الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia

براءة اختراع

إن الرئيس التنفيذي للهيئة السعودية للملكية الفكرية و بموجب أحكام نظام براءات الإختراع و التصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة و الأصناف النباتية و النماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/27 وتاريخ 1425/05/29هـ و المعدل بقرار مجلس الوزراء رقم 536 و تاريخ 1439/10/19هـ ، و لائحته التنفيذية.
يقرر منح :

ريكسجينيرو بيوسينسيس اس. ال
Rexgenero BioSciences, S.L.
سيرفيسيو انداليوز دي سالود
Servicio Andaluz de Salud
فونداشن بوبليكا انداليوزا بروجريسو واي سالود
Fundacion Publica Andaluza Progreso Y Salud

براءة اختراع رقم : SA 11943

بتاريخ : 1444/06/16 هـ
الموافق : 2023/01/09 م

عن الإختراع المسمى :

معلق خلية لاستخدامه في معالجة مرض الشريان المحيطي للطرف السفلي

CELL SUSPENSION FOR USE IN THE TREATMENT OF LOWER EXTREMITY PERIPHERAL ARTERY DISEASE

وفق ما هو موضح في وصف الاختراع المرفق، ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق النظامية في المملكة العربية السعودية خلال فترة سريان الحماية.

الرئيس التنفيذي

د. عبدالعزيز بن محمد السويلم

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

[19] **الهيئة السعودية للملكية الفكرية**
[11] **رقم البراءة:** SA 11943 B1

[12] **براءة اختراع**

[45] **تاريخ المنح:** 1444/06/16 هـ
الموافق: 2023/01/09 م

[21] رقم الطلب: 519401187
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1440/06/20 هـ
الموافق: 2019/02/25 م
[30] بيانات الأسبقية:
16382405.5 EP 2016/08/26 م
[72] اسم المخترع: دوبير جوناثان روبيرت باركلاى ، دى جون ليسبيث ، واجينا ادوين جا
[73] مالك البراءة: 1)ريكسجينيرو بيوسينسيس اس. ال ، 2)سيرفيسيو اندالوز دى سالود ، 3)فونداشن بوبليكا اندالوزا بروجريسو واى سالود
عنسوانه: 1)كال ماكس بلانك 3 (اى دى . اريس الثانى ، اسلا دى لا كارتوجا) 41092 سيفيلا ، اسبانيا ، 2)افدا . دى لا كونستيتوسيون 18 41071 سفيلا ، اسبانيا ، 3)افدا . اميريكو فيسبوسيو 15 ، اديفيسيو اس 2 ، باركوى سينتيفيكو واى تيكولوجيكا كارتوجا 41092 سيفيلا ، اسبانيا
جنسيته: 1)اسبانية ، 2)اسبانية ، 3)اسبانية
[74] الوكيل: تركي عبد الكريم عبد الرزاق العليوي

[86] رقم الطلب الدولي: PCT/EP2017/071580
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2017/08/28 م
[87] رقم النشر الدولي: WO/2018/037134
تاريخ النشر الدولي: 2018/03/01 م
[51] التصنيف الدولي(IPC[8]):
C12N 005/078, A61K 035/015
[56] المراجع:
US 1011076255
Lymphocyte-to-monocyte ratio: a novel marker for critical limb ischemia in PAOD patients
Association of the Derived Neutrophil-Lymphocyte Ratio With Critical Limb Ischemia

الفاحص: ماجد بن غرم الله الغامدي

[54] اسم الاختراع: معلق خلية لاستخدامه في معالجة مرض الشريان المحيطي للطرف السفلي

CELL SUSPENSION FOR USE IN THE TREATMENT OF LOWER EXTREMITY PERIPHERAL ARTERY DISEASE

[57] الملخص: يتعلق الاختراع بمعلق خلية cell suspension من خلايا كُرية دم بيضاء white blood cells (WBCs) مشتقة من نخاع العظم bone marrow-derived عند البالغين ذاتية أو خيفية ويُفضل ذاتية، ويُفضل اشتقاق تلك الخلية من عُرف الحُرقُفة ilium (العرف الحرقفي iliac crest) أو المخصب لخلايا وحيدة النواة mononuclear cells (MNC) ويعني ذلك أن هناك أكثر من 25٪ من خلايا الدم البيضاء الموجودة في معلق الخلية هي عبارة عن خلايا وحيدة النواة وتشتمل على:
أ-خلايا وحدية النواة مختارة من قائمة تشتمل على:
1.مجموعة من الخلايا اللمفاوية Lymphocytes؛
2. مجموعة من الخلايا وحيدة النواة Monocytes؛ و
3. مجموعة من الخلايا الجذعية المكونة للدم Hematopoietic stem cells التي تعبر عن كتلة تمايز 34 cluster of differentiation 34 (CD34)؛
وحيث أن معلق الخلية يشتمل أيضاً على:
ب-الخلايا المُحببة Granulocytes
لاستخدامها في معالجة أو تخفيف مرض الشريان المحيطي peripheral artery disease للطرف السفلي lower extremity.

عدد عناصر الحماية (11)، عدد الأشكال (7)

معلق خلية لاستخدامه في معالجة مرض الشريان المحيطي للطرف السفلي

CELL SUSPENSION FOR USE IN THE TREATMENT OF LOWER EXTREMITY PERIPHERAL ARTERY DISEASE

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بمعلق خلية cell suspension من خلايا مشتقة من نخاع العظم bone marrow (BM) في البالغين والذي يمكن استخدامه لمعالجة أو تخفيف مرض الشريان المحيطي peripheral artery disease (PAD) السفلي ويفضل في معالجة نقص التروية الطرفية الحرجة critical ischemia limb.

يشتمل مرض الشريان المحيطي للطرف السفلي على مدى واسع من الأمراض الوعائية vascular diseases التي يسببها التصلب العصيدي atherosclerotic والانصمام الخثاري thromboembolic والعمليات الالتهابية inflammatory processes التي تغير هيكل ووظيفة الشرايين الطرفية السفلية lower limb arteries. وعلى الرغم من ذلك فإن السبب الرئيسي لمرض الشريان المحيطي هو تصلب الشرايين العصيدي.

تنتج الأعراض الخاصة بمرض مرض الشريان المحيطي للأطراف السفلية من تدفق الدم غير المناسب الذي يؤدي إلى الإمداد غير الكافي للأكسجين oxygen. يرتبط مرض الشريان المحيطي مع التخثر العصيدي للبطانات الوعائية vascular beds الأخرى، بما في ذلك أجهزة القلب والأوعية الدموية cardiovascular والأوعية الدموية للمخ cerebrovascular. إن وجود مرض السكري diabetes mellitus (DM) يزيد بشكل كبير من مخاطر مرض الشريان المحيطي، ويزيد من المرض ويجعل مرضى السكر أكثر عُرضة لحالات الإقفار وخلل الوظائف الوعائية وزيادة معدلات الاعتلال والوفاة ونوعية الحياة غير الجيدة Quality of Life (Thiruvoipati et al, 2015) (QoL). وبالفعل فإن مرضى مرض الشريان المحيطي يتم اعتبارهم بأنه مجموعة غير متجانسة تتراوح من المرضى الذين ليس بهم أعراض ولديهم عرج متقطع Intermittent Claudication (IC) والمرضى المصابين بالإقفار الطرفي الحرج critical limb ischemia (CLI). يشير الإقفار الطرفي الحرج إلى حالة من اختلال كفاءة الشريان والذي تقلل من ضغط التروية البعيدة distal perfusion pressure إلى المدى الذي يتم فيه الإخلال الشديد بدوران الدم الدقيق وتدفق الدم في الأنسجة tissues والتغذية. يمكن أن توجد الصدمات الطفيفة والتقرح ulceration والعدوى infection بصورة

مشتركة مما يزيد من الحاجات الأيضية الخاصة بالنسيج المصاب والذي يؤدي في الغالب إلى التقرحات غير الملتئمة non-healing ulcers أو التقرحات المزمنة. ويكون عبارة عن مرض متطور يتميز بأنه مرض متعدد المستويات وبه حمل عال من الاعتلال المشترك ومدى حياة منخفض.

وعلى الرغم من أن مؤشر الكاحل العضد ankle brachial index (ABI) يتم استخدامه في تشخيص مرض الشريان المحيطي وهو مؤشر لشدة مرض الشريان المحيطي فإنه لا يرتبط بصورة كاملة بالشدة الكيميائية الخاصة بالمرض. هناك مدى واسع من الأعراض الإكلينيكية التي يتم استخدامها بالتالي لكي يتم تصنيف الشدة الخاصة بمرض الشريان المحيطي مع اثنين من أنظمة التصنيف الروتينية المستخدمة مع الممارسة الإكلينيكية وهما نظامي: Rutherford و Fontaine (Hirsch AT, 2006). إن الشدة الإكلينيكية لمرض الشريان المحيطي تتراوح من عدم وجود الأعراض للغرغرينا gangrene إلى الإقفار الطرفي limb ischemia الذي يتطلب البتر amputation. يكون مرض الشريان المحيطي عبارة عن مرض متطور مع شدة خاصة بالتهيئة المتزايدة على مدى الوقت. يكون تطور المرض أسرع في المرضى المصابين بمرض السكري.

إن وضع درجات لأعراض مرض الشريان المحيطي والآفات التشريحية الخاصة بها تكون مسئولة عن الأعراض التي توفر مقياس موضوعي يتم من خلاله متابعة المرضى بصورة إكلينيكية وبصورة مهمة فإنه يوفر تجانس عند المقارنة الطبيعة واستراتيجيات المعالجة الخاصة بالتدخل في الدراسات الإكلينيكية.

يتم استخدام تصنيف Rutherford بصورة شائعة في نظام المراحل الإكلينيكية clinical staging system الخاصة بوصف مرض الشريان المحيطي وهو مشابه لتصنيف Fontaine ولكنه يوجد بصورة أكثر شيوعاً في نشرات جديدة في مجال طب الأوعية الدموية Vascular Medicine. يتم تقسيم مرض الانسداد الشرياني المحيطي بصفة شائعة في درجات على مقياس Fontaine والتي تم تقديمها بواسطة René Fontaine في عام 1954 من المرحلة I (عدم وجود أعراض) إلى المرحلة IV (التقرح ulceration أو الغرغرينا). تتكون التصنيفات التي تم إدخالها بواسطة Rutherford في عام 1986 وتمت مراجعتها في عام 1997 من أربعة درجات وسبعة فئات تتراوح من الفئة 0 (عدم وجود أعراض) حتى الفئة 6 (تقرحات إقفاريه شديدة أو غرغرينا) (الجدول رقم 1).

الجدول 1

تصنيف Fontaine و Rutherford لمرض الشريان المحيطي

تصنيف Fontaine		تصنيف Rutherford			
درجة Fontaine	التشخيص الإكلينيكي	درجة Rutherford	فئة Rutherford	التشخيص الإكلينيكي	معايير موضوعية
I	غياب الأعراض	0	0	غياب الأعراض – عدم وجود مرض مسد كبير من الناحية الديناميكية الدوائية	جهاز المشي العادي أو اختبار فرط الدم التفاعلي
II–أ	العرج المتقطع بعد أكثر من 200 متر من المشي بدون ألم	I	1	العَرَج الخفيف	تمرين جهاز مشي كامل؛ ضغط الكاحل Ankle pressure (AP) بعد التمرين > 50 ملي متر زئبق ولكنه يكون

II-ب	العرج المتقطع بعد اقل من 200 متر من المشي	I	2	العرض المعتدل بين الدرجات من 1 و3
			3	
			3	العرض الشديد لا يمكن إكمال تمرين جهاز المشي القياسي و† ضغط الكاحل بعد التمرين عند <50 مم زئبق.

III	أَلَمُ الرَّاحَة	II*	4	ألم الراحة الإقفاري	ضغط الكاحل الخاص بالراحة <40 مم زئبق، مستوية بها كاحل نابض بصورة ضعيفة أو مشط القدم تسجيل حجم النبضة pulse volume recording (PVR)؛ ضغط إصبع
IV.	التقرح أو الغرغرينة	III*	5	فقد النسيج الضعيف - تقرح غير ملتئم، غرغرينة بؤرية بها إقفار قدمي انتشاري	ضغط الكاحل الخاصة بالراحة < 60 مم زئبق، من الكاحل أو مشط القدم لتسجيل حجم النبضة، المسطح أو النابض بصورة

6	فقد النسيج الأساسي- الحز الممتد أعلى عبر مشط القدم مستوي trans-metatarsal (TM)، والقدم الوظيفية التي لا تكون قابلة للإنقاذ بعد.	نفس الشيء كما هو في الفئة 5

*إن الدرجات II وIII والفئات 4 و5 و6 تكون خاصة بالإقفار الحرج المزمن.

† خمسة دقائق عند 2 mph على 12٪ من الارتفاع.

تكون AP= ضغط الكاحل؛ وPVR = تسجيل حجم النبضة؛ TP = ضغط إصبع القدم؛ وTM = عبر مشط القدم.

ويكون الإقفار الطرفي الحرج عبارة عن مرض متطور يتميز بأنه مرض متعدد المستويات وبه حمل عالي من الاعتلال المشترك ومدى فترة حياة محدودة. وقد أوصت وثيقة لجنة Trans-Atlantic Inter-Society Consensus ((TASC II 2007 المتعلقة بالتحكم في المرض الشرياني المحيطي (TASCII، 2007) بأن مصطلح الإقفار الطرفي الحرج يجب أن يتم استخدامه لكل الخاضعين المصابين بألم الراحة الإقفاري ischemic rest pain والتقرحات ulcers أو الغرغرينا التي ترجع بصورة تم التثبت الموضوعي مها لمرض التقرح الشرياني. إن التعريف الحالي للإقفار الطرفي الحرج يشتمل على الخاضعين الذين بهم ألم في الراحة الطرفية السفلى أو التقرحات أو الغرغرينا الثانوية إلى الشديدة التي تم توضيحها في تدفق الدم في الأطراف والتي تستمر لأكثر من أسبوعين. ويشتمل التعريف أيضاً على فئات روثرفورد من 4-6 (ألم الراحة الخاص بالإقفار مع الفقد النسيجي tissue loss الضئيل والفقد النسيجي الأساسي على الترتيب) أو الدرجة على مقياس فونتين وهي III وIV.

تكون المعالجة الوحيدة للمرض الكامن في الإقفار الطرفي الحرج هي إعادة تكوين الأوعية revascularization. وعلى الرغم من ذلك فإن النسبة الهامة من المجموعة (التي تم تقديرها بين 50 ٪ و90٪ من المجموعة) لا تكون مناسبة لعمليات إعادة التوعية اليدوية (التحويل الجراحي surgical bypass أو الإجراء داخل الأوعية endovascular procedure)، وذل نتيجة لغياب أوعية الدم blood vessels القابلة للنمو وفشل إجراء إعادة التوعي اليدوي السابق أو الأمراض المتزامنة. يكون للعديد من مرضى الإقفار الطرفي الحرج حلات متعددة والتي يمكن أن تمنعهم من تحمل إعادة التوعية اليدوية. وفي النهاية، فإن البتر يكون هو الخيار الوحيد لمتبقي لنسبة كبيرة من المرضى حيث يكون الهدف هو التحكم في الألم المستعصي ومنع تطور الغرغرينا أو مكافحة العدوى. وبالتالي فهناك حاجة ماسة لعلاجات جديدة.

وحالياً فإن معالجة المرضى المصابين بالإقفار الطرفي الحرج تتكون نمطياً من تقييم الطرف المصاب (المؤشر) فيما يتعلق بقابلية معالجته بإعادة التوعي إما باستخدام الالتفاف الجراحي أو باستخدام طرق المعالجة الوعائية الداخلية endovascular methods. سوف تتم معالجة كل المرضى فيما يتعلق بالأعراض الموجودة للمرض، وبصورة خاصة الألم والتقرحات وأنواع العدوى. وعلى الرغم من ذلك فإن مكافحة الألم يكون غير فعال في الغالب حيث أن التقرحات الإقفارية ischemic ulcers نادراً ما تلتئم وتُركز عملية مداواة الجروح بصورة طبيعية على التحكم في العدوى ومنع التدهور وإنقاذ الطرف. تشتمل أهداف المعالجة الإجمالية للإقفار الطرفي الحرج على:

- التحكم في الألم Pain control.
- التئام الجروح Wound healing.
- إنقاذ الطرف Limb salvage.
- تحسين الحياة غير الجيدة، بما في ذلك الحفاظ على حالة قابلية التجول.
- تقليل المخاطر القلبية الإجمالية.

إن معلق الخلية الخاص بالاختراع الحالي قد تم توضيحه بشكل خاص بأنه خاص بمرضى الإقفار الطرفي الحرج، وبصورة خاصة بمرضى الإقفار الطرفي الحرج المصابين بمرض السكري والذين ليس لديهم خيار خاص بإعادة المعالجة الوعائية باستخدام التحويل الجراحي أو طرق المعالجة الوعائية الداخلية. وبالنسبة لهؤلاء المرضى فإن الحاجة التي لم يتم الوفاء بها هي عدم وجود خيارات علاجية للمرض الأساسي عند حالته العليا. إن أي معالجة يتم استخدامها مع هؤلاء

المرضى تكون معالجة لها أعراض مثل: لعناية بالجروح wound care، ومكافحة العدوى infection control وإدارة الألم pain management. بالنسبة لهؤلاء المرضى الذين لا تصلح معهم عملية إعادة التوعي اليدوية، حيث قد تم تقدم المرض فإن خيار المعالجة السريري الوحيد هو البتر إم في استجابة لتطور الغرغرينا أو العدوي التي لا يمكن التحكم فيها أو الآلام المستعصية. ومن مرضى مرض الشريان المحيطي الذين تم لديهم تطور الإقفار الطرفي الحرج، هناك تقريباً 25٪ من الوفيات في مدة سنة واحدة (NICE، 2012). وبالاعتماد على شدة الإقفار الطرفي الحرج، فإن معدلات البتر الابتدائي لمدة سنة واحدة تتراوح من 5٪ إلى 40٪ مع المعدلات الأعلى في المرضى غير المناسبين لعملية إعادة التوعي والذين يعانون من الضعف العصبي neurologically impaired أو عدم القدرة على المشي non-ambulatory.

<u>الوصف العام للاختراع</u>

تنطوي المشكلة التي يقوم الاختراع الحالي بحلها على توفير بديل علاجي مُحسن للمرضى الذين يعانون من مرض الشريان المحيطي الطرفي السفلي ويفضل مرضى الإقفار الطرفي الحرج والأكثر تفضيلاً مرضى الإقفار الطرفي الحرج المصابين بمرض السكري والذين ليس خيارات للمعالجة باستثناء عملية إعادة التوعي باستخدام التحويل الجانبي الجراحي أو طرق المعالجة الوعائية الداخلية. إن البديل العلاجي المحسن المذكور الذي تم توفيره بواسطة الاختراع الحالي يكون في صورة معلق خلية من خلايا مشتقة من نخاع العظم لبالغ بشري ذاتية أو خيفية ويفضل النماذج التي تمت الإشارة إليها أدناه.

وبالتالي تشير سمة أولى من الاختراع الحالي إلى معلقم خلية (الذي تتم الإشارة إليه هنا بأنه "معلق خلية من الاختراع الحالي") ويفضل خلايا كريات دم بيضاء white blood cells (WBCs) مشتقة من نخاع العظم عند البالغين ذاتية أو خيفية ويُفضل اشتقاق تلك الخلية من عُرف الحُرقُفة ilium (العرف الحرقفي iliac crest) أو المخصب لخلايا وحيدة النواة mononuclear cells (MNC) ويعني ذلك أن هناك أكثر من 25٪ من خلايا الدم البيضاء الموجودة في معلق الخلية هي عبارة عن خلايا وحيدة النواة وتشتمل على:

أ-خلايا وحيدة النواة مختارة من قائمة تشتمل على:

i-مجموعة من الخلايا اللمفاوية Lymphocytes (LYMPH)؛

ii. مجموعة من الخلايا الأحادية Monocytes (MONO)؛ و

iii. مجموعة من الخلايا الجذعية المكونة للدم Hematopoietic stem cells (HSCs) التي تعبر عن مجموعة من التمايز 34cluster of differentiation 34 (CD34)؛

وحيث أن معلق الخلية يشتمل أيضاً على:

ب-الخلايا المُحببة Granulocytes

لاستخدامها في معالجة أو تخفيف مرض الشريان المحيطي للطرف السفلي.

تمت ملاحظة أن المصطلحات العامة ومجموعات الخلية أ) وب) بدورها تشتمل على مجموعة خلية والتي تعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 C-X-C chemokine receptor type 4 (CxCR4)، أو مستقبل خاص عالم انتقال من عامل مشتق من الخلية السدوية 1 -stromal cell derived factor 1 (SDF1) من المجموعة وبالتالي فمن الضرورية أن يتم توضيح وجود المجموعة الفرعية من الخلايا الجذعية المكونة للدم التي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 ومستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4. بالإضافة إلى ذلك، فإن مجموعة الخلية أ) وب) بدورها تشتمل أيضاً على مجموعة خلية والتي تعبر عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2 Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) ومستقبل خاص بعامل تكوين الأوعية الدموية angiogenesis factor عامل النمو البطاني الوعائي Vascular endothelial growth factor (VEGF) الذي يتم تضمينه في التوليد الوعائي وتكوين الأوعية.

وفي النهاية فإن مجموعة الخلية أ. وiii) بدورها تشتمل على مجموعة الخلية التي لا تعبر عن مجموعة من التمايز 38cluster of differentiation 38 (CD38)، والتي هي من أوائل الخلايا الجذعية المنتجة للدم haematopoietic stem cells غير المرتبطة.

تمت ملاحظة أن الخلايا أحادية النواة mononuclear cells (MNCs) قد تم اعتبارها بأنها المكون الفعال الرئيسي من معلق الخلية من الاختراع. وبصفة خاصة فإن المكونات الفعالة أو التكوينات من معلق الخلية من الاختراع الحالي تكون عبارة عن الخلايا أحادية النواة تم اختيارها من قائمة تتكون من الخلايا اللمفاوية، والخلايا وحيدة النواة والخلايا الجذعية المكونة للدم والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 وبصورة خاصة أكثر المجموعات الفرعية من الخلايا الجذعية المكونة للدم غير المرتبطة بصورة مبكرة والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 ولا تعبر عن مجموعة من التمايز 38 وأيضاً خلايا الدم البيضاء القادرة على الانتقال الذي يتوسطه عامل مشتق من الخلية السدوية 1 والذي يعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 والخلايا الجذعية القادرة على

الانتقال الذي يتوسطه عامل مشتق من الخلية السدوية 1 والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 و مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 وخلايا لادم البيضاء القادرة على التكوين الوعائي والتي تعبر عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2. تكون كل تلك الخلايا أحادية النواة عبارة عن خلايا مشتقة من نخاع العظم ويفضل أن تكون مشتقة من عُرف الحُرقُفة (العرف الحرقفي).

بالإضافة إلى ذلك فقد تمت أيضاً ملاحظة أن معلق خلية الدم البيضاء من الاختراع يشتمل أيضاً على حبيبات بيضاء والتي تكون عبارة عن عدلات neutrophils (NEU) أو يوزينات eosinophils (EOS) و/أو قعدات basophils (BAS). وفي هذا الصدد، من المهم أن تتم ملاحظة أن منتج معلق الخلية النهائي من الاختراع كما هو موضح في الأمثلة قد تم تحضيره في جرعات بالاعتماد على خلايا مشتقة من نخاع العظم من خلايا الدم البيضاء القابلة للنمو والتي تشتمل ليس فقط على جزء خلية الدم البيضاء الخلية أحادية النواة (الخلايا اللمفاوية والخلايا الأحادية والخلايا الجذعية stem cells) ولكن أيضاً الخلايا الحبيبية.

في نموذج مفضل من السمة الأولى من الاختراع، فإن معلق الخلية من الاختراع، في الصيغة النهائية والذي تم تخصيبه من خلايا وحيدة النواة يعني أن به أكثر من 25٪ من الأعداد الإجمالية للخلايا الدم البيضاء الموجودة في معلق الخلية والذي يكون عبارة عن خلايا وحيدة النواة والتي تشتمل على حوالي 4×10^{8} إلى حوالي 2×10^{9} من خلايا مشتقة من نخاع العظم من خلايا الدم البيضاء ويفضل مشتقة من عُرف الحرقفة (أو العرف الحرقفي) حيث يكون العدد الإجمالي م حوالي 4×10^{8} إلى حوالي 2×10^{9} من خلايا الدم البيضاء، وبها

1. حوالي 20٪ إلى حوالي 51٪ والذي يكون عبارة عن خلايا لمفاوية، وحوالي 3.9٪ إلى حوالي 22.3٪ عبارة عن خلايا أحادية النواة؛

2. حوالي 1.4٪ إلى حوالي 10٪ من الخلايا الجذعية المكونة للدم والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34؛

3-حوالي 25.3٪ إلى حوالي 83.3 ٪ ويفضل من حوالي 32.3٪ إلى حوالي 80.0٪ من العدد الإجمالي لخلايا الدم البيضاء والذي يكون عبارة عن خلايا أحادية النواة ويفضل أن يتم اختيارها من قائمة تتكون من الخلايا اللمفاوية، والخلايا أحادية النواة وخلايا مجموعة من التمايز 34؛

4. حوالي 16.7٪ إلى حوالي 74.7٪ ويفضل حوالي 20.0٪ إلى حوالي 67.7٪ عبارة عن خلايا حبيبية؛

5-ومن العدد الإجمالي هناك خلايا جذعية مكونة للدم والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34، بنسبة حوالي 7.7 ٪ إلى حوالي 55.5٪ والتي تكون عبارة عن خلايا جذعية مكونة للدم غير مرتبطة مبكرة والتي لا تعبر عن مجموعة من التمايز 38؛

6. حوالي 5.4٪ إلى حوالي 38.8٪ من خلايا الدم البيضاء التي تعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4؛

7 -ومن العدد الإجمالي هناك خلايا جذعية مكونة للدم والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34، بنسبة حوالي 0.7٪ إلى حوالي 10.3٪ والتي تكون عبارة عن خلايا جذعية التي تعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4؛

8. حوالي 0.07٪ إلى حوالي 24.7٪ من خلايا الدم البيضاء التي تعبر عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2؛ و

9. تكون النسبة عند الحد الأقصى لها من خلايا الدم الحمراء إلى خلايا الكريات البيضاء هي 6.7 ونسبة عند الحد الأقصى لها من الصفائح الدموية لخلايا كريات الدم البيضاء هي 32.

في نموذج مفضل آخر من السمة الأولى من الاختراع فإن معلق الخلايا من الاختراع يكون في الصيغة النهائية، كما تم تحديده في الفقرة السابقة ويشتمل على ما بين حوالي 4×10^8 إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضاء، ويفضل أكثر من حوالي 5×10^8 إلى حوالي 2×10^9 من خلايا الدم البيضاء وبه أيضاً 2×10^9 من خلايا الدم البيضاء بوه أيضاً وبصورة مفضلة من حوالي 5×10^8 إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضاء وكانت كل قيم الجرعات بين كل من القيم المذكورة أعلاه.

يمكن اختيار النماذج المحددة في شكل أمداء فرعية من القيم المذكورة أعلاه من خلايا الدم البيضاء في الصيغة النهائية. على سبيل المثال، يمكن أن يتم اختيار نموذج محدد في شكل محتوي خلية الدم البيضاء في صيغة نهائية من أكبر من 8×10^8 إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضاء. ينطوي مثال آخر عن كيفية أن مدى يمكن اختياره في النموذج في الاختيار من محتوي من حوالي 9×10^8 إلى حوالي 1.1×10^9 من خلايا الدم البيضاء. يمكن اختيار مثال ثالث من الأمداء لنموذج محدد من الاختيار الذي يكون بين حوالي 9.5×10^9 من خلايا الدم البيضاء. يمكن اختيار مثال رابع من الأمداء لنموذج محدد من الاختيار الذي يكون بين حوالي 9.8×10^8 إلى حوالي 1.02×10^9 من خلايا الدم البيضاء.

أوضـــحت أمثلة أخرى كيفية أن مدى من أحد النماذج من المحتوي أو الجرعة يمكن اختياره والذي قد يشـتمل على المدى السـابق من 6×10^8 إلى حوالي 2×10^9 ويفضـل إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضـــاء ويضـــم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. ينطوي مثال آخر على الاختيار من المدى من أعلى من 7×10^8 إلى حوالي 2×10^9 ويفضـل إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضـاء ويضـم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. ينطوي مثال آخر على الاختيار من المدى من أعلى من 8×10^8 إلى حوالي 2×10^9 ويفضـــل إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضـاء ويضـم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. ينطوي مثال آخر على الاختيار من المدى من أعلى من 8.5×10^8 إلى حوالي 2×10^9 ويفضـل إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضـاء ويضـم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. ينطوي مثال آخر على الاختيار من المدى من أعلى من 9×10^8 إلى حوالي 2×10^9 ويفضـــل إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضـــاء ويضـــم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. ينطوي مثال آخر على الاختيار من المدى من أعلى من 9.5×10^8 إلى حوالي 2×10^9 ويفضـل إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضـاء ويضـم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. وبالتالي فإن كل أمداء الجرعات يمكن اختيارها من القيم المذكورة هنا ويمكن أن يتم فهمها من خلال ذوي المهارة العادية في المجال ويتم تضـمينها بواسـطة الاختراع الحالي.

تم توضـيح طرق قياس كل مجموعة خلة أعلاه وتم ذكرها بصـورة واضـحة بالتفصـيل من الاختراع الحالي.

تمت ملاحظة أن كل معلقات الخلة تشـــتمل على مواد حاملة مقبولة صـــيدلانياً و/أو ســـواغات excipients.

في نموذج مفض آخر من السـمة الأولى من الاختراع الحالي أو أي من النماذج المفضـلة له فإن مرض الشريان المحيطي الطرفي السفلي يكون عبارة عن إقفار طرفي حرج.

في نموذج مفضـل آخر من السـمة الأولى من الاختراع أو من أي من النماذج المفضـلة يتم تعليق الخلايا في حجم من 5 إلى 30 مل من محلول معالج بالهيبارين heparinized saline solution، أو محلول رينجر لاكتات lactated Ringer solution ويفضـل أن يشـتمل على حوالي 1٪ من ألبومين المصل البشري human serum albumin (HSA) وحوالي 2.5٪ من الجلوكوز glucose .

تشير سمة ثانية من الاختراع الحالي إلى معلق خلة كما تم تحديده في السمة الأولى من الاختراع أو أي من النماذج المفضلة، لاستخدامها في طريقة معالجة مرض الشريان الطرفي السفلي ويفضل إقفار الطرف الحرج وذلك من خلال الإعطاء الشريان حيث يصل ضغط تدفق الدم المنخفض إلى 4 جوي ويتم الحصول عليه من خلال تثبيت بالون قابل للنفخ بالقرب من آفة الانسداد الوعائي occlusive vascular عند الفخذ البعيد distal femoral أو الشريان المأبضي popliteal artery وتسريب معلق الخلية المذكور بداخل الشريان.

تشير سمة ثالثة من الاختراع الحالي إلى محقنة واحدة أو العديد من المحاقن المملوءة بشكل مسبق/ المشتملة على معلق الخلية كما تم تحديده في السمة الأولى من الاختراع أو أي من النماذج المفضلة.

تشير سمة رابعة من الاختراع إلى محقنة (محقنة مسبقة الملء) كما تم تحديدها في السمة الثالثة من الاختراع، لاستخدامها في معالجة أو تخفيف مرض الشريان الطرفي السفلي ويفضل إقفار الطرف السفلي الحرج. تمت ملاحظة أن المحاقن مسبقة الملء يمكن استخدامها لكل مريض.

تشير سمة خامسة من الاختراع إلى محقنة (محقنة مسبقة الملء) كما تم تعريفها في السمة الثالثة من الاختراع لاستخدامها في طريقة معالجة مرض الشريان الطرفي السفلي ويفضل إقفار الطرف الحرج وذلك من خلال الإعطاء الشريان حيث يصل ضغط تدفق الدم المنخفض إلى 4 جوي ويتم الحصول عليه من خلال تثبيت بالون قابل للنفخ بالقرب من آفة الانسداد الوعائي عند الفخذ البعيد أو الشريان المأبضي وتسريب معلق الخلية المذكور بداخل الشريان.

في نموذج مفضل من السمة الأولى وحتى السمة الخامة من الاختراع فإن معلق الخلية أو المحاقن يتم توفيرها في شكل جرعة منفردة.

في نموذج مفضل من السمة الثانية والسمة الخامسة من الاختراع، يتم إنتاج الحث منخفض الضغط في مدى بين 1 و6 دقائق ويتم تسريب معلق الخلية المذكور في مدى بين 2 و10 دقائق.

تشير سمة سادسة من الاختراع إلى عملية تصنيع من معلق الخلية من الاختراع كما تم تعريفه في السمة الأولى من الاختراع أو في أي نماذج مفضلة طرفية والتي تشتمل على:

1. يتم إجراء تجميع نخاع العظم بواسطة عمليات السفط المتكررة، ويفضل من القمة الحرقفية الخلفية للخاضع تحت عملية تخدير anesthesia موضعي أو عام. يتم بعد ذلك تجميع نواتج سفط

نخاع العظم ويفضل في كيس ناقل يشتمل على محلول مضاد للتخثر anticoagulant solution ويفضل أكثر محلول سترات ديكستيروز أ citrate dextrose solution A (ACD-A).

2. يتم ترشيح نخاع العظم ويفضل بمساعدة الجاذبية لكي تتم إزالة أي شظايا عظام bone fragments صغيرة ولكي يتم منع التخثر أثناء الخطوات التالية.

3. يتم تقليل حجم نخاع العظم الأولي ويفضل من حوالي 50-100 مل ويفضل باستخدام برنامج SmartRedux على جهاز Sepax 2.0 والذي يرتبط مع الإزالة عن طريق طقم SmartRedux (CS-490.1). إن تلك الخطوة التي تشتمل على إزالة البلازما plasma وخلية الدم الحمراء red blood cell (RBC) أن ينتج عنها حوالي 50-100 مل من منتج التغليف المزغب وأيضاً التي تتكون من النقاء الخاص بالمنتج النهائي.

4. وبشكل اختياري، فإن خطوة اختزال الحجم يتم إجراؤها في اثنين من الدورات وذلك اعتماداً على حجم مادة البدء المراد معالجتها. تمت معالجة عينات نخاع العظم بأحجام تصل إلى حوالي 220 مل في دورة منفردة وتمت معالجة عينات من العديد من 220 مل في اثنين من الدورات باستخدام نفس الطقم. يفضل أن يكون كل من اختزال الحجم في الدورة المنفردة والمزدوجة والحجم النهائي قد تم ضبطه عند حوالي 50-100 مل.

5. إن كيس العينة المتوسط المعقم sterile intermediate sample bag المشتمل على نخاع العظم تم اختزال حجمه كما هو موضح في الخطوة رقم 3 أو 4 يخضع لعملية طرد مركزي centrifugation متدرجة آلية ويلي ذلك مرتين من الغسل لمعلق الخلية أحادية النواة باستخدام محلول الغسل ويفضل المكون من 2-4٪ من ألبومين المصل البشري في المحلول الملحي المنظم (كل منها في درجة صيدلانية. يتم تجميع حوالي 45 مل من منتج خلية أحادية النواة مشتقة من نخاغ العظام Bone marrow-derived mononuclear cell (BM-MNC) في كيس الإخراج وتتم إزالة المكونات الأخرى في كيس النفايات. يفضل أن يخضع كيس العينة المتوسط المعقم المشتمل على نخاع العظم تم اختزال حجمه لعملية طرد مركزي بالكثافة من NeatCell ويلي ذلك مرتين من الغسل لمعلق الخلية أحادية النواة باستخدام محلول الغسل ويفضل المكون من 2-4٪ من ألبومين المصل البشري في المحلول الملحي المنظم (كل منها في درجة صيدلانية. يتم تجميع حوالي 45 مل من منتج خلية أحادية النواة مشتقة من نخاغ العظام في كيس الإخراج وتتم إزالة المكونات الأخرى في كيس النفايات.

6. يتم تجميع خلية أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام من كيس المنتج ويفضل باستخدام محقنة 50 مل ويتم الترشيح ويفضل أن يتم من خلال مرشح 50 ميكرو متر، ويفضل في أنبوب فالكون معقم sterile falcon tube. يتم سفط كيس المنتج باستخدام محلول الغسل ويتم الترشيح لكي يتم تحسين استخلاص الخلية أحادية النواة. يتم ضبط الحجم النهائي لمادة عقار خلية أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام عند 40-60 مل.

يتم الطرد المركزي لمادة العقار ويتم إعادة تعقيم الحُبيبات في خليط صيغة نهائية ويفضل في محلول ملحي مع الهيبارين heparin أو محلول رينجر ويفضل أن يكون 1٪ من ألبومين المصل البشري ويفضل أن يكون 2.5٪ من الجلوكوز في حجم يفضل أن يكون من 5-30 مل.

وكما تم ذكره بالفعل أعلاه، فجب أن تتم ملاحظة أن منتج معلق الخلية النهائي الذي تم الحصول عليه من السمة السادة من الاختراع يتم وضعه في جرعة بالاعتماد على خلايا الدم البيضاء القابلة للنمو والت تشتمل، ليس فقط على جزء الخلية أحادية النواة ولكن أيضاً الخلايا الحُبيبية. وبسبب أن الخلايا أحادية النواة عبارة عن مكون فعال فإن النسبة المئوية للخلايا أحادية النواة في المنتج النهائي يتم أخذها في الاعتبار بأنها سمة متعلقة بالجودة.

تشير سمة سابعة من الاختراع إلى منتج معلق خلية أو حاوية منتج ويفضل واحدة أو عدة محاقن والتي يتم الحصول عليها أو التي تكون قابلة للحصول عليها بواسطة طريقة من السمة السادسة من الاختراع. تمت ملاحظة أن منتج المعلق أو حاوية المنتج يمكن استخدامها طبقاً لأيٍ من السمات من الأولى وحتى الخامسة من الاختراع.

<u>شرح مختصر للرسومات</u>

الشكل 1 عبارة عن: مخطط تدفق لتصنيع معلق الخلية طبقاً للاختراع.

الشكل 2 عبارة عن: تصنيف روثرفورد عند الشهر 3 و6 و9 و12 بعد إعطاء معلق الخلية الخاص بالاختراع وعينة المقارنة في مقابل تطبيق الملاحظة الأخيرة last observation carried forward (LOCF) التي تمت معالجتها (بما في ذلك عمليات البتر والوفيات).

الشكل 3 عبارة عن: تصنيف روثرفورد عند الشهر 3 و6 و9 و12 بعد إعطاء معلق الخلية الخاص بالاختراع وعينة المقارنة في مقابل تطبيق الملاحظة الأخيرة التي تمت معالجتها (بما في ذلك عمليات البتر والوفيات).

الشكل 4 عبارة عن: تحسينات على تصنيف روثرفورد (النسبة المئوية للخاضعين) عند 3، 6 و9 و12 شـــهراً فيما يتعلق بمجموعة التحكم والثلاث مجموعات من (الجرعات) من معلق الخلية من الاختراع.

الشكل 5 عبارة عن: عبارة عن نسبة خاصة بالخاضعين الذين تم تصنيفهم والذين يعاونون من عدد من التقرحات في الطرف المصـاب عند 3 و6 و9 و12 شـهراً (اللوحة اليسرى: مجموعة المقارنة؛ اللوحة اليمنى معلق الخلية من مجموعة الاختراع).

الشـكل 6 عبارة عن: عرض صـور التصـوير الوعائي من ثلاثة من 24 حالة من حالات التكوين الوعائي vasculogenesis والذي يمكن أن يحدث والذي يتم عرضـه بالنسـبة للقيمة الأسـاسـية في الشـكل رقم 6: مع النمو الطولي للشـرايين arteries (الشـكل رقم 6أ)، المظهر الخاص بالأوعية الجديدة (الشكل رقم 6ب) والنمو العرضي الخاص بالجزء الجانبي الذي يستهدف الجلد (الشكل رقم 6ج).

الشكل 7 عبارة عن: عبارة عن مخطط التدفق الخاص بمعلق بعملية تصنيع منتج الاختراع.

<u>الوصف التفصيلي:</u>

التعريفات

وكما تم استخدامه هنا، فإن "ذاتي" يجب أن يتم فهمه بأنه يشير إلى مستحضر الخلية حيث يكون المانح والمتلقي هو نفس الشخص.

وكما تم استخدامه هنا، فإن "خيفي" يجب أن يتم فهمه بأنه يشير إلى مستحضر الخلية حيث يكون المانح والمتلقي ليس هو نفس الشخص.

وكما تم اســـتخدامه هنا، يتم فهم "خلايا مشـــتقة من نخاع العظم من بالغ adult bone marrow derived cells" بأنه مستحضر يشتمل على خلايا والتي لا تكون جنينية embryonic ويتم اشتقاقها من نخاع العظم ويتم الحصول عليها من مانح بشري human donor.

وكما تم استخدامه هنا، يتم فهم "معلق خلية" إلى مستحضر من الخلايا التي تم تعليقها في الوسط السائل.

وكما تم اســـتخدامه هنا، يتم فهم " معلقة خلية من خلايا مشـــتقة من نخاع العظم من بالغ" بأنه مستحضر يشتمل على خلايا والتي لا تكون جنينية ويتم اشتقاقها من نخاع العظم الذي تم الحصول عليه من مانح بشري تم تعليقه في وسط سائل.

وكما تم اســـتخدامه هنا يتم فهم "خلايا جذعية مكونة للدم Hematopoietic stem cells التي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 " بانها خلايا جذعية تقوم بالتعبير عن مرقم سطحي surface marker لـــمجموعة من التمايز 34 وتم تحديدها بأنها موجبة مجموعة من التمايز 34 بواسطة تبقيع الجسم المضاد antibody staining ومن خلال قياس التدفق الخلوي flow cytometry.

وكما تم اســتخدامه هنا، يتم فهم " خلايا جذعية مكونة للدم غير مرتبطة بصــورة مبكرة والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 ولا تعبر عن مجموعة من التمايز 38" بأنها عبارة عن خلايا جذعية مكونة للدم والتي تعبر عن مرقم مجموعة من التمايز 34 على الســـطح وتم تحديده في شـــكل مجموعة من التمايز 34 موجب بواسطة تبقيع الجسم المضاد لـــمجموعة من التمايز 34 والقياس الخلوي الخاص بالتدفق ولكنه تم تحديد أنه ســالبي بالنســبة لمرقم الســطح مجموعة من التمايز 38 بواسطة تبقيع الجسم المضاد مجموعة من التمايز 38 وقياس التدفق الخلوي.

وكما تم استخدامه في ما يلي، يتم فهم مصطلح "خلايا دم بيضاء تعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 " بأنه خاص بخلايا تعبر عن المرقم السطحي مجموعة من التمايز 45 cluster of differentiation 45 (CD45) ومســـتقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 وتم تحديده في شـــكل صــورة موجبة من مجموعة من التمايز 45 ومســتقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 بواســطة تبقيع الجسم المضاد لـــ مجموعة من التمايز 45 ومستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 وقياس التدفق الخلوي. يكون مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 عبارة عن مستقبل لعامل الانتقال عامل مشتق من الخلية السدوية 1.

وكما تم استخدامه هنا يتم فهم مصطلح "خلايا جذعية تعبر عن مجموعة من التمايز 34 و مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 " بأنه خاص بخلايا تعبر عن المرقم الســـطحي مجموعة من التمايز 45 ومجموعة من التمايز 34 ومســـتقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 والذي تم تحديده في شـــكل مجموعة من التمايز 45 ومجموعة من التمايز 34 ومســـتقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 وتم تحديده في شــكل صــورة موجبة من مجموعة من التمايز 45 ومجموعة من التمايز 34 ومســتقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 من تبقيع الجســـم المضـــاد وقياس التدفق الخلوي. يكون مســـتقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 عبارة عن مستقبل لعامل الانتقال عامل مشتق من الخلية السدوية 1.

وكما تم اســتخدامه هنا يتم فهم مصــطلح "خلايا دم بيضــاء تعبر عن مســتقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2 " بأنه خاص بخلايا تعبر عن المرقم السطحي مجموعة من التمايز 45 ومستقبل عامل

النمو البطاني الوعائي 2 وتم تحديده في شكل صورة موجبة من مجموعة من التمايز 45 ومستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2 بواسطة تبقيع الجسم المضاد لـــمجموعة من التمايز 45 ومستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2 وقياس التدفق الخلوي. يكون مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2 عبارة عن مستقبل لـــعامل النمو البطاني الوعائي والذي يكون خاص بتولد الأوعية والتكوين الوعائي.

وكما تم استخدامه هنا، يتم فهم مصطلح "خلايا وحيدات النواة" بأنها أي خلايا دم أو خلية دم بيضاء من نخاع العظم (التي يطلق عليها كريات الدم البيضاء leukocytes (LEU) والتي لها نواة مستديرة وبالتالي يتم استبعاد الخلايا الحُبيبية.

وكما تم استخدامه هنا يتم فهم المصطلح " مرض شريان محيطي طرفي سفلي" بأنه تضيُق في الشرايين خلاف تلك التي تقوم بإمداد القلب heart والمخ brain. يقوم مرض الشريان المحيطي بصورة عامل بالتأثير على الأرجل ولكن يمكن تضمين شرايين أخرى أيضاً.

وكما تم استخدامه هنا، يتم فهم مصطلح "إقفار طرفي حرج" بأنه الانقسام الفرعي الخاص بمرض الشريان الطرفي حيث أن الحالة تتميز بأنها ألم حُرقفي إقفاري مزمن، أو تقرحات أو غرغرينا في واحدة أو كلٍ من القدمين المتعرضة لمرض انسداد الشريان.

إن المصطلح "حوالي" عند استخدامه مع الإشارة إلى قيمة رقمية فإنه يعني +/-20٪ من القيمة الرقمية. إن المصطلح "حوالي" عند استخدامه مع الإشارة إلى قيمة رقمية فإنه يعني +/-10٪ من القيمة الرقمية. إن المصطلح "حوالي" عند استخدامه مع الإشارة إلى قيمة رقمية فإنه يعني +/-5٪ من القيمة الرقمية. إن المصطلح "حوالي" عند استخدامه مع الإشارة إلى قيمة رقمية فإنه يعني +/-1٪ من القيمة الرقمية.

إن المصطلحات "يشتمل على و "مشتملاً على" كما تم استخدامها بمعنى شامل أو بمعنى مفتوح فإنها تعني أنه يمكن تضمين عناصر إضافية. إن المصطلح "يشتمل على" يمكن أن يتم تضمينه أو يتم استخدامه بصورة تبادلية مع المصطلح "يتكون من" والمصطلح "يتكون بشكل أساسي من".

وكما تم استخدامه هنا فإن المصطلح "بالغ" يعني أن الخلايا الجذعية عبارة عن خلايا غير جنينية. في أحد النماذج فإن "بالغ" تعني بد مرحلة "الجنين" أو "بعد مرحلة الولادة". وبالنسبة للخلايا الجذعية من الاختراع الحالي فإن المصطلح "خلية جذعية من بالغ adult stem cell" تعني أن الخلية الجذعية يتم عزلها من نسيج أو من عضو من حيوان عند مرحلة نمو بعد المرحلة الجنينية

embryonic stage. لا تكون الخلايا الجذعية من البالغ مشابهة للخلايا الجذعية الجينية embryonic stem cells والتي يتم تحديدها من خلال أصلها ومن الكتلة الخلوية الداخلية الخاصة بأكياس الأرومة blastocyst. يمكن عزل الخلايا الجذعية طبقاً للاختراع من أي من النسيج غير الجنيني ويمكن أن تشتمل على خلايا من خاضعين حديثي الولادة والأطفال والمراهقين والبالغين.

وبصفة عامة فإن الخلية الجذعية من الاختراع الحالي يمكن عزلها من ثديي غير جنيني وعلى سبيل المثلان من أحد البشر غير حديث الولادة. يفضل أن تكون الخلايا الجذعية من الاختراع الحالي قد تم عزلها من أحد البشر.

يوضح المصطلح "معزولة" أن الخلية أو المجموعة التي يتم التداخل معها لا تكون في الوسط الطبيعي الخاص بها. يتم فصل الخلية أو المجموعة إلى حد كبير من النسيج المحيط بها.

إن مخطط المرقم الخاص بمنتج معلق الخلية تتم الإشارة إليه في الاختراع الحالي ويمكن أن يتم تحديده من خلال وجود و/أو غياب المرقمات الإضافية أو من خلال المخطط المحدد لتوليفة من مرقمات الاختراع الحالي. وفي كل حالة فإن النموذج المحدد من المرقمات يمكن أن يكون موجوداً في شكل خصائص معينة بداخل المجموعة من الخلايا و/أو مخططات معينة من المرقمات في الخلايا الفردية بداخل المجموعة.

يضم المصطلح "مرقم" كما تم استخدامه هنا أي جزيء بيولوجي والذي يكون وجود أو تركيزه أو نشاطه أو حالة المعالجة بالفسفوريل phosphorylation state له قد تم اكتشافها وقد تم استخدامها لكي يتم توضيح النمط الظاهري من الخلية.

وبعد ذلك فإن الخلايا من الاختراع تكون موجبة فيما يتعلق بالمرقمات الخاصة بالنمط الظاهري وتكون سالبة بالنسبة للأنظمة الأخرى. وعن طريق السمة "موجب" فإن ذلك يعني أن هذا المرقم يتم التعبير عنه بداخل الخلية. ولكي يتم اعتباره بأنه يمكن التعبير عنه فإن المرقم يجب أن يكون موجوداً عند مستوي يمكن اكتشافه. يُقصد من مصطلح "مستوي قابل للاكتشاف" بأن المرقم يمكن اكتشافه باستخدام واحدة أو أكثر من الطرق المعملية القياسية مثل تفاعل سلسلة البوليميراز Polymerase chain reaction (PCR)، أو التبقيع blotting أو تحليل قياس التدفق الخلوي flow cytometry analysis كما هو موضح.

يتم استخدام المصطلح " تم التعبير عنه" لكي يتم وصفه وجود مرقم على سطح أو بداخل خلية. ولكي يتم اعتباره بأنه يمكن التعبير عنه فإن المرقم يجب أن يكون موجوداً عند مستوي يمكن

اكتشافه. يُقصد من مصطلح "مستوي قابل للاكتشاف" بأن المرقم يمكن اكتشافه باستخدام واحدة أو أكثر من الطرق المعملية القياسية مثل تفاعل سلسلة البوليميراز، أو التبقيع أو تحليل التألق المناعي immunofluorescence أو تحليل إختبار ماص مناعي مرتبط بالإنزيم enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) أو تحليل فرز الخلايا المنشطة بالتألق Fluorescence-activated cell sorting (FACS). يمكن أن يشير "تم التعبير عنه" إلى، على سبيل المثال لا الحصر، الوجود القابل للاكتشاف الخاص ببروتين protein أو حالة إدخال الفسفوريل phosphorylation state لبروتين أو حمض النووي الريبوزي المرسال ribonucleic messenger acid (mRNA) مشفر للبروتين. يتم اعتبار الجين بأنه يتم التعبير عنه من خلال خلية من الاختراع أو خلية من المجموعة من الاختراع إذا كان التعبير قد تم اكتشافه بصورة منطقية بعد 30 دورة تفاعل سلسلة البوليميراز، ويفضل بعد 37 دورة تفاعل سلسلة البوليميراز والتي تكون مستجيبة لمستوي التعبير في الخلية من حوالي 100 نسخة لكل خلية. تكون المصطلحات "يعبر" و"تعبير" لها معاني مشابهة. يتم الأخذ في الاعتبار لمستوي التعبير الأقل من القيمة الحدية ويتم أخذ المرقم في الاعتبار الذي لم يتم التعبير عنه.

وصف مفصل

منتج معلق الخلية

يكون معلق الخلية طبقاً للاختراع الحالي عبارة عن منتج مناسب لمعالجة أو تخفيف مرض الشريان الطرفي المحيطي السفلي وبصورة خاصة لمعالجة الإقفار الطرفي الحرج، وبصورة خاصة لمعالجة الإقفار الطرفي الحرج في المرضى المصابين بمرض السكري والذين ليس لديهم أي خيار خاص بعملية إعادة التوعي باستخدام التحويل الجراحي أو الطرق الوعائية الداخلية في شكل بدي مفيد علاجي محسن. في هذا الصدد، كان من المدهش الوصول إلى أن معلق الخلية طبقاً للاختراع الحالي عند استخدامه في معالجة أو تخفيف مرض الشريان المحيطي الطرفي السفلي يؤدي إلى العديد من التحسينات الإكلينيكية ذات الصلة مثل التغيير في تصنيف روثر فورد من الدرجة II (الفئة 4) أو III (الفئة 5) إلى الدرجة I (الفئة 1-3) أو الدرجة 0 (الفئة 0)؛ وتحسناً أيضاً في عملية الالتئام ليس فقط في التقرحات ولكن أيضاً في عملية البتر amputations الرئيسية وزيادة في التمدد الوعائي vascular extension و/أو الكثافة الوعائية vascular density. يمكن الحصول على

كل السمات السابقة حتى بمن خلال إعطاء منفرد لمعلقة الخلية والذي تم توضيحه بصورة واضحة في المثال رقم 2.

وبصفة عامة فإن معلق الخالية من الاختراع يشير إلى معلقة من خلايا مشتقة من نخاع العظم الذاتية المشتقة من نخاع عظم بالغ ويفضل المشتقة من عُرف الحرقفة (أو العرف الحرقفي) والذي يشتمل على:

أ-خلايا وحيدة النواة مختارة من قائمة تشتمل على:

1-مجموعة من الخلايا اللمفاوية؛

2. مجموعة من الخلايا وحيدة النواة؛ و

3. مجموعة من الخلايا الجذعية المكونة للدم التي تعبر عن مجموعة من التمايز 34؛

وحيث أن معلق الخلية يشتمل أيضاً على:

ب-الخلايا المُحببة

تمت ملاحظة أن مجموعات الخلية أ) وب) بدورها تشتمل على مجموعة خلية والتي تعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4، أو مستقبل خاص عالم انتقال من عامل مشتق من الخلية السدوية 1 من المجموعة وبالتالي فمن الضرورية أن يتم توضيح وجود المجموعة الفرعية من الخلايا الجذعية المكونة للدم التي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 ومستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4. بالإضافة إلى ذلك، فإن مجموعة الخلية أ) وب) بدورها تشتمل على مجموعة خلية والتي تعبر عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2 ومستقبل خاص بعامل تكوين الأوعية الدموية عامل النمو البطاني الوعائي الذي يتم تضمينه في التوليد الوعائي وتكوين الأوعية.

وفي النهاية فإن مجموعة الخلية أ. و3) بدورها تشتمل على مجموعة الخلية التي لا تعبر عن مجموعة من التمايز 38، والتي هي من أوائل الخلايا الجذعية المنتجة للدم غير المرتبطة.

وبالتالي وبصورة خاصة فإن المعلق طبقاً للاختراع الحالي يكون عبارة عن معلق خلية من خلايا مشتقة من نخاع العظم من بالغ ذاتية أو خيفية ويفضل ذاتية تشتمل على؛ 1) خلايا تعبر عن مجموعة من التمايز 34؛ و2) خلايا جذعية مكونة للدم غير مرتبطة بصورة مبكرة والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 ولا تعبر عن مجموعة من التمايز 38 ؛ و3) خلايا دم بيضاء التي تعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4، والتي تكون عبارة عن مستقبل خاص بعامل انتقال عامل مشتق من الخلية السدوية 1؛ و 4) خلايا جذعية مكونة للدم التي تعبر عن مجموعة من

التمايز 34 ومستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 والتي تكون عبارة عن مستقبل لعامل الانتقال عامل مشتق من الخلية السدوية 1؛ و5) خلايا دم بيضاء التي تعبر عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2، والتي تكون مستقبل لـــــ (عامل النمو البطاني الوعائي) و6) وخلايا أحادية وخلايا حبيبية وخلايا لمفاوية.

من المهم أن تتم ملاحظة أن منتج معلق الخلية النهائي من الاختراع قد تم تحضيره في جرعات بالاعتماد على خلايا مشتقة من نخاع العظم من خلايا الدم البيضاء القابلة للنمو والتي تشتمل ليس فقط على جزء خلية الدم البيضاء أحادية النواة (الخلايا اللمفاوية والخلايا الأحادية والخلايا الجذعية) ولكن أيضاً الخلايا الحبيبية.

ونتيجة لذلك فإن معلق الخلية من الاختراع يشير إلى معلق خلية من خلايا ذاتية أو خيفية مشتقة من نخاع العظم من بالغ ويفضل خلايا ذاتية تشتمل على؛ 1) خلايا تعبر عن مجموعة من التمايز 34؛ و2) خلايا جذعية مكونة للدم غير مرتبطة بصورة مبكرة والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 ولا تعبر عن مجموعة من التمايز 38 ؛ و) خلايا دم بيضاء التي تعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4، والتي تكون عبارة عن مستقبل خاص بعامل انتقال migration factor عامل مشتق من الخلية السدوية 1؛ أي، 4) خلايا جذعية مكونة للدم التي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 ومستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 والتي تكون عبارة عن مستقبل لعامل الانتقال عامل مشتق من الخلية السدوية 1؛ و5) خلايا دم بيضاء التي تعبر عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2، والذي يكون عبارة عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي و6) وخلايا أحادية وخلايا حبيبية وخلايا لمفاوية.

في نموذج مفضل فإن معلق الخلية من الاختراع، في الصيغة النهائية والذي تم تخصيبه من خلايا وحيدة النواة يعني أن به أكثر من 25٪ من خلايا الدم البيضاء الموجودة في معلق الخلية والذي يكون عبارة عن خلايا وحيدة النواة والتي تشتمل على حوالي 4× 10^8 إلى حوالي 2 × 10^9 من خلايا مشتقة من نخاع العظم من خلايا الدم البيضاء ويفضل مشتقة من عُرف الحرقفة (أو العرف الحرقفي) حيث يكون العدد الإجمالي م حوالي 4× 10^8 إلى حوالي 2 × 10^9 من خلايا الدم البيضاء، وبها

1- حوالي 20٪ إلى حوالي 51٪ والذي يكون عبارة عن خلايا لمفاوية، وحوالي 3.9٪ إلى حوالي 22.3٪ عبارة عن خلايا أحادية النواة؛

2-1.4٪ إلى 10٪ من الخلايا الجذعية المكونة للدم والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34؛

3- حوالي 25.3٪ إلى حوالي 83.3٪ من العدد الإجمالي من خلايا الدم البيضـــاء والتي تكون عبارة عن خلايا وحيدة النواة؛

4-16.7 ٪ إلى 74.7٪ عبارة عن خلايا حُبيبية؛

5- حوالي 5.4٪ إلى حوالي 38.8٪ من العدد الإجمالي من خلايا الدم البيضاء تعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4؛

6-حوالي 0.07٪ إلى حوالي 24.7٪ من العدد الإجمالي من خلايا الدم البيضاء تعبر عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2؛

7-ومن العدد الإجمالي هناك خلايا جذعية مكونة للدم والتي تعبير عن مجموعة من التمايز 34، بنســـبة حوالي 7.7 ٪ إلى حوالي 55.5٪ والتي تكون عبارة عن خلايا جذعية مكونة للدم غير مرتبطة والتي لا تعبر عن مجموعة من التمايز 38 وبها من حوالي 0.7 ٪ إلى حوالي 10.3٪ من الخلايا الجذعية التي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 ومستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4؛ و

8-تكون النسبة عند الحد الأقصى لها من خلايا الدم الحمراء إلى خلايا الكريات البيضاء هي 6.7 ونسبة عند الحد الأقصى لها من الصفائح الدموية لخلايا كريات الدم البيضاء هي 32.

وفي نموذج مفضـــل، فإن العدد الإجمالي من خلايا الدم البيضـــاء هو 32.3٪ إلى 80.0٪ والذي يكون عبارة ع خلايا أحادية النواة مختارة من قائمة تتكون من الخلايا اللمفاوية والخلايا أحادية النواة والخلايا الجذعية المكونة اللدم والتي تبعر عن خلايا مجموعة من التمايز 34 و20.0 ٪ إلى 67.7٪ وتكون عبارة عن خلايا حُبيبية.

في نموذج مفضـــل آخر فإن معلق الخلايا من الاختراع يكون في الصـــيغة النهائية، كما تم تحديده في الفقرة الســابقة ويشـتمل على ما بين حوالي 4×10^8 إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضاء، ويفضل أكثر من حوالي 5×10^8 إلى حوالي $2\ 10^9$ من خلايا الدم البيضاء وبه أيضاً 2×10^9 من خلايا الدم البيضـــاء بوه أيضـــاً وبصـــورة مفضـــلة من حوالي 5×10^8 إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضاء وكانت كل قيم الجرعات بين كل من القيم المذكورة أعلاه.

يمكن اختيار النماذج المحددة في شكل أمداء فرعية من القيم المذكورة أعلاه من خلايا الدم البيضاء في الصـــيغة النهائية. على ســبيل المثال، يمكن أن يتم اختيار نموذج محدد في شـكل محتوي خلية الدم البيضـــاء من أكبر من 8×10^8 إلى حوالي 1.2×10^9 من خلايا الدم البيضـــاء. ينطوي

مثال آخر عن كيفية أن مدى يمكن اختياره في النموذج في الاختيار من محتوي من حوالي 9 × 10^8 إلى حوالي 1.1 × 10^9 من خلايا الدم البيضـــاء. يمكن اختيار مثال ثالث من الأمداء لنموذج محدد من الاختيار الذي يكون بين حوالي 9.5 × 10^9 من خلايا الدم البيضـــاء. يمكن اختيار مثال رابع من الأمداء لنموذج محدد من الاختيار الذي يكون بين حوالي 9.8 × 10^8 إلى حوالي 1.02 × 10^9 من خلايا الدم البيضاء.

أوضـــحت أمثلة أخرى كيفية أن مدى من أحد النماذج من المحتوي أو التركيز يمكن اختياره والذي قد يشـتمل على المدى السـابق من 6 × 10^8 إلى حوالي 2 × 10^9 ويفضـل إلى حوالي 1.2 × 10^9 من خلايا الدم البيضـــاء ويضـــم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. ينطوي مثال آخر على الاختيار من المدى من أعلى من 7 × 10^8 إلى حوالي 2 × 10^9 ويفضـل إلى حوالي 1.2 × 10^9 من خلايا الدم البيضـاء ويضـم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. ينطوي مثال آخر على الاختيار من المدى من أعلى من 8 × 10^8 إلى حوالي 2 × 10^9 ويفضـــل إلى حوالي 1.2 × 10^9 من خلايا الدم البيضـاء ويضـم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. ينطوي مثال آخر على الاختيار من المدى من أعلى من 8.5 × 10^8 إلى حوالي 2 × 10^9 ويفضـل إلى حوالي 1.2 × 10^9 من خلايا الدم البيضـاء ويضـم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. ينطوي مثال آخر على الاختيار من المدى من أعلى من 9 × 10^8 إلى حوالي 2 × 10^9 ويفضـــل إلى حوالي 1.2 × 10^9 من خلايا الدم البيضـــاء ويضـــم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. ينطوي مثال آخر على الاختيار من المدى من أعلى من 9.5 × 10^8 إلى حوالي 2 × 10^9 ويفضـل إلى حوالي 1.2 × 10^9 من خلايا الدم البيضـاء ويضـم المدى كل قيم الجرعة الموجودة بين القيمتين. وبالتالي فإن كل أمداء الجرعات يمكن اختيارها من القيم المذكورة هنا ويمكن أن يتم فهمها من خلال ذوي المهارة العادية في المجال ويتم تضـمينها بواسـطة الاختراع الحالي.

تم توضـيح طرق قياس كل مجموعة خلة أعلاه وتم ذكرها بصـورة واضـحة بالتفصـيل من الاختراع الحالي. وبصـــفة خاصـــة، يتم إجراء طرق قياس كل من الخلايا اللمفاوية والخلايا وحيدة النواة والخلايا الحبيبية والصفائح الدموية و خلايا الدم الحمراء red blood cells (RBCs) باستخدام أعداد خلية متمايزة وإجمالية باسـتخدام جهاز حسـاب خلايا الدم بصـورة آلية automated hematology cell counter (ABx Pentra 60, Horiba Medical). تم تحديد النسـب المئوية للخلايا السـليفة،

والنسب المئوية للخلايا المعبرة عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2 والنسب المئوية للخلايا المعبرة عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2 باستخدام وسيلة قياس التدفق الخلوي flow cytometer (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotec).

تمت ملاحظة أن كل معلقات الخلية تشتمل على مواد حاملة مقبولة صيدلانياً و/أو سواغات.

في نموذج مفضل آخر، يتم تعليق الخلايا في معلق الخلايا من الاختراع حجم من 5 إلى 30 مل من محلول ملحي معالج بالهيبارين، أو محلول رينجر لاكتات ويفضل أن يشتمل على حوالي 1٪ من ألبومين المصل البشري وحوالي 2.5٪ من الجلوكوز.

يوفر الاختراع أيضاً تركيبة تشتمل على معلق خلية من الاختراع كما تم تعريفه أعلاه وبشكل اختياري مادة حاملة مقبولة صيدلانياً. يمكن أن تشتمل المادة الحاملة المقبولة صيدلانياً على وسط والذي يعمل على دعم قابلية نمو الخلية والوظائف الخاصة بها. يمكن أن يكون الوسط المذكورة عبارة عن وسط خالي من المصل لكي يتم تجنب استثارة الاستجابة المناعية immune response في المتلقي. سوف تكون المادة الحاملة عبارة عن محلول منظم أو مادة خالية من الحمى pyrogen.

وتشمل المواد الحاملة المقبولة صيدلانياً والمخففات المقبولة صيدلانيا على المحاليل الملحية والمحاليل المائية والمذيبات و / أو أوساط التشتيت dispersion media. إن استخدام هذه الناقلات والمواد المخففة diluents معروف جيدا في هذا المجال. يكون المحلول عبارة عن محلول معقم ويكون له لزوجة منخفضة بشكل كافي للسماح باستخدام محقنة للإعطاء.

تكون أمثلة المواد والمحاليل التي يمكن استخدامها في شكل مواد حاملة مقبولة صيدلانياً معروفة أيضاً في المجال.

وقد تمت في نموذج مفضل ملاحظة أ الصيغة الصيدلانية النهائية من منتج معلق الخلية كما هو موضح في الأمثلة من المواصفة الحالية اقد تم تشكيله من محلول ملحي من الهيبارين (انظر الجدول رقم 4). يمكن أن يتم استخدام محلول رينجر معالج باللاكتات Lactated Ringer solution (2.7 مجم/ 100 مل من كلوريد الكالسيوم ثنائي الهيدرات calcium chloride dihydrate، 320 مجم/ 100 مل من لاكتات الصوديوم sodium lactate و40 مجم/ 100 مل من كلوريد بوتاسيوم potassium chloride و600 مجم/ 100 مل من كلوريد الصوديوم sodium chloride) مع إضافة 2.5٪ من الجلوكوز و1٪ من ألبومين المصل البشري (انظر الجدول رقم 2).

تم تحضير وسط الصيغة النهائي كما هو موضح في الأمثلة من الاختراع بصورة جديدة لكل دفعة وفي يوم المعالجة، وفي الفئة A BSC بواسطة إضافة 10 مل من الجلوكوز (2.5 ٪) و1 مل من ألبومين المصل البشري (20٪) إلى 9 مل من محلول رينجر معالج باللاكتات.

الجدول 2

المحلول المنظم للصيغة *

المكون	التركيز	الدرجة
مَحْلولُ رينجر		دستور الأدوية الأوروبي European Pharmacopeia (EP)، دستور الأدوية الأمريكي للتسريب United States Pharmacopeia (USP)
الجلوكوز	2.5٪	دستور الأدوية الأوروبي، دستور الأدوية الأمريكي للتسريب
أَلْبُومينٌ بَشَرِيّ Human albumin	1٪	دستور الأدوية الأوروبي، دستور الأدوية الأمريكي للتسريب
المحلول الملحي (0.9٪ NaCl)	20 وحدة/مل	دستور الأدوية الأوروبي، دستور الأدوية الأمريكي للتسريب
هيبارين		دستور الأدوية الأوروبي، دستور الأدوية الأمريكي للتسريب

الاختصارات: EP = دستور الأدوية الأوروبي؛ USP = دستور الأدوية في الولايات المتحدة الأمريكية.

* انظر أيضا الجدول

وبالتالي تكون السواغات المفضلة بصورة خاصة عبارة عن محلول رينجر معالج باللاكتات ويفضل بإضافة الجلوكوز وألبومين المصل البشري.

في نموذج مفضل آخر، فإن المعلق من الاختراع أو التركيبة الصيدلانية من الاختراع يمكن أن يتم تجميدها في وسط التجميد freezing medium. إن أي وسط يعمل على حفظ قابلية النمو من الخلايا عند درجات حرارة بين -135° م و-190 درجة مئوية يكون عبارة عن وسط تجميد مناسب. على سبيل المثال، فإن وسط التجميد يمكن أن يشتمل على ما بين 2.5٪ إلى 10٪ من ثنائي ميثيل السلفوكسيد Dimethylsulfoxide (DMSO). وبصورة أكثر تحديداً، فإن وسط التجميد يمكن أن يشتمل على 5 -10٪ من ثنائي ميثيل السلفوكسيد.

يمكن أن يكون وسط التجميد معتمداً على وسط الزراعة culture medium أو وسط التمدد expansion medium كما تم وصفه هنا والذي يشمل أيضاً على مصل بشري أو أي بروتين أو خليط من البروتينات القادرة على الحفاظ على الخلية بصورة متكاملة بعد إذابة الخلايا.

وبعد الإذابة فإن الخلايا من الاختراع يمكن أن يتم غسلها لإزالة ثنائي ميثيل السلفوكسيد أو مكونات وسط التجميد الأخرى قبل إعطاء أو إعادة التعليق في محلول الإعطاء. يمكن أن يكون محلول الإعطاء عبارة عن أي محلول قابل للحقن في المرضى بدون سمية. يمكن أن يشتمل محلول الإعطاء على 1-15٪ من البروتين مثل ألبومين المصل البشري.

يمكن استخدام التركيبات الصيدلانية من الاختراع في أي طرق خاصة بالمعالجة أو أي استخدامات علاجية تم وصفها هنا.

وكما تم ذكره بالفعل فإن معلق الخلية من الاختراع يعمل على زيادة سرعة (إعادة) التجديد من الأوعية الدموية الموجودة وتحسين تدفق الدم بداخل الأوعية الموجودة كما هو موضح في المثال رقم 2. وبالتالي فإن معلق الخلية من الاختراع يكون مفيداً بصفة خاصة في معالجة مرض الشريان المحيطي الطرفي السفلي، ويفضل مرض الشريان المحيطي، ويفضل أكثر الإقفار الطرفي الحرج باستخدام مرض السكري في المرضى الذين ليس لديهم خيارات خاصة بإعادة المعالجة الوعائية باستخدام التحول الجراحي أو الطرق بداخل الأوعية. تم إجراء المثال رقم 2 من خلال استخدام منتج معلق خلية عقار محدد يقع في مجال تعريف معلق الخلية من الاختراع الحالي كما تم تحديده في السمة الأولى من الاختراع. تم تحضير منتج معلق الخلية الخاص بالعاقر من مادة عقار خلية أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام التي تمت صياغتها في محلول ملحي معالج بالهيبارين من

10-30 مل. تم استخدام منتج معلق خلية العقار المذكورة في جرعات مختلفة ويفضل أن تكون تلك الجرعات من حوالي 5 × 10 ^{8} إلى حوالي 1 × 10 9. كانت الحاوية النهائية هي 1-3 من الإعطاءات في المحقنة. تم تجميع البيانات عن منتج تعليق الخلية المذكور في الطور II (دراسة CMMo/ICPD/2008) لـ 32 خاضعاً في الدفعة. يلخص الجدول رقم 2 فما يلي بيانات وسيلة حساب الخلايا لكل خاضع فردي بما في ذلك خلية الدم البيضاء White blood cell (WBC) وأعداد الخلايا المختلفة (الخلايا اللمفاوية ووحيدة النواة). تم توضيح الملوثات المتعلقة بالمنتج أيضاً لكل خاضع بما في ذلك خلية الدم الحمراء والتركيزات الخاصة بالصفائح والنسب المئوية الخاصة بالخلايا الحُبيبية.

تم أيضاً توضيح تحليل النمط الظاهري من نفس المنتجات في الجدول رقم 3 والذي يشتمل على تحليل أنواع الخلية التالية:

مجموعة من التمايز 34+ الخلايا الجذعية المكونة للدم

مجموعة من التمايز 34+مجموعة من التمايز 38-

الخلايا الجذعية المكونة للدم غير المرتبطة بصورة مبكرة

مجموعة من التمايز 133 133cluster of differentiation (CD133) +

مستحضر الخلية المشتمل على وسلة إنذار بطانية وعائية Endothelial progenitor.

مجموعة من التمايز 90 90cluster of differentiation (CD90)+

الخلايا الجذعية المكونة للدم بصورة مبكرة

مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4+

الخلايا المعبرة عن مستقبل عامل مشتق من الخلية السدوية 1 +VEGFR2

الخلايا المعبرة عن مستقبل عامل نمو بطاني وعائي 2.

-CD31+CD146+CD133

خلايا بطانية ناضجة Mature endothelial cells

+CD34+VEGFR2+CD133

خلايا نذير بطاني لعامل النمو outgrowth endothelial progenitor cells المتأخر

CD34-CD105+CD90+CD73+

الخلايا الجذعية المتوسطية Mesenchymal stem cells (MSCs)

تم توضيح البيانات التي تم تجمعيها من مادة العقار في الجدول رقم 2 وفي الجدول رقم 3.

الجدول 2 عدد الخلايا الذاتية التمايز الخاص بمادة العقار CMMo/ICPD/2008. تم توضيح البيانات الخاصة بالجعرة المتوسطة (5×10^{8} خلايا كريات الدم البيضاء أو خلايا الدم البيضاء) والجرعة العالية (1.0×10^{9} خلايا كريات الدم البيضاء أو خلايا الدم البيضاء).

دفعة المريض	خلايا الكريات البيضاء (1×10^3)	خلية الدم الحمراء (1×10^6)	PLA (×10^3)	لِمْف (٪)	أحادية (٪)	مجموعة من التمايز +34 (٪)	الخلايا أحادية النواة	العدلات (٪)	اليوزينات (٪)	قعدات (٪)	الخلايا الحبيبية (٪)
الطريقة:	وسيلة حساب عدد الخلية	وسيلة حساب عدد الخلية	وسيلة حساب عدد	وسيلة حساب عدد	وسيلة حساب عدد	بيتش إي PHE	الخلية أحادية النواة	وسيلة حساب عدد الخلية	وسيلة حساب عدد الخلية الآلية	وسيلة حساب عدد الخلية	المجموع

	الآلية automated cell counter (ACC)	الآلية	الخلية الآلية	الخلية الآلية		الخلية الآلية	الآلية		
F01	19.59	0.05	259	485.	6.4	غير متاح	45	33	55.0
F03	19.43	0.11	603	425.	12	1.44	45.2	33.9	54.8
F04	20.59	0.04	69	241.	7.2	3.77	68.6	57.7	31.4
F05	16.87	0.04	56	201.	6.4	7.23	73.4	62	26.6
F07	8.96	0.06	242	422.	12	غير متاح	44.8	31.2	55.2
F08	21.94	0.06	310	364.	7.5	3.69	56.1	42.6	43.9
F09	43.29	0.06	329	374.	5.4	4.34	57.2	47.2	42.8
F10	8.75	0.04	277	451.	22	2.54	32.7	25.3	67.3
F11	17.28	0.02	38	281.	7.0	10.05	64.8	54	35.2
F14	30.74	0.07	232	474.	10	4.20	42.1	27.3	57.9
F15	23.12	0.06	280	471.	11	6.50	41.7	30.4	58.3
F16	14.39	0.04	153	266.	11	4.75	62.3	51.2	37.7

42.9	2.3	0	49	57.1	3.68	6.7	362.	235	0.06	25.31	F17
38.4	3.3	0	48.9	61.6	3.00	8.2	302.	191	0.07	22.89	F18
62.3	4.1	0	21.8	37.7	غير متاح	11 2.	511.	229	0.06	16.46	F20
57.8	2.9	0.2	32.5	42.2	2.20	9.4	482.	153	0.05	31.55	F21
59.5	3.4	0.1	31.1	40.5	1.67	174.	420.	157	0.05	10.46	F22
46.5	2.9	0.1	42.9	53.5	3.30	6.2	402.	144	0.03	18.36	F23
42.5	6.4	0	51.7	57.5	3.30	6.0	365.	239	0.06	27.86	F25
57.3	2.8	0	28.4	42.7	4.28	143.	430.	337	0.08	25.83	F26
45.1	3.2	0	39.9	54.9	2.06	7.0	381.	538	0.06	23.68	F27
52.3	2.2	0	33.5	47.7	3.67	5.9	464.	93	0.04	19.56	F28
53.1	4.1	0	31.7	46.9	2.19	7.7	454.	246	0.09	20.74	F30
56.3	4.8	0.1	32.2	43.7	4.68	146.	416.	230	0.06	15.67	F31
67.7	4.5	0.2	17.5	32.3	5.40	169.	506.	489	0.15	26.34	F32
44.6	4.7	0	44.7	55.4	3.59	3.9	407.	370	0.11	35.3	F33
32.2	5.1	0	56.1	67.8	2.73	5.7	265.	398	0.11	56.97	F34
32.2	3.2	0.2	60.5	67.8	9.24	6.4	256.	107	0.05	28.94	F35
37.5	3.6	0.1	51.2	62.5	3.92	107.	267.	201	0.04	19.71	F37
50.9	2.7	0.1	39.5	49.1	4.12	208.	300.	504	0.07	29.41	F38

F39	26.03	0.03	17 4	317.	223.	4.44	45.9	40.6	0.1	3.6
F40	24.72	0.07	30 4	غير مهم	199.	3.18	80	48.9		
									0.1	2.7
الحد الأدنى	8.75	0.02	38	201.	3.9	1.44	32.3	17.5	0	1.2
الحد الأقصى	56.97	0.15	603	511.	223.	10.05	80.0	62.0	0.4	7.1

الطرق المستخدمة: ACC = تركيبة مادة العقار drug substance composition التي تم اختبارها باستخدام عداد الخلايا الآلي automated cell counter (ABx Pentra 60)؛ و PHE = تحليل النمط الظاهري phenotypic analysis من مادة العقار drug substance (وسيلة تحليل MACS Quant 10، Miltenyi Biotec)؛ MNC = تم حسابه في شكل نسبة مئوية من خلايا الدم البيضاء غير خلاف الحبيبات granulocytes؛ SUM = التي تم حسابها من عدات الخلية المتشكلة constitute cell counts.

الاختصارات: LEU = خلايا الكريات البيضاء؛ RBC = خلية الدم الحمراء؛ وPLT = صفيحة الدم platelet؛ LYMPH = الخلايا اللمفاوية؛ MONO = الخلية الأحادية؛ CD34+ = الخلايا المعبرة عن مجموعة من التمايز 34؛ MNCs = الخلايا أحادية النواة؛ وNEU = العدلات؛ وBAS = الخلايا الحمضية؛ EOS = اليوزينات؛ GRA = الخلايا الحبيبية؛ N/A = غير متاح not available؛ N/M= غير مهم not meaningful.

الجدول 3

تحليل النمط الظاهري من معادة عقار CMMo/ICPD/2008 تجميع البيانات في الطور II (دراسة CMMo/ICPD/2008) لـ 32 خاضعاً

دفعة المريض	مجموعة من التمايز +34 (٪)	مجموعة من التمايز +34/مجموعة من التمايز -38 (٪)	مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4+ (٪)	مجموعة من التمايز +34/مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 (٪)	مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي +2 (٪)
الطريقة:	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE
F01	غير متاح				
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	غير متاح	غير متاح	غير متاح	غير متاح	غير متاح
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
F18	3.00	34	21.10	3.33	0.07
F20	غير متاح	غير متاح	غير متاح	غير متاح	غير متاح
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
الحد الأدنى	1.44	7.74	5.38	0.69	0.07
الحد الأقصى	10.05	55.45	38.8	10.3	24.7

الطريقة المستخدم: PHE = تحليل النمط الظاهري لمادة العقار (وسيلة تحليل MACS Quant10، من Miltenyi Biotec)؛

الاختصارات: CD34+= الخلايا الجذعية المكونة للدم المعبرة عن مجموعة من التمايز 34؛ و CD34+/CD38−= نسبة الخلايا الجذعية المكونة للدم المعبرة عن مجموعة من التمايز 34 التي لا تعبر عن مجموعة من التمايز 38؛ و CD45+/CxCR4+ = نسبة خلايا الدم البيضاء والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 45 وأيضاً التي تعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4؛ و CD34+/CxCR4 = نسبة الخلايا الجذعية المكونة اللدم المعبرة عن مجموعة من التمايز 34 والتي تعبر أيضاً عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4؛ و CD45+ /VEGF+ = النسبة المئوية لخلايا الدم البيضاء التي تعبر عن عامل النمو البطاني الوعائي؛ و N/A= غير المتاحة. تم أيضاً التعبير عن كل الخلايا لمجموعة من التمايز 45.

وبالاعتماد على النتائج التي تم تجميعها في الطور II (دراسة CMMo/ICPD/2008) تم توضيح الدفعات لـ 32 خاضع في الجدول رقم 2 ورقم 3 أعلاه، وقد قمنا بتوفير الخصائص الخاصة بمنتج معلق الخلية من الاختراع الحالي.

تمت ملاحظة أن الاختراع الحالي يشتمل أيضاً على 1−3 من المحاقن (مسبقة الملء) التي تشتمل على معلق خلية الاختراع.

بالإضافة إلى ذلك، وإذا كان ذلك مطلوباً فإن الخلايا من معلقة الخلية من الاختراع يمكن أن يتم تعديلها بصورة جينية من خلال استخدام الطرق التقليدية والتي تشتمل على، على سبيل المثال لا

الحصر، عملات خاصة بالتكوين الجيني وعمليات الحذف وعمليات الإدراج في الجينوم genome، إلخ.

- عمليات التصنيع الخاصة بمنتج معلق الخلية.

يمكن أن يتم تصـــنيع منتج معلق الخلية من الاختراع في عدد من الطرق، وعلى الرغم من ذلك، يفضـل أن يتم تصـنيعها كما هو موضـح بالتفصـيل في المثال رقم 1 بحيث أن معلق الخلية من الاختراع يمكن أن يتم أخذه في الاعتبار بأنه قد تمت معالجته عند الحد الأدنى له من منتج خلية أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام ، بسبب أن عملية التصنيع تتكون فقط من كثافة حجم الجسيم وخطوات الفصـل بالاعتماد على الجاذبية المقصـود منها أن يتم تخصـيب الجزء في أسـبارتات، بواسطة إزالة البلازما والصفائح الدموية platelets وخلايا الدم الحمراء والخلايا الحبيبية.

تكون عملية الصنيع كما تم وصفه هنا في المثال رقم 1 قد تم تلخيصها بصورة مختصرة كما يلي:

- الخطوة 0 يتم إجراء تجميع نخاع العظم بواسـطة عمليات السـفط المتكررة، ويفضـل من القمة الحرقفية الخلفية للخاضع تحت عملية تخدير موضعي. يتم بعد ذلك تجميع نواتج سفط نخاع العظم ويفضل في كيس ناقل يشتمل على سترات مضادة للتخثر من محلول ديكستيروز أ.

الخطوة 1: الترشـيح-يتم ترشـيح نخاع العظم ويفضـل بواسـطة الجاذبية لكي تتم إزالة أي شـظايا عظام صغيرة ولكي يتم منع التخثر أثناء الخطوات التالية.

الخطوة 2: اختزال الحجم من SmartRedux - يتم تقليل حجم نخـاع العظم الأولي من حوالي 50-100 مل ويفضـل باسـتخدام برنامج SmartRedux على جهاز Sepax 2.0 والذي يرتبط مع الإزالة عن طريق طقم (SmartRedux (CS-490.1 وذلك بإتباع تعليمات المصـنع. إن تلك الخطوة التي تشـــتمل على إزالة البلازما وخلية الدم الحمراء ينتج عنها حوالي 50-100 مل من منتج التغليف المزغب وأيضاً تسهم في النقاء الخاص بالمنتج النهائي.

إن خطوة اختزال الحجم يتم إجراؤها مرة واحدة أو مرتين وذلك اعتماداً على حجم مادة البدء المراد معالجتها. تمت معالجة عينات نخاع العظم بأحجام تصـــل إلى حوالي 220 مل في دورة منفردة وتمت معالجة عينات من العديد من 220 مل في اثنين من الدورات باستخدام نفس الطقم.

بالنســـبة لكل من اختزال الحجم في الدورة المنفردة والمزدوجة والحجم النهائي قد تم ضـــبطه عند حوالي 50-100 مل.

الخطوتين 3 –4: تدريج الكثافة من NeatCell –يفضل أن يخضع كيس العينة المتوسط المعقم المشتمل على حجم مختزل من نخاع العظم لعملية طرد مركزي متدرج الكثافة من ويلي ذلك مرتين من الغسل لمعلق الخلية أحادية النواة باستخدام محلول الغسل ويفضل المكون من 2–4٪ من ألبومين المصل البشري في المحلول الملحي المنظم (كل منها في درجة صيدلانية). يتم تجميع حوالي 45 مل من منتج خلية أحادية النواة مشتقة من نخاغ العظام في كيس الإخراج وتتم إزالة المكونات الأخرى في كيس النفايات waste bag.

الخطوة 5: ترشيح خلية أحادية النواة مشتقة من نخاغ العظام– يتم تجميع خلية أحادية النواة مشتقة من نخاغ العظام من كيس المنتج باستخدام محقنة 50 مل ويتم الترشيح ويفضل أن يتم من خلال مرشح 50 ميكرو متر في أنبوب فالكون معقم. يتم سفط كيس المنتج باستخدام محلول الغسل ويتم الترشيح لكي يتم تحسين استخلاص الخلية أحادية النواة. يتم ضبط الحجم النهائي لمادة عقار خلية أحادية النواة مشتقة من نخاغ العظام عند 40–60 مل.

تتكون الخلية النهائية (الخطوة 6) على المستحضر من منتج معلق الخلية النهائي من الاختراع. تم وضع المنتج النهائي المذكور في جرعات على خلايا الدم البشرية، بما في ذلك ليس فقط جزء الخلية أحادية النواة ولكن أيضاً الخلايا الحبيبية. وبسبب أن الخلايا أحادية النواة عبارة عن مكون فعال فإن النسبة المئوية لـ الخلايا أحادية النواة في المنتج النهائي يتم أخذها في الاعتبار بأنها سمة متعلقة بالجودة. في هذا الصدد، هناك بعض متغيرات العملية التي يمكن أن تؤثر على النوعية التي تسهم في المنتج النهائي. في هذا الصدد، تم توضيح الخطوات التي تؤثر على النسب المئوية من الخلايا أحادية النواة في المنتج النهائي والتي تعتبر مهمة في عملية تصنيع المنتج في الجدول رقم 5.

الجدول 5

الخطوات والمتغيرات المرتبطة مع عملية التصنيع

الخطوة	المتغير	مدى الأهمية

ترشيح	الحجم	يمكن أن يتداخل وجود قطع العظام مع فعالية التنقية ويمكن أن يتداخل مع إجراء الإعطاء.
طريقة SmartRedux	الطرد المركزي: السرعة والمدة	يمكن أن تسهم خطوة الفصل المعتمدة على الجاذبية بصورة مباشرة في نقاء المنتج النهائي. وبالتالي فإن إعدادات المتغير تتطلب إنشاء عملية فصل هامة.
طريقة NeatCell	كثافة الفيكول	يقوم بتحديد مجموعات الخلايا التي تمت تنقيتها. كانت الكثافة المستخدمة هي 1.077 جرام/المللي
	حجم الفيكول	تأثيرات استخلاص الخلية أحادية النواة
	سرعة ومدة الطرد المركزي للفيكول	تأثيرات استخلاص الخلية أحادية النواة
	سرعة ومدة الطرد المركزي والغسل	تأثيرات استخلاص الخلية أحادية النواة

الاختصارات: MNC = خلايا وحيدة النواة

خطوة SmartRedux – يقصد من تلك الخطوة أن تقوم باختزال حجم نخاع العظم إلى حجم صغير بصورة كافية للمعالجة في إجراء Neatcell (يكون لـــ NeatCell حجم مدخلات من 120 مل). بالإضافة إلى ذلك فإن خطوة SmartRedux تشتمل على التجزئة إلى خلايا الدم الحمراء ومنتج البلازما ومنتج طلاء مزغب والذي يسمه في النقاء الخاص بمنتج NeatCell.

تكون المتغيرات المهمة الخاصة بتلك الخطوة عبارة عن سرعة الطرد المركزي والمدة وأيضاً المتغيرات التي يتم التأثير عليها بصورة هامة واستخلاصها من الخلايا أحادية النواة من أسبيرات aspirate نخاع العظم.

خطوة NeatCell–إن طريقة تخصيب الخلية أحادية النواة الآلية قد تم تصميمها وتم جعلها في صورة قياسية من خلال هيئة التصنيع ويُقصد منها أن تقوم بتخصيب أسبارتات نخاع العظم لـــلخلايا أحادية النواة وبالتالي فهي هامة. تكون هيماتوكريت Hematocrit (Hct) من مادة البدء لـ NeatCell عبارة عن سمة هامة للمادة بسبب أنها تؤثر على فعالية تنقية الخلية أحادية النواة. تم تثبيت متغيرات العملية الهامة في برنامج NeatCell بما في ذلك سرعة الطرد المركزي والمدة وكثافة الفيكول والحجم.

وفي سياق جزء الخلية أحادية النواة فإن مجموعات الخلايا المتعددة يعتقد أنها تلعب أدوراً مهمة في طريقة التأثير على المنتج النهائي. وبالتالي فإن الوجود والفعالية الخاصة بالخلايا المذكورة تأخذ في اعتبارها خصائص النوعية considered quality attributes (CQAs).

يكون لجزء الخلية أحادية النواة الذي تم الحصول عليه بعد تدريج الكثافة المشتمل على تلك الخلايا له كثافة منخفضة بالمقارنة مع الفيكول وبالتالي فإنه ليس له كثافة كافية لكي يم اختراقه بداخل طبقة الفيكول أثناء الطرد المركزي. ونتيجة لذلك، فإن كثافة الفيكول المستخدمة في العملية تتأثر بصورة مباشرة بالتركيبة الخاصة بمجموعة الخلية أحادية النواة وبالتالي فإنه يتم أخذها في الاعتبار بأنها متغير عملية هام. كانت الكثافة المستخدمة هي 1.077 جرام/المللي.

إن عملية التصنيع هي عملية متصلة ولا تتضمن أي خطوات تنشيط أو معالجات زائدة للخلايا والتي يمكن أن تؤثر في وظائف مجموعات الخلايا بداخل جزء الخلية أحادية النواة. يمكن أن تؤثر مدة العملية على الوظيفة الخاصة ب الخلايا وبالتالي لا يكون هناك أزمة إيقاف تم تضمينها في العملية إكمال العملية بكاملها في مدى من 4–5 ساعات في وسط غرفة نقية. يمكن أن يتم التأثير على الوظائف بواسطة حالة المرض الخاصة بالمريض وقابلية التغيير الفسيولوجية العامة للمريض.

واستناداً لما سبق، تشير سمة إضافية من الاختراع إلى عملية تصنيع خاصة بمعلق الخلية من الاختراع والتي تشتمل على:

1. يتم إجراء تجميع نخاع العظم بواسطة عمليات السفط المتكررة، ويفضل من العُرف الحرقفي الخلفي للخاضع تحت عملية تخدير موضعي أو عام. يتم بعد ذلك تجميع نواتج سفط نخاع العظم ويفضل في كيس ناقل يشتمل على محلول مضاد للتخثر ويفضل أكثر محلول سترات ديكستيروز أ.

2. يتم ترشيح نخاع العظم ويفضل بمساعدة الجاذبية لكي تتم إزالة أي شظايا عظام صغيرة ولكي يتم منع التخثر أثناء الخطوات التالية.

3. يتم تقليل حجم نخاع العظم الأولي ويفضل من حوالي 50–100 مل ويفضل باستخدام برنامج SmartRedux على جهاز Sepax 2.0 والذي يرتبط مع الإزالة عن طريق طقم (CS-SmartRedux 490.1). إن تلك الخطوة التي تشتمل على إزالة البلازما وخلية الدم الحمراء أن ينتج عنها حوالي 50–100 مل من منتج التغليف المزغب وأيضاً التي تتكون من النقاء الخاص بالمنتج النهائي.

4. وبشكل اختياري، فإن خطوة اختزال الحجم يتم إجراؤها في اثنين من الدورات وذلك اعتماداً على حجم مادة البدء المراد معالجتها. تمت معالجة عينات نخاع العظم بأحجام تصل إلى حوالي 220 مل في دورة منفردة وتمت معالجة عينات من العديد من 220 مل في اثنين من الدورات باستخدام نفس الطقم. يفضل أن يكون كل من اختزال الحجم في الدورة المنفردة والمزدوجة والحجم النهائي قد تم ضبطه عند حوالي 50–100 مل.

5. إن كيس العينة المتوسط المعقم المشتمل على نخاع العظم تم اختزال حجمه كما هو موضح في الخطوة رقم 3 أو 4 ويخضع لعملية طرد مركزي متدرجة ويلي ذلك مرتين من الغسل لمعلق الخلية أحادية النواة باستخدام محلول الغسل ويفضل المكون من 2–4٪ من ألبومين المصل البشري في المحلول الملحي المنظم (كل منها في درجة صيدلانية. يتم تجميع حوالي 45 مل من منتج خلية أحادية النواة مشتقة من نخاغ العظام في كيس الإخراج وتتم إزالة المكونات الأخرى في كيس النفايات. ويفضل أكثر أن يخضع كيس العينة المتوسط المعقم المشتمل على نخاع العظم تم اختزال حجمه لعملية طرد مركزي بالكثافة من NeatCell ويلي ذلك مرتين من الغسل لمعلق الخلية أحادية النواة باستخدام محلول الغسل ويفضل المكون من 2–4٪ من ألبومين المصل البشري في المحلول الملحي المنظم (كل منها في درجة صيدلانية. يتم تجميع حوالي 45 مل من منتج خلية

أحادية النواة مشـــتقة من نخاغ العظام في كيس الإخراج وتتم إزالة المكونات الأخرى في كيس النفايات.

6. يتم تجميع خلية أحادية النواة مشتقة من نخاغ العظام من كيس المنتج ويفضل باستخدام محقنة 50 مل ويتم الترشيح ويفضل أن يتم من خلال مرشح 50 ميكرو متر، في أنبوب فالكون معقم. يتم سفط كيس المنتج باستخدام محلول الغسل ويتم الترشيح لكي يتم تحسين استخلاص الخلية أحادية النواة. يتم ضبط الحجم النهائي لمادة عقار خلية أحادية النواة مشتقة من نخاغ العظام عند 40-60 مل.

من المهم أيضـاً أن تتم ملاحظة أن تصـنيع معلق الخلية من الاختراع يفضـل أن يكون في عملية متصلة تم تضمينها في عملية تخصيب الخلايا حيث أن العملية لا تشتمل على خيار المعالجة.

وبعد الإعداد الخاص بمادة العقار فإن الطرد المركزي لـــ الخلايا أحادية النواة يفضل أن يتم إجراؤه عند 760 × العجلة لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة الغرفة. يتم إعادة تعليق الخلايا في الصـــيغة النهائية (ويفضل في محلول ملحي منظم من الهيبارين أو محلول رينجرز تمت تزويده بـ 2.5٪ من الجلوكوز و1٪ من ألبومين المصـل البشـري وتم تحويله إلى محقنة(محاقن) غير بلاسـتيكية مولدة للاحترار تحت الظروف المعقمة).

ومن المنتج النهائي، يمكن أن يتم نقل 2-3 مل إلى زجاجة لاختبار مراقبة الجودة quality control (QC) ويفضـــل أن يتم نقل من 8 إلى 12 مل بداخل كل محقنة بلاســـتيكية غير مســـببة للحرارة معقمة تحت ظروف معقمة. يتم بعد ذلك تغليف المحقنة التي لها قبة مغلقة لكي يتم منع التلوث وبعد ذلك يتم التغليف في صورة منفردة معقمة باستخدام كيس بلاستيكي مزود بسحاب وكيس نقل للنقل إلى وحدة الأشعة التداخلية الخاصة بالإعطاء إلى الخاضع.

تم توضيح صورة عاملة لعملية التصنيع في الأشكال.

قابلية تصنيع منتج معلق الخلية

تم توضيح النتائج بصورة جيدة في المثال رقم 2 والذي تم توضيحه في الـ 12 شهراً الأول يلي ذلك إعطاء معلقة الخلية من الاختراع ويقوم الخاضـعين بتحقيق الاسـتجابة الإكلينيكية ذات الصـلة كما هو موضح من خلال تقليل التصنيف الخاص بفئة رذرفورد من 1-3 (الدرجة 1 (29) (64٪) من الخاضـــعين) والتي تمت مقارنتها بصـــورة جيدة مع مجموعة عينة المقارنة والتي يكون بها فقط 2 (13٪) من الخاضعين قد تم استجابتهم).

وعند الزيارة الأساسية، فقد عرض 25 (56٪) من الخاضعين في مجموعة المعالجة الذين تلقوا تسريب من معلق الخلية من الاختراع وجود تقرحات إقفاريه غير قابلة للالتئام non-healing ischemic ulcers ولكن وبعد الإعطاء لمدة 12 شهر بعد زيارات المتابعة فإن 18 خاضعاً (75٪) قد عرضو عدم وجود تقرحات (مع بتر رئيسي major amputation واحد) في 24 خاضعاً 060٪) من الخاضعين قد أوضحوا زيادة في ضغط الأكسجين عبر الجلد Transcutaneous oxygen pressure (TcPO2) ≤ مم زئبق والتي تكون عبارة عن تنبؤ يمكن الاعتماد عليه في الالتئام. تم اختبار تكون الأوعية عند الشهر 6 بعد إعطاء معلق الخلية من الاختراع الحالي. وفي الخاضعين الذين تمت معالجتهم بمعلق الخلية من الاختراع فتم تم عرض التكون الوعائي vasculogenesis في 26 (62٪) خاضعاً: 7، 8 و9 من الخاضعين في مجموعات منخفضة ومتوسطة وعالية الجرعة، على الترتيب.

لم يتعرض أي مريض إلى تفاعلات جانبية خطيرة غير متوقعة Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction (SUSAR) أثناء المعالجة وأثناء المتابعة. تم الأخذ في الاعتبار لثلاثة من التأثيرات الجانبية Adverse events (AEs) بحيث ترتبط مع مسار الإعطاء وكان بهم تفاعلات موضعية ضعيفة للحقن. لم يوجد أي من الخاضعين قد أوقف التجربة قبل انتهائها نتيجة وجود التأثير الجانبي Adverse event (AE) ولم يتعرض أي من الخاضعين للتأثير الجانبي في معلق الخلية الخاص بالاختراع. لم يحدث أي التأثيرات الجانبية الخطيرة serious adverse event (SAEs) قبل إعطاء ريكسيميلوسيل –T Rexmyelocel-T وليس هنا أي التأثير الجانبي الخطير قد حدث أثناء 24 ساعة بعد الإعطاء الخاص بريكسيميلوسيل–T. هناك إجمالي من 41 التأثيرات الجانبية الخطيرة قد تم تسجيله من خلال 23 خاضع أثناء فترة المتابعة (12 شخص)، و17 التأثيرات الجانبية الخطيرة (تسعة من الخاضعين) في مجموعة عينة المقارنة و24 التأثيرات الجانبية الخطيرة (14 خاضع) في مجموعات معالجة من ريكسيميلوسيل –T: مع جرعة منخفضة 1 × 10: مع جرعة منخفضة من 1 × 10 ^{8} خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام: لأربعة خاضعين؛ وعند أعلى جرعة من 1 × 10 ^{9} خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام من ستة خاضعين. وقد مات اثنين من الخاضعين من المرض القلبي الوعائي cardiovascular disease.

وبالتالي فمن الواضح بالتالي أن معلق الخلية من الاختراع يكون مفيداً بصفة خاصة في معالجة مرض الشريان المحيطي الطرفي السفلي، ويفضل مرض الشريان المحيطي، ويفضل أكثر الإقفار

الطرفي الحرج باستخدام مرض السكري في المرضى الذين ليس لديهم خيارات خاصة بإعادة المعالجة الوعائية باستخدام التحول الجراحي أو الطرق بداخل الأوعية.

وبالتالي، تشير سمة إضافية من الاختراع الحالي إلى معلق خلية ومحقنة مسبقة الملء أو تركيبة صيدلانية كما تم وصف ذلك في جزء "منتج معلق الخلية" ويتم استخدام المعلق في معالجة أو تخفيف مرض الشريان المحيطي الطرفي المنخفض ويفضل في خاضع بشري.

يفضل أن يكون مرض الشريان المحيطي الطرفي السفلي عبارة عن إقفار أطراف حرج.

يفضل أكثر أن يكون معلق الخلية، والمحقنة مسبقة الملء أو التركيبة الصيدلانية التي تم تعريفها في جزء ("منتج معلق الخلية") قد تم استخدامه في طريقة معالجة مرض الشريان المحيطي للطرف السفلي ويفضل في مرض إقفار الطرف الحرج وذلك من خلال الإعطاء بداخل الشريان حيث يصل ضغط تدفق الدم المنخفض إلى 4 جوي ويتم الحصول عليه من خلال تثبيت بالون قابل للنفخ بالقرب من آفة الانسداد الوعائي عند الفخذ البعيد أو الشريان المأبضي وتسريب معلق الخلية المذكور بداخل الشريان.

الأمثلة

المثال رقم 1: المواد والطرق

1. معلق الخلية وطريقة إنتاجه.

ولكي يتم توضح الاختراع الحالي، فقد تم استخدام معلق الخلية طبقاً للاختراع الحالي في الأمثلة التالية وقد تم تحضيره من معلق خلية ذاتي من خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام مكون من العديد من أنواع الخلايا الناضجة وأيضاً الخلايا المكونة للدم الأصلية. كانت صيغة المنتج النهائي معتمدة على عدد من خلايا الدم البيضاء القابلة للنمو الموجودة.

تم توضيح خصائص معلق الخلية من الاختراع باستخدام عدات الخلايا الإجمالية وعدات الخلايا التفاضلية باستخدام وسيلة عد الخلايا من الدم (ABx Pentra 60, Horiba Medical). تم تحديد النسب المئوية للخلايا السليفة خلايا الدم البيضاء (خلايا مجموعة من التمايز 45+) والتي تم العبير عنها في مستقبل عامل الانتقال من عامل مشتق من الخلية السدوية 1 من مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 أو العامل المكون للأوعية الدموية خلايا الدم البيضاء من المستقبل 2 من عامل النمو البطاني الوعائي والذي تم تحديدها باستخدام وسيقة قياس تدفق الخلية (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotec).

إن تركيز خلايا الدم البيضـــاء، ونســـبة الخلايا اللمفاوية والخلايا وحيدات النواة والخلايا الحبيبية وخلايا الإنذار وخلايا الدم البيضاء الإجمالية المعبرة عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 أو مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2 من 32 دفعة إكلينيكية قد تم توضيحها في الجدول رقم 6.

الجدول 6

5 تركيبة الخلية من 32 دفعة إكلينيكية من CMMo/ICPD/2008

نوع الخلية	الطريقة/ مرقم سطح الخلية	عـدد الخلايـا/ النسبة
الكريـات البيضـــاء (خلايـا الـدم البيضاء)	وســيلة حســاب عدد الخلية الآلية	x1 – 10^8 x1 10^9
خلايـا الـدم الحمراء/ خلايـا الـدم الـــــبـــــيضـــــاء	نسبة	x7 .6– 1.15
الصفائح الدموية /خلايا الدم البيضاء	نسبة	x7 .31– 2.2
العدلات	وســيلة حســاب عدد الخلية الآلية	2.5 ×10 7– 5.6 ×10 8
الخلايا اللمفاوية	وســيلة حســاب عدد الخلية الآلية	x2.4 10 ^{7} – x5.1 ×10 ^{8}
الخلايا وحيدة النواة	وســيلة حســاب عدد الخلية الآلية	x 6.4 10 ^{6} – x2.0 10 ^{8}
اليوزينات	وســيلة حســاب عدد الخلية الآلية	0 –71 x 10 x71 10 7
القعدات	وســيلة حســاب عدد الخلية الآلية	x1.2 10 ^{6}– x7.1 10 ^{7}
الخلايا المُحببة	وســيلة حســاب عدد الخلية الآلية	x2.8 10 ^{7}– x6.1 10 ^{8}

الخلايا وحيدة النواة	خلية الدم البيضاء – الخلايا الحبيبية	3.6×10^{-7} 7.8×10^{8}
الخلايا الجذعية المكونة للدم	قياس التدفق الخلوي لمجموعة من التمايز 34+	1.4×10^{-6} 5.4×10^{7}
الخلايا المعبرة عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 والتي تكون عبارة عن مرقم انتقال عامل مشتق من الخلية السدوية 1.	قياس التدفق الخلوي لمستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4+	5.4×10^{-6} 3.2×10^{8}
الخلايا الجذعية المعبرة عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 والتي تكون عبارة عن مرقم انتقال عامل مشتق من الخلية السدوية 1.	قياس التدفق الخلوي لـ CD34+/CxCR4+	1.0×10^{-4} 4.1×10^{6}
الخلايا التي تعبر عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2 لعامل التكوين الوعائي عامل النمو البطاني الوعائي	قياس التدفق الخلوي لمستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2	7.0×10^{-4} 2.5×10^{7}

الاختصارات: ACC = وسيلة حساب عدد الخلية الآلية، WBC = خلايا الدم البيضاء. تم توضيح البيانات في شكل العدد الأدنى إلى العدد الأعلى.

تم تصنيع معلق الخلايا من الاختراع تحت ظروف جي إم بي GMP. تم إجراء كل خطوات العملية في الفئة ب من الغرفة النظيمة حيث يكون هناك عمليات معالجة شبه مقفلة (ارتباط متصاعد أو سمات ربط بالقفل) ومعالجات مفتوحة تم إجراؤها في الفئة A BSC.

وبصورة مختصرة، فإن نخاع العظم قد تم ترشيحه بصورة مطهرة لكي تتم إزالة أجزاء النخاع يلي ذلك خطوة تقليل الحجم الآلي للحصول على حجم صغير بصورة كافية للمعالجة الإضافية.

وبعد ذلك، فإن الخلايا تخضـــع للطرد المركزي بتدريج الكثافة من الفيكول آلي بما في ذلك خطوات الغسل. تم ترشيح المنتج مما ينتج عنه 50 مل من جزء خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام والذي يكون عبارة عن مادة عقار.

تم إغلاق عملية التصنيع الخاصة بالمادة باستثناء الروابط المتصاعدة وروابط قفل luer. تم إجراء خطوات فصل الخلية Cell separation steps في نظام آلي automated system لضمان المعالجة القياسية الخاصة بالعملية.

تم توفير مخطط تدفق خاص بعملية التصـــنيع من معلق الخلية من الاختراع في الشـــكل رقم 1. بالإضافة إلى ذلك فإن عملية التصنع يتم وصفها بالتفصيل فيما يلي:

- الخطوة 0 يتم إجراء تجميع نخاع العظم بواســطة عمليات الســفط المتكررة، من القمة الحرقفية الخلفية للخاضع تحت عملية تخدير موضعي وباستخدام محاقن سعة 5 مل مقترنة مع وسيلة سفط نخاع العظم. تم تجميع نواتج الســـفط نخاع العظم في 600 مل من الكيس الخاص بالناقل من محلول ديكســتيروز ســيتيارات مضــاد للتخثر أ anticoagulant citrate dextrose solution A (A ACD-A) وحتى حجم يصل إلى 250-350 مل. يتم تعبئة كيس النقل نخاع العظم طبقاً للتعليمات ويتم تحضـــيره للشـــحن. يتم شـــحن نخاع العظم عند درجة حرارة الغرفة (15-210 درجة مئوية) بالنسبة لـ Rex genero في الشحن الخاص بالمعالجة الفورية.

- الخطوة 1 الترشيح-يتم ترشيح نخاع العظم ويفضل بواسطة الجاذبية خلال مرشح حطي سعة 200 ميكرو لتر لكي تتم إزالة أي شظايا عظام صغيرة ولكي يتم منع التخثر أثناء الخطوات التالية: وبعد الترشـــيح، تم تجميع العينة في اختبارات العملية وتم وزن كيس التجميع مع الكتلة التي تم تحويلها إلى الحجم والتي توفر حجم مدخل في الإعدادات الخاصة بالمعالجة الخلوية.

- الخطوة 2 اختزال الحجم من SmartRedux - يتم اختزال حجم نخاع العظم الأولي من حوالي 300 مل إلى 50 مل باســـتخدام برنامج SmartRedux على جهاز Sepax 2.0 والذي يرتبط مع الإزالة المعقمة عن طريق طقم SmartRedux (CS-490.1) وذلك بإتباع تعليمات المصـنع. إن تلك الخطوة التي تشـــتمل على إزالة البلازما وخلية الدم الحمراء ينتج عنها 50 مل من منتج التغليف المزغب وأيضـــاً تســـهم في النقاء الخاص بالمنتج النهائي. إن خطوة اختزال الحجم يتم إجراؤها مرة واحدة أو مرتين وذلك اعتماداً على حجم مادة البدء المراد معالجتها. تمت معالجة عينات نخاع العظم بأحجام تصـــل إلى حوالي 220 مل في دورة منفردة وتمت معالجة عينات من العديد من

220 مل في اثنين من الدورات باستخدام نفس الطقم. بالنسبة لكل من اختزال الحجم في الدورة المنفردة والمزدوجة والحجم النهائي قد تم ضبطه عند 50 مل.

- الخطوتين 3 -4: تدريج كثافة NeatCell-تم ربط كيس العينة الداخلية المعقم المشتمل على نخاع العظم تم تقليل حجمه مع طقم Neatcell (CS-900.2) وتمت المعالجة باستخدام برنامج NeatCell على جهاز Sepax 2.0، يلي ذلك تعليمات التصنيع. تتكون تلك الخطوات من الطرد المركزي الخاص بالكثافة على فيكول 1077 يلي ذلك اثنين من مرات الغسل من معلق خلية أحادية النواة باستخدام محلول الغسل المكون من 2.5٪ أو 4٪ من ألبومين المصل البشري في المحلول الملحي (لكل من الدرجة الصيدلانية). يتم تجميع 45 مل من منتج خلية أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام في كيس الإخراج وتتم إزالة المكونات الأخرى في كيس النفايات.

- الخطوة 5 ترشيح خلية أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام-يتم تجميع خلية أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام من كيس المنتج باستخدام محقنة 50 مل ويتم الترشيح ويفضل أن يتم من خلال مرشح 50 ميكرو متر في أنبوب فالكون معقم. يتم سفط كيس المنتج باستخدام محلول الغسل ويتم الترشيح لكي يتم تحسين استخلاص الخلية أحادية النواة. يتم ضبط الحجم النهائي لمادة عقار خلية أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام عند 50 مل.

2. اختيار مجموعة الدراسة

تم تسجيل عدد إجمالي من 60 خاضعاً لهم الإقفار الطرفي الحرج روثرفورد بدرجة II(الفئة 5) ومرض السكري وغير قادرين على التعرض لعملية إعادة المعالجة الوعائية الجراحية أو عملية إعادة التوعي للأوعية الداخلية endovascular revascularization (50 ذكر (83٪) و 10 إناث (17٪)) مع متوسط عمر من 64.3 (± 9.5) (في مدى : 46-80 سنة) وتم تحديدهم بصورة عشوائية في نسب من 1: 1: 1 :1 لكي يتم استقبال إعطاء منفرد من خلية المعلقة للاختراع (عند واحدة من ثلاثة مستويات من الجرعة؛ 1 × 10^8، 5 × 10^8، أو 1 × 10^9 من خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام ؛ و15 حاج لكل مجموعة معالجة) بالإضافة إلى مقياس العناية الخاص بواحدة أو كثر من الذين تمت معالجتهم طبقاً لمقياس الرعاية بمفرده. (15 خاضع). تم إعطاء معلق الخلية من الاختراع من خلال الشريان في تسريب منفرد. وبالنسبة لتلك التجربة، فإن التقسيم العشوائي الطبقي يتم وضعه ويتم إنشاء طبقات خاصة بتصنيف روثرفورد الإقفار الطرفي الحرج من الدرجة II وIII (الفئات 4 و5) مع عدم وجود خيارات خاصة بالتوعي الداخلي أو إعادة

التوعي الجراحي طبقاً لـ Transatlantic Inter-Society Consensus Document on Management of Peripheral Arterial Disease. في حالة الإقفار الطرفي الحرج التي تكون معروضـــة في كلا الرجلين، يتم الإعطاء بالتسريب إلى الرجل التي تم تحديدها بواسطة عملية الفحص للمرض المتقدم/ المرض الشديد بشط أن تكون الرجل لم يتم تعرضها لعملية بتر جراحي بالفعل في أصابع القدم أو أعلى من ذلك. يتم تقييم الخاضعين الداخلية في التجربة عند الزيارة الأساسية (الزيارة رقم 1) ولمدة 24 ساعة والأشهر التالية من 1، 3، 6، و9 و12 بعد إعطاء ريكسميولوسيل-T (الزيارات 3، 4، 5، 6، 7 و8 على الترتيب). لا يكون من المطلوب من الخاضـــعين الذين تم تحديدهم لمجموعة المقارنة أن يتم عرضهم لما يزيد عن زيارتين و3.

3. معايير الإدراج

يكون الخاضعين مؤهلين للإدراج في التجربة إذا انطبقت عليهم معايير الإدراج التالية:

1. خاضعين من كل من الجنسين بعمر ≤18 و ≤80 عاماً.

2. المرضى الذين استقبلوا معالجة لمرض السكري من النوع I أو النوع II.

3. الإقفار الطرفي الحرج من الدرجة II وIII (الفئة 4 و5) طبقاً لروثرفورد.

4. عدم القدرة على المعالجة الوعائية الجراحية أو المعالجة بإعادة التوعي داخل الأوعية كما تمت التوصية بذلك بواسطة Trans-Atlantic Inter-Society Consensus II.

5. فترة الحياة المتوقعة > عامان

6. لا يكون هناك توقع بتر كبير في الطرف المارد معالجة في مدة 12 شـــهراً بعد الإدراج في الدراسة.

7. وجود متغيرات كيميائية طبيعية يتم تحديدها بواســـطة كريات الدم البيضـــاء ≤ 3000 /مل والعدلات ≤ 1500 /مل، الصفائح الدموية ≤ 100000/ مم3، ناقلة أمين الأسبارتات aspartate aminotransferase (AST) / ناقلة أمين الألانين alanine aminotransferase (ALT) ≤ 2.5 × المدى القياسي، مع كرياتينين creatinine ≤ 2.5 مجم/الديسي لتر.

8. يقوم الخاضعين بتوفير موافقة خطية خاصة بالمشاركة في التجربة.

9. يجب أن يكون للنســـاء اللواتي لديهم احتمالية للحمل نتائج ســـلبية في اختبار الحمل بعد الإجراءات القياسـية لكل واحدة المسـتشـفى ويتم إجراء ذلك عند وقت تضـمينهم في التجربة ويتم توجيههم بالتزام وسيلة منع الحمل الطبيعية أثناء فترة التجربة.

4. معايير الإدراج

يتم استثناء الخاضعين من المشاركة في التجربة لم تنطبق عليهم أيٍ من معايير الإدراج التالية:

المَعايير

1. إذا كان لديهم تاريخ من مرض ورمي أو مرض دموي (أمراض نخاعية تكاثرية myeloproliferative disease أو سرطان الدم leukemia أو متلازمة خلل التنسج النخاعي myelodysplastic syndrome).

2. الخاضعين الذين لديهم ارتفاع في ضغط الدم hypertension غير المنتظم (والذي يتم تحديده بأنه ضغط دم > 180 مم زئبق / 110 مم زئبق في أكثر م مناسبة).

3. أنواع فشل القلب heart failure المتعددة (New York Heart Association Stage IV).

4. المرضى الذين لديهم عدم انتظام في ضربات الدم الخبيثة malignant ventricular arrhythmias أو الذبحة الصدرية غير المستقرة unstable angina.

5. المرضى الذين تم تشخيص بأن بهم جلطة الأوردة العميقة deep vein thrombosis في مدة ثلاثة أشهر قبل الفحص.

6. العدوى الفعالة أو الغرغرينا gangrene التي توجد في نفس اليوم من الإعطاء الخاص بريكساميلوسيل-T الذي تم التخطيط للإعطاء فيه.

7. العلاجات المصاحبة بما في ذلك العلاج بالأكسجي تحت الضغط hyperbaric oxygen therapy والمواد الفعالة للأوعية vasoactive substances ومثبطات سيكلوأوكسيجيناز-2 cyclooxygenase-2 (Cox-II).

8. مؤشر كتلة الجسم Body Mass Index (BMI) > 40 كجم 2.

9. المرضى الذين تم بهم تشخيص إدمان الكحول alcoholism في زمن الإدراج.

10. اعْتِلاَلُ الشَّبَكِيَّةِ التَّكاثُرِيّ Proliferative retinopathy

11. المرض المصاحب الذي يؤدي إلى نقص توقع الحياة إلى < عام واحد.

12. والتهاب الكبد الوبائي Hepatitis B B أو التهاب الكبد الوبائي Hepatitis C C

13. الأشخاص الذين كانوا غير راغبين أو غير قادرين على الالتزام بكافة جوانب البروتوكول.

14. فشل القلب أو جزء الطرد لـ < 30٪.

15. السكتة الدماغية Stroke أو احتشاء عضلة القلب myocardial infarction في الأشهر الثلاثة التي تسبق زيارة الفحص.

16. فقر الدم Anemia (الهيموجلوبين hemoglobin <10 جم / ديسي لتر).

17. نقص الكريات البيضاء Leukopenia

18. قلة الصفائح الدموية Thrombocytopenia

19. المرأة الحامل أو المرأة في سن الإنجاب والتي لا تستخدم وسائل منع حمل كافية.

20. الخاضعين الذين يشاركون في التجربة الإكلينيكية في مدى ثلاثة أشهر قبل الفحص للتجربة المذكورة.

5. المرضى الذين تتم إزالتهم من الدراسة

يمكن إزالة الخاضعين من التجربة لأيٍ من الأسباب التالية:

• الفشل في تحقيق التركيز النهائي الخاص بمعلق الخلية بالاعتماد على النتائج عند التوزيع العشوائي. في تلك الحالة فإن بي آى PI يجب أن يقرر ما إذا كانت المنتج قد تم إعطاؤه.

• وجود تأثيرات جانبية مصلية بين فترة الموافقة الخطية على تاريخ الإعطاء الذي تم التخطيط له.

• الإخلال الكبير بالبروتوكول. التوزيع العشوائي التالي للخاضعين الذين فشلوا في الوفاء بمعايير الدخول في البروتوكول أو الذين لم يلتزموا بمتطلبات البروتكول والذين استمروا في المشاركة والذين لديهم خطوة غير مقبولة بالنسبة لصحة المرضى.

• الخاضع الذي تعرض لتأثير جانبي أو حالة المعالجة المسبقة التي تتطلب الإنهاء المبكر بسبب أن الاستمرار في التجربة يفرض مخاطرة غير مقبولة على صحة المريض أو أن الخاضع ليس لديه النية في الاستمرار بسبب التأثير الجانبي أو حالة معالجة مسبقة.

• الانسحاب الطوعي. عند رغبة الخاضع (أو الخاضع المقبول من الناحية القانونية) في الانسحاب من الدراسة.

• تم فقده أثناء المتابعة المريض الذي لا يعود إلى العيادة الإكلينيكية وقد فشلت محاولات الاتصال به. ويتم توثيق محاولات الاتصال بالمريض. إذا انسحب المريض من التجربة فإن كل الإجراءات التي تم وضعها خاصة بزيارة الإنهاء المبكرة يتم إجراؤها، إذا أمكن.

وطبقاً للممارسة الإكلينيكية الجيدة فإن كل الخاضعين الذين انسحبوا من التجربة يتم التوصية لهم بمعالجة بديلة. إذا كان الانسحاب نتيجة حدوث تأثيرات جانبية كبيرة فإن الخاضعين يمكن أن تتم

مراقبتهم بواسطة الفاحص أو لكي يتم الإكمال، أي، حتى يتم حل تأثير جانبي أو حتى يتم تحديد الحالة المستمرة. يتم تسجيل السبب الرئيسي للتوقف عند التجربة في نموذج تقرير الحالة Case Report Form (CRF).

6. المعالجات التي يتم إعطاؤها

منتج الفحص

وتحت التخدير الموضعي، والمهدئات يكون حجم نخاع العظم (من 90-420 مل) وتم تجميعه بواسطة عمليات سفط تتابعية من العرف الحرقفي. تم تجميع نخاع العظم في كيس ناقل transfer bag يشتمل على محلول محلول سترات ديكستيروز أ في شكل مضاد التخثر في نسبة حجمية من 1: 5 (انظر النقطة 1 أعلاه).

تم الحصول على معلق من خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام بواسطة الطرد المركزي المتدرج الكثافة density gradient centrifugation بدون تعديلات أو بإضافة أي منتج مشابه لكي يتم التأثير على الوظائف البيولوجية.

يتم إعطاء معلق الخلية عند جرعة منفردة من

- 1×10^{8} خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام.
- 5×10^{8} خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام.
- 1×10^{9} خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام.

يتم إعطاء معلق الخلية باستخدام قثطرة شريانية داخلية. تمت المعالجة بالكانيولا للشرايين intra-arterial catheter الخاصة بالطرف المستهدف من خلال المسار عبر الفخذ وباستخدام قثطرة سلكية ببالون wire catheter balloon (تمت تهيئتها بالنسبة للقطر المأبضي popliteal diameter) والتي يتم تقديمها بصورة بعيدة ما أمكن في الحالات أسفل الركبة knee ويتم تثبيتها بالقرب من الآفات الوعائية الانسدادية occlusive vascular lesions وبصورة طبيعية عند الجزء الفخذي البعيد distal femoral أو المأبضي من الشريان popliteal artery. وعند تلك النقطة، فإن البالون يتم نفخه لكي تتم إعاقة الدم من التدفق ويتم تسريب معلق الخلية من الاختراع ببطء لمدة ثلاثة دقائق (دقيقة). وبعد الإعطاء، فإن البالون يتم تفريغ النخف الخاص به وتم استعادة تدفق الدم تدريجياً.

تم إجراء الإعطاء الخاص بمعلق الخلية من الاختراع بين ثلاثة خمسة ساعات بعد تجميع نخاع العظم بواسطة مختص الأوعية (مختص الأشعة التداخلية interventional radiologist أو جراح

الأوعية vascular surgeon) ويتم توصيلها بصورة مباشرة إلى وحدة العلاج الخلوي cell therapy unit.

تمت معالجة كل الخاضعين بإتباع معايير الرعاية القياسية الخاصة بأمراض الأوعية الدموية الشديدة والتصلب كما تم وصف ذلك بواسطة Trans-Atlantic Inter-Society Consensus II treatment guidelines.

7. التغيير في تصنيف رذرفورد

يشتمل إقفار الطرف الحرج على المرضى الذي بهم ألم في الراحة الطرفية السفلى أو التقرحات المتعلقة بالإقفار أو الغرغرينا الثانوية إلى الشديدة التي تم توضيحها في تدفق الدم في الأطراف المتأثرة والتي تستمر لأكثر من أسبوعين. تم إجراء التصنيف الخاص بمرض الشريان المحيطي للخاضعين من خلال التجربة ومن خلال مختصي الأوعية باستخدام درجات روثرفورد خلاف الفئات وذلك بسبب أن اختبار تمرين جهاز المشي لا تنفيذه وبالتالي من غير الممكن أن يتم التمييز بصورة جيدة بين العرج المتقطع المتوسط والمعتدل والشديد.

تم تعريف عرج متقطع (الدرجة I، الفئات 1-3) في شكل ألم عضلي شديد extremity muscle pain أو عدم راحة أو ضعف والذي يتم حثه بواسطة التمارين (يتم إنتاجه من خلال نشاط المشي أو النشاط العضلي) ويتم تركه بصورة مؤقتة بواسطة توقف الحركة على عكس الألم عند الراحة والذي يستمر في المرضى المصابين بالإقفار الطرفي الحرج.

تم استخدام درجة رذرفورد عند صفر لكي يتم تحديد الخاضعين الذين ليس لديهم أية أعراض أو بالكاد لديهم إحساس بالبرودة أو لديهم علامات إكلينيكية أو أمراض انسدادية أو تناقض نبض متواضع.

يتم تضمين القرحة الإقفارية غير القابلة للعلاج والتي يكون بها تسريب شرياني غير كافي في الطرف السفلي لكي يتم دعم الاستجابة الالتهابية inflammatory response المطلوبة لتضميد الجرح. وفي ارتباط مع ذلك، هناك دائماً ألفة في الراحة وهناك دليل هام خاص بالإقفار التبادلي المشتت diffuse pedal ischemia (الإقفار الطرفي الحرج روثرفورد الدرجة III-IV، فئات 5-6).

أوضح ألم الراحة الإقفاري Ischemic rest pain وجود إقفار تبادلي مشتت (الدرجة II-IV الفئات 4-6) والتي لا يمكن التحكم فيها بواسطة التخدير. يكون الألم موضعياً في مقدمة القدم وفي الأسابيع أو بالقرب من الآفات الإقفارية البؤرية focal ischemic lesions. يتم جعل المرض في

صورته الأسوأ من خلال رفع الطرف. ويرتبط نقص التروية المنتشر عند الضغط على القدم مع ألم البطانية الإقفاري مع ضغط الكاحل <40 مم زئبق ومؤشر الكاحل العضد <0.8.

يتم تصـــنيف المريض بالاعتماد على وجود ألم الراحة الإقفاري (مع أو بدون تقرحات إقفاريه غير قابلة للالتئام)، وألم إقفاري في العضـلة بما في ذلك الألم الناتج عن التمارين أو المرض الذي ليس له أعراض. وليك يتم تصـنيف الخاضـعين فإن الأعراض الإكلينيكية يتم دمجها مع دلائل خاصـة بالأعراض الخاصـة بإقفار القدم عند الضـغط عليها خلال قياس مؤشـر الكاحل العضـد (إذا تم الاختبار المعتمد عليه لذلك).

تم تقييم التغيير في تصنيف رذرفورد من القيمة الأساسية حتى الأشهر 1، 3 و6 و9 و12.

تم تحديد التجربة الإكلينيكية في شـكل التحسـين في درجة روثرفورد الفردية (الفئة) من القيمة الأساسية. تم تحديد التحسن ذي الصلة الإكلينيكية ف شكل التغير في تصنيف رذرفورد لـلإقفار الطرفي الحرج في الفئة 4 أو 5 للفئة عرج متقطع أو أقل وعند 3 أو 6 أو 9 أو 12 شـهراً بعد إعطاء ركسيميلوسيل-T.

8. التغيير في عدد التقرحات وحجم القرحة.

كان حجم القرحة الأكبر في الطرف السفلي المستهدف وأيضاً العدد الإجمالي من التقرحات في كل رجل قد تم تسـجيله في نموذج تقرير الحالة. تم اختبار التئام التقرحات والتغييرات في حجم القرحة من القيمة الأساسية حتى الأشهر 1، 3 و6 و9 و12.

9. تَكَوُّن الأَوعِيَة

تم اختبار تكون الأوعية عند الشـهر 6 بعد إعطاء معلقة الخلية من الاختراع من خلال تقييم اللجنة المشكلة بواسطة اثنين من أخصـائي الأشـعة التداخلية الذين يقومون بإجراء تقييم مستقل ومجهول من خلال مقارنة المخطط الوعائي عند القيمة الأسـاسـية الذي تم إجراؤه قبل المعالجة مع المخطط الوعائي الذي يتم بعد 6 أشهر من إعطاء ريكسيميلوسيل -T.

يتم الأخذ في الاعتبار لتكوين الأوعية إذا وُجد النمو الطولي في الشـرايين من قبل ووجد النمو العرضـي في الشـرايين القبلية الذي قد تمت زيادته في عدد الأوعية الدموية الجانبية مع الزيادة في عدد الأوعية الدموية الجانبية وزيادة في الحجم و/أو الكثافة الخاصـة بالأوعية الدموية الجانبية مع الزيادة في الحجم و/أو الكثافة الخاصـة بالأوعية المأبضـية الداخلية infra-popliteal vessels الأساسية.

10. عمليات البتر الرئيسية Major amputations (الطرف المستهدف).

يتم الأخذ في الاعتبار لعملية البتر الرئيسية في شكل عملية بتر خاصة بالطرف المنخفض أعلاه الخاص بالكاحل ankle.

11. التغيير في مؤشر الكاحل العضد

يتم تعريف مؤشر الكاحل العضد بأنه نسبة ضغط الدم الانقباضي المقاس عند الكاحل إلى ذلك المقاس في الشريان العضدي. يتم توجيه الخاضع بأن يستريح في وضع الاستلقاء لمدة 5 إلى 10 دقائق، مع الراحة ووضع القدم والكعبين على دعامة في الغرفة وعند درجة حرارة من 19 درجة مئوية –22 درجة مئوية. تم اختيار الضغط عند الكفة المناسبة للدم بحيث يتم قياس ضغط الدم في كل من الكاحل والذراع. وبالنسبة لكل من الكاحل والذراع فإن الكفة يتم وضعها حول الطرف باستخدام طريقة اللف على التوالي. تم استخدام مسبار دوبلر Doppler probe من 8 إلى 10 ميجا هيرتز وتم وضع هلام الدوبلر Doppler gel على المستشعر sensor. تم أيضاً استخدام مسبار الدوبلر لكي يتم اكتشاف تدفق الدم العضدي brachial blood flow أثناء قياس ضغط الذراع arm pressure. يتم قياس ضغوط الدم الانقباضية brachial systolic pressures في العضد لكل من الأذرع وفي عظام الساق الخلفية posterior tibial وعظام الساق الأمامية anterior tibial بالنسبة للضغط الانقباضي من الطرف محل الاهتمام.

إن التغيير في مؤشر الكاحل العضد من خط القاعدة إلى الأشهر من 1 و3 و9 و12 قد تم تسجيله في الخاضعين والذين يمكن أن يتم لديهم اختبار ضغط الكاحل.

12. التغيُر في ضغط الأكسجين عبر الجلد

إن التأكسج عبر الجلد وضغط الأكسجين عبر الجلد يكون عبارة عن مقياس غير شامل موضعي خاص بعكس مقدار الأكسجين الذي به تشتيت من المستشعرات خلال البشرة. تم قياس ضغط الأكسجين عبر الجلد باستخدام TCM3(Radiometer Medical ApS, Copenhagen, Denmark). تم تقييم التغيير في ضغط الأكسجين عبر الجلد من القيمة الأساسية إلى الأشهر 1 و3 و6 و9 و12.

13. تعريفات التأثيرات الجانبية

تم تعريف التأثيرات الجانبية في شكل أي تعبير غير مطلوب يحدث للخاضع أثناء التجربة سواء أكان هناك مرتبطاً أو غير مرتبط بالمنتج الخاص بالفحص. يمكن أن يكون التأثير الجانبي بالفعل

عبارة عن علامة غير جيدة وغير مقصـــودة (بما في ذلك الاكتشـــاف المعملي غير الطبيعي)، مع الأعرض أو مع المرض المرتبط بصـــورة مؤقتة مع اســـتخدام المنتج الطبي (الخاص بالتشـــخيص) ســـواء أكان ذلك أو لم يكن مرتبطا مع المنتج الطبي (القابل للفحص). ويشـــمل ذلك تفاقم الحالات الموجودة مســـبقاً أو داخل المرض الحالي أو التفاعل أو البطء الكبير الخاص بالتوضـــيحات تحت عمليات الفحص والتي لا يتم تســـجيلها في مكان آخر في نموذج تقرر الحالة تحت تقييمات الفالية الخاصـــة. إن التأرجحات المتوقعة فيما يتعلق بالحالات الموجودة مســـبقاً والتي تشـــتمل على أن المرض تحت الدراسة لا يمثل تفاقماً إكلينيكياً كبيراً أو تطور الحالة للأسوأ والذي لا يتم اعتباره بأنه التأثيرات الجانبية.

تم توثيق البيانات التالية لكل التأثير الجانبي:

- وصف حالة الأعراض
- النصيف "خطير" أو "غير خطير".
- الشدة: معتدل (التأثير الجانبي والذي يتم تحمله بصورة أسهل بواسطة الخاضعين وعدم الراحة عند الحد الأدنى لها).

ولا يتداخل مع الأنشطة اليومية)، مع عدم الفعالة المتوسط (يكون بالتأثير الجانبي بصورة كافية غير ريح للتداخل مع الأنشطة اليومية؛ ويمكن أن يكون التداخل مطلوباً)،

الشديد (هو التأثير الجانبي الذي يمنع القيام بالأنشطة اليومية، مع المعالجة أو التداخلات الأخرى والتي تكون مطلوبة بصورة طبيعية).

- تاريخ الحدوث والزمن الخاص بالتباين (إذا كان ذلك مطبقاً).
- الإجراء المتخذ: أي إجراء أو عدم الانتظام المســـتمر عن علاج التجربة أو الأخذ الخاص بدواء مصاحب أو التحكم في المعالجة غير الدوائية الخاصة بالمعالجة في المستشفى / الاحتجاز الطويل في المستشفى (التأثير الجانبي الخطير).
- العلاقة السببية. تم تشغيل كل جهاز بواسطة الفاحص لكي يتم اختبار العلاقة الخاصة بـــالتأثير الجانبي، إذا وجدت مع ريكسميلوسيل-T. يتم تقييم السببية باستخدام فئات المتابعة.

- وعلى نحو غير مشـــابه إذا كان هناك دليلاً صـــغيراً يتعلق باقتراح علاقة ســـببية (على ســـبيل المثال، علاقة حدثت ولا لم تحدث في الفترة الزمنية المعتادة بعد إعطاء ريكســـميلوســـيل-T أو إذا كان هناك تفســـير مناســـب آخر خاصـــاً بالحالة (على ســـبيل المثال، الحالة الإكلينيكية الخاصـــة

بالخاضع أو المعالجات المصاحبة). وإذا كان ذلك ممكناً وقد وجد دليل يقترح احتمالية وجود علاقة سببية (على سبيل المثال، بسبب الحالة التي تحدث في زمن معين بعد الإعطاء الخاص بريكسميلوسيل-T، وعلى الرغم من ذلك فإنه يمكن أن تسهم ظروف أخرى في تلك الحالة (على سبيل المثال، الحالة الإكلينيكية للخاضع أو العلاجات المصاحبة الأخرى. وبصورة محتملة إذا كان هناك دليلاً يقترح وجود علاقة سببية فيكون التأثير الخاص بالعوامل الأخرى غير مؤكد أيضاً.

-وعلى نحو مؤد إذا كان هناك دليلاً واضحاً باقتراح علاقة سببية فإن الإسهام المحتمل الخاص بالعوامل الأخرى يمكن استبعاده.

- غير قابل للقراءة، إذا كان هناك عدم إمكانية أو وجود دليل غير كامل لإجراء القياس الإكلينيكي على العلاقة السببية.

• النتيجة الخاصة بالحالة (غير المعروفة وغير المستخلصة والتي لم تتم استعادتها بعد تعافي العقابيل،

الوفاة (مع التاريخ والسبب الذي تم تقريره)).

14. تعريف التأثيرات الجانبية الشديدة

تم تعريف التأثير الجانبي الخطير بأنه التأثير الجانبي الذي يفي بواحدة أو أكثر من معايير النتيجة الخطيرة التالية:

- ينتج عنها الموت

- مهددة للحياة.

- تتطلب المكوث بداخل المستشفى أو المدة الطويلة للمكوث بداخل المستشفى في المستشفيات الموجودة.

- ينتج عنها إعاقة دائمة أو شديدة أو العجز.

- وجود تشوهات خلقية أو عيوب مولود بها.

- أن يكون هناك حالة طبية هامة والتي بالاعتماد على القياس العلمي والطبي يمكن أن تؤدي لإتلاف التدخل المطلوب للخاضع لمنع واحدة أو أكثر من النتائج المذكورة أعلاه.

يتم اعتبار التأثير الجانبي بأنه مهدد للحياة إذا كان الخاضع يتعرض لخطورة الموت عند زمن تلك الحالة. لا يتم اعتباره بأنه حالة نظرية ويمكن اسن يتم استخدامها والتي يمكن أن تسبب الموت إذا كانت أكثر شدة.

المثال رقم 2: النتائج

1. التغيير في تصنيف رذرفورد

يكون التغيير في فئة رذرفورد لـــــمرض الشـــريان المحيطي في الخاضـــعين في عينة المقارنة والخاضـعين الذين تمت معالجتهم بمعلق الخلية من الاختراع عند القيمة الأساسية وذلك بعد 3 و6 و9 و12 شهر وقد تم عرض ذلك في الجدول رقم 7 التالي.

وعند الزيارة الأساسية، فإن الخاضـعين في معلق الخلية من الاختراع تمت معالجتهم تم تصـنيفهم بـأن بهم فئـة روثرفورد رقم 4 (الـدرجـة II) أو فئـة روثرفورد رقم 5 (الـدرجـة III) ()٪44(20 والخاضعين وبهم 25 (56٪) من الخاضعين على الترتيب. أوضحت النتائج أنه وفي مدة الـــ 12 شـهراً الأولى فإن معظم الخاضـعين تمت معالجتهم بمعلق الخلية من الاختراع وقد حققوا اسـتجابة ذات صـلة كما هو موضـح من خلال التحسين، أي تم تقليل التصـنيف الخاص بفئات رذرفورد من 0-3 (الدرجة 1 و1) في 28 (68٪) من الخاضعين.

الجدول 7

تصـــنيف روثرفورد عند القيمة الأســـاســـية وعند الشـــهر 3، 6، 9 و12 شـــهراً بعد إعطاء ريكسيميلوسيل-T

الفئة	الدرجة	عينة المقارنة (n، ٪)	الجرعة الأكثر انخفاضاً $1 x 10^8$ خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	الجرعة المتوسطة $5 x 10^8$ خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	الجرعة الأعلى $5 x 10^9$ خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	كل الخاضعين الذين تمت معالجتهم (n، ٪)
القيمة الأساسية						
0	0	0	0	0	0	0
3-1	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
الإجمالي		15	15	15	15	45
3 -أشهر						
0	0	0	0	0	0	0
3-1	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
الإجمالي		14	15	15	15	45
6 -أشهر						
0	0	0	0	1(7)	0	1(2)
3-1	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
الإجمالي		12	15	15	15	45
9 -أشهر						

0	0	0	0	0	0	0
24(57)	7(47)	8(57)	9(69)	1(8)	I	3-1
6(14)	2(13)	2(14)	2(15)	7(58)	II	4
12(29)	6(40)	4(29)	2(15)	3(25)	III	5
0	0	0	0	1(8)	IV	6
42	15	14	13	12	الإجمالي	
12 -شهراً						
2(5)	0	2(14)	0	0	0	0
26(63)	7(50)	9(64)	10(77)	2(18)	I	3-1
7(17)	5(36)	2(14)	0	5(46)	II	4
6(15)	2(14)	1(7)	3(23)	4(36)	III	5
0	0	0	0	0	IV	6
41	14	14	13	11	الإجمالي	

الاختصـــارات: BMNCs = خلايا وحيدة النواة مشـــتقة من نخاع العظم Bone marrow-derived mononuclear cells

5 وبعد الإعطاء بثلاثة أشـــهر فقد أوضـــح 15(33٪) من الخاضـــعين الذين تمت معالجتهم بمعلق الخلية من الاختراع و12 (40٪) من الخاضـــعين في المجموعات ذات الجرعة المتوســـطة والعالية أنهم لم يعودوا يعانون من مرض الراحة أو فقد النسيج وقد تم تصنيفهم في درجات روثرفورد الفئة 0 -3 (الدرجة 0 و1) وقد تمت زيادتهم إلى 21 (46٪) من الخاضـــعين و24 (57٪) و28 (68٪) عند معدلات الإعطاء من 6، 9 و12 شـــهراً بعد الإعطاء على الترتيب. بالنســـبة للخاضـــعين في

المجموعات المتوسطة وعالية الجرعة هناك 13 (43٪)، و15 (50٪) و18 (64٪) يكونون عند معدلات إعطاء من 9 و12 شهراً بعد الإعطاء، على الترتيب. تمت مقارنة ذلك بصورة جيدة مع مجموعة المقارنة والتي كان بها 0 (0٪)، 1 (8٪) و1 (8٪)، و2 (18٪) من الخاضعين قد تحسنت لديهم فئة روثرفورد من 1-3 (الدرجة I) بعد 3، 6، 9 و12 شهراً على الترتيب.

وقد قام أحد الخاضعين المسجلين في مجموعة عينة المقارنة بسبب الموافقة المكتوبة بعد التقسيم العشوائية ومات آخر نتيجة مرض قلبي وعائي قبل 6 أشهر من زيارة المتابعة، وقد خضع أحد المرضى لعملية بتر كبيرة قبل 6 أشهر من زيارة المتابعة وتم فقد أحد الخاضعين في المتابعة قبل الزيارة المحددة في الشهر رقم 12. وقد خضع اثنين من المرضى في مجموعة الجرعة المنخفضة من ريكسيميسوسيل -T إلى البتر الرئيسي بعد ستة أشهر من الإعطاء في الطرف المستهدف.

وبالتالي فقد أوضح عدد إجمالي من 28 خاضعاً من 45 (62٪) من الخاضعين في معلق الخلية من الاختراع من مجموعة المعالجة عند 12 شهراً بعد الإعطاء ومنهم 18 مريضاً (63٪) في مجموعة الجرعة المتوسطة ومجموعة الجرعة العالية لم يعرضوا ألم إقفاري عند الجزء المتبقي أو مع تقرحات إقفاريه بالمقارنة مع مجموعات عينة المقارنة 9 من 11 (82٪) من الخاضعين الذين تم تسجيل أن لديهم ألم في الراحة أو وجود تقرحات إقفاريه غير ملتئمة 4 (36٪) من الخاضعين).

وعندما يتم تطبيق الملاحظة الأخيرة (باستثناء الخاضعين المصابين ببتر طرفي؛ فإن هؤلاء الخاضعين يتم اعتبارهم بأنهم غير مستجيبين)، مما ينتج عنه توضيح أنه خلال 12 شهراً بعد إعطاء معلق الخلية الخاص بالاختراع فإن الاستجابة ذات الصلة الإكلينيكية قد تم تحقيقها كما هو موضح من خلال التقليل في التصنيف الخاص بروثرفورد. الفئة من 0-3 (الدرجة 0 والدرجة I) في 28 (64٪) من كل الخاضعين الذين تمت معالجتهم و18 (63٪) في مجموعات الجرعة المتوسطة والجرعة العالية (انظر الجدول رقم 8 والشكل رقم 2 والشكل رقم 3).

وبعد الإعطاء بثلاثة أشهر من إعطاء ريكسيميلوسيل -T، فقد أوضح 15 خاضعاً (33٪) تم إعطاؤهم ريكسيميلوسيل -T منهم 12 (40٪) في مجموعة الجرعة المتوسطة ومجموعة الجرعة العالية أنهم لم يعودوا يعانون من ألم في الراحة أو فقد في النسيج وقد تم تصنيفهم بأنهم من الفئات 0-3 (الدرجة 0 والدرجة I) وقد تمت زيادتهم إلى 21 (46٪) من الخاضعين و24 (53٪ من الخاضعين بعد الإعطاء من 6 و9 أشهر على الترتيب لكل من المرضى الذين تمت معالجتهم. في مجموعات الجرعات المتوسطة والعالية 14 (47٪9 و15 (50٪) فقد تم تصنيفهم بأنهم فئة

روثرفورد من 0-3 عند الشـــهر 6 و9 على الترتيب. تمت مقارنة ذلك بصـــورة جيدة مع مجموعة المقارنة والتي كان بها 0 (0٪)، وواحد (8٪) و1 (7٪)، واثنين (13٪) من الخاضعين قد تحسنت لديهم فئة روثرفورد من 1-3 (الدرجة I) بعد 3، 6، 9 و12 شهراً على الترتيب.

الجدول 8

5

تصنيف روثرفورد عند القيمة الأساسية وعند الشهر 3، 6، 9 و12 بعد إعطاء ريكسيميلوسيل-T (بما في ذلك مرات البتر والوفيات) -تطبيق الملاحظة الأخيرة

الفئة	الدرجة	عينة المقارنة (n، ٪)	الجرعة المنخفضة 10^8 x1 خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	الجرعة المتوسطة 10^8 x5 خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	الجرعة العالية 10^9 x5 خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	كل الخاضعين الذين تمت معالجتهم (n، ٪)
القيمة الأساسية						
0	0	0	0	0	0	0
3-1	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
بتر		0	0	0	0	0
تمت وفاته		0	0	0	0	0

الإجمالي	15	15	15	15	45
3 -أشهر					
0	0	0	0	0	0
3-1	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
بتر		0	0	0	0	0
تـــمـــت		0	0	0	0	0
وفاته						
الإجمالي	15	15	15	15	45
6 -أشهر					
0	0	0	0	1(7)	0	1(2)
3-1	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
بتر		1(7)	0	0	0	0
تـــمـــت		1(7)	0	0	0	0
وفاته						
الإجمالي	15	15	15	15	45
9 -أشهر					

0	0	0	0	0	0	0
3-1	I	(7)1	(60)9	(53)8	(47)7	(53)24
4	II	(47)7	(20)2	(20)3	(13)2	(18)8
5	III	(27)4	(20)2	(27)4	(40)6	(29)13
6	IV	(7)1	0	0	0	0
بتر		(7)1	(13)2	0	0	(4)2
تـــمـــت وفاته		(7)1	0	0	0	0
الإجمالي		15	15	15	15	45
12 -شهراً						
0	0	0	0	(13)2	0	(4)2
3-1	I	(13)2	(67)10	(60)9	(50)7	(58)26
4	II	(40)6	(7)0	(20)3	(36)5	(18)8
5	III	(33)5	(27)3	(7)1	(14)2	(13)6
6	IV	0	0	0	0	0
بتر		(7)1	(13)2	0	0	(4)2
تـــمـــت وفاته		(7)1	0	0	(7)1	(2)1
الإجمالي		15	15	15	15	45

الاختصارات: BMNCs = خلايا وحيدة النواة مشتقة من نخاع العظم

أوضح الشكل رقم 4 والجدول رقم 9 أن الاستجابة الإكلينيكية ذات الصلة في معظم الخاضعين في مجموعات المعالجة من معلق الخلية من الاختراع قد تمت مقارنتهم مع مجموعة عينة المقارنة عند الإعطاء التالي وعند زيارات المتابعة. وقبل 12 شهراً بعد الإعطاء لريكسيميلوسيل –T فإن معظم الخاضعين في مجموعات ريكسيميلوسيل –T قد أوضحوا استجابة إكلينيكية بالمقارنة مجموعة عينة المقارنة: من 34 (76 ٪) من الخاضعين و (10، 13 و11 خاضعاً في مجموعات ريكسيميلوسيل –T عند الجرعة المنخفضة والمتوسطة والعالية، على الترتيب) في مقابل 2 (13٪) من الخاضعين.

الجدول 9

تصنيف روثرفورد عند 3 و9 و12 شهراً بعد إعطاء ريكسيميلوسيل–T من تطبيق الملاحظة الأخيرة

عينة المقارنة (n، ٪)	الجرعة الأكثر انخفاضاً 1×10^8 خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	الجرعة المتوسطة 5×10^8 خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	الجرعة الأعلى 5×10^9 خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	كل الخاضعين الذين تمت معالجتهم (n، ٪)
3 –أشهر				
الاستجابة	1(7)	5(33)	7(47)	6(40)	18(40)
جرعة الصيانة	13(87)	10(67)	8(53)	9(60)	27(60)
عدم وجود استجابة	1(7)	0	0	0	0
الإجمالي	15	15	15	15	45
6 –أشهر					

الاستجابة	2(13)	10(67)	8(53)	7(47)	25(56)
جـــرعـــة الصيانة	11(73)	5(33)	7(47)	7(47)	19(42)
عـدم وجود استجابة	2(13)	0	0	1(7)	(12
الإجمالي	15	15	15	15	45
9 -أشهر					
الاستجابة	2(13)	11(73)	9(60)	9(60)	29(64)
جـــرعـــة الصيانة	11(73)	4(27)	6(40)	5(33)	15(33)
عـدم وجود استجابة	2(13)	0	0	1(7)	1(2)
الإجمالي	15	15	15	15	45
12 -أشهر					
الاستجابة	2(13)	10(67)	13(87)	12(80)	35(78)
جـــرعـــة الصيانة	12(80)	5(33)	2(13)	3(20)	7(22)
عـدم وجود استجابة	1(7)	0	0	0	0
الإجمالي	15	15	15	15	45

الاختصارات: BMNCs = خلايا وحيدة النواة مشتقة من نخاع العظم

2. التغيُر في عدد التقرحات في الطرف المصاب

إن التغير في عدد التقرحات في الطرف المصاب قد تم عرضه في الجدول رقم 10 وفي الشكل رقم 5. وعند الزيارة الأساسية فقد تم تصنيف 25 خاضعاً (56٪) في مجموعات المعالجة بمعلق الخلية من الاختراع وتم وضع 9 خاضعين (60٪) في مجموعة عينة المقارنة وذل طبقاً لتصنيف روثفورد

5 والتي تم تقديمها مع التقرحات الخاصـــة بالإقفار الذي لا يلتئم. يكون لمعظم الخاضـــعين قرحة واحدة وبالتالي لا يكون هناك أي اختلافات رئيســـية بين مجموعات المعالجة وبين مجموعات المقارنة (5، 7 و6 خاضعين في مجموعات الجرعة المنخفضة والمتوسطة والعالية من معلق الخلية الخاص بالاختراع على الترتيب وفي 6 خاضـعين في مجموعة المقارنة). إن أربعة من الخاضـعين في مجموعة المعالجة بمعلق الخلية بالجرعة المنخفضة، والمتوسطة والعليا من الاختراع (1 و2 من الخاضعين على الترتيب) وخاضع واحد في مجموعة عينة المقارنة يكون بهم ≤ 3 من التقرحات.

على الرغم من أن الحجم المتوسط للقرحة عند القيمة الأساسية ف الخاضعين في مجموعة المعالجة بمعلقة الخلية من الاختراع الحالي كان أكبر من الحجم الموجود في الخاضـــعين في مجموعة عينة المقارنة (39.9 ±23.0 مم في مقابل 26.3 ± 23.5 مم في المجموعات المعالجة ومجموعات عينة المقارنة من الخاضعين على الترتيب) فإن النتائج قد أظهرت أن الخاضعين الذين بهم تقرحات لم تلتئم، قد تم تناقص حجمها (29.7 ± 13.5 مم) بينما كان حجم التقرحات المتوســط قد زاد في مجموعة عينة المقارنة (43.8 ±29.3 مم) (الجدول رقم 11).

الجدول 10

التغيُر في عدد التقرحات في الطرف المصاب

عينة المقارنة (n، ٪)	الجرعة الأكثر انخفاضاً 1x 10^8 خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	الجرعة المتوسطة 5x 10^8 خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	الجرعة الأعلى 5x 10^9 خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	كل الخاضعين الذين تمت معالجتهم (n، ٪)
القيمة الأساسية				
0 قَرْحَة				
1 قَرْحَة	6(67)	5(63)	7(88)	6(67)	18(72)

2 قَرْحَة	2(22)	2(25)	0	1(11)	3(12)
≤3 قَرْحَة	1(11)	1(12)	1(12)	2(22)	4(16)
الإجمالي	9	8	8	9	25
بعد ثلاثة أشهر من إعطاء ريكساميلوسيل -T					
0 قَرْحَة	1(13)	2(25)	2(25)	1(11)	5(20)
1 قَرْحَة	4(50)	4(50)	5(63)	4(44)	13(52)
2 قَرْحَة	1(12)	0	0	3(33)	3(12)
≤3 قَرْحَة	2(25)	2(25)	1(12)	1(11)	4(16)
الإجمالي	8	8	8	9	25
بعد ستة أشهر من إعطاء ريكساميلوسيل -T					
0 قَرْحَة	2(33)	4(57)	3(38)	2(22)	9(38)
1 قَرْحَة	4(67)	1(14)	4(50)	6(67)	11(46)
2 قَرْحَة	0	2(29)	0	0	2(8)
≤3 قَرْحَة	0	0	1(12)	1(11)	2(8)
الإجمالي	6	7	8	9	24
بعد تسعة أشهر من إعطاء ريكساميلوسيل -T					
0 قَرْحَة	2(33)	5(71)	4(50)	4(44)	13(54)
1 قَرْحَة	4(67)	2(29)	3(38)	4(44)	9(38)
2 قَرْحَة	0	0	0	1(11)	1(4)
≤3 قَرْحَة	0	0	1(12)	0	1(4)
الإجمالي	6	7	8	9	24
بعد اثني عشر شهراً من إعطاء ريكساميلوسيل -T					
0 قَرْحَة	2(33)	4(57)	7(88)	7(78)	18(75)
1 قَرْحَة	4(66)	3(43)	0	2(22)	5(21)
2 قَرْحَة	0	0	0	0	0

≤3 قَرْحَة	0	0	1(12)	0	1(4)
الإجمالي	6	7	8	9	24

الجدول 11 حجم القرحة في الطرف المصاب (القطر الأكبر)

عينة المقارنة

حجم القرحة في الطرف المصاب (القطر الأكبر)

	عينة المقارنة (n=15)	الجرعة الأكثر انخفاضاً $1x10^8$ خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n=15)	الجرعة المتوسطة $5x10^8$ خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n=15)	الجرعة الأعلى $5x10^9$ خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n=15)	كل الخاضعين الذين تمت معالجتهم (n=45)
خط الأساس					
N	9	8	7	8	23
المتوسط±	±26.3	±41.5	±31.4	±45.6	±39.9
انحراف معياري standard deviation (SD)	23.5	29.1	19.7	19.2	23.0
3 شهور					
N	5	6	6	7	19

المتوسط±	±21.8	±51.7	±23.7	±27.9	±34.1
انحراف	(17.9	39.7	19.5	12.9	27.4
معياري					
6 أشهر					
N	3	4	5	7	16
المتوسط±	±36.7	±42.5	±24.0	±24.3	±28.8
انحراف	15.3	43.5	19.8	13.7	25.0
معياري					
9 أشهر					
N	3	2	4	5	11
المتوسط±	±26.7	±27.5	±12.5	±23.0	±20.0
انحراف	5.8	17.7	6.5	14.8	13.0
معياري					
12 أشهر					
N	4	3	1	2	6
المتوسط±	±43.8	±31.7	*15.0	±34.0	±29.7
انحراف	29.3	17.6		35.7	13.5
معياري					

* عند 12 شهراً يعرض أحد الخاضعين في مجموعة المعالجة بالجرعة المتوسطة قرحة على الطرف المصاب. وقد تم عرض الحجم الفعلي الخاص بالقرحة.

3. التغير في ضغط الأكسجين عبر الجلد

5 تم عرض التغيير في ضغط الأكسجين عبر الجلد في الجدول رقم 12.

وعند القيمة الأساسية فإن هناك 35 (79٪) من الخاضعين في مجموعات المعالجة من الاختراع بمعلق الخلايا بها ضغط الأكسجين عبر الجلد <40 مم زئبق (12، 12 و11 خاضع في مجموعات الجرعة الثلاث (المنخفضة، المتوسطة، المرتفعة، على الترتيب) بالمقارنة بـ 6 (43٪) من الخاضعين في مجموعة عينة المقارنة.

أظهرت النتائج أن هناك زيارة متابعة قبل 12 شـهر وقد زادت مسـتويات ضـغط الأكسـجين عبر الجلد إلى ≤ مم زئبق.

في معظم الخاضـعين الذين تمت معالجتهم بريكسـيميلوسـيل-)60٪) 24) T من الخاضـعين الذين تمت مقارنتهم بـ 5

5 (46 ٪) من الخاضعين في مجموعة عينة المقارنة.

الجدول 12 التغير في ضغط الأكسجين عبر الجلد

عينة المقارنة

التغير في ضغط الأكسجين عبر الجلد

عـينـة المقارنة (n، ٪)	الجرعة الأكثر انخفاضاً x1 10^8 خلايا أحادية النواة مشـتقة مـن نـخـاع العظام (n، ٪)	الـجـرعـة المتوسـطة x5 10^8 خـلايـا أحـاديـة النواة مشتقة من نخـاع العظام (n، ٪)	الـجـرعـة الأعـلـى x5 10^9 خلايا أحادية النواة مشـتقة مـن نـخـاع العظام (n، ٪)	كـل الخاضعين الـذين تـمـت معالجتهم (n، ٪)
القيمة الأساسية				
TcO2 ≤40 مم زئبق	8(57)	2(14)	3(20)	4(27)	9(21)
TcO2> 40 مم زئبق	6(43)	12(86)	12(80)	11(73)	35(79)
الإجمالي	14	14	15	15	44
بعد ثلاثة أشهر من إعطاء ريكساميلوسيل -T				
TcO2 ≤40 مم زئبق	7(64)	6(43)	6(43)	8(53)	20(47)

TcO2< 40 مم زئبق	4(36)	8(57)	8(57)	7(47)	23(53)
الإجمالي	11	14	14	15	43
بعد ستة أشهر من إعطاء ريكسميلوسيل -T					
TcO2≤ 40 مم زئبق	6(55)	7(47)	5(39)	8(53)	20(47)
TcO2< 40 مم زئبق	5(45)	8(53)	8(61)	7(47)	23(53)
الإجمالي	11	15	13	15	43
بعد اثنا عشر شهراً من إعطاء ريكسميلوسيل -T					
TcO2 ≥40 مم زئبق	5(46)	9(69)	7(54)	8(57)	24(60)
TcO2< 40 مم زئبق	6(54)	4(31)	6(46)	6(43)	16(40)
الإجمالي	11	13	13	14	40

4. تَكَوُّن الأَوعِيَة

تم اختبار تكون الأوعية عند الشهر 6 بعد إعطاء معلق الخلية من الاختراع الحالي. وفي الخاضعين الذين تمت معالجتهم بمعلق الخلية من الاختراع فتم تم عرض التكون الوعائي في 26 (62٪) خاضعاً: 7، 8 و9 من الخاضعين في مجموعات منخفضة ومتوسطة وعالية، على الترتيب (انظر الجدول رقم 13).

الجدول 13 تَكَوُّن الأَوعِيَة

تَكَوُّن الأَوعِيَة

	الجرعة الأكثر انخفاضاً	الجرعة المتوسطة 10^8 x5 خلايا	الجرعة الأعلى 10^9 x5 خلايا	كل الخاضعين الذين

	$1x10^8$ خلايا أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	أحادية النواة مشتقة من نخاع العظام (n، ٪)	تمت معالجتهم (n، ٪)
بعد ستة أشهر من إعطاء ريكسميلوسيل –T				
تَكَوُّن الأَوعِيَة	7(58)	8(62)	9(64)	24(62)
عدم تكوّن الأوعية	5(42)	5(38)	5(36)	15(38)
الإجمالي	12	13	14	39

تم عرض صور التصوير الوعائي من ثلاثة من 24 حالة من حالات التكوين الوعائي والذي يمكن أن يحدث والذي يتم عرضه بالنسبة للقيمة الأساسية في الشكل رقم 6: مع النمو الطولي للشرايين (الشكل رقم 6أ)، والمظهر الخاص بالأوعية الجديدة (الشكل رقم 6ب) والنمو العرضي الخاص بالجزء الجانبي الذي يستهدف الجلد (الشكل رقم 6ج).

5 قائمة التتابع

"أ" المواد

"ب" الاعدادات

"ج" المتغير

"د" الخطوة

10 "هـ" IPC

"و" حجم BM

"ز" مجموعة اعطاء الدم من نوع Terumo

"ح" 200 ميكرومتر

"ط" طقم Biosafe SmartRedux

15 "ي" جهاز SmartRedux Sepax 2.0

"ك" Ficoll-Paque

"ل" طقم الخلية من نوع Biosafe NeatCell

"م" جهاز NeatCell Sepax 2.0

"ن" 4٪ من HAS في المحلول الملحي

"س" المحقنة

"ع" مرشح خاص بالمحنة

"ف" ميكرومتر

"ص" BM

"ق" BC (غلاف مزغب)

"ر" DS: BM-MNC's

"ش" مولار

"ت" وفاة

"ث" تم بتره

"خ" القيمة الاساسية

"ذ" المرى ٪

"ض" عينة مقارنة

"أ1" تمت معالجة الكل

"ب1" جرعة متوسطة

"ج1" جرعة منخفضة

"د1" جرعة عالية

"هـ1" زيارة المتابعة (بالشهور)

"و1" عينة مقارنة (n=15)

"ز1" جرعة متوسطة من ريكسيميبسيل-t (n=15)

"ح1" جرعة منخفضة من ريكسيميبسيل-t (n=15)

"ط1" جرعة عالية من ريكسيميبسيل-t (n=15)

"ي1" قرح

"ك1" من القرح

"ل1" قرحة

"م1" اشهر

"ن1" CMMo/ICPD/2008

"س1" 6ب: اوعية جديدة في المنطقة

"ع1" 6 من شرايين النمو الطوية

"ف1" انبوب الفالكون؟

"ص1" العجلة، 10 دقائق

"ق1" "HAS٪20

5٪من الجلوكوز

محلول رينجر معالج"

"ر1" "10 مل من محلول رينجر

+2.5٪الجلوكوز

+1٪HAS"

"ش1" BM-MNCs:DP

1 ترشيح BM

2 اختزال حجم BM

3 تخصيب MNC

4 x2 مرة غسل

5 الترشيح

6 الطرد المركزي

7 مستحضر السواغ

8 الصيغة

9 الملء/الانهاء

عناصر الحماية

1. معلق خلية cell suspension يشتمل على ما بين 4×10^{8} إلى 1.2×10^{9} من خلايا الدم من الكريات البيضاء white blood cells من نخاع العظم bone marrow من الخاضع البشري حيث أن العدد الإجمالي يمكن أن يكون من 4×10^{8} إلى 1.2×10^{9} من خلايا الدم البيضاء white blood cells:

1) 20٪ إلى 51٪ والذي يكون عبارة عن خلايا لمفاوية lymphocytes، و3.9٪ إلى 22.3٪ عبارة عن خلايا أحادية النواة monocytes؛

2) 1.4٪ إلى 10٪ من الخلايا الجذعية المكونة للدم hematopoietic stem cells والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 34 cluster of differentiation (CD34)؛

3) 25.3٪ إلى 83.3٪ من العدد الإجمالي من خلايا الدم البيضاء white blood cells والتي تكون عبارة عن خلايا وحيدة النواة mononuclear cells؛

4) 16.7 ٪ إلى 74.7٪ من العدد الإجمالي لخلايا الدم البيضاء white blood cells عبارة عن خلايا حُبيبية granulocytes.

5) 5.4٪ إلى 38.8٪ من العدد الإجمالي من خلايا الدم البيضاء white blood cells تعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 4 C-X-C chemokine receptor type (CXCR4)؛

6) 0.07٪ إلى 24.7٪ من العدد الإجمالي من خلايا الدم البيضاء white blood cells تعبر عن مستقبل عامل النمو البطاني الوعائي 2 2 Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR2)؛

7) من العدد الإجمالي هناك خلايا جذعية مكونة للدم hematopoietic stem cells والتي تعبير عن عن مجموعة من التمايز 34 34 cluster of differentiation (CD34)، نسبة 7.7 ٪ إلى 55.5٪ والتي تكون عبارة عن خلايا جذعية مكونة للدم hematopoietic stem cells غير مرتبطة والتي لا تعبر عن مجموعة من التمايز 38 38 cluster of differentiation (CD38) وبها من 0.7 ٪ إلى 10.3٪ من الخلايا الجذعية stem cells التي تعبر عن مستقبل كيموكين C-X-C من النوع 4 4 C-X-C chemokine receptor type (CXCR4)؛ و

8) تكون النسبة عند الحد الأقصى لها من خلايا الدم الحمراء red blood cells إلى خلايا الكريات البيضاء leucocyte cells هي 6.7 ونسبة عند الحد الأقصى لها من الصفائح الدموية platelets لخلايا كريات الدم البيضاء leucocyte cells هي 32؛

حيث يكون معلق الخلية cell suspension للاستخدام في معالجة أو تخفيف مرض الشريان المحيطي peripheral artery disease؛ وحيث يتم اشتقاق معلق الخلية cell suspension من نفس الهدف الذي يهدف إلى استقبال معلق الخلية cell suspension أو يتم اشتقاقه من هدف مختلف يهدف إلى استقبال معلق الخلية cell suspension.

2. معلق الخلية cell suspension طبقاً لعنصر الحماية 1، حيث أن العدد الإجمالي من خلايا الدم البيضاء white blood cells، 32.3٪ إلى 80.0٪ والذي يكون عبارة عن خلايا أحادية النواة mononuclear cells مختارة من قائمة تتكون من الخلايا اللمفاوية lymphocytes والخلايا أحادية النواة monocytes والخلايا الجذعية المكونة اللدم hematopoietic stem cells والتي تعبر عن مجموعة من التمايز 34 cluster of differentiation 34 (CD34) و20.0 ٪ إلى 67.7٪ وتكون عبارة عن خلايا حُبيبية granulocytes.

3. معلق الخلية cell suspension طبقاً لعنصر الحماية 1، حيث أن معلق الخلية cell suspension يشتمل على 5×10^{8} إلى 1.2×10^{9} خلايا الدم البيضاء white blood cells المستمدة من نخاع عظم bone marrow بشري.

4. معلق الخلية cell suspension طبقاً لعنصر الحماية 1، حيث أن معلق الخلية cell suspension يشتمل على 8×10^{8} إلى 1.2×10^{9} خلايا الدم البيضاء white blood cells المستمدة من نخاع عظم bone marrow بشري.

5. معلق الخلية cell suspension لاستخدامه طبقاً لعنصر الحماية 1، حيث أن معلق الخلية cell suspension يشتمل على 9×10^{8} إلى 1.1×10^{9} خلايا الدم البيضاء white blood cells المستمدة من نخاع عظم bone marrow بشري.

6. معلق الخلية cell suspension طبقاً لعنصر الحماية 1، حيث أن معلق الخلية cell suspension يشتمل على 9.5×10^{8} إلى 1.05×10^{9} خلايا الدم البيضاء white blood cells المستمدة من نخاع عظم bone marrow بشري.

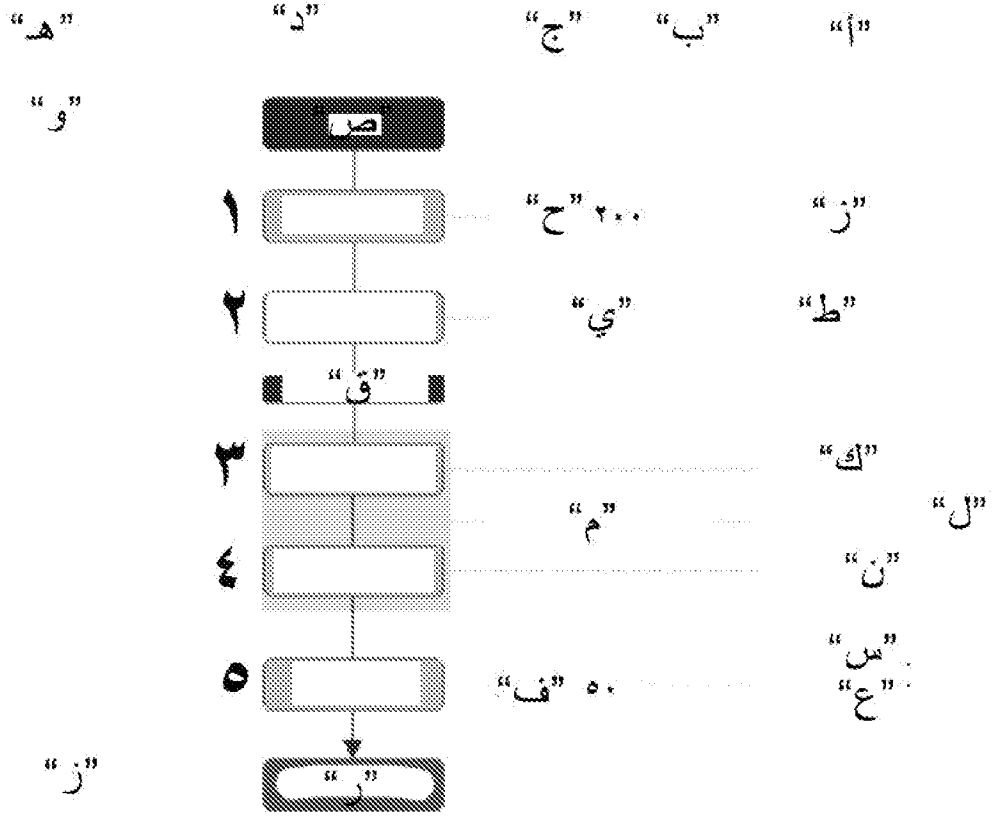
7. معلق الخلية cell suspension طبقاً لعنصر الحماية 1، حيث أن معلق الخلية cell suspension يشتمل على 9.8×10^{8} إلى 1.02×10^{9} خلايا الدم البيضاء white blood cells المستمدة من نخاع عظم bone marrow بشري.

8. معلق الخلية cell suspension طبقاً لعنصر الحماية 1، حيث أن مرض الشريان المحيطي الطرفي extremity peripheral artery disease يكون عبارة عن إقفار طرفي حرج critical limb ischemia.

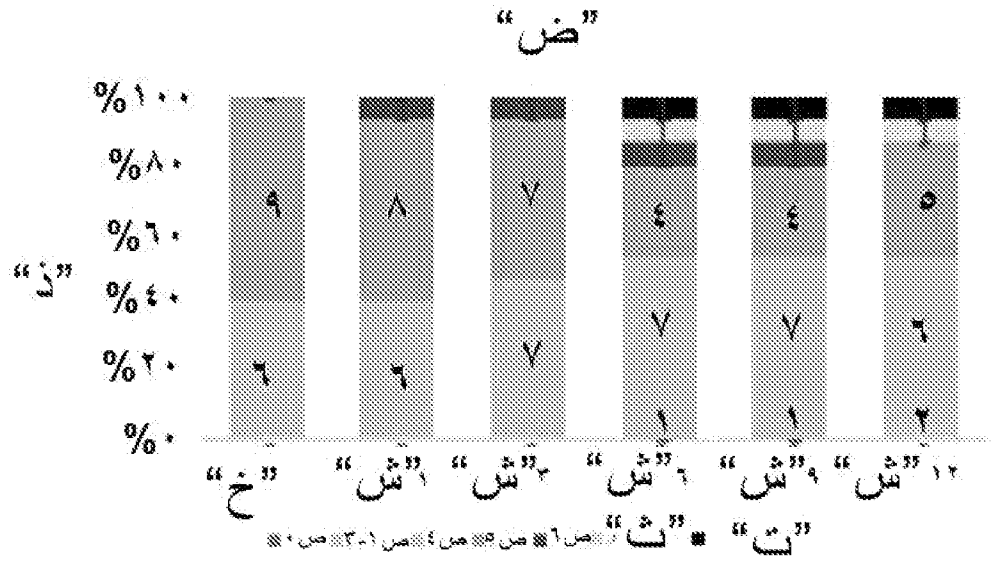
9. معلق الخلية cell suspension طبقاً لعنصر الحماية 1، حيث يتم تعليق الخلايا في معلق الخلايا cell suspension من الاختراع حجم من 5 إلى 30 مل من محلول ملحي معالج بالهيبارين heparinized saline solution، أو محلول رينجر لاكتات lactated Ringer solution ويشتمل على حوالي 1٪ من ألبومين المصل البشري human serum albumin (HSA) وحوالي 2.5٪ من الجلوكوز glucose.

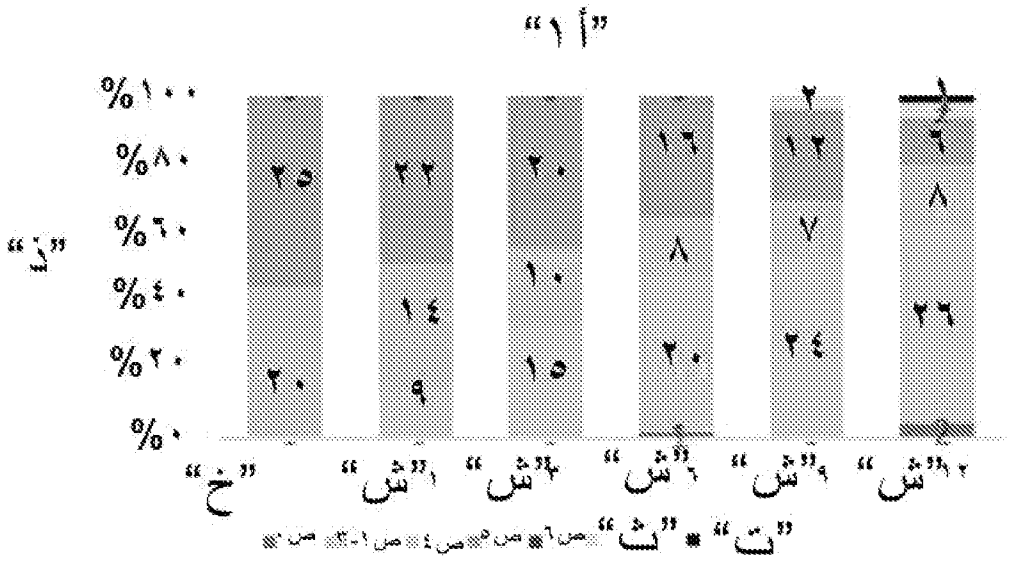
10. واحد أو عدة محقنة/ محاقن مملوءة مسبقًا تشتمل على معلق خلية cell suspension كما تحدد في عنصر الحماية 1.

11. المحقنة/ المحاقن طبقاً لعنصر الحماية 10، حيث أن المعلق يتم توفيره في شكل جرعة منفردة.

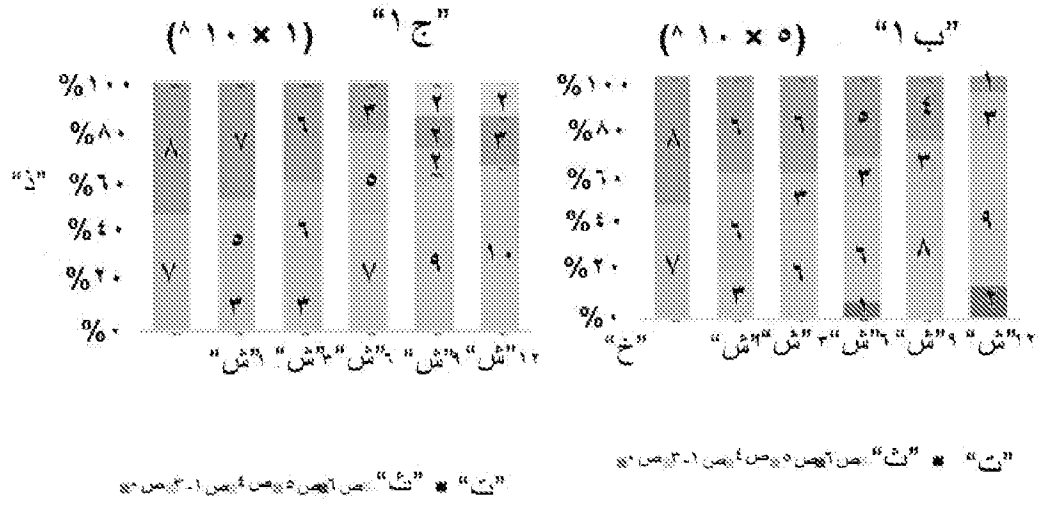


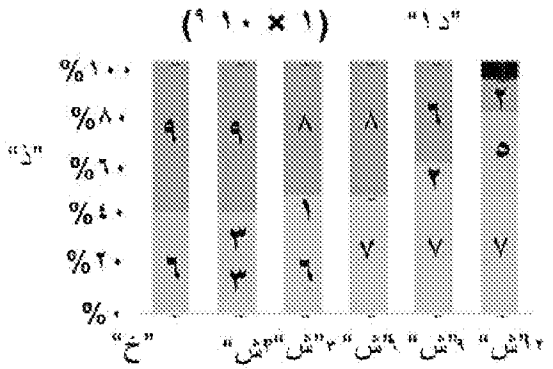
شكل ١


"ض"
%١٠٠
%٨٠
%٦٠
%٤٠
%٢٠
%٠
"ز"
٩
٦
٨
٦
٧
٧
٤
٧
١
٤
٧
١
٥
٦
٢
"خ"
"ش"١
"ش"٣
"ش"٤
"ش"٦
"ش"٩
"ش"١٢
"ت" ■ "ث"

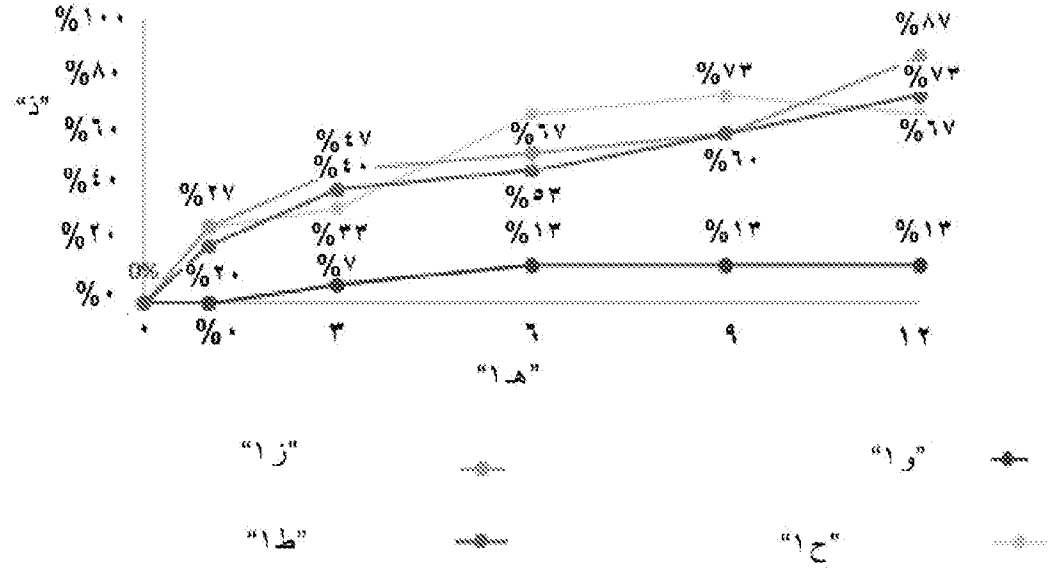

"أ ١"
%١٠٠
%٨٠
%٦٠
%٤٠
%٢٠
%٠
"ز"
٢٥
٢٠
٢٢
١٤
٩
٢٠
١٠
١٥
١٦
٨
٢٠
٢
١٢
٧
٢٤
٦
٨
٢٦
"خ"
"ش"١
"ش"٣
"ش"٤
"ش"٦
"ش"٩
"ش"١٢
"ت" ■ "ث"

شكل ٢

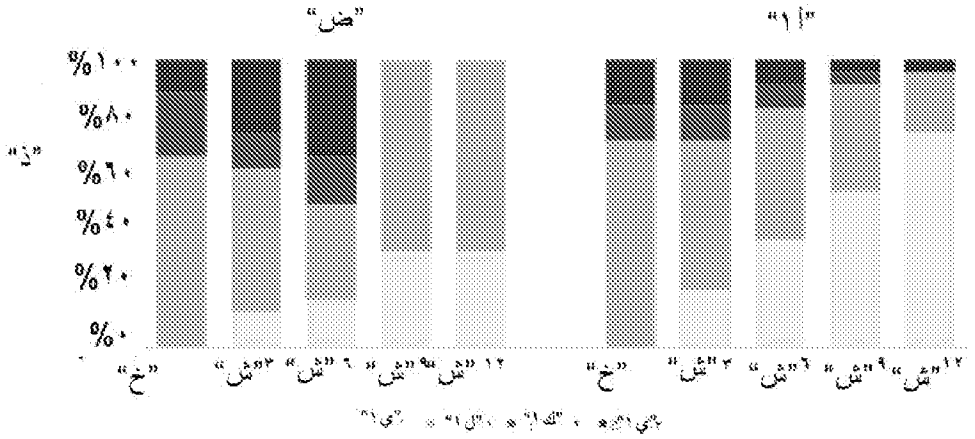

"ب ١" (٥ × ١٠ ^ ٨)
"ج ١" (١ × ١٠ ^ ٨)
%١٠٠
%٨٠
%٦٠
%٤٠
%٢٠
%٠
"ز"
"خ"
"ش ١" "ش ٢" "ش ٣" "ش ٤" "ش ٥" "ش ٦" "ش ٧" "ش ٨" "ش ٩" "ش ١٠" "ش ١١" "ش ١٢"
"ت" * "ث" ص١ ص٢ ص٣ ص٤ ص٥ ص٦


"د ١" (١ × ١٠ ^ ٩)
%١٠٠
%٨٠
%٦٠
%٤٠
%٢٠
%٠
"ز"
"خ"
"ش ١" "ش ٢" "ش ٣" "ش ٤" "ش ٥" "ش ٦" "ش ٧" "ش ٨" "ش ٩" "ش ١٠" "ش ١١" "ش ١٢"
"ت" * "ث" ص١ ص٢ ص٣ ص٤ ص٥ ص٦

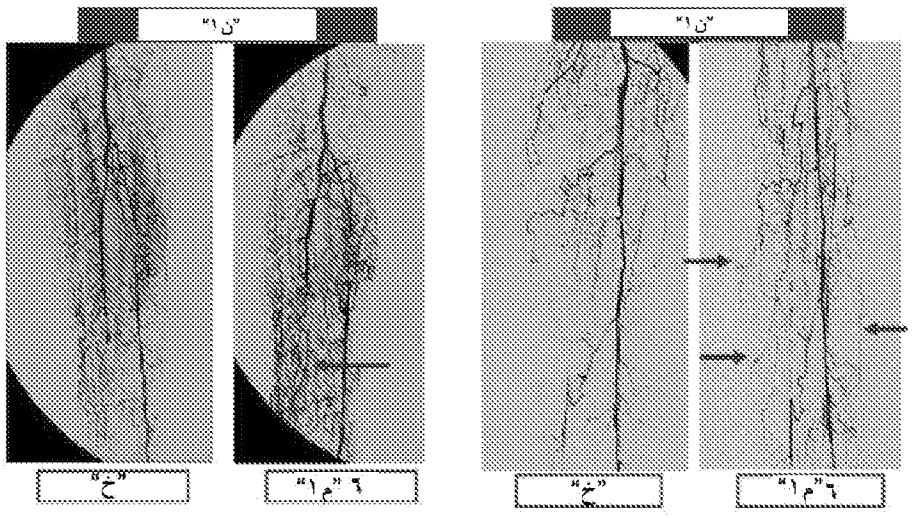
شكل ٣


%١٠٠
%٨٠
%٦٠
%٤٠
%٢٠
%٠
"ز"
٠
٣
٦
٩
١٢
"هـ١"
%٨٧
%٧٣
%٦٧
%٤٧
%٤٠
%٢٧
%٦٧
%٦٠
%٥٣
%٣٣
%٢٠
%٧
%١٣
%١٣
%١٣
%٠
"ز١"
"و١"
"ط١"
"ح١"

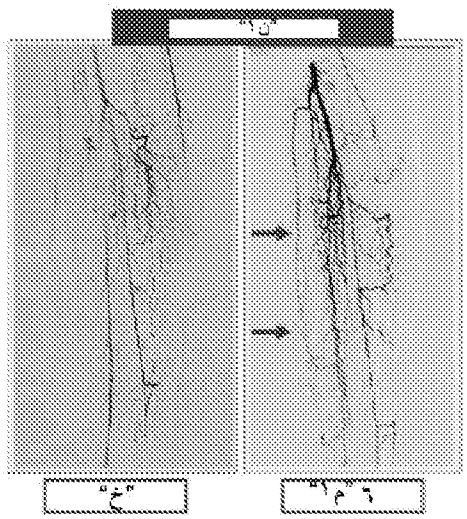
شكل ٤


"ض"
"أ"
%١٠٠
%٨٠
%٦٠
%٤٠
%٢٠
%٠
"ز"
"خ"
"ش٣"
"ش٦"
"ش٩"
"ش١٢"
"خ"
"ش٣"
"ش٦"
"ش٩"
"ش١٢"

شكل ٥

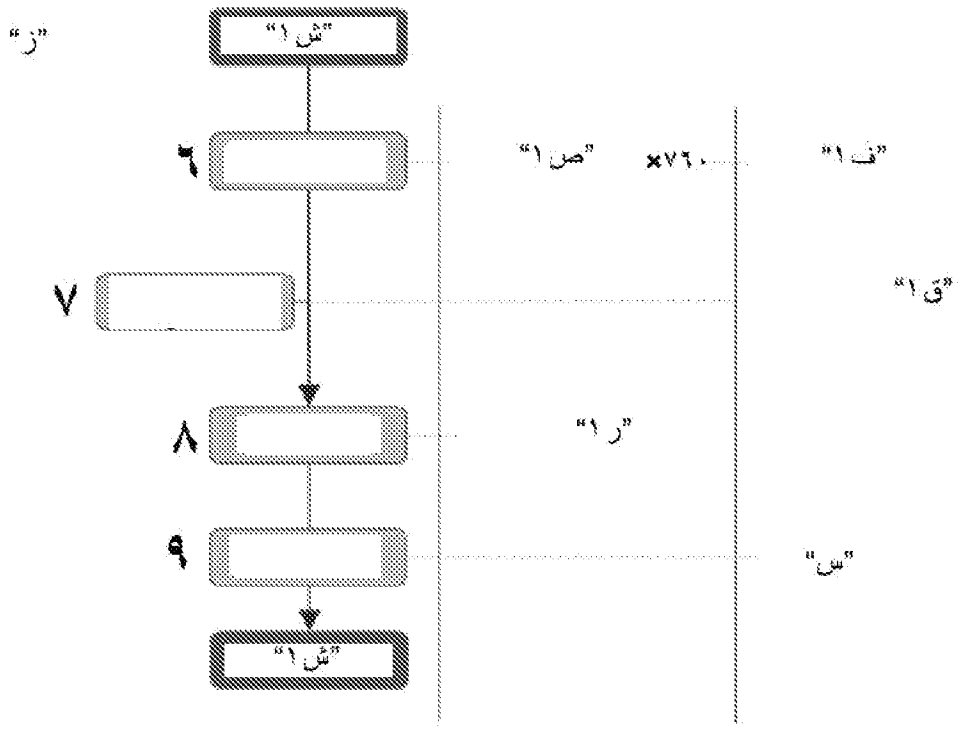


"خ" "س١"



ج٦

شكل ٦



شكل ٧

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشـرط تسـديد المقابل المالي السـنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سـقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية.

صادرة عن

الهيئة السعودية للملكية الفكرية

ص ب ٦٥٣١ ، الرياض ١٣٣٢١ ، المملكة العربية السعودية

SAIP@SAIP.GOV.SA