



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113412118 A

(43) 申请公布日 2021.09.17

(21) 申请号 202080012570.6

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

(22) 申请日 2020.02.07

代理人 牛蔚然

(30) 优先权数据

2019-020707 2019.02.07 JP

(51) Int.Cl.

A61K 35/28 (2015.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.08.04

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/004698 2020.02.07

A61P 41/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/162580 JA 2020.08.13

A61L 31/00 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

(71) 申请人 北海道公立大学法人札幌医科大学

地址 日本北海道

申请人 尼普洛株式会社

(72) 发明人 本望修 佐佐木祐典 佐佐木优子

冈真一 中崎公仁 前泽理惠

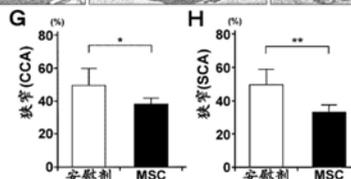
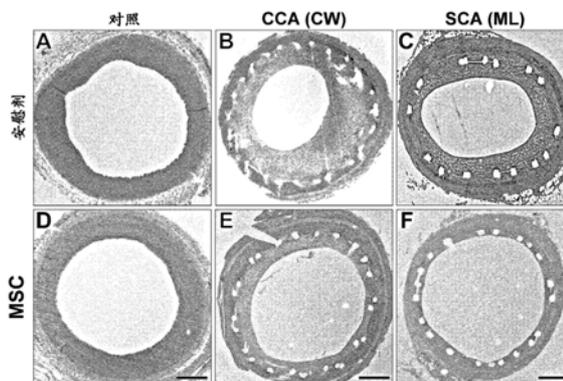
权利要求书1页 说明书13页 附图5页

(54) 发明名称

用于预防支架内再狭窄的药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及向接受支架置入的患者所施予的、包含间充质干细胞的药物组合物。具体而言，本发明涉及药物组合物，其为用于组织修复·再生的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包含间充质干细胞，并被施予至接受支架置入的患者，并且本发明涉及基于前述药物组合物的支架内新生内膜增生或支架内再狭窄的预防。



1. 药物组合物,其为用于组织修复·再生的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含间充质干细胞,并被施予至接受支架置入的患者。

2. 如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述患者为正罹患或罹患过选自动脉粥样硬化、包括心肌梗塞的缺血性心脏病、包括脑梗塞及短暂性脑缺血发作(TIA)的缺血性脑血管疾病、闭塞性动脉硬化症(ASO)、伯格氏病、全身血管的动脉硬化性病变、包括解离性动脉瘤的血管解离性病变、及动脉瘤中的任意疾病的患者。

3. 如权利要求1或2所述的药物组合物,其中,所述支架置入为颈动脉支架置入(CAS)或经皮血管成形·支架置入(PTAS)。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的药物组合物,其特征在于,在1次施予中,10<sup>6</sup>个以上的细胞被施予。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的药物组合物,其中,所述间充质干细胞为源自骨髓或血液的间充质干细胞。

6. 如权利要求1~5中任一项所述的药物组合物,其中,所述间充质干细胞为源自所述患者的骨髓或血液的间充质干细胞。

7. 如权利要求1~6中任一项所述的药物组合物,其预防支架内再狭窄。

8. 药物组合物,其为用于预防支架内再狭窄的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含间充质干细胞,并被施予至接受支架置入的患者。

## 用于预防支架内再狭窄的药物组合物

### 技术领域

[0001] 相关申请

[0002] 本说明书包含作为本申请优先权基础的日本特愿2019-020707 (2019年2月7日提出申请)的说明书中所记载的内容。

[0003] 技术领域

[0004] 本发明涉及向接受支架置入的患者所施予的、包含间充质干细胞的药物组合物。本发明的药物组合物被施予至接受支架置入的患者,从而促进患部的组织修复·再生,并且预防支架内再狭窄。

### 背景技术

[0005] 在颈动脉或者颅内动脉粥样硬化的治疗中实施的颈动脉支架置入 (Carotid Artery Stenting: CAS) 或经皮血管成形·支架置入 (Percutaneous Transluminal Angioplasty and Stenting: PTAS) 中,术后的支架内再狭窄是导致脑卒中(脑梗塞)复发的严重并发症。虽然先前的研究中报道了CAS后的同侧脑梗塞复发的风险低,但在PTAS后,与内膜切除相比,更频繁地发生中度以上的再狭窄,并且再狭窄增加了同侧复发性脑卒中及暂时性缺血发作 (Transient Ischemic Attack: TIA) 的风险。尽管手术技术有所提高,然而颅内动脉粥样硬化的PTAS后的支架内再狭窄仍作为重大并发症来进行报道,发生率最高为31%。在39%的患者中,狭窄会导致脑卒中或TIA。总体而言,这些发现强调了预防PTAS后的支架内再狭窄来预防同侧缺血性脑卒中或TIA、并改善CAS和PTAS后的临床结果的必要性。

[0006] 作为支架内再狭窄的机制,可举出如下的可能性:由相对于支架支柱的炎症反应而诱发的新生内膜增生(非专利文献1及非专利文献2)。在心脏病学中,已经开发出了药物洗脱支架 (Drug Eluting Stent: DES),其通过抑制炎症反应来预防新生内膜增生,从而使再狭窄率降低。也尝试了相对于颅内动脉疾病的DES的适应症外应用,但由于支架的刚性及神经毒性所引起的技术障碍,术前并发症率高。因此,期望开发出新的用于抑制新生内膜增生的方法。

[0007] 据报道,源自骨髓的间充质干细胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) 的静脉内施予可减少再灌注损伤、梗塞面积,并改善实验性脑卒中模型的行为功能(专利文献1~5)。除神经保护、神经新生、诱导轴突再生、血管新生、恢复血脑屏障、髓鞘再生、皮质连接保留、赋予神经可塑性及远距离应答的神经营养因子的分泌等MSC的治疗机制之外,由最近的研究所提示的机制中,存在由各种抗炎介质(非专利文献3~7)的释放引起的炎症微环境的稳定化(非专利文献8)。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1: W02002/000849号

[0011] 专利文献2: W02009/034708号

[0012] 专利文献3: W02018/034023号

- [0013] 专利文献4:W02018/034314号
- [0014] 专利文献5:W02017/188457号
- [0015] 非专利文献
- [0016] 非专利文献1:Dussaillant GR等人,Small stent size and intimal hyperplasia contribute to restenosis:a volumetric intravascular ultrasound analysis.J Am Coll Cardiol 26:720-724,1995
- [0017] 非专利文献2:Hoffmann R等人,Patterns and mechanisms of in-stent restenosis.A serial intravascular ultrasound study.Circulation94:1247-1254, 1996
- [0018] 非专利文献3:Lankford KL等人,Intravenously delivered mesenchymal stem cell-derived exosomes target M2-type macrophages in the injured spinal cord.PLoS One 13:e0190358,2018
- [0019] 非专利文献4:Nakazaki M等人,Intravenous infusion of mesenchymal stem cells inhibits intracranial hemorrhage after recombinant tissue plasminogen activator therapy for transient middle cerebral artery occlusion in rats.J Neurosurg 127:917-926,2017
- [0020] 非专利文献5:Prockop DJ等人,Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs):role as guardians of inflammation.Mol Ther 20:14-20,2012
- [0021] 非专利文献6:Shi Y等人,Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases.Nat Rev Nephrol,2018
- [0022] 非专利文献7:Sasaki Y等人,Synergic Effects of Rehabilitation and Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells After Stroke in Rats.Phys Ther 96:1791-1798,2016

## 发明内容

- [0023] 发明所要解决的课题
- [0024] 本发明的课题在于提供可对接受支架置入的患者施予的用于组织修复·再生的药物组合物,以及提供用于预防PTAS后的再狭窄和与之相伴的脑卒中或TIA的复发的新方法。
- [0025] 用于解决课题的手段
- [0026] 本申请的发明人提出一种假设:静脉内施予MSC抑制了对使用猪模型而移植的支架支柱的炎症反应,由此抑制新生内膜增生。本申请的发明人将两种裸金属支架插入小型猪中,将一个支架移植到相当于人大脑中动脉(Middle Cerebral Artery:MCA)的颈总动脉(Common Carotid Artery:CCA)中,将另一个支架移植到相当于人CCA的颈浅动脉(Superficial Cervical Artery:SCA)中,并使用血管造影(DSA)及血管内超声波检查(IVUS)进行图像解析。此外,对包括施予MSC后的支架支柱周围的炎性变化的组织学的观察结果进行评价。并且,确认了也可以向接受支架置入的患者施予MSC,且由此在置入有支架的CCA及SCA中,可以抑制新生内膜增生的发展。
- [0027] 本发明是基于上述发现而完成的,其涉及以下的(1)~(15)。

[0028] (1) 药物组合物,其为用于组织修复·再生的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含间充质干细胞,并被施予至接受支架置入的患者。

[0029] (2) 如(1)所述的药物组合物,其中,前述患者为正罹患或罹患过选自动脉粥样硬化、包括心肌梗塞的缺血性心脏病、包括脑梗塞及短暂性脑缺血发作(TIA)的缺血性脑血管疾病、闭塞性动脉硬化症(ASO)、伯格氏病、全身血管的动脉硬化性病变、包括解离性动脉瘤的血管解离性病变、及动脉瘤中的任意疾病的患者。

[0030] (3) 如(1)或(2)所述的药物组合物,其中,前述支架置入为颈动脉支架置入(CAS)或经皮血管成形·支架置入(PTAS)。

[0031] (4) 如(1)~(3)中任一项所述的药物组合物,其特征在于,在1次施予中,10<sup>6</sup>个以上的细胞被施予。

[0032] (5) 如(1)~(4)中任一项所述的药物组合物,其中,前述间充质干细胞为源自骨髓或血液的间充质干细胞。

[0033] (6) 如(1)~(5)中任一项所述的药物组合物,其中,前述间充质干细胞为源自前述患者的骨髓或血液的间充质干细胞。

[0034] (7) 如(1)~(6)中任一项所述的药物组合物,其预防支架内再狭窄(支架内的新生内膜增生)。

[0035] (8) 药物组合物,其为用于预防支架内再狭窄的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含间充质干细胞,并被施予至接受支架置入的患者。

[0036] (9) 如(8)所述的药物组合物,其中,前述患者为正罹患或罹患过选自动脉粥样硬化、包括心肌梗塞的缺血性心脏病、包括脑梗塞及短暂性脑缺血发作(TIA)的缺血性脑血管疾病、闭塞性动脉硬化症(ASO)、伯格氏病、全身血管的动脉硬化性病变、包括解离性动脉瘤的血管解离性病变、及动脉瘤中的任意疾病的患者。

[0037] (10) 如(8)或(9)所述的药物组合物,其中,前述支架置入为颈动脉支架置入(CAS)或经皮的血管形成·支架置入(PTAS)。

[0038] (11) 如(8)~(10)中任一项所述的药物组合物,其特征在于,在1次施予中,10<sup>6</sup>个以上的细胞被施予。

[0039] (12) 如(8)~(11)中任一项所述的药物组合物,其中,前述间充质干细胞为源自骨髓或血液的间充质干细胞。

[0040] (13) 如(8)~(12)中任一项所述的药物组合物,其中,前述间充质干细胞为源自前述患者的骨髓或血液的间充质干细胞。

[0041] (14) 如(8)~(13)中任一项所述的药物组合物,其预防支架内再狭窄(支架内的新生内膜增生)。

[0042] (15) 预防支架内再狭窄的方法,其特征在于,向接受支架置入的患者静脉内施予间充质干细胞。

[0043] 发明的效果

[0044] 根据本发明,提供了可以向接受支架置入的患者施予的、用于组织修复·再生的药物组合物。本发明的药物组合物可以防止PTAS后的支架内再狭窄,并可以防止脑卒中的复发、TIA的发生。已知间充质干细胞具有促进心肌梗塞、脑梗塞等缺血性血管疾病中的损伤部位的再生,改善运动功能障碍的效果。另外,已知基于损伤部位(病变部位)中的突触形

成和可塑性促进效果,对认知症、慢性期的脑梗塞、慢性期的脊髓损伤、神经退行性疾病、精神疾病、高级功能障碍等具有治疗效果。因此,可以期待本发明的药物组合物预防支架内再狭窄,并且对上述的症状也具有优选的效果。

### 附图说明

[0045] [图1]图1示出实施例的实验方案。(A)在支架移植14天后,将小型猪随机地分成安慰剂施予组和MSC施予组,静脉内施予安慰剂或MSC(各 $1.0 \times 10^8$ 细胞)。在马上施予前及第1天、第7天、第28天实施血管造影(DSA)及血管内超声波检查(IVUS)。(B)为在第28天的评价后的、对支架置入血管和相对侧颈总动脉(对照)的血管造影(箭头为CCA及SCA)。

[0046] [图2]图2示出血管造影的结果。置入CW的CCA(A:安慰剂施予组,B:MSC施予组)、置入ML的SCA(C:安慰剂施予组,D:MSC施予组)。将对狭窄进行定量化的结果(狭窄率)示于E及F(E:置入CW的CCA,F:置入ML的SCA)。比例尺=4mm(A,B),1mm(C,D)。\* $p < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ , (CW:Carotid WALLSTENT(注册商标),ML:Multi-Link 8(注册商标))。

[0047] [图3]图3示出IVUS的结果。置入CW的CCA(A:安慰剂施予组,B:MSC施予组),置入ML的SCA(C:安慰剂施予组,D:MSC施予组)。将对狭窄进行定量化的结果(狭窄率)示于E及F(E:置入CW的CCA,F:置入ML的SCA)。比例尺=2mm(A,B),1mm(C,D)。\* $p < 0.05$

[0048] [图4]图4示出HE染色的结果(低倍率显微镜图像)。对照动脉(A:安慰剂施予组,D:MSC施予组),CCA(B:安慰剂施予组,E:MSC施予组),SCA(C:安慰剂施予组,F:MSC施予组)。将对狭窄进行定量化的结果(狭窄率)示于G及H(G:置入CW的CCA,H:置入ML的SCA)。比例尺=10mm(A,B,D,E),5mm(C,F)。\* $p < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$

[0049] [图5]图5示出HE染色的结果(高倍率显微镜图像)。对照动脉(A:安慰剂施予组,D:MSC施予组),CCA(B:安慰剂施予组,E:MSC施予组),SCA(C:安慰剂施予组,F:MSC施予组)。将对狭窄进行定量化的结果(狭窄率)示于G及H(G:置入CW的CCA,H:置入ML的SCA)。比例尺=10mm(A,D),5mm(B,C,E,F)。\*\* $P < 0.01$

### 具体实施方式

[0050] 本发明涉及向支架置入后的患者也可施予的用于组织修复·再生的药物组合物。

#### [0051] 1. 间充质干细胞

[0052] 本发明的药物组合物中使用的所谓“间充质干细胞”,是在间充质组织的间质细胞中微量地存在的具有多分化能力及自我复制能力的干细胞,已知其不仅分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等结缔组织细胞,还具有分化为神经细胞、心肌细胞的分化能力。

[0053] 作为间充质干细胞的来源,可以由ES细胞、诱导性多能干细胞(iPS细胞)分化诱导出的细胞,也可以是经株系化的细胞,还可以是从生物体分离·增殖而得到的细胞。为生物体的情况下,可举出骨髓、末梢血、脐带血、胎儿胚胎、脑等,但优选源自骨髓或血液的间充质干细胞,特别优选骨髓间充质干细胞,其中优选人骨髓间充质干细胞。源自骨髓的间充质干细胞具有以下优点:1)可以期待显著的效果,2)副作用的危险性低,3)可以期待充分的供体细胞的供给,4)是非侵入性的治疗,可进行自体移植,因此5)传染病的风险低,6)不用担心免疫排斥反应,7)没有伦理问题,8)易于被社会接受,9)作为普通医疗而易于广泛定植;等等。此外,骨髓移植疗法是已经在临床现场使用的治疗,安全性也得到确认。另外,源

自骨髓的干细胞的迁移性高,除了向局部移植以外,还可通过静脉内施予到达目标损伤组织,可以期待治疗效果。

[0054] 细胞可以源自异体细胞也可以源自于自体细胞,优选源自于自体细胞(源自患者自身的细胞)的间充质干细胞。

[0055] 本发明中使用的间充质干细胞优选处于未分化的状态。这是因为未分化的状态下细胞增殖率及导入生物体内后的存活率高。未分化的状态例如可以通过作为分化标志物的CD24未表达来进行确认。本申请的发明人还开发了取得这样的细胞的获得方法,其详细内容记载于W02009/002503号。

[0056] 本申请的发明人开发出的前述方法中,使用包含同种血清(优选自体血清;在人用药物组合物中为人血清)、且不含或者以极低浓度包含抗凝剂(肝素等)的培养基使实质上不与抗凝剂(肝素等)接触的条件下从骨髓液等中分离出细胞进行增殖。所谓“不含或者以极低浓度包含抗凝剂”,是指作为抗凝剂不含有效量的抗凝剂。具体地,例如如果为肝素、其诱导体,则通常作为抗凝剂的有效量为约20-40 $\mu$ /mL左右,在发明人开发出的方法中,通过将预先添加到用于试样采集的采血管中的量设为最小限度,从而从生物体采集的试样中的量变为小于5U/mL,优选小于2U/mL,进一步优选小于0.2U/mL,在培养细胞时培养基中存在的量相对于培养基的溶剂而言,变为小于0.5U/mL,优选小于0.2U/mL,进一步优选小于0.02U/mL(参见W02009/034708号)。

[0057] 培养基中的细胞密度对细胞的性质及分化的方向性产生影响。在间充质干细胞的情况下,如果培养基中的细胞密度超过8,500个/cm<sup>2</sup>,细胞的性质将会发生变化,因此优选以至多8,500个/cm<sup>2</sup>以下的方式进行传代培养,更优选在达到5,500个/cm<sup>2</sup>以上的时间点进行传代培养。

[0058] 本申请的发明人开发出的前述方法中,由于使用含有人血清含有培养基,考虑到血清供体的负担,优选尽可能减少培养基更换的次数,例如,至少每周进行1次、更优选每周进行1~2次的培养基更换。

[0059] 就培养而言,重复进行传代培养直到细胞的总数成为10<sup>8</sup>个以上。需要的细胞数可以根据使用目的而变化,认为用于治疗例如脑梗塞等缺血性脑疾病的移植所需的间充质干细胞的数量为10<sup>7</sup>个以上,本发明中为10<sup>6</sup>个以上。根据本申请的发明人开发的方法,在12天左右可以得到10<sup>7</sup>个间充质干细胞。

[0060] 根据需要,可以通过冷冻保存等方法(例如,在-152℃的深冻冰箱中)保存增殖后的间充质干细胞直至使用。冷冻保存中,使用包含血清(优选人血清,更优选自体血清)、葡聚糖、DMSO的培养基(RPMI等哺乳动物细胞用的培养基)作为冷冻保存液。例如,可以在包含进行了通常的过滤灭菌的RPMI 20.5mL和从患者处采集的自体血清20.5mL、葡聚糖5mL、DMSO 5mL的冷冻保存液中将细胞悬浮,并于-150℃进行冷冻保存。例如,作为DMSO,可以使用NIPRO株式会社制的Cryoserv、葡聚糖可以使用大塚制药制的低分子葡聚糖L注射液(LOW MOLECULAR DEXTRAN L INJECTION),但不限于此。

[0061] 如上所述制备的间充质干细胞可以a)向包含间充质干细胞的培养物中添加细胞因子,确认间充质干细胞表达CX3CL1,或者b)确认间充质干细胞表达EGFR及/或ITGA4,由此来确认该间充质干细胞的品质·功能。

[0062] 作为所使用的“炎性细胞因子”,可举出TNF- $\alpha$ 、INF  $\gamma$ 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-

18,其中优选包含TNF- $\alpha$ 、INF  $\gamma$ 、及IL-6,更优选使用TNF- $\alpha$ 、INF  $\gamma$ 、及IL-6的混合物。

[0063] 前述方法还可以进一步包括:确认(细胞因子未添加)培养物中的选自BDNF、VEGF、及HGF中任一者以上的存在的工序。特别地,确认BDNF及/或VEGF的存在是重要的,最重要的是确认BDNF的存在。

[0064] 如果通过添加炎性细胞因子而使间充质干细胞表达CX3CL1,则可以期待该间充质干细胞的炎症调节作用(免疫调节作用)优异,如果间充质干细胞的90%以上表达EGFR及/或ITGA4,则可以期待该间充质干细胞向损伤部位的蓄积能力优异。另外,如果在培养基中存在BDNF、VEGF、及HGF等营养因子中的任意,则可以期待包含神经保护作用高的间充质干细胞,其中BDNF及/或VEGF的存在、特别是BDNF的存在可以是神经保护作用高的MSC的重要指标。间充质干细胞即使未刺激也会分泌BDNF、VEGF及/或HGF,但分泌能力的确认可以评价来自未刺激的细胞的分泌,也可以评价来自炎性细胞因子刺激后的细胞的分泌。

[0065] 就上述CX3CL1、EGFR、ITGA4、BDNF、VEGF、HGF的表达而言,与基因水平相比,优选将蛋白质水平的表达设为指标,为EGFR、ITGA4等细胞表面蛋白质的情况下,从简便性和灵敏性的观点考虑,优选使用流式细胞术(FCM)进行测定,为CX3CL1、BDNF、VEGF、HGF等分泌蛋白的情况下,从简便性和灵敏性的观点考虑,优选使用微珠测定法。

[0066] 2.本发明的药物组合物

[0067] 本发明的药物组合物为向接受支架置入的患者所施予的、用于组织修复·再生的药物组合物。所谓“支架内再狭窄”,是指在PTAS后、由置入支架内的新生内膜增生产生的再狭窄。典型地,再狭窄在支架置入后3~6月后产生,是导致脑梗塞的复发、缺血再发作的重大并发症。本发明的药物组合物是用于预防该支架内再狭窄的药物组合物。

[0068] 所谓“用于组织修复·再生的药物”,是指用于帮助损伤部位修复、或用于由年龄增加而引起的老化的部位修复的药物。组织没有特别限定,例如可以例示出包括脑、脊髓在内的神经系统组织、肾脏、胰腺、肝脏、肠、胃、消化器官、肺、心脏、脾、血管、血液、皮肤、骨、软骨、牙齿、及前列腺等。作为用于组织修复·再生的药物的对象的疾病、损伤,具体而言,可以举出肾损伤、肝损伤、包括糖尿病在内的胰腺损伤、前列腺肥大、高脂血症、包括失语症及认知症在内的高级脑功能损伤、复苏后脑病、包括心绞痛、心肌梗塞在内的缺血性心脏病、脑梗塞、动脉硬化等缺血性脑血管疾病、脊髓损伤等,但不限于这些(参见W02009/034708号)。

[0069] 本发明的药物组合物中含有的间充质干细胞的细胞数量越多越优选,考虑到针对患者的施予时间、培养所需要的时间,显示出效果的最小量是实用的。因此,在本发明的药物组合物的优选方式中,间充质干细胞的细胞数为 $10^6$ 个以上,优选为 $5 \times 10^6$ 个以上,更优选为 $10^7$ 个以上,更优选为 $5 \times 10^7$ 个以上,更优选为 $10^8$ 个以上,进一步优选为 $5 \times 10^8$ 个以上。

[0070] 本发明的药物组合物优选为非经口施予制剂,更优选为非经口全身施予制剂、尤其是静脉内施予制剂。作为适合非经口施予的剂型,可举出溶液性注射剂、悬浮性注射剂、乳浊性注射剂、使用时配置型注射剂等注射剂、移植物等。非经口施予用制剂为水性或非水性的等渗性无菌溶液或悬浮液的形态,例如,可与药理学上允许的载体或者介质等适当组合,制剂化为合适的单元施与形态,具体而言有灭菌水、生理盐水、培养基(尤其是RPMI等用于培养哺乳动物细胞的培养基)、PBS等生理缓冲液、植物油、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、赋形剂、载体(vehicle)、防腐剂、粘结剂等。另外,也可以保持在药物洗脱支架

(Drug Eluting Stent:DES) 等中。

[0071] 作为注射用的水溶液,例如可举出生理盐水、培养基、PBS等生理缓冲液、包含葡萄糖、其他助剂的等渗液,例如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露糖醇、氯化钠等,还可与适当的助溶剂、例如醇(具体而言,乙醇、多元醇、丙二醇、聚乙二醇)、非离子性表面活性剂(例如聚山梨醇酯80、HCO-50等)并用。

[0072] 本发明的药物组合物的初次施予优选在PTAS后的180天以内,更优选在0天~90天,更优选在0天~60天,进一步更优选在0天~30天,但不限于此。

[0073] 3. 本发明的药物组合物的施予对象

[0074] 本发明的药物组合物被施予至接受支架置入的患者。“支架置入”是用于使狭窄的动脉自血管内部进行再开通、用于处置大动脉解离等解离性病变、或者用于在动脉瘤中加强血管而在血管内部插入支架而进行配置·置入的治疗。支架置入为颈动脉支架置入(CAS)和经皮血管成形·支架置入(PTAS)等方法,但不限于此。

[0075] CAS为在颈动脉的狭窄部位置入支架而使血管扩张的治疗方法。PTAS为在血管内插入球囊导管并在狭窄部位或者闭塞部位使球囊膨胀而扩张后、将支架置入而使血管扩张的治疗方法。本发明以有支架内再狭窄的风险的所有接受支架置入的患者为对象。

[0076] 对于患者而言,作为原发病,大多具有动脉粥样硬化、包括心肌梗塞在内的缺血性心脏病、包括脑梗塞及短暂性脑缺血发作(TIA)在内的缺血性脑血管疾病、闭塞性动脉硬化症(ASO)、伯格氏病、全身血管的动脉硬化性病变、包括解离性动脉瘤在内的血管解离性病变、及动脉瘤等。

[0077] [缺血性脑血管疾病]

[0078] 作为缺血性脑血管疾病,例如可举出脑梗塞(例如,动脉粥样硬化性血栓性脑梗塞、脑血栓、脑栓塞、腔隙性脑梗塞、BAD(分支动脉粥样硬化病,Branch Atheromatous Disease)、Trousseau综合征、血液凝固异常、动脉解离、静脉梗塞、血管炎、抗磷脂抗体综合征)、及短暂性脑缺血发作(TIA)等。

[0079] [缺血性心脏病]

[0080] 所谓缺血性心脏病,是由动脉硬化等原因使冠状动脉狭窄或者闭塞、血液无法到达心肌而产生的疾病,例如可举出心肌梗塞。心肌梗塞是指向心脏供给氧、营养的冠状动脉血管发生闭塞、狭窄、血液的流量降低、心肌成为缺血状态而坏死的状态。

[0081] [动脉粥样硬化]

[0082] 所谓动脉粥样硬化,是指由血脂异常、糖尿病、高血压、吸烟、运动不足等引起的动脉硬化,最终动脉的血流被阻断,结果成为引发脑梗塞、心肌梗塞等的原因。

[0083] [血管解离性病变]

[0084] 所谓血管解离性病变,是指解离性动脉瘤等在构成动脉壁的内膜、中膜、外膜中的中膜脆弱化,内膜与外膜解离,结果病变部位的血管仅为外膜而成为容易破裂的状态的病症。

[0085] [动脉瘤]

[0086] 所谓动脉瘤,是指脑动脉瘤、大动脉瘤、腹部大动脉瘤等病变部位的动脉血管壁变薄膨大而成为瘤样状态的病症。

[0087] 4. 本发明的药物组合物的效果

[0088] 本发明的药物组合物减轻炎症反应、抑制新生内膜增生,由此可以预防支架内再狭窄。由此,使伴随支架内再狭窄的脑卒中复发、缺血再发作的发生风险降低,可以实现安全的支架置入。

[0089] 如上所述,已知间充质干细胞具有神经保护、神经新生、轴突再生诱导、血管新生、恢复血脑屏障、髓鞘再生、皮质连接保留、赋予神经可塑性及远距离应答的神经营养因子分泌等效果。与这些效果相关,本申请的发明人确认了间充质干细胞的施予促进心肌梗塞、脑梗塞等缺血性血管疾病中的损伤部位的再生,从而改善运动功能障碍。另外,还确认了间充质干细胞的施予可基于损伤部位(病变部位)中的突触形成和可塑性促进效果来治疗认知症、慢性期的脑梗塞、慢性期的脊髓损伤、神经退行性疾病、精神疾病、高级功能障碍等。因此,可以期待本发明的药物组合物可预防支架内再狭窄,并且对患者具有或者已具有的上述原发病也发挥良好的效果。

[0090] 实施例

[0091] 1. 材料及方法

[0092] (1) 人间充质干细胞的制备

[0093] 根据以往报道来制备人MSC。即,MSC(P2)从Lonza社(Walkersville,MD)购入,用Dulbecco改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium)稀释,添加10%FBS(Life Technologies公司)、2mM L-谷氨酰胺(Sigma-Aldrich公司)、100U/ml青霉素-链霉素(Sigma-Aldrich公司),接种到150mm组织培养皿(IWAKI公司),在5%CO<sub>2</sub>的湿润气氛下于37°C孵育数天。细胞大致达到汇合时,用胰蛋白酶-EDTA溶液(Mediatech Inc.)剥离黏附细胞,以 $1 \times 10^4$ 细胞/ml进行传代培养。由此,用较短培养时间(传代:4次)将MSC增殖至 $1 \times 10^8$ 细胞。将增殖后的MSC分离,在支架插入日,用保存溶液[RPMI(Life Technologies公司)8ml、从各动物中得到的自体血清8ml、低分子葡聚糖L(Otsuka公司)2ml、二甲基亚砜(Nipro公司)2ml]稀释,用冰箱(-80°C)(Sanyo公司)保存直至使用。将不含MSC的保存溶液用作安慰剂。在施予日,在图像下治疗室的床边,在37°C的水浴中将冷冻保存的包含MSC的保存溶液解冻。将 $1.0 \times 10^8$ 个细胞(存活率; $99.6 \pm 0.5\%$ )或安慰剂静脉内施予至各动物。MSC上的表面抗原的表现型为CD34<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup>、及CD105<sup>+</sup>。

[0094] (2) 实验方案

[0095] 在图1中示出实验方案。将体重30~38kg的SPF成年小型猪(Gottingen Minipig, Oriental Yeast Co.,日本东京),在支架插入7天前用100mg/天的阿司匹林和15mg/天的奥美拉唑进行前处理。在支架插入日,将两种支架:Carotid WALLSTENT(注册商标)(Boston Scientific公司,Natick,MA)及Multi-Link 8(注册商标)(Abbott Vascular Company, Abbott Park,IL)分别插入。在支架插入14天后,在血管造影(DAS)及血管内超声波检查(IVUS)之后,在全身麻醉下从右耳静脉将安慰剂或MSC(各 $1.0 \times 10^8$ 细胞)对所有猪进行静脉内施予,将小型猪随机分为安慰剂施予组及MSC施予组这2个实验组。从施予安慰剂或MSC的1天前起,对所有猪每天施予环孢菌素A(10mg/kg,经口)。

[0096] 刚刚施予安慰剂或MSC后及在第1天、第7天、及第28天实施血管造影检查(DSA)及IVUS。在第28天评价后,取出经PTAS的血管及作为对照动脉的对侧颈总动脉(CCA)用于组织学分析。在包括PTAS和DSA及IVUS的随访试验的步骤中,监测生理学参数(表1)。在施予安慰剂或MSC后的支架置入第0天、第1天、第7天及第28天,也进行前述步骤前的使用血液样品的

实验(表2)。

[0097] [表1]

	PTAS (第14天)			第0天			第1天			第7天			第28天		
	安慰剂	MSC	P值	安慰剂	MSC	P值	安慰剂	MSC	P值	安慰剂	MSC	P值	安慰剂	MSC	P值
BW (kg)	35 ± 4	34 ± 4	0.584	37 ± 3	34 ± 2	0.230	36 ± 4	35 ± 3	0.687	37 ± 4	35 ± 3	0.323	40 ± 4	39 ± 3	0.641
BT (°C)	36.0 ± 0.5	36.5 ± 0.4	0.135	36.4 ± 0.8	36.0 ± 0.3	0.668	36.7 ± 0.3	36.8 ± 0.2	0.712	36.8 ± 0.3	36.5 ± 0.5	0.421	36.7 ± 0.4	36.6 ± 0.6	0.630
sBP (mmHg)	98 ± 5	103 ± 8	0.277	128 ± 23	120 ± 8	0.516	110 ± 8	117 ± 12	0.372	113 ± 11	110 ± 13	0.681	113 ± 8	114 ± 22	0.985
dBp (mmHg)	47 ± 3	46 ± 9	0.898	60 ± 20	62 ± 20	0.857	53 ± 17	52 ± 10	0.929	55 ± 13	53 ± 17	0.872	60 ± 18	49 ± 9	0.259
HR (bpm)	99 ± 10	98 ± 14	0.839	110 ± 16	103 ± 20	0.584	97 ± 9	100 ± 9	0.581	98 ± 14	98 ± 7	0.978	93 ± 17	100 ± 14	0.482
SpO <sub>2</sub> (%)	98.8 ± 0.8	99.2 ± 0.4	0.943	98.2 ± 0.4	98.6 ± 0.4	0.545	98.4 ± 1.1	99.0 ± 0.7	0.347	99.0 ± 0.7	98.6 ± 1.1	0.524	99.0 ± 0.4	98.6 ± 1.0	0.523
ACT (秒)	256 ± 25	256 ± 62	0.985	282 ± 51	295 ± 67	0.818	273 ± 57	266 ± 59	0.857	259 ± 45	264 ± 78	0.455	252 ± 26	253 ± 36	0.850
pH	7.50 ± 0.04	7.49 ± 0.02	0.717	7.50 ± 0.02	7.52 ± 0.02	0.373	7.51 ± 0.04	7.52 ± 0.08	0.883	7.46 ± 0.05	7.5 ± 0.1	0.913	7.49 ± 0.05	7.50 ± 0.05	0.652
pO <sub>2</sub> (mmHg)	150 ± 16	138 ± 14	0.585	163 ± 90	138 ± 33	0.605	147 ± 59	127 ± 51	0.591	144 ± 54	115 ± 30	0.318	141 ± 34	110 ± 29	0.163
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	40 ± 2	42 ± 2	0.352	39 ± 3	39 ± 1	0.744	38 ± 4	39 ± 4	0.818	46 ± 6	44 ± 6	0.476	45 ± 2	41 ± 6	0.236
HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	31 ± 1	31 ± 2	0.837	30 ± 3	32 ± 2	0.422	30 ± 2	31 ± 3	0.492	32 ± 3	34 ± 3	0.458	34 ± 3	34 ± 4	0.857

[0098]

[0099] 表1:生理学的参数

[0100] [表2]

	支架置入 (第14天)			第0天 (施予安慰剂或MSC)			第1天			第7天			第28天		
	安慰剂	MSC	P值	安慰剂	MSC	P值	安慰剂	MSC	P值	安慰剂	MSC	P值	安慰剂	MSC	P值
WBC (10 <sup>9</sup> /μL)	60 ± 13	63 ± 10	0.791	57 ± 20	52 ± 13	0.677	79 ± 40	69 ± 17	0.612	75 ± 29	59 ± 12	0.273	68 ± 15	76 ± 11	0.406
RBC (10 <sup>9</sup> /μL)	435 ± 60	489 ± 63	0.216	472 ± 30	487 ± 52	0.587	415 ± 82	443 ± 66	0.565	397 ± 80	449 ± 87	0.363	477 ± 48	525 ± 63	0.220
Hb (g/dL)	8.6 ± 1.3	9.8 ± 0.7	0.107	9.7 ± 0.3	10.1 ± 0.6	0.239	8.5 ± 1.4	9.3 ± 1.1	0.296	8.2 ± 1.6	9.4 ± 1.3	0.229	9.9 ± 1.0	11.0 ± 1.0	0.114
PLT (10 <sup>9</sup> /μL)	54 ± 4	52 ± 3	0.585	47 ± 12	43 ± 8	0.596	38 ± 19	39 ± 4	0.962	63 ± 14	65 ± 8	0.766	51 ± 15	53 ± 13	0.868
T-Bil (mg/dL)	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.347	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.524	0.5 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.329	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.448	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.784
AST (U/L)	32 ± 28	20 ± 8	0.417	22 ± 6	19 ± 4	0.322	27 ± 10	30 ± 6	0.572	24 ± 6	24 ± 6	0.957	21 ± 6	23 ± 6	0.498
ALT (U/L)	30 ± 19	29 ± 3	0.890	36 ± 13	33 ± 6	0.654	45 ± 22	41 ± 4	0.641	39 ± 19	35 ± 9	0.679	29 ± 8	30 ± 9	0.775
LDH (U/L)	361 ± 66	359 ± 26	0.945	376 ± 57	349 ± 73	0.520	554 ± 212	486 ± 161	0.587	422 ± 38	432 ± 104	0.84	338 ± 82	274 ± 121	0.353
ALP (U/L)	150 ± 25	162 ± 54	0.689	153 ± 24	161 ± 47	0.742	272 ± 75	180 ± 26	0.412	128 ± 77	150 ± 49	0.601	153 ± 28	152 ± 61	0.992
Alb (g/L)	4.4 ± 0.3	4.2 ± 0.2	0.355	4.5 ± 0.5	4.4 ± 0.2	0.667	4.3 ± 0.5	4.3 ± 0.1	1.000	4.4 ± 0.5	4.3 ± 0.3	0.726	4.4 ± 0.5	4.5 ± 0.2	0.930
T-cho (mg/dL)	76 ± 27	76 ± 26	0.982	92 ± 42	74 ± 12	0.387	60 ± 23	60 ± 15	0.975	74 ± 18	77 ± 26	0.806	84 ± 34	71 ± 14	0.454
BUN (mg/dL)	4.3 ± 0.8	4.8 ± 1.1	0.491	5.6 ± 2.5	5.8 ± 0.4	0.825	8.3 ± 1.6	10.2 ± 2.1	0.172	5.5 ± 0.7	4.8 ± 2.5	0.615	4.2 ± 1.5	5.5 ± 2.4	0.325
Cre (mg/dL)	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.855	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.406	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.000	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.372	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.3	0.654
Na (mmol/L)	144 ± 2	144 ± 1	0.855	145 ± 3	144 ± 2	0.608	145 ± 1	145 ± 3	0.802	145 ± 4	144 ± 3	0.595	144 ± 3	144 ± 2	1.000
K (mmol/L)	3.6 ± 0.3	3.4 ± 0.2	0.218	3.5 ± 0.4	3.6 ± 0.2	0.914	3.7 ± 0.6	3.6 ± 0.1	0.638	4.0 ± 0.4	3.7 ± 0.5	0.265	4.0 ± 0.2	3.9 ± 0.5	0.666
Cl (mmol/L)	101 ± 3	100 ± 1	0.608	102 ± 5	100 ± 5	0.562	103 ± 2	101 ± 5	0.445	100 ± 4	100 ± 2	0.676	99 ± 3	98 ± 4	0.689
PT (秒)	12.4 ± 0.5	12.1 ± 0.6	0.518	11.5 ± 2.3	12.5 ± 0.9	0.406	12.8 ± 0.6	12.8 ± 1.0	0.941	12.3 ± 0.7	12.5 ± 0.8	0.787	12.5 ± 0.7	11.5 ± 2.0	0.314
APTT (秒)	22 ± 3	24 ± 6	0.546	25 ± 1	29 ± 8	0.327	25 ± 6	26 ± 6	0.939	17 ± 8	25 ± 9	0.204	23 ± 6	25 ± 6	0.525
Fib (mg/dL)	157 ± 76	124 ± 31	0.398	123 ± 67	127 ± 36	0.914	211 ± 48	246 ± 21	0.176	163 ± 48	161 ± 76	0.584	215 ± 168	195 ± 78	0.818

[0101]

[0102] 表2:血液样品数据

[0103] (3) 支架置入(PTAS)

[0104] 在全身麻醉下进行支架置入。在手术前12小时使动物断食。通过肌肉注射氯胺酮(10mg/kg)、右美托咪啶盐酸盐(0.03mg/kg)及咪达唑仑盐酸盐(0.18mg/kg)进行麻醉诱导,介由插管吸入异氟烷(0.5-5%),由此维持麻醉,使痛苦为最小限度。手术中,静脉内施予乳酸林格氏液(5-10ml/kg/小时)。

[0105] 使用单一的血管造影系统(Infinix Celeve-i;Toshiba Medical System公司,日本东京)进行支架置入。通过超声波诱导穿刺将5-F无鞘导引导管插入右股动脉。接下来,使5-F无鞘导引导管前进,配置于作为人的颈动脉模型的右侧CCA(图1B,箭头)。使用5.0mm的球囊导管进行预扩张以损伤内膜层。用CCA展开Carotid WALLSTENT(注册商标)(10×24mm),使用5.0mm的球囊导管进行主扩张。在支架展开后,利用IVUS确认装置完全扩张。接

下来,作为人大脑动脉模型,将导引导管配置在的浅颈动脉内(SCA,图1B,箭头的头部)。使用3.0mm的球囊导管进行造影,在动脉中展开MULTI-LINK8(注册商标)(3.0×23mm),使用3.0mm球囊导管进行预扩张。利用IVUS进行确认。

[0106] 对所有小型猪在静脉内施予2000~3000单位的肝素,以维持250~300秒的活化凝血时间。将动物置于温水再循环加热垫上。生理参数中的心率(HR)、收缩期动脉血压(sBP)及舒张期动脉血压(dBP)、体温(BT)及氧饱和度(SaO<sub>2</sub>)介由食道探测针进行连续测定。

[0107] (4) 血管造影观察结果的评价

[0108] 使用单一的血管造影系统来得到血管造影图像。该步骤在全身麻醉下进行。通过超声波诱导穿刺将4-F无鞘导引导管插入股动脉。接下来,使4-F无鞘导引导管前进而配置在支架置入动脉内,选择性地进行造影剂的施予。使用NIH Image J plug-in“Neuro J”长度分析工具(version 1.39,National Institutes of Health,Bethesda,Maryland)进行初始及随访研究血管造影的定量分析。狭窄率规定为支架中央部中的新生内膜的厚度的百分比:(1-管腔径/支架直径)×100。全部的初始及随访测定以前方-后方投影来实施。

[0109] (5) IVUS观察结果的评价

[0110] 在取得血管造影图像后,使用IVUS导管(TVC Imaging System,MC8,InfraRedx Inc.)来得到IVUS图像。使用4-F无鞘导引导管使0.014英寸导丝前进至置入的支架的远端,并将3.2F快速交换导管插入到导丝上。在施予200μg硝酸甘油后,取得IVUS图像。狭窄率规定为支架中央部中的新生内膜的厚度的百分比:(1-管腔径/支架直径)×100。

[0111] (6) 组织学的观察结果

[0112] 在评价项目中,对动物进行处置以用于组织学分析(图1A)。用生理盐水及0.1M磷酸缓冲液(5升)进行心脏内灌注。然后,除去支架置入的血管及对侧CCA(作为对照动脉),并用4%多聚甲醛将组织固定。将该容器包埋在甲基丙烯酸-2-羟乙酯和甲基丙烯酸甲酯单体的混合树脂中。用烧结碳化钨刀(RM2245,Leica公司,德国)切下支架或正常血管的中心部的切片,用苏木精·伊红(New Histology Science Laboratory Corporation,日本东京)染色。通过光学显微镜(BX51,Olympus公司)对切片进行评价。

[0113] 进行包括新生内膜面积及炎症评分(%)在内的组织学分析。在支架周围及内膜上测定新生内膜区域。新生内膜面积的比例定义为新生内膜面积/支架面积×100。使用炎症评分来评价各个支柱中的炎性浸润的程度及密度。评价如下,0:支柱周围无炎症细胞,1:支柱周围有轻微的非圆形淋巴组织增殖性浸润,2:非圆形地包围在支柱周围的局部的中度~高密度的细胞聚集体,3:在支柱周围有密度高的淋巴细胞增殖性细胞浸润。

[0114] (7) 统计分析

[0115] 所有统计分析使用Windows(SAS Institute Inc.,Cary,NC)的JMP12.2进行。为了多次比较由血管造影图像和IVUS图像测定的狭窄率,在重复测定方差分析(ANOVA)后,实施Sidak post hoc测试。通过student t检验来分析组间差异。误差线表示平均值±SD。认为P值<0.050看作统计学上显著。

[0116] 2. 结果

[0117] 对10只动物而言,实施向CCA的Carotid WALLSTENT(注册商标)插入和向SCA的Multi Link8(注册商标)移植。全部动物在处置后存活,保持健康直至本试验的终点。

[0118] (1) 血管造影观察结果

[0119] 由于在第0天施予安慰剂或MSC前通过血管造影检查,确认了置入Multi Link 8 (注册商标)的1个SCA的闭塞,因此分析了置入Carotid WALLSTENT (注册商标)的10个CCA (安慰剂:n=5, MSC:n=5)、和置入Multi Link 8 (注册商标)的9个SCA (安慰剂:n=4, MSC:n=5)。在安慰剂施予组和MSC施予组之间,支架插入前的CCA和SCA的直径没有显著差异 (CCA, 安慰剂:4.82±0.09mm, MSC:4.82±0.22mm, p=0.699, SCA, 安慰剂:2.83±0.38mm, MSC:2.68±0.16mm, p=0.424)。在第0天施予安慰剂或MSC前,CCA及SCA各自的狭窄率没有差异 (CCA, 图2A、B、E, 安慰剂:8.4±3.7%, MSC:8.8±1.7, p=0.878, SCA, 图2C、D、F, 安慰剂:6.8±2.3%, MSC:6.8±2.7%, p=0.995)。

[0120] 在施予安慰剂或MSC后,狭窄率没有统计差异,但在第1天及第7天在安慰剂及MSC组这两者中均观察到由于CCA及SCA的支架置入引起的进行性狭窄 (图2)。在施予安慰剂或MSC后第28天, MSC施予组的狭窄率在CCA及SCA这两者中均低于安慰剂组的狭窄率 (CCA, 图2A、B、E, 安慰剂:35.9±8.0, MSC:34.6±2.7, p=0.028, SCA, 图2C、D、F, 安慰剂:24.2±3.7%, MSC:16.8±4.2%, p=0.044)。通过血管造影分析,揭示了静脉内施予MSC可预防由CCA及SCA的支架移植诱发的新生内膜增生。

#### [0121] (2) IVUS观察结果

[0122] 利用IVUS对置入了Carotid WALLSTENT (注册商标)的10个CCA (安慰剂:N=5, MSC:n=5)及置入了Multi Link8 (注册商标)的9个SCA (安慰剂:n=4, MSC:N=5)进行分析。在第0天的施予安慰剂或MSC前,CCA及SCA的狭窄率没有显著差异 (CCA, 图3A、B、E, 安慰剂:8.8±2.1%, MSC:9.0±2.7, p=0.892, SCA, 图3C、D、F, 安慰剂:7.0±2.2%, MSC:7.4±2.2%, p=0.857)。

[0123] 施予安慰剂或MSC后,第1天及第7天的2组间的狭窄率没有统计差异,但在施予安慰剂或MSC后的第28天,在MSC施予组中的支架置入的CCA及SCA的狭窄率显著低于安慰剂施予组 (CCA, 图3A、B、E, 安慰剂:27.6±6.1%, MSC:18.7±4.1, p=0.892, SCA, 图3C、D、F, 安慰剂:19.0±3.3%, MSC:12.0±3.2%, p=0.025)。利用IVUS分析,证实静脉内施予MSC预防可由支架插入引起的新生内膜增生。

#### [0124] (3) 组织学的观察结果

[0125] 在安慰剂或MSC施予后第28天,对置入了Carotid WALLSTENT (注册商标)的10个CCA (安慰剂:n=5, MSC:n=5)、置入了Multi Link 8 (注册商标)的9个SCA (安慰剂:n=4, MSC:n=5)进行分析。在由对侧CCA得到的对照动脉中,在安慰剂施予组及MSC施予组这两者中均观察到新生内膜增生 (图4A、D)。在置入了Carotid WALLSTENT (注册商标)的CCA中,利用苏木精·伊红 (HE) 染色,在安慰剂施予组中观察到新内膜增生,但在MSC施予组中新内膜增生降低 (图4B、E、G, 安慰剂:49.4±10.3, MSC:38.0±3.8%, p=0.483)。在置入了Multi Link 8 (注册商标)的9个SCA中观察到同样的结果 (图4C、F、H, 安慰剂:49.4±9.3%, MSC:33.1±4.3%, p=0.010)。

[0126] 为了分析动脉壁中的炎症细胞浸润,使用高倍率HE染色图像。在对照动脉中,在安慰剂施予组与MSC施予组这两者中,均观察到动脉壁的炎症细胞 (图5A、D)。然而,在Carotid WALLSTENT (注册商标) (图5B)和Multi Link 8 (注册商标) (图5C)这两者中,在安慰剂施予组中,在支柱周围发现大量浸润炎症细胞。然而,在MSC施予组中,在Carotid WALLSTENT (注册商标) (图5E)和Multi Link 8 (注册商标) (图5F)这两者中,支柱周围的浸润炎症细胞的

水平少于安慰剂施予组。定量分析的结果为, MSC施予组中的CCA及SCA的平均炎症评分显著低于安慰剂施予组 (CCA, 图5B、E、G, 安慰剂:  $1.83 \pm 0.18$ , MSC:  $1.39 \pm 0.14$ ,  $p=0.002$ , SCA, 图5C、F、H, 安慰剂:  $1.89 \pm 0.22$ , MSC:  $1.40 \pm 0.15$ ,  $p=0.005$ )。如此, 利用组织学分析, 证实了静脉内施予MSC可防止新生内膜增生及炎症细胞对Carotid WALLSTENT (注册商标) 及Multi Link8 (注册商标) 的浸润。

### [0127] 3. 考察

[0128] 本研究中, 使用小型猪的CCA和SCA验证了MSC可减轻对支架支柱的炎症反应从而阻碍新生内膜增生的假设。小型猪的CCA及SCA的直径各自类似于人CCA及MCA。利用两者的血管造影及IVUS分析显示出静脉内施予MSC减少了置入Carotid WALLSTENT (注册商标) 的CCA和置入Multi Link 8 (注册商标) 的SCA任一者中支架内狭窄的水平。此外, 利用组织学检查, 证实了在置入了支架的CCA及SCA这两者中, 与安慰剂施予组相比, MSC施予组阻碍了支架支柱周围的炎症反应。

[0129] 在本研究中, 所有动物中均观察到在置入了支架的CCA及SCA中的新生内膜增殖, 但在MSC施予组中, 新生内膜的厚度比安慰剂施予组薄 (图4)。报道了支架置入后的炎症反应有助于新生内膜形成, 引发支架内再狭窄。由白细胞介素 (IL) -1、及浸润单核细胞和巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等炎性因子在早期炎症反应及支架置入后的新生内膜增殖中有重要作用。具体而言, 基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 升高后, IL-1及TNF- $\alpha$ 的分泌在支架置入后至少持续3个月, MMP-9的活化有助于细胞外基质的一些成分的分解, 使置入了支架的血管内壁中的分子表达发生变化, 导致新生内膜增生及支架内再狭窄。因此, 如果使支架支柱周围炎症反应减少并防止MMP-9的活化, 则可阻碍支架内再狭窄。

[0130] 本申请的发明人以前的研究中显示, 静脉内施予MSC抑制MMP-9的活化。MSC介由IL-1及TNF- $\alpha$ 级联来分泌下述这样的抗炎因子: 阻碍MMP-9的活化的TNF- $\alpha$ 刺激基因/蛋白质6 (TSG-6)、及抑制MMP-9活化的转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ 1)。实际上, 利用ELISA分析, 本申请的发明人的研究中使用的人MSC在体外 (in vitro) 分泌TGF- $\beta$ 1 ( $93.34 \pm 12.65$ PG/ $1.0 \times 10^4$ 细胞,  $N=3$ )。此外, 最近的研究还显示, 当MSC暴露于炎症环境时, 其可以介由包含免疫抑制分子、外泌体及趋化因子的各种介质的释放来调节免疫应答。简而言之, 静脉内施予MSC可阻碍支架支柱周围的炎症反应, 并预防新生内膜增生及支架内再狭窄。

[0131] 主要的大脑动脉、颈动脉中的动脉硬化性病变成脑卒中的原因, 并与约5%至20%的缺血性脑卒中相关。对于具有神经病变的这些患者, 为了预防后续神经病变及复发性同侧脑卒中, 在脑卒中发作后进行支架置入。静脉内施予MSC被认为是缺血性脑卒的新疗法。认为接受CAS或PTAS的缺血性脑卒中患者将来也可以通过静脉内施予MSC来进行治疗。静脉内施予MSC可以改善神经症状, 并预防支架内狭窄及复发性脑卒中。本研究鼓励了可改善经支架置入的脑卒中患者的功能结果的本方案。

[0132] MSC的静脉施予已知为用于急性期脊髓损伤患者的用于组织修复·再生的药物, 但其对支架置入患者的影响仍未知。通过本研究的结果确认了MSC静脉施予对支架置入患者没有不良影响, 相反, 具有阻碍血管内再狭窄的效果。由此, 向经支架置入的急性期脊髓损伤患者静脉施予MSC成为可能。

### [0133] 产业上的可利用性

[0134] 通过本发明, 向接受支架置入的患者施予包含MSC的用于组织修复·再生的药物

组合物成为可能。包含MSC的药物组合物可防止置入了支架的血管内的新生内膜增生的发展,可预防PTAS后的再狭窄。

[0135] 在本说明书中引用的全部出版物、专利及专利申请均直接作为参考而并入本说明书中。

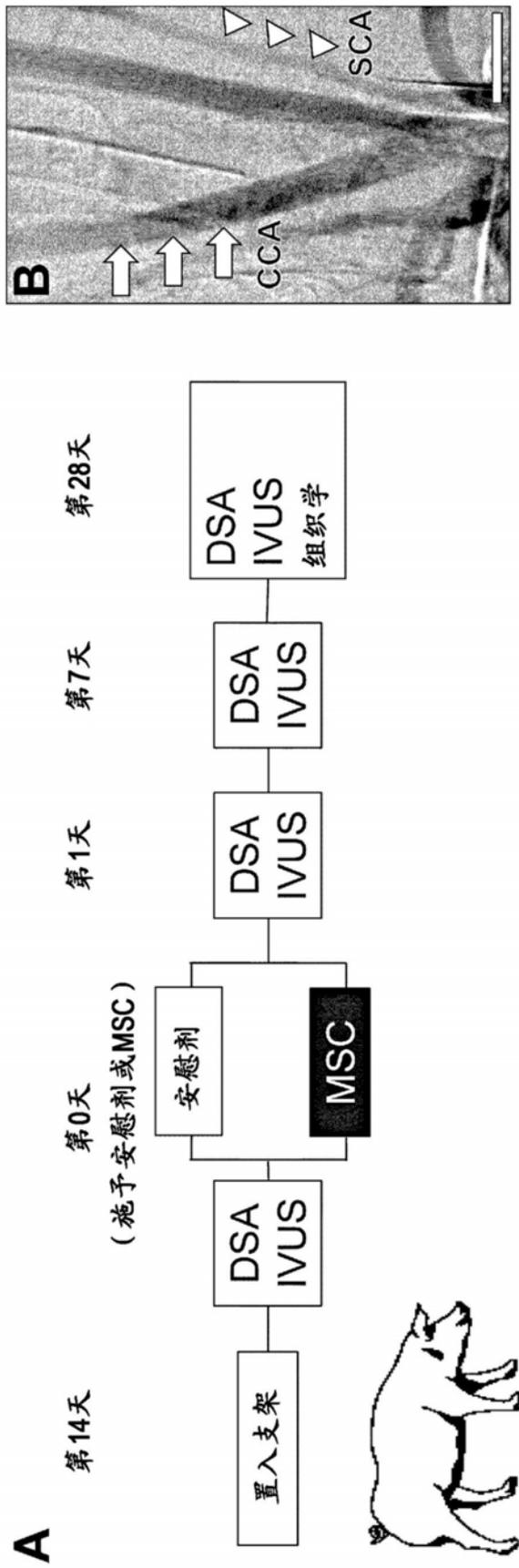


图1

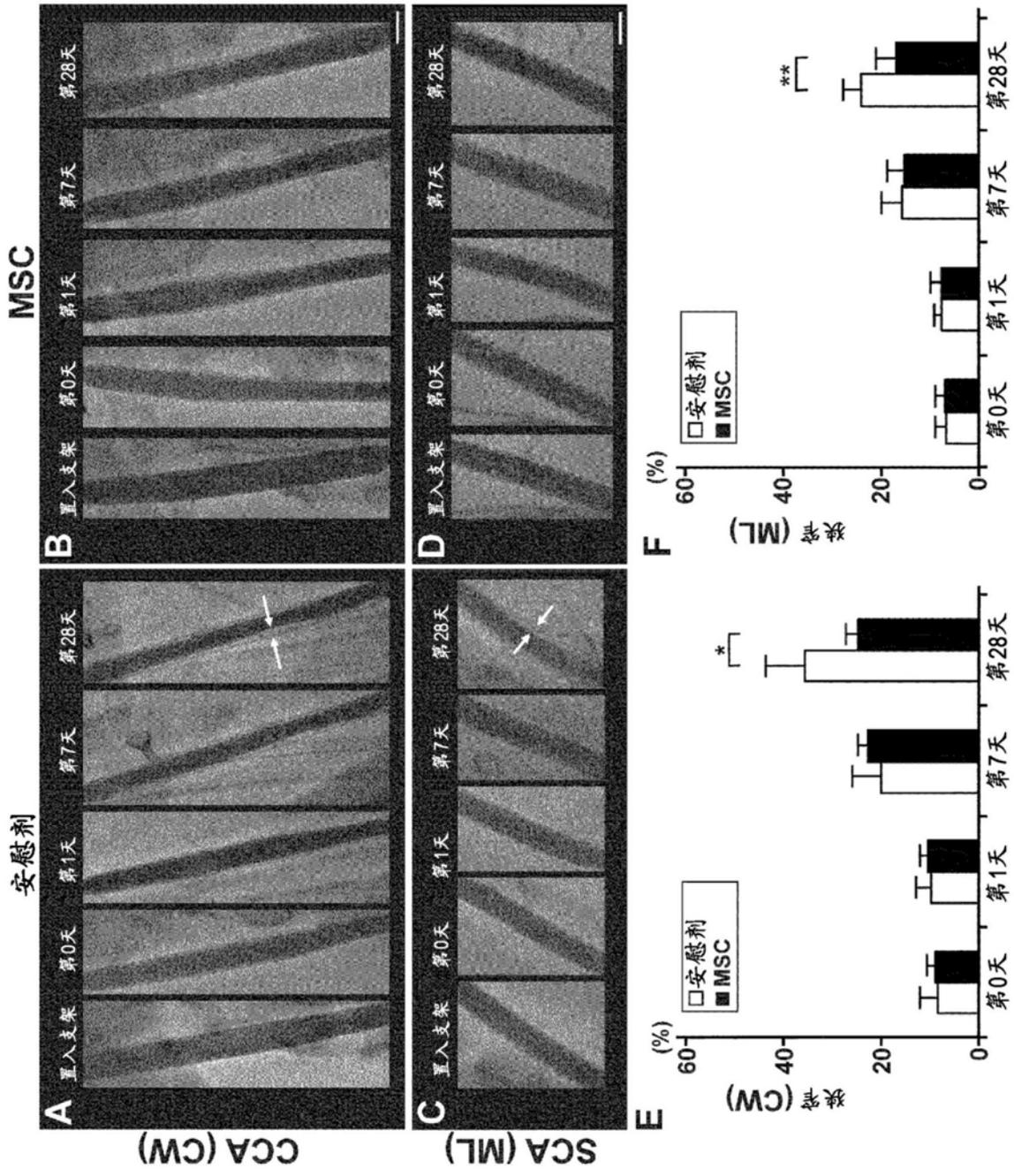


图2

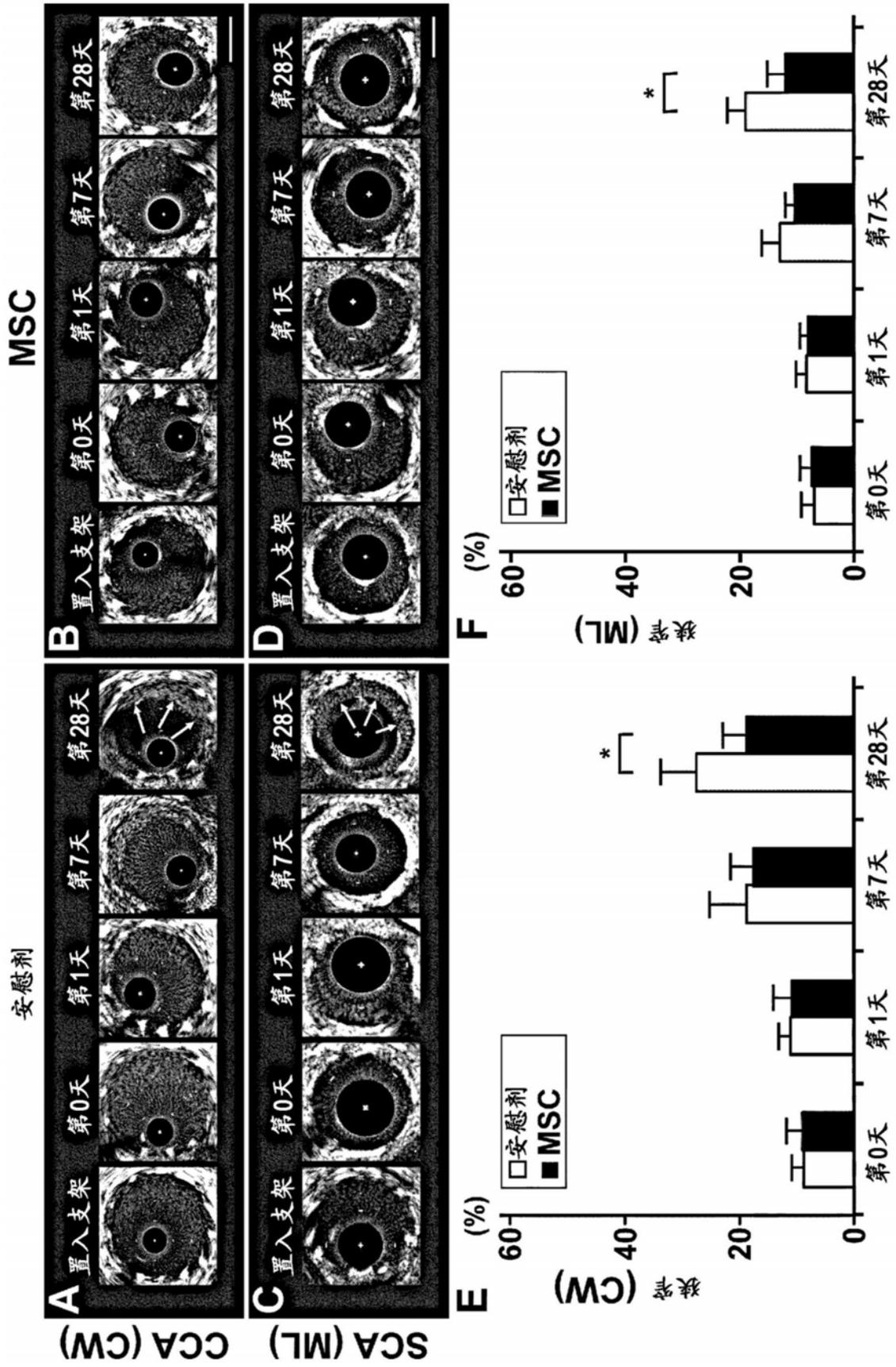


图3

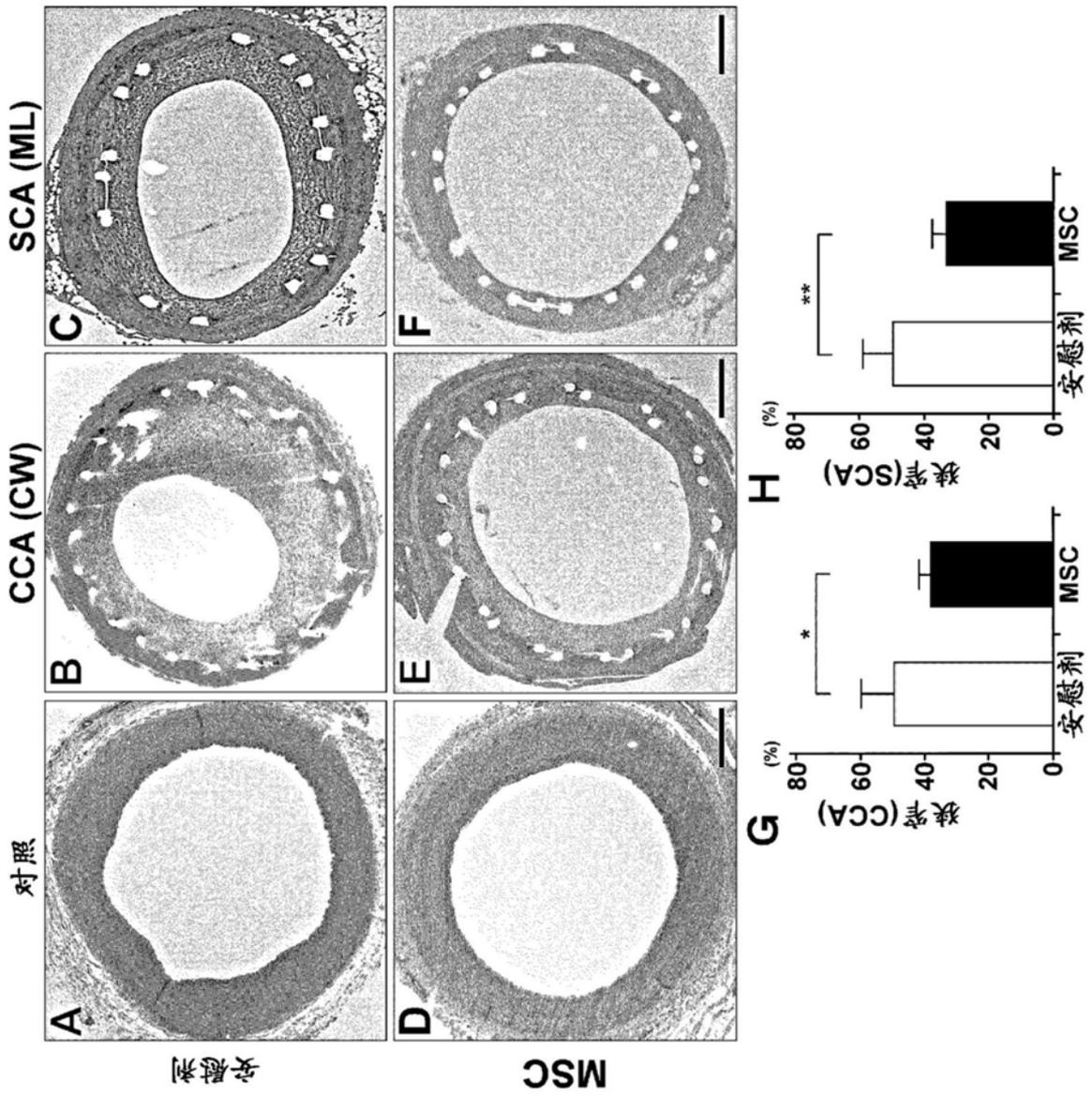


图4

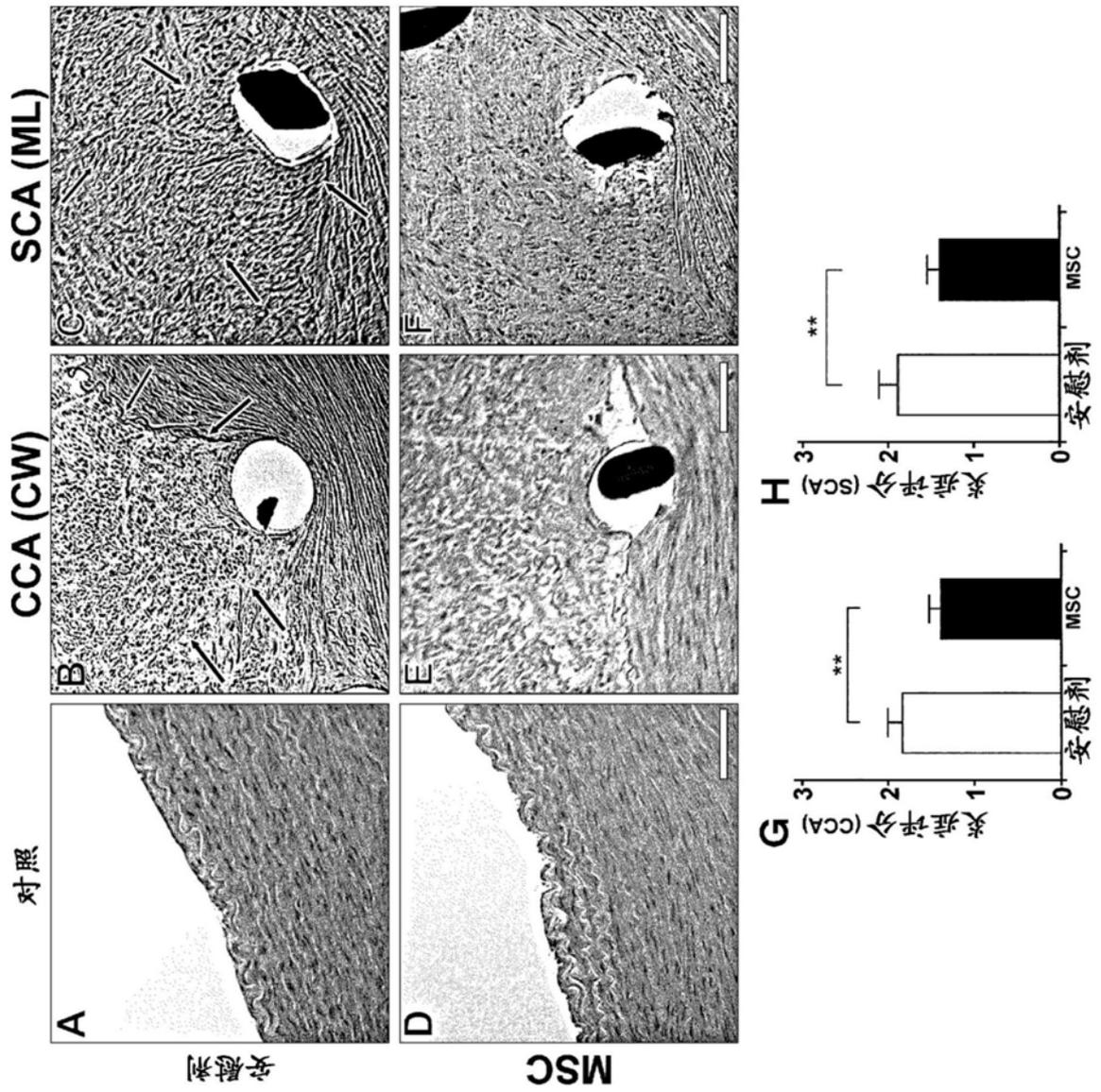


图5