بسم الله الرحمن الرحيم

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية KACST

المملكة العربية السعودية

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

إن المشرف العام على مكتب البراءات السعودي، وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/٢٧ وتاريخ ١٤٢٥/٠٥/٢٩هـ، واستناداً لأحكام اللائحة التنفيذية له الصادرة بالقرار الإداري رقم ٣٦٠٧٣٢٩-٢-١٦١ وتاريخ ١٤٣٦/١٢/٣٠ هـ، يقرر منح:

اوتسوكا فارماسيوتيكال فاكتوري، انك.

OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY,INC.

براءة اختراع رقم ٦٠٨٦

بتاريخ ١٤٤٠/٠١/٠٣هـ الموافق ٢٠١٨/٠٩/١٣ م

عن الاختراع المسمى/ محلول يحتوي على تريهالوز وديكستران لغرس خلايا ثديية

Trehalose and dextran-containing solution for transplanting mammalian cells

ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق التي يمنحها النظام في المملكة العربية السعودية.

المشرف العام على مكتب البراءات السعودي

م. صقر بن ناصر الفطيماني

مدينة الملك عبدالعزيز
للعلوم والتقنية KACST

[19] **المملكة العربية السعودية** SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] **رقم البراءة:** ٦٠٨٦
[45] **تاريخ المنح:** ١٤٤٠/٠١/٠٣ هـ
الموافـــق: ٢٠١٨/٠٩/١٣ م

[12] براءة اختراع

[72] **اســم المخــترع:** ماســوهيرو نيشــيمورا ، تامــاكي وادا ، شيكاج شيراكاوا ، ماساكو دوي

[73] **مالك البراءة :** اوتسوكا فارماسيوتيكال فاكتوري، انك.

عنوانه: ١١٥ ازا، كوحوهارا، تاتيوا، مويا -شو، ناروتو -شي، اليابان

جنسيته: يابانية

[74] **الوكيل:** مكتب المحامي سليمان ابراهيم العمار

[21] **رقم الطلب:** ٥١٥٣٧٠٢٩٥

[22] **تاريخ دخول المرحلة الوطنية:** ١٤٣٧/٠٣/٠٦ هـ
الموافق : ٢٠١٥/١٢/١٧ م
تاريخ الإيداع للطلب الدولي: ٢٠١٤/٠٦/١٨ م

[86] **رقم الطلب الدولي:** PCT/JP2014/003266
[87] **رقم النشر الدولي:** WO/2014/208053
تاريخ النشر الدولي: ٢٠١٤/١٢/٣١ م

[30] **بيانات الأسبقية:**

JP	١٣٧٤٥٤ -٢٠١٣	٢٠١٣/٠٦/٢٨م

[51] **التصنيف الدولي** (IPC[8]) :
C12N 005/002

[56] **المراجع:**

EP	١٥١٦٩٢٣	٢٠٠٥/٠٣/٢٣ م
US	٢٠٠٩٠٠٨١٧٨٥	٢٠٠٩/٠٣/٢٦ م
WO	٢٠١٠٠٢١٧١٤	٢٠١٠/٠٤/١٥ م
WO	٢٠١٢٠٦٣٨٧٠	٢٠١٢/٠٥/١٨ م
WO	٢٠١٢١٣٣٥٧٥	٢٠١٢/١٠/٠٤ م

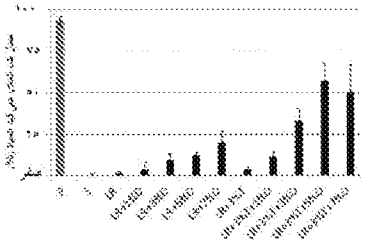
اسم الفاحص: ندى بنت هذال القحطاني

[54] **اسم الاختراع:** محلول يحتوي على تريهالوز وديكستران لغرس خلايا ثديية

Trehalose- and dextran-containing solution for transplanting mammalian cells

[57] **الملخص:** يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لحفظ خلايا **ثديية** mammalian cell لفترة طويلة من الزمن باستخدام محلول لغرس الخلايا، قادر على كبح موت الخلايا بصورة فعَّالة عندما يتم حفظ الخلايا الثديية، ومحلول غرس الخلايا. يتسم الاختراع الحالي بحفظ الخلايا الثديية في محلول مائي فسيولوجي لغرس الخلايا، يضم ٢,٠ إلى ٦,٠٪ (وزن/حجم) من التريهالوز trehalose ، أحد مشتقاته، أو الملح من التريهالوز أو المشتق (التريهالوز) و٤,٠ إلى ٧,٠٪ (وزن/حجم) من الديكستران dextran ، أحد مشتقاته، أو الملح من الديكستران أو المشتق (الديكستران). يمكن لتأثيرات التريهالوز والديكستران المتضمنان في المحلول المائي الفسيولوجي لغرس الخلايا الحد من الانخفاض في معدل حياة الخلايا عند حفظ الخلايا الثديية لفترة طويلة من الزمن (١٤ يومًا على الأقل). يفضل اختيار المحلول المائي الفسيولوجي physiological aqueous solution من مجموعة مكونة من محلول لاكتات الرينجرز lactate Ringer's ، محلول ملحي saline ، محلول رينجرز Ringer's ، ومحلول أسيتات رينجرز acetate Ringer's ؛ يفضل تحديدًا أن يكون محلول لاكتات رينجرز أو محلول ملحي .

عدد عناصر الحماية (٥)، عدد الأشكال (٩)



الشكل (١)

محلول يحتوي على تريهالوز وديكستران لغرس خلايا ثديية

Trehalose- and dextran-containing solution for transplanting mammalian cells

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لحفظ خلايا ثديية mammalian cell في محلول مائي فسيولوجي physiological aqueous solution لغرس الخلايا يضم ٢,٠ إلى ٦,٠٪ (وزن/حجم) من التريهالوز trehalose ، أحد مشتقاته، أو الملح من التريهالوز أو المشتق (المشار إليه هنا لاحقًا، المشار إليه أحيانًا باسم "تريهالوز") و ٤,٠ إلى ٧,٠٪ (وزن/حجم) من الديكستران dextran ، أحد مشتقاته، أو الملح من الديكستران أو المشتق (المشار إليه هنا لاحقًا، المشار إليه أحيانًا باسم "ديكستران") (المشار إليه هنا لاحقًا، المشار إليه أحيانًا باسم "المحلول الحالي لغرس الخلايا solution for cell transplantation ")، المحلول الحالي للغرس، والمحلول المائي الفسيولوجي الذي يحتوي على خلايا للغرس يضم خلايا ثديية mammalian cells والتريهالوز والديكستران (المشار إليه هنا لاحقًا، المشار إليه باسم "المحلول الحالي الذي يحتوي على خلايا للغرس ").

في السنوات الأخيرة، زاد تقدم السريع لدراسات الخلايا الجذعية stem cell من الزخم نحو الطب التجديدي، وانتشرت معرفته وفهمه على نطاق واسع ليس فقط بين الباحثين ولكن أيضًا بين العامة. الطب التجديدي باستخدام الخلايا الجذعية يتمثل في علاج مخصَّص لاعادة وظيفة الخلايا والأنسجة التي تضررت من الأمراض المختلفة من خلال الاستفادة من إمكانات التجديد الذاتي وتعدد قدرات الخلايا الجذعية أو العوامل التي يتم إفرازها من قبل خلايا الجذعية. ينتج عن زراعة النخاع العظمي Bone-marrow في المرضى الذين يعانون من أمراض دم hematological diseases مستعصية، مثل سرطان الدم leukemia وفقر الدم اللاتنسجي aplastic anemia ، ترقيع الأسلاف المكونة للدم hematopoietic progenitors في أجسام هؤلاء المرضى، مما يجعل من الممكن الحفاظ على قدرة الدم طوال فترة حياته بالكامل تقريبًا. في الآونة الأخيرة، كثير من الباحثين الذي استهدفوا في التطبيق السريري استخدام خلايا جذعية أخرى غير الخلايا الجذعية

المكونة للدم، حدَّدوا وجود خلايا جذعية في الأعصاب المركزية central nerves والأعصاب الطرفية peripheral nerves ، ونخاع العظام bone marrow والأمعاء الدقيقة small intestine ، وما شابه ذلك، وبدأوا استخدام علاج الأنسجة بغرس الخلايا الجذعية لعلاج مرض رضحي traumatic disease ومرض تدهور الأنسجة tissue degeneration disease (الوثائق من غير براءات الاختراع رقم ١-٣). من ناحية أخرى، يعد علاج السرطان من خلال الخلايا المناعية cancer immune cell therapy أكثر العلاجات بالخلايا تقدمًا حيث يتم أخذ الخلايا المناعية التي تهاجم السرطان إلى خارج الجسم، ومن ثم تعزيز عملها وإعادتها بعد ذلك مرة أخرى إلى داخل الجسم، كما يتم استخدام العلاجات التي تستخدم خلايا T، مثل العلاج بلقاح الخلايا المتغصنة dendritic cell vaccine therapy ، العلاج بخلايا ألفا/ بيتا alpha/beta T (العلاج بخلايا $\alpha\beta$ T)، العلاج بخلايا gamma/delta T (العلاج بخلايا $\gamma\delta$T)، والعلاج بالخلايا القاتلة الطبيعية natural killer (NK).

عند استخدام الخلايا الجذعية أو خلايا T للعلاج بالغرس يتم حفظها لفترة طويلة من الزمن، ولا يمكن للحفاظ في سائل إبقاء معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة في درجة مرضية. على سبيل المثال، ورد في التقارير أن الحفاظ بالتبريد (في ٤م°) على خلايا نخاع عظام بشرية human bone marrow stem cells في محلول ملحي saline خفض معدل بقاء الخلايا إلى ٤٠٪ أو أقل بعد ٤٨ ساعة، وإلى ٢٠٪ أو أقل بعد ٧٢ ساعة (الوثيقة من غير براءات الاختراع رقم ٤). وبالتالي، عند الحفاظ على الخلايا الجذعية للغرس أو خلايا T للغرس لفترة طويلة من الزمن، يتم عادةً حفظها بالتجميد. ومع ذلك، يحتوي الحفظ بالتجميد في العادة على عامل للحفظ بالتجميد freeze preservation agent ، مثل ثنائي ميثيل السلفوكسيد Dimethyl sulfoxide (DMSO) أو الجليسيرول glycerol ؛ وبالتالي، فمن الضروري إزالة عامل الحفظ بالتجميد للغرس قبل تنفيذ المعالجة بالغرس بعد إذابة الخلايا الجذعية أو خلايا T المحفوظة بالتجميد، وهو الأمر الذي يعد إشكالية بسبب كونها عملية تتطلب عمالة كثيفة. كما تم اعتبار سائل الحفظ بالتجميد الذي يحتوي على عامل حفظ بالتجميد إشكالية من حيث تسبُّبه في ضرر كبير للهيكل الخلوي نظرًا لتبلور الماء أثناء التجميد وتقليل معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة بعد التجميد

والإذابة. وبالتالي، توجد حاجة مُلِّحة لتطوير سائل حفظ خلايا ممتاز في سهولة الاستخدام وقادر على الحد من الانخفاض في معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة.

يعد التريهالوز نوع من الداي ساكاريد disaccharide الذي يتم تشكيله عن طريق ربط ١،١-جليكوسيد لمركبات الجلوكوز. يستخدم التريهالوز في مختلف الأطعمة ومستحضرات التجميل لإعطاءه طعم حلو وقدرته على الاحتفاظ بالماء بدرجة عالية. كما يستخدم تريهالوز كمكوِّن نشط لمحلول حافظ للأعضاء عند زراعة الأعضاء بسبب خواصه المتمثلة في العمل على استقرار أغشية الخلايا والحد من تلف الخلايا. على سبيل المثال، تم تطوير محاليل ممتازة لحفظ الأعضاء تحتوي على تريهالوز، مثل محلول ET-كيوتو Kyoto ومحلول ET-كيوتو الجديد (وثائق البراءات رقم ١ و٢ الوثيقة من غير براءات الاختراع رقم ٥).

يعد الديكستران نوع من البولي ساكاريد يتكون من الجلوكوز ويستخدم على نطاق واسع كمادة مكثفة، ومرطب، أو ما شابه في مجالات الطب ومستحضرات التجميل.

ذكرت مقدِّموا الاختراع الحالي أن غسل الخلايا الجذعية الوسيطة المأخوذة من وعاء استنبات الخلايا بواسطة معالجة الإنزيم الحال للبروتين بمحلول فسيولوجي مائي يحتوي على تريهالوز حد من موت الخلايا الجذعية الوسيطة (وثيقة البراءة رقم ٣). بسبب أن تضرر الخلايا بواسطة علاج الانزيم الحال للبروتين يؤدي حث مسار موت الخلايا (الموت المبرمج للخلايا أو ما شابه ذلك)، فإن مثل هذا التأثير عن طريق تريهالوز ربما يرجع إلى كبت ممر الموت المبرمج للخلايا أو إلى تعزيز وظيفة إصلاح التلف في الخلايا على الأرجح. ذكر أيضًا مقدِّموا الاختراع الحالي أن إضافة الساكاريد، مثل تريهالوز أو ديكستران، إلى معلَّق الخلايا الجذعية الوسيطة يمكن أن يحد من التكتل، والانخفاض في معدل البقاء على قيد الحياة، للخلايا الجذعية الوسيطة عند الحفاظ عليها لفترة قصيرة من الزمن (٣٠ دقيقة إلى ٦ ساعات) (وثيقة براءة الاختراع رقم ٤). ومع ذلك، لم يكن من الواضح ما إذا كان الجمع بين استخدام تريهالوز وديكستران يمكنه الحد على نحو متآزر من الانخفاض في معدل بقاء الخلايا الثديية على قيد الحياة، مثل الخلايا الجذعية الوسيطة، وما إذا كان يزيد على نحو متآزر من نسبة الخلايا الحية أم لا.

وثائق الفن السابق : وثائق براءات الاختراع :

وثيقة براءة الاختراع رقم ١: البراءة اليابانية رقم ٣٢٥٣١٣١

وثيقة براءة الاختراع رقم ٢: الطلب الدولي رقم ٠٤٣٦٩٨/٢٠٠٧

وثيقة براءة الاختراع رقم ٣: الطلب الدولي رقم ١٣٣٥٧٥/٢٠١٢

وثيقة براءة الاختراع رقم ٤: طلب البراءة اليابانية التي لم يتم فحصها رقم ٢٠١٢-١١٥٢٥٣

٥ الوثائق من غير براءات الاختراع

وثيقة من غير براءات الاختراع رقم ١: Gage, F. H., Science 287: 1433-1438 (2000)

وثيقة من غير براءات الاختراع رقم ٢: Morrison, S. J. et al., Cell 96: 737-749 (1999)

١٠ وثيقة من غير براءات الاختراع رقم ٣: Batle, E. et al., Cell 111: 251-263 (2002)

وثيقة من غير براءات الاختراع رقم ٤: Lane, T. A. et al., Transfusion 49: 1471-1481 (2009)

وثيقة من غير براءات الاختراع رقم ٥: Chem, F. et al., Yonsei Med. J. 45: 1107-1114 (2004)

١٥ **<u>الوصف العام للاختراع</u>**

المشكلة المستهدف حلها بالاختراع:

يستهدف الاختراع الحالي توفير طريقة لحفظ خلايا ثديية لفترة طويلة من الزمن باستخدام محلول لغرس الخلايا، قادر على كبح موت الخلايا بصورة فعَّالة عندما يتم حفظ الخلايا الثديية، ومحلول غرس الخلايا.

٢٠ وسائل حل المشكلة: ذكر مقدِّمو الاختارع الحالي أن أنه بحسب الموصوف أعلاه، الوقت القصير (٣٠ دقيقة إلى ٦ ساعات) لحفظ الخلايا الجذعية اللحمية المتوسطية في محلول يحوي ساكاريد،

مثل تريهالوز أو ديكستران، يمكنه الحد من الانخفاض في معدل البقاء علي قيد الحياة للخلايا (وثيقة براءة الاختراع رقم ٤). مع هذا، الاختراع الموصوف في وثيقة براءة الاختراع رقم ٤ لم يوضِّح تأثير متناغم بالاستخدام المدمج للتريهالوز والديكستران. في دراسات مكثَّفة من أجل حل المشكلة المذكورة أعلاه، تم اكتشاف أن حفظ الخلايا الجذعية اللحمية المتوسطية البشرية من نخاع العظام (human mesenchymal stem cells from bone marrow (hMSC-BM أو خلية T بشرية في الدم المحيطي (human peripheral blood T cells (hPBT في محلول مائي فسيولوجي يحوي تريهالوز وديكستران بتركيزات معينة تبلغ ٢,٠ إلى ٦,٠٪ [وزن/حجم] و ٤,٠ إلى ٧,٠٪ [وزن/حجم]، يمكن على التوالي الحد على نحو متآزر من الانخفاض في معدل البقاء على قيد الحياة للخلايا لفترة طويلة من الزمن (١٤ يومًا على الأقل) ويزيد على نحو متآزر من نسبة الخلايا الحية، وبالتالي الوصول على الاختراع الحالي.

وبالتالي، يتعلق الاختراع الحالي بـ (١) طريقة لحفظ خلية ثديية في محلول مائي فسيولوجي لغرس الخلايا يضم ٢,٠ إلى ٦,٠٪ (وزن/حجم) من التريهالوز، أحد مشتقاته، أو الملح من التريهالوز أو المشتق، و ٤,٠ إلى ٧,٠٪ (وزن/حجم) من الديكستران، أحد مشتقاته أو الملح من الديكستران أو المشتق، (٢) الطريقة وفقًا لـ (١) أعلاه، حيث يتم اختيار لمحلول المائي الفسيولوجي من مجموعة مكونة من محلول لاكتات الرينجرز lactate Ringer's solution ، محلول ملحي saline ، محلول رينجرز Ringer's solution ، ومحلول أسيتات رينجرز acetate Ringer's solution ، (٣) الطريقة وفقًا لـ (١) أو (٢) أعلاه، حيث يتم حفظ الخلية الثديية في المحلول المائي الفسيولوجي لغرس الخلايا لمدة ٣ إلى ١٤ يوم، (٤) الطريقة وفقًا لأيٍ من (١) إلى (٣) أعلاه، حيث تكون الخلية الثديية عبارة عن خلية جذعية لحمية متوسطية mammalian mesenchymal stem cell أو خلية T ثديية mammalian T cell ، و(٥) الطريقة وفقًا لـ (٤) أعلاه، حيث تكون الخلية الجذعية اللحمية المتوسطية عبارة عن خلية جذعية لحمية متوسطية بشرية من نخاع العظام bone marrow وتكون خلية T الثديية عبارة عن خلية T بشرية في الدم المحيطي human peripheral blood T cell.

يتعلق الاختراع الحالي أيضًا بـ (٦) المحلول المائي الفسيولوجي لغرس الخلايا يضم ٢,٠ إلى ٦,٠٪ (وزن/حجم) من التريهالوز، أحد مشتقاته، أو الملح من التريهالوز أو المشتق، و ٤,٠ إلى

٧,٠٪ (وزن/حجم) من الديكستران، أحد مشتقاته، أو الملح من الديكستران أو المشتق، (٧) المحلول المائي الفسيولوجي لغرس الخلايا وفقًا لـ (٦) أعلاه، حيث يتم اختيار لمحلول المائي الفسيولوجي من مجموعة مكونة من محلول لاكتات الرينجرز، محلول ملحي، محلول رينجرز، ومحلول أسيتات رينجرز، (٨) المحلول المائي الفسيولوجي لغرس الخلايا وفقًا لـ (٦) أو (٧) أعلاه، حيث تكون الخلية الثديية عبارة عن خلية جذعية لحمية متوسطية أو خلية T ثديية، و(٩) المحلول المائي الفسيولوجي لغرس الخلايا وفقًا لـ (٨) أعلاه، حيث تكون الخلية الجذعية اللحمية المتوسطية عبارة عن خلية جذعية لحمية متوسطية بشرية من نخاع العظام وتكون خلية T الثديية عبارة عن خلية T بشرية في الدم المحيطي.

يتعلق الاختراع الحالي أيضًا بـ (١٠) المحلول المائي الفسيولوجي الذي يحتوي على خلايا للغرس تضم: خلية ثديية؛ ٢,٠ إلى ٦,٠٪ (وزن/حجم) من التريهالوز، أحد مشتقاته، أو الملح من التريهالوز أو المشتق؛ و٤,٠ إلى ٧,٠٪ (وزن/حجم) من الديكستران، أحد مشتقاته أو الملح من الديكستران أو المشتق، (١١) المحلول المائي الفسيولوجي الذي يحتوي على خلية للغرس وفقًا لـ (١٠) أعلاه، حيث يتم اختيار لمحلول المائي الفسيولوجي من مجموعة مكونة من محلول لاكتات الرينجرز، محلول ملحي، محلول رينجرز، ومحلول أسيتات رينجرز، (١٢) المحلول المائي الفسيولوجي الذي يحتوي على خلية للغرس وفقًا لـ (١٠) أو (١١) أعلاه، حيث تكون الخلية الثديية عبارة عن خلية جذعية لحمية متوسطية أو خلية T ثديية، و(١٣) المحلول المائي الفسيولوجي الذي يحتوي على خلية للغرس وفقًا لـ (١٢) أعلاه، حيث تكون الخلية الجذعية اللحمية المتوسطية عبارة عن خلية جذعية لحمية متوسطية بشرية من نخاع العظام وتكون خلية T الثديية عبارة عن خلية T بشرية في الدم المحيطي.

يمكن للنماذج الأخرى للاختراع الحالي تضم توليفة من المحلول المائي الفسيولوجي وتريهالوز، أحد مشتقاته، أو الملح من التريهالوز أو المشتق وديكستران، أحد مشتقاته أو الملح من الديكستران أو المشتق لحفظ خلايا ثديية، واستخدام توليفة من المحلول المائي الفسيولوجي وتريهالوز، أحد مشتقاته، أو الملح من التريهالوز أو المشتق وديكستران، أحد مشتقاته أو الملح من الديكستران أو المشتق لتحضير محلول لغرس خلايا ثديية؛ بشكل محدَّد أكثر، يعد التريهالوز الموصوف أعلاه،

أحد مشتقاته، أو الملح من التريهالوز أو المشتق وديكستران، أحد مشتقاته أو الملح من الديكستران أو المشتق مكوِّنات نشطة للحد من الانخفاض في معدل البقاء على قيد الحياة .

تأثير الاختراع: وفقًا للاختراع الحالي، يمكن الحد من الانخفاض في معدل البقاء على قيد الحياة للخلايا بما في ذلك الخلايا الجذعية، مثل الخلايا الجذعية اللحمية المتوسطية، وكريات الدم البيضاء leukocytes ، مثل خلايا T، عند حفظ معلَّق الخلايا لفترة طويلة من الزمن (١٤ يومًا على الأقل)؛ وبالتالي، يمكن توفير معلَّق خلايا ذو جودة عالية للغرس في الطب التجديدي أو علاج السرطان cancer treatment ليس فقط لمنطقة إنتاج معلَّق الخلايا والمناطق المحيطة بها ولكن أيضًا للأماكن البعيدة، وعلى الرغم من إجراء اختبار التعقيم لفحص الجودة في شحن المنتجات الصيدلانية ويستغرق اختبار التعقيم ١٤ يوم وفقًا لدستور الصيدلة اليابانية، يمكن توفير معلَّق خلايا ذو جودة عالية حتى بعد إنتاج معلَّق الخلايا وإجراء اختبار التعقيم.

<u>شرح مختصر للرسومات</u>

شكل ١ عبارة عن رسم بياني يوضِّح نتائج تحليل معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hMSC-BM لمدة ١٤ يوم باستخدام كلاً من ١١ محلول لغرس الخلايا الثديية (محاليل S، LR، "LR + ١٪ D"، "LR + ٣٪ D"، "LR + ٥٪ D"، "LR + ٧٪ D"، "LR + ٣٪ T"، "LR + ٣٪ T + ١٪ D"، "LR + ٣٪ T + ٣٪ D"، "LR + ٣٪ T + ٥٪ D"، و"LR + ٣٪ T + ٧٪ D" : انظر محلول "١-١-١ لغرس الخلايا" في المثال ١). يبيِّن المحور الصادي ordinate axis نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتباره معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري [n = ٤]). من أجل المقارنة، تم توضيح معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة قبل الحفظ في المحلول الملحي لـ Dulbecco المنظم بالفوسفات phosphate buffered (D-PBS [-]) (المشار إليه هنا لاحقًا ببساطة المشار إليه باسم "PBS") محلول ("P" على المحور السيني abscissa axis في الشكل).

شكل ٢ عبارة عن رسم بياني يوضِّح نتائج تحليل معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hMSC-BM لمدة ٣ أيام، ٧ أيام، و١٤ يوم باستخدام كلاً من ١١ محلول لغرس الخلايا الثديية (محاليل S، LR، "LR + ١٪ D"، "LR + ٣٪ D"، "LR + ٥٪ D"، "LR + ٧٪ D"، "LR +

٣٪ T"، "+ ٣٪ LR + ١٪ D"، "+ ٣٪ LR + ٣٪ T + ٣٪ D"، "+ ٣٪ LR + ٥٪ T + ٥٪ D"، و" LR + ٣٪ + ٧٪ T + ٧٪ D" ["٢ إلى ١٢"، على التوالي على المحور السيني في الشكل]: انظر محلول "١-١-١ لغرس الخلايا" في المثال ١). يبيِّن المحور الصادي نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتباره معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري [n = ٤]). من أجل المقارنة، تم توضيح معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة قبل الحفظ (صفر يوم بعد الحفظ) في محلول PBS ("١" على المحور السيني في الشكل).

شكل ٣ عبارة عن رسم بياني يوضِّح نتائج تحليل معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hMSC-BM لمدة ١٤ يوم باستخدام كلاً من ١٣ محلول لغرس الخلايا الثديية (محاليل S، LR، "+ LR ١٪ T"، "+ LR ٣٪ T"، "+ LR ٥٪ T"، "+ LR ٧٪ T"، "+ LR ١٠٪ T"، "+ LR ٥٪ D"، "+ LR ٥٪ + ١٪ T D"، "+ LR ٥٪ + ٣٪ T D"، "+ LR ٥٪ + ٥٪ T D"، "+ LR ٥٪ + ٧٪ T D"، و"+ LR ٥٪ + ١٠٪ T": انظر محلول "٢-١-١ لغرس الخلايا" في المثال ٢). يبيِّن المحور الصادي نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتباره معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري standard deviation [n = ٤]). من أجل المقارنة، تم توضيح معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة قبل الحفظ في محلول PBS ("P" على المحور السيني في الشكل).

شكل ٤ عبارة عن رسم بياني يوضِّح نتائج تحليل معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hMSC-BM لمدة ٣ أيام، ٧ أيام، و١٤ يوم باستخدام كلاً من ١١ محلول لغرس الخلايا الثديية (محاليل S، LR، "+ LR ١٪ T"، "+ LR ٣٪ T"، "+ LR ٥٪ T"، "+ LR ٧٪ T"، "+ LR ٥٪ D"، "+ LR ٥٪ + ١٪ T D"، "+ LR ٥٪ + ٣٪ T D"، "+ LR ٥٪ + ٥٪ T D"، و" LR + ٥٪ + ٧٪ T D" ["٢ إلى ١٢"، على التوالي على المحور السيني في الشكل]: انظر محلول "٢-١-١ لغرس الخلايا" في المثال ٢). يبيِّن المحور الصادي نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتباره معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري [n = ٤]). من أجل المقارنة، تم توضيح معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة قبل الحفظ (صفر يوم بعد الحفظ) في محلول PBS ("١" على المحور السيني في الشكل).

شكل ٥ عبارة عن رسم بياني يوضِّح نتائج تحليل معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hMSC-BM لمدة ١٤ يوم باستخدام كلاً من ١١ محلول لغرس الخلايا الثديية (محاليل S، LR، LRD، LRTD، "LRD + GL"، "LRD + SR"، "LRD + MN"، "LRD + LC"، "LRD + RF"، "LRD + ML"، و"LRD + SC" : انظر محلول "٣-١-١ لغرس الخلايا" في المثال ٣).

٥ يبيِّن المحور الصادي نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتباره معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري [n = ٤]). تبيِّن "*" في الشكل وجود فرق كبير من الناحية الإحصائية (P < ٠,٠٥) مقابل LRD بواسطة اختبار Dunnett.

شكل ٦ عبارة عن رسم بياني يوضِّح نتائج تحليل معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hMSC-BM لمدة ١٤ يوم باستخدام كلاً من ١١ محلول لغرس الخلايا الثديية (محاليل S، LR، LRT، LRTD، "LRT + GL"، "LRT + SR"، "LRT + MN"، "LRT + LC"، "LRT + RF"، "LRT + ML"، و"LRT + SC" : انظر "٤-١-١ محلول لغرس الخلايا" في المثال ٤).

١٠ يبيِّن المحور الصادي نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتباره معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري [n = ٤]). تبيِّن "*" في الشكل وجود فرق كبير من الناحية الإحصائية (P < ٠,٠٥) مقابل LRT بواسطة اختبار Dunnett.

١٥ شكل ٧ عبارة عن رسم بياني يوضِّح نتائج تحليل معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hMSC-BM لمدة ١٤ يوم باستخدام كلاً من ١١ محلول لغرس الخلايا الثديية (محاليل S [محلول ملحي Otsuka عادي]، LR [حقن لاكتيك Lactec injection]، LRD [٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران dextran]، LRT [٣٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز trehalose]، "LR + GL" [حقن لاكتيك يحوي جلوكوز glucose]، "LR + SR"

٢٠ [حقن لاكتيك يحوي سوربيتول sorbitol]، "LR + MN" [حقن لاكتيك يحوي مانيتول mannitol]، "LR + LC" [حقن لاكتيك يحوي لاكتوز lactose]، "LR + RF" [حقن لاكتيك يحوي رافينوز raffinose]، "LR + ML" [حقن لاكتيك يحوي مالتوز maltose]، و"LR + SC" [حقن لاكتيك يحوي سكروز sucrose]). يبيِّن المحور الصادي نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتباره معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري [n = ٤]).

يبيِّن "***" في الشكل وجود فرق كبير من الناحية الإحصائية (P < ٠,٠٠١) مقابل LR بواسطة اختبار Dunnett.

شكل ٨ عبارة عن رسم بياني يوضِّح نتائج تحليل معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hMSC-BM لمدة ١٤ يوم باستخدام كلاً من ١٠ محلول لغرس الخلايا الثديية (محاليل LR، LRTD، S، STD، ٥٪ جلوكوز glucose ، ٥٪ جلوكوز TD، رينجر Ringer ، رينجر TD، فيين Veen ، وفيين TD: انظر "٥-١-١ محلول لغرس الخلايا" في المثال ٥). يبيِّن المحور الصادي نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتباره معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري [n = ٤]). من أجل المقارنة، تم توضيح معدل البقاء على قيد الحياة للخلايا قبل الحفظ في محلول PBS ("P" على المحور السيني في الشكل).

شكل ٩ عبارة عن رسم بياني يوضِّح نتائج تحليل معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hPBT لمدة ١ يوم، ٣ أيام، ٧ أيام، و١٤ يوم باستخدام كلاً من ٥ محلول لغرس الخلايا الثديية (S، LR، LRT، LRD، وLRTD). يبيِّن المحور الصادي نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتباره معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري [n = ٦]). من أجل المقارنة، تم توضيح معدل البقاء على قيد الحياة للخلايا قبل الحفظ (صفر يوم بعد الحفظ) في محلول PBS ("P" على المحور السيني في الشكل).

الوصف التفصيلي:

نمط تنفيذ الاختراع:

تعد طريقة حفظ الخلايا الثديية وفقًا للاختراع الحالي عبارة عن طريقة مقصورة على تطبيق "للاستخدام في غرس الخلايا"، التي تتضمن حفظ الخلايا الثديية في محلول مائي فسيولوجي يضم ٢,٠ إلى ٦,٠٪ (وزن/حجم) من التريهالوز و ٤,٠ إلى ٧,٠٪ (وزن/حجم) من الديكستران (المحلول الحالي لغرس الخلايا)؛ بشكل محدَّد أكثر، المحلول الحالي لغرس الخلايا تضم التريهالوز والديكستران كمكوِّنات نشطة للحد من الانخفاض في معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة. تم حفظ كثافة الخلايا الثديية في المحلول الحالي لغرس الخلايا التي تتراوح نمطيًا في نطاق من ٣١٠ إلى ١٠١٠ خلية/ مل.

بالنسبة للمحلول الحالي الذي يحوي خلايا للغرس، عادة ما يتم تضمن الخلايا الثديية في المحلول الحالي لغرس الخلايا. يمكن تحضير المحلول الحالي الذي يحوي خلايا للغرس عن طريق إضافة خلايا ثديية إلى المحلول الحالي لغرس الخلايا، أو عن طريق إضافة التريهالوز إلى ٢,٠ إلى ٦,٠٪ (وزن/حجم) والديكستران إلى ٤,٠ إلى ٧,٠٪ (وزن/حجم) إلى المحلول المائي الفسيولوجي الذي يحتوي على خلايا ثديية.

أمثلة الثديات وفقًا للاختراع الحالي يمكن أن تتضمن القوارض، مثل الفأر، فأر، الهامستر، أو خنزير غينيا، وهو فصيلة الأرانب، مثل أرنب، وهي ذوات الحوافر، مثل الخنزير، البقرة، الماعز، الحصان، أو الماعز، وآكلات اللحوم، مثل الكلب أو القط، و الرئيسيات، مثل الإنسان، القرد، القرد الهندي الصغير، قرد الربَّاح، وقرد القشة الأميركي، إنسان الغاب، أو الشمبانزي، من بين أنواع أخرى، تشمل الأمثلة المفضلة الفأر، الخنزير، والإنسان.

لا يقتصر المحلول المائي الفسيولوجي الذي تم وضعه تحديدًا على المحلول الحالي لغرس الخلايا والمحلول الحالي الذي يحوي خلايا للغرس شريطة كونه محلول مائي متساوي التوتر حيث يتم تعديل تركيزات الملح والسكر وما شابه بالصوديوم sodium ، البوتاسيوم potassium ، وما شابه من أجل توفير نفس الضغط الأسموزي تقريبًا لموائع الجسم أو موائع الخلايا. يمكن أن تتضمن الأمثلة الخاصة محلول ملحي، محاليل ملحية لها آثار محاليل مُنظمّة (محلول ملحي مُنظَّم بالفوسفات phosphate buffered saline [PBS] ، محلول ملحي مُنظَّم بالتريس Tris buffered saline [TBS] ، ومحلول ملحي مُنظَّم بـ HEPES)، محلول رينجرز، محلول لاكتات رينجرز، محلول أسيتات رينجرز، محلول بيكربونات رينجرز bicarbonate Ringer's solution ، ٥٪ محلول جلوكوز مائي glucose aqueous solution ، وسط قاعدي لاستنبات خلايا حيوانية basal media for animal cell (DMEM، EMEM، RPMI-1640، α-MEM، F-12، F-10، M-199 وما شابه)، وعوامل متساوية التوتر (جلوكوز glucose ، D-سوربيتول sorbitol ، D-مانيتول mannitol ، لاكتوز lactose ، كلوريد صوديوم sodium chloride وما شابه)؛ من بين عوامل أخرى، من المفضل اختيارها من مجموعة مكونة من محلول لاكتات الرينجرز، محلول ملحي، محلول رينجرز، ومحلول أسيتات رينجرز؛ يفضل تحديدًا is محلول لاكتات رينجرز أو محلول ملحي. يمكن أن يكون المحلول المائي الفسيولوجي محلول

متوفر تجاريًا أو تم تحضيره. أمثلة المحلول المتوفر تجاريًا يمكن أن تضم محلول Otsuka ملحي عادي (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (محلول ملحي)، محلول رينجرز "OTSUKA" (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (محلول رينجرز)، حقن لاكتيك (R) Lactec (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (محلول لاكتات رينجرز)، منقوع فيين F (من Kowa Pharmaceutical Co., Ltd.) (محلول أسيتات رينجرز)، حقن جلوكوز OTSUKA ٥٪ (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (٥٪ محلول جلوكوز مائي)، ومنقوع بيكانات Bicanate Infusion (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (محلول بيكربونات رينجرز bicarbonate Ringer's solution). بحسب المستخدم هنا، يشير مصطلح "متساوي التوتر isotonic " إلى ضغط أسموزي osmotic pressure يتراوح من ٢٥٠ إلى ٣٨٠ مللي أسمول/ل.

يمكن على نحو مناسب تزويد المحلول الحالي لغرس الخلايا والمحلول الحالي يحوي خلايا للغرس بمواد إضافية، مثل مادة مثبِّتة (على سبيل المثال، ألبومين مصل بشري human serum albumin أو جليكول بولي إيثيلين polyethylene glycol)، محلول منظم (على سبيل المثال، محلول فوسفات منظم phosphate buffer أو محلول استيات صوديوم منظم sodium acetate buffer)، عامل استخلاب chelating agent (على سبيل المثال، EDTA، EGTA، حمض سيتريك citric acid ، أو ساليسلات salicylate)، حمض أميني amino acid (على سبيل المثال، حمض أميني غير أساسي nonessential amino acid ، مثل جلوتامين glutamine ، آلانين alanine ، أسباراجين asparagine ، سيرين serine ، حمض اسبارتيك aspartic acid ، سيستين cysteine ، حمض جلوتاميك glutamic acid ، جلايسين glycine ، برولين proline ، أو تيروسين tyrosine)، فيتامين vitamin (على سبيل المثال، كلوريد كولين choline chloride ، حمض بانتوثينيك pantothenic acid ، حمض فوليك folic acid ، نيكوتيناميد nicotinamide ، هيدروكلوريد بيريدوكسال pyridoxal hydrochloride ، ريبوفلافين riboflavin ، هيدروكلوريد ثيامين thiamin hydrochloride ، حمض أسكوربيك ascorbic acid ، بيوتين biotin ، أو إينوسيتول inositol)، مذيب solubilizer ، مادة حافظة preservative ، ومضاد أكسدة antioxidant.

يمكن أن تكون مدة الحفظ عند حفظ الخلايا الثديية في المحلول الحالي لغرس الخلايا مدة كافية للحد من الانخفاض في معدل حياة الخلايا وزيادة نسبة الخلايا الحية، وتصل، على سبيل المثال، ١٢ ساعة أو أكثر، ١ يوم أو أكثر، ٢ أيام أو أكثر، ٣ أيام أو أكثر، أو ٧ أيام أو أكثر. بسبب إمكانية أن يكون لفترة حفظ الخلايا الثديية الطويلة تأثير ضار على بقاء الخلايا على قيد الحياة، تستمر الفترة نمطيًا إلى ٢١ يوم أو أقل، يفضل ١٦ يوم أو أقل، يفضل أكثر ١٤ يوم أو أقل من أجل تجنب التأثير الضار على معدل البقاء على قيد الحياة للخلايا. وبالتالي، تتراوح فترة الحفظ نمطيًا من ١٢ ساعة إلى ٢١ يوم، ١ إلى ٢١ يوم، ٢ إلى ٢١ يوم، ٣ إلى ٢١ يوم، أو ٧ إلى ٢١ يوم، يفضل ١٢ ساعة إلى ١٦ يوم، ١ إلى ١٦ يوم، ٢ إلى ١٦ يوم، ٣ إلى ١٦ يوم، أو ٧ إلى ١٦ يوم، يفضل أكثر ١٢ ساعة إلى ١٤ يوم، ١ إلى ١٤ يوم، ٢ إلى ١٤ يوم، ٣ إلى ١٤ يوم، أو ٧ إلى ١٤ يوم، يفضل على الإطلاق من ٣ إلى ١٤ يوم. يمكن تأكيد كبت موت الخلايا ثديية المحفوظة في المحلول الحالي لغرس الخلايا بطريقة معروفة قادرة على الكشف عن موت الخلايا، مثل طريقة تبقيع Trypan Blue ، طريقة TUNEL ، طريقة Nexin ، أو طريقة FLICA.

درجة حرارة الحفظ عند حفظ الخلايا الثديية في المحلول الحالي لغرس الخلايا يمكن أن تكون درجة حرارة لا يتم فيها تجميد محلول غرس الخلايا وتكون الخلايا متاحة، وتتراوح نمطيًا في نطاق من صفر إلى ٣٧م°، يفضل من صفر إلى ٢٥م° (درجة حرارة الغرفة).

يمكن أن تضم أمثلة التريهالوز في صورة التريهالوز الموصوف أعلاه α، β-تريهالوز trehalose في صورة داي ساكاريد disaccharide تكون فيه جزيئات α-جلوكوز و β-جلوكوز عبارة عن ١، ١-مرتبطة بجليكوسيد glycoside و β، β-تريهالوز في صورة داي ساكاريد حيث تكون جزيئات ٢ β-جلوكوز عبارة عن ١، ١- مرتبطة بجليكوسيد، بالإضافة إلى ذلك إلى α، α-تريهالوز في صورة داي ساكاريد حيث تكون جزيئات ٢ α-جلوكوز عبارة عن ١، ١- مرتبطة بجليكوسيد؛ من بين الأمثلة الأخرى، يعد α، α-تريهالوز هو المفضل. يمكن إنتاج مركبات التريهالوز المذكورة بأيٍ من الطرق المعروفة، مثل التخليق الكيميائي، الإنتاج بواسطة الكائنات الدقيقة، والإنتاج بواسطة الإنزيمات؛ مع هذا، يمكن أيضًا استخدام الأمثلة المتوفرة تجاريًا. يمكن أن تضم أمثلة ذلك α، α-تريهالوز (من Hayashibara Co., Ltd.) و α، α-تريهالوز (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.).

لا يعد التريهالوز المشتق في صورة التريهالوز الموصوف أعلاه محدَّدًا على نحو خاص شريطة كونه أحد مركبات جليكوسيل التريهالوز glycosyltrehaloses حيث يتم واحدة أو أكثر من وحدات الساكاريد saccharide units بالتريهالوز في صورة داي ساكاريد؛ تضم مركبات جليكوسيل تريهالوز glycosyltrehalose ، مالتوسيل maltosyltrehalose ، ومالتوتريوسيل تريهالوز maltotriosyltrehalose.

يمكن أن تضم أمثلة ملح التريهالوز أو المشتق منه في صورة التريهالوز الموصوف أعلاه أملاح إضافة لحمض، مثل الهيدروكلوريد hydrochloride ، وهيدروبرومات hydrobromate ، وهيدروإيوديد hydroiodide ، والفوسفات phosphate ، والنترات nitrate ، والكبريتات sulfate ، والأسيتات acetate ، والبروبيونات propionate ، وتولين سلفونات toluenesulfonate ، السكسينات succinate ، والأكسالات oxalate ، واللاكتات lactate ، ترترات tartrate ، والجليكولات glycolate ، سلفونات الميثان methanesulfonate ، والبيوتيرات butyrate ، الفاليرات valerate ، والسيترات citrate ، والفيومرات fumarate ، والماليات maleate ، المالات malate ؛ والأملاح المعدنية metal salt ، مثل ملح الصوديوم sodium salt ، وملح البوتاسيوم potassium salt ، وملح الكالسيوم calcium salt ؛ وملح النشادر ammonium salt ، وملح ألكيل أمونيوم alkylammonium. وتستخدم كل من هذه الأملاح على شكل محلول في وقت الاستخدام، ويفضل أن يكون لفاعليتها نفس قوة التريهالوز. يمكن أن تشكِّل هذه الأملاح هيدرات أو مذيبات، و يمكن استخدامها وحدها أو في توليفة مناسبة من اثنين أو أكثر من ذلك.

لا يعد الديكستران في صورة الديكسترات الموصوف أعلاه محدَّدًا على نحو خاص شريطة أن يكون عبارة عن بولي ساكاريد $(C_6H_{10}O_5)_n$ مكون من D-جلوكوز، باستخدام α ١ ٦ مرتبطة في صورة سلسلة رئيسية، ويمكن أن تضم الأمثلة عليه ديكسترات ٤٠ (يبلغ متوسط وزنه الجزيئي (Mw) = ٤٠٠٠٠) وديكسترات ٧٠ (Mw = ٧٠٠٠٠). يمكن إنتاج مركبات الديكسترات بواسطة أيٍ من الطرق المعروفة، مثل التخليق الكيميائي، الإنتاج بواسطة الكائنات الدقيقة، والإنتاج بواسطة الإنزيمات؛ مع هذا، يمكن أيضًا استخدام الأمثلة المتوفرة تجاريًا. يمكن أن تضم أمثلتها منتجات

تجارية، مثل حقن ديكسترات L منخفض الوزن الجزيئي (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) وديكسترات ٧٠ (من Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.).

أمثلة الديكسترات المشتق في صورة الديكسترات الموصوف أعلاه تضم سولفات ديكسترات ، ديكسترات معالج بالكربوكسيلات carboxylated dextran ، وداي إيثيل أمينو إيثيل diethylaminoethyl (DEAE)-ديكسترات.

يمكن أن تضمن أمثلة ملح الديكسترات والمشتق منه في صورة الديكسترات الموصوف أعلاه أملاح إضافية إلى حمض، مثل هيدروكلوريد ، هيدروبرومات hydrobromate ، هيدروإيوديد hydroiodide ، فوسفات phosphate ، نيترات nitrate ، سولفات sulfate ، أسيتات acetate ، بروبيونات propionate ، سلفونات تولين toluenesulfonate ، سكسينات succinate ، والأكسالات oxalate ، واللاكتات lactate ، ترترات tartrate ، والجليكولات glycolate ، سلفونات الميثان methanesulfonate ، والبيوتيرات butyrate ، الفاليرات valerate ، والسيترات citrate ، والفيومرات fumarate ، والماليات maleate ، المالات malate ؛ والأملاح المعدنية metal salt ، مثل ملح الصوديوم، وملح البوتاسيوم، وملح الكالسيوم؛ وملح النشادر، وملح ألكيل أمونيوم. وتستخدم كل من هذه الأملاح على شكل محلول في وقت الاستخدام، ويفضل أن يكون لفاعليتها نفس قوة الديكسترات. يمكن أن تشكّل هذه الأملاح هيدرات hydrates أو مذيبات solvates ، و يمكن استخدامها وحدها أو في توليفة مناسبة من اثنين أو أكثر من ذلك

يمكن أن أمثلة الخلايا الثدة وفقًا للاختراع الحالي خلايا ثديية من جزء البنكرياس يتم إعطائها عن طريق الوريد لمرضى السكري من النوع الأول، والخلايا الجذعية الثديية، الخلايا القاتلة الطبيعية natural killer (NK)، وخلايا T (على سبيل المثال، خلايا ألفا بيتا T ($\alpha\beta$)، خلايا دلتا جاما T ($\gamma\delta$)، الخلايا اللمفاوية T السامة cytotoxic T lymphocytes (CTL) ، وخلايا T المساعدة helper T cells)، الخلايا الملتهمة macrophage ، وكريات الدم البيضاء leukocytes (على سبيل المثال، كريات دم بيضاء حبيبية ناضجة وكريات دم بيضاء متعددة شكل النواة) يتم إعطائها عن طريق الوريد intravenously لمرضى السرطان بالإضافة إلى الخلايا الجذعية الثديية التي يتم إعطائها عن طريق الأوعية الدموية بغرض تطبيق الطب

التجديدي أو ما شابه ذلك، ويفضل خلايا T. يمكن عزل هذه الخلايا بالطرق الشائعة المعروفة. على سبيل المثال، كريات الدم البيضاء، خلايا T، خلايا T المساعدة، خلايا T السامة، كما يمكن عزل خلايا T γδ عن عينة من الأجسام المضادة في الدم المحيطي أو دم الحبل السري باستخدام وسيلة فرز خلايا منشطة بالفلورسنت fluorescent-activated cell sorter (FACS) بواسطة أجسام مضادة antibodies لعلامات سطح خلايا كريات الدم البيضاء leukocyte cell surface marker (CD45)، علامة سطح خلايا T cell surface marker T (CD3)، علامة سطح خلايا T المساعدة helper T cell surface marker (CD4)، خلايا T السامة للخلايا T cytotoxic T cell (CD8)، وعلامة سطح خلايا γδ T (CD39) أو جهاز فصل الخلايا المغناطيسي التلقائي automatic magnetic cell separation apparatus (autoMACS) باستخدام الأجسام المضادة لعلامات سطح الخلية المرمَّزة بمادة ترميز، مثل مادة الفلورسنت fluorescent ، بيوتين biotin ، أو أفيدين avidin ، والجسم المضاد المترافق بحبة (الحبة المغناطيسية magnetic bead) لمادة الترميز. يمكن أن تضم أمثلة مادة الترميز ألوفيكوسيانين allophycocyanin (APC)، فيكوإيريترين phycoerythrin (PE)، (فلوريسين أيزو ثيوسيانات fluorescein isothiocyanate)، Alexa Fluor 488، Alexa Fluor 647، Alexa Fluor 700، PE-Texas Red ، PE-Cy5، و PE-Cy7.

يعني مصطلح "الخلايا الجذعية: الخلايا غير الناضجة التي تتمتع بقدرة على التجديد الذاتي وقدرة على التمايز differentiation /التكاثر proliferation. تضم خلايا الجذعية مجموعات فرعية، مثل خلايا جذعية متعددة الإمكانات، خلايا الجذعية متعددة القدرات، أو الخلايا الجذعية ذات قدرة واحدة، وفقًا لقدرة التمايز. الخلايا الجذعية متعددة الإمكانات تعني الخلايا التي لا يمكنها أن تصبح عضو منفرد ولكن تتمتع بإمكانية التمايز إلى جميع أنواع الأنسجة أو الخلايا التي تكوِّن الكائن الحي. تعني الخلايا الجذعية متعددة القدرات الخلايا التي تتمتع بالقدرة على التمايز إلى عدة، ولكن ليس كل، أنواع الأنسجة أو الخلايا. تعني الخلايا الجذعية ذات القدرة الواحدة الخلايا القادر على التمايز إلى عدة أنسجة أو خلايا.

يمكن أن تضم أمثلة الخلايا الجذعية متعددة الإمكانات الخلايا الجذعية الجنينية embryonic stem cells (خلايا ES)، خلايا EG ، وخلايا iPS . يمكن إنتاج خلايا ES عن طريق

استنبات كتلة خلايا داخلية على خلايا مغذية أو في وسط يحوي LIF. تم وصف طريقة إنتاج خلايا ES ، على سبيل المثال في الطلب الدولي رقم ٢٢٣٦٢/٩٦، الطلب الدولي رقم ١٠١٠٥٧/٠٢، البراءة الأمريكية رقم ٥٨٤٣٧٨٠، البراءة الأمريكية رقم ٦٢٠٠٨٠٦، أو البراءة الأمريكية رقم ٦٢٨٠٧١٨. يمكن إنتاج خلايا EG عن طريق استنبات خلايا منتشة أولية في وسط يحوي mSCFن LIF، وbFGF (Cell, 70: 841-847, 1992). يمكن إنتاج خلايا iPS عن طريق إدخال عوامل إعادة برمجة ، مثل Oct3/4، Sox2، Klf4 (وعلى اختياريًا أيضًا c-Myc أو n-Myc)، إلى خلايا جسدية (على سبيل المثال،الأرومة الليفية fibroblasts أو خلايا الجلد skin cells) (Cell, 126: p. 663-676, 2006; Nature, 448: p. 313-317, 2007; Nat. Biotechno1, 26; p. 101-106, 2008; Cell 131: p. 861-872, 2007; Science, 318: p. 1917-1920, 2007; Cell Stem Cells 1: p. 55-70, 2007; Nat. Biotechnol, 25: p. 1177-1181, 2007; Nature, 448: p. 318-324, 2007; Cell Stem Cells 2: p. 10-12, 2008; Nature 451: p. 141-146, 2008; Science, 318: p. 1917-1920, 2007). تعد الخلايا الجذعية التي تم إنشاؤها باستنبات الأجنة المبكرة عن طريق غرس أنوية الخلايا الجسدية مفضلة أيضًا ككخلايا جذعية متعددة الإمكانات (Nature, 385, 810 (1997); Science, 280, 1256 (1998); Nature Biotechnology, 17, 456 (1999); Nature, 394, 369 (1998); Nature Genetics, 22, 127 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 14984 ((1999)), and Rideout III et al.(Nature Genetics, 24, 109 (2000)).

أمثلة الخلايا الجذعية متعددة القدرات multipotent stem cells تضم الخلايا الجذعية اللحمية المتوسطية mesenchymal stem cells قادر على على التمايز إلى خلايا، مثل الخلايا الشحمية adipocyte ، الخلايا العظمية osteocyte ، الخلايا الغضروفية chondrocyte ، الخلايا الشحمية، الخلايا السلفية المكونة للدم hematopoietic progenitors القادرة على التمايز إلى خلايا كريات دم، مثل الكريات البيضاء، الكريات الحمراء، والصفائح الدموية platelet ، الخلايا الجذعية العصبية neural stem cells القادرة على التمايز إلى خلايا، مثل الخلايا العصبية neuron ، الخلايا النجمية astrocyte ، والدبقية قليلة التغصن oligodendrocyte ،

والخلايا الجذعية الجسدية somatic stem cells ، مثل الخلايا الجذعية النخاعية myeloid stem cell والخلايا الجذعية الجرثومية germ stem cell. من المفضل أن تكون الخلايا الجذعية متعددة القدرات عبارة عن خلايا جذعية لحمية متوسطية mesenchymal stem cells. يعني مصطلح الخلايا الجذعية اللحمية المتوسطية أنها خلايا جذعية قادرة على التمايز إلى جميع أو بعض من خلايا بناء العظم osteoblast ، وخلايا الأرومة الغضروفية chondroblast ، وخلايا الأرومة الشحمية lipoblast. يمكن عزل الخلايا الجذعية متعددة القدرات عن الجسم الحي بالطرق المعروفة في حد ذاتها. على سبيل المثال، يمكن جمع الخلايا الجذعية اللحمية المتوسطية من نخاع العظام bone marrow ، الأنسجة الدهنية fat tissue ، الدم المحيطي peripheral blood ، دم الحبل السري cord blood ، وما شابه من الثديات بالطرق العامة المعروفة. على سبيل المثال، يمكن عزل الخلايا الجذعية اللحمية المتوسطية البشرية عن طريق استنبات والاستنبات الثانوي للخلايا الجذعية المكوِّنة للدم أو ما شابه بعد نقب نخاع العظام (Journal of Autoimmunity, 30 (2008) 163–171). يمكن أيضًا الحصول على الخلايا الجذعية متعددة القدرات عن طريق استنبات الخلايا متعددة الإمكانات المذكورة أعلاه في ظل ظروف حيث مناسبة. من المفضل أن تكون الخلايا الجذعية اللحمية المتوسطية عبارة عن خلايا جذعية لحمية متوسطية مشتقة من نخاع عظام بشر human bone marrow.

يمكن أن تضم أمثلة الخلايا الثديية وفقًا للاختراع الحالي خلايا ملتصقة. بحسب المستخدم هنا، يشير مصطلح خلايا "ملتصقة" هنا إلى خلايا معتمدة على سلسلة جزيئات متجاورة قادرة على البقاء على قيد الحياة، التكاثر، وإنتاج مواد عن طريق الالتصاق بسلسلة الجزيئات المتجاورة. يمكن أن تضم أمثلة الخلايا الجذعية الملتصقة الخلايا الجذعية متعددة الإمكانات، الخلايا الجذعية اللحمية المتوسطية، الخلايا الجذعية العصبية، الخلايا الجذعية النخاعية، والخلايا الجذعية الجرثومية germ stem cells . من المفضل أن تكون الخلايا الجذعية الملتصقة عبارة عن خلايا جذعية لحمية متوسطية أو خلايا جذعية متعددة الإمكانات pluripotent stem cells.

يمكن فصل الخلايا الثديية (مجموعات) وفقًا للاختراع الحالي عن خلايا الجسم الحي أو الخلايا المستنبتة فرعيًا في المعمل؛ مع هذا، من المفضل فصلها أو تنقيتها. بحسب المستخدم هنا، يعني مصطلح "معزولة أو منقاة" عملية إزالة المكونات غير المكونات المرغوبة التي تم وضعها. عادةً ما

يتراوح نقاء الخلايا الثديية التي تم عزلها أو تنقيتها (نسبة الخلايا المرغوبة، مثل الخلايا الجذعية الثديية، بناءًا على العدد الكلي للخلايا) ٣٠٪ أو أكثر، يفضل ٥٠٪ أو أكثر، يفضل أكثر ٧٠٪ أو أكثر، يفضل أكثر ٩٠٪ أو أكثر (على سبيل المثال، ١٠٠٪).

من المفضل أن تكون الخلايا الثديية (مجموعات) المحفوظة في المحلول الحالي لغرس الخلايا في حالة خلايا منفردة. بحسب المستخدم هنا، يعني مصطلح "حالة الخلايا المنفردة" أن الخلايا لا تجتمع مع بعضها مع خلايا أخرى لتكوين كتلة (بمعنى آخر، حالة غير مجمَّعة). يمكن تحضير الخلايا الثديية في حالة خلايا منفردة عن طريق تعريض الخلايا الثديية المستنبتة في المعمل للمعالجة بإنزيم تريبسين EDTA/ trypsin أو ما شابه. عادةً ما تبلغ نسبة الخلايا الثديية في حالة منفردة في الخلايا الثديية ٧٠٪ أو أكثر، يفضل ٩٠٪ أو أكثر، يفضل أكثر ٩٥٪ أو أكثر، ويفضل أكثر ٩٩٪ أو أكثر (على سبيل المثال، ١٠٠٪). يمكن تحديد نسبة الخلايا في حالة منفردة عن طريق تشتيبت الخلايا الثديية في PBS، ملاحظة التشتيب تحت المجهر، وفحص عدة خلايا (على سبيل المثال، ١,٠٠٠) مختارة عشوائيًا بحثًا عن وجود تكتلات.

من المفضل أن تكون الخلايا الثديية (مجموعات) المحفوظة في المحلول الحالي لغرس الخلايا طافية. بحسب المستخدم هنا، يشير مصطلح "طافية floating " إلى أن الخلايا محمولة في محلول للغرس دون ملامسة الجدار الداخلي لمبيت حاوية محلول الغرس.

عند تكتل أو ترسب الخلايا الثديية المحفوظة في المحلول الحالي لغرس الخلايا، من المفضل تعليق الخلايا قبل غرسها بطريقة معروفة جيدًا في الفن، مثل التوزيع بالممص أو البزل.

سيتم وصف الاختراع الحالي بشكل محدَّد أكثر أدناه بالإشارة إلى الأمثلة. مع هذا، لا يقصد بهذه الأمثلة تقييد النطاق التقني للاختراع الحالي.

الأمثلة

مثال ١

١. التأكيد ١ على أن المحلول الحالي لغرس الخلايا له تأثير متآزر للحد من الإنخفاض مع معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة. (تقييم العلاقة بين التغير في تركيز الديكستران والتأثير المتآزر عند تركيز تريهالوز ثابت يبلغ ٣٪ (وزن/حجم))

١-١ مادة

١-١-١ محلول لغرس الخلايا

S: محلول Otsuka ملحي عادي (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

LR: حقن لاكتيك Lactec (R) (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

+ LR ١٪ D: ١٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران dextran

+ LR ٣٪ D: ٣٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

+ LR ٥٪ D: ٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

+ LR ٧٪ D: ٧٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

+ LR ٣٪ T: ٣٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز Trehalose

+ LR ٣٪ + T ١٪ D: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز- و١٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

+ LR ٣٪ + T ٣٪ D: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز- و٣٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

+ LR ٣٪ + T ٥٪ D: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز- و٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

+ LR ٣٪ + T ٧٪ D: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز- و٧٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

١-١-٢ تحضير محلول لغرس الخلايا

١) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز (محلول "+ LR ٣٪ T") عن طريق إضافة وإذابة تريهالوز dissolving trehalose (من Hayashibara Co., Ltd.) في حقن اللاكتيك (محلول LR).

٢) يمكن تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز- و١٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران (محلول "+ LR ٣٪ + T ١٠٪ D") عن طريق إضافة وإذابة تريهالوز (من Hayashibara Co., Ltd.) في حقن ديكستران L منخفض الوزن الجزيئي Low Molecular (١٠٪ [وزن/حجم] حقن لاكتيك يحوي ديكستران) (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (محلول "+ LR ١٠٪ D").

٣) تم تحضير حقن لاكتيك تحوي النسب المحدَّدة مسبقًا (١، ٣، ٥، و٧٪ [وزن/حجم]) من الديكستران (محاليل "+ LR ١، ٣، ٥، و٧٪ D") عن طريق تخفيف محلول "+ LR ١٠٪ D" بمحلول LR.

٤) تم تحضير حقن لاكتيك تحوي ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز والنسب المحدَّدة مسبقًا (١، ٣، ٥، و٧٪ [وزن/حجم]) من الديكستران (محاليل "+ LR ٣٪ + T ١، ٣، ٥، و٧٪ D") عن طريق تخفيف محلول "+ LR ٣٪ + T ١٠٪ D" بمحلول "+ LR ٣٪ T".

١-١-٣ تحضير الخلايا الثديية

تم تحضير الخلايا الجذعية اللحمية المتوسطية البشرية من نخاع العظام [hMSC-BM] (من Lonza Co.، Ltd.) وفقًا للإجراءات الموصوفة في [١] إلى [٨] أدناه واستخدامها في التجربة الحالية.

[١] تم استنبات hMSC-BM في حاضن ٥٪ CO2 عند ٣٧م° في وجود طاقم وسط خاص للخلايا الجذعية اللحمية المتوسطية البشرية (من Lonza Co.، Ltd.) (المشار إليه هنا لاحقًا المشار إليه باسم "وسط MSC ") باستخدام دورق ٧٥ سم٢. تمت ملاحظة حالة الخلايا تحت

المجهر، وتم إجراء الاستنبات لحين الوصول على حالة تشابك الأنسجة الخلوية بنسبة حوالي ٨٠٪.

[٢] تمت إزالة وسط MDC باستخدام شافطة، وتم شطف hMSC-BM بـ ٨ مل/ دورق من PBS (من Invitrogen Co., Ltd.).

[٣] تمت إزالة PBS باستخدام شافطة، وتمت إضافة ٣,٧٥ مل/ دورق من تريبسين trypsin – EDTA (من Lonza Co.، Ltd.) يتبعها البقاء عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق.

[٤] تم التقليب ببطء أثناء ملاحظة hMSC-BM تحت المجهر لحين الوصول إلى نسبة ٩٠٪ تقريبًا.

[٥] تمت إضافة ٣,٧٥ مل/ دورق من وسط MSC لإيقاف تفاعل تريبسين، وتمت إستعادة hMSC-BM بالممص pipetting ونقله إلى انبوب طرد مركزي centrifuge tube ٥٠ مل.

[٦] تم إجراء الطرد المركزي عند ٦٠٠ × جم و٢٥م° لمدة ٥ دقائق.

[٧] تمت إزالة وسط MSC في صورة المادة الطافية باستخدام شافطة aspirator ، وتمت إضافة ٤ مل/ دورق من PBS (من Invitrogen Co., Ltd.) يتبعها تعليق suspending كريات hMSC-BM pellet (رواسب precipitate).

[٨] تم أخذ ١٠ ميكرو لتر من معلق hMSC-BM ؛ تم قياس عدد الخلايا باستخدام عدَّاد خلايا؛ وتمت إضافة PBS (من Invitrogen Co., Ltd.) إليه بمقدار ٥ ×١٠ ٥ خلية/ مل، والذي تم تبريده بعد ذلك بالثلج.

١-٢ الطريقة

من أجل التأكد من تمتع المحلول الحالي لغرس الخلايا بتأثير متآزر للحد من الإنخفاض في معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة، تم إجراء التجربة وفقًا للإجراءات الموصوفة في [١] إلى [٣] أدناه.

[١] المعلَّق hMSC-BM الذي تم تحضيره في الخطوة [٧] من مستحضر "١-١-٣ للخلايا الثديية" الموصوف أعلاه تم تشتيته في انبوب طرد مركزي مخروطي ١٥ مل باستخدام

FINPIPETTE (١٠٠ إلى ١٠٠٠ ميكرو لتر) وطرده مركزيًا عند ٦٠٠ g × و٢٥م° لمدة ٥ دقائق.

[٢] تمت إزالة/ شفط المادة الطافية بعد المعالجة بالطرد المركزي، وتم تعليق المادة الناتجة في كلاً من ١١ محلول لغرس الخلايا ومن ثم تم حفظها في الثلاجة (تحت درجة حرارة ٤م°) لمدة ١٤ يوم. لقياس معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة قبل الحفظ، تم شفط/ إزالة المادة الطافية بعد المعالجة بالطرد المركزي، ومن ثم تم تعليق المادة الناتجة في PBS (من Invitrogen Co., Ltd.)، يتبعها مباشرةً أخذ جزء (٢٠ ميكرو لتر) من المعلق، خلط الجزء مع ٢٠ ميكرو لتر من محلول بقعة Trypan الأزرق (من Gibco Co., Ltd.)، ومن ثم قياس العدد الكلي للخلايا وعدد الخلايا الميتة باستخدام عداد خلايا تحت المجهر لتقييم معدل الخلايا الحية (انظر "P" في شكل ١).

[٣] بعد حفظ hMSC-BM في محلول غرس الخلايا لمدة ١٤ يوم، تم التحريك بلطف (التوزيع بالممص ٥ مرات بحجم سائل يبلغ ٥٠٠ ميكرو لتر) في حالة يتم فيها إدخال طرف في مكان يمكن رؤيته فيه من أجل على بعد ٥ مم من القاع لجعل الخلايا في حالة معلقة، وتم أخذ جزء (٢٠ ميكرو لتر) من المعلق في انبوب بحجم الميكرو ١,٥ مل، وتم خلطه مع ٢٠ ميكرو لتر من محلول بقعة Trypan الأزرق (من Gibco Co., Ltd.)، ومن ثم قياسه للتوصل إلى العدد الكلي للخلايا وعدد الخلايا الميتة باستخدام عداد خلايا تحت المجهر لتقييم معدل الخلايا الحية.

١-٣ النتائج

تم توضيح نتائج تقييم معدل الخلايا الحية في جدول ١ وشكل ١. عند حفظ hMSC-BM في محلول S ومحلول LR، تمت ملاحظة قليل من hMSC-BM الحية (أقل من ١٪ لمحلول S و١٪ لمحلول LR)، بينما عند حفظ hMSC-BM في المحاليل "+ LR ١، ٣، ٥، و٧٪ D" ، زادت نسبة hMSC-BM الحية إلى ٤٪، ٩٪، ١٢٪، و٢٠٪، على التوالي (جدول ١ وشكل ١). عند حفظ hMSC-BM في المحلول "+ LR ٣٪ T" ، زادت أيضًا نسبة hMSC-BM الباقية على قيد الحياة إلى ٤٪ (جدول ١ وشكل ١). تبيِّن هذه النتائج أنه على على الرغم من حفظ الخلايا الثديية لوقت طويل، مثل hMSC-BM، في محلول ملحي أو محلول مائي فسيولوجي،

مثل محلول لاكتات رينجرز، الذي نتج عنه موت معظم الخلايا، فإن استخدام المحلول المائي الفسيولوجي الذي يحتوي على ديكستران أو تريهالوز يمكنه الحد من موت الخلايا وزيادة نسبة الخلايا الحية.

عند حفظ hMSC-BM في "محاليل + LR ٣٪ + T ١، ٣، ٥، و٧٪ D"، بلغت نسبة hMSC-BM الحية ١١٪، ٣٣٪، ٥٧٪، و٥٠٪، على التوالي وزادت مقارنة بحفظ hMSC-BM في محلول "+ LR ٣٪ T" (جدول ١ وشكل ١). بالإضافة إلى ذلك، معدلات بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام كلاً من المحلول "+ LR ٣٪ T" و"+ LR ١٪ D" بنسبة ٤٪، بلغ إجماليها ٨٪، بينما معدلات بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول "+ LR ٣٪ + T ١٪ D" ظلت عن نفس النسبة ١١٪ (١,٤ مرة). على نحو مشابه، قيم معدلات بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام المحلول "+ LR ٣٪ T" و"+ LR ٣٪ D" بلغ إجماليها ١٣٪، بينما ظل معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول "+ LR ٣٪ + T ٣٪ D" عند نسبة ٣٣٪ (٢,٥ مرة)؛ قيم معدلات بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول "+ LR ٣٪ T" و" LR + ٥٪ D" بلغ إجماليها ١٦٪، بينما معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول " LR + ٣٪ + T ٥٪ D" محلول ظلت عند نسبة ٥٧٪ (٣,٦ مرة)؛ وقيم معدلات بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول "+ LR ٣٪ T" و"+ LR ٧٪ D" بلغ إجماليها ٢٤٪، بينما معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول "+ LR ٣٪ + T ٧٪ D" محلول ظلت عند نسبة ٥٠٪ (٢,١ مرة). تبيِّن هذه النتائج أن الاستخدام المدمج لـ ٣٪ تريهالوز وحوالي ٥٪ (٤ إلى ٧٪) ديكستران يمكنه على نحو متأزر الحد من الانخفاض في معدل حياة الخلايا عند حفظ الخلايا الثديية، مثل hMSC-BM، لفترة طويلة من الزمن ويمكن أن يزيد على نحو متآزر نسبة الخلايا الحية.

جدول ١: معدل البقاء على قيد الحياة (٪) للخلايا عند حفظها لمدة ١٤ يوم

محلول غرس الخلايا	معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪)
S	صفر ± ١

LR	١ ± ١
D٪LR+1	٤ ± ٤
D٪LR+3	٣ ± ٩
D٪LR+5	٢ ± ١٢
D٪LR+7	٧ ± ٢٠
T٪LR+3	١ ± ٤
D٪T+1٪LR+3	٣ ± ١١
D٪T+3٪LR+3	٧ ± ٣٣
D٪T+5٪LR+3	١١ ± ٥٧
D٪T+7٪LR+3	١٧ ± ٥٠

بالنسبة"معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪)" في الجدول أعلاه، تم توضيح نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتبارها معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري، [n = ٤]. كان معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة قبل الحفظ "٩٣ ± ٢(٪)". بالنسبة لـ ١١ نوع من "محلول غرس الخلايا" في الجدول أعلاه، انظر محلول "١-١-١ لغرس الخلايا" في مثال ١.

علاوة على ذلك، تمت دراسة فترة حفظ hMSC-BM في محلول غرس الخلايا لمدة ٣ أيام و٧ أيام بالإضافة إلى ذلك إلى ١٤ يوم. تم توضيح النتائج في شكل ٢. كما هو الحال عند حفظ hMSC-BM لمدة ١٤ يوم، تبين أن الاستخدام المدمج ٣٪ تريهالوز وحوالي ٥٪ (٤ إلى ٧٪) ديكستران يمكنه على نحو متآزر الحد من الانخفاض في معدل حياة الخلايا عند حفظ hMSC-BM لفترة طويلة من الزمن ويزيد على نحو متآزر نسبة الخلايا الحية حتى عند حفظ hMSC-BM لمدة ٣ أيام أو ٧ أيام.

مثال ٢

٢. التأكيد ٢ على أن المحلول الحالي لغرس الخلايا له تأثير متآزر للحد من الإنخفاض في نسبة بقاء الخلايا على قيد الحياة (تقييم العلاقة بين التغير في تركيز تريهالوز والتأثير المتآزر عند التركيز الثابت للديكستران البالغ ٥٪ (وزن/حجم))

٢-١ المواد

٢-١-١ محلول لغرس الخلايا

S: محلول Otsuka ملحي عادي (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

LR: حقن لاكتيك (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

+ LR ١٪ T: ١٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

+ LR ٣٪ T: ٣٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

+ LR ٥٪ T: ٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

+ LR ٧٪ T: ٧٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

+ LR ١٠٪ T: ١٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

+ LR ٥٪ D: ٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

+ LR ٥٪ + D ١٪ T: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و١٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

+ LR ٥٪ + D ٣٪ T: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و٣٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

+ LR ٥٪ + D ٥٪ T: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

+ LR ٥٪ + D ٧٪ T: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و٧٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

+ LR ٥٪ + D ١٠٪ T: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و١٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

٢-١-٢ تحضير محلول لغرس الخلايا

١) تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران (محلول "+ LR ٥٪ D") عن طريق تخفيف حقن ديكستران L منخفض الوزن الجزيئي (١٠٪ [وزن/حجم]حقن لاكتيك يحوي ديكستران) (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (محلول "+ LR ١٠٪ D") بحقن اللاكتيك (محلول LR).

٢) تم تحضير ١٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز (محلول "+ LR ١٠٪ T") عن طريق إضافة وإذابة تريهالوز (من Hayashibara Co., Ltd.) في محلول LR.

٣) تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و١٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز (محلول "+ LR ٥٪ + D ١٠٪ T") عن طريق إضافة وإذابة تريهالوز (من Hayashibara Co., Ltd.) في محلول "+ LR ٥٪ D".

٤) تم تحضير حقن لاكتيك يحوي النسب المحدَّدة مسبقًا (١، ٣، ٥، و٧٪ [وزن/حجم]) من التريهالوز (محاليل "+ LR ١، ٣، ٥، و٧٪ T") عن طريق تخفيف the "+ LR ١٠٪ T" بمحلول LR.

٥) تم تحضير حقن لاكتيك يحوي ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران والنسب المحدَّدة مسبقًا (١، ٣، ٥، و٧٪ [وزن/حجم]) من التريهالوز (محاليل "+ LR ٥٪ + D ١، ٣، ٥، و٧٪ T") عن طريق تخفيف محلول "+ LR ٥٪ + D ١٠٪ T" بمحلول "+ LR ٥٪ D".

٢-٢ النتائج

بعد تحضير hMSC-BM بواسطة الطريقة الموصوفة في "١-١-٣ تحضير الخلايا الثديية" في مثال ١، تم إجراء تجربة وفقًا للإجراءات الموصوفة في "١-٢ الطريقة " في مثال ١ باستخدام ١٣ محلول لغرس الخلايا. تم توضيح النتائج في جدول ٢ وشكل ٣. كما في نتائج مثال ١، عند حفظ hMSC-BM في محلول S ومحلول LR، few أو no surviving hMSC-BM were observed (١٪ لمحلول S وصفر٪ لمحلول LR). عند حفظ hMSC-BM في المحاليل " LR + ١، ٣، ٥، ٧، و١٠٪ T"، نسب hMSC-BM الحية were ٢٪، ٦٪، ٧٪، ٥٪، و٣٪، على التوالي، بينما عند حفظ hMSC-BM في المحاليل "+ LR ٥٪ + D ١، ٣، ٥، ٧، و١٠٪ T"، بلغت نسب hMSC-BM الحية ٣٠٪، ٤٨٪، ٤٩٪، ٣٠٪، و١٤٪، على التوالي، يوضِّح زيادات كبيرة (جدول ٢ وشكل ٣). تحديدًا، بلغت معدلات بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول "+ LR ٥٪ D" و"+ LR ١٪ T" محلول ١١٪ و٢٪، على التوالي، بإجمالي ١٣٪، بينما معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول "+ LR ٥٪ + D ١٪ T" محلول ظلت عند نسبة ٣٠٪ (٢,٣ مرة). على نحو مشابه، قيم معدلات بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول "+ LR ٥٪ D" و"+ LR ٣٪ T" بلغ إجماليها ١٧٪، بينما معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عندما "+ LR ٥٪ + D ٣٪ T" محلول ظلت عند نسبة ٤٨٪ (٢,٨ مرة)؛ قيم معدلات بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول "+ LR ٥٪ D" و"+ LR ٥٪ T" بلغ إجماليها ١٨٪، بينما معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عندما "+ LR ٥٪ + D ٥٪ T" محلول ظلت عند نسبة ٤٩٪ (٢,٧ مرة)؛ وقيم معدلات بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول "+ LR ٥٪ D" و"+ LR ٧٪ T" بلغ إجماليها ١٦٪، بينما معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عندما "+ LR ٥٪ + D ٧٪ T" محلول ظلت عند نسبة ٣٠٪ (١,٩ مرة). تبيِّن هذه النتائج أن الاستخدام المدمج لحوالي ٣٪ (٢ إلى ٦٪) تريهالوز و٥٪ ديكستران يمكنه على نحو متأزر الحد من الانخفاض في معدل حياة الخلايا عند حفظ الخلايا الثديية، مثل hMSC-BM، لفترة طويلة من الزمن ويمكن أن يزيد على نحو متآزر نسبة الخلايا الحية.

جدول ٢: معدل البقاء على قيد الحياة (٪) للخلايا عند حفظها لمدة ١٤ يوم

محلول غرس الخلايا	معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪)

S	١ ± ١
LR	صفر ± صفر
T٪LR+1	٢ ± ١
T٪LR+3	٦ ± ٢
T٪LR+5	٧ ± ٢
T٪LR+7	٥ ± ٣
T٪LR+10	٣ ± ٢
d٪LR+3	١١ ± ٤
T٪D+1٪LR+3	٣٠ ± ٥
T٪D+3٪LR+3	٤٨ ± ٣
T٪D+5٪LR+3	٤٩ ± ٤
T٪D+7٪LR+3	٣٠ ± ٧
T٪D+10٪LR+3	١٤ ± ٥

بالنسبة "معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪)" في الجدول أعلاه، تم توضيح نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتباره معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري، [n = ٤]). بلغ معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة قبل الحفظ "٩٥ ± ٢(٪)". بالنسبة لـ ١٣ نوع من "محلول غرس الخلايا" في الجدول أعلاه، انظر محلول "٢-١-١ لغرس الخلايا" في مثال ٢.

بالإضافة إلى ذلك، تمت دراسة فترة حفظ hMSC-BM في محلول غرس الخلايا لمدة ٣ أيام و٧ أيام بالإضافة إلى ذلك إلى ١٤ يوم. تم توضيح النتائج في شكل ٤. كما هو الحال عند حفظ hMSC-BM لمدة ١٤ يوم، تبين أن الاستخدام المدمج لحوالي ٣٪ (٢ إلى ٦٪) تريهالوز و٥٪

ديكستران يمكنه على نحو متآزر الحد من الانخفاض في معدل حياة الخلايا عند حفظ hMSC-BM لفترة طويلة من الزمن ويزيد على نحو متآزر نسبة الخلايا الحية حتى عند حفظ hMSC-BM لمدة ٣ أيام أو ٧ أيام.

بتلخيص نتائج المثالين ١ و٢، تبين أن الاستخدام المدمج لحوالي ٣٪ (٢ إلى ٦٪) تريهالوز وحوالي ٥٪ (٤ إلى ٧٪) ديكستران يمكنه على نحو متآزر الحد من الانخفاض في معدل حياة الخلايا عند حفظ الخلايا الثديية، مثل hMSC-BM، لفترة طويلة من الزمن (١٤ يومًا على الأقل) ويمكنه يزيد على نحو متآزر نسبة الخلايا الحية.

مثال ٣

٣. دراسة تأثير الحد من الإنخفاض مع معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول غرس الخلايا يحتوي على توليفة من الديكستران وساكاريد آخر

٣-١ المواد

٣-١-١ محلول لغرس الخلايا

S: محلول Otsuka ملحي عادي (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

LR: حقن اللاكتيك (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

LRD: ٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

LRTD: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

LRD + GL: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران – و١,٦٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي جلوكوز

LRD + SR: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران – و١,٦٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي سوربيتول

LRD + MN: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران – و١,٦٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي مانيتول

LRD + LC: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران – و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي لاكتوز

LRD + RF: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و٤,٨٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي رافينوز raffinose

LRD + ML: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي مالتوز

LRD + SC: ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي سكروز

٣-١-٢ تحضير محلول لغرس الخلايا

١) تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران (محلول "LRD") و٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز- و٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران (محلول "LRTD") وفقًا للطريقة الموصوفة في "١-١-٢ تحضير محلول لغرس الخلايا" في مثال ١.

٢) تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و١,٦٪ (وزن/حجم)حقن لاكتيك يحوي جلوكوز (محلول "LRD + GL") عن طريق إضافة وإذابة جلوكوز (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRD".

٣) تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و١,٦٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي سوربيتول sorbitol (محلول "LRD + SR") عن طريق إضافة وإذابة السوربيتول (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRD".

٤) تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و١,٦٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي مانيتول (محلول "LRD + MN") عن طريق إضافة وإذابة مانيتول (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRD".

٥) تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي لاكتوز (محلول "LRD + LC") عن طريق إضافة وإذابة لاكتوز (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRD".

٦) تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و٤,٨٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي رافينوز (محلول "LRD + RF") عن طريق إضافة وإذابة رافينوز (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRD".

٧) تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي مالتوز (محلول "LRD + ML") عن طريق إضافة وإذابة مالتوز (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRD".

٨) تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران- و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي سكروز (محلول "LRD + SC") عن طريق إضافة وإذابة سكروز (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRD". تم تعريض مركبات الساكاريد ٧ (جلوكوز، سوربيتول، مانيتول، لاكتوز، رافينوز، مالتوز، وسكروز) لتعديل التركيز بحيث يكون لها الضغط الأسموزي osmotic pressure نفسه البالغ ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز.

٣-٢ النتائج

بعد تحضير hMSC-BM بالطريقة الموصوفة في "١-١-٣ تحضير الخلايا الثديية" في مثال ١، تم إجراء تجربة وفقًا للإجراءات الموصوفة في "١-٢ الطريقة " في مثال ١ باستخدام ١١ محلول لغرس الخلايا. تم توضيح النتائج في شكل ٥. كما في نتائج المثالين ١ و٢، كما تم توضيح استخدام توليفة من التريهالوز والديكستران للحد على نحو متأزر من الانخفاض في معدل حياة الخلايا عند حفظ hMSC-BM لمدة ١٤ يوم وزيادة معدل الخلايا الحية (مقارنة "LRTD" بـ "LRD"، "LR"، أو "S" في شكل ٥). على الناحية الأخرى، الاستخدام المدمج للديكستران بكلٍ من مركبات الساكاريد ٧ (جلوكوز، سوربيتول، مانيتول، لاكتوز، رافينوز، مالتوز، وسكروز) بدل التريهالوز عمل على تغيير معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة بدرجة طفيفة مقارنة باستخدام الديكستران وحده (مقارنة "LRD" بـ "LRD + GL"، "LRD + SR"، "LRD + MN"، " + LRD LC"، "LRD + RF"، "LRD + ML"، أو "LRD + SC" في شكل ٥). تبيِّن هذه النتائج أنه على عكس التريهالوز، لم يكن لمركبات الساكاريد ٧ تأثير كابت لموت الخلايا عند حفظ الخلايا

الثديية، مثل hMSC-BM، لفترة طويلة من الزمن وزيادة معدل الخلايا الحية في محلول غرس الخلايا.

مثال ٤

٤. دراسة تأثير الحد من الإنخفاض مع معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند استخدام محلول غرس الخلايا يحتوي على توليفة من الديكستران وساكاريد آخر

٤-١ المواد

٤-١-١ محلول لغرس الخلايا

S: محلول Otsuka ملحي عادي (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

LR: حقن لاكتيك (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

LRT: ٣٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

LRTD: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

LTD + GL: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و١,٦٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي جلوكوز

LTD + SR: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و١,٦٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي سوربيتول

LTD + MN: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و١,٦٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي مانيتول

LTD + LC: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي لاكتوز

LTD + RF: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٤,٨٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي رافينوز

LTD + ML: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي مالتوز

LTD + SC: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي سكروز

٤-١-٢ تحضير محلول لغرس الخلايا

١) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز (محلول "LRT") وتم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران (محلول "LRTD") وفقًا للطريقة الموصوفة في "١-١-٢ تحضير محلول لغرس الخلايا" في مثال ١.

٢) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و١,٦٪ (وزن/حجم)حقن لاكتيك يحوي جلوكوز (محلول "LRD + GL") عن طريق إضافة وإذابة جلوكوز (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRT".

٣) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و١,٦٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي سوربيتول (محلول "LRT + SR") عن طريق إضافة وإذابة سوربيتول (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRT".

٤) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و١,٦٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي مانيتول (محلول "LRT + MN") عن طريق إضافة وإذابة مانيتول (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRT".

٥) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي لاكتوز (محلول "LRT + LC") عن طريق إضافة وإذابة لاكتوز (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRT".

٦) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٤,٨٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي رافينوز (محلول "LRT + RF") عن طريق إضافة وإذابة رافينوز (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRT".

٧) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي مالتوز (محلول "LRT + ML") عن طريق إضافة وإذابة مالتوز (من Wako Pure Chemical Industries Ltd.) في محلول "LRT".

٨) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٣,٠٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي سكروز (محلول "LRT + SC") عن طريق إضافة وإذابة سكروز (من Wako Pure Chemical

.Industries Ltd) في محلول "LRT". تم تعريض مركبات الساكاريد ٧ (جلوكوز، سوربيتول، مانيتول، لاكتوز، رافينوز، مالتوز، وسكروز) لتعديل التركيز بحيث يكون لها الضغط الأسموزي نفسه البالغ ٥٪ (وزن/حجم) ديكستران.

٤-٢ النتائج

٥ بعد تحضير hMSC-BM بالطريقة الموصوفة في "١-١-٣ تحضير الخلايا الثديية" في مثال ١، تم إجراء تجربة وفقًا للإجراءات الموصوفة في "١-٢ الطريقة " في مثال ١ باستخدام ١١ محلول لغرس الخلايا. تم توضيح النتائج في شكل ٦. كما في نتائج الأمثلة ١ إلى ٣، أظهر الاستخدام المدمج للديكستران والتريهالوز الحد بشكل متآزر من الانخفاض في معدل حياة الخلايا عند استخدام محلول خلايا محفوظ لمدة يوم وزيادة معدل الخلايا الحية (مقارنة "LRTD" بـ "LRT"، ١٠ "LR"، أو "S" في شكل ٦). من ناحية أخرى، الاستخدام المدمج للتريهالوز بكلٍ من مركبات الساكاريد ٧ (جلوكوز، سوربيتول، مانيتول، لاكتوز، رافينوز، مالتوز، وسكروز) بدلاً من الديكستران أحدث تغييرًا طفيفًا على معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة مقارنة باستخدام التريهالوز وحده (مقارنة "LRT" بـ "LRT + GL"، "LRT + SR"، "LRT + MN"، "LRT + LC"، "LRT + RF"، "LRT + ML"، أو "LRT + SC" في شكل ٦). تبيِّن هذه النتائج أنه على عكس ديكستران، لا ١٥ تتمتع مركبات الساكاريد ٧ بتأثير كابت لموت الخلايا عند حفظ الخلايا الثديية، مثل hMSC-BM، لفترة طويلة من الزمن وزيادة معدل الخلايا الحية في محلول غرس الخلايا.

بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء تجربة باستخدام كلاً من مركبات الساكاريد ٧ (جلوكوز، سوربيتول، مانيتول، لاكتوز، رافينوز، مالتوز، وسكروز) وحده بدون توليفه مع التريهالوز أو الديكستران للتأكد من أن مركبات الساكاريد ٧ ليس لها تأثير كابت لموت الخلايا عند حفظ الخلايا الثديية، مثل ٢٠ hMSC-BM، لفترة طويلة من الزمن وزيادة معدل الخلايا الحية في محلول غرس الخلايا (شكل ٧).

مثال ٥

٥. دراسة المحلول الفسيولوجي المائي في المحلول الحالي لغرس الخلايا

٥-١ المواد

٥-١-١ محلول لغرس الخلايا

LR: حقن لاكتيك (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

LRTD: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز - و٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

S: محلول Otsuka ملحي عادي (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

STD: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز - و٥٪ (وزن/حجم) ديكستران-يحوي Otsuka Normal محلول ملحي

٥٪ جلوكوز: OTSUKA جلوكوز INJECTION ٥٪ (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

٥٪ جلوكوز TD: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز - و٥٪ (وزن/حجم) حقن جلوكوز OTSUKA يحتوي على ديكستران ٥٪

رينجر: محلول رينجرز "OTSUKA" (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

رينجر TD: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز - و٥٪ (وزن/حجم) ديكستران-يحوي محلول رينجرز "OTSUKA"

فيين: منقوع فيين F (من Kowa Pharmaceutical Co., Ltd.)

فيين TD: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز - و٥٪ (وزن/حجم) منقوع فيين F يحتوي على ديكستران

٥-١-٢ تحضير محلول لغرس الخلايا

١) تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران (محلول "LRD") وتم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز - و٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران (محلول "LRTD") وفقًا للطريقة الموصوفة في "١-١-٢ تحضير محلول لغرس الخلايا" في مثال ١.

٢) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز - و٥٪ (وزن/حجم) ديكستران-يحوي محلول Otsuka ملحي عادي (محلول "STD") عن طريق إضافة وإذابة تريهالوز (من Hayashibara Co.,

Ltd.) وديكستران ٤٠ (من Meito Sangyo Co., Ltd.) في محلول Otsuka ملحي عادي (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.).

٣) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز- و٥٪ (وزن/حجم) حقن جلوكوز OTSUKA يحتوي على ديكستران ٥٪ (محلول "٥٪ جلوكوز TD") عن طريق إضافة وإذابة تريهالوز (من Hayashibara Co., Ltd.) وديكستران ٤٠ (من Meito Sangyo Co., Ltd.) في حقن جلوكوز OTSUKA ٥٪ (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.).

٤) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز- و٥٪ (وزن/حجم) ديكستران-يحوي محلول رينجرز "OTSUKA" (محلول "رينجر TD") عن طريق إضافة وإذابة تريهالوز (من Hayashibara Co., Ltd.) وديكستران ٤٠ (من Meito Sangyo Co., Ltd.) في محلول رينجرز "OTSUKA" (Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.).

٥) تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز- و٥٪ (وزن/حجم) ديكستران-يحوي منقوع فيين F عن طريق إضافة وإذابة تريهالوز (من Hayashibara Co., Ltd.) وديكستران ٤٠ (من Meito Sangyo Co., Ltd.) في منقوع فيين F (من Kowa Pharmaceutical Co., Ltd.).

٥-٢ النتائج

بعد تحضير hMSC-BM بالطريقة الموصوفة في "١-١-٣ تحضير الخلايا الثديية" في مثال ١، تم إجراء تجربة وفقًا للإجراءات الموصوفة في "١-٢ الطريقة " في مثال ١ باستخدام ١٠ the محلول لغرس الخلايا. تم توضيح النتائج في شكل ٨. أظهر استخدام محلول Otsuka ملحي عادي (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)، محلول رينجرز "OTSUKA" (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)، أو منقوع فيين F (من Kowa Pharmaceutical Co., Ltd.) في صورة المحلول المائي الفسيولوجي في محلول غرس الخلايا تأثير كبح موت الخلايا عند حفظ hMSC-BM لمدة ١٤ يوم وزيادة معدل الخلايا الحية في

محلول غرس الخلايا (the مقارنة "S" بـ "STD"، the مقارنة "رينجر" بـ "رينجر TD"، أو the مقارنة "فيين" بـ "فيين TD" في شكل ٨). من ناحية أخرى، لم يلاحظ أن استخدام حقن جلوكوز OTSUKA ٥٪ (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) له تأثير في كبح موت الخلايا عند حفظ hMSC-BM لمدة ١٤ يوم (مقارنة "٥٪ جلوكوز" بـ "٥٪ جلوكوز TD" في شكل ٨). تظهر النتائج أعلاه أن تأثير الحد من الإنخفاض في معدل الخلايا الحية بالاستخدام المدمج للتريهالوز وديكستران تمت ملاحظته على الأقل عند استخدام كلاً من المحلول الملحي، محلول لاكتات الرينجرز، محلول الرينجرز، ومحلول أسيتات الرينجرز في صورة محلول مائي فسيولوجي.

مثال ٦

٦. التأكيد ٣ على أن المحلول الحالي لغرس الخلايا له تأثير متآزر للحد من الإنخفاض مع معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (التقييم باستخدام خلايا ثديية غير hMSC-BM)

تم التأكد مما إذا كان تأثير الحد من الإنخفاض في معدل حياة الخلايا بالمحلول الحالي لغرس الخلايا تمت ملاحظتها على نحو مشابه عند استخدام خلايا ثديية غير hMSC-BM.

٦-١ المواد

٦-١-١ محلول لغرس الخلايا

S: محلول Otsuka ملحي عادي (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

LR: حقن لاكتيك (من Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

LRT: ٣٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز

LRD: ٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

LRTD: ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران

٦-١-٢ تحضير محلول لغرس الخلايا

تم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي تريهالوز (محلول "LRT")، تم تحضير ٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران (محلول "LRD")، وتم تحضير ٣٪ (وزن/حجم) تريهالوز – و٥٪ (وزن/حجم) حقن لاكتيك يحوي ديكستران (محلول "LRTD") وفقًا للطريقة الموصوفة في "١-١-٢ تحضير محلول لغرس الخلايا" في مثال ١.

٦-٢ الطريقة

[١] تمت إضافة وسط RPMI (١٨ مل) (من Gibco Co., Ltd.) عند درجة حرارة الغرفة إلى أنبوب طرد مركزي مخروطي ٥٠ مل.

[٢] تم فك غطاء حاوية الحفظ (قنينة) التي تم داخلها حفظ خلية T بشرية في الدم المحيطي (hPBT) (من CELL APPLICATIONS، INC.) بالتجميد من أجل تحرير الضغط، متبوعًا بغلق الغطاء.

[٣] تمت إذابة الخلايا أثناء التحريك ببطء في الحاضن عند ٣٧م°.

[٤] تم نقل الخلايا التي تمت إذابتها إلى انبوب طرد مركزي مخروطي تمت إليه إضافة وسط RPMI المذكور أعلاه.

[٥] تم إجراء المعالجة بالطرد المركزي عند ٤٠٠ g × و٢٥م° لمدة ٥ دقائق، وتمت إستعادة الخلايا بواسطة شفط المادة الطافية وتعليقها في ١٠ مل/ قنينة من PBS (من Invitrogen Co., Ltd.).

[٦] تم قياس عدد الخلايا باستخدام عداد خلايا، وتمت إضافة PBS (من Invitrogen Co., Ltd.) إلى ٥ × ٥١٠ خلية/ مل، متبوعًا بالتبريد بالثلج.

[٧] تم تشتيت معلَّق الخلايا (٠,٥ مل) في كلاً من ١٢ انبوب طرد مركزي مخروطي conical centrifuge tubes ١٥ مل باستخدام FINPIPETTE (١٠٠ إلى ١٠٠٠ ميكرو لتر)

وتعريضها للمعالجة بالطرد المركزي centrifugation عند ٤٠٠ g × و٢٥م° لمدة ٥ دقيقة لاستعادة الخلايا.

[٨] تم شفط/ إزالة المادة الطافية، وتم تعليق hPBT في كلاً من ٥ محاليل لغرس الخلايا ومن ثم حفظها في الثلاجة (تحت درجة حرارة ٤م°). لقياس معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة قبل الحفظ، تم شفط/ إزالة المادة الطافية بعد المعالجة بالطرد المركزي، ومن ثم تم تعليق المادة الناتجة في PBS (من Invitrogen Co., Ltd.)، يتبعها مباشرةً أخذ جزء (٢٠ ميكرو لتر) من المعلق، خلط الجزء مع ٢٠ ميكرو لتر of محلول بقعة Trypan الأزرق (من Gibco Co., Ltd.)، ومن ثم قياس العدد الكلي للخلايا وعدد الخلايا الميتة باستخدام عداد خلايا تحت المجهر لتقييم معدل الخلايا الحية (انظر "P" في شكل ٩).

[٩] بعد حفظ hPBT في محلول غرس الخلايا، تم بلطف تحريك (٥ مرات توزيع بالممص بحجم سائل يبلغ ٢٥٠ ميكرو لتر) في حالة تم فيها إدخال طرف السن في مكان يكون مرئيًا فيه على ارتفاع ٥ مم من القاع لجعل الخلايا في حالة تعليق عند اليوم ١، اليوم ٣، اليوم ٧، واليوم ١٤ من الحفظ، وتم أخذ جزء (٢٠ ميكرو لتر) من المعلق إلى انبوب دقيق ١,٥ مل، خلطه مع ٢٠ ميكرو لتر من محلول بقعة Trypan الأزرق (من Gibco Co., Ltd.)، ومن ثم قياس العدد الكلي للخلايا وعدد الخلايا الميتة باستخدام عداد خلايا تحت المجهر لتقييم معدل الخلايا الحية.

٦-٣ النتائج

تم توضيح نتائج تقييم معدل الخلايا الحية في جدول ٣ وشكل ٩. انخفضت معدلات بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hPBT في محلول S ومحلول LR لمدة ١ يوم إلى ١٨٪ و٢٩٪، على التوالي ("S" و"LR" عند ١ يوم بعد بدء الحفظ في جدول ٣ وشكل ٩). تحسنت معدلات بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hPBT في محلول LRT ومحلول LRD لمدة ١ يوم إلى ٣٧٪ و٤٩٪، على التوالي، دون فرق كبير ("LRT" و"LRD" عند ١ يوم بعد بدء الحفظ في جدول ٣ وشكل ٩). من ناحية أخرى، بلغ معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة عند حفظ hPBT في محلول LRTD لمدة ١ يوم ٨٢٪ مع فارق كبير مقارنة بالحفظ في محلول LR ("LRTD" عند ١ يوم بعد

بدء الحفظ في جدول ٣ وشكل ٩). تبيِّن هذه النتائج أن الاستخدام المدمج للتريهالوز وديكستران يمكنه الحد بشكل فعَّال من الإنخفاض فب معدل حياة خلايا hPBT.

أصبح تأثير الاستخدام المدمج للتريهالوز وديكستران ملحوظًا بدرجة أكبر عند حفظ hPBTالمدة ٣ أيام، ٧ أيام، و١٤ يوم. على نحو خاص، زاد الاستخدام المدمج للتريهالوز وديكستران معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة بمقدار ضعفين أو أكثر مقارنة باستخدام التريهالوز أو الديكستران وحدهما، كما تمت ملاحظة أن الاستخدام المدمج للتريهالوز وديكستران له تأثير متآزر ("LRTD" at ٣ أيام، ٧ أيام، و١٤ يوم بعد بدء الحفظ في جدول ٣ وشكل ٩). تحديدًا عند الحفظ لمدة ٧ أيام، بلغت نسب hPBT الباقية على قيد الحياة في محلول LRT ومحلول LRD ١٣٪ و١٧٪، على التوالي، بإجمالي ٣٠٪، بينما بلغت نسبة hPBT الباقية على قيد الحياة في محلول LRTD ٥٧٪ (١,٩ مرة)، مما يوضِّح التأثير المتآزر العالي للاستخدام المدمج للتريهالوز وديكستران. تبيِّن هذه النتائج أن تأثير الحد من الانخفاض في معدل الخلايا الحية بواسطة الاستخدام المدمج للتريهالوز وديكستران يشابه أيضًا نظيره الذي تمت ملاحظته عند استخدام خلايا ثديية (hPBT) غير hMSC-BM.

جدول ٣: معدل البقاء على قيد الحياة (٪) عند حفظ Hpbt

محلول غرس الخلايا	١ يوم	٣ أيام	٧ أيام	١٤ أيام

S	١٨ ± ١٢	٤ ± ٤	١ ± ١	صفر ± صفر
LR	٢٩ ± ٢١	٢٢ ± ١٥	٨ ± ٥	٤ ± ٣
LRT	٣٧ ± ١٧	٢٢ ± ١١	١٣ ± ٧	١١ ± ٦
LRD	٤٩ ± ١٣	٢٥ ± ١٨	١٧ ± ٧	١٦ ± ٧*
LRTD	٨٢ ± ٧***	٦٦ ± ١٩***	٥٧ ± ١٤***	٣٢ ± ٨***

بالنسبة لـ "معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪)" في الجدول أعلاه، تم توضيح نسبة الخلايا الحية بناءًا على العدد الكلي للخلايا باعتبارها معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (٪) (متوسط ± الإنحراف العياري، [n = ٦]. تبيِّن "*" و"***" في الجدول وجود فروق كبيرة من الناحية الإحصائية (P < ٠,٠٥ وP < ٠,٠٠١، على التوالي) مقابل LR اختبار Dunnett. بلغ معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة قبل الحفظ "٩٢ ± ٣(٪)". بالنسبة لـ ٥ أنواع من "محلول غرس الخلايا" في الجدول أعلاه، انظر "٦-١-١ محلول لغرس الخلايا" في مثال ٦.

قابلية التطبيق الصناعي

يمكن للاختراع الحالي توفير معلق خلايا ذو جودة جيدة قادر على الحد من الانخفاض في معدل حياة الخلايا عند حفظ معلَّق الخلايا الذي يحتوي على الخلايا الجذعية، مثل MSC، وكريات الدم البيضاء، مثل خلايا T لفترة طويلة من الزمن، مما يجعله مفيدًا في مجال الغرس الطبي في الطب التجديدي أو ما شابه وفي مجال علاج السرطان.

عناصر الحماية

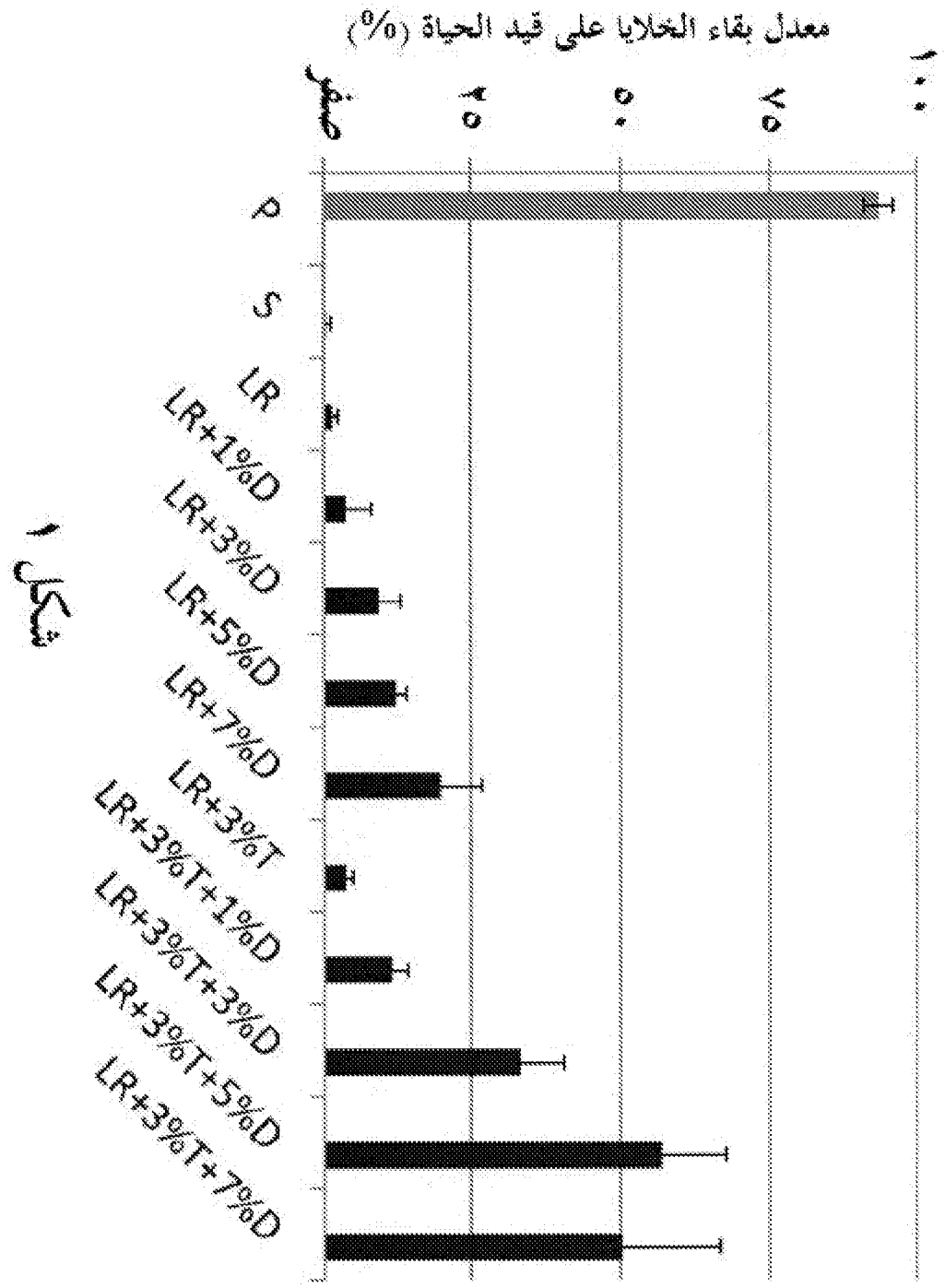
١- طريقة تشتمل على خطوة حفظ خلية ثديية mammalian cell في محلول مائي فسيولوجي physiological aqueous solution لغرس الخلايا يضم ٢,٠ إلى ٦,٠٪ (وزن/حجم) من التريهالوز trehalose ، أحد مشتقاته، أو الملح من التريهالوز trehalose أو المشتق، و ٤,٠ إلى ٧,٠٪ (وزن/حجم) من الديكسترات dextran ، أحد مشتقاته، أو الملح من الديكسترات dextran أو المشتق، حيث يتم حفظ الخلية الثديية mammalian cell في المحلول مائي الفسيولوجي لزرع الخلايا لمدة ١ إلى ١٤ يوم.

٢- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية ١، حيث يتم اختيار المحلول المائي الفسيولوجي physiological aqueous solution من مجموعة مكونة من محلول لاكتات الرينجرز lactate Ringer's ، محلول ملحي saline ، محلول رينجرز Ringer's solution ، ومحلول أسيتات رينجرز acetate Ringer's solution.

٣- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية ١ أو ٢، حيث يتم حفظ الخلية الثديية mammalian cell في المحلول المائي الفسيولوجي physiological aqueous solution لغرس الخلايا لمدة ٣ إلى ١٤ يوم.

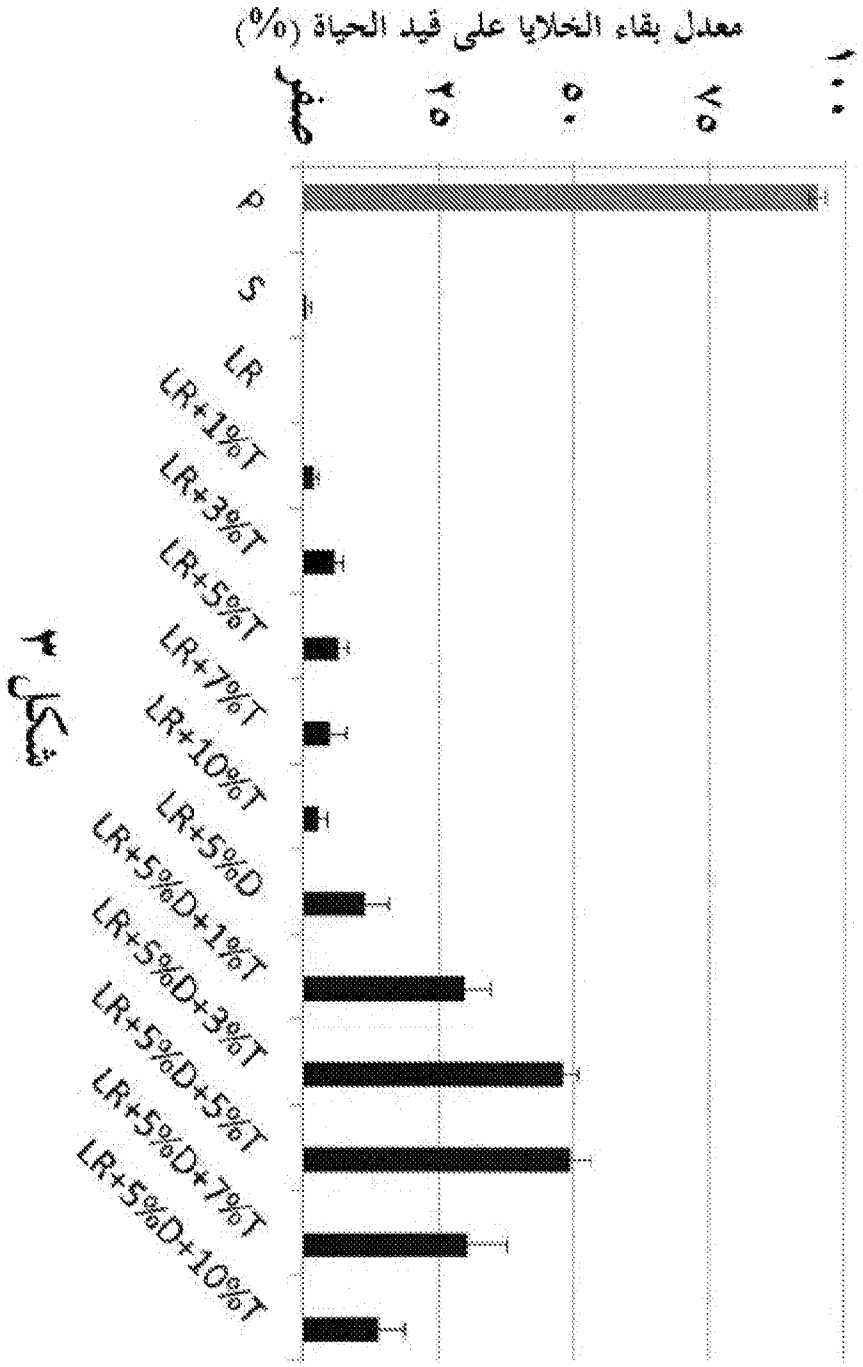
٤- الطريقة وفقًا لأيٍ من عناصر الحماية ١ إلى ٣، حيث تكون الخلية الثديية mammalian cell عبارة عن خلية جذعية stem cell لحمية متوسطية أو خلية T ثديية mammalian T cell.

٥- الطريقة وفقًا لعنصر الحماية ٤، حيث تكون الخلية الجذعية اللحمية المتوسطية عبارة عن خلية جذعية stem cell لحمية متوسطية بشرية من نخاع العظام bone marrow وتكون خلية T الثديية mammalian T cell عبارة عن خلية T بشرية في الدم المحيطي human peripheral blood T cell .

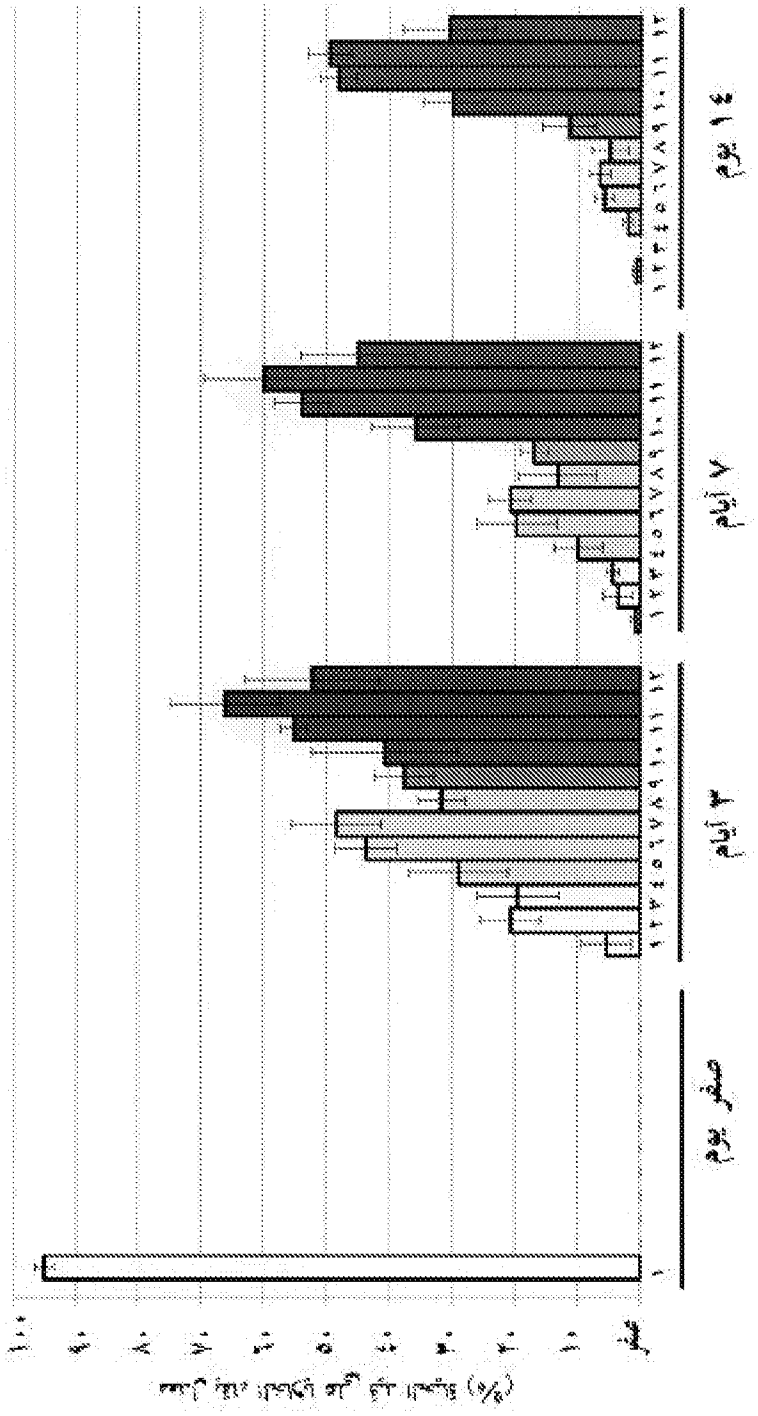

معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (%)
١٠٠
٧٥
٥٠
٢٥
صفر
P
S
LR
LR+1%D
LR+3%D
LR+5%D
LR+7%D
LR+3%T
LR+3%T+1%D
LR+3%T+3%D
LR+3%T+5%D
LR+3%T+7%D

شكل ١

شكل ٢

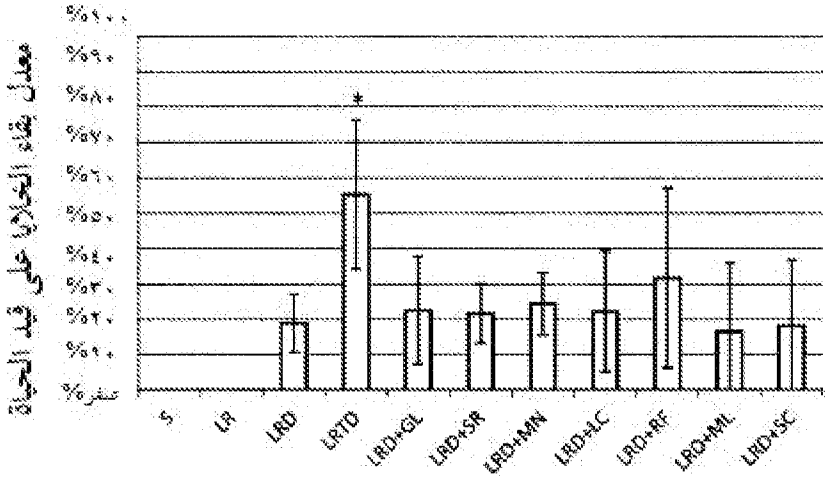

معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة (%)
١٠٠
٧٥
٥٠
٢٥
صفر
P
S
LR
LR+1%T
LR+3%T
LR+5%T
LR+7%T
LR+10%T
LR+5%D
LR+5%D+1%T
LR+5%D+3%T
LR+5%D+5%T
LR+5%D+7%T
LR+5%D+10%T

شكل ٤

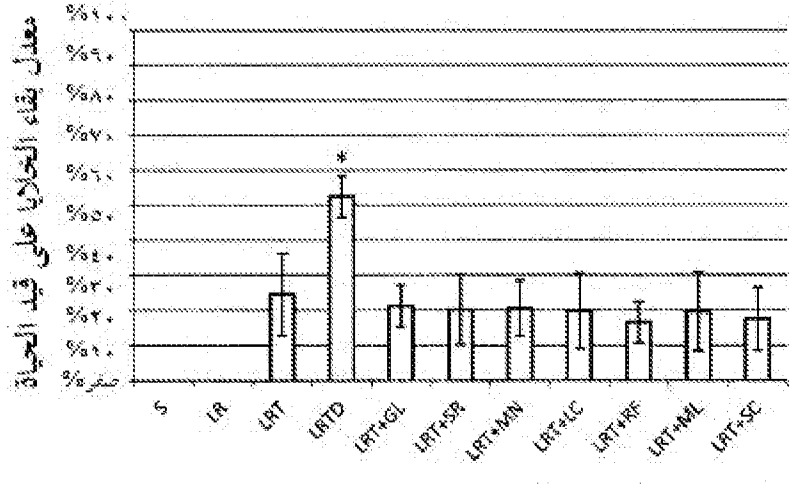


شكل ٤

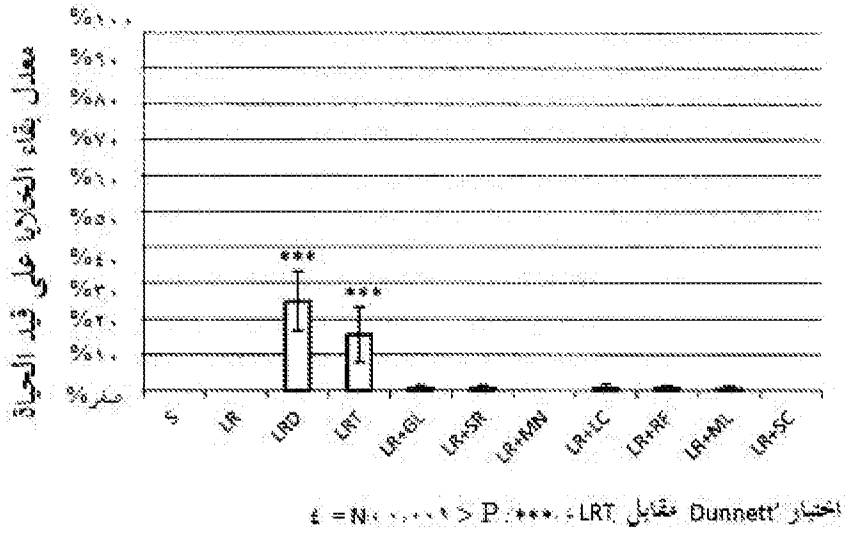
شكل ٥



شكل ٦

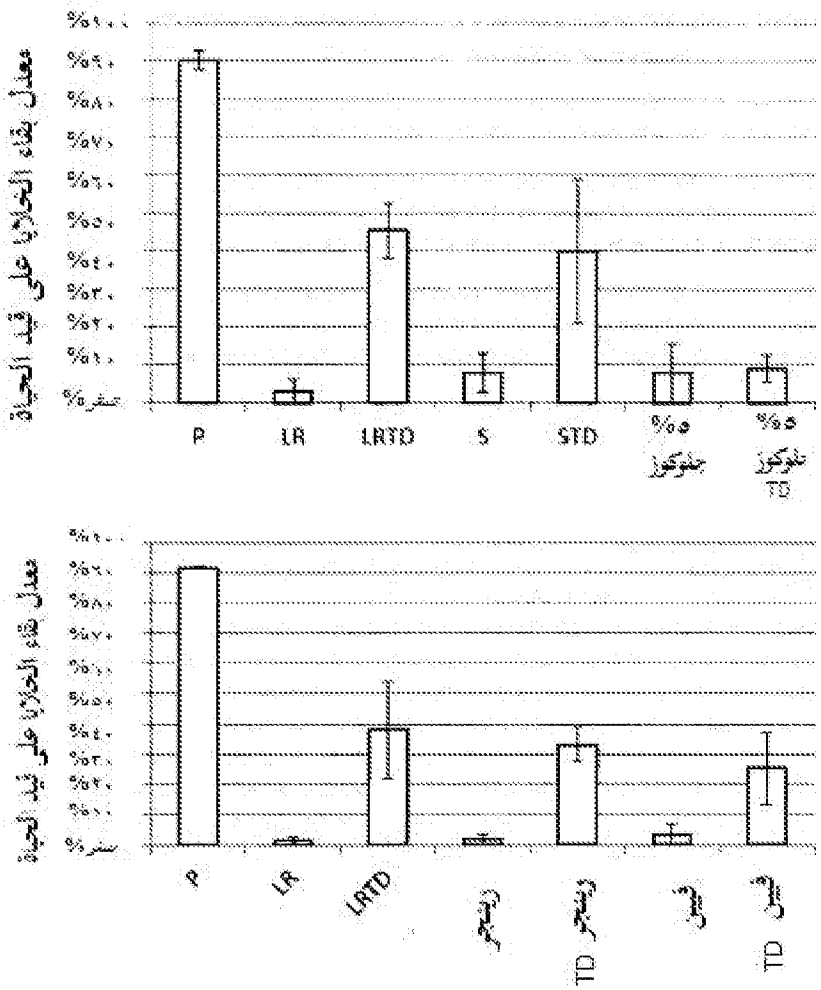


اختبار 'Dunnett مقابل LRT ، P < ٠,٠٥ ، N = ٤



اختبار Dunnett' مقابل LRT؛ ***: P < ٠,٠٠٠١؛ N = ٤

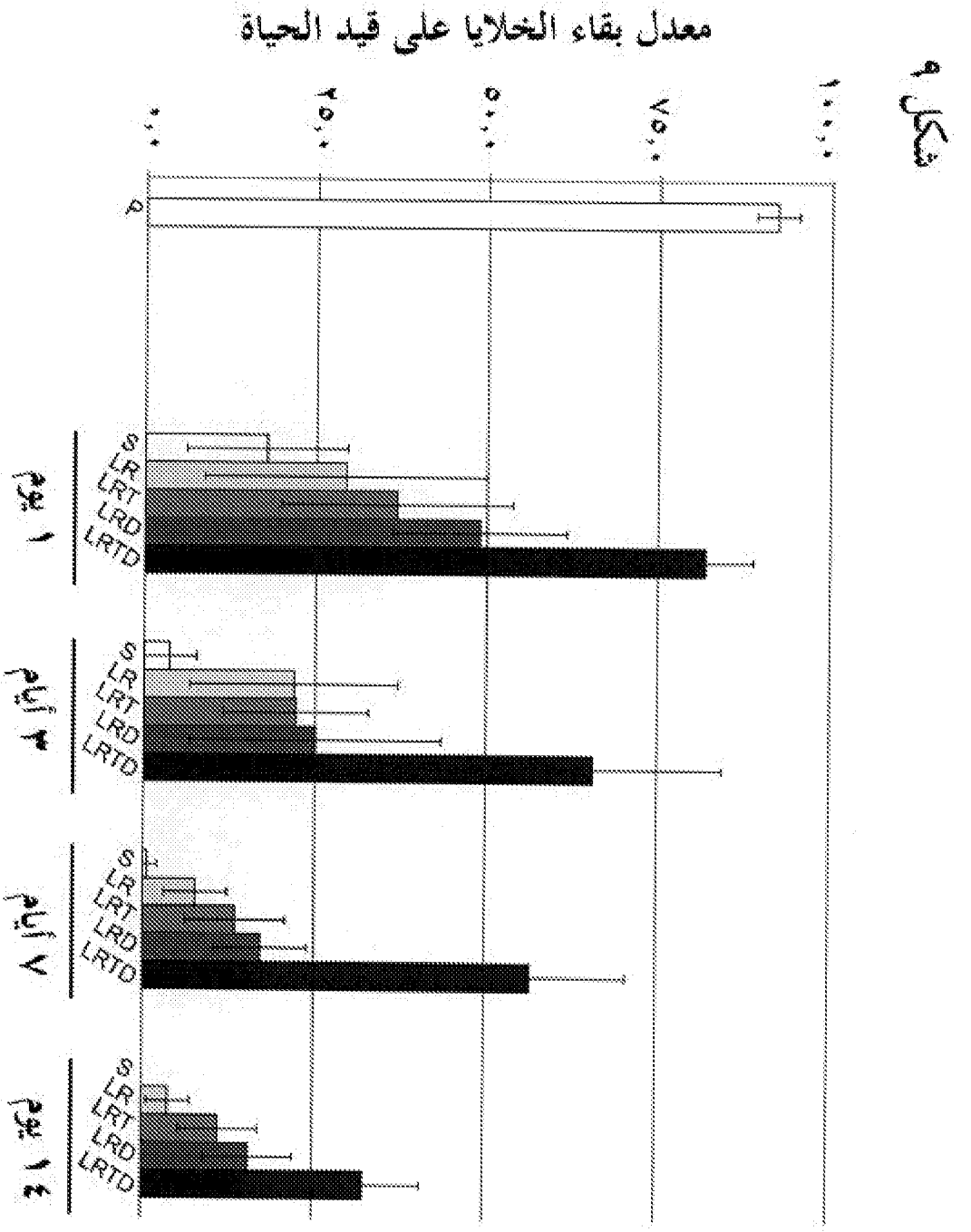
شكل ٧



معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة
%١٠٠
%٩٠
%٨٠
%٧٠
%٦٠
%٥٠
%٤٠
%٣٠
%٢٠
%١٠
%صفر
P
LR
LRTD
S
STD
%٥ جلوكوز
%٥ جلوكوز TD
معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة
P
LR
LRTD
TD
TD

شكل ٨

شكل ٥


معدل بقاء الخلايا على قيد الحياة
١٠٠,٠
٧٥,٠
٥٠,٠
٢٥,٠
٠,٠
P
S
LR
LRT
LRD
LRTD
١ يوم
٣ أيام
٧ أيام
١٤ يوم

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشرط تسديد المقابل المالي السنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية

صادرة عن
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية ، مكتب البراءات السعودي
ص ب ٦٠٨٦ ، الرياض ١١٤٤٢ ، المملكة العربية السعودية
بريد الكتروني: patents@kacst.edu.sa