експресія і накопичення HIF-1 α визначає активність HIF-1. В умовах нормоксії відбувається синтез білка HIF-1 α і його швидка деградація під впливом системи убіквітин-протеасома. Пролілігдроксилази (PHD) гідроксильють HIF-1 α , і гідроксильований HIF-1 α розпізнається білком-супресором пухлинного росту фон Хіппель-Ліндау (pVHL), який утворює убіквітин-протеїнлігазу, яка таргетує HIF-1 α на деградацію білка. Після ішемічного ураження тканини, ушкоджена область є гіпоксичною, і вона інгібує активність пролілігдроксилази (PHD), що сприяє накопиченню HIF-1 α і транслокації його в ядро, де HIF-1 α димеризується з HIF-1 β з утворенням HIF-1, об'єднується з іншими факторами і ініціює транскрипцію генів-мішеней. Ушкоджені тканини експресують високий рівень SDF-1 і вивільняють SDF-1 у кровотік, створюючи градієнт концентрації між ушкодженою областю і віддаленою частиною кровотоку. У

результаті, градієнт спрямовує CXCR4-експресовані стовбурові клітини, включаючи мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку (BMSC), до ушкоджених тканин.

[107] Коли серце знаходиться в стані хронічної гіпоксії, кров у коронарних артеріях не може задовольнити потреби міокарда. Хронічна ішемія може викликати фіброз міокарда, зменшити щільність сітки мікроартерій, погіршити нагнітання крові і призвести, в остаточному підсумку, до ішемічного інфаркту міокарда. При хронічній ішемії активність HIF-1 обмежена, що приводить до інгібування експресії ангіогенних факторів, які регулюються за допомогою HIF-1. У результаті неможливо відновити кровотік і може відбутися інфаркт.

[108] Звичайно активність HIF-1 у тканинах, ушкоджених у результаті ішемії, тимчасово обмежена. Як в експериментах на тваринах, так і при клінічних випробуваннях було показано, що при серцевій ішемії в ушкоджених тканинах відразу після ушкодження накопичується HIF-1 α , але потім його вміст поступово зменшується. Активність HIF-1 знижується навіть швидше, ніж вміст HIF-1, що приводить до зменшення експресії факторів, регульованих HIF-1, таких як VEGF і SDF-1, після транзиторного підвищення активності. Завдяки регуляції за допомогою HIF-1, експресія SDF-1 досягає максимального значення на перший або другий день після інфаркту міокарда. Потім експресія SDF-1 поступово зменшується і досягає вихідного рівня приблизно через один місяць. Оскільки SDF-1 є одним з мобілізаторів хоумінгу стовбурових клітин, зниження рівня SDF-1 приводить до зниження і навіть зникнення хоумінгу стовбурових клітин.

[109] Важливо відзначити, що захисні механізми, індуковані за допомогою HIF-1 α , які активуються в умовах гострої ішемії, функціонують інакше, ніж в умовах тривалої ішемії. В умові тривалої ішемії рівні білка HIF збільшуються в ішемізованому міокарді, тоді як гени, регульовані HIF (такі як VEGF), супресуються, що приводить до зменшення реваскуляризації і порушення регенерації. Втрата міді знижує зв'язування HIF-1 α з послідовністю гіпоксія-респонсивного елемента (HRE) генів-мішеней і з P300, компонентом транскрипційного комплексу HIF-1. Крім того, мідь суттєво мобілізується з міокарда в кров після тривалої ішемії. Ця мобілізація міді в коронарний потік чутливо супроводжує тривалу, але не короточасну серцеву ішемію. Втрата міді в міокарді корелює зі ступенем втрати серцевих функцій. Отже, навіть за умови підвищеного вмісту білка HIF, не відбувається підвищення регуляції HIF-контрольованих генів через втрату міді в міокарді. Елементи в слідових кількостях, такі як мідь, можуть приводити до активації HIF-1, що включає синтез HIF-1 α , стабілізацію, транслокацію із цитозолу в ядро, зв'язування з послідовністю HRE генів-мішеней і утворення транскрипційного комплексу HIF-1. Тому мідезалежна транскрипційна активність HIF-1, що включає мідезалежну індукцію генів-мішеней HIF-1 або мідезалежну репресію генів-мішеней HIF-1, може відігравати важливу роль у відновленні ішемізованих тканин. Описані у винаході способи можуть застосовуватися для індукування однієї або декількох сигнальних молекул, таких як HIF-1 α і мідезалежні HIF-1 (такі як HIF-1 α) гени-мішені.

[110] В одному аспекті даного винаходу пропонується спосіб посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триєнтину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триєнтину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення спосіб індукує експресію щонайменше одного мідезалежного HIF-1 гена-мішені в ішемізованій тканині індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб репресує експресію щонайменше одного мідезалежного HIF-1 гена-мішені в ішемізованій тканині індивідуума. У деяких варіантах здійснення щонайменше один мідезалежний HIF-1 ген-мішень вибирають із групи, що складається з VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 і BNP3. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[111] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) в ішемізованій тканині

індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення спосіб індукує експресію щонайменше одного мідезалежного HIF-1 гена-мішені в ішемізованій тканині індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб репресує експресію щонайменше одного мідезалежного HIF-1 гена-мішені в ішемізованій тканині індивідуума. У деяких варіантах здійснення щонайменше один мідезалежний HIF-1 ген-мішень вибирають із групи, що складається з VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 і BNIP3. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[112] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять одночасно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення спосіб індукує експресію щонайменше одного мідезалежного HIF-1 гена-мішені в ішемізованій тканині індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб репресує експресію щонайменше одного мідезалежного HIF-1 гена-мішені в ішемізованій тканині індивідуума. У деяких варіантах здійснення щонайменше один мідезалежний HIF-1 ген-мішень вибирають із групи, що складається з VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 і BNIP3. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[113] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму була введена раніше ефективна кількість мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення спосіб індукує експресію щонайменше одного мідезалежного HIF-1 гена-мішені в ішемізованій тканині індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб репресує експресію щонайменше одного мідезалежного HIF-1 гена-мішені в ішемізованій тканині індивідуума. У деяких варіантах здійснення щонайменше один мідезалежний HIF-1 ген-мішень вибирають із групи, що складається з VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 і BNIP3. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[114] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де

індивідууму раніше вводили ефективну кількість мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепромотуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення спосіб індукції експресії щонайменше одного мідезалежного HIF-1 гена-мішені в ішемізованій тканині індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб репресії експресії щонайменше одного мідезалежного HIF-1 гена-мішені в ішемізованій тканині індивідуума. У деяких варіантах здійснення щонайменше один мідезалежний HIF-1 ген-мішень вибирають із групи, що складається з VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 і BNIP3. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[115] У науковій літературі описані HIF-1 гени-мішені. Див., наприклад, публікації Benita Y. et al. (2009), *Nucleic Acids Research*, 37 (14):4587-4602; Shen C. et al. (2008), *J. Biol. Chem.*, 280:20580-20588; Elvidge G.P. et al. (2006), *J. Biol. Chem.*, 281:15215-15266; Manalo D.J. et al. (2005), *Blood*, 105:659-669; при цьому HIF-1 гени-мішені включені у винахід шляхом посилання на них. Регуляція транскрипції за допомогою HIF-1 субпопуляції HIF-1 генів-мішеней залежить від міді, і субпопуляцію HIF-1 генів-мішеней називають у винаході мідезалежними HIF-1 генами-мішенями. Регуляція транскрипції за допомогою HIF-1 деяких генів-мішеней HIF-1 не залежить від міді. Див., наприклад, публікацію Zhang Z. et al. (2014), *Metallomics* 6(10):1889-93. Приклади мідезалежних HIF-1 генів-мішеней включають, але цим не обмежуючи, фактор росту судинного ендотелію (VEGF), гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу (GAPDH), транспортер глюкози 1 (GLUT1), фосфогліцераткіназу 1 (PGK1) і BCL2/аденовірус E1B 19 кДа білок-взаємодіючий білок 3 (BNIP3).

[116] Мідезалежна транскрипційна активність HIF-1, розглянута в даному винаході, включає індукцію або репресію (тобто транскрипційну регуляцію) експресії мідезалежних HIF-1 генів-мішеней в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення мідезалежна транскрипційна активність HIF-1 (наприклад, кратність індукції або репресії мідезалежного гена-мішені HIF-1) знижується щонайменше на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більше в ішемізованій тканині індивідуума до проведення лікування в порівнянні з контрольним рівнем. У деяких варіантах здійснення мідезалежна транскрипційна активність HIF-1 (наприклад, кратність індукції або репресії мідезалежного гена-мішені HIF-1) в ішемізованій тканині індивідуума відновлюється щонайменше на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більше у порівнянні з контрольним рівнем після проведення лікування індивідуума. Контрольний рівень мідезалежної транскрипційної активності HIF-1 може ґрунтуватися на сумі індукції або репресії гена-мішені HIF-1 у здоровій тканині в умовах гострої ішемії або при станах гіпоксії порівнянного рівня в порівнянні з нормальними умовами (наприклад, відсутність ушкоджень або нормальні умови забезпечення киснем). Мідезалежна транскрипційна активність HIF-1 може бути визначена шляхом порівняння рівня експресії (наприклад, рівня РНК і/або рівня білка) мідезалежного HIF-1 гена-мішені в ішемізованій тканині з рівнем експресії мідезалежного HIF-1 гена-мішені в здоровій тканині. Рівні експресії РНК можуть бути виміряні будь-яким з відомих методів, що включають, але цим не обмежуючи, полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією (RT-PCR), кількісну RT-PCR, мікроматричний аналіз і методи секвенування РНК. Рівні експресії білка можуть бути виміряні будь-яким з відомих методів, що включають, але цим не обмежуючи, методи на основі застосування антитіл (такі як вестерн-блотинг і ELISA) і кількісні протеомічні методи (такі як кількісна мас-спектрометрія).

[117] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування щонайменше двох (у тому числі, наприклад, щонайменше будь-якого з 3, 4, 5, 6, 7 або більше) процесів відновлення тканини у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де щонайменше два процеси відновлення тканини вибирають із групи, що складається з індукування міграції стовбурових клітин, таких як мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку, в ішемізовану тканину, індукування диференціювання стовбурових клітин в ішемізованій тканині, індукування регенерації тканини в ішемізованій тканині, індукування сигнальної молекули, яка ініціює регенерацію тканини, зворотного розвитку ушкодження в ішемізованій тканині, відновлення мікрооточення клітин нейрофібрили і нейросекреторних клітин в ішемізованій тканині і посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при

гіпоксії фактора 1 (HIF-1). У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триєнтину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триєнтину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму попередньо вводять мідепромотуючу композицію, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[118] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування міграції стовбурових клітин (таких як мезенхімальні стовбурові клітини (MSC), наприклад мезенхімальні стовбурові клітини головного мозку (BMSC)) в ішемізовану тканину і індукування диференціювання стовбурових клітин в ішемізованій тканині, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування міграції стовбурових клітин (таких як мезенхімальні стовбурові клітини (MSC), наприклад мезенхімальні стовбурові клітини головного мозку (BMSC)) в ішемізовану тканину і індукування регенерації тканини в ішемізованій тканині, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування міграції стовбурових клітин (таких як мезенхімальні стовбурові клітини (MSC), наприклад мезенхімальні стовбурові клітини головного мозку (BMSC)) в ішемізовану тканину, індукування диференціювання стовбурових клітин в ішемізованій тканині і індукування регенерації тканини в ішемізованій тканині, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триєнтину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триєнтину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму попередньо вводять мідепромотуючу композицію, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[119] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування відновлення ішемізованої тканини (або поліпшення функції ішемізованої тканини) у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює

комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ішемізовану тканину вибирають із групи, що складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту і ішемізованої тканини скелетного м'яза (такої як ішемізована тканина кінцівки). У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована серцева тканина. У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована тканина головного мозку. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[120] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування відновлення ішемізованої тканини (або поліпшення функції ішемізованої тканини) у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ішемізовану тканину вибирають із групи, що складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту і ішемізованої тканини скелетного м'яза (такої як ішемізована тканина кінцівки). У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована серцева тканина. У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована тканина головного мозку. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[121] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування відновлення ішемізованої тканини (або поліпшення функції ішемізованої тканини) у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, і ефективної кількості мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять одночасно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і мідепромотуючу композицію вводять послідовно. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ішемізовану тканину вибирають із групи, що складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту і ішемізованої тканини скелетного м'яза (такої як ішемізована тканина кінцівки). У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована серцева тканина. У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована тканина головного мозку. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[122] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування відновлення ішемізованої тканини (або поліпшення функції ішемізованої тканини) у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму була введена раніше

ефективна кількість мідепротуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення мідепротуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепротуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепротуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ішемізовану тканину вибирають із групи, що складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту і ішемізованої тканини скелетного м'яза (такої як ішемізована тканина кінцівки). У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована серцева тканина. У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована тканина головного мозку. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[123] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування відновлення ішемізованої тканини (або поліпшення функції ішемізованої тканини) у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, де індивідууму раніше вводили ефективну кількість мідепротуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення мідепротуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення індивідууму вводили мідепротуючу композицію приблизно за 1 день, за 2 дні, за 3 дні, за 4 дні, за 5 днів, за 6 днів, за 1 тиждень, за 2 тижні, за 3 тижні, за 4 тижні або більше до введення композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ішемізовану тканину вибирають із групи, що складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту і ішемізованої тканини скелетного м'яза (такої як ішемізована тканина кінцівки). У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована серцева тканина. У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована тканина головного мозку. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[124] Крім того, пропонуються способи лікування захворювання або стану, пов'язаного з ішемічним ураженням тканини, використовуючи будь-який з описаних у винаході способів.

[125] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб лікування ішемічної серцевої недостатності у індивідуума, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триєнтин). У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять протягом щонайменше приблизно 1 місяця (наприклад, щонайменше приблизно 3 місяців або щонайменше приблизно 6 місяців). У деяких варіантах здійснення індивідуум має функцію викиду лівого шлуночка (LVEF) не більше ніж приблизно 35 % від нормального рівня. У деяких варіантах здійснення індивідуум має серцеву недостатність класу II або класу III (на основі класифікації Нью-Йоркської кардіологічної асоціації (New York Heart Association) або функціональної класифікації (Functional classification NYHA)).

[126] Серцева недостатність будь-якого класу або стадії, яка має ішемічне походження (наприклад, ішемічна серцева недостатність), може бути піддана лікуванню описаними у винаході способами. У деяких варіантах здійснення індивідуум має серцеву недостатність I класу NYHA ішемічного походження. У деяких варіантах здійснення індивідуум має ішемічну

серцеву недостатність II класу NYHA ішемічного походження. У деяких варіантах здійснення індивідуум має ішемічну серцеву недостатність III класу NYHA ішемічного походження. У деяких варіантах здійснення індивідуум має ішемічну серцеву недостатність IV класу NYHA ішемічного походження. У деяких варіантах здійснення індивідуум має ішемічну серцеву недостатність класу A NYHA ішемічного походження. У деяких варіантах здійснення індивідуум має ішемічну серцеву недостатність класу B NYHA ішемічного походження. У деяких варіантах здійснення індивідуум має ішемічну серцеву недостатність класу C NYHA ішемічного походження. У деяких варіантах здійснення індивідуум має ішемічну серцеву недостатність класу D NYHA ішемічного походження. У деяких варіантах здійснення індивідуум має один або декілька симптомів ішемічної серцевої недостатності, таких як стомлюваність, прискорене серцебиття, задишка або обмеження фізичної активності. У деяких варіантах здійснення індивідуум має один або декілька симптомів серцево-судинного захворювання. У деяких варіантах здійснення індивідуум був госпіталізований протягом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20, 25, 30 і більше днів.

[127] Ефективність будь-якого з описаних у винаході способів може бути додатково визначена шляхом оцінки ступеня відновлення ішемізованої тканини. Відновлення тканини можна оцінити, наприклад, по площі ушкодження або об'єму ушкодження. Відновлення ушкодженої тканини у пацієнта може бути оцінене, використовуючи будь-який клінічно релевантний стандарт. Наприклад, відновлення ушкодженої тканини можна виміряти шляхом підрахунку числа клітин, наприклад числа міоцитів, фібробластів, або кількості рубців, або за допомогою функціональних аналізів продуктивності або структурних аспектів серцевої функції, включаючи кінцевий діастолічний тиск у лівому шлуночку (LVEDP), діастолічний тиск у лівому шлуночку (LVDP), максимальну швидкість наростання тиску в лівому шлуночку в ранній фазі систоли (dp/dt), мінімальну швидкість наростання тиску в лівому шлуночку у ранній фазі систоли (dp/dt), масу лівого шлуночка, об'єм камери і діастолічне напруження стінки. У цілому, вважається, що описаний у винаході спосіб відновлює ушкоджену тканину, якщо в результаті суттєво (наприклад, щонайменше в 2 рази) змінюється будь-яка така клінічна оцінка або будь-яка комбінація оцінок.

[128] Для дослідження відновлення тканини може бути застосований будь-який придатний метод (методи). Наприклад, можуть застосовуватися методи для оцінки загоєння тканини, для оцінки функціональності відновленої тканини і для оцінки клітинного росту в тканині. Для визначення ступеня загоєння тканини може бути проведене гістологічне дослідження і забарвлення клітин з метою виявлення розмноження посіяних клітин і/або поліпшення гістологічної ознаки. У ряді випадків, можуть бути зібрані ділянки тканини і оброблені фіксатором, таким як, наприклад, нейтральний забуферений розчин формаліну. Такі ділянки тканини можуть бути збезводнені, залиті парафіном і секціоновані мікромомом для гістологічного аналізу. Зрізи можуть бути забарвлені гематоксилином і еозином (H&E) і потім поміщені на предметні стекла для мікроскопічної оцінки морфології і насиченості клітинами. У деяких випадках, можуть застосовуватися фізіологічні дослідження для оцінки рухливості тканини і функціональності після проведення лікування запропонованими у винаході способами і речовинами. Наприклад, можуть бути проведені випробування механічних властивостей *in vitro* для вимірювання роботи при згинанні (WOF) або кута згинання відновленої тканини сухожилля або відновленого суглоба. Дослідження *in vivo* можуть включати функціональну оцінку органів, оцінку симптомів або методи візуалізації.

[129] У деяких варіантах здійснення функцію тканини і/або органа до, під час або після застосування розкритого в даному винаході способу лікування можна оцінити будь-якими одним або більше з наступних методів: біохімічним дослідженням щонайменше одного біомаркера, що вказує на поліпшення функції тканини, такими методами як проточна цитометрія, імунофлуоресценція, ELISA, введення люмінесцентної мітки, гібридизація, ампліфікація нуклеїнової кислоти або вестерн-блотинг; дослідженнями функції клітин, такими як дослідження апоптозу клітин, дослідження некрозу і дослідження життєздатності клітин, включаючи забарвлення анексином V з імунофлуоресцентним визначенням або визначенням проточною цитометрією, визначення активності каспази, дослідження гіпоксії, дослідження за допомогою термінального дезоксиуридинового мічення кінців (TUNEL), електрофоретичне розщеплення ДНК клітин, визначення кількості паличкоподібних клітин при впливі H_2O_2 , кількісна оцінка експресії генів методом полімеразної ланцюгової реакції і вимірювання некротичної області шляхом забарвлення гематоксилином і еозином; дослідженнями утворення рубців, включаючи підрахунок числа фібробластичних клітин в ушкодженій області або ураженій інфарктом області, вимірювання відкладання колагену і рівня інших матричних білків, пов'язаних з утворенням рубця; дослідженнями міграції стовбурових клітин або клітин-попередників в ушкоджену область і будь-якими іншими клінічно значущими дослідженнями функції органів.

[130] У деяких варіантах здійснення серцева функція може бути оцінена за одним або більше із наступних показників: механічні властивості міоцитів і злиття клітин, наприклад частотність розподілу розмірів міоцитів, пікове укорочення, швидкість укорочення і повторного подовження, і оцінка злиття клітин (кількість X-хромосом); продуктивність або структурні аспекти серцевої функції, включаючи кінцевий діастолічний тиск у лівому шлуночку (LVEDP), діастолічний тиск у лівому шлуночку (LVDP), максимальну швидкість наростання тиску в лівому шлуночку в ранній фазі систоли (dp/dt), мінімальну швидкість наростання тиску в лівому шлуночку в ранній фазі систоли (dp/dt), масу лівого шлуночка, об'єм камери і діастолічне напруження стінки, і порівняння пацієнтів з інфарктом міокарда, що піддавалися лікуванню і не піддавалися лікуванню; регенерація міокарда, наприклад склад регенерованого міокарда, оцінка BrdU-позитивних клітин в області інфаркту у суб'єктів, що піддавалися лікуванню, у порівнянні із суб'єктами, що не піддавалися лікуванню, і міозинпозитивні клітини в області інфаркту у суб'єктів, що піддавалися лікуванню, у порівнянні із суб'єктами, що не піддавалися лікуванню; структурні показники серця, такі як розмір інфаркту, ступінь фіброзу і гіпертрофія кардіоміоцитів. У конкретних варіантах здійснення розкритий у винаході спосіб додатково включає вимірювання одного або більше показників серцевої функції, де зазначеними показниками серцевої функції є вимірювання по зміні імпедансу грудної клітки серцевий викид серця (CO), серцевий індекс (CI), тиск заклинювання в легеневій артерії (PAWP), серцевий індекс (CI), % фракції укорочення (% FS), фракції викиду (EF), фракції викиду лівого шлуночка (LVEF); кінцевий діастолічний діаметр лівого шлуночка (LVEDD), кінцевий систолічний діаметр лівого шлуночка (LVESD), скорочувальна здатність (dp/dt), зниження функції передсердь або шлуночків, збільшення ефективності прокачування, зниження швидкості втрати ефективності прокачування, зниження втрати гемодинамічної функції або зменшення ускладнень, пов'язаних з кардіоміопатією у порівнянні з контролем.

[131] У деяких варіантах здійснення може бути оцінена функція мозку до, під час або після застосування розкритого у винаході способу лікування шляхом проведення неврологічного тестування або електрофізіологічного дослідження, наприклад дослідження зменшення відношення сигнал/шум, або біохімічного дослідження, наприклад шляхом аналізу щонайменше одного біомаркера, що характеризує функцію органа, функцію тканини і/або функцію клітин центральної або периферичної нервової системи. Приклади електрофізіологічних методів включають електроенцефалографію (EEG), електрокардіографію (EKG), електроміографію (EMG), обумовлені подіями потенціали мозку (ERP), викликані потенціали мозку (EP), магнітоенцефалографію (MEG) і дослідження провідності нервів (NCS). В інших варіантах здійснення функція мозку може бути оцінена будь-якими одним або більше із наступних методів або показників: по загальній розумовій діяльності, наприклад, на основі тестування по скороченій шкалі інтелекту Векслера і по шкалі-III інтелекту Векслера для дорослих; по основній увазі, наприклад, на основі тестування на запам'ятовування цифрової послідовності, просторових підтестів по шкалі-III Векслера; по складній увазі (короткочасній пам'яті), наприклад, на основі тестування на запам'ятовування цифрової послідовності, послідовності номерів букв і арифметичних підтестів по шкалі-III інтелекту Векслера для дорослих; по здатності до цілеспрямованої діяльності, наприклад, на основі вісконсинського тесту сортування карток, тесту В на побудову маршруту, тесту Струпа, тесту "Лондонська вежа", тесту на азартні ігри, тестування по поведінковій шкалі любових систем і Айова-шкалі функції любової частки; по пам'яті (візуальній і вербальній), наприклад, на основі тестування по шкалі-III пам'яті Векслера, тесту Рея на слухомовні завчання, каліфорнійського тесту-II на слухомовні завчання, уточненого тесту на короткочасну зорову пам'ять; по регуляції негативних емоцій, наприклад, на основі тестування по багатостадійному особистісному опитнику-2 університету штату Мінесота, тесту Струпа на афективні розлади, тестування по поведінковій шкалі любових систем і Айова-шкалі функції любової частки; по інтерпретації емоційних стимулів, наприклад, діагностичним аналізом невербальної поведінки (DANVA); по швидкості обробки інформації, наприклад, на основі індексу швидкості обробки інформації (пошуку символів, кодування) при тестуванні по інтелектуальній шкалі-III Векслера для дорослих, на основі тесту на побудову маршруту і тесту на зіставлення символів і цифр; по мовленню, наприклад, на основі бостонського тесту на найменування; шляхом використання контрольованого усного тесту на словесну асоціацію; шляхом використання тесту на семантичну вербальну швидкість і випробування на мультилінгвальну афазію; шляхом використання візуально-конструкційних тестів, таких як тест комплексної фігури Рея-Остерриця, підтести на поділ на групи і угруповання предметів при тестуванні по інтелектуальній шкалі-III Векслера для дорослих; і шляхом використання тестів на просторову орієнтацію, таких як матричні міркування при тестуванні по інтелектуальній шкалі-III Векслера і тест на судження про орієнтацію лінії.

[132] У деяких варіантах здійснення проводять дослідження характеристик стану скелетного м'яза до, під час або після застосування розкритого у винаході способу лікування. У деяких варіантах здійснення характеристики стану скелетного м'яза включають біль у м'язах, ушкодження м'язів, метаболічні зміни при фізичному навантаженні і реорганізацію цитоскелета. Функція скелетного м'яза може являти собою м'язову силу, витривалість м'язів, адаптацію до тренування, нормальний стан м'яза, який дозволяє рухатися суглобам, або стандартний фізіологічний метаболізм і функцію скелетного м'яза у здорового ссавця. Може бути виміряна будь-яка функціональна змінна скелетного м'яза, у тому числі м'язова сила (максимальна сила, що виникає при конкретному русі), витривалість м'язів (максимальна кількість скорочень, які можуть бути виконані із заданою частотою і силою) і потужність м'язів (сила/час, максимальний ефект, створюваний м'язом). Типові специфічні для м'язів функції включають, але цим не обмежуючи, диференціювання міобластів, детермінацію міобластів, розвиток м'язів, скорочення м'язів, саркомерні зміни, злиття міобластів, розвиток соматичних м'язів і міогенез.

[133] У деяких варіантах здійснення оцінюють фіброз скелетного м'яза пацієнта. Існує ряд методів визначення стану фіброзу скелетного м'яза, включаючи узяття біоптату м'язової тканини у пацієнта і гістохімічне або імуногістохімічне дослідження біоптату, забарвленого барвниками, чутливими до присутності фіброзної тканини. Приклади гістохімічного дослідження включають забарвлення, наприклад, гематоксиліном і еозином (H&E), трихромом і аденозинтрифосфатазою (наприклад, при pH 4,3, 4,65 і 10,4). Типові антитіла, які можуть бути використані для введення мітки в м'язові волокна для імуногістохімічного дослідження, включають, наприклад, міозин, колаген типу IV, ламінін, фібронектин і дистрофін. Як варіант, може бути використаний функціональний метод визначення ступеня ураження фіброзом скелетного м'яза пацієнта. Функціональний метод включає проведення одного або більше наборів тестів і фізичних вимірювань у пацієнта. Такі тести і вимірювання звичайно включають тести на неврологічну ефективність, оцінки м'язової сили, рівноваги, ходи, постави, сенсорної координації і тести на функцію легенів, наприклад життєву ємність легенів і ємність форсованого видиху, причому всі вони можуть бути проведені за допомогою добре відомих методів. У деяких варіантах здійснення відновлення тканини можна оцінити за рівнем (рівнями) експресії однієї або більше сигнальних молекул, описаних у винаході. Придатні біомаркери як індикатори відновлення тканини включають, але цим не обмежуючи, біомаркер ушкодження ДНК, біомаркер запальної відповіді, біомаркер ушкодження тканини, біомаркер відновлення ушкодженої тканини або гематологічний сурогатний маркер, такий як p53, p21, GADD45a, ATM, фосфорильований H2AX-гістон, IL-6, CRP, SAA, IL-1, IL-5, IL-10, KC/GRO, IFN, IL-2, IL-4, TNF-альфа, IL-12, IL-3, IL-7, IL-6, бета-амілази слини, цитрульовані білки, S100B, SP-D, BPI, TSP, CA15-3, CDBB, CKMB, CKMM, FABP2, GFAP, NSE, CD5, CD-16b, CD20, CD177, CD26, CD27, CD40, CD45, Flt-3L, G-CSF, KFG, EPO, TPO, GM-CSF або SDF-1α.

[134] Мідь (включаючи іон міді) є регулятором одного або більше факторів (наприклад, факторів транскрипції), що беруть участь у відновленні ушкодження тканини і/або в регенерації тканини, і, отже, відновлення тканини можна оцінити шляхом оцінки будь-яких одного або більше із цих факторів. Регульовані міддю фактори включають, але цим не обмежуючи, білки гомеостазу міді, такі як Ctr 1, Ctr 3, DMT1, Atox 1, ATP7A/7B, Cox 17, CCS, Sco 1/2, Cox 11, глутаматні рецептори N-метил-D-аспартату (NMDAR), білок-попередник амілоїду (APP), домен гена MURR1 метаболізму міді (COMMD1), X-зв'язаний інгібітор апоптозу (XIAP), гомоцистеїн (Hcy), субодинаця II цитохром-с-оксидази (COX II), субодинаця I цитохром-с-оксидази (COX I), FGF-1, VEGF, ангіопоетин (такий як ANG1 або ANG2), фібронектин, колагеназа, MMPs-TIMPs, еластин, PDGF і eNOS; внутрішньоклітинні Cu-зв'язувальні білки, такі як цитохром-с-оксидаза C (CCO), супероксиддисмутаза (SOD), металотіонеїн (MT), глутатіон (GSH), допамін-β-монооксигеназа (DBH), пептидигліцин-α-амідуюча монооксигеназа (PAM), тирозиназа, фенілаланінгідроксилаза, діаміноксидаза, гефестин і глікопротеїн хрящового матриксу; позаклітинні Cu-зв'язувальні білки, такі як церулоплазмін (CP), лізілоксидаза (LOX), альбумін (ALB), транкуприн, аміноксидаза, фактори згортання крові V і VIII, фероксидаза II, позаклітинна супероксиддисмутаза і позаклітинний металотіонеїн. Регульовані міддю фактори розкриті в публікації Zheng et al., Role of copper in regression of cardiac hypertrophy, Pharmacol. Ther. doi:10.1016/j.pharmthera. 2014.11.014 (2014), зміст якої включений у винахід шляхом посилання на неї. У деяких варіантах здійснення мідь або іон міді регулює транскрипційну активність одного або більше HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS і COMMD1 і сигнальні мережі, регульовані цими факторами транскрипції.

[135] У деяких варіантах здійснення аналізують рівень і/або активність одного або більше описаних у винаході факторів, регульованих міддю, у індивідуума після його лікування за допомогою розкритої у винаході терапевтичної або профілактичної композиції. У деяких

варіантах здійснення визначають рівень і/або активність одного або більше HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS і COMMD1, і потім знаходять їх взаємозв'язок з відповіддю індивідуума на вплив терапевтичної або профілактичної композиції. У деяких варіантах здійснення відповідь виявляють шляхом вимірювання клітинних маркерів гомеостазу нормальної тканини і/або стійкого ушкодження ішемізованої тканини (наприклад, шляхом імуногістохімічного аналізу або вимірювання рівнів ДНК і транскрипту), шляхом вимірювання площі ушкодження або об'єму ушкодження або оцінки будь-яких клінічно значущих показників. Таким чином, у конкретних аспектах, рівень і/або активність одного або більше регульованих міддю факторів (таких як HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS і COMMD1) можна використовувати як біомаркер кінцевої точки відповіді індивідуума на описану у винаході схему терапевтичного або профілактичного лікування.

[136] У деяких варіантах здійснення один або декілька розкритих у винаході регульованих міддю факторів можуть бути використані в прогностичному тесті для аналізу і прогнозування відповіді на розкриті у винаході композицію тетраміну або на спосіб лікування або профілактики. Наприклад, рівень і/або активність одного або більше HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS і COMMD1 можуть указувати на ймовірність того, що у індивідуума буде досягнута позитивна відповідь на розкриті у винаході лікувальну або профілактичну композицію, і лікувальну або профілактичну композицію можна вводити індивідууму. І навпаки, якщо рівень і/або активність одного або більше HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS і COMMD1 указує на те, що у індивідуума, з великою часткою ймовірності, не буде досягнута відповідь або буде досягнута негативна відповідь на лікувальну або профілактичну композицію, то може бути запропонований альтернативний курс лікування. Негативна відповідь може означати або відсутність ефективної відповіді, або наявність токсичних побічних ефектів. Відповідь на терапевтичне або профілактичне лікування може бути передбачена при проведенні попереднього дослідження, у якому суб'єктів у будь-якій з наступних груп генотипують: у групі, у якій досягається позитивна відповідь на режим лікування, у групі, у якій практично відсутня відповідь на режим лікування, і в групі, у якій досягається негативна відповідь на режим лікування (наприклад, проявляються один або більше побічних ефектів). Ці групи представлені як приклади, і можуть бути проаналізовані і інші групи і підгрупи. На основі результатів цих аналізів, індивідуума генотипують для того, щоб передбачити, чи буде він або вона мати позитивну відповідь на режим лікування, практично не мати позитивної відповіді на режим лікування або мати негативну відповідь на режим лікування. Тому, у деяких варіантах здійснення рівень і/або активність одного або більше HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS і COMMD1 можуть бути використані як індикатори відповіді індивідуума на описану у винаході схему терапевтичного або профілактичного лікування. Індикатори відповіді можна оцінювати до, під час і/або після застосування схеми терапевтичного або профілактичного лікування. Наприклад, один або більше індикаторів відповіді можуть бути оцінені під час інтервалів між дозуванням при тривалому введенні для того, щоб оцінити, чи досягається позитивна відповідь у індивідуума при тривалому лікуванні або необхідне альтернативне лікування.

[137] Описані вище прогностичні тести можуть застосовуватися при клінічних випробуваннях. Використовуючи описані у винаході способи, можуть бути ідентифіковані один або більше індикаторів відповіді (наприклад, HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS і COMMD1). Потім може бути проведений скринінг потенційних учасників клінічних випробувань композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і, необов'язково, мідепромотуючу композицію, яка містить іон міді, для того, щоб виявити тих індивідуумів, які з великою часткою ймовірності будуть мати позитивну відповідь на композицію тетраміну, і виключити тих індивідуумів, у яких з великою часткою ймовірності будуть проявлятися побічні ефекти. Таким чином, може бути виміряна ефективність лікування у індивідуумів, у яких досягається позитивна відповідь на композицію тетраміну, без зниження результатів вимірювань через включення в клінічні випробування індивідуумів, у яких з великою часткою ймовірності не буде досягнута позитивна відповідь у процесі дослідження, і без ризику виникнення небажаних проблем безпеки.

[138] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування відновлення тканини у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, без підвищення експресії VEGF у місці ін'єкції, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування росту кровоносних судин у напрямку місця ішемічного ушкодження у індивідуума, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування росту кровоносних судин у напрямку місця ішемічного ушкодження у індивідуума, без підвищення експресії VEGF у місці ін'єкції, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка

включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триєнтину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триєнтину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму попередньо вводять мідепромотуючу композицію, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ішемізовану тканину вибирають із групи, що складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту і ішемізованої тканини скелетного м'яза (такої як ішемізована тканина кінцівки). У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована серцева тканина. У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована тканина головного мозку. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[139] Утворення і ріст кровоносних судин у тканині можуть відбуватися шляхом ангиогенезу і/або васкулогенезу. У деяких варіантах здійснення кровоносні судини включають капілярноподібні структури, функція яких полягає в підтриманні перенесення крові. У деяких варіантах здійснення ангиогенез включає процес, що бере участь у рості нових кровоносних судин із уже існуючих судин, ангиогенез у результаті проростання, утворення нової кровоносної судини шляхом проростання існуючих або ангиогенез у результаті поділу (інтусусцепції), утворення нової кровоносної судини шляхом поділу існуючих судин. У деяких варіантах здійснення васкулогенез включає процес, пов'язаний з формуванням зовсім нових кровоносних судин у результаті проліферації ендотеліальних стовбурових клітин, наприклад утворення нових кровоносних судин, яких раніше не існувало.

[140] У деяких варіантах здійснення для утворення і росту кровоносних судин необхідні сигнали від факторів росту і інших білків, які безпосередньо контролюють процес, таких як ангиопоетин (наприклад, Ang-1 і Ang-2), ефрин (Eph), фактори росту ендотелію судин (наприклад, VEGF-A і VEGF-C), фактор росту тромбоцитів (PDGF), фактори росту фібробластів (наприклад, FGF-1 і FGF-2), фактор-α некрозу пухлини (TNF-α), інтерлейкін (IL), моноцитарний хемотаксичний білок-1 (MCP-1) (також відомий як CCL-2), трансформуючий фактор росту-α (TGF-α), трансформуючий фактор росту-β (наприклад, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 і TGF-β4), ендостатин, вазохібін, хемокіни, тромбоспондин, ангиостатин, молекули адгезії судинного ендотелію (наприклад, VCAM-1), матричні металопротеїнази (наприклад, MMP-2 і MMP-9), інтегрини, кадгерини, активатори плазміногена і інгібітори активатора плазміногена.

[141] У деяких варіантах здійснення ріст кровоносних судин досліджують шляхом вимірювання ендотеліальної проліферації клітин, яка необхідна для розвитку капілярів, у інтактної тварини. У деяких варіантах здійснення дія композиції тетраміну, що вводиться, яка включає хелатуючий мідь тетрамін, на ендотеліальну проліферацію може бути оцінена шляхом прямого підрахунку клітин, синтезу ДНК і/або по метаболічній активності. Наприклад, ендотеліальні клітини можуть бути виділені з місця ішемічного ушкодження і досліджені на швидкість їх проліферації після лікування композицією тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. В інших варіантах здійснення проліферація ендотеліальних клітин у місці ішемічного ушкодження може постійно контролюватися шляхом введення в клітини мітки і вимірювання кількості клітин, синтезу ДНК і/або метаболічної активності *in situ*. В інших варіантах здійснення індивідууму можуть бути введені мічені ендотеліальні клітини, і можна постійно контролювати *in situ* проліферацію мічених ендотеліальних клітин у місці ішемічного ушкодження. У деяких варіантах здійснення ендотеліальні клітини мітять радіоізотопом, флуоресцентною речовиною

або маркером, які можуть бути специфічно виявлені, наприклад, за допомогою антитіла. У конкретних варіантах здійснення клітини мітять [³H]тимідином або бромдезоксіуридином (BrdU).

[142] У деяких варіантах здійснення досліджують ріст кровеносних судин шляхом вимірювання міграції ендотеліальних клітин, які руйнують базальну мембрану і мігрують у напрямку хімічних градієнтів, обумовлених проангіогенними факторами росту, наприклад при ангіогенезі в результаті проростання. У деяких варіантах здійснення мітять ендотеліальні клітини в місці ішемічного ушкодження і постійно контролюють *in vivo* міграцію клітин. В інших аспектах, суб'єкту вводять мічені ендотеліальні клітини і постійно контролюють *in vivo* їх міграцію в місце ішемічного ушкодження. В інших аспектах, у місці ішемічного ушкодження можуть бути виділені ендотеліальні клітини, і їх міграційні властивості можуть бути досліджені за допомогою ряду аналізів *in vitro*, включаючи аналіз у камері Бойдена, аналіз під шаром агарози, аналіз загоснення рани, аналіз із тефлоновим бар'єром, аналіз кінетики фагоцитозу за допомогою трекера і інші подібні аналізи.

[143] У деяких варіантах здійснення ріст кровеносних судин досліджують шляхом вимірювання ендотеліальних клітин, що утворюють трубочки із просвітом для течії крові, тобто тубулогенез. У деяких варіантах здійснення ріст кровеносних судин досліджують за допомогою аналізу аортального кільця. Аналіз аортального кільця для дослідження росту кровеносних судин описаний у публікації Li et al., "Copper promotion of angiogenesis in isolated rat aortic ring: role of vascular endothelial growth factor", Journal of Nutritional Biochemistry, 25(2014) 44-49, зміст якої включений в даний винахід шляхом посилання на неї. Мікросудини, що проростають із аортального кільця, тісно взаємодіють із резидентними макрофагами, перицитами і фібробластами в упорядкованій послідовності, яка імітує ангіогенез у інтактної тварини. У деяких варіантах здійснення ендотеліальні клітини не були попередньо відібрані шляхом пасивування і, тому, знаходяться у стані спокою, подібному до стану інтактної тварини. Інші дослідження ангіогенезу, які враховують ангіогенні функції (такі як деградація матриці, міграція, проліферація, утворення трубочок), включають аналіз ембріодних тіл, дослідження плеснової кістки мишей і інші подібні аналізи.

[144] У деяких варіантах здійснення дослідження *in vivo* використовують для вимірювання росту кровеносних судин після введення композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. Ці дослідження включають, але цим не обмежуючи, аналіз ангіогенезу в рогівці, аналіз хоріоналлантоїсної мембрани курчати і аналіз у шарі матригелю. Наприклад, рогівка є єдиною тканиною організму, яка позбавлена судин і є прозорою, що робить її ідеальною для спостереження за ангіогенезом. У деяких варіантах здійснення мікросфери або губки, що містять проангіогенні молекули (наприклад, розкриті у винаході композицію тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін), можуть бути імплантовані в стромальні кармани, утворені хірургічним шляхом. Вростання нових судин з периферичної лімбальної судинної системи може щодня контролюватися, що дозволяє визначити швидкості ангіогенезу. При аналізі в шарі матригелю, матригель, що містить розкриті у винаході композицію тетраміну (з іонами міді або без них), може бути імплантований індивідууму в місці або поблизу місця ішемічного ушкодження, а потім шар матригелю видаляють для візуалізації кровеносних судин. У деяких варіантах здійснення ендотеліальні клітини мітять одним або більше маркерами і досліджують *in vivo* їх проліферацію, міграцію, тубулогенез, утворення кровеносних судин і/або ріст кровеносних судин у місці ішемічного ушкодження, наприклад, з використанням відповідного методу візуалізації.

Комбінована терапія

[145] Описана вище композиція тетраміну, необов'язково, у комбінації з мідепротуючою композицією може бути використана як єдиний лікарський засіб або як частина комбінованої терапії зі стовбуровими клітинами або індукторами стовбурових клітин для індукування відновлення ішемізованої тканини. У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб індукування відновлення тканини (або поліпшення функції тканини) у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, який включає: а) введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін; і b) введення індивідууму ефективної кількості стовбурових клітин (таких як мезенхімальні стовбурові клітини (MSC), наприклад мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку (BMSC)) або індуктора стовбурових клітин. У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення індивідууму ефективної кількості стовбурових клітин (таких як мезенхімальні стовбурові клітини (MSC), наприклад мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку (BMSC)). У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення індивідууму ефективної кількості індуктора стовбурових клітин. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах

здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму мідепромотуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму попередньо вводять мідепромотуючу композицію, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ішемізовану тканину вибирають із групи, що складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту і ішемізованої тканини скелетного м'яза (такої як ішемізована тканина кінцівки). У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована серцева тканина. У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована тканина головного мозку. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[146] У деяких варіантах здійснення описані у винаході стовбурові клітини являють собою мезенхімальні стовбурові клітини (MSC), мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку (BMSC), мультипотентні стовбурові клітини, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPS) або стовбурові клітини, що утворюються в тканині. У деяких варіантах здійснення стовбурові клітини, що утворюються в тканині, являють собою стовбурові клітини, що утворюються в жировій тканині, стовбурові клітини, що утворюються в серцевій тканині, або стовбурові клітини, що утворюються в тканині пупкового канатика. У деяких варіантах здійснення стовбурова клітина є індуктором дорослої стовбурової клітини. У деяких варіантах здійснення дорослі стовбурові клітини являють собою кровотворні стовбурові клітини, стовбурові клітини молочної залози, інтестинальні стовбурові клітини, мезенхімальні стовбурові клітини в плаценті, жировій тканині, легені, кістковому мозку, крові, вартонових драглях пупкового канатика або зубах (наприклад, периваскулярній ніші пульпи зуба і з'єднувальній зв'язці періодонта), ендотеліальні стовбурові клітини, нейрональні стовбурові клітини, дорослі стовбурові клітини органів нюху, стовбурові клітини нейрального гребеня або зародкові стовбурові клітини (наприклад, стовбурові клітини в сім'янику).

[147] У деяких варіантах здійснення описаний у винаході індуктор стовбурових клітин є індуктором мезенхімальних стовбурових клітин (MSC), мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (BMSC), мультипотентних стовбурових клітин, індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPS) або стовбурових клітин, що утворюються в тканині, таких як стовбурові клітини, що утворюються в жировій тканині, стовбурові клітини, що утворюються в серцевій тканині, або стовбурові клітини, що утворюються в тканині пупкового канатика. У деяких варіантах здійснення індуктор стовбурових клітин є індуктором дорослих стовбурових клітин, таких як кровотворні стовбурові клітини, стовбурові клітини молочної залози, інтестинальні стовбурові клітини, мезенхімальні стовбурові клітини в плаценті, жировій тканині, легені, кістковому мозку, крові, вартонових драглях пупкового канатика або зубах (наприклад, периваскулярній ніші пульпи зуба і з'єднувальній зв'язці періодонта), ендотеліальні стовбурові клітини, нейрональні стовбурові клітини, дорослі стовбурові клітини органів нюху, стовбурові клітини нейрального гребеня або зародкові стовбурові клітини (наприклад, стовбурові клітини в сім'янику).

[148] У деяких варіантах здійснення стовбурові клітини або індуктор стовбурових клітин вводять системно. У деяких варіантах здійснення стовбурові клітини або індуктор стовбурових клітин вводять локально в ішемізовану тканину. У деяких варіантах здійснення стовбурові клітини або індуктор стовбурових клітин вводять локально в місце, яке не є місцем ішемічного ушкодження.

[149] У деяких варіантах здійснення стовбурові клітини (або індуктор стовбурових клітин), композицію тетраміну (з іонами міді або без іонів міді) і, необов'язково, мідепрототуючу композицію вводять одночасно. У деяких варіантах здійснення описані у винаході стовбурові клітини (або індуктор стовбурових клітин), композицію тетраміну (з іонами міді або без іонів міді) і, необов'язково, мідепрототуючу композицію вводять послідовно в будь-якому придатному порядку.

[150] Після того, як описані у винаході стовбурові клітини (або індуктор стовбурових клітин), композицію тетраміну (з іонами міді або без іонів міді) і, необов'язково, мідепрототуючу композицію вводять ссавцю (наприклад, людині), у деяких варіантах здійснення постійно контролюють присутність і/або біологічну активність клітин будь-яким з відомих методів. У деяких варіантах здійснення клітини мігрують *in vivo* з ішемізованої тканини індивідуума, і присутність і/або біологічну активність клітин на шляху до місця ушкодження ділянки тканини постійно контролюють і/або регулюють.

[151] Незважаючи на те, що описані у винаході способи в цілому застосовні до всіх аспектів відновлення тканини, проте, слід мати на увазі, що способи комбінованої терапії можуть бути використані для будь-яких однієї або більше із наступних цілей: для індукування міграції мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку до ішемізованої тканини, для індукування диференціювання стовбурових клітин в ішемізованій тканині, для індукування регенерації тканини в ішемізованій тканині, для індукування сигнальної молекули, яка ініціює регенерацію тканини, для посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1), для зворотного розвитку ушкодження на місці ішемічного ушкодження і для відновлення мікрооточення нейрофібрили клітин і нейросекреторних клітин у місці ішемічного ушкодження.

Способи запобігання і профілактичного використання

[152] У винаході також пропонуються способи запобігання ушкодженню ішемізованої тканини у індивідуума, які включають введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін. У деяких варіантах здійснення ішемізовану тканину вибирають із групи, що складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту і ішемізованої тканини скелетного м'яза (такої як ішемізована тканина кінцівки). У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована серцева тканина. У деяких варіантах здійснення ішемізованою тканиною є ішемізована тканина головного мозку. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триєнтину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триєнтину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення іон міді в композиції тетраміну не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму мідепрототуючої композиції, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення індивідууму попередньо вводять мідепрототуючу композицію, яка може підвищувати позаклітинний вміст міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення мідепрототуюча композиція являє собою іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепрототуюча композиція не включає іон міді. У деяких варіантах здійснення мідепрототуюча композиція може підвищувати засвоєння міді, знижувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу.

[153] У деяких варіантах здійснення пропонується спосіб запобігання ішемічній серцевій недостатності у індивідуума, який включає введення індивідууму ефективної кількості композиції тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триєнтин). У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції є недостатньою для зниження позаклітинного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг (наприклад, від приблизно 80 мг до

приблизно 300 мг або від приблизно 150 мг до приблизно 350 мг) на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять два рази на добу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять протягом щонайменше приблизно 1 місяця (наприклад, щонайменше протягом приблизно 3 місяців або щонайменше приблизно 6 місяців). У деяких варіантах здійснення індивідуум має функцію викиду лівого шлуночка (LVEF) не більше ніж 35 % на вихідному рівні. У деяких варіантах здійснення індивідуум має серцеву недостатність класу II або класу III (за класифікацією Нью-Йоркської кардіологічної асоціації або функціональною класифікацією NYHA). У деяких варіантах здійснення індивідуум має вміст у плазмі натрійуретичного пептиду В-типу (BNP) щонайменше приблизно 150 пг/мл. У деяких варіантах здійснення індивідуум має вміст NT-proBNP (N-термінального попередника BNP) не менше ніж приблизно 600 пг/мл.

[154] Використовуваний у винаході термін "запобігання" включає в себе забезпечення профілактичних заходів відносно виникнення або повторного прояву захворювання у індивідуума, який може бути схильний до захворювання, але у якого ще не було діагностоване це захворювання. У деяких варіантах здійснення пропонувані у винаході клітини і композиції застосовують для уповільнення розвитку захворювання або уповільнення прогресування захворювання, такого як ушкодження тканини.

[155] Для профілактики або лікування захворювання, вибір відповідної дози або способу введення залежить від типу захворювання, що підлягає лікуванню, тяжкості і ходу захворювання, незалежно від того, чи вводять ці клітини в профілактичних або терапевтичних цілях, проведеної раніше терапії, історії хвороби індивідуума і відповіді індивідуума на композицію тетраміну і/або на клітини, а також від рішення лікаря. Композиції тетраміну, мідепрототуюча композиції, стовбурові клітини і індуктори стовбурових клітин у деяких варіантах здійснення можуть вводитися індивідууму в один час або протягом декількох курсів лікування.

[156] У деяких варіантах здійснення в даному винаході пропонуються композиції і способи лікування і запобігання ушкодженню ішемізованої тканини. У деяких варіантах здійснення розкриті у винаході композиції тетраміну, мідепрототуючі композиції і/або клітини вводять до, під час і/або після лікування, яке повинно викликати або може викликати ушкодження тканини у індивідуума, і введення запобігає або зменшує ушкодження ішемізованої тканини, пов'язане з лікуванням, таким як променева терапія і хіміотерапія раку.

[157] У деяких варіантах здійснення розкриті у винаході композиція тетраміну або спосіб запобігають ушкодженню ішемізованої тканини або зменшують площу, об'єм або тривалість ушкодження ішемізованої тканини шляхом індукування міграції (наприклад, хоумінгу) стовбурових клітин в тканину, навіть після того, як тканина у індивідуума через інші причини втратила властиву їй здатність самовільно рекрутувати стовбурові клітини. У варіантах здійснення введення композиції тетраміну і/або клітин за даним винаходом ініціює ряд інших процесів, що приводять до підвищеної стійкості до ушкодження ішемізованої тканини, які включають, наприклад, індукування диференціювання стовбурових клітин на ділянці тканини, індукування регенерації тканини на ділянці тканини, індукування сигнальної молекули, яка ініціює регенерацію тканини, посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1), оборотний розвиток ушкодження в місці початкового ішемічного ушкодження до виникнення додаткового ушкодження, і/або відновлення мікрооточення нейрофібрил в клітинах і нейросекреторних клітин на ділянці тканини.

[158] Наприклад, ішемія або інфаркт міокарда може призвести до необоротної втрати функції серцевої тканини з можливим погіршенням нагнітальної функції і до смерті. Оклюзія коронарної судини призводить до припинення кровопостачання залежної капілярної системи. Без живлення і кисню кардіоміоцити гинуть і зазнають некрозу. Виникає запалення оточуючої тканини з інвазією запальних клітин і фагоцитозом клітинного дебрису. Відбувається фіброзне рубцювання і уражена область серця втрачає свою скорочувальну силу. Без медичного втручання єдиним способом для серцевого м'яза компенсувати втрату тканини є гіпертрофія кардіоміоцитів, що залишилися (накопичення клітинного білка і скорочувальних елементів усередині клітини). Ендокринні, метаболічні (спирт) або інфекційні (вірусний міокардит) засоби і засоби для лікування раку також призводять до загибелі клітин і, отже, до зниження функції міокарда. У деяких варіантах здійснення розкриті у винаході композиція тетраміну або спосіб запобігають ішемічному ушкодженню серцевої тканини або зменшують площу, об'єм або тривалість ішемічного ушкодження серцевої тканини. У деяких варіантах здійснення розкриті у винаході композиція тетраміну індукує міграцію (наприклад, хоумінг) і/або утримання мезенхімальних стовбурових клітин (наприклад, мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку) в ішемізованій серцевій тканині. У деяких варіантах здійснення, у випадках ішемії або

інфаркту міокарда, серцевий м'яз може компенсувати втрату тканини шляхом диференціювання стовбурових клітин у кардіоміоцити, тим самим запобігаючи або зменшуючи гіпертрофію серця і подальше ушкодження серцевої тканини.

Композиції тетраміну

5 [159] Крім того, у винаході пропонуються композиції тетраміну (у тому числі фармацевтичні композиції), які включають хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин), для підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді, для доставки міді в клітини, для індукування щонайменше одного (наприклад, щонайменше будь-якого з 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більше) процесу відновлення

10 тканини, для індукування міграції стовбурових клітин або посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини. Будь-яка з композицій тетраміну, необов'язково, у комбінації з мідепромотуючою композицією і/або стовбуровими клітинами (або індуктором стовбурових клітин) може бути використана в описаних вище способах.

15 [160] У деяких варіантах здійснення пропонується композиція тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін або його фармацевтично прийнятну сіль. Розглянутий у даному винаході хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин) включає в себе, але цим не обмежуючи, саму по собі сполуку хелатуючого мідь тетраміну, її фармацевтично прийнятні солі, її активні метаболіти, її проліки і її похідні. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триентином. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є аналогом триентину,

20 таким як тетрамін формули (II), описаний у розділі "Мідь і здатні до утворення хелату з міддю тетраміни". У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну не включає слідової кількості елемента, такого як мідь. У деяких варіантах здійснення композиція може хелатувати іон міді в крові і доставляти іон міді в клітини ішемізованої тканини.

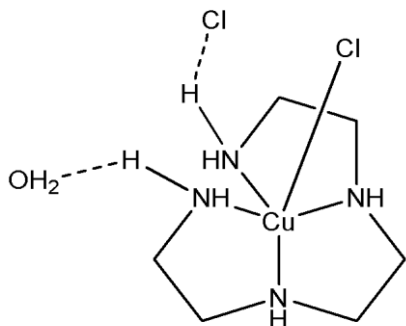
25 [161] У деяких варіантах здійснення пропонується композиція тетраміну, яка включає суміш хелатуючого мідь тетраміну і іона міді. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає суміш триентину і іона міді. У деяких варіантах здійснення мольне відношення хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) до іона міді становить приблизно будь-яке одне з 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 або 1:100. У деяких варіантах здійснення мольне відношення хелатуючого мідь тетраміну (такого як

30 триентин) до іона міді становить приблизно 1:1. У деяких варіантах здійснення мольне відношення хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) до іона міді становить приблизно будь-яке одне з 50:1-100:1, 20:1-50:1, 10:1-20:1, 5:1-10:1, 4:1-5:1, 3:1-4:1, 2:1-3:1, 1:1-2:1, 1:2-1:1, 1:3-1:2, 1:4-1:3, 1:5-1:4, 1:10-1:5, 1:20-1:10, 1:50-1:20, 1:100-1:50, 1:100-1:10, 1:10-1:1, 1:1-10:1, 10:1-100:1 або 1:10-10:1. У деяких варіантах здійснення щонайменше частина іонів міді знаходиться у формі комплексу з хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення іон міді не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном.

35 [162] У деяких варіантах здійснення пропонується композиція тетраміну, яка включає комплекс хелатуючого мідь тетраміну і іона міді. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає комплекс триентину і іона міді. У деяких варіантах здійснення стехіометричне відношення хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) до іона міді становить приблизно 1:1. У деяких варіантах здійснення комплекс хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) і іона міді є кристалічним. У деяких варіантах здійснення кристалічний комплекс хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) і іона міді є термодинамічно стійким поліморфом. Різні термодинамічно стійкі поліморфи кристалічного комплексу можуть бути

45 описані специфічним набором геометричних структур, сталими решіток, просторовими групами і структурними координатами, які можуть бути визначені відомими методами, такими як рентгеноструктурна кристалографія. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс

50 додатково включає два іони хлору і молекулу води. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс формули (I), зображений нижче:



, Формула (I)

де Cu позначає іон міді, і пунктирні лінії зображують водневі зв'язки. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, де кристалічний комплекс має кристалічну структуру, зображену на фігурі 1. У деяких варіантах здійснення кристалічна структура має довжину зв'язків, кути зв'язків і торсіонні кути, наведені на фігурі 2. У деяких варіантах здійснення кристалічний комплекс включає кристали із просторовою групою і параметрами, наведеними на фігурі 3. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, де кристалічна структура кристалічного комплексу визначається атомними координатами, наведеними на фігурах 4А-4С.

[163] У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає комплекс хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) і іона міді, де комплекс не є кристалічним. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну додатково включає іон міді, що не входить у комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення мольне відношення іона міді, що не входить у комплекс із хелатуючим мідь тетраміном, до комплексу становить приблизно будь-яке одне з 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 або 1:100. У деяких варіантах здійснення мольне відношення іона міді, що не входить у комплекс із хелатуючим мідь тетраміном, до комплексу становить приблизно будь-яке одне з 1:2-1:1, 1:3-1:2, 1:4-1:3, 1:5-1:4, 1:10-1:5, 1:20-1:10, 1:50-1:20, 1:100-1:50, 1:100-1:10 або 1:10-1:1. У деяких варіантах здійснення процентна кількість сумарної міді в композиції тетраміну, яка знаходиться в комплексі з хелатуючим мідь тетраміном (таким як триентин), становить приблизно будь-яку одну з 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 100 %. У деяких варіантах здійснення процентна кількість сумарної міді в композиції тетраміну, яка знаходиться в комплексі з хелатуючим мідь тетраміном (таким як триентин), становить приблизно будь-яку одну з 1-5 %, 5-10 %, 10-20 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70-80 %, 80-90 %, 90-100 %, 1-10 %, 10-50 %, 50-80 % або 80-100 %. У деяких варіантах здійснення процентна кількість сумарного хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) у композиції тетраміну, яка знаходиться в комплексі з іоном міді, становить щонайменше приблизно будь-яку одну з 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 100 %. У деяких варіантах здійснення процентна кількість сумарного хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) у композиції тетраміну, яка знаходиться в комплексі з іоном міді, становить щонайменше приблизно будь-яку одну з 1-5 %, 5-10 %, 10-20 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70-80 %, 80-90 %, 90-100 %, 1-10 %, 10-50 %, 50-80 % або 80-100 %. У деяких варіантах здійснення іон міді, який не знаходиться в комплексі з хелатуючим мідь тетраміном (таким як триентин), присутній у вигляді солі, такої як сульфат міді, хлорид міді, оксид міді, нітрат міді, ацетат міді, форміат міді, глюконат міді, хелати міді з амінокислотами і інші подібні солі.

[164] У деяких варіантах здійснення пропонується композиція тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді, де іон міді не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає триентин і іон міді, де іон міді не утворює комплекс із триентином. У деяких варіантах здійснення іон міді присутній у вигляді солі, такої як сульфат міді, хлорид міді, оксид міді, нітрат міді, ацетат міді, форміат міді, глюконат міді, хелати міді з амінокислотами і інші подібні солі. У деяких варіантах здійснення мольне відношення хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) до іона міді становить приблизно будь-яке одне з 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 або 1:100. У деяких варіантах здійснення мольне відношення хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) до іона міді становить приблизно будь-яке одне з 50:1-100:1, 20:1-50:1, 10:1-20:1, 5:1-10:1, 4:1-5:1, 3:1-4:1, 2:1-3:1, 1:1-2:1, 1:2-1:1, 1:3-1:2, 1:4-1:3, 1:5-1:4, 1:10-1:5, 1:20-1:10, 1:50-1:20, 1:100-1:50, 1:100-1:10, 1:10-1:1, 1:1-10:1, 10:1-100:1 або 1:10-10:1.

[165] Багато які параметри композиції тетраміну, у тому числі, але цим не обмежуючи, хімічна структура хелатуючого мідь тетраміну, відношення хелатуючого мідь тетраміну до міді в композиції тетраміну, взаємодії іона міді з хелатуючим мідь тетраміном (наприклад, чи утворюється комплекс, чи є комплекс кристалічним, і так далі), можуть впливати на здатність композиції тетраміну доставляти (наприклад, вивантажувати) мідь у клітини в ішемізованій тканині. Наприклад, хелатуючий мідь тетрамін може мати конфігурацію (у тому числі дентатність хелатоутворювального ліганду, донорні зв'язувальні групи і розмір порожнин), яка сприяє оборотному зв'язуванню іона міді. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає хелатуючий мідь тетрамін з достатньо низькою спорідненістю до іона міді усередині клітин в ішемізованій тканині, де композиція тетраміну дисоціює і вивантажує іон міді усередині клітин. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну включає додаткові сполуки і/або засоби, які підсилюють вивантаження іона міді в клітинах в ішемізованій тканині.

[166] Крім того, пропонуються фармацевтичні композиції, які включають будь-яку з описаних у винаході композицій тетраміну і один або більше фармацевтично прийнятних носіїв, допоміжні речовини, стабілізатори, розріджувачі і/або інші добре відомі речовини, для застосування в описаних для застосування способах.

[167] Відповідно, в одному аспекті даного винаходу пропонується фармацевтична композиція, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді. У деяких варіантах здійснення пропонується фармацевтична композиція, яка включає триентин і іон міді.

[168] У деяких варіантах здійснення пропонується фармацевтична композиція, яка включає комплекс хелатуючого мідь тетраміну і іона міді. У деяких варіантах здійснення пропонується фармацевтична композиція, яка включає комплекс триентину і іона міді. В одному з варіантів здійснення комплекс хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) і іона міді є кристалічним. У деяких варіантах здійснення кристалічний комплекс хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) і іона міді є термодинамічно стійким поліморфом. У деяких варіантах здійснення фармацевтична композиція включає кристалічний комплекс триентину і іона міді, у якому іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворенням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води. В одному з варіантів здійснення комплекс хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) і іона міді не є кристалічним.

[169] У деяких варіантах здійснення пропонується фармацевтична композиція, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді, де щонайменше частина (наприклад, щонайменше приблизно будь-яка з 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більше) іона міді не знаходиться в комплексі з хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення пропонується фармацевтична композиція, яка включає триентин і іон міді, де щонайменше частина (наприклад, щонайменше приблизно будь-яка з 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більше) іона міді не знаходиться в комплексі із триентином. У деяких варіантах здійснення пропонується фармацевтична композиція, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді, де іон міді не утворює комплекс з хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення пропонується фармацевтична композиція, яка включає триентин і іон міді, де іон міді не утворює комплекс із хелатуючим мідь триентином. У деяких варіантах здійснення іон міді, що не знаходиться в комплексі з хелатуючим мідь тетраміном, присутній у вигляді солі, такої як сульфат міді, хлорид міді, оксид міді, нітрат міді, ацетат міді, форміат міді, глюконат міді, хелати міді з амінокислотами і інші подібні солі.

[170] Будь-яка з описаних у винаході фармацевтичних композицій може застосовуватися для підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, для індукування щонайменше двох (наприклад, будь-яких з щонайменше 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більше) процесів відновлення тканини, для посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) і/або для лікування (у тому числі запобігання) будь-якого захворювання або стану, пов'язаного з ішемічним ураженням тканини.

[171] Описані у винаході фармацевтичні композиції можуть бути приготовлені у формі розчинів, емульсій, суспензій, дисперсій або комплексів включення, наприклад із циклодекстринами, у придатних фармацевтичних розчинниках або носіях, або у формі пігулок, таблеток, льодяників, супозиторіїв, пакетиків, драже, гранул, порошків, порошків для приготування розчинів або капсул разом із твердими носіями, використовуючи добре відомі традиційні методи приготування різних дозованих форм. Фармацевтичні композиції варіантів здійснення можуть бути введені за допомогою відповідного способу доставки, такого як пероральний, парентеральний, ректальний, назальний, місцевий або окулярний способи введення, або за допомогою інгаляції. У деяких варіантах здійснення фармацевтичну

композицію приготують для перорального введення. У деяких варіантах здійснення фармацевтичну композицію приготують для парентерального введення (такого як внутрішньовенне введення).

[172] Для перорального введення, фармацевтична композиція може бути представлена у твердій формі, такий як таблетка або капсула, або у вигляді розчину, емульсії або суспензії. У деяких варіантах здійснення фармацевтичну композицію приготують у формі таблетки, капсули або пігулки. Пероральні таблетки можуть включати активний інгредієнт (інгредієнти), змішаний із сумісними фармацевтично прийнятними допоміжними речовинами, такими як розріджувачі, дезинтегруючі речовини, зв'язуючі речовини, мастильні речовини, підсолоджувачі, ароматизатори, забарвлюючі речовини і консерванти. Придатні інертні наповнювачі включають карбонат натрію і кальцію, фосфат натрію і кальцію, лактозу, крохмаль, цукор, глюкозу, метилцелюлозу, стеарат магнію, маніт, сорбіт і інші подібні речовини. Приклади рідких пероральних допоміжних речовин включають етанол, гліцерин, воду і інші подібні речовини. Прикладами дезинтегруючих речовин є крохмаль, полівінілпіролідон (PVP), крохмальгліколят натрію, мікрокристалічна целюлоза і альгінова кислота. Зв'язуючі речовини можуть включати крохмаль і желатин. Мастильна речовина, якщо вона присутня, може являти собою стеарат магнію, стеаринову кислоту або тальк. При необхідності, на таблетки може бути нанесене покриття з такого матеріалу як гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат для уповільнення всмоктування в шлунково-кишковому тракті, або може бути нанесене ентросолюбільне покриття. Пероральні склади можуть являти собою дискретні елементи, такі як капсули, облатки або таблетки, кожний з яких містить задану кількість активного інгредієнта, являти собою порошок або гранули; являти собою розчин або суспензію у водній рідині або неводній рідині або являти собою рідку емульсію типу масло-у-воді або рідку емульсію вода-в-маслі. Активний інгредієнт може також знаходитися у формі болюсу, електуарію або пасти.

[173] Таблетка може бути виготовлена шляхом пресування або формування, необов'язково, з однією або декількома допоміжними речовинами. Пресовані таблетки можуть бути одержані шляхом пресування на відповідній установці активного інгредієнта в сипкому стані, такому як порошок або гранули, необов'язково змішаного зі зв'язуючою речовиною (наприклад, повідомом, желатином, гідроксипропілметилцелюлозою), мастильною речовиною, інертним розріджувачем, консервантом, дезинтегруючою речовиною (наприклад, крохмальгліколятом натрію, зшитим повідомом, зшитою карбоксиметилцелюлозою натрію), поверхнево-активною речовиною або диспергуючою речовиною. Формовані таблетки можуть бути виготовлені шляхом формування на відповідній установці суміші порошкоподібної сполуки, зволоженої за допомогою інертного рідкого розріджувача. На таблетки може бути необов'язково нанесене покриття або насічка, і таблетки можуть бути виготовлені таким чином, щоб вони забезпечували повільне або контрольоване вивільнення активного інгредієнта, використовуючи, наприклад, гідроксипропілметилцелюлозу в різних пропорціях для одержання необхідного профілю вивільнення.

[174] Капсули для перорального введення включають тверді і м'які желатинові капсули. Для приготування твердих желатинових капсул активний інгредієнт (інгредієнти) може бути змішаний з твердим, напівтвердим або рідким розріджувачем. М'які желатинові капсули можуть бути одержані шляхом змішування активного інгредієнта з водою, олією, такою як арахісова олія або оливкова олія, рідким парафіном, сумішшю моно- і дигліцеридів коротколанцюжкових жирних кислот, поліетиленгліколем 400 або пропіленгліколем. Капсули можуть також містити желатин, оксиди заліза, стеаринову кислоту і діоксид титану як неактивні інгредієнти.

[175] Рідини для перорального введення можуть бути у формі суспензій, розчинів, емульсій або сиропів або можуть бути ліофілізовані, або можуть знаходитися у формі сухого продукту для розчинення у воді або іншому придатному середовищі перед використанням. Такі рідкі композиції можуть, необов'язково, містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, такі як суспендуючі речовини (наприклад, сорбіт, метилцелюлоза, альгінат натрію, желатин, гідроксипропілметилцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза, гель стеарату алюмінію і інші подібні речовини); неводні середовища, наприклад олію (наприклад, мигдалеву олію або фракціоновану кокосову олію), пропіленгліколь, етиловий спирт або воду; консерванти (наприклад, метил або пропіл-п-гідроксибензоат або сорбінова кислота); змочувальні засоби, такі як лецитин, і, при необхідності, ароматизатори або забарвлюючі речовини.

[176] Для парентерального застосування, у тому числі внутрішньовенного, внутрішньом'язового, інтраперитонеального, інтраназального або підшкірного введення, композиції тетраміну можуть бути приготувані в стерильних водних розчинах або суспензіях, забуферених до придатного значення pH і ізотонічності, або в парентерально прийнятній олії. Придатні водні середовища включають розчин Рінгера і ізотонічний розчин хлориду натрію. Такі

форми можуть бути представлені у вигляді лікарської форми з разовою дозою, такої як ампули або одноразові ін'єкційні пристрої, у вигляді багатодозових лікарських форм, таких як флакони, з яких може бути витягнута відповідна доза, або у вигляді твердої форми або попередньо приготовленого концентрату, який може бути використаний для приготування ін'єкційної композиції. Склади, придатні для парентерального, у тому числі внутрішньовенного, введення включають водні і неводні стерильні розчини для ін'єкцій, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостати і розчинені речовини, які забезпечують складу ізотонічність із кров'ю передбачуваного реципієнта; і водні і неводні стерильні суспензії, які можуть включати суспендуючі речовини і загусники. Склади можуть бути представлені у вигляді однодозових або багатодозових контейнерів, наприклад герметичних ампул і флаконів, і можуть зберігатися в ліофілізованому стані, при якому потрібне тільки додавання стерильного рідкого середовища, наприклад води для ін'єкцій, безпосередньо перед використанням. Розчини і суспензії для негайної ін'єкції можуть бути приготовлені зі стерильних порошків, гранул і таблеток описаного вище типу.

Дозування і способи введення

[177] При застосуванні *in vivo* будь-якого з описаних у винаході способів лікування, композицію тетраміну (у тому числі фармацевтичну композицію) і, необов'язково, мідепромотуючу композицію і/або стовбурові клітини (або індуктор стовбурових клітин) вводять індивідууму в ефективних кількостях. "Ефективна кількість" являє собою щонайменше мінімальну концентрацію, необхідну для досягнення поліпшення, що піддається вимірюванню, або запобігання захворюванню або стану, пов'язаному з ішемічним ураженням тканини. У даному винаході, ефективна кількість може змінюватися залежно від таких факторів як ступінь ішемічного ушкодження у індивідуума, характеристика використовуваної конкретної композиції тетраміну, іона міді і/або стовбурових клітин (або індукторів стовбурових клітин), наприклад їх терапевтичний індекс, характеристика індивідуума (наприклад, вік, стать, вага і історія хвороби). Ефективна кількість також являє собою кількість, при якій терапевтичні позитивні ефекти значно перевищують будь-які токсичні або шкідливі ефекти, що виникають при лікуванні. У випадку профілактичного застосування, позитивні або бажані результати включають такі результати як усунення або зниження ризику, полегшення тяжкості або відстрочення початку захворювання або стану, включаючи біохімічні, гістологічні і/або поведінкові симптоми захворювання або стану, їх ускладнення і проміжні патологічні фенотипи, що виникають при розвитку захворювання або стану. У випадку терапевтичного застосування, позитивні або бажані результати включають такі клінічні результати як зменшення одного або декількох симптомів, викликаних захворюванням або станом, підвищення якості життя людей, що страждають від цього захворювання, зниження дози інших лікарських препаратів, необхідних для лікування хвороби, посилення дії іншого лікарського препарату, наприклад, шляхом таргетування, уповільнення прогресування захворювання і/або продовження строку виживання.

[178] У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну (наприклад, фармацевтичної композиції) і, необов'язково, у комбінації з ефективною кількістю мідепромотуючої композиції є ефективною для досягнення збільшення більше ніж приблизно на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % і більше внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині у індивідуума в порівнянні із внутрішньоклітинним вмістом міді в ішемізованій тканині у індивідуума до лікування. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну (наприклад, фармацевтичної композиції) і, необов'язково, у комбінації з ефективною кількістю мідепромотуючої композиції є ефективною для досягнення збільшення більше ніж приблизно на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % і більше сумарного вмісту міді в ішемізованій тканині у індивідуума в порівнянні із сумарним вмістом міді в ішемізованій тканині у індивідуума до лікування. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну (наприклад, фармацевтичної композиції) і, необов'язково, в комбінації з ефективною кількістю мідепромотуючої композиції не зменшують позаклітинний вміст міді (наприклад, міді в крові) у індивідуума. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну (наприклад, фармацевтичної композиції) і, необов'язково, у комбінації з ефективною кількістю мідепромотуючої композиції не знижує позаклітинного вмісту міді (наприклад, міді в крові) у індивідуума приблизно більше ніж на 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % або більше у порівнянні з позаклітинним вмістом міді у індивідуума до лікування. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну (наприклад, фармацевтичної композиції) і, необов'язково, у комбінації з ефективною кількістю мідепромотуючої композиції не зменшує сумарного вмісту міді у індивідуума. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну (наприклад, фармацевтичної композиції) і, необов'язково, у комбінації з

ефективною кількістю мідепромотуючої композиції не зменшує сумарного вмісту міді у індивідуума приблизно більше ніж на 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % або більше у порівнянні із сумарним вмістом міді у індивідуума до лікування.

[179] Ефективна кількість може бути введена в результаті одного або більше введень.

5 Виходячи з медичної практики зрозуміло, що ефективна кількість лікарського засобу, сполуки або фармацевтичної композиції може бути досягнута або може бути не досягнута при використанні в комбінації з іншим лікарським засобом, сполукою або фармацевтичною композицією. Так, наприклад, "ефективна кількість" може розглядатися в контексті введення
10 одного або декількох терапевтичних засобів, і можна вважати, що один засіб введений в ефективній кількості, якщо в комбінації з одним або більше іншими засобами може бути досягнутий або досягається необхідний результат.

[180] Ефективна кількість, дози і режим дозування композиції тетраміну окремо або в комбінації з мідепромотуючою композицією (такою як іон міді) і/або зі стовбуровими клітинами (або індуктором стовбурових клітин) можуть бути визначені під час доклінічних випробувань і
15 клінічних випробувань добре відомими терапевтам і лікарям-клініцистам методами. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) у композиції тетраміну становить приблизно менше ніж 0,5 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 80 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг або 1200 мг. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість хелатуючого мідь тетраміну
20 (такого як триентин) у композиції тетраміну становить від приблизно 0,5 мг до приблизно 5 мг, від приблизно 5 мг до приблизно 10 мг, від приблизно 10 мг до приблизно 25 мг, від приблизно 25 мг до приблизно 50 мг, від приблизно 50 мг до приблизно 75 мг, від приблизно 75 мг до приблизно 100 мг, від приблизно 100 мг до приблизно 125 мг, від приблизно 125 мг до приблизно 150 мг, від приблизно 150 мг до приблизно 175 мг, від приблизно 175 мг до
25 приблизно 200 мг, від приблизно 200 мг до приблизно 225 мг, від приблизно 225 мг до приблизно 250 мг, від приблизно 250 мг до приблизно 275 мг, від приблизно 275 мг до приблизно 300 мг, від приблизно 300 мг до приблизно 350 мг, від приблизно 350 мг до приблизно 400 мг, від приблизно 400 мг до приблизно 500 мг, від приблизно 500 мг до приблизно 600 мг, від приблизно 600 мг до приблизно 1200 мг, від приблизно 1200 мг до
30 приблизно 2400 мг, від приблизно 0,5 мг до приблизно 50 мг, від приблизно 50 мг до приблизно 100 мг, від приблизно 100 мг до приблизно 125 мг, від приблизно 125 мг до приблизно 200 мг, від приблизно 150 мг до приблизно 300 мг, від приблизно 200 мг до приблизно 300 мг, від приблизно 300 мг до приблизно 600 мг, від приблизно 0,5 мг до приблизно 200 мг, від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 80 мг до приблизно 400 мг, або від
35 приблизно 80 мг до приблизно 450 мг. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 80 мг до приблизно 450 мг хелатуючого мідь тетраміну (наприклад, у формі дихлоридної солі) на добу для пацієнта-людини.

[181] У деяких варіантах здійснення ефективна кількість хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) у композиції тетраміну (такій як фармацевтична композиція) включає щонайменше
40 приблизно 1 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 7,5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг або 20 мг/кг. У деяких варіантах здійснення кількість хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) у композиції тетраміну (такій як фармацевтична композиція) включає приблизно менше ніж 35 мг/кг, 30 мг/кг, 25 мг/кг, 20 мг/кг, 18 мг/кг, 15 мг/кг, 10 мг/кг, 5 мг/кг, 2,5 мг/кг, 2 мг/кг, 1 мг/кг, 0,5 мг/кг або 0,1 мг/кг. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість хелатуючого мідь тетраміну в композиції
45 тетраміну становить будь-яку одну з від приблизно 1 мг/кг до приблизно 10 мг/кг, від приблизно 10 мг/кг до приблизно 15 мг/кг, від приблизно 15 мг/кг до приблизно 20 мг/кг, від приблизно 20 мг/кг до приблизно 25 мг/кг, від приблизно 25 мг/кг до приблизно 30 мг/кг, від приблизно 30 мг/кг до приблизно 40 мг/кг, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 100 мг/кг, від приблизно 10 мг/кг до приблизно 50 мг/кг, від приблизно 15 мг/кг до приблизно 50 мг/кг, від приблизно 15 мг/кг до
50 приблизно 40 мг/кг або від приблизно 20 мг/кг до приблизно 35 мг/кг на добу. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить не більше ніж приблизно 20 мг/кг на добу, наприклад приблизно 18 мг/кг на добу, для мавп макак-резус. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить не більше ніж від приблизно 15 мг/кг до приблизно 35 мг/кг на добу для миші.

55 [182] У деяких варіантах здійснення ефективна кількість хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) у фармацевтичній композиції (наприклад, у стандартній дозованій формі) знаходиться в діапазоні від приблизно 5 мг до приблизно 300 мг, наприклад від приблизно 80 мг до приблизно 150 мг, від приблизно 80 мг до приблизно 200 мг, від приблизно 200 мг до приблизно 300 мг або від приблизно 80 мг до приблизно 300 мг. У деяких варіантах здійснення
60 концентрація хелатуючого мідь тетраміну (такого як триентин) у фармацевтичній композиції є

розведеною (приблизно 0,1 мг/мл) або високою (приблизно 100 мг/мл), у тому числі, наприклад, будь-якою однією з від приблизно 0,1 до приблизно 50 мг/мл, від приблизно 0,1 до приблизно 20 мг/мл, від приблизно 1 до приблизно 10 мг/мл.

[183] Приклади частоти дозування включають, але цим не обмежуючи, будь-яку одну частоту із чотирьох разів на добу, трьох разів на добу, двох разів на добу, одного разу на добу, одного разу на два дні, одного разу на три дні, одного разу на чотири дні, одного разу на тиждень. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну (таку як фармацевтична композиція) вводять щонайменше приблизно 1 раз, 2 рази, 3 рази, 4 рази, 5 разів, 6 разів або 7 разів (тобто щодня) на тиждень. У деяких варіантах здійснення інтервали між кожним введенням становлять менше ніж приблизно 7 днів, 6 днів, 5 днів, 4 дні, 3 дні, 2 дні, 1 день, 12 годин, 6 годин, 4 години або 3 години. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять щодня. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять щонайменше два рази на день. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять щонайменше один раз, у тому числі, наприклад, щонайменше 2 рази, 3 рази або 4 рази на день.

[184] У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну в комбінації із частотою дозування є достатніми для підтримання високої концентрації тетраміну (такого як триентин) у індивідуума, наприклад у крові або в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення висока концентрація тетраміну є концентрацією, яка підсилює мідезалежну транскрипційну активність HIF-1 або індукє щонайменше один (у тому числі щонайменше 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більше) процес відновлення тканини. У деяких варіантах здійснення введення композиції тетраміну (такої як фармацевтична композиція) приводить щонайменше до концентрації приблизно 0,005 мг/л (у тому числі, наприклад, щонайменше приблизно 0,01 мг/л, 0,05 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/мл, 1,0 мг/л, 2,0 мг/л, 3,0 мг/л, 4,0 мг/л або 5,0 мг/л) хелатуючого мідь тетраміну в крові. Концентрація тетраміну в біологічному зразку (такому як кров або біоптат ішемізованої тканини) може бути визначена за допомогою відомих методів, таких як флуоресцентна спектроскопія, мас-спектроскопія і хроматографічні методи, або шляхом вимірювання рівня міченого тетраміну.

[185] У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну в комбінації із частотою дозування забезпечують підтримання високої концентрації тетраміну (такого як триентин) у індивідуума протягом щонайменше приблизно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше годин. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну в комбінації із частотою дозування забезпечують підтримання високої концентрації тетраміну (такого як триентин) у індивідуума протягом щонайменше приблизно 8 годин.

[186] У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить приблизно щонайменше 1 мг/кг/добу, 2 мг/кг/добу, 5 мг/кг/добу, 10 мг/кг/добу, 12 мг/кг/добу, 15 мг/кг/добу, 18 мг/кг/добу, 20 мг/кг/добу, 30 мг/кг/добу, 40 мг/кг/добу, 50 мг/кг/добу або більше триєнтину в композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить не більше ніж 1 мг/кг/добу, 2 мг/кг/добу, 5 мг/кг/добу, 10 мг/кг/добу, 12 мг/кг/добу, 15 мг/кг/добу, 18 мг/кг/добу, 30 мг/кг/добу, 40 мг/кг/добу або 50 мг/кг/добу триєнтину в композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 1 мг/кг/добу до приблизно 2 мг/кг/добу, від приблизно 2 мг/кг/добу до приблизно 5 мг/кг/добу, від приблизно 5 мг/кг/добу до приблизно 10 мг/кг/добу, від приблизно 10 мг/кг/добу до приблизно 15 мг/кг/добу, від приблизно 15 мг/кг/добу до приблизно 20 мг/кг/добу, від приблизно 20 мг/кг/добу до приблизно 30 мг/кг/добу, від приблизно 30 мг/кг/добу до приблизно 50 мг/кг/добу, від приблизно 1 мг/кг/добу до приблизно 5 мг/кг/добу, від приблизно 5 мг/кг/добу до приблизно 15 мг/кг/добу, від приблизно 1 мг/кг/добу до приблизно 10 мг/кг/добу або від приблизно 1 мг/кг/добу до приблизно 18 мг/кг/добу триєнтину в композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить приблизно 18 мг/кг/добу триєнтину в композиції тетраміну. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість композиції тетраміну становить від приблизно 1 мг/кг/добу до приблизно 10 мг/кг/добу триєнтину в композиції тетраміну.

[187] Введення композиції тетраміну (такої як фармацевтична композиція) може здійснюватися протягом тривалого періоду часу, наприклад від приблизно одного тижня до приблизно декількох років. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну (таку як фармацевтична композиція) вводять протягом періоду часу щонайменше приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 або 84 місяці або більше. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну (таку як фармацевтична композиція) вводять протягом щонайменше приблизно одного місяця, у тому числі, наприклад, приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 або більше місяців. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну (таку як фармацевтична композиція) вводять протягом щонайменше приблизно одного місяця, і де

композицію тетраміну вводять щонайменше один раз (наприклад, два рази, три рази або чотири рази) на добу. У деяких варіантах здійснення введення композиції тетраміну (у тому числі фармацевтичної композиції) приводить щонайменше до вмісту приблизно 0,005 мг/л (у тому числі, наприклад, щонайменше приблизно 0,01 мг/л, 0,05 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/мл, 1,0 мг/л, 2,0 мг/л, 3,0 мг/л, 4,0 мг/л або 5,0 мг/л) хелатуючого мідь тетраміну в крові протягом щонайменше приблизно 1 тижня (у тому числі, наприклад, протягом щонайменше приблизно 2 тижнів, 1 місяця, 2 місяців, 3 місяців, 4 місяців, 6 місяців, 12 місяців або більше).

[188] Будь-яка з описаних у винаході композицій тетраміну (наприклад, фармацевтичних композицій) може бути введена індивідууму (такому як людина) різними способами, що включають, наприклад, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, інтраперитонеальне, внутрішньолегеневе, пероральне, інгаляційне, інтравезикулярне, внутрішньом'язове, інтратрахеальне, підшкірне, інтраокулярне, інтратекальне, трансмукозальне, трансдермальне, внутрішньопухлинне введення, пряму ін'єкцію в стінку кровоносної судини, інтракраніальне або внутрішньопорожнинне введення. У деяких варіантах здійснення може бути використана лікарська форма з безперервним уповільненим вивільненням композиції тетраміну (такої як фармацевтична композиція). У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять парентерально. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять перорально. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять безпосередньо в ішемізовану тканину (наприклад, використовуючи описані у винаході способи прямої доставки). У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну вводять хірургічним методом, таким як ангиопластика.

[189] У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну (така як фармацевтична композиція) може бути введена разом із другою терапевтичною сполукою і/або із другою терапією. Доза і частота дозування композиції тетраміну (такої як фармацевтична композиція) і другої сполуки можуть бути скоректовані протягом курсу лікування на основі висновку лікаря. У деяких варіантах здійснення перший і другий лікарські засоби вводять одночасно, послідовно або паралельно. Використовуване у винаході "одночасне введення" може вказувати на те, що перший засіб і другий засіб при комбінованій терапії вводять із часовим інтервалом не більше ніж приблизно 15 хвилин, наприклад не більше ніж приблизно 10, 5 або 1 хвилина. Коли перший і другий лікарські засоби вводять одночасно, перший і другий лікарські засоби можуть міститися в одній і тій же композиції (наприклад, композиції, яка включає як перший, так і другий лікарський засіб) або в роздільних композиціях (наприклад, перший лікарський засіб міститься в одній композиції, а другий лікарський засіб міститься в іншій композиції). "Послідовне введення" може вказувати на те, що перший засіб і другий засіб при комбінованій терапії вводять із часовим інтервалом більше ніж приблизно 15 хвилин, наприклад більше ніж приблизно 20, 30, 40, 50, 60 або більше хвилин. Або перший лікарський засіб, або другий лікарський засіб може вводитися першим по порядку. Перший і другий лікарські засоби містяться в роздільних композиціях, які можуть бути розфасовані в одні і ті ж або різні упаковки або набори. Паралельне введення може вказувати на те, що введення першого зазначеного засобу і введення другого лікарського засобу при комбінованій терапії перекриваються одне з одним. При роздільному введенні, фармацевтична композиція і друга сполука можуть бути введені з різною частотою дозування або з різними інтервалами. Наприклад, композиція тетраміну (така як фармацевтична композиція) може бути введена один раз на добу, у той час як друга сполука може вводитися більш часто або менш часто. У деяких варіантах здійснення може бути використана лікарська форма композиції тетраміну і/або другої сполуки з безперервним уповільненим вивільненням. Відомі різні композиції і пристрої для досягнення уповільненого вивільнення. Може бути використана комбінація описаних у винаході конфігурацій введення. У деяких варіантах здійснення другою сполукою є іон міді (наприклад, сіль міді або хелат міді). У деяких варіантах здійснення другий лікарський препарат включає стовбурові клітини або індуктор стовбурових клітин.

[190] У деяких варіантах здійснення індивідууму додатково вводять ефективну кількість мідепромотуючої композиції, яка включає іон міді. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість мідепромотуючої композиції, що вводиться індивідууму, є достатньою для підвищення позаклітинного вмісту міді у індивідуума приблизно на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 % або більше у порівнянні з позаклітинним вмістом міді у індивідуума до лікування. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість мідепромотуючої композиції, що вводиться індивідууму, є достатньою для підвищення сумарного вмісту міді в ішемізованій тканині індивідуума приблизно на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 % або більше у порівнянні із сумарним вмістом міді в ішемізованій тканині індивідуума до лікування.

[191] У деяких варіантах здійснення ефективна кількість мідепромотуючої композиції, що вводиться індивідууму, є достатньою для підвищення позаклітинного вмісту міді у індивідуума приблизно на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 % або більше у порівнянні з позаклітинним вмістом міді у індивідуума до лікування. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість мідепромотуючої композиції, що вводиться індивідууму, є достатньою для підвищення сумарного вмісту міді в ішемізованій тканині індивідуума приблизно на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 % або більше у порівнянні із сумарним вмістом міді в ішемізованій тканині індивідуума до лікування. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція, яка не включає іон міді, може бути використана для підвищення позаклітинного вмісту міді. Наприклад, мідепромотуюча композиція може збільшувати введення міді, зменшувати виведення міді і/або знижувати токсичність цинку.

[192] У деяких варіантах здійснення ефективна кількість іона міді в мідепромотуючій композиції, що включає іон міді, знаходиться у наступних діапазонах: від приблизно 0,01 мг до приблизно 0,1 мг, від приблизно 0,1 мг до приблизно 0,5 мг, від приблизно 0,5 мг до приблизно 1 мг, від приблизно 1 мг до приблизно 2 мг, від приблизно 2 мг до приблизно 3 мг, від приблизно 3 мг до приблизно 4 мг, від приблизно 4 мг до приблизно 5 мг, від приблизно 5 мг до приблизно 8 мг, від приблизно 8 мг до приблизно 10 мг, від приблизно 0,01 мг до приблизно 1 мг або від приблизно 0,1 мг до приблизно 2,5 мг. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість іона міді в мідепромотуючій композиції, що вводиться індивідууму, включає щонайменше приблизно 5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 20 мкг/кг, 30 мкг/кг, 50 мкг/кг, 100 мкг/кг, 200 мкг/кг, 300 мкг/кг, 400 мкг/кг, 500 мкг/кг, 600 мкг/кг, 700 мкг/кг, 800 мкг/кг, 900 мкг/кг або 1000 мкг/кг. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість іона міді в мідепромотуючій композиції, що вводиться індивідууму, включає менше ніж приблизно 1000 мкг/кг, 900 мкг/кг, 800 мкг/кг, 700 мкг/кг, 600 мкг/кг, 500 мкг/кг, 400 мкг/кг, 300 мкг/кг, 200 мкг/кг, 100 мкг/кг, 50 мкг/кг, 30 мкг/кг, 20 мкг/кг, 10 мкг/кг або 5 мкг/кг.

[193] У деяких варіантах здійснення мідепромотуючу композицію вводять один або два рази на день. У деяких варіантах здійснення мідепромотуючу композицію вводять із такою ж частотою дозування і протягом такого ж періоду часу, як і композицію тетраміну. У деяких варіантах здійснення мідепромотуючу композицію вводять з відмінною частотою дозування і/або протягом відмінного періоду часу в порівнянні з композицією тетраміну. У деяких варіантах здійснення мідепромотуючу композицію вводять перорально. Ефективна кількість і частота дозування мідепромотуючої композиції можуть бути визначені під час доклінічних і клінічних випробувань методами, добре відомими терапевтам і лікарям-клініцистам.

[194] Після того, як досягнуте поліпшення стану пацієнта, доза може бути скоректована для профілактичного або підтримуючого лікування. Наприклад, доза або частота введення, або і те, і інше, може бути зменшена залежно від симптомів до рівня, при якому підтримується необхідний терапевтичний або профілактичний ефект. Зрозуміло, що, якщо в результаті симптоми були полегшені до відповідного рівня, то лікування може бути припинене. Однак пацієнтам може знадобитися інтермітуюча терапія на довгостроковій основі після будь-якого повторного прояву симптомів. Пацієнтам може також знадобитися тривале лікування на довгостроковій основі.

[195] Відомі різні прямі методи доставки лікарських засобів, і вони можуть бути використані для введення композиції тетраміну (такої як фармацевтична композиція) і/або мідепромотуючої композиції.

[196] У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і/або мідепромотуючу композицію доставляють за допомогою мікропузирчика. У деяких варіантах здійснення іон міді доставляють за допомогою наночастинок на основі пептидів, що включають мідь. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і/або мідепромотуючу композиції доставляють або таргетують в ішемізовану тканину пасивно за допомогою фізичного впливу, індукуючого вивільнення або доставку в ішемізовану тканину, що забезпечується наночастинками (або мікросферами).

[197] У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і/або мідепромотуючу композицію доставляють шляхом безпосереднього введення композиції тетраміну і/або мідепромотуючої композиції в ішемізовану тканину. У деяких варіантах здійснення розкриті у винаході композицію тетраміну і/або мідепромотуючу композицію вводять перорально до місця ішемічного ураження тканини. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну і/або мідепромотуюча композиція всмоктуються через травний тракт. В одному аспекті всмоктувану композицію і/або іон міді таргетують (шляхом активного таргетування або пасивного таргетування) на місце ішемічного ушкодження, і її вивільнення відбувається локально в місці ішемічного ушкодження із забезпеченням ефективної локальної концентрації композиції тетраміну і/або мідепромотуючої композиції для відновлення тканини. У деяких варіантах здійснення іон міді, що доставляється

перорально, утворює сполуку або комплекс із білком, пептидом, амінокислотою або моно-, ди- або полісахаридом. У деяких варіантах здійснення іон міді утворює сполуку або комплекс із одним або більше полімерами. В інших варіантах здійснення іон міді знаходиться в металоорганічній сполуці, такий як низькомолекулярна металоорганічна сполука.

[198] У деяких варіантах здійснення розкрита у винаході композиція з уповільненою доставкою включає ін'єкційні препарати пролонгованої дії (наприклад, ін'єкції на масляній основі, ін'єктовані суспензії, ін'єктовані мікросфери і ін'єктовані *in situ* системи), які містять композицію тетраміну і/або композицію міді, речовини і полімери для ін'єкцій у депо-формі, ін'єкції у депо-формі, що випускаються промисловістю, і ін'єктовані системи доставки з уповільненим вивільненням. У конкретним варіантах здійснення розкрита у винаході композиція з уповільненою доставкою включає полімерну матрицю, з якої лікарський засіб вивільняється в результаті дифузії і/або розкладання полімерної матриці. Тому, характеристика вивільнення лікарського засобу визначається, головним чином, полімерною матрицею, а також вмістом завантаженого лікарського засобу і методом виготовлення. У деяких варіантах здійснення в препаратах з уповільненим вивільненням використовують біорозкладаний полімер. У цьому випадку препарати з уповільненим вивільненням не вимагають їх подальшого хірургічного видалення з організму суб'єкта. Звичайно, такі препарати повільно розкладаються і абсорбуються в організмі пацієнта і, в остаточному підсумку, видаляються з іншими розчинними метаболічними відходами життєдіяльності.

[199] У деяких варіантах здійснення використовують полімерну ін'єктовану депо-систему для доставки імплантата, що утворюється *in situ*, який містить композицію тетраміну і/або композицію міді, на місце ішемічного ушкодження. Системи, що утворюють імплантат *in situ*, звичайно виготовляють із біорозкладаних продуктів, які можуть бути ін'єктовані за допомогою шприца в організм і після ін'єкції застигають із утворенням твердого біорозкладаного імплантата. У деяких варіантах здійснення імплантат формують із термопластичних пастоподібних мас, *in situ* зшитих полімерів, шляхом *in situ* осадження полімеру, термічно індукованого гелеутворення або *in situ* отвердження органел. Механізм формування депо з термопластичних паст полягає в утворенні напівтвердої речовини в результаті охолодження до температури тіла після ін'єктування в організм у розплавленій формі. Зшиті тривимірні полімерні структури можуть бути одержані *in situ* різними способами, утворюючи тверді полімерні системи або гелі. Методи для *in situ* зшитих систем включають вільнорадикальні реакції, звичайно ініційовані нагріванням або абсорбцією фотонів, або міжіонні взаємодії між невеликими катіонами і полімерними аніонами. *In situ* формування можуть бути одержані в результаті осадження полімеру з розчину. Водонерозчинний і біорозкладаний полімер солюбілізується у біосумісному органічному розчиннику, до якого додають лікарський засіб, одержуючи розчин або суспензію після змішування. Коли цю композицію ін'єктують в організм, змішуваний з водою органічний розчинник розсіюється і вода проникає в органічну фазу. Це приводить до розділення фаз і осадження полімеру, утворюючи депо в місці ін'єкції. Термічно індуковані системи гелеутворення демонструють термооборотні золь/гель-переходи і характеризуються нижньою критичною температурою розчинення. Вони є рідинами при кімнатній температурі і утворюють гель при нижній критичній температурі розчинення і більш високих температурах. *In situ* отвердження органел включає водонерозчинні амфіфільні ліпіди, які набухають у воді і утворюють різні типи ліотропних рідких кристалів.

[200] У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і/або мідепромотуючу композицію ін'єктують у місце ішемічного ушкодження, наприклад, шляхом прямої черезшкірної пункції, за допомогою встановленого хірургічним шляхом катетера або шляхом міжхребетної ін'єкції. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і/або мідепромотуючу композицію доставляють безпосередньо в місце ішемічного ушкодження шляхом використання імплантата, стента або пластинки, на які нанесений шар композиції тетраміну і/або мідепромотуючої композиції, або імплантата, імпрегнованого композицією тетраміну і/або мідепромотуючою композицією. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і/або мідепромотуючу композицію доставляють безпосередньо в місце ішемічного ушкодження шляхом повільного вивільнення композиції тетраміну і/або мідепромотуючої композиції із внутрішньосудинного стента, з'єданого із джерелом композиції тетраміну і/або мідепромотуючої композиції. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і/або мідепромотуючу композицію доставляють безпосередньо в місце ішемічного ушкодження шляхом точного таргетування ліпосоми або донорно-акцепторного комплексу. У деяких варіантах здійснення композицію тетраміну і/або мідепромотуючу композицію доставляють у місце ішемічного ушкодження, використовуючи фізіотерапевтичний метод, ультразвук, лікарський електрофорез, ультразвукове посилення проникнення, електропорацію і/або застосування губки. Застосування композиції тетраміну і/або

клітин у місці ішемічного ушкодження може бути місцевим (наприклад, через шкіру), може бути в деякій локалізації в ушкодженій тканині, яка знаходиться усередині поверхні тіла, або і тим, і іншим методом. Наприклад, композиція тетраміну і/або мідепромотуюча композиція може бути доставлена шляхом електрофорезу через кровоносну судину, ендотеліальний клітинний шар або інші внутрішні тканини в місце ішемічного ушкодження для забезпечення ефективної локальної концентрації композиції тетраміну і/або мідепромотуючої композиції для відновлення тканини.

[201] У деяких варіантах здійснення розкрита у винаході композиція з уповільненим вивільненням включає біорозкладаний полімер для контрольованої доставки композиції тетраміну і/або мідепромотуючої композиції. Придатні біорозкладані полімери звичайно включають полілактиди (PLA), полігліколіди (PGA), співполімер лактид-гліколід (PLGA), полі(ϵ -капролактон) (PCL), полігліконат, поліангідриди, поліортоєфіри, полі(діоксанон) і поліалкілціаноакрилати. У деяких варіантах здійснення композиція з уповільненим вивільненням включає ін'єктовані біорозкладані мікросфери, такі як PLGA-мікросфери, PCL-мікросфери, поліангідридні мікросфери, поліортоєфірні мікросфери і поліалкілціаноакрилатні мікросфери.

[202] У конкретних варіантах здійснення цілий ряд різних типів мідевмісних сполук може бути використаний для локалізованої доставки мідепромотуючої композиції безпосередньо в місце ішемічного ушкодження. Прикладами придатних розчинів, що містять іон міді, є розчини хлориду міді(I), хлориду міді(II), ацетату міді і сульфату міді. У деяких варіантах здійснення мідь утворює сполуку або комплекс із білком, пептидом, амінокислотою, моно-, ди- або полісахаридом, одним або більше полімерами або з малою молекулою, і сполуку або комплекс використовують для безпосередньої локалізованої доставки в місце ішемічного ушкодження. У деяких варіантах здійснення металоорганічну сполуку, що містить іон міді, використовують для безпосередньої локалізованої доставки в місце ішемічного ушкодження.

[203] У деяких варіантах здійснення концентрація іонів міді в мідепромотуючій композиції, використовуваний для локалізованої доставки безпосередньо в місце ушкодження, становить від приблизно 5 мкМ до приблизно 10 мкМ, від приблизно 10 мкМ до приблизно 20 мкМ, від приблизно 20 мкМ до приблизно 40 мкМ, від приблизно 40 мкМ до приблизно 60 мкМ, від приблизно 60 мкМ до приблизно 80 мкМ, від приблизно 80 мкМ до приблизно 100 мкМ, від приблизно 100 мкМ до приблизно 200 мкМ, від приблизно 200 мкМ до приблизно 400 мкМ, від приблизно 400 мкМ до приблизно 600 мкМ, від приблизно 600 мкМ до приблизно 800 мкМ, від приблизно 800 мкМ до приблизно 1 мМ, від приблизно 1 мМ до приблизно 5 мМ, від приблизно 5 мМ до приблизно 10 мМ, від приблизно 10 мМ до приблизно 20 мМ, від приблизно 20 мМ до приблизно 40 мМ або від приблизно 40 мМ до приблизно 60 мМ. Концентрація іона міді може бути визначена під час доклінічних випробувань і клінічних випробувань методами, добре відомими терапевтам і лікарям-клініцистам.

Мідь і здатні до утворення хелату з міддю тетраміни

[204] Терміни "мідь", "іон міді" і "елементарна мідь" використовуються у винаході взаємозамінно. У біологічних системах іони міді звичайно існують у двох ступенях окиснення, у формі одновалентної міді (Cu^{1+} , мідь(I) або відновлена) і двовалентної міді (Cu^{2+} , мідь(II) або окиснена). У деяких варіантах здійснення мідь включає обидві форми одновалентної і двовалентної міді. У деяких варіантах здійснення мідь є двовалентною (Cu^{2+}). У деяких варіантах здійснення мідь є одновалентною (Cu^{1+}). У деяких варіантах здійснення мідь являє собою вільний іон, тобто не зв'язаний або в комплексі з іншою молекулою, такою як білок, або з низькомолекулярною органічною молекулою. У деяких варіантах здійснення мідь знаходиться у формі солі. У деяких варіантах здійснення мідь присутня у формі солі, вибраної із сульфату міді, хлориду міді, оксиду міді, глюконату міді і хелатів міді з амінокислотами. У деяких варіантах здійснення мідь присутня у формі комплексного іона. У деяких варіантах здійснення мідь знаходиться в металоорганічній сполуці, такій як низькомолекулярна металоорганічна сполука. У деяких варіантах здійснення мідь знаходиться в комплексі з хелатуючим мідь тетраміном. У деяких варіантах здійснення мідь являє собою комплексний іон, що включає різні види іонів, що утворився в результаті введення міді в клітину, тканину або організм відповідно до даного винаходу. У деяких варіантах здійснення мідь утворює сполуку або комплекс із білком, пептидом, амінокислотою або моно-, ди- або полісахаридом. Важливі білки, що зв'язуються міддю, які виявляються в біологічних системах, включають, але цим не обмежуючи, цитохром-с-оксидазу (Cco), мідь-цинк супероксиддисмутази (Cu, Zn-SOD), дофамін- β -гідроксилазу (DBH), білок пріону (PrP), тирозиназу, X-зчеплений інгібітор апоптозу білка (XIAP), лізилоксидазу, металотіонеїн (MT) і церулоплазмін. У деяких варіантах здійснення мідь знаходиться у формі, не доступній для засвоєння або використання ішемізованою тканиною, наприклад у комплексі із

церулоплазміном. У деяких варіантах здійснення мідь знаходиться у формі, доступній для засвоєння або використання ішемізованою тканиною. У деяких варіантах здійснення розкрита у винаході мідь є індуктором транскрипційної активності HIF-1.

[205] Мідепромотуюча композиція, що включає описаний вище будь-який вид іона міді, може бути використана в описаних у винаході способах. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція включає Cu^{2+} . У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція включає Cu^{1+} . У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція включає іон міді у формі солі (наприклад, будь-якої або комбінації, вибраної із сульфату міді, хлориду міді, оксиду міді, глюконату міді і хелатів міді з амінокислотами). У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція включає металоорганічну сполуку. У деяких варіантах здійснення мідепромотуюча композиція не включає іон міді або сполуки міді.

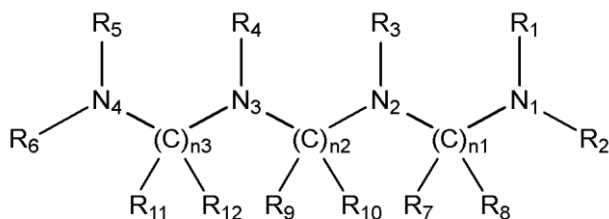
[206] "Вміст міді", на який посилаються в будь-якому з описаних у винаході способів, може належати до концентрації будь-якого одного з описаних у винаході видів сполук міді, наприклад Cu^{2+} , Cu^{1+} , або концентрації сумарної міді (наприклад, Cu^{1+} і Cu^{2+} і/або вільної або незв'язаної міді). У деяких варіантах здійснення вміст міді належить до вмісту двовалентної міді. У деяких варіантах здійснення вміст міді належить до вмісту міді, яка знаходиться у формі, доступній для засвоєння або використання ішемізованою тканиною.

[207] "Хелатуючий мідь тетрамін" належить до сполуки тетраміну, що зв'язує мідь або утворює хелат з міддю. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін зв'язує Cu^{2+} . У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін зв'язує Cu^{1+} . У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін проявляє специфічність (тобто має більш високу спорідненість) до Cu^{2+} у порівнянні з Cu^{1+} . У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін утворює комплекс із іоном міді в плоско-квадратній, перекрученій плоско-квадратній, тригонально-пірамідальній, квадратно-пірамідальній перекрученій октаедральній конфігурації. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін змінює рівновагу між Cu^{1+} і Cu^{2+} у клітинах або організмах. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін може змінювати (наприклад, знижувати) вміст міді (наприклад, сумарний вміст міді) у індивідумі. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін може змінювати (наприклад, знижувати) вміст міді (наприклад, сумарний вміст міді) у крові індивідуму. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін може підвищувати внутрішньоклітинний вміст міді (наприклад, сумарний вміст міді або вміст двовалентної міді). У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін може підвищувати концентрацію міді у формі, доступній для ішемізованої тканини у індивідумі. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін може змінювати напрямок внутрішньоклітинної спрямованої міграції і/або транспорту міді між тканинами або між органами. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін специфічно зв'язується з ішемізованою тканиною і/або засвоюється ішемізованою тканиною, такою як ішемізована серцева тканина. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін (у тому числі його комплекс із міддю) здатний проникати через мембрану. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін (у тому числі його комплекс із міддю) розчинний у жирах. У деяких варіантах здійснення стехіометричне відношення хелатуючого мідь тетраміну до міді в його комплексі становить приблизно 1:1. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін оборотно зв'язує іон міді. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін зв'язує іон міді з достатньо низькою спорідненістю усередині клітин в ішемізованій тканині, що дозволяє розвантаження або дисоціацію іона міді.

[208] Будь-який хелатуючий мідь тетрамін, який може підвищувати внутрішньоклітинний вміст міді, може бути використаний в описаних у винаході способах. Хелатуючий мідь тетрамін може належати до самих його сполук, фармацевтично прийнятних солей, активних метаболітів, похідних і проліків, а також до стереоізомера, енантіомерів, рацемічних сумішей і інших подібних сполук, при наявності відповідної можливості. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є лінійним. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є розгалуженим. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є циклічним. У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін вибирають із триетилтетраміну (2,2,2-тетраміну), 2,3,2-тетраміну і 3,3,3-тетраміну.

[209] У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є триєнтином. "Триєнтин" також називають триєтилтетраміном, 2,2,2-тетраміном, N, N'-біс(2-аміноетил)-1,2-етандіаміном, 1,8-діаміно-3,6-діазаоктаном, 3,6-діазаоктан-1,8-діаміном, 1,4,7,10-тетраазадеканом, трисном, ТЕТА, TECZA, N, N'-біс(аміноетил)етилєндіаміном, N, N'-біс(2-аміноетил)етандіаміном і N, N'-біс(2-аміноетил)етилєндіаміном. У деяких варіантах здійснення триєнтин є сполукою формули $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ або її фармацевтично прийнятною сіллю.

[210] Інші здатні до утворення хелату з міддю тетраміни з аналогічними властивостями хелатування міді можуть включати, але цим не обмежуючи, сполуки формули (II) і їх фармацевтично прийнятні солі:



Формула (II).

[211] У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є ациклічною сполукою формули (II), де R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 і R_6 незалежно вибирають із H, CH_3 , C2-C10 лінійного або розгалуженого алкілу, C3-C10-циклоалкілу, C1-C6-алкіл-C3-C10-циклоалкілу, арилу, моно-, ди-, три-, тетра- і пентазаміщеного арилу, гетероарилу, конденсованого арилу, C1-C6-алкіларилу, C1-C6-алкілмоно-, ди-, три-, тетра- і пентазаміщеного арилу, C1-C5-алкілгетероарилу, C1-C6-алкілконденсованого арилу, CH_2COOH , CH_2SO_3H , $CH_2PO(OH)_2$, $CH_2P(CH_3)O(OH)$; n_1 , n_2 і n_3 незалежно вибирають із 2 або 3; і R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} і R_{12} незалежно вибирають із H, CH_3 , C2-C10 лінійного або розгалуженого алкілу, C3-C10-циклоалкілу, C1-C6-алкіл-C3-C10-циклоалкілу, арилу, моно-, ди-, три-, тетра- і пентазаміщеного арилу, гетероарилу, конденсованого арилу, C1-C6-алкіларилу, C1-C6-алкілмоно-, ди-, три-, тетра- і пентазаміщеного арилу, C1-C5-алкілгетероарилу, C1-C6-алкілконденсованого арилу. Крім того, один або декілька з R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 або R_6 можуть бути функціоналізовані для приєднання, наприклад, до пептидів, білків, поліетиленгліколів і інших таких хімічних структурних елементів з метою модифікації загальної фармакокінетики, ефективності доставки і/або періоду напіввиведення конструкцій. Приклади такої функціоналізації включають, але цим не обмежуючи, C1-C10-алкіл-CO-пептид, C1-C10-алкіл-CO-білок, C1-C10-алкіл-CO-PEG, C1-C10-алкіл-NH-пептид, C1-C10-алкіл-NH-білок, C1-C10-алкіл-NH-CO-PEG, C1-C10-алкіл-S-пептид, C1-C10-алкіл-S-білок. Крім того, один або декілька з R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} або R_{12} можуть бути функціоналізовані для приєднання, наприклад, до пептидів, білків, поліетиленгліколів і інших таких хімічних структурних елементів з метою модифікації загальної фармакокінетики, ефективності доставки і/або періоду напіввиведення конструкцій. Приклади такої функціоналізації включають, але цим не обмежуючи, C1-C10-алкіл-CO-пептид, C1-C10-алкіл-CO-білок, C1-C10-алкіл-CO-PEG, C1-C10-алкіл-NH-пептид, C1-C10-алкіл-NH-білок, C1-C10-алкіл-NH-CO-PEG, C1-C10-алкіл-S-пептид і C1-C10-алкіл-S-білок.

[212] У деяких варіантах здійснення хелатуючий мідь тетрамін є циклічною сполукою формули (II), де R_1 і R_6 з'єднані один з одним з утворенням місточної групи $(CR_{13}R_{14})_{n4}$, і де R_2 , R_3 , R_4 і R_5 незалежно вибирають із H, CH_3 , C2-C10 лінійного або розгалуженого алкілу, C3-C10-циклоалкілу, C1-C6-алкіл-C3-C10-циклоалкілу, арилу, моно-, ди-, три-, тетра- і пентазаміщеного арилу, гетероарилу, конденсованого арилу, C1-C6-алкіларилу, C1-C6-алкілмоно-, ди-, три-, тетра- і пентазаміщеного арилу, C1-C5-алкілгетероарилу, C1-C6-алкілконденсованого арилу, CH_2COOH , CH_2SO_3H , $CH_2PO(OH)_2$, $CH_2P(CH_3)O(OH)$; n_1 , n_2 і n_3 незалежно вибирають із 2 або 3; і R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} і R_{14} незалежно вибирають із H, CH_3 , C2-C10 лінійного або розгалуженого алкілу, C3-C10-циклоалкілу, C1-C6-алкіл-C3-C10-циклоалкілу, арилу, моно-, ди-, три-, тетра- і пентазаміщеного арилу, гетероарилу, конденсованого арилу, C1-C6-алкіларилу, C1-C6-алкілмоно-, ди-, три-, тетра- і пентазаміщеного арилу, C1-C5-алкілгетероарилу, C1-C6-алкілконденсованого арилу. Крім того, один або декілька з R_2 , R_3 , R_4 або R_5 можуть бути функціоналізовані для приєднання, наприклад, до пептидів, білків, поліетиленгліколів і інших таких хімічних структурних елементів з метою модифікації загальної фармакокінетики, ефективності доставки і/або періоду напіввиведення конструкцій. Приклади такої функціоналізації включають, але цим не обмежуючи, C1-C10-алкіл-CO-пептид, C1-C10-алкіл-CO-білок, C1-C10-алкіл-CO-PEG, C1-C10-алкіл-NH-пептид, C1-C10-алкіл-NH-білок, C1-C10-алкіл-NH-CO-PEG, C1-C10-алкіл-S-пептид, C1-C10-алкіл-S-білок. Крім того, один або декілька з R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} і R_{14} можуть бути функціоналізовані для приєднання, наприклад, до пептидів, білків, поліетиленгліколів і інших таких хімічних структурних елементів з метою модифікації загальної фармакокінетики, ефективності доставки і/або періоду напіввиведення конструкцій. Приклади такої функціоналізації включають, але цим не обмежуючи, C1-C10-алкіл-CO-пептид, C1-C10-алкіл-CO-білок, C1-C10-алкіл-CO-PEG, C1-C10-алкіл-NH-пептид, C1-C10-алкіл-NH-білок, C1-C10-алкіл-NH-CO-PEG, C1-C10-алкіл-S-пептид і C1-C10-алкіл-S-білок.

[213] "Фармацевтично прийнятні солі" належать до солей, одержаних з фармацевтично прийнятних нетоксичних основ або кислот, у тому числі неорганічних або органічних основ і неорганічних або органічних кислот і інших подібних основ і кислот. Коли, наприклад, сполука має властивості основи, солі можуть бути одержані з фармацевтично прийнятних нетоксичних кислот, у тому числі з неорганічних і органічних кислот. Такі кислоти включають, наприклад, оцтову, бензолсульфонову, бензойну, камфорсульфонову, лимонну, етансульфонову, фумарову, глюконову, глютамінову, бромистоводневу, хлористоводневу, ізетіонову, молочну, малеїнову, яблучну, мигдалеву, метансульфонову, слизову, азотну, памову, пантотенову, фосфорну, бурштинову, сірчану, винну, п-толуолсульфонову кислоту і інші подібні кислоти. У деяких варіантах здійснення фармацевтично прийнятні солі хелатуючого мідь тетраміну вибирають із гідрохлоридної солі (наприклад, триетилентетраміну дигідрохлориду), сукцинатної солі (наприклад, триетилентетраміну дисукцинату), малеатної солі (наприклад, триетилентетраміну тетрамаалеату) і фумаратної солі (наприклад, триетилентетраміну тетрафумарату). Хелатуючий мідь тетрамін, такий як триентин, може бути також у формі четвертинних амонієвих солей, у яких атом азоту несе придатну органічну групу, таку як алкільний, алкільний, алкільний або аралкільний фрагмент. Метаболіти хелатуючого мідь тетраміну можуть включати, але цим не обмежуючи, ацетильовані метаболіти, такі як N-ацетилтриетилентетрамін (наприклад, моноацетилтриетилентетрамін). Похідні хелатуючого мідь тетраміну можуть включати, але цим не обмежуючи, PEG-модифіковані тетраміни (такі як триентин-PEG).

[214] Хелатуючий мідь тетрамін, у тому числі триентин, може бути одержаний, використовуючи будь-який з ряду відомих методів хімічного синтезу, виділення і очищення. Наприклад, див. патентні документи U.S. Pat. № 4806517, U.S. Pat. № 4550209, U.S. Pat. № 5225599, U.S. Pat. № 4766247, European Patent № EP262562, U.S. Patent № 8394992 і U.S. Pat. Publication № US20130108709 A1.

Індивідуум, що має ішемічне ураження тканини

[215] Описане у винаході "ішемічне ураження тканини" належить до ушкодження тканини, що включає, наприклад, кардіоваскулярну тканину, тканину печінки, тканину головного мозку, тканину скелетного м'язу і інші подібні тканини, що приводить до обмеження кровопостачання тканини, яке викликає нестачу кисню і глюкози, необхідних для клітинного метаболізму в тканині. Ушкодження може мати на увазі будь-яке число патологічних станів або травму під впливом зовнішнього фактора, що приводять до порушення кровообігу. У деяких варіантах здійснення ішемічне ураження тканини являє собою серцево-судинну ішемію. У деяких варіантах здійснення ішемічне ураження тканини являє собою ішемію головного мозку або ішемічний інсульт. У деяких варіантах здійснення ішемічне ураження тканини являє собою ішемію кінцівок, таку як ішемія нижніх кінцівок. У деяких варіантах здійснення ішемічне ураження тканини являє собою ішемію кишечника, таку як ішемічний коліт або мезентеральний тромбоз. У деяких варіантах здійснення ішемічне ураження тканини являє собою ішемію шкіри. У деяких варіантах здійснення ішемічне ураження тканини пов'язане з емболією, тромбозом, аневризмою, травмою, інфарктом міокарда, захворюванням мітрального клапана, хронічною фібриляцією передсердь, кардіоміопатією, протезуванням, компресійним синдромом верхньої апертури грудної клітки, атеросклерозом, гіпоглікемією, тахікардією, гіпотонією, стисненням кровоносної судини пухлиною, серпоподібноклітинною анемією, обмороженням, артеріовенозною мальформацією, оклюзійним захворюванням периферичних артерій, розривом важливих кровоносних судин, анемією, діабетом, виразками діабетичної стопи, некротизуючим ентероколітом, виразковим колітом, хворобою Крона, запальним захворюванням кишечника, рестенозом (після ангіопластики або установки стента) або панкреатитом. У деяких варіантах здійснення ішемічне ураження тканини пов'язане з кардіоміопатією. У деяких варіантах здійснення ішемічне ураження тканини пов'язане з інфарктом міокарда. У деяких варіантах здійснення ішемічне ураження тканини пов'язане з діабетом.

[216] Описані у винаході способи, тому, звичайно застосовують при багатьох захворюваннях, при яких відбувається ішемічна ураження тканини. Ці захворювання включають, але цим не обмежуючи, інфаркт міокарда, кардіоміопатію, аневризму, стенокардію, аортальний стеноз, аортит, аритмії, артеріосклероз, артеріїт, асиметричну гіпертрофію перегородки (ASH), атеросклероз, фібриляцію і тріпотіння передсердь, бактеріальний ендокардит, синдром Барлоу (пролапс мітрального клапана), брадикардію, хворобу Бюргера (облітеруючий тромбоангіїт), кардіомегалію, кардит, захворювання сонної артерії, коарктацію аорти, уроджені пороки серця, застійну серцеву недостатність, захворювання коронарної артерії, синдром Ейзенменгера, емболію, ендокардит, еритромелалгію, фібриляцію, фіброзном'язову дисплазію, блокаду серця,

шум у серці, гіпертонію, гіпотонію, ідіопатичне звуження артерії у дітей, синдром Кавасаки (синдром шкірно-слизових лімфовузлів, захворювання шкірно-слизових лімфовузлів, дитячий поліартеріїт), метаболічний синдром, мікроvasкулярну стенокардію, міокардит, пароксизмальну передсердну тахікардію (PAT), вузликосий періартеріїт (поліартеріїт, нодозний поліартеріїт), перикардит, захворювання периферичних кровоносних судин, критичну ішемію кінцівок, флебіт, стеноз легеневого стовбура (легеневий стеноз), хворобу Рейно, стеноз ниркової артерії, реноvasкулярну гіпертонію, ревматичне ураження серця, діабетичну васкулопатію, дефекти перегородки, "німу" ішемію, синдром Х, тахікардію, артеріїт Такаюсу, тетралогію Фалло, транспозицію магістральних судин, атрезію тристулкового клапана, загального артеріального стовбура, порок клапана серця, варикозні виразки, варикозне розширення вен, васкуліт, дефект міжшлункової перегородки, синдром Вольфа-Паркінсона-Уайта, дефект формування перегородки атріовентрикулярного каналу, гостру ревматичну пропасницю, гострий ревматичний перикардит, гострий ревматичний ендокардит, гострий ревматичний міокардит, хронічні ревматичні захворювання серця, захворювання мітрального клапана, мітральний стеноз, ревматичну мітральну недостатність, захворювання аортального клапана, захворювання інших ендокардіальних структур, ішемічну хворобу серця (гостру і підгостру), стенокардію, гостру легенево-серцеву недостатність, емболію легенів, хронічну легенево-серцеву недостатність, кіфосколиотичне захворювання серця, міокардит, ендокардит, ендоміокардіальний фіброз, субендокардіальний фіброеластоз, атріовентрикулярну блокаду, серцеву аритмію, міокардіальну дегенерацію, цереброваскулярне захворювання, захворювання артерій, артеріол і капілярів або захворювання вен і лімфатичних судин; набуте ушкодження головного мозку, травматичне ушкодження головного мозку, інсульт (у тому числі ішемічний, внутрішньочеребральний геморагічний, субарахноїдальний геморагічний), ушкодження від гіпоксії, метаболічні порушення, енцефаліт і ушкодження головного мозку в результаті інфекції. У конкретних варіантах здійснення захворювання, які викликають ішемічне ураження тканини, включають системний саркоїдоз, захворювання або стан шкіри, синдром Лефгрена, захворювання або стан легенів, захворювання або стан серця, захворювання або стан очей, захворювання або стан печінки, захворювання або стан скелетних м'язів і захворювання або стан нирок. Даний винахід, таким чином, також включає лікування будь-якого із захворювань, використовуючи описані у винаході способи.

[217] Описаний у винаході "індивідуум", "суб'єкт" або "пацієнт" належить до ссавця, такого як миші, щури, кролики, кішки, собаки, свині, корови, бики, вівці, кози, коні, мавпи і інші нижчі примати, і люди, до хребетного, такого як риба, і до птиці, такої як курча. Ссавці можуть включати сільськогосподарських тварин, тварин для спортивних змагань, гризунів і домашніх тварин. У деяких варіантах здійснення індивідуумом є людина.

[218] Описані у винаході способи можуть застосовуватися відносно індивідуума, що має одне або більше ушкоджень ішемізованої тканини, включаючи, але цим не обмежуючи, ішемічне ушкодження міокарда, ішемічне ушкодження головного мозку, ішемічне ушкодження спинного мозку, ішемічне ушкодження м'яза, ішемічне ушкодження скелета, гострий каналцевий некроз, ішемічне ушкодження кишечника, ішемічне ушкодження легенів, ішемічне ушкодження печінки, ішемічне ушкодження нирок, ішемічне ушкодження шкіри, грижу, судинні анастомози, атеросклеротичну бляшку, гемангіому і після травматичного ушкодження, нанесеного тупим предметом, або проникаючого травматичного ушкодження.

[219] У деяких варіантах здійснення відповідно до будь-якого з описаних у винаході способів, індивідуум не має порушеної системи відновлення тканин. У деяких варіантах здійснення індивідуум має порушену систему відновлення тканин. Індивідууми з порушеною системою відновлення тканин можуть мати одну або більше із наступних характеристик: (a) похилий вік (наприклад, щонайменше близько 60 років, у тому числі, наприклад, щонайменше близько 65, 70, 75, 80, 85, 90 або більше років); (b) хронічне ураження тканини (наприклад, індивідуум, який має ураження тканини протягом щонайменше вже 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 або 24 місяців); (c) дефіцит стовбурових клітин; (d) відсутність міграції (тобто хоумінгу) стовбурових клітин; (e) порушена система відновлення тканини; і (f) один або більше із наступних симптомів або станів: втрата пам'яті, низька або знижена рухова здатність (у тому числі, але цим не обмежуючи, низька або знижена здатність прикладати фізичні зусилля, низька або знижена швидкісна витривалість, гнучкість і рухливість суглобів), гіпестезія, м'язова слабкість, втрата слуху і хронічне розтягання сухожилля.

[220] У деяких варіантах здійснення вік індивідуума становить щонайменше близько 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 або більше років. У деяких варіантах здійснення індивідуум має вік молодше приблизно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 років. У деяких варіантах здійснення індивідуум має хронічну ішемію. У деяких варіантах здійснення індивідуум має відтік міді з ішемізованої тканини (такої як

ішемізований міокард) у кровотік. У деяких варіантах здійснення індивідуум має зниження вмісту (менше ніж приблизно на 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 %) міді в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення знижений вміст міді в ішемізованій тканині обумовлений хронічними ішемічними станами. У деяких варіантах здійснення індивідуум має репресовану транскрипційну активність HIF-1.

[221] У деяких варіантах здійснення індивідуума вибирають для лікування на основі його або її показників по вмісту міді, таких як внутрішньоклітинний вміст міді, позаклітинний вміст міді, сумарний вміст міді і вміст міді в сироватці (тобто в крові). Індивідууми із хронічними ішемічними станами звичайно мають низький внутрішньоклітинний вміст міді в ішемізованій тканині, наприклад приблизно менше на 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % або менше, ніж середній внутрішньоклітинний вміст міді у відповідній тканині здорових індивідуумів. Вміст міді в сироватці, наприклад сумарний вміст міді в сироватці, вміст міді, зв'язаної з білком (наприклад, із церулоплазміном), у сироватці або вільної (тобто незв'язаної) міді в сироватці для індивідуумів із хронічними ішемічними станами є звичайно вище (наприклад, приблизно в 1,2 разу, 1,5 разу, 1,75 разу, 2 рази, 3 рази, 4 рази, 5 разів або більше), ніж середній вміст міді в сироватці здорових індивідуумів. У деяких варіантах здійснення до введення композиції тетраміну індивідуум має сумарний вміст міді в сироватці щонайменше приблизно 60 мкг/дл, 70 мкг/дл, 80 мкг/дл, 90 мкг/дл, 100 мкг/дл, 110 мкг/дл, 120 мкг/дл, 130 мкг/дл, 140 мкг/дл, 150 мкг/дл, 175 мкг/дл, 200 мкг/дл, 250 мкг/дл, 300 мкг/дл або більше. У деяких варіантах здійснення до введення композиції тетраміну індивідуум має сумарний вміст міді в сироватці не більше ніж приблизно в 1 раз, 1,2 разу, 1,5 разу, 1,75 разу або 2 рази в порівнянні із середнім сумарним вмістом міді в сироватці здорових індивідуумів. У деяких варіантах здійснення до введення композиції тетраміну індивідуум має сумарний вміст міді в сироватці не більше ніж приблизно 60 мкг/дл, 70 мкг/дл, 80 мкг/дл, 90 мкг/дл, 100 мкг/дл, 110 мкг/дл, 120 мкг/дл, 130 мкг/дл, 140 мкг/дл, 150 мкг/дл, 175 мкг/дл, 200 мкг/дл, 250 мкг/дл, 300 мкг/дл. У деяких варіантах здійснення після введення композиції тетраміну індивідуум має щонайменше 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або більше від середнього сумарного вмісту міді в сироватці здорових індивідуумів. У деяких варіантах здійснення після введення композиції тетраміну індивідуум має щонайменше сумарний вміст міді в сироватці приблизно 60 мкг/дл, 70 мкг/дл, 80 мкг/дл, 90 мкг/дл, 100 мкг/дл, 110 мкг/дл, 120 мкг/дл, 130 мкг/дл, 140 мкг/дл або 150 мкг/дл.

[222] У деяких варіантах здійснення індивідуума вибирають для лікування на основі його або її показників за рівнем активності HIF-1. У деяких варіантах здійснення індивідуум має репресовану транскрипційну активність HIF-1 генів-мішеней в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення індивідуум має високий рівень (наприклад, рівень білка або РНК) HIF-1 α в ішемізованій тканині, але репресовану транскрипційну активність HIF-1 генів-мішеней в ішемізованій тканині. У деяких варіантах здійснення індивідуум має хронічну ішемію, яка приводить до репресованої активності HIF-1.

Набори і готові вироби

[223] У даному винаході також пропонуються набори, лікарські препарати, композиції і лікарські форми з разовою дозою для застосування в будь-якому з описаних у винаході способів.

[224] Пропоновані у винаході набори включають один або більше контейнерів, які включають будь-яку одну з описаних у винаході композицій тетраміну (включаючи фармацевтичні композиції) і/або інший засіб (засоби), і, у деяких варіантах здійснення додатково включають інструкції із застосування відповідно до будь-якого з описаних у винаході способів. Набір може додатково включати опис методики вибору індивідуума, придатного для лікування. Інструкції, якими забезпечені набори згідно з винаходом, звичайно являють собою письмові інструкції на етикетці або на листку-вкладиші (наприклад, на аркуші паперу, вкладеному в набір), але також припустиме використання інструкцій, які можна прочитати за допомогою комп'ютера (наприклад, інструкції на магнітному або оптичному носії для зберігання інформації).

[225] Наприклад, у деяких варіантах здійснення набір включає а) композицію тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин) або його фармацевтично прийнятну сіль і фармацевтично прийнятний носій; і, необов'язково, б) інструкції із введення композиції тетраміну для лікування захворювання або стану, пов'язаного з ішемічним ураженням тканини.

[226] У деяких варіантах здійснення набір включає а) композицію тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін (такий як триентин) або його фармацевтично прийнятну сіль і фармацевтично прийнятний носій; б) мідепрототуючу композицію, яка включає іон міді (наприклад, CuSO_4 або CuCl_2) і фармацевтично прийнятний носій; і, необов'язково, с) інструкції

із введення композиції тетраміну і мідепромотуючої композиції для лікування захворювання або стану, пов'язаного з ішемічним ураженням тканини.

[227] Набори за винаходом знаходяться у придатних упаковках. Придатні упаковки включають, але цим не обмежуючи, флакони, пляшечки, посудини, еластичну упаковку (наприклад, герметизовані пакети з поліетилентерефталату або пластику) і інші подібні упаковки. У набори можуть необов'язково бути вкладені і інші компоненти, такі як буфери і пояснювальна інформація. Відповідно, у даному винаході також пропонуються готові вироби, які включають флакони (наприклад, герметизовані флакони), пляшечки, посудини, еластичну упаковку і інші подібні вироби.

[228] У деяких варіантах здійснення набори включають один або більше компонентів, які полегшують доставку композиції тетраміну, мідепромотуючої композиції і/або додаткових терапевтичних засобів індивідууму. Наприклад, у деяких варіантах здійснення набір включає компоненти, які полегшують доставку композиції тетраміну і/або мідепромотуючої композиції усередину ураженої тканини індивідуума. У деяких варіантах здійснення набір включає, наприклад, шприци і голки, придатні для доставки клітин індивідууму, і інші подібні вироби. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну і/або мідепромотуюча композиція можуть міститися в наборі в контейнері або в одному або більше флаконах. У деяких варіантах здійснення набір включає компоненти, які полегшують внутрішньовенну або внутрішньоартеріальну доставку композиції тетраміну і/або мідепромотуючої композиції індивідууму. У деяких варіантах здійснення композиція тетраміну і/або мідепромотуюча композиція можуть міститися, наприклад, у пляшці або контейнері (наприклад, контейнері для крові або аналогічному контейнері, здатному вміщати приблизно до 1,5 л розчину, що включає клітини), і набір додатково включає систему для інфузії і голки, придатні для доставки композиції тетраміну і/або мідепромотуючої композиції індивідууму.

[229] Інструкції стосовно застосування композицій звичайно включають інформацію відносно дози, режиму дозування і способу введення для передбачуваного лікування. Контейнери можуть являти собою разові дози, багатодозові упаковки (наприклад, багатодозові фасування) або кратні дози від разової дози. Наприклад, можуть пропонуватися набори, які містять достатні дози розкритого у винаході хелатуючого мідь тетраміну для забезпечення ефективного лікування індивідуума протягом тривалого періоду часу, наприклад протягом тижня, 8 днів, 9 днів, 10 днів, 11 днів, 12 днів, 13 днів, 2 тижнів, 3 тижнів, 4 тижнів, 6 тижнів, 8 тижнів, 3 місяців, 4 місяців, 5 місяців, 7 місяців, 8 місяців, 9 місяців або більше. Набори можуть також включати множину разових доз фармацевтичних композицій і інструкції для використання і упаковки з кількостями, достатніми для зберігання і застосування в аптеках, наприклад лікарняних аптеках і рецептурних аптеках.

[230] Крім того, пропонуються лікарські препарати, композиції і лікарські форми з разовою дозою, які можуть застосовуватися в описаних у винаході способах.

[231] Представлені далі необмежувальні приклади додатково ілюструють композиції і способи за даним винаходом. Для фахівців у цій галузі є очевидним, що в рамках обсягу і суті цього винаходу можливе існування і інших варіантів здійснення. Далі винахід буде описаний більш докладно за допомогою наступних необмежувальних прикладів. Наступні приклади додатково ілюструють винахід, але, зрозуміло, їх ніяким чином не слід розглядати як обмеження для обсягу винаходу.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Кристалічна структура комплексу триентину з іоном міді

[232] Кристалізували комплекс, який включає дихлорид триентину, іон міді і воду. Вибирали придатний монокристал (150116_s2_lzh_m) і реєстрували рентгенограми монокристала на дифрактометрі Xcalibur Eos. У процесі зняття рентгенограм підтримували температуру кристала при 143,00-143,10 K. Використовуючи програмне забезпечення Olex2 (Dolomanov et al. (2009), J. Appl. Cryst. 42:339-341), була розв'язана структура за допомогою програми розв'язання кристалічних структур Superflip (Palatinus et al. (2008), J. Appl. Cryst. 41:975-984; Palatinus et al. (2012), J. Appl. Cryst. 45:575-580) з використанням алгоритму Charge Flipping і уточнена за допомогою програмного пакета для уточнення кристалічних структур ShelXL (Sheldrick G.M. (2008), Acta Cryst. A64:112-122), використовуючи алгоритм мінімізації методом найменших квадратів. Емпірична формула комплексу в кожній елементарній комірці була визначена як $C_6H_{20}Cl_2CuN_4O$. Уточнена кристалічна структура і її параметри наведені на фігурах 1-3 і 4A-4C.

Приклад 2. Внутрішньоклітинна доставка міді в кардіоміоцити за допомогою триентину і комплексу триентин-мідь

[233] У цьому прикладі описується дослідження доставки міді *in vitro* у кардіоміоцити за допомогою триентину і комплексу триентин-мідь. Блок-схема проведення експерименту показана на фігурі 5.

[234] Первинні культури кардіоміоцитів новонароджених щурів культивували в безсироватковому модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM), доповненому 10 % фетальною бичачою сироваткою (FBS), при 37 °C, 10 % CO₂, протягом 48 годин. Потім клітини переносили в безсироваткове DMEM і культивували при 37 °C, 10 % CO₂, протягом 12 годин, потім клітини розділяли на п'ять експериментальних груп (одну контрольну групу і чотири лікувальні групи). У контрольній групі клітини культивували в безсироватковому DMEM протягом ще 6 годин при 37 °C, 10 % CO₂. У чотирьох лікувальних групах клітини інкубували протягом 6 годин при 37 °C, 10 % CO₂, тільки з CuCl₂, тільки із триентином, з комплексом триентин-мідь і сумішшю триентину і CuCl₂, відповідно, при кінцевій концентрації 10 мкМ триентину і/або 10 мкМ міді. Комплекс триентин-мідь синтезували самостійно і досліджували методом мас-спектрометрії і методом рентгеноструктурного аналізу (XRD). Комплекс триентин-мідь мав композицію і структуру, описані в прикладі 1. Суміш триентину і міді одержували шляхом додавання рівних кількостей молів триентину і CuCl₂ у безсироваткове DMEM при кінцевій концентрації 10 мкМ при 37 °C протягом 24 годин до того, як суміш використовували для обробки кардіоміоцитів новонароджених щурів.

[235] Після обробки, клітини збирали за допомогою шкребка, три рази промивали льодяним PBS, що містить 10 мМ ЕДТО (Sigma, США), для того, щоб бути впевненими в тому, що вся позаклітинна мідь була повністю видалена, і центрифугували при 3000 об./хв. протягом 5 хвилин. Осади клітин лізували з використанням 1 % розчину SDS (Beyotime, CN). Лізати розділяли на дві частини. Одну частину обробляли концентрованою азотною кислотою при 50 °C протягом 72 годин і аналізували методом атомної абсорбції з атомізацією в графітовій печі для визначення концентрації внутрішньоклітинної міді. Іншу частину використовували для визначення загальної концентрації білка методом аналізу білка з біцинхоніною кислотою (Bio-Rad, USA). Концентрацію внутрішньоклітинної міді в кожній лікувальній групі нормалізували до загальної концентрації білка.

[236] На фігурі 6 наведені нормалізовані внутрішньоклітинні концентрації міді в п'яти експериментальних групах. Усі дані представлені як середнє значення \pm стандартне відхилення (SD). Для початкового аналізу використовували однофакторний дисперсійний аналіз, а для порівняння між декількома групами використовували тест Ст'юдента-Ньюмана-Кейлса. Відмінності між експериментальними групами вважалися значущими при $P < 0,05$. Як показано на фігурі 6, концентрація внутрішньоклітинної міді в групі, що піддавалася лікуванню комплексом триентин-мідь (тобто Cu-триентин), і в групі, що піддавалася лікуванню сумішшю триентину і CuCl₂ (тобто Cu+триентин), значно зростала в порівнянні з контрольною групою, і збільшення внутрішньоклітинних концентрацій міді в цих двох групах були більш явно вираженими, ніж у випадку застосування тільки CuCl₂. Примітно, що суміш триентину і CuCl₂ (тобто Cu+триентин) приводила до найбільшого збільшення внутрішньоклітинної концентрації міді при всіх досліджених умовах, що вказує на те, що триентин може транспортувати мідь із середовища з високим вмістом міді, що оточує клітини, у кардіоміоцити.

Приклад 3. Терапія за допомогою триентину в експериментальній моделі патологічної гіпертрофії серця на щурах

[237] У цьому прикладі описаний експеримент *in vivo* для оцінки ефективності терапії за допомогою триентину патологічної гіпертрофії серця у щурів лінії Sprague-Dawley. Для моделювання патологічної гіпертрофії серця у щурів проводили операцію по звуженню аорти. На фігурі 7 показана блок-схема проведення експерименту.

1.1. Формування патологічної серцевої гіпертрофії у щурів

[238] Перед хірургічним втручанням, усім випробуваним щурам ін'єктували інтраперитонеально 10 % хлоральгідрат (0,35 мг/кг), щоб викликати седативний ефект. Шерсть, що покриває ліву частину грудної клітки, ретельно виголювали перед операцією. Для вентиляції проводили ендотрахеальну інтубацію. Для досягнення дихального об'єму від 1,2 мл до 1,5 мл здійснювали допоміжну штучну вентиляцію легенів. Частота дихання становила приблизно 80/хв., і відношення вдиху і видиху становило 1:1.

[239] Під час операції щура укладали в положення лежачи на правому боці, і щура поміщали під стереомікроскоп. Зону операції ізолювали асептичним способом. Ізоляцію здійснювали за допомогою одного шматка одноразової стерильної серветки.

[240] Операційне поле злегка надрізали по середині до лінії лівого другого міжреберного простору, і робили поперечний розріз 1-1,5 см у напрямку від лівої сторони передньої частини груднини. Підшкірну тканину і м'язові площини розтинали до плеври, входячи в плевральний

простір. Вставляли ватяну паличку, щоб прочистити плевральний простір і відсунути легеню від операційного поля для запобігання травмі легенів, і потім міжреберний розріз розширювали за допомогою ретрактора для того, щоб розкрити грудну клітку і оголити тимус і жирову клітковину.

[241] Після того, як тимус і жирову клітковину відокремлювали, оголювали великі судини у верхній частині вушка лівого передсердя. Висхідну частину аорти вирізали з артеріальної вени праворуч. Місце звуження розташовували на висхідній аорті між аортальним клапаном і брахіоцефальною артерією.

[242] Висхідну аорту піддавали констрикції за допомогою голки 20 розміру (із зовнішнім діаметром 0,9 мм). Висхідну аорту і голку перев'язували одним шматком хірургічної нитки 6-0. Голку потім швидко видаляли для того, щоб утворювався просвіт у стенозованій аорті.

[243] Перед закриттям грудної клітки видаляли ретрактор грудної клітки, і тимус і жирову клітковину повертали в їх нормальне положення. Порожнину грудної клітки закривали шляхом зближення другого і третього ребер за допомогою двох швів нейлонових ниток розміру 3-0. Для запобігання виникненню сильної кровотечі і пневмотораксу, вживали заходи для виключення ймовірності проколу дилатованого серця і ушкодження легені під час стягування ребер. Легені повторно роздували шляхом відключення подачі повітря в апарат штучної вентиляції легенів протягом 1-2 секунд, використовуючи палець руки при закритті міжреберного розрізу, для того, щоб повітря могло бути видалене із плевральної порожнини. Після закриття міжреберного розрізу, розрізи м'язів і шкіри закривали пошарово за допомогою швів шовкової нитки розміру 5-0 і очищали стерильним способом. Ендотрахеальну трубку забирали після відновлення самостійного дихання. Для полегшення болю після хірургічної операції вводили внутрішньом'язово знеболюючий засіб дезоцин (0,8 мг/кг) і потім один раз на добу протягом наступних 2 днів.

1.2. Ехокардіографія

[244] Для ехокардіографічних вимірювань, щурів заспокоювали шляхом інтраперитонеальної ін'єкції седативного засобу 10 % хлоралгідрату (0,35 мг/кг). Через 4 місяці після операції по звуженню аорти і через 1, 3 і 5 тижнів після проведення лікування триентином знімали серію ехокардіограм з використанням перетворювача 11,5 МГц (Vivid 7 Dimension, GE). Визначали товщину міжшлуночкової перегородки (IVSD) і товщину задньої стінки лівого шлуночка (LVPWD), використовуючи двовимірний режим, шляхом вимірювання коротких осей площ поперечних перерізів і довжини лівого шлуночка.

[245] Фракцію викиду (EF) і фракцію укорочення (FS) лівого шлуночка оцінювали одноплощинним методом Сімпсона. Безпосередньо реєстрували кінцево-діастолічний об'єм лівого шлуночка (LVEDV), кінцево-сistolічний об'єм лівого шлуночка (LVESV), кінцево-діастолічний внутрішній діаметр (LVID_d) і кінцево-сistolічний внутрішній діаметр (LVID_s). EF і FS розраховували за наступними формулами: $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100 \%$, $FS = (LVID_d - LVID_s) / LVID_d \times 100 \%$.

1.3. Лікування триентином

[246] Через чотири місяці після операції, виявляли концентричну гіпертрофію лівого шлуночка і інтерстиціальний фіброз міокарда. Формування моделі патологічної гіпертрофії серця підтверджували ультразвуковими оцінками морфології і функцій серця. Лікування триентином починали після підтвердження стану патологічної гіпертрофії серця. Групу з констрикцією висхідної аорти (AAC) підрозділяли на три групи: контрольну групу (групу NS) і дві групи лікування триентином (групу Tr(H) і групу Tr(L)). Щурів в імітаційній групі піддавали такому ж хірургічному втручанню за винятком стадій констрикції висхідної аорти. Щурів в імітаційній групі також підрозділяли на три групи: контрольну групу (групу NS) і дві групи лікування триентином (групу Tr(H) і групу Tr(L)). Щурів у контрольних групах обробляли фізіологічним розчином. У групах лікування триентином, триентин вводили перорально два рази на добу. Вводили дві дози триентину (дозу в розрахунок на дигідрохлорид триентину), 45 мг/кг/добу (група Tr(H)) і 90 мг/кг/добу (група Tr(L)). Лікування продовжували протягом 6 тижнів.

[247] Методика експерименту і результати, представлені в наступних розділах даного прикладу, стосуються лікування композицією триентину, яка складається в основному з гідрохлориду триентину. Той же протокол експерименту використовується для оцінки терапевтичної ефективності інших композицій триентину для лікування гіпертрофії серця в експериментальній моделі на щурах. Наприклад, в одному експерименті, на доповнення до лікування триентином, у групах лікування триентином щурів з констрикцією висхідної аорти (AAC) також перорально вводили добавку міді (таку як хлорид міді) у дозі 54 мг/кг/добу протягом 6 тижнів. В іншому експерименті, комплекс триентин-мідь прикладу 1 використовують для лікування щурів з констрикцією висхідної аорти (AAC) у групі лікування триентином при дозі 120 мг/кг/добу при пероральному введенні протягом 6 тижнів.

1.4. Оцінки морфології і функції серця

[248] Морфологію і функцію серця оцінювали за допомогою ехокардіографії і вимірювали концентрації міді в плазмі (тобто виявлення в крові) для оцінки терапевтичної ефективності лікування триєнтином відповідно до блок-схеми, показаної на фігурі 7.

[249] Крім того, одержують зрізи серцевої тканини щурів після їх умертвіння наприкінці експериментів. На зрізах тканини проводять імуногістохімічні експерименти. Вимірюють щільність капілярної сітки на зрізах серцевої тканини і визначають зміни вмісту колагену. Вимірюють рівні мРНК і білка HIF-1 α і його мішеней, таких як VEGF і VEGFR-1, в ураженій інфарктом тканині, у пограничній зоні ураженої інфарктом тканини і у серцевій тканині, віддаленій від ураженої інфарктом області.

1.5. Концентрація міді в серцевій тканині

[250] Зразки тканин швидко заморожували і зберігали при -80 °C перед ліофілізацією. Після ліофілізації і обробки тканин азотною кислотою, зразок був безбарвним або ясно-жовтим і прозорим без видимого осаду або залишку. У кожен ємність додавали воду вищого ступеня очищення для розведення HNO₃ до концентрації 2 % для наступного аналізу концентрацій міді. Концентрації міді визначали спектрометричним методом атомної абсорбції із застосуванням графітової печі (ICE3500, Thermo) відповідно до програми, наведеної в таблиці 1 нижче.

Таблиця 1

Програма спектрометричної атомної абсорбції із застосуванням графітової печі

Температура (°C)	Час (сек.)	Витрата аргону (л/хв.)
90	20	0,2
120	20	0,2
850	20	0,2
2100	3	0
2500	3	0,2

1.6. Статистичний аналіз

[251] Усі дані виражали у вигляді середніх величин \pm SD. Варіацію кожного параметра порівнювали між різними експериментальними групами, використовуючи критерій Левена для оцінки однорідності дисперсії і коефіцієнт варіацій (CV). Використовували пакет програм для статистичного аналізу SPSS 14,0 (SPSS, Chicago, IL), і значущою відмінністю вважали відмінність, для якої значення P становили <0,05.

2. Результати

2.1. Морфологія і функція серця

[252] Ехокардіографічні дослідження показали, що після лікування триєнтином зворотний розвиток патологічної гіпертрофії серця відбувався на морфологічному рівні. Після 3 тижнів лікування значно зменшувалися товщина міжшлуночкової перегородки (IVSD) і товщина задньої стінки лівого шлуночка (LVPWD). Зі збільшенням тривалості лікування, ефект лікування триєнтином ставав ще більш очевидним. Коли щурів з констрикцією висхідної аорти (AAC) піддавали лікуванню протягом 5 тижнів, величини IVSD і LVPWD були майже нормальними в порівнянні з величинами, які досягалися в імітаційних групах. Як показано на фігурі 8A і фігурі 8B, відповідно до результатів сталих контролю, в групах, що піддаються лікуванню, спостерігалася тенденція до значного зниження величин IVSD і LVPWD з часом. Навпаки, у контрольній групі величини IVSD і LVPWD стабільно зростали з часом.

[253] Незважаючи на те, що параметри функції серця, фракція викиду (EF) і фракція укорочення (FS) знаходилися в межах норми для всіх експериментальних груп внаслідок компенсаторних ефектів, проте на фігурах 9A і 9B показано, що у випадку підданих лікуванню триєнтином груп величини EF і FS коливалися не дуже значно. На відміну від цього, у випадку не підданих лікуванню груп спостерігалася виражена тенденція до зниження величин EF і FS.

[254] Концентрації міді в плазмі і міокарді щурів у підданих різному лікуванню групах визначали методом атомно-абсорбційної спектрометрії. Як показано на фігурі 10A, концентрація міді знижувалася в гіпертрофованому міокарді щурів, підданих операціям по констрикції висхідної аорти (AAC). Після лікування триєнтином протягом 6 тижнів збільшувалися концентрації міді в тканинах серця підданих лікуванню щурів. Стовець діаграми на фігурі 10A, відповідний групі AAC-Tr, демонструє середню концентрацію міді в серцевій тканині щурів з констрикцією висхідної аорти (AAC), яким вводили як високу дозу триєнтину, так і низьку дозу триєнтину (тобто об'єднані разом групи AAC-Tr(H) і AAC-Tr(L)).

[255] Внаслідок відтоку міді із серцевих тканин щурів з констрикцією висхідної аорти (AAC), концентрації міді в плазмі щурів з констрикцією висхідної аорти (AAC) були вище, ніж у щурів в імітаційній групі. Однак після лікування триентином протягом 6 тижнів, як показали вимірювання в різні моменти часу в ході лікування (тобто кожні два тижні), висока концентрація міді в плазмі щурів з констрикцією висхідної аорти (AAC) з часом значно зменшувалася. На відміну від цього, концентрація міді в плазмі щурів в імітаційній групі залишалася досить стабільною протягом усього курсу лікування (фігура 10B).

3. Обговорення

[256] У даному дослідженні використовували триентин для підвищення концентрації міді в тканинах гіпертрофованого серця щурів. Результати показали, що триентин здатний промотувати перерозподіл і повторне використання міді в тканині і відновлювати морфологію і функції гіпертрофованого серця. У результаті лікування триентином у щурів з гіпертрофією серця може також збільшуватися транскрипційна активність HIF-1 і щільність сітки капілярів в уражених інфарктом серцевих тканинах. Крім того, ехокардіографічні дослідження показали, що протягом усього періоду лікування триентином підтримувалися нормальні функції серця. Результати цього експерименту переконливо свідчать про те, що лікування триентином за даним винаходом може забезпечувати ефективну доставку міді в ішемізовані тканини серця *in vivo* для лікування гіпертрофії серця.

Приклад 4. Дослідження лікування триентином в експериментальній моделі серцевої недостатності після ішемічного інфаркту серця на мавпах макак-резус

[257] У цьому прикладі описується експеримент *in vivo* по оцінці ефективності лікування триентином у моделі серцевої недостатності у мавп макак-резус. Серце у мавпи макак-резус великою мірою нагадує серце людини з точки зору внутрішньої будови, електричної активності, розподілу коронарних артерій, коронарного колатерального кровообігу, а також його розміщення і прикріплення в грудній порожнині. Таким чином, модель серцевої недостатності на мавпах макак-резус є гарною моделлю для оцінки ефективності лікування серцево-судинних захворювань у людей. У цьому експерименті, ішемічний інфаркт міокарда моделювали шляхом хірургічної операції по накладенню лігатури на коронарну артерію. Після операції, ішемічна серцева тканина поступово замінювалася колагеновим волокном і ставала ураженою інфарктом тканиною. Через рік після операції неуражена інфарктом серцева тканина у тварини не могла компенсувати функції, втрачені ураженою інфарктом серцевою тканиною, і в результаті формувалася модель серцевої недостатності. Потім мавпам забезпечували лікування триентином з метою лікування серцевої недостатності.

1.1. Формування серцевої недостатності у мавп макак-резус

[258] Перед хірургічним втручанням, усім пацієнтам внутрішньом'язово ін'єктували 5 мг/кг кетаміну і 0,2 мг/кг мідазоламу для досягнення седативного ефекту. Шерсть, що покриває грудну клітку і кінцівки в місцях кріплення електродів, ретельно виголювали для проведення операції і для поліпшення реєстрації результатів електрокардіографії (ЕКГ). Реєстрували стандартні біполярні і уніполярні відведення електрокардіограми. З дослідження виключали тварин з аномальною ЕКГ, таких як тварини з тахікардією (більше 200 ударів на хвилину), аритмією і очевидними відхиленнями сегмента ST від базової лінії.

[259] Постійно здійснювали контроль шляхом проведення стандартних неінвазивних вимірювань, які включають зняття електрокардіограми, вимірювання артеріального тиску за допомогою манжети, пульсову оксиметрію і капнографію (Dash3000, GE, USA), і у вени пацієнтів установлювали катетери. Усі мавпи, що піддавалися хірургічному втручання, були спочатку інтубовані після анестезії, викликаній внутрішньовенною інфузією фентанілу (10 мкг/кг), мідазоламу (0,2 мг/кг), пропофолу (1 мг/кг) і векуронію (0,1 мг/кг). Допоміжну штучну вентиляцію легенів проводили за допомогою керованої штучної вентиляції легенів з керованим тиском для досягнення наприкінці спокійного видиху CO₂ від 35 мм рт.ст. до 40 мм рт.ст. Тиск при вдиху встановлювали в межах від 12 до 20 см H₂O. Частота дихання становила 40/хв., і відношення вдих/видих становило 1:2.

[260] Для підтримання стану анестезії під час хірургічної операції, розбавляли 2 мл фентанілу (0,1 мг) і 10 мл пропофолу (100 мг) до 20 мл фізіологічним розчином. Суміш безперервно інфузійно вводили шприцевим насосом зі швидкістю 5-10 мл/год. Швидкість насоса коректували залежно від стану анестезії і тривалості операції. Артеріальний катетер вставляли в стегнову артерію з голкою, що постійно знаходиться в ньому, і з'єднували із системою постійного контролю тиску для постійного інвазивного контролю артеріального тиску під час операції. Як правило, пульсацію стегнової артерії реєстрували посередині між верхньою передньою клубовою остю і лобковим зрощенням. Операційну зону асептично ізолювали. Ізоляцію здійснювали за допомогою чотирьох одноразові стерильні простирателі.

[261] Операційне поле злегка розрізали посередині до лінії лівого четвертого міжреберного простору, і робили поперечний розріз 4-5 см назовні з лівої сторони передньої частини груднини. Монополярну діатермію застосовували як для розрізування тканин, так і з метою коагуляції. Підшкірну тканину і м'язові шари розтинали до плеври, входячи в плевральний простір, і потім розріз розширювали, розкриваючи хірургічні щипці. Вставляли паличку з ватяним тампоном для очищення плеврального простору і для того, щоб відсунути легеню від отвору, і потім розширювали міжреберний розріз для відкриття грудної клітки і оголення перикарда.

[262] Оголювали серце за допомогою торакотомічного розрізу (4-5 см) простору лівого четвертого міжребер'я і визначали вершину і ліве вушко серця. Епікардіальний кінець лівої передньої спадної артерії (LAD) приймали за нульовий рівень; початок лівої передньої спадної артерії (LAD) під лівим вушком серця приймали за рівень 100. Лігатуру накладали на 60 % лівої передньої спадної артерії (LAD). Крім того, у деяких мавп також накладали лігатуру на головну діагональну артерію паралельно місцю лігування на лівій передній спадній артерії (LAD), якщо місце розгалуження діагональної артерії знаходилося вище місця накладення лігатури.

[263] Артерію піддавали оклюзії протягом 1 хвилини з наступною реперфузією протягом 5 хвилин, і цей цикл оклюзії-реперфузії повторювали 3 рази перед остаточним накладенням лігатури. Після остаточного лігування, постійно контролювали різницю в русі стінки лівого шлуночка, зміни кольору передньої стінки шлуночка і зміни електрокардіограми і артеріального тиску для того, щоб бути впевненими, що лігування було успішним. Після остаточного лігування, у ліве вушко серця швидко вводили метиленовий синій (1 мл) за допомогою шприца об'ємом 1,0 мл. Дефект наповнення метиленовим синім указував на завершення лігування, а також дозволяв передбачити область ішемії.

[264] Перед закриттям грудної клітки постійно контролювали протягом 45 хвилин стан серця. Для підтримання функцій серця інфузійно вводили добутамін ($3-5 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$) і, у випадку необхідності, застосовували дефібрилятор (HEARTSTART XL, Philips). Вживали заходи для запобігання можливості ушкодження серця під час закриття перикарда. З метою антиадгезійної обробки, у перикардіальну камеру інфузійно вводили гіалуронат натрію. Перикард і плевру закривали шляхом накладення швів за допомогою поліетиленових ниток 4-0. Міжреберний розріз закривали, накладаючи шви шовковою ниткою. Для запобігання виникненню пневмотораксу вживали заходи, що виключають можливість ушкодження легені під час закриття міжреберного простору. Легені повторно роздували, і закривали міжреберний розріз для того, щоб повітря могло бути видалене із плевральної порожнини. Після закриття міжреберного розрізу, у підшкірний простір вводили по краплях фізіологічний розчин, і легеню знову заповнювали повітрям, щоб переконатися, що розріз грудної клітки закритий щільно. Розрізи м'язів і шкіри пошарово закривали за допомогою швів шовкової нитки № 2-0 і стерильно очищали. Після відновлення самостійного дихання, інтубаційну трубку видаляли. Надріз покривали стерильною марлею і пов'язкою. Для полегшення болю вводили внутрішньом'язово трамадол (2 мг/кг). Пов'язку міняли через день, і шви видаляли через тиждень після операції.

1.2. Постійний контроль електрокардіограми (ЕКГ)

[265] ЕКГ з 12 відведеннями (MAC8000, GE, США) кожної мавпи реєстрували в положенні лежачи на спині на момент до операції, відразу після операції (тривалість усієї хірургічної операції приблизно 2 години) і через чотири тижні і вісім тижнів після операції, використовуючи педіатричні електроди, при швидкості руху паперу 25 мм/сек. і амплітуді 10 мм/мВ. Стінка грудної клітки мавпи була недостатньо широка для того, щоб на ній можна було одночасно розташувати 6 грудних відведень навіть із педіатричними електродами. Тому, 6 грудних відведень розділяли на дві групи: V1, V3 і V5 реєстрували в одній групі, а V2, V4 і V6 реєстрували в іншій групі.

1.3. Ехокардіографія

[266] Проводили двовимірні ехокардіографічні вимірювання на стандартних апікальних 2-камерних і 4-камерних зображеннях із трьома послідовними серцевими циклами. Частоту кадрів підтримували від 70 до 100 кадрів на секунду. Усіх мавп піддавали трансторакальній ехокардіографічній оцінці за допомогою перетворювача 10,3 МГц (P10-4, Siemens ACUSON Antares System, German) у лівому бічному положенні в момент часу до операції і через чотири тижні і через вісім тижнів після операції.

[267] Фракцію викиду (EF) лівого шлуночка оцінювали за допомогою одноплощинного методу Сімпсона. Безпосередньо реєстрували кінцево-діастолічний об'єм лівого шлуночка (LVEDV) і кінцево-систолічний об'єм лівого шлуночка (LVESV), і розраховували величину EF наступним чином: $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100 \%$. Систолічний об'єм крові (SV) лівого шлуночка розраховувався наступним чином: $SV = LVEDV - LVESV$.

1.4. Лікування триєнтином

[268] Через один рік після операції, ішемізована тканина серця повністю замінялася колагеновим волокном і перетворювалася на уражену інфарктом тканину. Формування моделі серцевої недостатності підтверджували ультразвуковими оцінками функцій серця. Потім проводили лікування триєнтином. У групі, що піддавалася лікуванню триєнтином, кожній мавпі перорально вводили триєнтин два рази на добу. Доза триєнтину становила 18 мг/кг/добу. Це лікування продовжували протягом восьми тижнів. Мавпи в групі, що не піддавалася лікуванню (тобто в контрольній групі), не піддавалися ніякому лікуванню. Для оцінки терапевтичної ефективності триєнтину, досліджували функції і морфологію серця відповідно до блок-схеми, наведеної на фігурі 11.

[269] Методика експерименту і результати, представлені в наступних розділах даного прикладу, стосуються лікування композицією триєнтину, яка складається в основному з гідрохлориду триєнтину. Той же протокол експерименту використовується для оцінки терапевтичної ефективності інших композицій триєнтину для лікування серцевої недостатності в експериментальній моделі на мавпах макак-резус. Наприклад, в одному експерименті, на доповнення до лікування триєнтином, у групах лікування триєнтином мавпам резус-макак із серцевою недостатністю також перорально вводили добавку міді (таку як хлорид міді) у дозі 16,5 мг/кг на добу протягом 6 тижнів. В іншому експерименті, комплекс триєнтин-мідь прикладу 1 використовують для лікування мавп макак-резус із серцевою недостатністю в групі лікування при дозі 36,7 мг/кг/добу при пероральному введенні протягом 6 тижнів.

1.5. Гістопатологічні дослідження

[270] Мавп умертвляють шляхом внутрішньовенної ін'єкції хлориду калію (10 %, 10 мл), і проводять повний розтин кожної мавпи. Зібрані серця промивають і ретельно перевіряють на видимі ушкодження, і фіксують в 10 % розчині формальдегіду. Потім серце розрізають на шість блоків від вершини до основи уздовж довгої осі. Товщина кожного блока становить 0,5 см. Поверхню кожного зрізу згладжують і уніфікують під час розтинання, і зрізи маркують за допомогою прив'язаної бирки. Тонкі зрізи розрізають і забарвлюють по Массону і гематоксиліном/еозином для мікроскопічних досліджень.

Імуногістохімічне дослідження

[271] Зрізи тканин досліджують імуногістохімічними методами для виявлення HIF-1, VEGFA і VEGFR1. Наступні антитіла використовують у зазначеному порядку: мишаче моноклональне антитіло проти людського HIF-1 α (ab16066, Abcam); мишаче моноклональне антитіло проти людського VEGFA (sc-57496, Santa Cruz); кроляче моноклональне антитіло проти людського VEGFR1 (1303-12, Epitomics); мишаче моноклональне антитіло проти людського CD31 (Maixin bio-tech company, Fuzhou). Демаскування HIF-1 α проводять методом теплового індукуювання демаскування антигену при високому тиску з використанням EDTO (pH 9,0), демаскування VEGF і VEGFR1 проводять методами мікрохвильового теплового індукуювання демаскування антигену з використанням цитраного буферного розчину (pH 6,0), і демаскування CD31 проводять методом мікрохвильового теплового індукуювання демаскування антигену з використанням EDTO. Робочі концентрації антитіл є наступними: 1:800 для анти-HIF-1 α , 1:100 для анти-VEGF і 1:100 для анти-VEGFR1. При імуногістохімічних дослідженнях, зразки негативного контролю інкубують з PBS замість першого антитіла. CD31 є маркером ендотеліальних клітин. Мітку Ki-67 досліджують методом імуофлуоресценції з використанням конфокальної мікроскопії.

Щільність капілярної сітки

[272] Щільності капілярної сітки зрізів тканини оцінюють наступним чином. Спочатку, під оптичним мікроскопом з 100-кратним збільшенням визначають поле зору з максимальним розподілом капілярів, і потім відбирають 5 рандомізованих полів зору під оптичним мікроскопом з 200-кратним збільшенням для визначення щільності капілярної сітки. Капіляр визначається як просвіт з діаметром, меншим ніж сума 8 діаметрів еритроцитів. Вимірювання виконується двома незалежними фахівцями.

Напівкількісний аналіз експресії білка

[273] Імуногістохімічні препарати досліджують під оптичним мікроскопом, і зображення реєструються і використовуються для визначення рівнів експресії білка напівкількісним методом з використанням програмного забезпечення для аналізу зображень Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics). Препарати різних груп оцінюються двома незалежними фахівцями. Зображення з 5 рандомізованих полів зору пограничної області інфаркту і віддалених областей від інфаркту на кожному препараті реєструються під оптичним мікроскопом з 400-кратним збільшенням.

1.6. Вестерн-блотинг

Приготування тканини

[274] Серце видаляють із грудної клітки. Ретельно розглядають стінку лівого шлуночка, і відбирають зразки тканин з ураженої інфарктом області, пограничної області і віддалених областей. Уражену інфарктом область можна відрізнити від не уражених інфарктом областей по її блідому зовнішньому вигляду. Погранична область визначається як область від 1 мм усередину ураженої інфарктом області до 3 мм за межами ураженої інфарктом області. Віддалені області визначаються як області, що знаходяться на відстані більше 3 мм від ураженої інфарктом області. Зразки зберігають у рідкому азоті для аналізу вестерн-блотингом.

Вестерн-блотинг

[275] Екстракти білків одержують після подрібнювання кожної тканини в рідкому азоті і лізування подрібненої тканини в буфері для лізису RIPA (Beyotime, CN), що містить 1 % повної суміші інгібіторів протеаз без EDTA (Roche, DE), протягом 40 хвилин на льоду. Концентрацію білка визначають за допомогою набору для аналізу білка Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC, 23227, USA). Рівні кількості білка (30 мкг) з кожного зразка солюбілізують у буфері для зразків 5× додецилсульфату натрію (SDS) і розділяють на поліакриламідних гелях, що містять 10 % додецилсульфату натрію (SDS) і 8 % поліакриламиду. Потім білки електрофоретично переносять на мембрану з полівініліденфториду (Bio-Rad, USA). Мембрани блокують протягом 1 години на суміші Tris-забуферений фізіологічний розчин/Tween 20 (TBST) (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl і 0,1 % Tween 20), що містить 5 % знежиреного сухого молока (блокувальний розчин), і інкубують протягом ночі при 4 °C з відповідними первинними антитілами, такими як анти-HIF-1 α (Abcam, ab113642, США), анти-VEGF (Santa Cruz, sc-57496, США) і анти-VEGFR-1 (Abcam, ab32152, USA), розведеними в блокувальному розчині відповідно до рекомендацій фірми-виробника. Після промивання за допомогою TBST, мембрани інкубують протягом 1 години при 37 °C з відповідними вторинними антитілами. Білки-мішені візуалізують з використанням хемілюмінесцентного субстрату пероксидази хрому (HRP) (Millipore, США) і аналізують за допомогою денситометрії, використовуючи програмне забезпечення QUANTITY ONE™.

1.7. Рівні мРНК HIF-1 генів-мішеней

[276] Для визначення транскрипційної активності HIF-1 в ішемізованому міокарді, визначають рівні мРНК HIF-1 α , генів-мішеней HIF-1, таких як VEGF і VEGFR-1 (також відомих як Flt-1), методом полімеразної ланцюгової реакції в масштабі реального часу (RT-PCR).

[277] Виділяють загальну РНК із кожного зразка, використовуючи реагент TRIZOL® (Invitrogen, 15596-026, USA) відповідно до інструкцій фірми-виробника. 1 мкг загальної РНК піддають зворотній транскрипції, використовуючи набір реагентів PRIMESCRIPT™ RT reagent Kit (TaKaRa, RR037A, Japan), при 37 °C протягом 15 хвилин, потім при 85°C протягом 5 секунд і при 4°C протягом 5 хвилин. Реакції RT-PCR у реальному часі проводили з використанням набору SYBR® Premix Ex Taq™ II kit (TaKaRa, RR820A, Japan). Для ампліфікації HIF-1 α , VEGF і VEGFR1 кДНК фрагментів, зразки обробляють, використовуючи систему реального часу BIO-RAD CFX96 з наступною програмою: денатурація при 95 °C протягом 30 секунд, потім 35 циклів при 95 °C протягом 5 секунд і при 60 °C протягом 30 секунд. Аналізують результати логарифмічної лінійної частини на кривій росту і проводять відносну кількісну оцінку, використовуючи метод 2- Δ CT. Рівні експресії кожного з генів HIF-1 α , VEGF і VEGFR1 нормалізують до рівня експресії актину в кожному зразку. Для кожного зразка запускають щонайменше 3 реплікації. Послідовності праймерів наведені в таблиці 2 нижче.

Таблиця 2

Послідовності праймерів RT-PCR

Ген-мішень	Послідовності праймерів	
HIF-1 α мавпи макак-резус	прямий праймер	GTCTGCAACATGGAAGGTATTG (SEQ ID NO: 1)
	зворотний праймер	GCAGGTCATAGGTGGTTTCT (SEQ ID NO: 2)
VEGF мавпи макак-резус	прямий праймер	GAGCTTCCTACAGCACAACA (SEQ ID NO: 3)
	зворотний праймер	CCAGGACTTATACCGGGATTTC (SEQ ID NO: 4)
VEGFR1 мавпи макак-резус	прямий праймер	GGGTACATCACCTAACATCAC (SEQ ID NO: 5)
	зворотний праймер	CCTTTCTGCTGTCCCAGATTAC (SEQ ID NO: 6)
Актин мавпи макак-резус	прямий праймер	CCACGAACTACCTTCAACTCC (SEQ ID NO: 7)
	зворотний праймер	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT (SEQ ID NO: 8)

1.8. Концентрація міді в серці

[278] Зразки тканин швидко заморожували і зберігали при -80°C перед ліофілізацією. Після ліофілізації і обробки тканин азотною кислотою, зразок був безбарвним або ясно-жовтим і прозорим без видимого осаду або залишку. У кожен ємність додавали воду вищого ступеня очищення для розведення HNO_3 до концентрації 2 % для наступного аналізу концентрацій міді. Концентрації міді визначали спектрометричним методом атомної абсорбції із застосуванням графітової печі (ICE3500, Thermo) відповідно до програми, наведеної в таблиці 1 прикладу 3.

1.9. Статистичний аналіз

[279] Усі дані виражали у вигляді середніх величин \pm SD. Варіацію кожного параметра порівнювали між різними експериментальними групами, використовуючи критерій Левена для оцінки однорідності дисперсії і коефіцієнт варіацій (CV). Використовували пакет програм для статистичного аналізу SPSS 14,0 (SPSS, Chicago, IL), і значущою відмінністю вважали відмінність, для якої значення P становили $<0,05$.

2. Результати

2.1. Функції серця

[280] Ехокардіографічні дослідження показали, що після лікування триєнтином фракція викиду лівого шлуночка з часом значно збільшилася. Однак у групі, що не піддавалася лікуванню, фракція викиду лівого шлуночка з часом зменшувалася. Див. фігуру 12.

2.2. Концентрації міді в ураженому інфарктом серці

[281] Концентрації міді в міокарді визначали методом атомно-абсорбційної спектроскопії. Як показано на фігурі 13, концентрації міді значно збільшилися після лікування триєнтином у зразках тканини з області інфаркту і пограничної області в групі, що піддавалася лікуванню, в порівнянні з концентраціями міді в групі, що не піддавалася лікуванню. На відміну від цього, концентрації міді в зразках тканин у віддалених областях порівнянні з концентраціями міді в групі, що піддавалася лікуванню триєнтином, і у групі, що не піддавалася лікуванню.

3. Обговорення

[282] Ішемія міокарда приводить до накопичення HIF-1 α і до виснаження вмісту міді. В умовах ішемії, накопичений HIF-1 α не може бути активований транскрипцією HIF, оскільки мідь необхідна для формування транскрипційного комплексу HIF і для взаємодії HIF з послідовностями HIF елемента відповіді на гіпоксію (HRE) у генах-мішенях. Тому, незважаючи на те, що в ішемізованому міокарді відбувається накопичення HIF, проте дефіцит міді блокує HIF-регульовану експресію генів, залучених в ангіогенез, що призводить до пригнічення ангіогенезу в міокарді. Цей ефект призводить до інфаркту міокарда, який далі прогресує в серцеву недостатність.

[283] У цьому дослідженні застосовували триєнтин для збільшення концентрації міді в осередкових ішемізованих тканинах для лікування інфаркту міокарда. Результати показали, що триєнтин сприяє перерозподілу і повторному використанню міді в тканинах. Крім того, ехокардіографічні дослідження показали, що після лікування триєнтином поліпшувалися функції серця. Доза триєнтину в цьому експерименті становила 18 мг/кг на добу для мавп макак-резус, що еквівалентно приблизно 420 мг на добу для людини. У порівнянні з типовими дозами триєнтину, використовуваними для зниження вмісту міді в сироватці крові у пацієнтів із захворюванням Вільсона (від 500-700 мг/добу до максимально 1500 мг/добу для педіатричних хворих і від 750-1250 мг/добу до максимально 2000 мг/добу для дорослих пацієнтів), доза, використовувана в цьому експерименті, набагато нижче. Результати цього експерименту переконливо свідчать про те, що описане у винаході лікування низькими дозами триєнтину є ефективним способом доставки міді *in vivo* для лікування інфаркту міокарда.

Приклад 5. Лікування триєнтином ішемічного інфаркту міокарда в експериментальній моделі на мишах

[284] У цьому експерименті, експериментальну модель ішемічного інфаркту міокарда на мишах формували шляхом проведення хірургічної операції по установленню постійної лігатури на коронарну артерію. Через 4 тижні після операції ішемізована серцева тканина заміщлася колагеновим волокном і перетворювалася в уражену інфарктом тканину. Лікування триєнтином проводили, як описано в протоколі, наведеному на фігурі 14.

[285] Лікування триєнтином застосовували в чотирьох групах мишей з модельованим захворюванням шляхом внутрішньошлункового введення триєнтину два рази на добу в дозі 16,75, 33,49, 55,94 або 78,25 мг/кг на добу. Це лікування тривало протягом 4 тижнів. В групі, що не піддавалася лікуванню, триєнтин не вводили.

Ехокардіографія

[286] Для оцінки терапевтичної ефективності триєнтину досліджували функції серця методом ехокардіографії. Усіх мишей піддавали трансторакальній ехокардіографічній оцінці за допомогою перетворювача 12 МГц (i13L, Vivid7, GE Ultrasound). Фракцію викиду (EF) лівого

шлуночка оцінювали одноплощинним методом Сімпсона. Безпосередньо реєстрували кінцево-діастолічний об'єм лівого шлуночка (LVEDV) і кінцево-систолічний об'єм лівого шлуночка (LVESV), і розраховували величину EF наступним чином: $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100 \%$.

Концентрація міді в серці

[287] Зразки тканин швидко заморожували і зберігали при -80°C перед ліофілізацією. Після ліофілізації і обробки тканин азотною кислотою, зразок був безбарвним або ясно-жовтим і прозорим без видимого осаду або залишку. У кожену ємність додавали воду вищого ступеня очищення для розведення HNO_3 до концентрації 2 % для наступного аналізу концентрацій міді. Концентрації міді визначали спектрометричним методом атомної абсорбції із застосуванням графітової печі (ICE3500, Thermo) відповідно до програми, наведеної в таблиці 1 прикладу 3.

Результати

[288] Показники серцевої діяльності, виявлені методом ехокардіографії, показали, що функція серця, вимірювана фракцією викиду лівого шлуночка у мишей, підданих лікуванню триентином, покращилася при лікуванні більш низькими дозами триентину, і таке поліпшення зменшувалося при лікуванні більш високими дозами триентину (див. фігуру 15). Показник поліпшення фракції викиду досягав максимального значення при дозі 33,49 мг/кг на добу, а потім зменшувався навіть при більш високій дозі. Результати цього експерименту дозволяють припустити, що лікування інфаркту міокарда триентином ефективне у вузькому діапазоні низьких доз. Як показано на фігурі 16, концентрація міді в ураженій інфарктом області значно збільшилася у відповідь на лікування триентином. Примітно, що в групі лікування з дозою 33,49 мг/кг на добу вміст міді в ураженій інфарктом області був найвищим.

Обговорення

[289] У цьому дослідженні застосовували послідовно зростаючі дози триентину для лікування ішемічного інфаркту міокарда у мишей. Результати показали, що в групі, що піддавалася лікуванню триентином у дозі 33,49 мг/кг на добу, вміст міді в ураженій інфарктом області був найвищим серед усіх експериментальних груп, що відповідає найвищому показнику поліпшення фракції викиду, спостережуваному в цій групі, у порівнянні з іншими експериментальними групами. При випробуванні більш високих доз триентину не спостерігалось подальшого поліпшення вмісту міді в ураженій інфарктом області або фракції викиду.

[290] Досліджені в цьому експерименті дози 16,75, 33,49, 55,94 і 78,25 мг/кг на добу еквівалентні приблизно дозам 150, 300, 500 і 700 мг на добу для людини. На відміну від цього, доза триентину, використовувана для лікування хвороби Вільсона шляхом зменшення вмісту міді в сироватці крові у цих пацієнтів, становить від 500-700 мг/добу до максимально 1500 мг/добу для педіатричних хворих і від 750-1250 мг/добу до максимально 2000 мг/добу для дорослих пацієнтів. Таким чином, визначена в цьому експерименті доза триентину, що забезпечує найвищу ефективність заповнення вмісту міді в ішемізованій серцевій тканині і відновлення функцій серця, значно нижче дози, застосовуваної при лікуванні пацієнтів із хворобою Вільсона. Результати цього експерименту переконливо доводять, що лікування триентином інфаркту міокарда ефективне у вузькому діапазоні низьких доз.

[291] Не посилюючись як на додаткові докази на яку-небудь теорію або гіпотезу, проте, можна зробити висновок про те, що триентин може служити як засіб доставки міді для перенесення міді із тканини або оточуючого середовища з високою концентрацією (такого як сироватка крові після ішемії) у збіднену міддю ішемізовану тканину в серці, тим самим зменшуючи дефіцит міді в ішемізованій тканині і поліпшуючи стан при серцево-судинних захворюваннях. У декількох публікаціях описується підвищений вміст міді в сироватці крові пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями, особливо при інфаркті міокарда. Див., наприклад, публікації Ford E.S. Am. J. Epidem. 151 (12):1182 (2000); Gomez E. et al. J. Trace Elements Med. Biol. 14:65-70 (2000); і Singh M.M. et al. Angiology-Journal of Vascular Diseases, 504-506 (1985).

Приклад 6. Клінічне дослідження лікування триентином пацієнтів із серцевою недостатністю

[292] Клінічне дослідження проводиться для оцінки клінічних ефектів лікування низькими дозами триентину пацієнтів із серцевою недостатністю. Основною метою дослідження є оцінка до і після лікування ефективності триентину в порівнянні із плацебо при лікуванні пацієнтів із серцевою недостатністю.

[293] Дослідження являє собою рандомізоване подвійне сліпе плацебо-контрольоване клінічне дослідження пацієнтів із серцевою недостатністю (наприклад, із серцевою недостатністю II і III класу за функціональною класифікацією Нью-Йоркської кардіологічної асоціації) зі зменшеною фракцією викиду (наприклад, $\text{LVEF} \leq 35 \%$). Пацієнтам у контрольній групі призначають стандартне лікування (SOC) плюс два рази на добу плацебо. Пацієнтам у

групі лікування призначають стандартне лікування (SOC) плюс пероральне введення триентину два рази на добу в дозі 150 мг. Пацієнтів оцінюють при обстеженні на початковому етапі (на тиждень 0), у ході курсу лікування і після лікування.

[294] Первинною кінцевою точкою дослідження може бути виживання, госпіталізація, пов'язана із серцевою недостатністю, або зміна біомаркера, пов'язаного із серцевою недостатністю. Наприклад, рівні циркулюючих натрійуретичних пептидів у динаміці в часі були використані для стратифікації ризику серцевої недостатності і, отже, можуть служити біомаркерами для оцінки тяжкості серцевої недостатності.

[295] Вторинні кінцеві точки дослідження можуть включати зміну структури і функції серця від вихідного рівня до кінця лікування. Структура і функція серця може бути визначена за допомогою ехокардіографії. Приклади кількісних показників, які можуть служити вторинними кінцевими точками, включають кінцево-діастолічний об'єм лівого шлуночка, фракцію викиду лівого шлуночка і відношення E/E'. Вторинні кінцеві точки дослідження можуть додатково включати функціональний стан, оснований на тесті 6-хвилинної ходьби, зміні симптомів (клас NYHA) і показники якості життя.

[296] Вмісти міді в сироватці крові і інші біомаркери можуть постійно контролюватися як третинні кінцеві точки дослідження.

[297] Безпека оцінюється шляхом розгляду спонтанних небажаних явищ (АЕ), повідомлених суб'єктом, і інших відповідних медичних оцінок і оцінок безпеки, таких як основні показники життєдіяльності, ЕКГ, лабораторні аналізи і інші показники.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Застосування композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді, для підвищення внутрішньоклітинного вмісту міді в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, де хелатуючий мідь тетрамін являє собою триентин.

2. Застосування композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді, для спрямованої доставки міді у клітини ішемізованої тканини у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, де хелатуючий мідь тетрамін являє собою триентин.

3. Застосування композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді, для індукування щонайменше двох процесів відновлення тканини в ішемізованій тканині індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, де щонайменше два процеси відновлення тканини вибрані з групи, яка складається з: індукування міграції стовбурових клітин, таких як мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку, в ішемізовану тканину, індукування диференціювання стовбурових клітин в ішемізованій тканині, індукування регенерації тканини в ішемізованій тканині, індукування сигнальної молекули, яка ініціює регенерацію тканини, зворотного розвитку ушкодження в ішемізованій тканині, відновлення мікрооточення клітин нейрофібрил і нейросекреторних клітин в ішемізованій тканині, і посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1), де хелатуючий мідь тетрамін являє собою триентин.

4. Застосування композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді, для індукування міграції стовбурових клітин в ішемізовану тканину у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, де хелатуючий мідь тетрамін являє собою триентин.

5. Застосування композиції, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді, для посилення мідезалежної транскрипційної активності індукованого при гіпоксії фактора 1 (HIF-1) в ішемізованій тканині у індивідуума, що має ішемічне ураження тканини, де хелатуючий мідь тетрамін являє собою триентин.

6. Застосування за будь-яким одним з пп. 1-5, де індивідуум має порушену систему відновлення тканин.

7. Застосування за будь-яким одним з пп. 1-5, де індивідуум не має порушеної системи відновлення тканин.

8. Застосування за будь-яким одним з пп. 1-7, де ішемізовану тканину вибирають з групи, яка складається з ішемізованої серцевої тканини, ішемізованої тканини печінки, ішемізованої тканини головного мозку, ішемізованої легеневої тканини, ішемізованої тканини нирки, ішемізованої шкірної тканини, ішемізованої тканини травного тракту і ішемізованої тканини кінцівки.

9. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, де іон міді в композиції утворює комплекс з хелатуючим мідь тетраміном.

10. Застосування за п. 9, де комплекс хелатуючого мідь тетраміну і іона міді є кристалічною речовиною.

11. Застосування за п. 10, де іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворюванням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води.
12. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, де іон міді в композиції не утворює комплекс із хелатуючим мідь тетраміном.
13. Застосування за будь-яким одним з пп. 1-12, де композиція являє собою пероральну композицію.
14. Застосування за будь-яким одним з пп. 1-13, де композиція включає від 80 до 450 мг на добу хелатуючого мідь тетраміну.
15. Застосування за будь-яким одним з пп. 1-14, де композицію вводять щонайменше два рази на добу.
16. Застосування за будь-яким одним з пп. 1-15, де композицію вводять протягом щонайменше одного місяця.
17. Застосування за будь-яким одним з пп. 1-16, де введення композиції призводить до вмісту в крові щонайменше 0,005 мг/л хелатуючого мідь тетраміну.
18. Застосування за будь-яким одним з пп. 1-17, де введення композиції призводить до вмісту в крові щонайменше 0,005 мг/л хелатуючого мідь тетраміну протягом щонайменше 1 тижня.
19. Застосування за будь-яким одним з пп. 1-18, що додатково включає постійний контроль внутрішньоклітинного вмісту міді у індивідуума.
20. Застосування за п. 19, що додатково включає коректування дозування композиції, виходячи із внутрішньоклітинного вмісту міді у індивідуума.
21. Фармацевтична композиція, яка включає хелатуючий мідь тетрамін і іон міді, де хелатуючий мідь тетрамін являє собою триентин.
22. Фармацевтична композиція за п. 21, де іон міді хелатований чотирма аміногрупами триентину з утворюванням плоскої квадратної структури, і де кристалічний комплекс додатково включає два іони хлору і молекулу води.
23. Фармацевтична композиція за п. 21 або 22, де фармацевтична композиція приготовлена у формі таблетки, капсули або пігулки.
24. Набір, який включає композицію тетраміну, яка включає хелатуючий мідь тетрамін або його фармацевтично прийнятну сіль, і іон міді, для лікування ішемічного ураження тканини, де хелатуючий мідь тетрамін являє собою триентин.

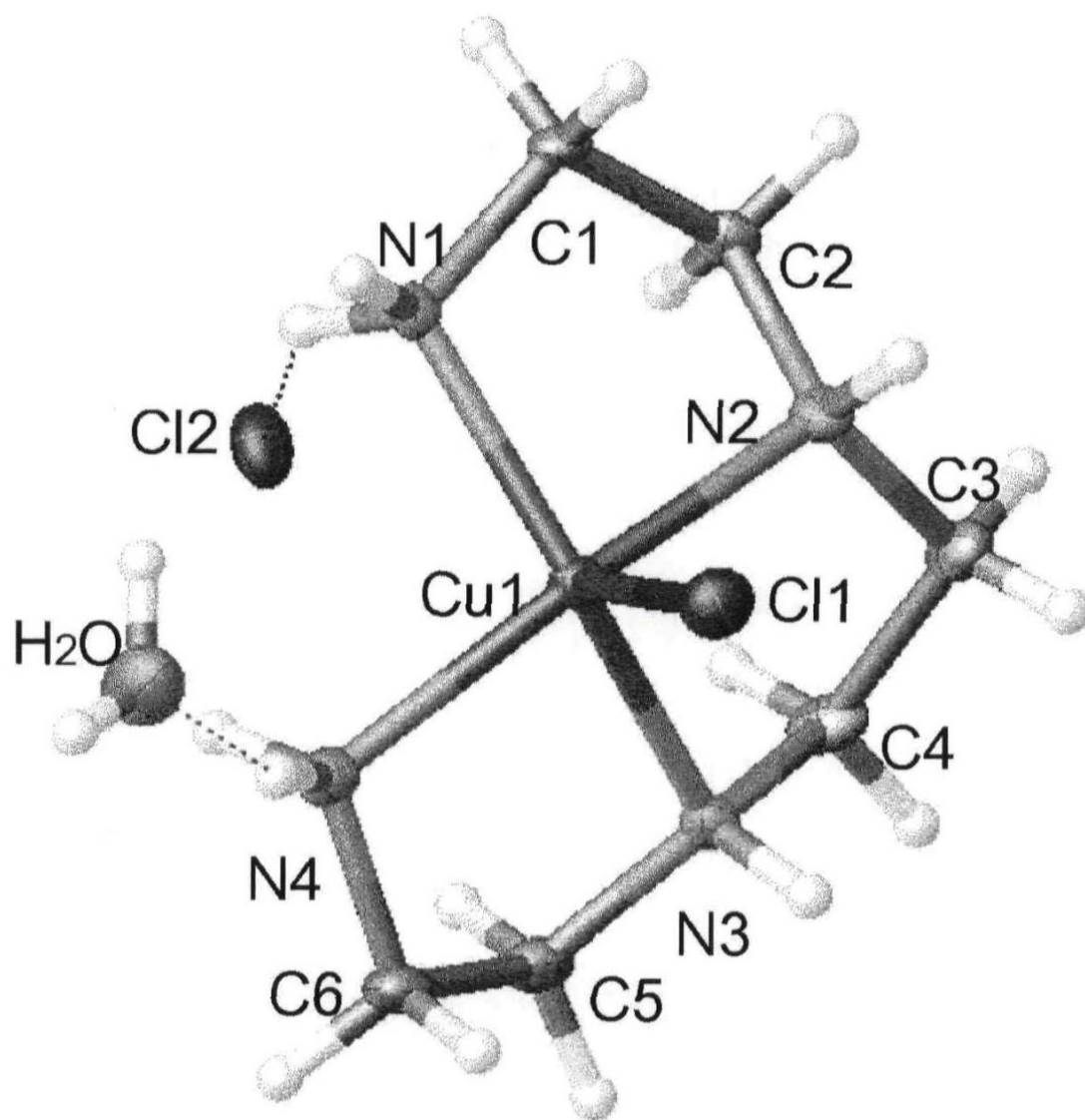


Fig. 1

Довжини зв'язків

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

Кути зв'язків

АТОМ	АТОМ	АТОМ	Кут/°	АТОМ	АТОМ	АТОМ	Кут/°
N1	C1	C2	106.6 (4)	N3	Cu1	N2	84.54 (15)
N2	C2	C1	106.0 (4)	N3	Cu1	N4	84.82 (15)
N2	C3	C4	106.6 (4)	N4	Cu1	C11	106.67 (11)
N3	C4	C3	109.1 (4)	N4	Cu1	N2	146.08 (15)
N3	C5	C6	107.2 (4)	C1	N1	Cu1	107.6 (3)
N4	C6	C5	108.9 (4)	C2	N2	C3	115.7 (4)
N1	Cu1	C11	99.60 (11)	C2	N2	Cu1	107.0 (3)
N1	Cu1	N2	84.60 (16)	C3	N2	Cu1	105.4 (3)
N1	Cu1	N3	163.99 (15)	C4	N3	Cu1	109.4 (3)
N1	Cu1	N4	97.79 (15)	C5	N3	C4	115.0 (4)
N2	Cu1	C11	106.25 (11)	C5	N3	Cu1	105.9 (3)
N3	Cu1	C11	94.72 (10)	C6	N4	Cu1	108.8 (3)

Торсіонні кути

A	B	C	D	Кут/°	A	B	C	D	Кут/°
C1	C2	N2	C3	-161.8 (4)	C5	C6	N4	Cu1	31.5 (4)
C1	C2	N2	Cu1	-44.7 (4)	C6	C5	N3	C4	168.4 (4)
C2	C1	N1	Cu1	-42.4 (4)	C6	C5	N3	Cu1	47.6 (4)
C3	C4	N3	C5	-89.9 (4)	N1	C1	C2	N2	58.3 (4)
C3	C4	N3	Cu1	29.1 (4)	N2	C3	C4	N3	-52.7 (5)
C4	C3	N2	C2	167.4 (4)	N3	C5	C6	N4	-53.3 (5)
C4	C3	N2	Cu1	49.4 (4)					

Фіг. 2

**Таблиця 1. Кристалічні дані і уточнення структури для
150116_s2_lzh_m**

Ідентифікаційний код	150116_s2_lzh_m
Емпірична формула	$C_6H_{20}Cl_2CuN_4O$
Молекулярна маса по формулі сполуки	298.70
Температура/К	143.00 (10)
Кристалічна система	Орторомбічна
Просторова група	$P2_12_12_1$
$a/\text{\AA}$	7.0684 (2)
$b/\text{\AA}$	10.5124 (4)
$c/\text{\AA}$	16.5540 (5)
$\alpha /^\circ$	90
$\beta /^\circ$	90
$\gamma /^\circ$	90
Об'єм/ \AA^3	1230.05 (7)
Z	4
$\rho_{\text{розрах.}} \text{ МГ/ММ}^3$	1.613
$M/\text{ММ}^{-1}$	2.188
$F(000)$	620.0
Розмір кристала/ мм^3	$0.3 \times 0.2 \times 0.2$
Випромінювання	MoK α ($\lambda = 0.71073$)
2 θ -діапазон для реєстрації даних	6.264 to 52.738 $^\circ$
Діапазон індексів	$-8 \leq h \leq 6, -13 \leq k \leq 8, -13 \leq l \leq 20$
Виміряні відбиття	3978
Незалежні відбиття	2139 [$R_{\text{int}} = 0.0266, R_{\text{sigma}} = 0.0500$]
Дані/обмеження/параметри	2139/0/135
Погодження при вирівнюванні по F^2	1.039
Кінцеві R-індекси [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0314, wR_2 = 0.0651$
Кінцеві R-індекси [усі дані]	$R_1 = 0.0364, wR_2 = 0.0679$
Найбільша відмінність пік/западина/ $e \text{\AA}^{-3}$	0.42/-0.35
Параметр Флека	0.007 (13)

Фіг. 3

Таблиця 2. Фракційні координати атомів ($\times 10^4$) і еквівалентні ізотропні параметри заміщення ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) для 150116_s2_lzh_m. $U_{\text{екв}}$ визначається як $1/3$ сліду ортогоналізованого тензора U_{ij}

АТОМ	x	y	z	U (екв)
C1	-3466(6)	-5730(5)	-7456(3)	21.1(11)
C2	-3528(6)	-4378(5)	-7122(3)	19.7(11)
C3	-1517(6)	-3062(5)	-6194(3)	21.2(11)
C4	387(7)	-3175(5)	-5773(3)	21.1(11)
C5	-122(6)	-4630(4)	-4606(3)	16.4(11)
C6	-180(6)	-6052(4)	-4434(3)	16.3(11)
C11	1894.2(15)	-6628.5(12)	-6795.6(7)	20.4(3)
Cu1	-916.8(7)	-5709.6(6)	-6122.9(3)	14.05(15)
N1	-2985(5)	-6574(4)	-6769(2)	17.6(9)
N2	-1635(5)	-4137(4)	-6772(2)	15.4(8)
N3	584(5)	-4472(4)	-5437(2)	15.7(9)
N4	-1272(5)	-6685(4)	-5073(2)	14.3(8)
C12	-5193.7(14)	-5164.0(11)	-4787.6(8)	22.9(3)
O1	-1646(6)	-9247(4)	-7027(3)	29.4(9)

Fig. 4A

Таблиця 3. Анізотропні параметри заміщення ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) для 150116_s2_lzh_m. Анізотропний експонентний фактор заміщення приймає форму:

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

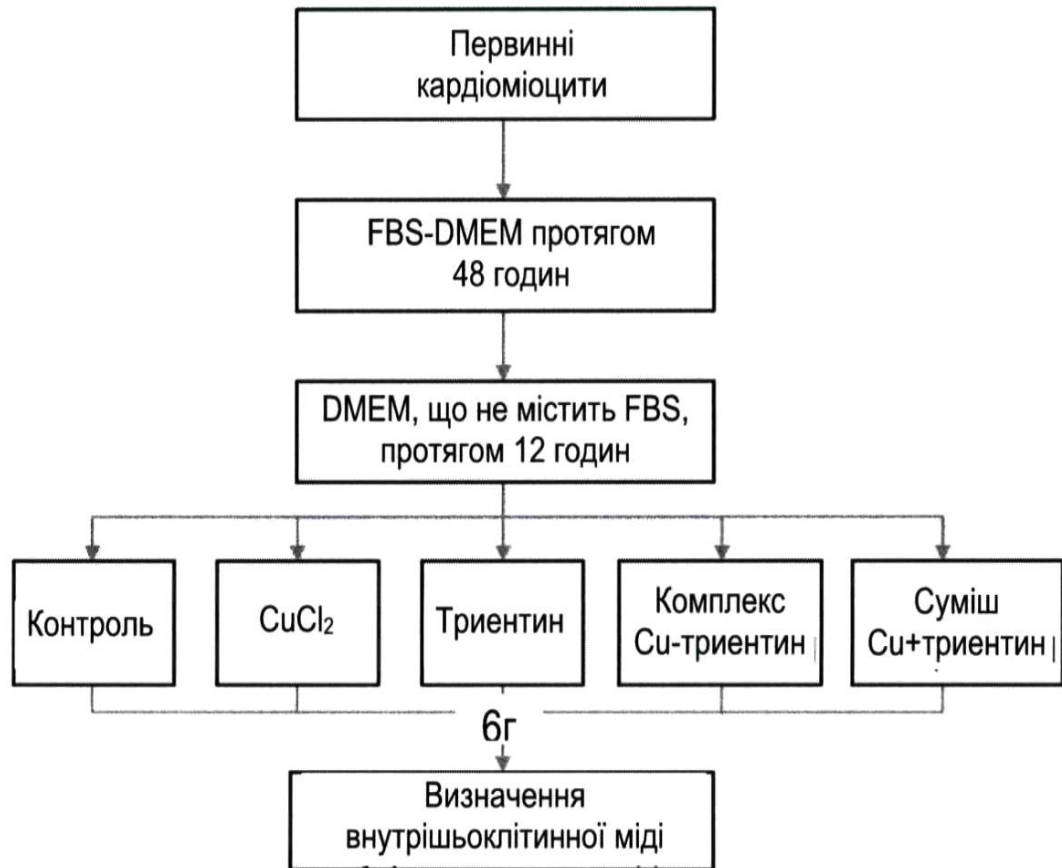
АТОМ	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
C1	21(2)	28(3)	14(2)	4(3)	-4.4(19)	0(2)
C2	18(2)	26(3)	15(2)	4(3)	-0.1(18)	2(2)
C3	32(2)	14(2)	19(2)	3(2)	0(2)	8(2)
C4	30(2)	13(3)	19(2)	3(2)	-2(2)	-2(2)
C5	19(2)	17(3)	13(2)	-4(2)	-0.4(19)	1(2)
C6	18(2)	18(3)	12(2)	4(2)	-4.0(19)	2(2)
C11	20.6(5)	20.0(7)	20.7(6)	-1.4(6)	3.0(5)	4.1(5)
Cu1	16.6(3)	11.9(3)	13.6(3)	0.0(3)	-1.3(3)	0.3(3)
N1	19.2(19)	17(2)	16(2)	1.1(19)	0.5(18)	0.2(18)
N2	16.5(17)	16(2)	13.4(18)	-0.9(19)	-0.1(15)	-0.2(18)
N3	16.1(17)	13(2)	18(2)	0.9(18)	-1.7(15)	3.9(18)
N4	12.5(17)	13(2)	18(2)	0.7(18)	-0.7(15)	-1.2(16)
C12	15.2(5)	17.7(6)	35.6(7)	-0.7(6)	-1.4(5)	0.5(5)
O1	40(2)	24(2)	24(2)	-6(2)	1.6(19)	-3(2)

Fig. 4B

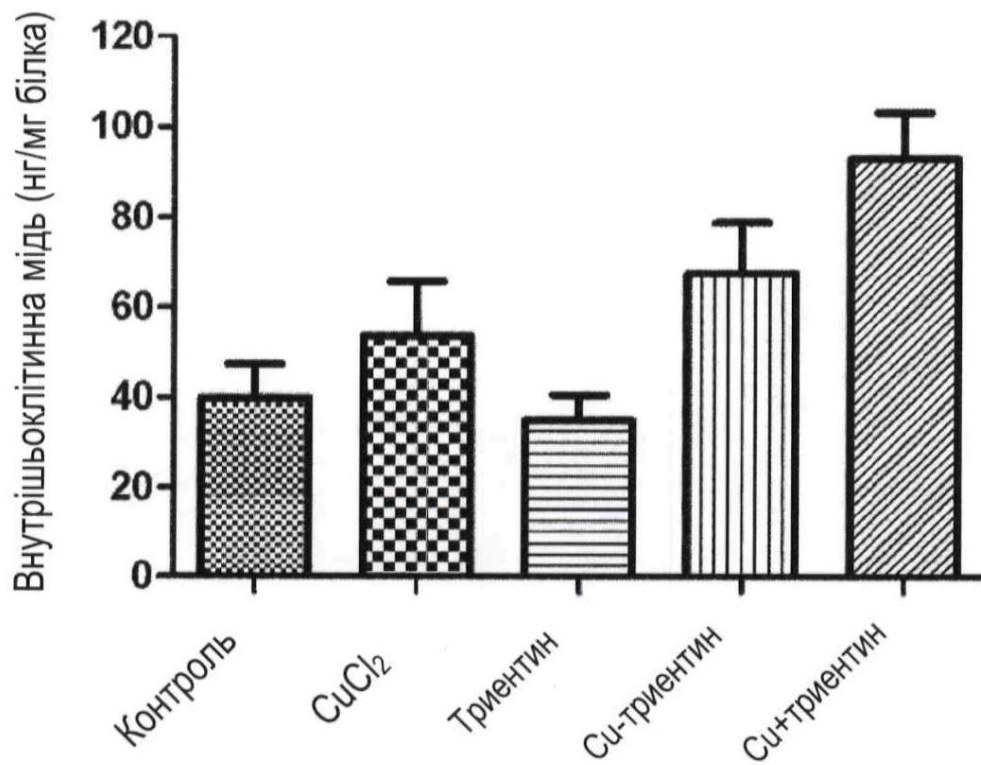
Координати атомів водню і ізотропні параметри заміщення ($\text{\AA}^2 \times 10^3$)
для 150116_s2_lzh_m

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

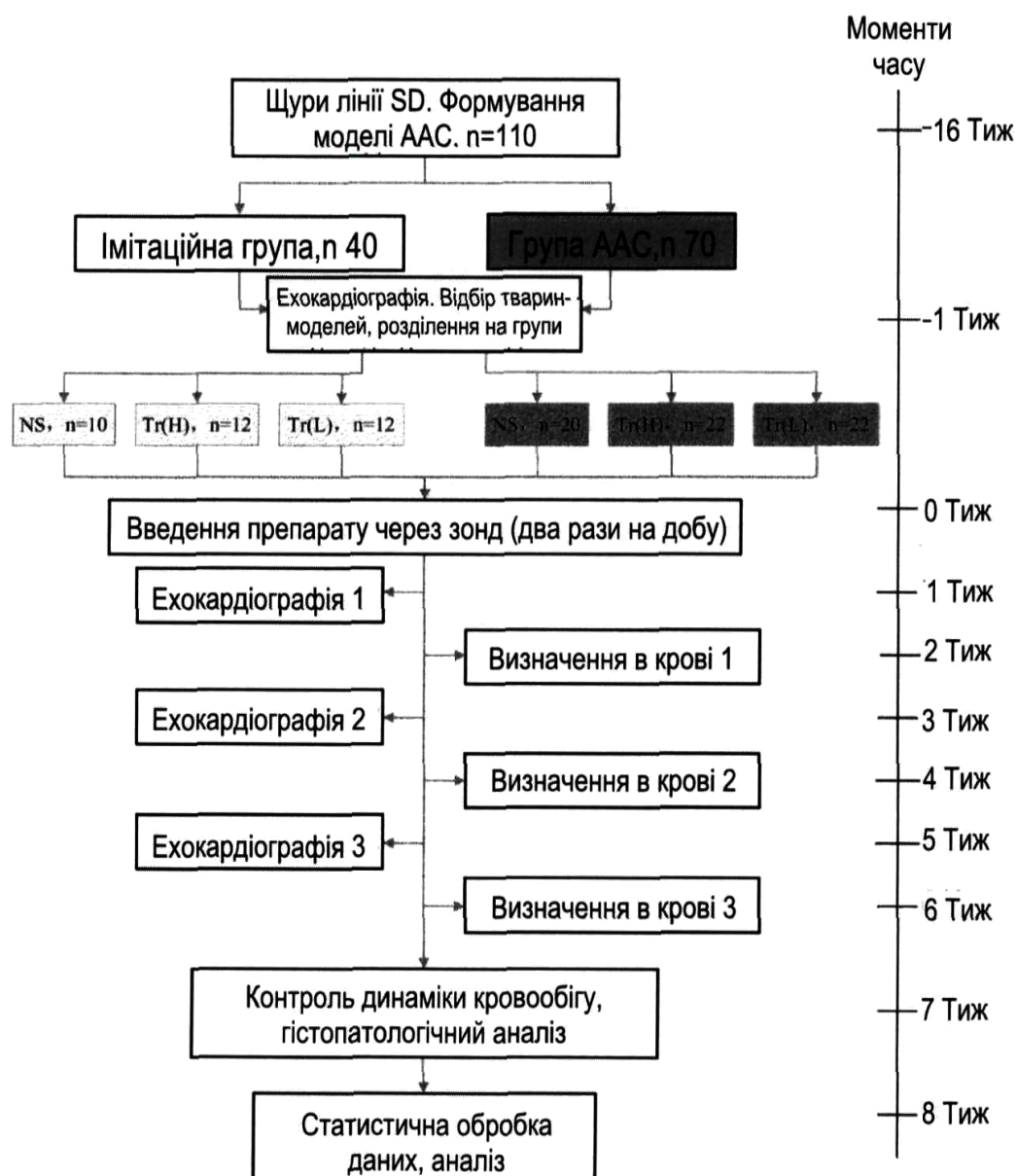
Fig. 4C



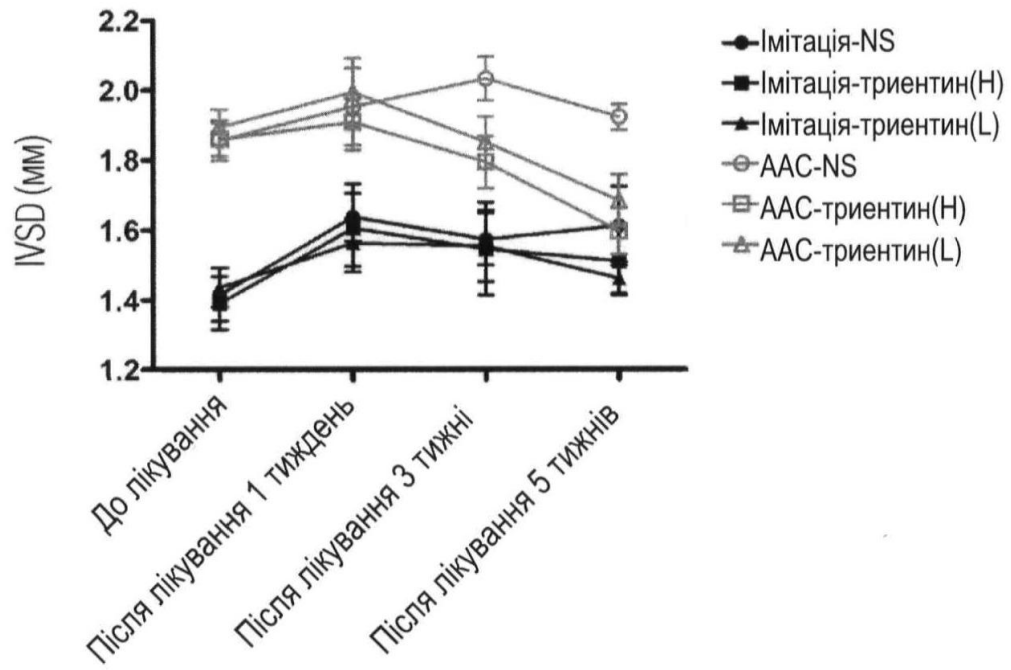
Фіг. 5



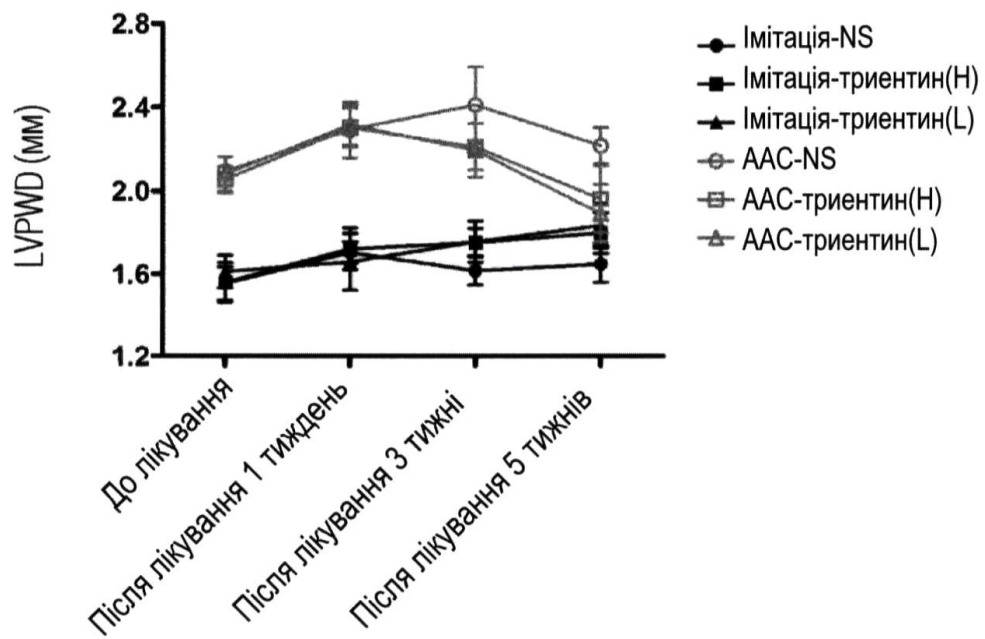
Фіг. 6



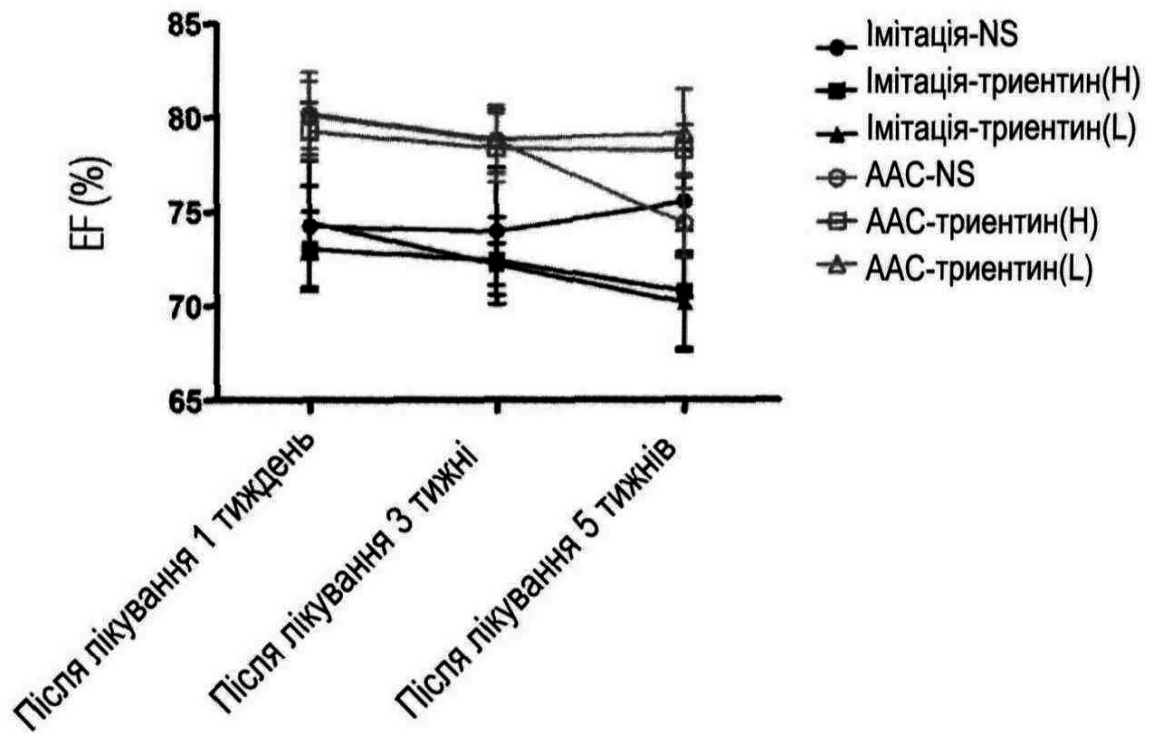
Фіг. 7



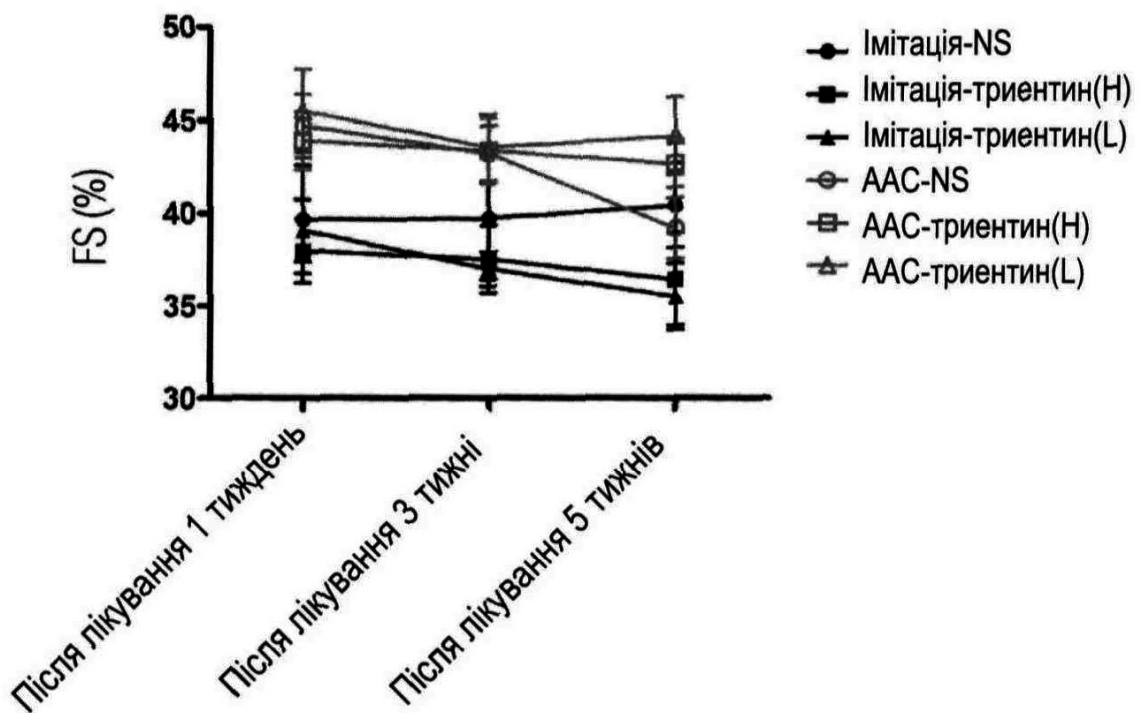
Фіг. 8А



Фіг. 8В



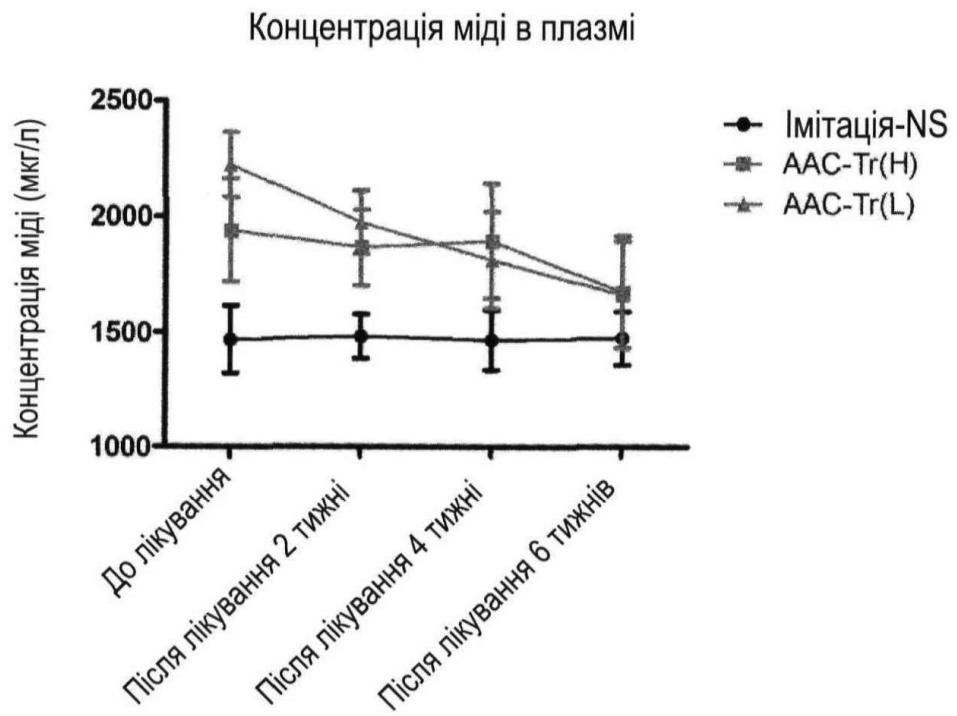
Фіг. 9А



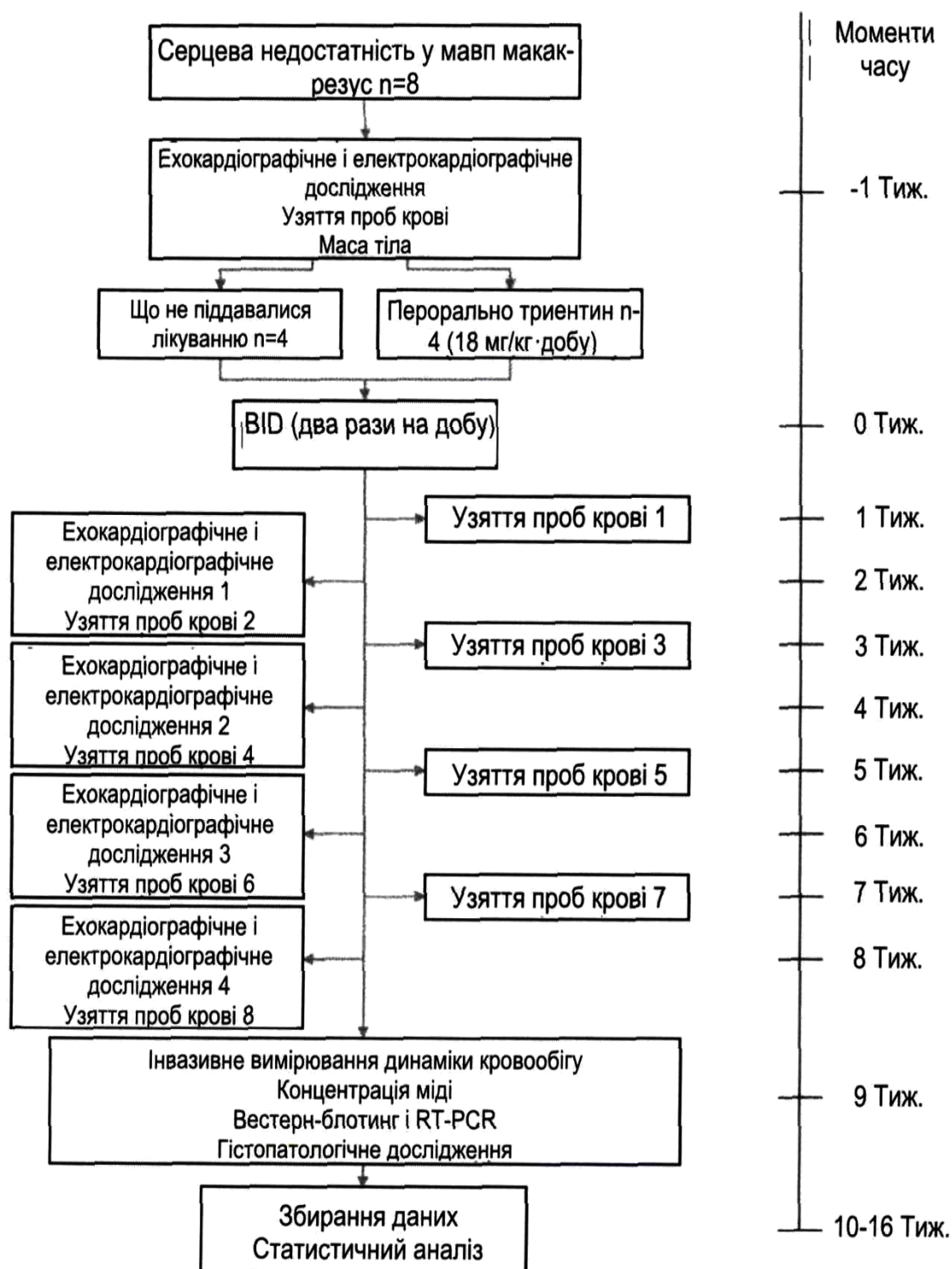
Фіг. 9В



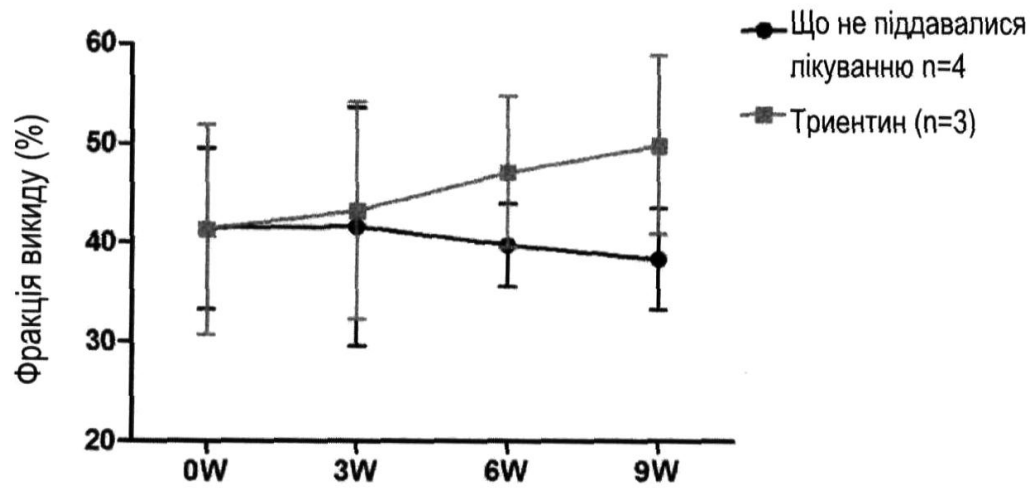
Фіг. 10А



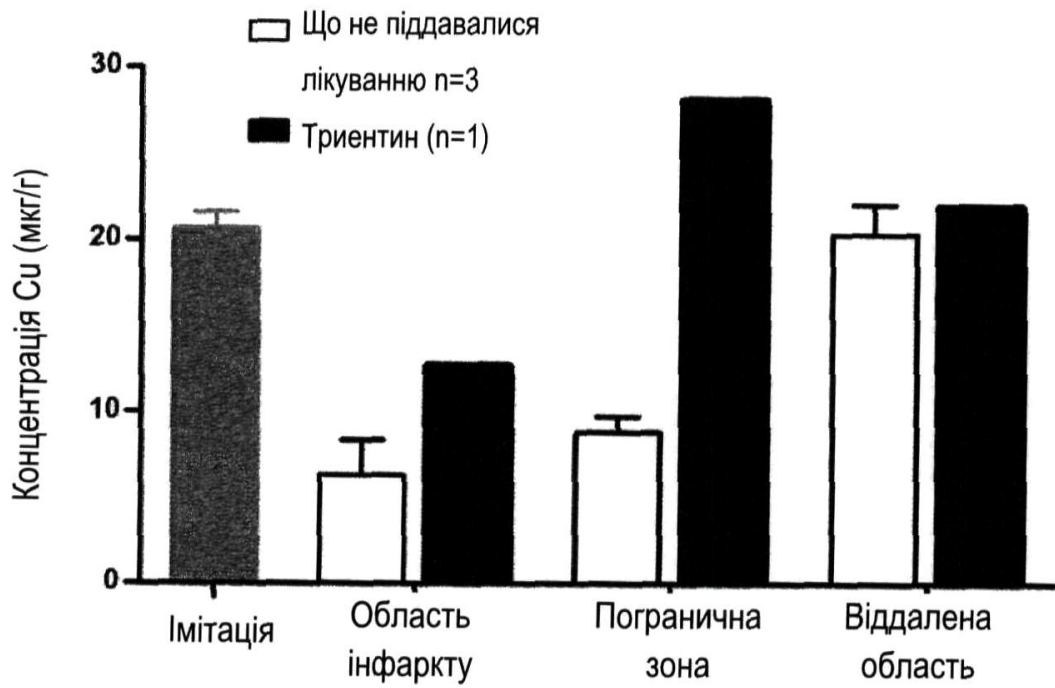
Фіг. 10В



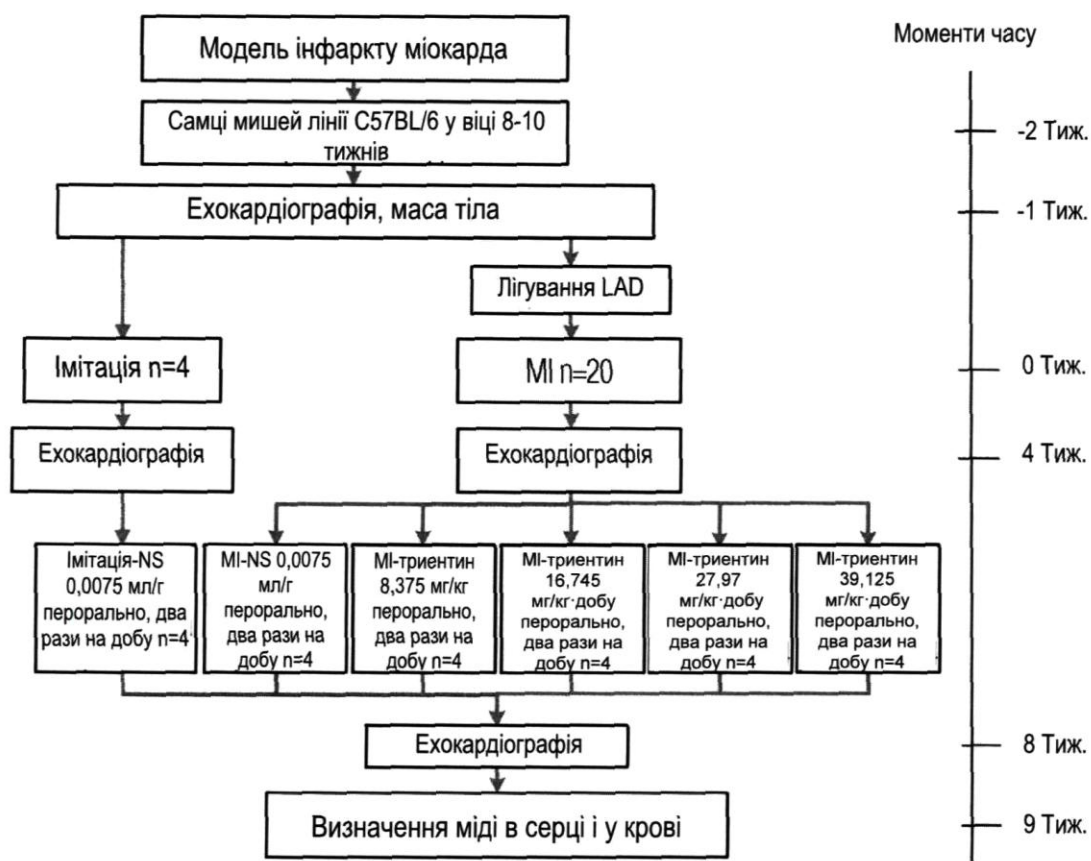
Фіг. 11



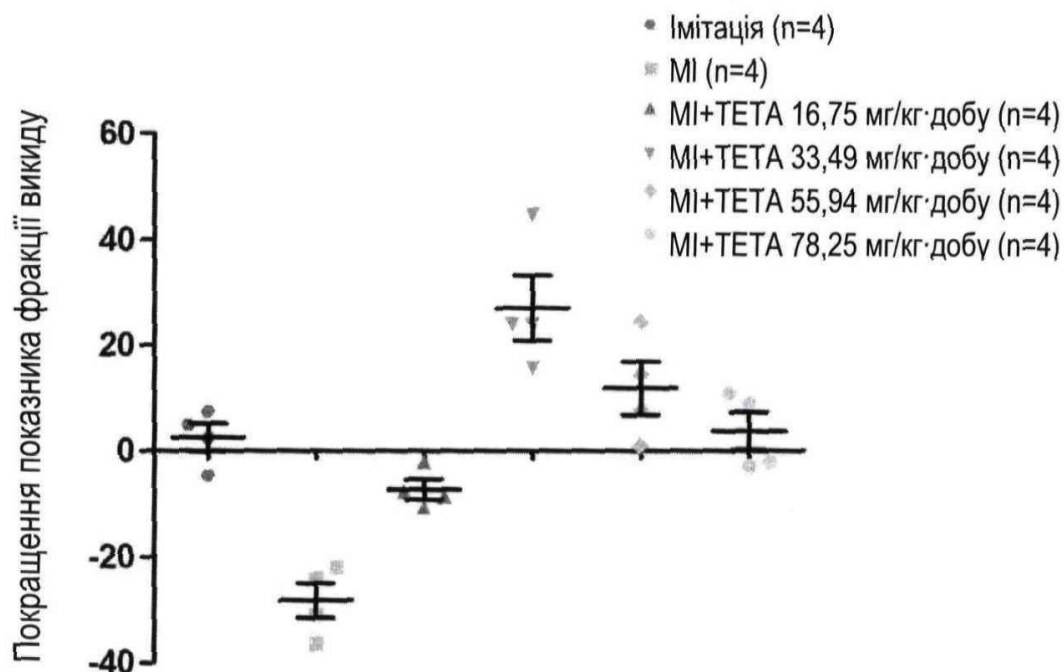
Фіг. 12



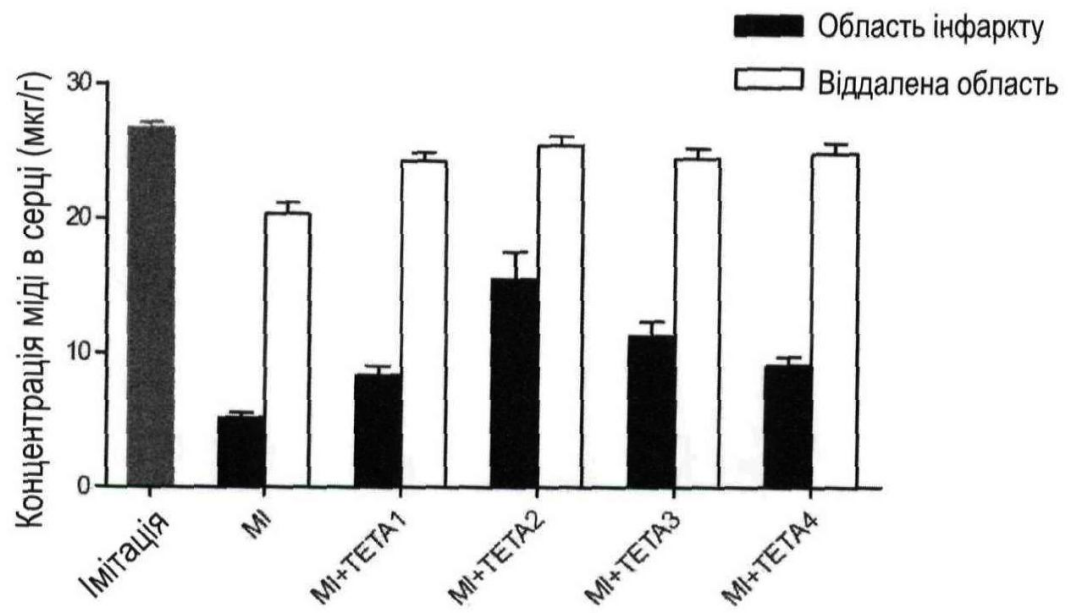
Фіг. 13



Фіг. 14



Фіг. 15



Фіг. 16