(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110168077 B
(45)授权公告日 2024.06.14

(21)申请号 201780066959.7

(22)申请日 2017.08.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110168077 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(30)优先权数据
16382405.5 2016.08.26 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.04.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/071580 2017.08.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/037134 EN 2018.03.01

(73)专利权人 雷克斯吉尼罗生物科学公司
地址 西班牙塞维利亚
专利权人 安达卢西亚健康服务部
安达卢西亚进步与健康公共基金会

(72)发明人 乔纳森·罗伯特·巴克利·杜佩雷
利斯贝特·德·乔
埃德温·J·瓦格纳

(74)专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224
专利代理师 刘培培 黄爱娇

(51)Int.Cl.
C12N 5/078(2006.01)
C12N 5/0789(2006.01)

(56)对比文件
US 2011/0076255 A1,2011.03.31
CN 102186970 A,2011.09.14
BELAJ KLARA et al.Association of the derived neutrophi-lymphocyte ratio with critical limb Ischemia.《Angiology》.2016,第67卷(第4期),第352页 1栏,第2段;图1.
Gary et al.Lymphocyte-to-monocyte ratio: a novel marker for critical limb ischemia in PAOD patients.《International Journal of Clinical Practice》.2014,第68卷(第2期),第1484页 2栏,第2段;图1;表2.
Gary Thomas et al.Platelet-to-Lymphocyte ratio: A novel marker for critical limb Ischemia in Peripheral arterial occlusive disease patients.《PLOS ONE》.2013,第8卷(第7期),第2页2栏,第3段;表2,3.
Gary Thomas et al.Neutrophil-to-Lymphocyte ratio and its association with critical limb Ischemia in PAOD patients.《PLOS ONE》.2013,第8卷(第2期),第2页2栏,第3段;表2,3.
Holger Lawall et al.Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy.《Journal of Vascular Surgery》.2010,第53卷(第2期),图1,2;表1.
(续)

审查员 陈永强

权利要求书2页 说明书34页 附图6页

(54)发明名称

用于治疗下肢外周动脉疾病的细胞悬液

(57)摘要

本发明涉及自体或同种异体的,优选自体的骨髓衍生的成体白细胞的细胞悬液,所述骨髓衍生的成体白细胞优选来源自髂骨的嵴(或髂嵴),所述细胞悬液富含单核细胞,意指细胞悬液中存在的多于25%的白细胞(WBC)是单核细胞,所述细胞悬液包含:A.选自包含或由以下组成的表单的单核细胞(MNC):i.淋巴细胞群;ii.单核白细胞群;和iii.表达CD34的造血干细胞群;其中细胞悬液还包括:B.粒细胞;所述细胞悬液用于治疗或改善下肢外周动脉疾病。

CN 110168077 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Eriko Tateishi-Yuyama et al.Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial.《Lancet》.2002,第360卷(第9331期),第427-435页 摘要,病人和方法,结果,讨论部分.

1.一种细胞悬液,其包含来源于人对象骨髓的4×10^8个至1.2×10^9个自体或同种异体白细胞,其中,在总数为4×10^8个至1.2×10^9个的白细胞中:

i. 20%至51%是淋巴细胞,并且3.9%至22.3%是单核白细胞;

ii. 1.4%至10%是表达CD34的造血干细胞;

iii. 白细胞总数的25.3%至83.3%是单个核的细胞;

iv. 16.7%至74.7%是粒细胞;

v. 白细胞总数的5.4%至38.8%表达CXCR4;

vi. 白细胞总数的0.07%至24.7%表达VEGFR2;

vii. 在表达CD34的造血干细胞总数中,7.7%至55.5%是不表达CD38的早期未定型造血干细胞,0.7%至10.3%是表达CD34和CXCR4的干细胞;和

viii. 红细胞与白血球细胞的最大比例为6.7,血小板与白血球细胞的最大比例为32,

所述细胞悬液用于治疗或改善无法选择使用手术旁路或血管内方法进行血运重建的患者的下肢外周动脉疾病。

2.根据权利要求1所述的细胞悬液,其特征在于,所述白细胞总数中的32.3%至80.0%是选自由表达CD34细胞的淋巴细胞、单核白细胞和造血干细胞组成的表单,并且20.0%至67.7%是粒细胞。

3.根据权利要求1所述的细胞悬液,其特征在于,所述细胞悬液包含5×10^8个至1.2×10^9个。

4.根据权利要求1所述的细胞悬液,其特征在于,所述细胞悬液包含8×10^8个至1.2×10^9个。

5.根据权利要求1所述的细胞悬液,其特征在于,所述细胞悬液包含9×10^8个至1.1×10^9个。

6.根据权利要求1所述的细胞悬液,其特征在于,所述细胞悬液包含9.5×10^8个至1.05×10^9个。

7.根据权利要求1所述的细胞悬液,其特征在于,所述细胞悬液包含9.8×10^8个至1.02×10^9个。

8.根据权利要求1所述的细胞悬液,其特征在于,所述细胞悬液中的细胞悬浮在体积为5mL至30mL的肝素化盐水溶液中。

9.根据权利要求8所述的细胞悬液,其特征在于,所述细胞悬液中的细胞悬浮在包含1% HSA和2.5%葡萄糖的乳酸林格氏溶液中。

10.一种注射器,其包含根据权利要求1至9中任一项所述的细胞悬液。

11.一种根据权利要求1至9中任一项所述的细胞悬液的制造方法,包括:

a.过滤人类对象的骨髓(BM),以去除任何小骨碎片并防止在后续步骤中阻塞;

b. 通过使用Sepax 2.0装置上的SmartRedux程序和相关的无菌一次性SmartRedux试剂盒(CS-490.1)减少初始BM体积;

c. 在步骤b)中获得的体积减小的BM,然后通过进行NeatCell密度梯度离心来进行自动密度梯度离心,然后使用洗涤溶液洗涤单个核的细胞(MNC)悬液两次;

d. 收集步骤c)的产物并将所述产物过滤到无菌falcon管中;和

e. 然后用洗涤溶液冲洗BM产物并过滤以改善MNC(单个核的细胞)回收。

12.根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述洗涤溶液由2%至4％HAS的盐水溶液组成。

13.根据权利要求12所述的方法,其特征在于,所述盐水溶液为药用级。

14.根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述方法包括将所述BM产物的最终体积调节至40mL至60mL。

15.权利要求1至9中任一项所述的细胞悬液在制备用于治疗或改善无法选择使用手术旁路或血管内方法进行血运重建的患者的下肢外周动脉疾病的药物中的用途。

16.权利要求1至9中任一项所述的细胞悬液在制备用于治疗或改善无法选择使用手术旁路或血管内方法进行血运重建的患有糖尿病的患者的下肢外周动脉疾病的药物中的用途。

17.根据权利要求15或16所述的用途,其特征在于,所述下肢外周动脉疾病是严重肢体缺血。

用于治疗下肢外周动脉疾病的细胞悬液

技术领域

[0001] 本发明涉及成人骨髓源性细胞的细胞悬液,其可用于治疗或改善下肢外周动脉疾病,优选严重的肢体缺血。

背景技术

[0002] 下肢外周动脉疾病(PAD)包括由动脉粥样硬化、血栓栓塞和炎症过程引起的改变下肢动脉的结构和功能的各种血管疾病。然而,PAD的主要原因是动脉粥样硬化。

[0003] 症状性下肢PAD由血流不足导致供氧不足而引起。PAD与其他血管床的动脉粥样硬化血栓形成有关,包括心血管和脑血管系统。糖尿病(下称DM)的存在极大地增加了PAD的风险,加速了疾病的进程,使得糖尿病患者更容易发生缺血事件、血管功能受损、发病率和死亡率增加、以及生活质量受损(QoL)(Thiruvoipati等,2015)。实际上,PAD患者被认为是从无症状到间歇性跛行(IC)患者和CLI(严重肢体缺血)患者的异质性患者群。CLI是指动脉供血不足,使远端灌注压力降低到微循环和血液流向组织和营养受到严重干扰的程度的状态。轻微创伤、溃疡和感染可以共存,从而增加受影响组织的代谢需求,经常导致慢性不愈合性溃疡。它是一种以多级疾病、合并症负担高和寿命有限为特征的进行性疾病。

[0004] 虽然踝臂指数(ABI)用于诊断PAD并且是PAD严重程度的指标,但它与疾病的临床严重程度并不完全相关。因此,使用更广泛的临床症状通过临床实践中常规使用的两种分类系统Rutherford和Fontaine(Hirsch AT,2006)来对PAD的严重程度进行分类。PAD的临床严重程度范围从无症状到需要截肢的坏疽以及肢体缺血。PAD是一种病情的严重程度随着时间的推移而增加的进行性疾病。DM患者疾病进展更快。

[0005] 对PAD的症状以及对作为这些症状的原因的解剖学病变进行分级提供了一种客观测量,通过该测量在临床上追踪对象,并且重要的是,在临床研究中比较医学和介入治疗策略时提供一致性。

[0006] Rutherford分类是用于描述PAD的常用临床分期系统,与Fontaine分类相似,但在血管医学领域的新出版物中更常引用。外周动脉闭塞性疾病通常以Fontaine分期(由René Fontaine于1954年提出)分为从I期(无症状)到IV期(溃疡或坏疽)。由Rutherford于1986年提出并于1997年修订的分类包括四个等级和七个类别,范围从0类(无症状)到6类(严重缺血性溃疡或坏疽)(表1)。

[0007] 表1:PAD的Fontaine和Rutherford分类

[0008]

Fontaine 分类		Rutherford 分类			
Fontaine 等级	临床描述	Rutherford 等级	Rutherford 类别	临床描述	客观标准
I	无症状	0	0	无症状-没有血流动力学上显著的闭塞性疾病	踏车或反应性充血试验正常
II-A	行走 200 多米无痛后间歇性跛行	I	1	轻度跛行	完成踏车运动†；运动后 AP> 50 mm Hg 但比静息值低至少 20 mm Hg
II-B	行走不到 200 米后间歇性跛行	I	2	中度跛行	在第 1 类和第 3 类之间
			3	重度跛行	无法完成标准踏车运动† 并且运动后 AP <50 mm Hg
III	静息痛	II*	4	缺血性静息痛	静息 AP <40 mm Hg，踝关节或跖骨 PVR 平坦或几乎没有脉动；TP <30 mm Hg
IV	溃疡或坏疽	III*	5	轻微组织缺失-不愈合性溃疡，局灶性坏疽伴弥漫性足缺血	静息 AP <60 mm Hg，踝关节或跖骨 PVR 平坦或几乎没有脉动；TP <40 mm Hg
			6	主要组织缺失-延伸超过 TM 水平，功能性足不可挽救	与第 5 类相同

[0009] *术语慢性临界性缺血涵盖II和III级以及第4、5和6类。

[0010] †在12％倾斜时以2英里/小时的速度行驶5分钟。

[0011] AP＝踝压;PVR＝脉搏容积记录;TP＝趾压;TM＝经跖骨。

[0012] CLI是一种以多级疾病、合并症负担高和寿命有限为特征的进行性疾病。泛大西洋介入协会(Trans-Atlantic Inter-Society Consensus,TASC)2007年外周动脉疾病管理文件II(TASCII,2007)建议,术语CLI应该用于所有患有由客观证实的动脉闭塞性疾病而引起的慢性缺血性静息痛、溃疡或坏疽的患者。目前对CLI的定义包括患有继发于肢体血流严重受损的下肢静息痛、溃疡或坏疽持续超过两周的对象。它构成了Rutherford第4至6类(分别

为缺血性静息痛、轻微组织缺失和主要组织缺失)或Fontaine第III级和IV级。

[0013] CLI中潜在疾病的唯一治疗方法是血运重建。然而,由于缺乏活血管、先前手动血运重建手术失败、或合并症,相当一部分群体(估计在群体的50%至90%之间)不适合手动血运重建(手术旁路或血管内手术)。许多CLI患者具有多种可能会阻止他们进行手动血运重建的情况。最终,截肢通常是大部分这些患者剩余的唯一选择,其目的是控制难治性疼痛,预防坏疽进展或对抗感染。因此迫切需要新疗法。

[0014] 目前,对CLI患者的初始治疗通常包括评估受影响的(指数)肢体对通过手术旁路或使用血管内方法进行血运重建的适宜性。针对疾病的现有症状,特别是疼痛、溃疡和感染治疗所有患者。然而,疼痛管理通常是无效的,并且由于缺血性溃疡很少愈合,因此伤口处理通常集中在感染控制、预防恶化和肢体挽救上。CLI的整体治疗目标包括:

[0015] • 疼痛控制。

[0016] • 伤口愈合。

[0017] • 肢体挽救。

[0018] • 改善QoL,包括维持非卧床状态。

[0019] • 降低心脏病总体风险。

[0020] 本发明的细胞悬液特别用于CLI患者,特别是用于无法选择使用手术旁路或血管内方法进行血运重建的患有DM的CLI患者。对于这些患者,未满足的需求是最高的,因为没有治疗潜在疾病的治疗选择。用于这些患者的任何治疗都是症状性的:伤口护理、感染控制和疼痛控制。对于那些不适合手动血运重建的患者,随着疾病的进展,在对进行性坏疽、不受控制的感染或难治性疼痛的应答中,唯一的临床选择可能是截肢。在罹患CLI的PAD患者中,大约25%在一年内死亡(NICE,2012)。根据CLI的严重程度,一年原发截肢率为5%至40%,不适合血运重建、神经功能受损或卧床的患者中发生率最高。

附图说明

[0021] 图1.制造本发明的细胞悬液的流程图。

[0022] 图2.在给药本发明的细胞悬液后第3、6、9和12个月,对照与治疗的对比(包括截肢和死亡)LOCF的Rutherford分类。

[0023] 图3.在本发明的细胞悬液给药后第3、6、9和12个月,三次递增剂量的效果(包括截肢和死亡)LOCF的Rutherford分类。

[0024] 图4.对于对照组和本发明的细胞悬液的三组(剂量)在第3、6、9和12个月Rutherford分类(对象的百分比)的改善。

[0025] 图5.按在第3、6、9和12个月患肢中的溃疡数分类的对象的比例(左图:对照组;右图:本发明的细胞悬液组)。

[0026] 图6.在图6中相对于基线呈现24个出现血管发生的病例中的三个的血管造影图像:动脉的纵向生长(图6A)、出现新血管(图6B)和靶向皮肤的侧支的横向生长(图6C)。

[0027] 图7.本发明的细胞悬液的产品制造过程的流程图。

发明内容

[0028] 本发明所解决的问题是为患有下肢外周动脉疾病(PAD)的患者,优选CLI患者,更

优选无法选择使用手术旁路或血管内方法进行血运重建的患有DM的CLI患者提供改进的替代治疗方案。本发明以如下文所述的方面和优选实施方式所定义的自体或同种异体成人骨髓源性细胞的细胞悬液的形式提供这种改进的替代治疗方案。

[0029] 因此,本发明的第一方面涉及自体或同种异体的,优选自体的成人骨髓源性白细胞的细胞悬液(下文中称为"本发明的细胞悬液"),所述白细胞优选来源自富含单个核的细胞的髂骨的嵴(或髂嵴),这意味着细胞悬液中存在的超过25%的白细胞(WBC)是单个核的细胞,所述细胞悬液包括:

[0030] A.选自包含以下或由以下组成的表单中的单个核的细胞(MNC):

[0031] i.淋巴细胞群;

[0032] ii.单核白细胞群;和

[0033] iii.表达CD34的造血干细胞群;

[0034] 其中细胞悬液还包括:

[0035] B.粒细胞;

[0036] 用于治疗或改善下肢外周动脉疾病。

[0037] 值得注意的是,一般而言,细胞群A)和B)又包含表达CXCR4的细胞群,CXCR4是迁移因子SDF1的受体,在该群体中,重要的是指出表达CD34和CXCR4的造血干细胞亚群的存在。此外,细胞群A)和B)又包含表达VEGFR2的另一细胞群,VEGFR2是参与血管生成和血管发生的血管生成因子VEGF的受体。

[0038] 最后,细胞群A.iii)又包含不表达CD38的细胞群,该细胞群是早期未定型造血干细胞。

[0039] 应注意,单个核的细胞(MNC)被认为是本发明细胞悬液的主要活性组分。特别地,本发明的细胞悬液的活性组分或成分是选自由表达CD34的淋巴细胞、单核白细胞和造血干细胞(更特别地表达CD34并且不表达CD38的早期未定型造血干细胞、表达CXCR4的能够进行SDF-1介导的迁移的白细胞、表达CD34和CXCR4的能够进行SDF-1介导的迁移的干细胞、以及表达VEGFR2的能够进行血管生成的白细胞的亚群)组成的表单中的MNC。所有这些单个核的细胞都是骨髓源性细胞,优选来自髂骨的嵴(或髂嵴)。

[0040] 此外,还应注意,本发明的白细胞悬液还包含粒细胞,所述粒细胞为嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。在这方面,重要的是要注意,如实施例中所示的本发明的最终细胞悬液产品基于活骨髓源性白细胞来配量,所述活骨髓源性白细胞不仅包括MNC白细胞部分(淋巴细胞和单核白细胞以及干细胞),而且包括粒细胞。

[0041] 在本发明第一方面的优选实施方式中,本发明的细胞悬液在最终制剂中富含单个核的细胞,这意味着细胞悬液中存在的白细胞(WBC)总数的25%以上是单个核的细胞,本发明的细胞悬液包含约4×10^8个至约2×10^9个自体或同种异体骨髓源性白细胞,优选自体的,优选来源自髂骨的嵴(或髂嵴),其中在总数为约4×10^8个至约2×10^9个的白细胞中,

[0042] i.约20%至约51%是淋巴细胞,并且约3.9%至约22.3%是单核白细胞;

[0043] ii.约1.4%至约10%是表达CD34的造血干细胞;

[0044] iii.白细胞总数的约25.3%至约83.3%,优选约32.3%至约80.0%是优选选自由淋巴细胞、单核白细胞和CD34细胞组成的表单中的单个核的细胞;

[0045] iv.约16.7%至约74.7%,优选约20.0%至约67.7%是粒细胞;

[0046] v.在表达CD34的造血干细胞总数中,约7.7％至约55.5％是不表达CD38的早期未定型造血干细胞;

[0047] vi.约5.4％至约38.8％的白细胞表达CXCR4;

[0048] vii.在表达CD34的造血干细胞总数中,约0.7％至约10.3％是表达CD34和CXCR4的干细胞;

[0049] viii.约0.07％至约24.7％的白细胞表达VEGFR2;和

[0050] ix.红细胞与白血球细胞的最大比例为6.7,血小板与白血球细胞的最大比例为32。

[0051] 在本发明第一方面的另一种优选实施方式中,在最终制剂中,如在先段落中定义的本发明的细胞悬液包含约4×10^8个至约1.2×10^9个白细胞,更优选约5×10^8个至约2×10^9个白细胞,更优选约5×10^8个至约1.2×10^9个白细胞,以及上述每个所列举的值之间的所有剂量值。

[0052] 可以选择某些实施方式作为最终制剂中白细胞的这些值的子范围。例如,可以选择特定实施方式作为白细胞含量,该含量在最终制剂中为大于8×10^8个至约1.2×10^9个白细胞。在实施方式中如何选择范围的另一个示例是选择约9×10^8个至约1.1×10^9个白细胞的含量。可以针对特定实施方式选择的范围的第三个示例是选择约9.5×10^8个至约1.05×10^9个白细胞。可以针对特定实施方式选择的范围的第四个示例是选择诸如9.8×10^8个至约1.02×10^9个白细胞的含量。

[0053] 如何选择含量或剂量实施方式范围的其他示例包括大于6×10^8个至约2×10^9个,优选大于6×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。另一个示例是选择大于7×10^8个至约2×10^9个,优选大于7×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。另一个示例是选择大于8×10^8个至约2×10^9个,优选大于8×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。另一个示例是选择大于8.5×10^8个至约2×10^9个,优选大于8.5×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。另一个示例是选择大于9×10^8个至约2×10^9个,优选大于9×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。另一个示例是选择大于9.5×10^8个至约2×10^9个,优选大于9.5×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。因此,本发明包括可以从本文的值中选择并且如本领域普通技术人员所理解的所有剂量范围。

[0054] 在本发明的详细描述中清楚地确定了上述每种细胞群的测量方法。

[0055] 应注意,这种细胞悬液可包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0056] 在本发明第一方面或其任何优选实施方式中的另一种优选实施方式中,下肢外周动脉疾病是严重肢体缺血。

[0057] 在本发明第一方面的另一种优选实施方式或其任何优选实施方式中,细胞悬浮在体积为5mL至30mL的肝素化盐水溶液或优选包含约1％HSA和约2.5％葡萄糖的乳酸林格氏溶液中。

[0058] 本发明的第二方面涉及如本发明第一方面或其任何优选实施方式中所定义的细胞悬液,其用于通过动脉内给药治疗下肢外周动脉疾病,优选严重肢体缺血的方法中,其中通过将可充气气囊放置在闭塞性血管病变部分附近远端股动脉或腘动脉处并在动脉内输注所述细胞悬液,获得高至4个大气压的低压血流。

[0059] 本发明的第三方面涉及一种或若干种预填充注射器,其包含如本发明第一方面或其任何优选实施方式中所定义的细胞悬液。

[0060] 本发明的第四方面涉及如本发明第三方面所定义的注射器(预填充注射器),其用于治疗或改善下肢外周动脉疾病,优选严重肢体缺血。应注意,每位患者可使用一个或多个预填充注射器。

[0061] 本发明的第五方面涉及如本发明第三方面所定义的注射器(预填充注射器),其用于通过动脉内给药治疗下肢外周动脉疾病,优选严重肢体缺血的方法中,其中通过将可充气气囊放置在闭塞性血管病变部分附近远端股动脉或腘动脉处并在动脉内输注所述细胞悬液,获得高至4个大气压的低压血流。

[0062] 在本发明第一至第五方面的优选实施方式中,细胞悬液或注射器以单剂量提供。

[0063] 在本发明第二和第五方面的优选实施方式中,低压流动的诱导在1至6分钟内产生,并且所述细胞悬液的输注在2至10分钟内进行。

[0064] 本发明的第六方面涉及如本发明的第一方面或其任何优选实施方式中所定义的本发明的细胞悬液的制备方法,其包括:

[0065] 1.通过反复吸引术进行骨髓(BM)收集,优选在局部或全身麻醉下从对象的后髂嵴进行。然后收集BM吸出物,优选收集在含有抗凝血剂溶液的转移袋中,更优选收集在含有柠檬酸盐葡萄糖溶液A(ACD-A)的转移袋中。

[0066] 2.BM优选通过重力过滤,以去除任何小骨碎片并防止在后续步骤中阻塞。

[0067] 3.优选通过使用Sepax 2.0装置上的SmartRedux程序和相关的一次性无菌SmartRedux试剂盒(CS-490.1)减少初始BM体积,优选减少至约50mL至100mL。该步骤包括去除血浆和红细胞(RBC),优选产生约50mL至100mL的血沉棕黄层产物,也有助于最终产品的纯度。

[0068] 4.任选地,体积减少步骤在一个或两个循环中进行,这取决于待处理的起始材料的体积。体积高至220mL的BM样品以单个循环进行处理,超过220mL的样品以两个循环使用相同的试剂盒处理。优选地,对于单循环和双循环体积减少,最终体积设定为约50mL至100mL。

[0069] 5.如步骤3或4中所确定的含有体积减少的BM的无菌中级样品袋经过自动密度梯度离心,然后使用优选由含2%至4%HAS的盐水溶液(均为药用级)组成的洗涤溶液洗涤单个核的细胞(MNC)悬液两次。在输出袋中大约收集约45mL的BM-MNC产物,并将其他组分移至废物袋中。优选地,含有体积减少的BM的无菌中级样品袋经过NeatCell密度梯度离心,然后使用优选由含2%至4%HAS的盐水溶液(均为药用级)组成的洗涤溶液洗涤单个核的细胞(MNC)悬液两次。在输出袋中大约收集约45mL的BM-MNC产品,并将其他组分移至废物袋中。

[0070] 6.优选使用50mL注射器从产品袋收集BM-MNC,并且优选通过50μm过滤器过滤,优选过滤到无菌Falcon管中。用洗涤溶液冲洗产品袋并过滤以提高MNC回收。将BM-MNC药物物质的最终体积调节至40mL至60mL。

[0071] 将药物物质离心,并使团块重悬于最终的制剂混合物中,优选重悬于体积优选为5mL至30mL的含有肝素的盐水或含有优选1%HSA和优选2.5%葡萄糖的乳酸林格氏溶液中。

[0072] 如上所述,注意到从本发明第六方面获得的最终细胞悬液产品是基于活白细胞来配量的,该活白细胞不仅包括MNC级分,还包括粒细胞。由于MNC是活性组分,因此最终产品

中MNC的百分比被视为质量属性。

[0073] 本发明的第七方面涉及通过本发明的第六方面的方法获得或可获得的细胞悬液产品或产品容器,该产品容器优选一个或若干个注射器。应注意,这种细胞悬液产品或产品容器可以如本发明第一至第五方面中任一方面所确定的那样使用。

具体实施方式

[0074] 定义

[0075] 如本文所用,“自体”应理解为指其中供体和受体是同一个体的细胞制剂。

[0076] 如本文所用,“同种异体”应理解为指其中供体和受体不是同一个体的细胞制剂。

[0077] 如本文所用,“成人骨髓源性细胞”应理解为包含并非胚胎性的而是来源于从人供体获得的骨髓的细胞的制剂。

[0078] 如本文所用,“细胞悬液”应理解为在液体培养基中悬浮的细胞制剂。

[0079] 如本文所用,“成人骨髓源性细胞的细胞悬液”被理解为在液体培养基中悬浮的并非胚胎性的而是来源于从人供体获得的骨髓的细胞的制剂。

[0080] 如本文所用,“表达CD34的造血干细胞”被理解为表达表面标志物CD34并通过CD34抗体染色和流式细胞术鉴定为CD34阳性的造血干细胞。

[0081] 如本文所用,“表达CD34并且不表达CD38的早期未定型造血干细胞”被理解为表达表面标志物CD34并通过CD34抗体染色和流式细胞术鉴定为CD34阳性,但是通过CD38抗体染色和流式细胞术鉴定为表面标志物CD38阴性的造血干细胞。

[0082] 如本文所用,“表达CXCR4的白细胞”被理解为表达表面标志物CD45和CXCR4,并且通过CD45和CXCR4抗体染色和流式细胞术鉴定为CD45和CXCR4阳性的细胞。CXCR4是迁移因子SDF-1的受体。

[0083] 如本文所用,“表达CD34和CXCR4的干细胞”被理解为表达表面标志物CD45、CD34和CXCR4,并且通过CD45,CD34和CXCR4抗体染色和流式细胞术鉴定为CD45,CD34和CXCR4阳性的细胞。CXCR4是迁移因子SDF-1的受体。

[0084] 如本文所用,“表达VEGFR2的白细胞”被理解为表达表面标志物CD45和VEGFR2,并且通过CD45和VEGFR2抗体染色和流式细胞术鉴定为CD45和VEGFR2阳性的细胞。VEGFR2是血管生成和血管发生的VEGF的受体。

[0085] 如本文所用,“单个核的细胞”应理解为具有圆形细胞核从而排除粒细胞的任何血液或骨髓白细胞(也称为白细胞)。

[0086] 如本文所用,“下肢外周动脉疾病”被理解为除供应心脏或脑的动脉之外的动脉变窄。外周动脉疾病通常影响腿部,但可能涉及其他动脉。

[0087] 如本文所用,“严重肢体缺血”被理解为外周动脉疾病的细分,其中所述病症的特征在于由于客观证实的动脉闭塞性疾病而引起的一条腿或两条腿中的慢性缺血性静息痛、溃疡或坏疽。

[0088] 关于数值的术语“约”表示该数值+/-20%。关于数值的术语“约”还包括该数值+/-10%。关于数值的术语“约”还包括该数值+/-5%。关于数值的术语“约”还包括该数值+/-1%。

[0089] 术语“包括/包含(comprise/comprising)”以包含性的开放式意义使用,意味着可

以包括附加元素。术语“包括/包含”还涵盖“由.....组成”和“基本上由.....组成”并且可以与术语“由.....组成”和“基本上由.....组成”互换使用。

[0090] 如本文所用,术语“成人”是指干细胞不是胚胎性的。在一个实施方式中,“成人”意指胚胎后或“产后”。关于本发明的干细胞,术语“成体干细胞”是指干细胞在比胚胎阶段晚的生长阶段从动物的组织或器官中分离。成体干细胞与胚胎干细胞不同,胚胎干细胞的起源由其起源界定,是胚泡的内细胞团。根据本发明的成体干细胞可以从任何非胚胎组织中分离,并且包括新生儿,幼儿,青少年和成年对象。通常,本发明的干细胞将从非新生哺乳动物中分离,例如从非新生儿中分离。优选地,本发明的干细胞是从人体中分离的。

[0091] 术语“分离的”表示该术语所指的细胞或细胞群并非处于其天然环境中。该细胞或细胞群已基本上与周围组织分离。

[0092] 本发明中提及的新细胞悬浮液产品的标志物谱可以通过其他标志物的存在和/或不存在,或通过存在和不存在的标志物的组合的特定谱来进一步限定。在每种情况下,标志物的特定组合可以以细胞群内的特定谱和/或群内个体细胞上标志物的特定谱的形式存在。

[0093] 如本文所用的术语“标志物”涵盖可以检测到其存在、浓度、活性或磷酸化状态并用于鉴定细胞表型的任何生物分子。

[0094] 然后,本发明的细胞的某些表型标志物呈阳性,其他表型标志物呈阴性。“阳性”是指标志物在细胞内表达。为了认定有表达,标志物必须以可检测的水平存在。“可检测水平”是指标志物可以使用如所描述的标准实验室方法(例如PCR、印迹或流式细胞术分析)之一检测到。

[0095] 术语“表达的”用于描述标志物在细胞表面上或细胞内存在。为了认定有表达,标志物必须以可检测的水平存在。“可检测水平”是指标志物可以使用标准实验室方法(例如PCR、印迹、免疫荧光、ELISA或FACS分析)之一检测到。“表达的”可以指,但不限于,蛋白质、蛋白质的磷酸化状态、或编码蛋白质的mRNA可检测地存在。如果在30个PCR循环后,优选在37个PCR循环(这与细胞中表达水平为每个细胞至少约100个拷贝对应)后,可以合理地检测到表达,则认为本发明的细胞或本发明的细胞群表达基因。术语“表达(express/expression)”具有相应的含义。在低于该阈值的表达水平下,认为标志物未表达。

[0096] 详细说明

[0097] -细胞悬液产品

[0098] 根据本发明的细胞悬液是适合于治疗或改善下肢外周动脉疾病,特别是适合于治疗严重肢体缺血(CLI),更具体地适合于治疗无法选择使用手术旁路或血管内方法进行血运重建的DM患者的严重肢体缺血(CLI)的产品,该产品作为一种改进的有用的替代治疗方案。在这个意义上,令人惊讶地发现,根据本发明的细胞悬液在用于治疗或改善下肢外周动脉疾病时导致许多临床相关的改善,例如,Rutherford分类从CLI II级(第4类)或III级(第5类)变成I级(第1至3类)或0级(第0类);改善的愈合过程,不仅是针对溃疡,甚至针对大截肢;以及血管延伸和/或血管密度增加。即使单次给药细胞悬液也可以获得所有上述优点,并且在实施例2中清楚地说明所述优点。

[0099] 通常,本发明的细胞悬液是指自体或同种异体,优选自体的成体骨髓源性细胞的细胞悬液,所述成体骨髓源性细胞优选来源于髂骨的嵴(或髂嵴),所述细胞悬液包含:

[0100] A.选自包含以下或由以下组成的表单中的单个核的细胞(MNC):

[0101] i.淋巴细胞群;

[0102] ii.单核白细胞群;和

[0103] iii.表达CD34的造血干细胞群;

[0104] 其中所述细胞悬液还包括:

[0105] B.粒细胞。

[0106] 值得注意的是,细胞群A)和B)又包含表达CXCR4的细胞群,CXCR4是迁移因子SDF1的受体,在该群体中,重要的是指出表达CD34和CXCR4的造血干细胞亚群的存在。此外,细胞群A)和B)又包含表达VEGFR2的细胞群,VEGFR2是参与血管生成和血管发生的血管生成因子VEGF的受体。

[0107] 最后,细胞群A.iii)又包含不表达CD38的细胞群,该细胞群是早期未定型造血干细胞。

[0108] 因此,具体地,根据本发明的悬液是自体或同种异体的,优选自体的成体骨髓源性细胞的细胞悬液,该细胞悬液包含:i)表达CD34的造血干细胞;ii)表达CD34并且不表达CD38的早期未定型造血干细胞;iii)表达CXCR4的白细胞,CXCR4是迁移因子SDF-1的受体;iv)表达CD34和CXCR4的造血干细胞,CXCR4是迁移因子SDF-1的受体;v)表达VEGFR2的白细胞,VEGFR2是(VEGF)的受体;和vi)单核白细胞、粒细胞和淋巴细胞。

[0109] 重要的是要注意,本发明的最终细胞悬液产品基于活骨髓源性白细胞给药,所述活骨髓源性白细胞不仅包括单核白细胞部分(淋巴细胞和单核白细胞以及干细胞),还有粒细胞。

[0110] 因此,本发明的细胞悬液是指自体或同种异体的,优选自体的成体骨髓源性细胞,该成体骨髓源性细胞包含i)表达CD34的造血干细胞;ii)表达CD34并且不表达CD38的早期未定型造血干细胞;iii)表达CXCR4的白细胞,CXCR4是迁移因子SDF-1的受体;iv)表达CD34和CXCR4的造血干细胞,CXCR4是迁移因子SDF-1的受体;v)表达VEGFR2的白细胞,VEGFR2是血管内皮生长因子(VEGF)的受体;和vi)单核白细胞、粒细胞和淋巴细胞。

[0111] 在一个优选的实施方式中,细胞悬液在最终制剂中富含单个核的细胞,这意味着细胞悬液中存在的白细胞(WBC)的25%以上是单个核的细胞,本发明的细胞悬液包含约4×10^8至约2×10^9个自体或同种异体骨髓源性白细胞,优选自体的,优选来源于髂骨的嵴(或髂嵴),其中在总数为约4×10^8个至约2×10^9个的白细胞中:

[0112] i.约20%至约51%是淋巴细胞,并且约3.9%至约22.3%是单核白细胞;

[0113] ii.1.4%至10%是表达CD34的造血干细胞;

[0114] iii.白细胞总数的约25.3%至约83.3%是单个核的细胞;

[0115] iv.约16.7%至约74.7%是粒细胞;

[0116] v.白细胞总数的约5.4%至约38.8%表达CXCR4;

[0117] vi.白细胞总数的约0.07%至约24.7%表达VEGFR2;和

[0118] vii.在表达CD34的造血干细胞总数中,约7.7%至约55.5%是不表达CD38的早期未定型造血干细胞,并且约0.7%至约10.3%是表达CD34和CXCR4的干细胞;

[0119] viii.红细胞与白血球细胞的最大比例为6.7,血小板与白血球细胞的最大比例为32。

[0120] 在另一个优选的实施方式中,白细胞总数中的32.3%至80.0%是选自淋巴细胞、单核白细胞和表达CD34的造血干细胞的单个核的细胞,白细胞总数中的20.0%至67.7%是粒细胞。

[0121] 在又另一种优选实施方式中,在最终制剂中,如在先段落中定义的本发明的细胞悬液包含约4×10^8个至约1.2×10^9个白细胞,更优选约5×10^8个至约2×10^9个白细胞,更优选约5×10^8个至约1.2×10^9个白细胞,以及上述每个所列举的值之间的所有剂量值。

[0122] 可以选择某些实施方式作为最终制剂中白细胞的这些值的子范围。例如,可以选择特定实施方式作为白细胞含量,该含量为大于8×10^8个至约1.2×10^9个白细胞。在实施方式中如何选择范围的另一个示例是选择约9×10^8个至约1.1×10^9个白细胞的含量。可以针对特定实施方式选择的范围的第三个示例是选择约9.5×10^8个至约1.05×10^9个白细胞。可以针对特定实施方式选择的范围的第四个示例是选择诸如9.8×10^8个至约1.02×10^9个白细胞的含量。

[0123] 如何选择含量或浓度实施方式范围的其他示例包括大于6×10^8个至约2×10^9个,优选大于6×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。另一个示例是选择大于7×10^8个至约2×10^9个,优选大于7×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。另一个示例是选择大于8×10^8个至约2×10^9个,优选大于8×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。另一个示例是选择大于8.5×10^8个至约2×10^9个,优选大于8.5×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。另一个示例是选择大于9×10^8个至约2×10^9个,优选大于9×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。另一个示例是选择大于9.5×10^8个至约2×10^9个,优选大于9.5×10^8个至约1.2×10^9个白细胞的范围,包括其间的所有剂量值。因此,本发明包括可以从本文的值中选择并且如本领域普通技术人员所理解的所有剂量范围。

[0124] 在本发明的详细描述中清楚地确定了上述每种细胞群的测量方法。具体地,使用自动血液学细胞计数器(ABX Pentra 60,Horiba Medical)用总细胞计数和差异细胞计数进行每种淋巴细胞、单核白细胞、粒细胞、血小板和RBC的测量方法。使用流式细胞仪(MACSQuant Analyzer 10,Miltenyi Biotec)确定祖细胞百分比、表达CXCR4的细胞百分比和表达VEGFR2的细胞百分比。

[0125] 应注意,这种细胞悬液可包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0126] 在另一个优选的实施方式中,使本发明的细胞悬液中的细胞悬浮在体积为5mL至30mL的肝素化盐水溶液或优选包含约1%HSA和约2.5%葡萄糖的乳酸林格氏溶液中。

[0127] 本发明还提供了药物组合物,其包含如上定义的本发明的细胞悬液和任选的药学上可接受的载体。药学上可接受的载体可包含支持细胞活力和功能的培养基。这种培养基可以是无血清的,以避免在接受者中引发免疫应答。载体会是缓冲性的且无热原的。

[0128] 药学上可接受的载体和稀释剂包括盐水、水性缓冲溶液和/或分散介质。这些载体和稀释剂的使用在本领域中是熟知的。该溶液是无菌的并且具有足够低的粘度以允许使用注射器来给药。

[0129] 可充当药学上可接受的载体的材料和溶液的示例也是本领域熟知的。

[0130] 应注意,在优选的实施方式中,如本说明书的实施例中所示的细胞悬液产品的最终药物制剂溶液由肝素化盐水组成(参见表4)。也可以使用添加了2.5%葡萄糖和1%HAS的

乳酸林格氏溶液(2.7mg/100mL氯化钙二水合物、320mg/100mL乳酸钠、40mg/100mL氯化钾和600mg/100mL氯化钠)(见表

[0131] 如本发明的实施例中所示,最终制剂培养基的每个批次在处理当天在A类BSC中通过添加10mL葡萄糖(2.5%)和1mL HSA(20%)至9mL乳酸林格氏溶液中新鲜制备。

[0132] 表2:

[0133] 制剂缓冲液*

[0134]

组分	浓度	等级
林格氏溶液		EP、USP 用于输液
葡萄糖	2.5%	EP USP 用于输液
人白蛋白	1%	EP USP 用于输液
盐水（0.9% NaCl）	20U/mL 的	EP USP 用于输液
肝素		EP USP 用于输液

[0135] 缩写:EP=欧洲药典;USP=美国药典

[0136] *另见表

[0137] 因此,特别优选的赋形剂是乳酸林格氏溶液,优选添加有葡萄糖和HSA。

[0138] 在另一种优选实施方式中,本发明的细胞悬液或本发明的药物组合物可以在冻存培养基中冷冻。在-135℃至-190℃的温度下使细胞保持活力的任何培养基都适合作为冻存培养基。例如,冻存培养基可包含2.5%至10% DMSO。更具体地,冻存培养基可包含5至10% DMSO。

[0139] 冻存培养基可以基于本文所述的培养基或扩增培养基,所述培养基或扩增培养基还包含人血清或能够在解冻细胞后维持细胞完整性的任何其他蛋白质或蛋白质混合物。

[0140] 解冻后,可以在给药之前或在给药溶液中重悬之前洗涤本发明的细胞以除去DMSO或其他冻存培养基组分。给药溶液是能够无毒性地注射至患者的任何生理溶液。给药溶液可包含1%至15%的蛋白质,例如人血清白蛋白。

[0141] 本发明的药物组合物还可以用于本文所述的任何治疗方法或治疗用途。

[0142] 如上所述,如实施例2所示,本发明的细胞悬液加速新血管和现有血管的生成(再生),并改善现有血管内的血流量。因此,本发明的细胞悬液特别有利于治疗下肢外周动脉疾病(PAD),优选CLI,更优选无法选择使用手术旁路或血管内方法进行血运重建的DM患者的CLI。实施例2通过使用落入本发明第一方面所定义的本发明的细胞悬液的定义内的特定药物细胞悬液产品进行。这种药物细胞悬液产品由配制在10至30mL肝素化盐水中的BM-MNC药物物质制成。以不同的剂量使用这种药物细胞悬液产品,优选的剂量为约5×10^8个至约1×10^9个。使用的最终容器是1至3个给药注射器。在在II期(研究CMMo/ICPD/2008)中针对32个对象批次收集了该细胞悬液产品的数据。下表2总结了每个个体对象的自动细胞计数器数据,包括WBC和差异(淋巴细胞、单核白细胞)计数。还列出了每个对象的产品相关杂质,包括RBC和血小板浓度,以及粒细胞的百分比。

[0143] 表3还示出了相同产品的表型分析,其中包括对以下细胞类型的分析:

CD34+	造血干细胞
CD34+ CD38-	早期未定型 HSC
CD133+	含内皮祖细胞的细胞群
CD90+	早期造血干细胞
CXCR4+	表达 SDF-1 受体的细胞
VEGFR2+	表达血管内皮生长因子受体 2 的细胞
CD31+CD146+CD133-	成熟内皮细胞
CD34+VEGFR2+CD133+	晚期新出内皮祖细胞
CD34-CD105+CD90+CD73+	MSC

[0144]

[0145] 从药物物质中收集的数据在表2和表3中示出。

[0146] 表2:CMMo/ICPD/2008药物物质的自动细胞计数和差异。示出了中等剂量(5×10^8个WBC或白血球)和高剂量(1.0×10^9个WBC或白细胞)的数据。

[0147]

病人 批次	LEU ($\times10^3$)	RBC ($\times10^6$)	PLA ($\times10^3$)	LYMPH (%)	MONO (%)	CD34+ (%)	MNC	NEU(%)	EOS(%)	BAS(%)	GRA(%)

[0148]

方法	ACC	ACC	ACC	ACC	ACC	PHE	MNC	ACC	ACC	ACC	SUM
F01	19.59	0.05	259	48.5	6.4	N/A	45	33	0.1	3.0	55.0
F03	19.43	0.11	603	42.5	12.2	1.44	45.2	33.9	0.1	1.2	54.8
F04	20.59	0.04	69	24.1	7.2	3.77	68.6	57.7	0.1	3.1	31.4
F05	16.87	0.04	56	20.1	6.4	7.23	73.4	62	0.1	2.5	26.6
F07	8.96	0.06	242	42.2	12.6	N/A	44.8	31.2	0.4	3.1	55.2
F08	21.94	0.06	310	36.4	7.5	3.69	56.1	42.6	0	2.7	43.9
F09	43.29	0.06	329	37.4	5.4	4.34	57.2	47.2	0	4.1	42.8
F10	8.75	0.04	277	45.1	22.1	2.54	32.7	25.3	0.1	2.3	67.3
F11	17.28	0.02	38	28.1	7	10.05	64.8	54	0.1	4.9	35.2
F14	30.74	0.07	232	47.4	10.5	4.20	42.1	27.3	0	7.1	57.9
F15	23.12	0.06	280	47.1	11.1	6.50	41.7	30.4	0.1	4.2	58.3
F16	14.39	0.04	153	26.6	11	4.75	62.3	51.2	0.1	4.6	37.7
F17	25.31	0.06	235	36.2	6.7	3.68	57.1	49	0	2.3	42.9
F18	22.89	0.07	191	30.2	8.2	3.00	61.6	48.9	0	3.3	38.4
F20	16.46	0.06	229	51.1	11.2	N/A	37.7	21.8	0	4.1	62.3
F21	31.55	0.05	153	48.2	9.4	2.20	42.2	32.5	0.2	2.9	57.8
F22	10.46	0.05	157	42.0	17.4	1.67	40.5	31.1	0.1	3.4	59.5
F23	18.36	0.03	144	40.2	6.2	3.30	53.5	42.9	0.1	2.9	46.5
F25	27.86	0.06	239	36.5	6	3.30	57.5	51.7	0	6.4	42.5
F26	25.83	0.08	337	43.0	14.3	4.28	42.7	28.4	0	2.8	57.3
F27	23.8	0.06	538	38.1	7	2.06	54.9	39.9	0	3.2	45.1
F28	19.56	0.04	93	46.4	5.9	3.67	47.7	33.5	0	2.2	52.3
F30	20.74	0.09	246	45.4	7.7	2.19	46.9	31.7	0	4.1	53.1
F31	15.67	0.06	230	41.6	14.6	4.68	43.7	32.2	0.1	4.8	56.3
F32	26.34	0.15	489	50.6	16.9	5.40	32.3	17.5	0.2	4.5	67.7
F33	35.3	0.1	370	40.7	3.9	3.59	55.4	44.7	0	4.7	44.6
F34	56.97	0.11	398	26.5	5.7	2.73	67.8	56.1	0	5.1	32.2
F35	28.94	0.05	107	25.6	6.4	9.24	67.8	60.5	0.2	3.2	32.2
F37	19.71	0.04	201	26.7	10.7	3.92	62.5	51.2	0.1	3.6	37.5

[0149]

F38	29.41	0.07	504	30.0	20.8	4.12	49.1	39.5	0.1	2.7	50.9
F39	26.03	0.03	174	31.7	22.3	4.44	45.9	40.6	0.1	3.6	54.1
F40	24.72	0.07	304	N/M	19.9	3.18	80	48.9	0.1	2.7	20.0
最小	8.75	0.02	38	20.1	3.9	1.44	32.3	17.5	0	1.2	20.0
最大	56.97	0.15	603	51.1	22.3	10.05	80.0	62.0	0.4	7.1	67.7

[0150] 使用的方法:ACC＝使用自动细胞计数器(ABX Pentra 60)评估药物物质组成;PHE＝药物物质的表型分析(MACS Quant Analyzer 10,Miltenyi Biotec);MNC＝计算为不是粒细胞的白细胞的比例;SUM＝由组成细胞计数计算。

[0151] 缩写:LEU＝白细胞;RBC＝红细胞;PLT＝血小板;LYMPH＝淋巴细胞;MONO＝单核白细胞;CD34+＝表达CD34的细胞;MNC＝单个核的细胞;NEU＝中性粒细胞;BAS＝嗜碱性粒细胞;EOS＝嗜酸性粒细胞;GRA＝粒细胞;N/A＝不可用;N/M＝无意义。

[0152] 表2:CMMo/ICPD/2008药物物质的表型分析。在II期(研究CMMo/ICPD/2008)针对32名对象收集的数据。

[0153]

病人批次	CD34 + (%)	CD34 +/CD38- (%)	CXCR4 + (%)	CD34 +/CXCR4 (%)	VEGFR2 + (%)
方法	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE
F01	N/A				
F03	1.44	18.05	15.10	0.69	24.73
F04	3.77	26.25	5.38	1.06	2.23
F05	7.23	7.74	18.63	1.10	0.30
F07	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F08	3.69	14.9	22.59	9.48	0.25
F09	4.34	22.11	31.93	9.44	0.19
F10	2.54	20.47	32.00	2.75	0.25
F11	10.05	25.77	31.56	4.87	0.40
F14	4.20	18.33	20.27	6.66	0.30
F15	6.50	41.84	21.93	0.92	0.53
F16	4.75	22.1	38.79	4.00	0.28
F17	3.68	28.53	25.62	5.43	0.76

[0154]

F18	3.00	34	21.10	3.33	0.07
F20	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F21	2.20	55.45	11.20	6.81	0.13
F22	1.67	19.16	16.00	3.59	0.64
F23	3.30	10.00	27.10	10.3	0.47
F25	3.30	18.48	20.05	3.33	0.36
F26	4.28	21.26	26.66	5.84	0.65
F27	2.06	17.47	23.79	1.45	0.21
F28	3.67	18.52	14.55	5.17	0.56
F30	2.19	23.74	29.44	10.04	0.33
F31	4.68	42.73	32.06	9.61	0.66
F32	5.40	24.07	22.88	5.37	0.45
F33	3.59	11.14	15.62	1.94	0.37
F34	2.73	34.43	7.69	1.83	0.46
F35	9.24	20.23	21.53	2.59	1.07
F37	3.92	33.92	35.21	4.84	0.65
F38	4.12	35.92	30.42	2.66	1.78
F39	4.44	18.01	27.51	1.80	0.99
F40	3.18	30.50	15.88	2.83	1.37
最小	1.44	7.74	5.38	0.69	0.07
最大	10.05	55.45	38.8	10.3	24.7

[0155] 使用的方法:PHE＝药物物质的表型分析(MACS Quant Analyzer 10,Miltenyi Biotec);

[0156] 缩写:CD34+＝表达CD34的造血干细胞;CD34+/CD38-＝表达CD34而不表达CD38的造血干细胞的比例;CD45+/CXCR4+＝表达CD45也表达CXCR4的白血球的比例;CD34+/CXCR4＝表达CD34也表达CXCR4的造血干细胞的比例;CD45+/VEGF+＝表达VEGF的白细胞比例;N/A＝不可用。所有细胞也表达CD45。

[0157] 基于在上述表2和3中所示的针对32个对象批次在II期(研究CMMo/ICPD/2008)中收集的结果,我们提供了本发明的细胞悬液产品的表征。

[0158] 应注意,本发明还包括1至3个包含本发明的细胞悬液的(预填充)注射器。

[0159] 此外,如果需要,本发明的细胞悬液的细胞可以通过任何常规方法进行遗传修饰,包括但不限于在其基因组中的转基因、缺失或插入等方法。

[0160] -细胞悬液产品的制造过程

[0161] 本发明的细胞悬液产品可以以多种方式制造,然而,它们优选如实施例1中详述的那样制造,使得本发明的细胞悬液可以被认为是最小程度操作的BM-MNC(骨髓-单个核的细胞)产品,因为制造过程仅包括旨在通过去除血浆、血小板、RBC和粒细胞来富集BM吸出物中的MNC部分的基于密度、颗粒大小和重力的分离步骤。

[0162] 如实施例1中所述的制造过程简要总结如下:

[0163] 步骤0.优选在局部麻醉下从对象的后髂嵴通过反复吸引术进行骨髓(BM)收集。然后收集BM吸出物,优选收集在含有抗凝血剂柠檬酸盐葡萄糖溶液A(ACD-A)抗凝血剂的转移袋中。

[0164] 步骤1:过滤-BM优选通过重力过滤,以去除任何小骨碎片并防止在后续步骤中阻塞。

[0165] 步骤2:SmartRedux体积减少-根据生产商说明,优选通过使用Sepax 2.0装置上的SmartRedux程序和相关的无菌一次性SmartRedux试剂盒(CS-490.1)将BM初始体积减少至约50mL至100mL。该步骤包括去除血浆和红细胞(RBC),优选产生约50mL至100mL的血沉棕黄层产物,也有助于最终产品的纯度。

[0166] 取决于待处理的起始材料的体积,体积减少步骤以一次或两次进行。在单次循环中处理体积最多220mL的BM样品,超过220mL的样品在两个循环中使用相同的试剂盒处理。

[0167] 对于单循环和双循环体积减少,最终体积设定为约50mL至100mL。

[0168] 步骤3至4:NeatCell密度梯度-含有体积减少的BM的无菌中间样品袋经过密度梯度离心,然后使用洗涤溶液洗涤两次单个核的细胞(MNC)悬液,洗涤溶液优选由2-4%HSA盐水溶液(均为药用级)组成。在输出袋中大约收集约45mL的BM-MNC产物,并将其他组分移至废物袋中。

[0169] 步骤5:BM-MNC过滤-使用50mL注射器从产品袋收集BM-MNC,并且通过50μm过滤器过滤到无菌Falcon管中。用洗涤溶液冲洗产品袋并过滤以提高MNC回收。将BM-MNC药物物质的最终体积调节至40mL至60mL。

[0170] 最后一步(步骤6)在于制备本发明的最终细胞悬液产品。这种最终产品是基于活白细胞配量的,该活白细胞不仅包括MNC级分,还包括粒细胞。由于MNC是活性组分,因此最终产品中MNC的百分比被视为质量属性。从这个意义上讲,有一些工艺参数会影响最终产品的质量属性。在这方面,表5中显示了在产品制造中被认为重要的可影响MNC在最终产品中百分比的步骤。

[0171] 表5:与制造过程相关的步骤和参数

[0172]

步骤	参数	关键性
过滤	大小	骨片的存在可能干扰纯化效率并且可能干扰给药程序
SmartRedux	离心：速度和持续时间	这种基于重力的分离步骤直接有助于最终产品的纯度。因此，确定分离所需的参数设置至关重要。
NeatCell	Ficoll密度 Ficoll体积	确定将被纯化的细胞群。使用的密度为1.077gr/ml 影响MNC恢复
	Ficoll离心速度和持续时间	影响MNC恢复
	洗涤离心速度和持续时间	影响MNC恢复

[0173] 缩写:MNC＝单个核的细胞

[0174] SmartRedux步骤-此步骤旨在将BM初始体积减小到足够小的体积,以便在Neatcell程序中处理(NeatCell的最大输入体积为120mL)。此外,SmartRedux步骤包括分级为RBC、血浆和血沉棕黄层产物,这有助于提高NeatCell产品的纯度。

[0175] 与该步骤相关的重要参数是离心速度和持续时间,因为这些参数将直接影响来自BM吸出物回收MNC。

[0176] NeatCell步骤-使用的自动化MNC富集方法由制造商设计和标准化,旨在富集MNC的BM吸出物,因此是重要的。NeatCell起始材料的Hct是重要的材料属性,因为它影响MNC纯化的效率。在NeatCell程序中确定重要的工艺参数,包括离心速度和持续时间,以及Ficoll密度和体积。

[0177] 在MNC区间内,多个细胞群被认为在最终产品的作用模式中起重要作用。因此,这些细胞的存在和功能被认为是质量属性(CQA)。

[0178] 在Ficoll密度梯度离心后获得的MNC级分包含密度低于Ficoll的那些细胞,因此在离心期间不足以渗透到Ficoll层中。因此,该过程中使用的Ficoll的密度直接影响MNC群的组成,因此被认为是重要的过程参数。使用的密度为1.077gr/ml。

[0179] 制造是连续的过程,并且不涉及可能影响MNC级分内的特定细胞群的功能的任何激活步骤或其他大量的细胞操作。处理持续时间可能影响细胞的功能,因此,在该过程中不包含保持时间,并且整个过程优选在洁净室环境中在4至5小时内完成。功能也可能受到对象疾病状态和对象一般生理可变性的影响。

[0180] 基于上述,本发明的另一方面涉及本发明的细胞悬液的制造方法,其包括:

[0181] 1.通过反复吸引术进行骨髓(BM)收集,优选在局部或全身麻醉下从对象的后髂嵴进行。然后收集BM吸出物,优选收集在含有抗凝血剂溶液的转移袋中,更优选收集在含有柠檬酸盐葡萄糖溶液A(ACD-A)的转移袋中。

[0182] 2.BM优选通过重力过滤,以去除任何小骨碎片并防止在后续步骤中阻塞。

[0183] 3.优选通过使用Sepax 2.0装置上的SmartRedux程序和相关的一次性无菌SmartRedux试剂盒(CS-490.1)减少初始BM体积,优选减少至约50mL至100mL。该步骤包括去除血浆和红细胞(RBC),优选产生约50mL至100mL的血沉棕黄层产物,也有助于最终产品的纯度。

[0184] 4.任选地,体积减少步骤在一个或两个循环中进行,这取决于待处理的起始材料的体积。体积高至220mL的BM样品以单个循环进行处理,超过220mL的样品以两个循环使用相同的试剂盒处理。优选地,对于单循环和双循环体积减少,最终体积设定为约50mL至100mL。

[0185] 5.如步骤3或4中所确定的含有体积减少的BM的无菌中级样品袋经过密度梯度离心,然后使用优选由含2%至4%HAS的盐水溶液(均为药用级)组成的洗涤溶液洗涤单个核的细胞(MNC)悬液两次。在输出袋中大约收集约45mL的BM-MNC产物,并将其他组分移至废物袋中。更优选地,含有体积减少的BM的无菌中级样品袋经过NeatCell密度梯度离心,然后使用优选由含2%至4%HAS的盐水溶液(均为药用级)组成的洗涤溶液洗涤单个核的细胞(MNC)悬液两次。在输出袋中大约收集约45mL的BM-MNC产品,并将其他组分移至废物袋中。

[0186] 6.优选使用50mL注射器从产品袋收集BM-MNC,并且优选通过50μm过滤器过滤到无菌Falcon管中。用洗涤溶液冲洗产品袋并过滤以提高MNC回收。将BM-MNC药物物质的最终体积调节至40mL至60mL。

[0187] 同样重要的是要注意,本发明的细胞悬液的制造优选是涉及富集单个核的细胞的连续过程,其中该过程不包括再处理的选项。

[0188] 在制备药物物质后,MNC的离心优选在室温下以760×g进行10分钟。将细胞重新悬浮在最终制剂中(优选肝素化盐水或补充有2.5%葡萄糖和1%HSA的乳酸林格氏溶液,并在无菌条件下转移至无菌无热原塑料注射器)。

[0189] 在最终产品中,可任选地将2mL至3mL转移到小瓶中用于质量控制(QC)测试,并且优选在无菌条件下将8mL至12mL转移到每个无菌无热原塑料注射器中。然后将具有封闭锥体以防止污染的注射器包装在无菌一次性塑料拉链袋和运输箱中,以运输到参与性介入放射单元从而对对象给药。

[0190] 制造过程的概述如图所示。

[0191] -细胞悬液产品的适用性

[0192] 实施例2中清楚说明的结果显示,在给药本发明的细胞悬液后的前12个月内,对象达到临床相关反应,如通过将其分类减少至与其中仅2名(13%)对象有反应的对照组相比有利的Rutherford第1-3类(1级)(29名(64%)对象)所证实。

[0193] 在基线访视时,接受输注本发明细胞悬液的治疗组中的25名(56%)对象表现出不愈合性缺血性溃疡,但是在给药后第12个月随访时,18名(75%)对象不再存在溃疡(一名进行大截肢),24名(60%)对象显示TcPO2增加≥40mmHg,这是治愈的可靠预测。在给药本发明的细胞悬液后第6个月评估血管发生。在用本发明的细胞悬液治疗的对象中,血管发生存在于26名(62%)对象中:在最低、中等、最高组中分别为7名、8名和9名对象。

[0194] 在随访期间,治疗中没有对象出现疑似非预期严重不良反应(SUSAR)。三种AE被认为与给药途径有关,并且是轻微的注射部位反应。没有对象由于AE而过早地中断试验,并且

没有对象经历与本发明的细胞悬液相关的AE。在给药Rexmyelocel-T之前没有发生SAE,并且在给药Rexmyelocel-T后的最初24小时期间没有发生SAE。在随访期间(12个月),23名对象共记录了41件SAE,对照组中有17件SAE(9名对象),Rexmyelocel-T治疗组中有24件SAE(14名对象):低剂量1×10^8个BM-MNC:4名对象;中等剂量5×10^8个BM-MNC:4名对象;最高剂量1×10^9个BM-MNC:6名对象。两名对象因心血管疾病死亡。

[0195] 因此,很明显本发明的细胞悬液特别有利于治疗下肢外周动脉疾病(PAD),优选CLI,更优选无法选择使用手术旁路或血管内方法进行血运重建的患有DM的CLI患者。

[0196] 因此,本发明的另一方面涉及优选在人类对象中用于治疗或改善下肢外周动脉疾病的细胞悬液、预填充注射器或标题为“细胞悬液产品”的部分中定义的药物组合物。

[0197] 优选地,下肢外周动脉疾病是严重肢体缺血。

[0198] 更优选地,细胞悬液、预填充注射器或在标题为“细胞悬液产品”的部分中定义的药物组合物用于通过动脉内给药治疗下肢外周动脉疾病,优选严重肢体缺血的方法中,其中通过将可充气气囊放置在闭塞性血管病变部分附近远端股动脉或腘动脉处并在动脉内输注所述细胞悬液,获得高至4个大气压的低压血流。

[0199] 实施例

[0200] 实施例1.材料和方法

[0201] 1.细胞悬液及其制备方法。

[0202] 为了说明本发明,根据本发明的细胞悬液已用于以下由BM-MNC的自体细胞悬液制成的实施例中,所述BM-MNC由若干种成熟细胞类型以及造血祖细胞组成。最终产品的制剂基于存在的活WBC的数量。

[0203] 使用自动血细胞计数器(ABX Pentra 60,Horiba Medical)用总细胞计数和差异细胞计数进行本发明细胞悬液的表征。使用流式细胞仪(MACS Quant Analyzer 10,Miltenyi Biotec)确定祖细胞百分比、表达迁移因子SDF-1受体CXCR4的WBC(CD45+细胞)或表达血管生成因子VEGF受体2的WBC。

[0204] 表6中示出了来自32个临床批次的白细胞(WBC)浓度、淋巴细胞、单核白细胞、粒细胞和祖细胞的比例以及表达CXCR4或VEGFR2的总WBC。

[0205] 表6.来自CMMo/ICPD/2008的32个临床批次的细胞组成

[0206]

细胞类型	技术/细胞表面标记	细胞计数/比率
（白血球）白细胞	ACC	1×10^8 至 1×10^9
红细胞/白细胞	比率	1.15 至 6.7×
血小板/白细胞	比率	2.2 至 31.7×
中性粒细胞	ACC	2.5×10^7 至 5.6×10^8
淋巴细胞	ACC	2.4×10^7 至 5.1×10^8
单核白细胞	ACC	6.4×10^6 至 2.0×10^8
嗜酸性粒细胞	ACC	0 至 7.1×10^7
嗜碱性粒细胞	ACC	1.2×10^6 至 7.1×10^7
粒细胞	ACC	2.8×10^7 至 6.1×10^8
单个核的细胞	WBC-粒细胞	3.6×10^7 至 7.8×10^8
造血干细胞	流式细胞仪 CD34+	1.4×10^6 至 5.4×10^7
表达 SDF-1 迁移标记的受体 CXCR4 的细胞	流式细胞仪 CXCR4+	5.4×10^6 至 3.2×10^8
表达 SDF-1 迁移标记的受体 CXCR4 的干细胞	流式细胞仪 CD34+/CXCR4+	1.0×10^4 至 4.1×10^6
表达用于血管生成因子 VEGF 的受体 VEGFR2 的细胞	流式细胞仪 VEGFR2	7.0×10^4 至 2.5×10^7

[0207] 缩写:ACC＝自动细胞计数器,WBC＝白细胞。数据表示为最小值到最大值。

[0208] 本发明的细胞悬液在GMP条件下制备。所有工艺步骤均在B级洁净室中进行,其中半封闭操作(穿刺器连接(spike connection)和鲁尔锁连接(luer lock connection))和开放操作在A类BSC中进行。

[0209] 简而言之,无菌过滤骨髓以除去骨块,然后进行自动体积减小步骤来获得足够小的体积以进一步处理。

[0210] 接下来,对细胞进行自动Ficoll密度梯度离心,包括洗涤步骤。过滤产品,得到50mL BM-MNCs级分,即为药物物质。

[0211] 除穿刺器和鲁尔锁连接外,整个药物物质制造过程均是封闭的。在自动化系统中进行细胞分离步骤以确保该过程的标准化。

[0212] 图1中提供了本发明的细胞悬液的制造过程的流程图。此外,以下详细描述制造过程:

[0213] -步骤0:使用连接至BM吸引器的5mL注射器在局部麻醉下通过反复吸引术从对象的后髂嵴进行骨髓(BM)收集。将BM吸出物收集在在含有抗凝血剂柠檬酸盐葡萄糖溶液A(ACD-A)抗凝血剂的600mL转移袋中直至达到约250mL至350mL的体积。根据说明来包装含有新鲜BM的转移袋,并准备装运。BM在室温下按单次装运运送到Rexgenero以立即进行处理。

[0214] -步骤1:过滤-通过重力经200μm在线过滤器过滤BM,以去除任何小骨碎片并防止在后续步骤中阻塞。过滤后,收集样品以用于在过程中测试(in-process test)并称量收集袋,将质量转换成体积,在针对细胞处理的设定中提供输入体积。

[0215] -步骤2:SmartRedux体积减少-按照制造商的说明,使用Sepax 2.0装置上的

SmartRedux程序和相关的无菌一次性SmartRedux试剂盒(CS-490.1),将约300mL的BM初始体积减少至50mL。该步骤包括去除血浆和红细胞(RBC),产生50mL血沉棕黄层产物,也有助于最终产品的纯度。根据待处理的起始材料的体积,进行一次或两次体积减小步骤。在单次循环中处理体积最多220mL的BM样品并且超过220mL的样品以两个循环使用相同的试剂盒处理。对于单循环和双循环体积减少,最终体积设定为50mL。

[0216] 步骤3至4:NeatCell密度梯度-按照制造商的说明,将含有体积减少的BM的无菌中间样品袋连接至Neatcell试剂盒(CS-900.2),并使用Sepax 2.0装置上的NeatCell程序进行处理。该步骤包括在Ficoll 1077上进行密度梯度离心,然后使用由2.5%或4%HSA的盐水溶液(药物级)组成的洗涤溶液洗涤单个核的细胞(MNC)悬液两次。在输出袋中收集大约45mL的BM-MNC产物,并将其他组分移至废物袋中。

[0217] -步骤5:BM-MNC过滤-使用50mL注射器从产品袋收集BM-MNC,并且通过50μm过滤器过滤到无菌falcon管中。用洗涤溶液冲洗产品袋并过滤以提高MNC回收。将BM-MNC药物物质的最终体积调节至50mL。

[0218] 2.选择研究人群

[0219] 招募了总共60名平均年龄为64.3(±9.5)岁(范围46至80岁),不能进行手术或血管内血运重建的患有CLI Rutherford II级(第4类)或III级(第5类)和DM的对象(50名男性(83%)和10名女性(17%)),并以1:1:1:1的比例随机分配以除了标准护理之外接受单次本发明的细胞悬液(以三种剂量水平之一给药:1×10^8、5×10^8或1×10^9个BM-MNC;每个治疗组15名对象)给药,或仅根据标准护理进行治疗(15名对象)。本发明的细胞悬液在单次输注中动脉内给药。对于这项试验,应用分层随机化,根据关于外周动脉疾病管理的跨大西洋跨社会共识文件(Transatlantic Inter-Society Consensus Document on Management of Peripheral Arterial Disease,TASC)为不能选择进行血管内或手术血运重建的RutherfordCLI II级和III级(4和5类)构建分层。在两条腿都存在CLI的情况下,则输液给药至研究者所确定的具有更晚期/严重的疾病的腿部,条件是腿部尚未进行脚趾或更高位的的手术截肢。在基线访视(访视1)、Rexmyelocel-T给药后24小时和第1、3、6、9、12个月(分别为访视3、4、5、6、7和8)时评估试验对象。分配给对照组的对象不需要出现在访视2和3中。

[0220] 3.入选标准

[0221] 如果对象符合以下所有入选标准,则他们有资格入选试验:

[0222] 1.年龄≥18岁且≤80岁的男女两性对象。

[0223] 2.接受I型或II型DM治疗的对象。

[0224] 3.根据Rutherford的CLI II级和III级(第4类和第5类)。

[0225] 4.无法按照TASC II的建议进行手术或血管内血运重建。

[0226] 5.预期寿命>两年。

[0227] 6.预计在入选后的接下来12个月内,待治疗的肢体不会发生大截肢。

[0228] 7.正常生化参数,定义为:白细胞≥3000个/mL,中性粒细胞≥1500个/mL,血小板≥100000个/mm^3,AST/ALT≤2.5x标准范围,肌酐≤2.5mg/dL

[0229] 8.对象提供参与试验的书面知情同意书。

[0230] 9.根据每个医院在入选试验期间执行的标准程序,怀孕妇女必须对妊娠试验是阴性结果,并且在试验期间承诺使用医学上批准的生育控制。

[0231] 4.排除标准

[0232] 如果对象符合以下任何一项排除条件,则被排除在参与试验之外

[0233] 标准:

[0234] 1.瘤形成或血液病(骨髓增生性疾病、白血病或骨髓增生异常综合征)病史。

[0235] 2.高血压不受控的对象(不止一次地确定为血压大于180mmHg/110mmHg)。

[0236] 3.严重心力衰竭(纽约心脏病协会第四阶段)。

[0237] 4.患有恶性室性心律失常或不稳定型心绞痛的对象。

[0238] 5.筛查前三个月诊断出深部静脉血栓形成。

[0239] 6.在计划给药Rexmyelocel-T的同一天出现活动性感染或坏疽。

[0240] 7.伴随的疗法包括高压氧疗法、血管活性物质、Cox-II抑制剂。

[0241] 8.BMI>40kg/m^2。

[0242] 9.入选时被诊断为酒精中毒的对象。

[0243] 10.增殖性视网膜病变。

[0244] 11.预期寿命降低至小于一年的伴随疾病。

[0245] 12.HIV感染、乙型肝炎或丙型肝炎

[0246] 13.不愿意或不能遵守议定书所有方面的对象。

[0247] 14.心力衰竭或射血分数<30%。

[0248] 15.筛选访视前三个月中风或心肌梗死。

[0249] 16.贫血(血红蛋白<10g/dL)。

[0250] 17.白血球减少症。

[0251] 18.血小板减少症(<100,000血小板/mm^3)。

[0252] 19.怀孕妇女或未使用适当的避孕措施的育龄妇女。

[0253] 20.在筛选本试验前三个月内参加临床试验的对象。

[0254] 5.从研究中移除对象

[0255] 由于以下任何原因,对象可以从试验中移除:

[0256] • 未能根据随机化结果达到细胞悬液的最佳终浓度。在这种情况下,PI应决定是否进行产品给药。

[0257] • 在知情同意至计划给药日期之间存在严重不良事件(SAE)。

[0258] • 主要方案偏离(Major protocol deviation)。随机后发现(discovery post-randomization),即对象未能满足方案准入标准或未遵守方案要求,并且持续参与对对象的健康构成不可接受的风险。

[0259] • 对象经历了需要提前终止的AE或治疗前事件,因为持续参与对对象的健康造成不可接受的风险,或者由于AE或治疗前事件,对象不愿意继续参与。

[0260] • 自愿退出。对象(或对象的法律上可接受的代表)希望退出试验。

[0261] • 失访。对象未返回临床并试图联系对象未成功。尝试与对象联系有记录。如果对象退出试验,如果可能,则进行为提前终止访视而安排的所有程序。

[0262] 根据良好的临床实践,为所有过早退出试验的对象推荐了替代治疗。如果退出是由于发生显著的AE(不良反应),则研究者将监测对象到完成,即直到AE解决或直至被确定为永久性事件。在CRF上记录试验中止的主要原因。

[0263] 6.给药治疗

[0264] 调查性产品

[0265] 在局部麻醉和镇静下,通过髂嵴的连续吸引收获一定体积的BM(90mL至420mL)。将BM在含有ACD-A溶液作为抗凝血剂的转移袋中以1:5BM体积的比例收集(见上文第1点)

[0266] 通过密度梯度离心获得BM-MNC的悬液,无需修饰或添加任何可能影响其生物学功能的产品。

[0267] 本发明的细胞悬液以单剂量给药:

[0268] • 1×10^8个BM-MNC。

[0269] • 5×10^8个BM-MNC。

[0270] • 1×10^9个BM-MNC。

[0271] 使用动脉内导管给药本发明的细胞悬液。使用线上导管球囊(适应腘直径)通过经股动脉导管对目标肢体动脉进行插管,所述线上导管球囊尽可能向远端推进,但在所有情况下均低于膝盖并位于闭塞性血管病变的近端,通常在股动脉或腘动脉的远端。此时,使球囊膨胀以阻断血流,并将本发明的细胞悬液缓慢注入3分钟(min)。给药后,球囊放气,恢复顺行血流量。

[0272] 在由血管专家(介入放射科医师或血管外科医生)直接从细胞疗法单元递送的BM收集后3至5小时,进行本发明的细胞悬液的给药。

[0273] 如TASC II治疗指南所述,所有对象均接受目前用于腘动脉以下严重动脉粥样硬化血管疾病的标准治疗。

[0274] 7.Rutherford分类的变化

[0275] 严重肢体缺血包括持续超过两周患有下肢静息痛、缺血性溃疡、继发于患肢的严重血流障碍的坏疽的患者。在整个试验期间,血管专家使用Rutherford等级而不是分类进行对象的PAD分类,这是因为没有进行标准的踏板运动试验,因此不可能正式区分轻度、中度或重度IC。

[0276] IC(I级,1至3类)被定义为由运动(由步行或肌肉活动产生)引起并通过停止活动则立即缓解的而不像CLI患者在静息时持续疼痛的肢体肌肉疼痛、不适或虚弱。

[0277] Rutherford 0级用于识别那些没有症状,或仅仅有感冒或没有闭塞性疾病的临床症状或轻微脉搏减缓的对象。

[0278] 不愈合性缺血性溃疡意味着下肢的动脉灌注不足以支持愈合所需的炎症反应。与此相关,通常存在缺血性静息痛和弥漫性足缺血的客观证据(CLI Rutherford III至IV级,第5至6类)。

[0279] 缺血性静息痛表明弥漫性足缺血(II至IV级,第4至6类),并且不能通过镇痛药容易地控制。疼痛局限于前足和脚趾或局灶性缺血性病变附近。抬高肢体会更糟。带缺血性静息痛的弥漫性足缺血通常与踝压<40mmHg和ABI<0.8有关。

[0280] 基于缺血性静息痛(有或没有不愈合性缺血性溃疡)、运动(IC)诱发的缺血性肌肉疼痛或渐近性疾病的存在,对对象进行分类。为了对试验对象进行分类,通过测量ABI(如果可以可靠地评估ABI)将临床症状与弥漫性足缺血的客观证据相结合。

[0281] 评估了Rutherford分类从基线到第1、3、6、9和12个月的变化。

[0282] 临床改善被定义为从基线开始的单一Rutherford等级(类别)改善。临床相关的改

善被定义为在给药Rexmyelocel-T后3、6、9或12个月时,Rutherford分类从CLI第4类或5类到IC第3类或更低的变化。

[0283] 8.溃疡数量和溃疡大小的变化

[0284] 在病例报告表(CRF)中记录了目标下肢最大溃疡的大小以及双腿溃疡的总数。评估溃疡愈合和溃疡大小从基线到第1、3、6、9和12个月的变化。

[0285] 9.血管发生

[0286] 通过由两名介入放射科医师组成的评估委员会在给药本发明的细胞悬液后的第6个月评估血管发生,所述评估委员会通过比较治疗前进行的基线血管造影片和给药Rexmyelocel-T后6个月进行的血管造影片进行独立的盲评价。

[0287] 如果先前存在的动脉纵向生长,先前存在的动脉交叉生长,侧支血管数量增加,侧支血管数量增加,侧支血管的大小和/或密度增加或主腘动脉以下血管的大小和/或密度增加,则认为血管发生已经发生。

[0288] 10.大截肢(目标肢体)

[0289] 大截肢被认为是踝关节上方的下肢截肢。

[0290] 11.ABI的变化

[0291] ABI定义为在踝关节测量的收缩压与在肱动脉处测量的收缩压的比率。指示对象在19℃至22℃的温度下在室内以仰卧位置休息5至10分钟,放松,支撑头部和脚跟。选择适当尺寸的血压袖带以测量踝关节和手臂中的血压。对于踝关节和手臂,使用直线缠绕方法将袖带放置在肢体周围。使用8至10MHz的多普勒探头,并在传感器上涂抹多普勒凝胶。多普勒探头还用于在手臂压力测量期间检测肱动脉血流。测量了两臂的肱动脉收缩压和所讨论的肢体的胫前和胫后收缩压。

[0292] 记录可以可靠地评估踝压的对象从基线到第1、3、6、9和12个月的ABI变化。

[0293] 12.经皮氧压的变化

[0294] 经皮血氧测定法TcPO2是一种局部的非侵入性测量,反映了从毛细血管通过表皮扩散的O2的量。用TCM3(Radiometer Medical ApS,Copenhagen,Denmark)测量TcPO2。

[0295] 记录TcPO2从基线到第1、3、6、9和12个月的变化。

[0296] 13.不良事件的定义

[0297] 不良事件(AE)被定义为在试验期间对象所发生的任何不希望的经历,无论是否被认为与研究产品有关。因此,AE可以是与药物(研究)产品的使用暂时相关的任何不利和非预期的迹象(包括实验室异常发现)、症状或疾病,无论这是否与药物(研究)产品相关。这包括先前存在的病症或事件的加剧、间发疾病、药物相互作用或在研究中在特定功效评估下未在病例报告表的其他地方记录的指征的显著恶化。预先存在的病症的预期波动,包括在研究中不代表临床显著加重或恶化的疾病,不被认为是AE。

[0298] 每个AE都记录了以下数据:

[0299] • 症状事件的描述。

[0300] • “严重”或“不严重”的分类。

[0301] • 严重程度:轻度(受试者容易忍受的AE,引起最小的不适并且不干扰日常活动),中度(足以令人不适至干扰正常的日常活动的AE;可能需要干预),严重(阻止正常的日常活动的AE;通常需要治疗或其他干预)。

[0302] • 首次出现日期和解决日期(如适用)。

[0303] • 采取的措施:任何行动,永久停止试验治疗,给予合并药物治疗,进行非药物治疗或住院/延长住院时间(SAE)。

[0304] • 因果关系。研究人员尽一切努力评估AE(如果有的话)与Rexmyelocel-T的关系。使用以下类别评估因果关系:

[0305] -不太可能,如果几乎没有证据表明因果关系(例如,事件未在Rexmyelocel-T给药后的合理时间内发生),或者如果事件有其他合理解释(例如对象的临床状况,其他伴随治疗)。可能,如果有证据表明可能的因果关系(例如因为事件发生在Rexmyelocel-T给药后的合理时间内,即使其他因素可能导致该事件(例如对象的临床条件,其他伴随治疗)。很可能,如果有证据表明因果关系,并且其他因素的影响是不可能的。

[0306] -确定,如果有明确证据表明因果关系,可以排除其他因素的可能贡献。

[0307] -难确认,如果对于对因果关系作出临床判断没有足够证据或证据不完整。

[0308] • 事件结果(未知、恢复、尚未恢复、恢复伴随后遗症、死亡(报告日期和原因))。

[0309] 14.严重不良事件的定义

[0310] SAE被定义为符合以下一个或多个严重结果标准的AE:

[0311] -导致死亡。

[0312] -危及生命。

[0313] -需要住院治疗或延长现有住院时间。

[0314] -导致持续或严重残疾或无行为能力。

[0315] -先天性异常或先天性缺陷。

[0316] -根据医学和科学判断为重要的医疗事件,有可能危及对象或需要干预以防止上述结果之一。

[0317] 如果受试者在事件发生时有死亡风险,则AE被认为是危及生命的。如果事件更严重,理论上可能不会将其认为是死亡原因。

[0318] 实施例2.结果

[0319] 1.Rutherford分类的变化

[0320] 在基线和在3、6、9和12个月后的对照对象和用本发明的细胞悬液治疗的对象中的Rutherford类别的PAD的变化在下表7中给出。

[0321] 在基线访视时,本发明治疗组的细胞悬液中的对象分别被分类为CLI Rutherford 4类(II级)或Rutherford 5类(III级)(分别20名(44%)对象和25名(56%)对象)。结果显示,在前12个月内,用本发明的细胞悬液治疗的大多数对象实现了临床相关的反应,正如通过改善所证明的那样,即将28名(68%)对象的分类降低至Rutherford第0至3类(0级和1级)。

[0322] 表7:Rexmyelocel-T给药后在基线和第3、6、9和12个月时的Rutherford分类

[0323]

类别	等级	对照 (n, %)	最低剂量 1×10^8 个 BM-MNC (n, %)	中等剂量 5×10^8 个 BM-MNC (n, %)	最高剂量 1×10^9 个 BM-MNC (n, %)	所有治疗对象 (n, %)
基线						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	0	0	0	0	0
4	II	6 (40)	7 (47)	7 (47)	6 (40)	20 (44)
5	III	9 (60)	8 (53)	8 (53)	9 (60)	25 (56)
6	IV	0	0	0	0	0
总计		15	15	15	15	45
3 个月						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	0	3 (20)	6 (40)	6 (40)	15 (33)
4	II	7 (50)	6 (40)	3 (20)	1 (7)	10 (22)
5	III	6 (43)	6 (40)	6 (40)	8 (53)	20 (44)
6	IV	1 (7)	0	0	0	0
总计		14	15	15	15	45
6 个月						
0	0	0	0	1 (7)	0	1 (2)
1-3	I	1 (8)	7 (47)	6 (40)	7 (47)	20 (44)
4	II	7 (58)	5 (33)	3 (20)	0 (0)	8 (18)
5	III	3 (25)	3 (20)	5 (33)	8 (53)	16 (36)
6	IV	1 (8)	0	0	0	0
总计		12	15	15	15	45
9 个月						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	1 (8)	9 (69)	8 (57)	7 (47)	24 (57)
4	II	7 (58)	2 (15)	2 (14)	2 (13)	6 (14)

[0324]

5	III	3 (25)	2 (15)	4 (29)	6 (40)	12 (29)
6	IV	1 (8)	0	0	0	0
总计		12	13	14	15	42
12 个月						
0	0	0	0	2 (14)	0	2 (5)
1-3	I	2 (18)	10 (77)	9 (64)	7 (50)	26 (63)
4	II	5 (46)	0	2 (14)	5 (36)	7 (17)
5	III	4 (36)	3 (23)	1 (7)	2 (14)	6 (15)
6	IV	0	0	0	0	0
总计		11	13	14	14	41

[0325] 缩写:BMNC＝骨髓源性单个核的细胞

[0326] 给药后3个月,用本发明的细胞悬液治疗的15名(33％)对象,以及中等剂量和高剂量组中的12名(40％)对象不再遭受静息痛或组织损失,并且被归类为Rutherford第0至3类(0级和I级),并且在给药后6、9和12个月,Rutherford 0至3类(0级和I级)的人数分别进一步增加至21名(46％)、24名(57％)和28名(68％)对象。对于中等剂量组和高剂量组的对象,在给药后6、9和12个月时分别为13名(43％)、15名(50％)和18名(64％)。这与对照组相比有利,在对照组中,3、6、9和12个月后0名(0％)、1名(8％)、1名(8％)和2名(18％)对象改善为Rutherford第1至3类(I级)。

[0327] 分配给对照组的一名对象在随机化后撤回知情同意书,一名对象在6个月的随访期间因心血管疾病死亡,一名患者在6个月的随访期间经历大截肢,一名对象在第12个月访视之前失访。接受较低剂量Rexmyelocel-T的两名对象在目标肢体中给药六个月后进行了大截肢。

[0328] 在给药后12个月,与对照组相比,本发明的细胞悬液治疗组的总计45名对象中的28(62％)名未出现静息缺血性疼痛或缺血性溃疡,其中中等剂量和高剂量组的30名中的18名(63％)对象未出现静息缺血性疼痛或缺血性溃疡,其中对照组中11名对象中的9名(82％)报告静息痛或存在不愈合性缺血性溃疡(4名(36％)对象)。

[0329] 当应用末次观测值结转(LOCF)时(不包括主要肢体截肢的对象;这些对象被认为是无反应者),结果表明在给药本发明的细胞悬液后的前12个月内,通过所有治疗的对象中28名(64％)以及中等剂量和高剂量组中18名降低至Rutherford第0至3类(0或I级)分类来证明临床相关反应。(参见表8和图2和图3)。

[0330] 给药Rexmyelocel-T三个月后,15名(33％)对象用Rexmyelocel-T来治疗,其中在中等剂量和高剂量组中的12名(40％)不再患有静息痛或组织损失,被并归类为Rutherford第0至3类(0级和I级),并且所有治疗的患者中Rutherford第0至3类(0级和I级)在给药后6个月和9个月分别进一步增加到21名(46％)和24名(53％)对象在。中等剂量和高剂量组中,14名(47％)和15名(50％)对象在6个月和9个月分别分类至Rutherford第0至3类。这与对照组相比是有利的,在对照组中,3、6、9和12个月后只有0名(0％)、1名(8％)、1名(7％)和2名(13％)对象改善为Rutherford第1至3类(I级)。

[0331] 表8:Rexmyelocel-T给药后在基线和第3、6、9和12个月时的Rutherford分类(包括截肢和死亡)-LOCF

[0332]

类别	等级	对照 (N, %)	低剂量 1×10^8 个 BM-MNC (N, %)	中等剂量 5×10^8 个 BM-MNC (N, %)	高剂量 1×10^9 个 BM-MNC (N, %)	所有治疗对象 (N, %)
基线						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	0	0	0	0	0
4	II	6 (40)	7 (47)	7 (47)	6 (40)	20 (44)
5	III	9 (60)	8 (53)	8 (53)	9 (60)	25 (56)
6	IV	0	0	0	0	0
截肢		0	0	0	0	0
死亡		0	0	0	0	0
总计		15	15	15	15	45
3 个月						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	0	3 (20)	6 (40)	6 (40)	15 (33)
4	II	7 (47)	6 (40)	3 (20)	1 (7)	10 (22)
5	III	7 (47)	6 (40)	6 (40)	8 (53)	20 (44)
6	IV	1 (6)	0	0	0	0
截肢		0	0	0	0	0
死亡		0	0	0	0	0
总计		15	15	15	15	45

[0333]

6 个月						
0	0	0	0	1 (7)	0	1 (2)
1-3	I	1 (7)	7 (47)	6 (40)	7 (47)	20 (44)
4	II	7 (47)	5 (33)	3 (20)	0	8 (18)
5	III	4 (27)	3 (20)	5 (33)	8 (53)	16 (36)
6	IV	1 (7)	0	0	0	0
截肢		1 (7)	0	0	0	0
死亡		1 (7)	0	0	0	0
总计		15	15	15	15	45
9 个月						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	1 (7)	9 (60)	8 (53)	7 (47)	24 (53)
4	II	7 (47)	2 (20)	3 (20)	2 (13)	8 (18)
5	III	4 (27)	2 (20)	4 (27)	6 (40)	13 (29)
6	IV	1 (7)	0	0	0	0
截肢		1 (7)	2 (13)	0	0	2 (4)
死亡		1 (7)	0	0	0	0
总计		15	15	15	15	45
12 个月						
0	0	0	0	2 (13)	0	2 (4)
1-3	I	2 (13)	10 (67)	9 (60)	7 (50)	26 (58)
4	II	6 (40)	0 (7)	3 (20)	5 (36)	8 (18)
5	III	5 (33)	3 (27)	1 (7)	2 (14)	6 (13)
6	IV	0	0	0	0	0
截肢		1 (7)	2 (13)	0	0	2 (4)
死亡		1 (7)	0	0	1 (7)	1 (2)
总计		15	15	15	15	45

[0334] 缩写:BMNC＝骨髓源性单个核的细胞

[0335] 图4和表9显示了在所有给药后随访时与对照组相比本发明的细胞悬液治疗组中更多对象的临床相关反应。在给予Rexmyelocel-T后12个月,所有Rexmyelocel-T组中的大多数对象与对照组相比表现出临床相关反应:34名(76％)对象(最低、中等、和最高Rexmyelocel-T组中分别为10、13和11名对象)对比2名(13％)对象。

[0336] 表9:Rutherford分类)在Rexmyelocel-T给药后3、6、9和12个月-LOCF

[0337]

	对照 (N, %)	最低剂量 1×10^8 个 BM-MNC (N, %)	中等剂量 5×10^8 个 BM-MNC (N, %)	最高剂量 1×10^9 个 BM-MNC (N, %)	所有治疗对象 (N, %)
3 个月					
反应	1 (7)	5 (33)	7 (47)	6 (40)	18 (40)
保持	13 (87)	10 (67)	8 (53)	9 (60)	27 (60)
无反应	1 (7)	0	0	0	0
总计	15	15	15	15	45
6 个月					
反应	2 (13)	10 (67)	8 (53)	7 (47)	25 (56)
保持	11 (73)	5 (33)	7 (47)	7 (47)	19 (42)
无反应	2 (13)	0	0	1 (7)	1 2)
总计	15	15	15	15	45
9 个月					
反应	2 (13)	11 (73)	9 (60)	9 (60)	29 (64)
保持	11 (73)	4 (27)	6 (40)	5 (33)	15 (33)
无反应	2 (13)	0	0	1 (7)	1 (2)
总计	15	15	15	15	45
12 个月					
反应	2 (13)	10 (67)	13 (87)	12 (80)	35 (78)
保持	12 (80)	5 (33)	2 (13)	3 (20)	7 (22)
无反应	1 (7)	0	0	0	0
总计	15	15	15	15	45

[0338] 缩写:BMNCs＝骨髓源性单个核的细胞

[0339] 2.患肢溃疡数量的变化

[0340] 表10和图5中示出了患肢中溃疡数量的变化。在基线访视时,本发明的细胞悬液治疗组中有25名对象(56%)和对照组中的9名对象(60%)被分类为Rutherford第5类,并且表现为非愈合性缺血性溃疡。大多数对象有一处溃疡并且治疗组和对照组之间没有重要差异(在本发明的细胞悬液最低、中等、最高剂量组分别为5、7和6名对象,在对照组中为6名对象)。本发明的细胞悬液最低、中等、最高剂量治疗组(分别为1、1和2名对象)和对照组中的1名对象具有≥3处溃疡。

[0341] 虽然本发明的细胞悬液治疗组中的对象的基线平均溃疡大小高于对照组对象(在

治疗组和对照组中分别为39.9±23.0mm对比26.3±23.5mm),但是结果显示,在溃疡未愈合的对象中,溃疡大小减小(29.7±13.5mm),而对照组的平均溃疡大小增加(43.8±29.3mm)(表11)。

[0342] 表10:患肢中溃疡数量的变化

	对照 (n, %)	最低剂量 1×10^8 个 BM-MNC (n, %)	中等剂量 5×10^8 个 BM-MNC (n, %)	最高剂量 1×10^9 个 BM-MNC (n, %)	所有治疗对象 (n, %)
基线					
0 处溃疡					
1 处溃疡	6 (67)	5 (63)	7 (88)	6 (67)	18 (72)
2 处溃疡	2 (22)	2 (25)	0	1 (11)	3 (12)
≥3 处溃疡	1 (11)	1 (12)	1 (12)	2 (22)	4 (16)
总计	9	8	8	9	25

[0343]

Rexmyelocel-T 给药后 3 个月					
0 处溃疡	1 (13)	2 (25)	2 (25)	1 (11)	5 (20)
1 处溃疡	4 (50)	4 (50)	5 (63)	4 (44)	13 (52)
2 处溃疡	1 (12)	0	0	3 (33)	3 (12)
≥3 处溃疡	2 (25)	2 (25)	1 (12)	1 (11)	4 (16)
总计	8	8	8	9	25
Rexmyelocel-T 给药后 6 个月					
0 处溃疡	2 (33)	4 (57)	3 (38)	2 (22)	9 (38)
1 处溃疡	4 (67)	1 (14)	4 (50)	6 (67)	11 (46)
2 处溃疡	0	2 (29)	0	0	2 (8)
≥3 处溃疡	0	0	1 (12)	1 (11)	2 (8)

总计	6	7	8	9	24
Rexmyelocel-T 给药后 9 个月					
0 处溃疡	2 (33)	5 (71)	4 (50)	4 (44)	13 (54
1 处溃疡	4 (67)	2 (29)	3 (38)	4 (44)	9 (38)
2 处溃疡	0	0	0	1 (11)	1 (4)
≥3 处溃疡	0	0	1 (12)	0	1 (4)

[0344]

总计	6	7	8	9	24
Rexmyelocel-T 给药后 12 个月					
0 处溃疡	2 (33)	4 (57)	7 (88)	7 (78)	18 (75)
1 处溃疡	4 (66)	3 (43)	0	2 (22)	5 (21)
2 处溃疡	0	0	0	0	0
≥3 处溃疡	0	0	1 (12)	0	1 (4)
总计	6	7	8	9	24

[0345] 表11:患肢的溃疡大小(最大直径)

	对照 (n = 15)	**最低剂量 1×10^8 个 BM-MNC (n = 15)**	**中等剂量 5×10^8 个 BM-MNC (n = 15)**	**最高剂量 1×10^9 个 BM-MNC (n = 15)**	**所有治疗对象 (n = 15)**
基线					
N	9	8	7	8	23
平均值±SD	26.3±23.5	41.5±29.1	31.4±19.7	45.6±19.2	39.9±23.0

[0346]

3 个月					
N	5	6	6	7	19
平均值±SD	21.8±17.9	51.7±39.7	23.7±19.5	27.9±12.9	34.1±27.4
6 个月					
N	3	4	5	7	16
平均值±SD	36.7±15.3	42.5±43.5	24.0±19.8	24.3±13.7	28.8±25.0
9 个月					
N	3	2	4	5	11

平均值±SD	26.7±5.8	27.5±17.7	12.5±6.5	23.0±14.8	20.0±13.0
12 个月					
N	4	3	1	2	6
平均值±SD	43.8±29.3	31.7±17.6	15.0*	34.0±35.7	29.7±13.5

[0347]

[0348] *在12个月时,中等剂量的一名对象在患肢上出现溃疡。呈现该溃疡的实际大小。

[0349] 3.TcPO2的变化

[0350] 表12中示出了TcPO2的变化。

[0351] 在基线时,本发明的细胞悬液治疗组中的35名(79%)对象中TcPO2<40mmHg(三个剂量组中分别为12、12和11名对象(分别为最低、中等、最高组)),对比对照组中的6名(43%)对象。

[0352] 结果显示,通过第12个月的随访,在用Rexmyelocel-T治疗的大多数对象(24名(60%)对象)中,TcPO2水平增加至≥40mmHg,对比对照组中的5名(46%)对象。

[0353] 表12:经皮氧压的变化

	对照 (N, %)	**最低剂量 1×10^8 个 BM-MNC (N, %)**	**中等剂量 5×10^8 个 BM-MNC (N, %)**	**最高剂量 1×10^9 个 BM-MNC (N, %)**	**所有治疗对象 (N, %)**
基线					
TcO_2 ≥40 mmHg	8 (57)	2 (14)	3 (20)	4 (27)	9 (21)
TcO_2 <40 mmHg	6 (43)	12 (86)	12 (80)	11 (73)	35 (79)
总计	14	14	15	15	44
Rexmyelocel-T 给药后 3 个月					
TcO_2 ≥40 mmHg	7 (64)	6 (43)	6 (43)	8 (53)	20 (47)
TcO_2 <40 mmHg	4 (36)	8 (57)	8 (57)	7 (47)	23 (53)
总计	11	14	14	15	43
Rexmyelocel-T 给药后 6 个月					

[0354]

TcO_2 ≥40 mmHg	6 (55)	7 (47)	5 (39)	8 (53)	20 (47)
TcO_2 <40 mmHg	5 (45)	8 (53)	8 (61)	7 (47)	23 (53)
总计	11	15	13	15	43

[0355]

Rexmyelocel-T 给药后 12 个月					
TcO_2 ≥40 mmHg	5 (46)	9 (69)	7 (54)	8 (57)	24 (60)
TcO_2 <40 mmHg	6 (54)	4 (31)	6 (46)	6 (43)	16 (40)
总计	11	13	13	14	40

[0356] 4.血管发生

[0357] 在给药本发明的细胞悬液后第6个月评估血管发生。在用本发明的细胞悬液治疗的对象中,26名(62%)对象中存在血管发生:在最低、中等、最高组中分别为7名、8名和9名对象(参见表13)。

[0358] 表13:血管发生

[0359]

	最低剂量 1×10^8 个 BM-MNC (n, %)	**中等剂量 5×10^8 个 BM-MNC (n, %)**	**最高剂量 1×10^9 个 BM-MNC (n, %)**	**所有治疗对象 (n, %)**
Rexmyelocel-T 给药后 6 个月				
血管发生	7（58）	8（62）	9（64）	24（62）
无血管发生	5（42）	5（38）	5（36）	15（38）
总计	12	13	14	39

[0360] 在图6中相对于基线呈现24名出现血管发生病例中的三个病例的血管造影图像:动脉的纵向生长(图6A)、出现新血管(图6B)和靶向皮肤的侧支的横向生长(图6C)。

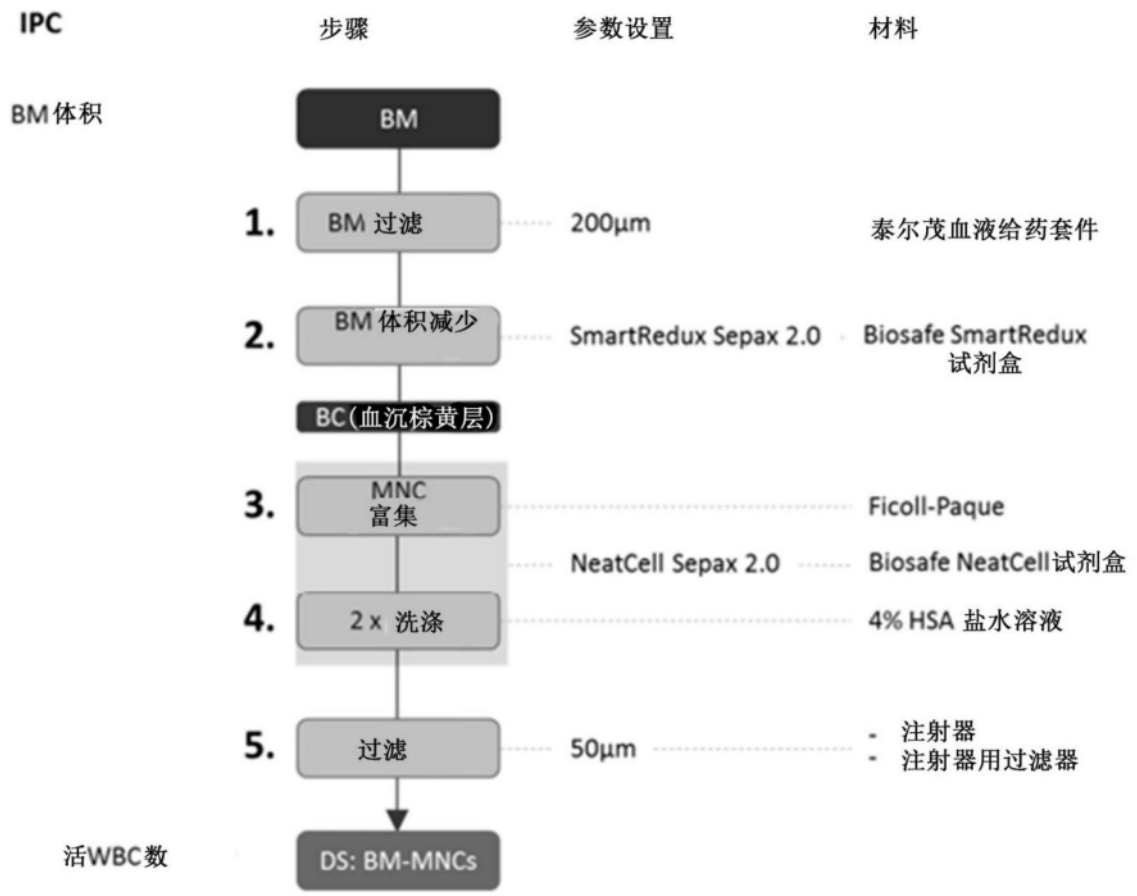

IPC
步骤
参数设置
材料
BM体积
BM
1.
BM 过滤
200μm
泰尔茂血液给药套件
2.
BM 体积减少
SmartRedux Sepax 2.0
Biosafe SmartRedux 试剂盒
BC(血沉棕黄层)
3.
MNC 富集
Ficoll-Paque
NeatCell Sepax 2.0
Biosafe NeatCell试剂盒
4.
2 x 洗涤
4% HSA 盐水溶液
5.
过滤
50μm
- 注射器
- 注射器用过滤器
活WBC数
DS: BM-MNCs

图1

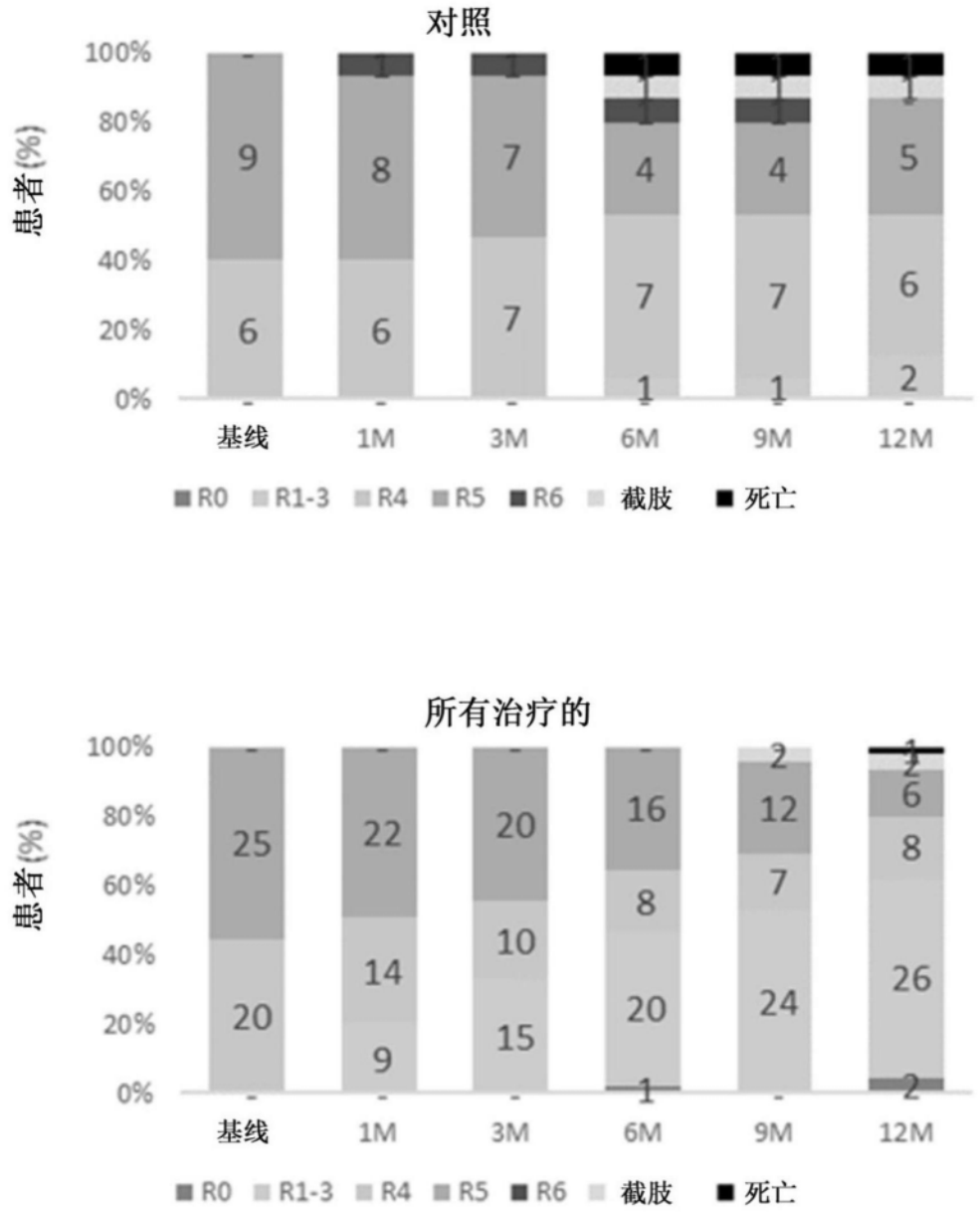

对照
患者(%)
100%
80%
60%
40%
20%
0%
基线
1M
3M
6M
9M
12M
R0
R1-3
R4
R5
R6
截肢
死亡
所有治疗的
患者(%)
基线
1M
3M
6M
9M
12M
R0
R1-3
R4
R5
R6
截肢
死亡

图2

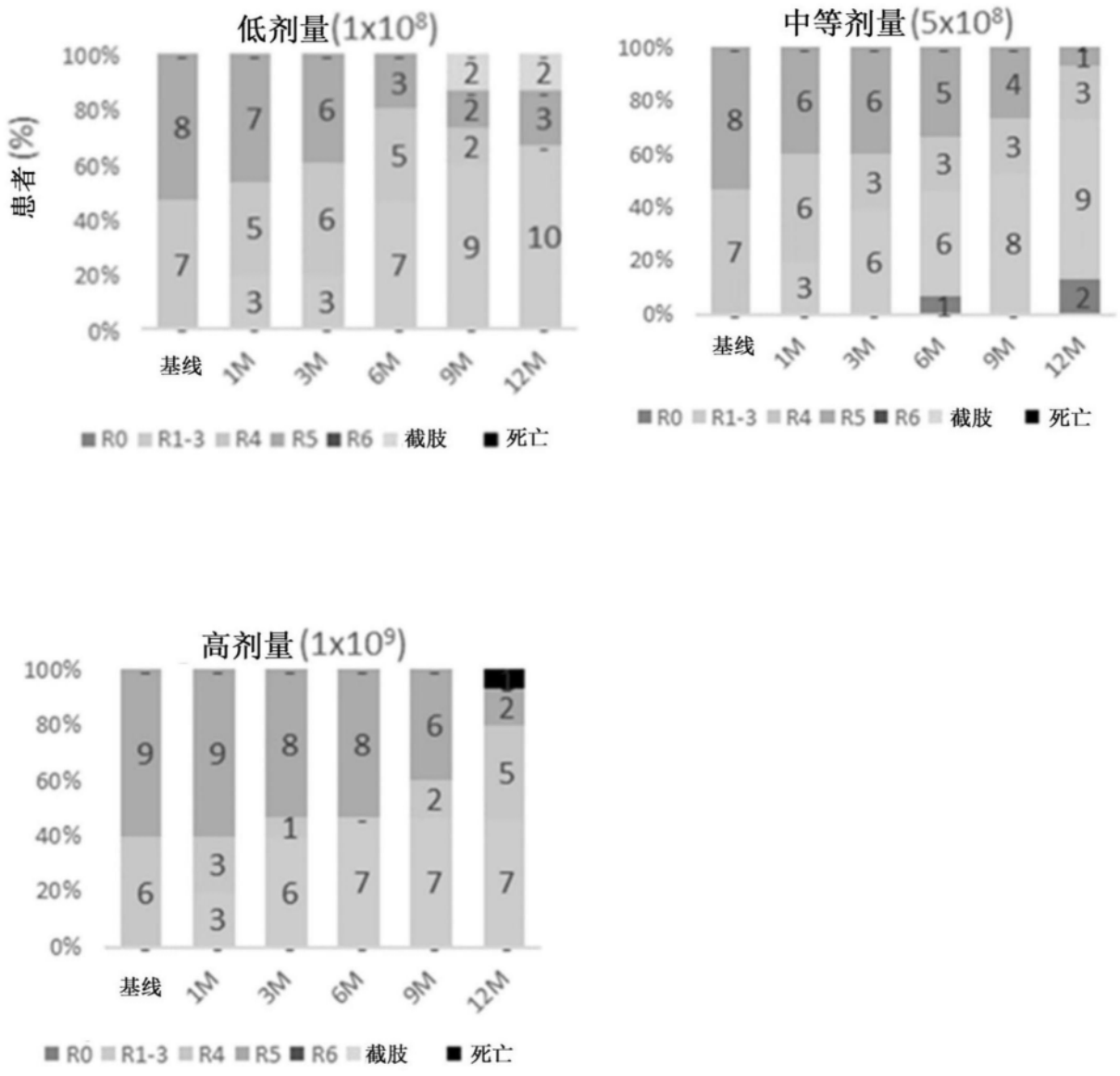

低剂量(1x10⁸)
患者(%)
100%
80%
60%
40%
20%
0%
基线
1M
3M
6M
9M
12M
R0 R1-3 R4 R5 R6 截肢 死亡
中等剂量(5x10⁸)
高剂量(1x10⁹)

图3

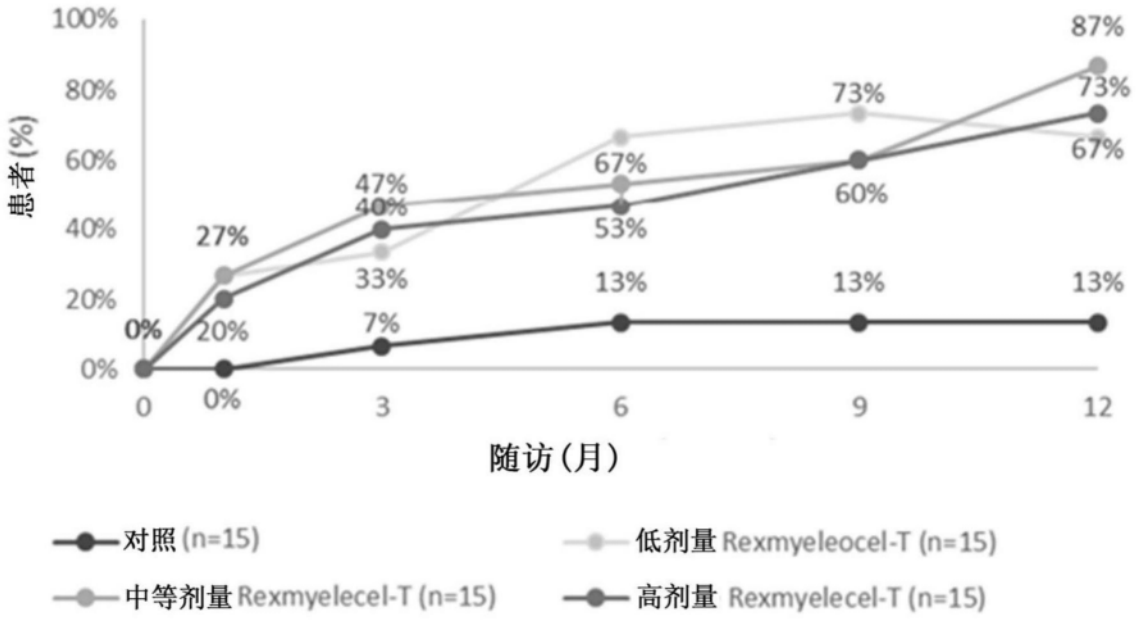

100%
80%
60%
40%
20%
0%
患者(%)
0
3
6
9
12
随访(月)
0%
27%
47%
67%
73%
87%
0%
20%
40%
53%
60%
73%
0%
33%
67%
73%
67%
0%
7%
13%
13%
13%
对照 (n=15)
低剂量 Rexmyeleocel-T (n=15)
中等剂量 Rexmyelecel-T (n=15)
高剂量 Rexmyelecel-T (n=15)

图4

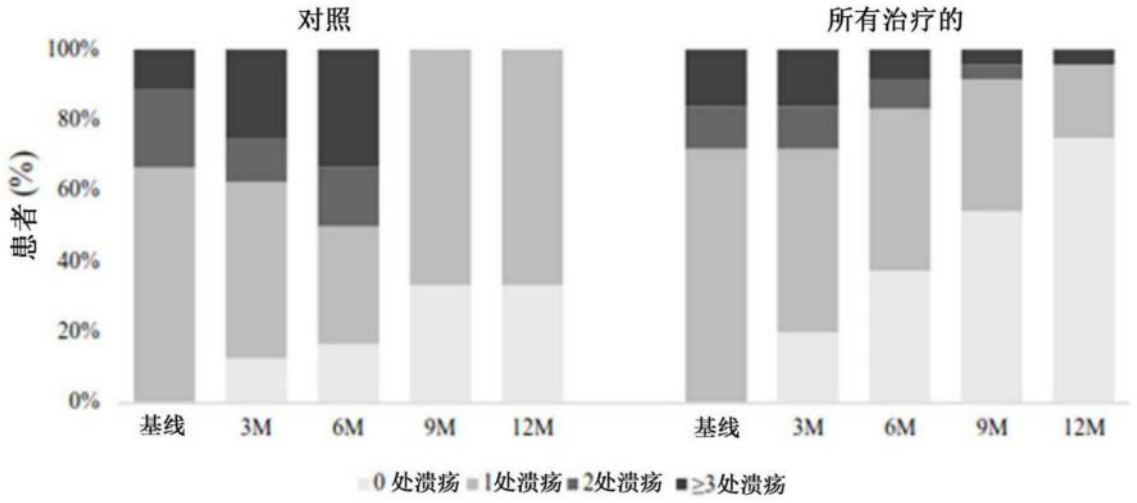
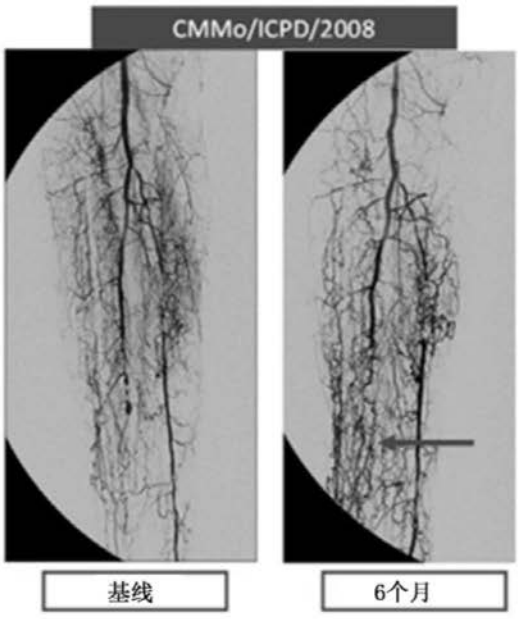
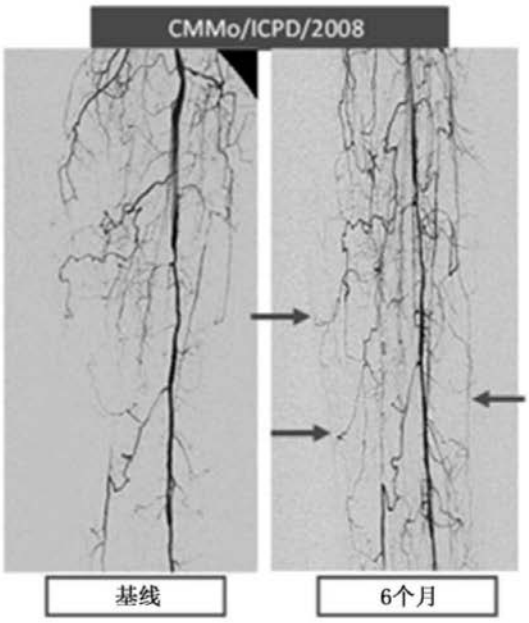

对照
所有治疗的
100%
80%
60%
40%
20%
0%
患者(%)
基线
3M
6M
9M
12M
基线
3M
6M
9M
12M
0 处溃疡
1处溃疡
2处溃疡
≥3处溃疡

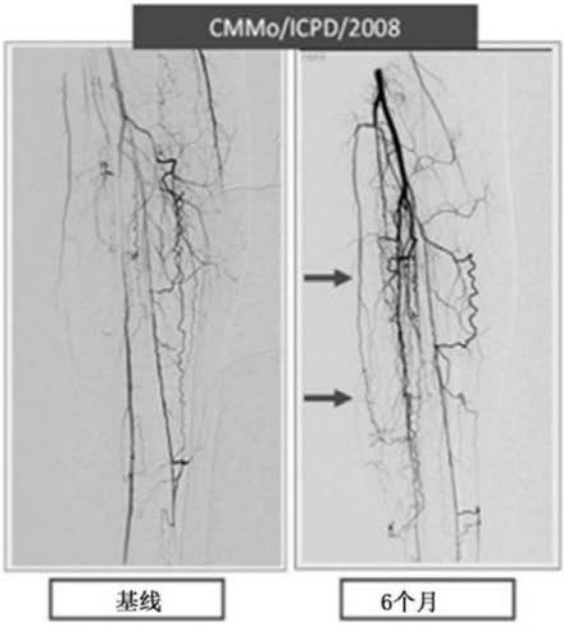
图5



6A. 动脉的纵向生长



6B. 区域中的新血管



6C.

图6

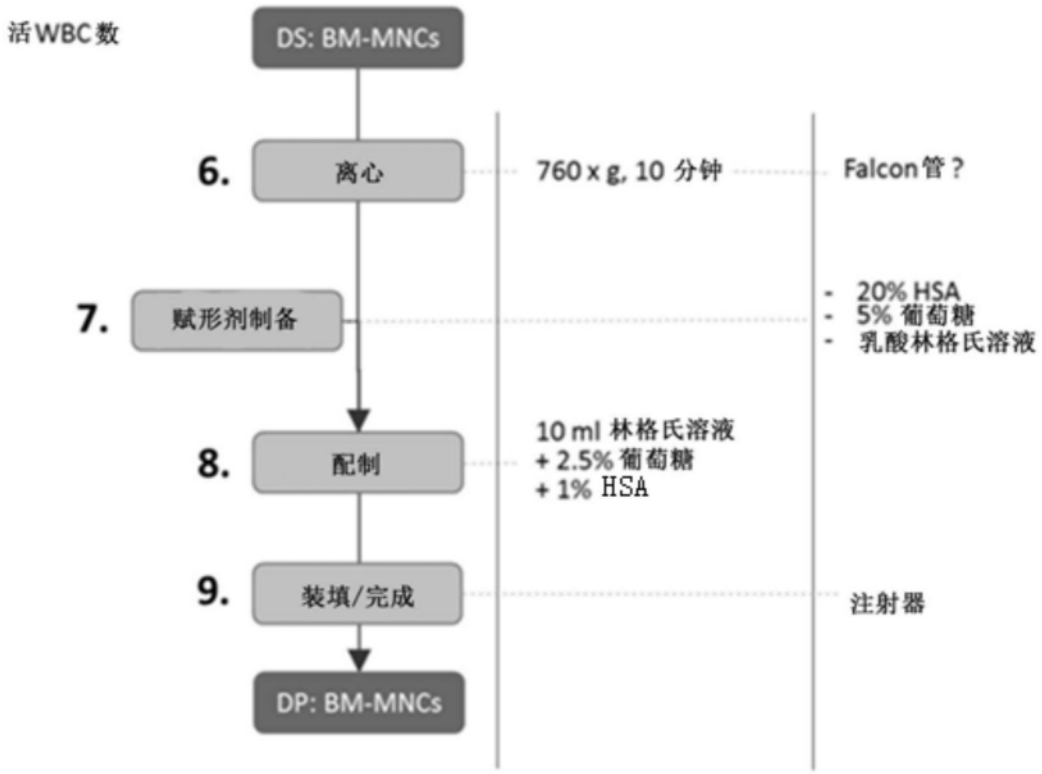

活WBC数
DS: BM-MNCs
6.
离心
760 x g, 10 分钟
Falcon管？
7.
赋形剂制备
- 20% HSA
- 5% 葡萄糖
- 乳酸林格氏溶液
8.
配制
10 ml 林格氏溶液
+ 2.5% 葡萄糖
+ 1% HSA
9.
装填/完成
注射器
DP: BM-MNCs

图7