УКРАЇНА

(19) UA (11) 129616 (13) C2

(51) МПК
C12N 5/078 (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
A61K 35/15 (2025.01)
A61K 35/17 (2025.01)
A61P 9/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ "УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2019 02885**

(22) Дата подання заявки: **28.08.2017**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **19.06.2025**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **16382405.5**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **26.08.2016**

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

(41) Публікація відомостей про заявку: **10.07.2019, Бюл.№ 13**

(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **18.06.2025, Бюл.№ 25**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/EP2017/071580, 28.08.2017**

(72) Винахідник(и):
Дьюпере Джонатан Роберт Барклей (ES),
де Йонг Лізбет (ES),
Вагена Едвін Дж (ES)

(73) Володілець (володільці):
СЕРВІСІО АНДАЛУЗ ДЕ САЛУД,
Avda. de la Constitucion, 18, 41071 Sevilla, Spain (ES),
ФУНДАСІОН ПУБЛІКА АНДАЛУЗА ПРОГРЕСО І САЛУД,
Avda. Américo Vespucio, 15, Edificio S2., Parque Científico y Tecnológico Cartuja, 41092 Sevilla, Spain (ES)

(74) Представник:
Бочаров Максим Анатолійович

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 2011076255 A1, 31.03.2011
Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy / H. Lawall, P.Bramlage, B. Amann // Journal of vascular surgery. – 2011. – Vol. 53 (2). – P. 445-453
Platelet-to-lymphocyte ratio: a novel marker for critical limb ischemia in peripheral arterial occlusive disease patients / Th. Gary, M. Pichler, K. Belaj // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8 (7). – P. e67688
Lambert M.A. Medical management of critical limb ischaemia: where do we stand today? / M. A. Lambert, J. J. F. Belch // Journal of internal medicine. – 2013. – Vol. 274 (4). – P. 295-307
Association of the derived neutrophil-lymphocyte ratio with critical limb ischemia / Klara Belaj, Martin Pichler, Gerald Hackl et al. //Angiology. – 2016. – Vol. 67 (4). – P. 350-354
Bone marrow derived cell therapy in critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized placebo controlled trials / S.M.O. Peeters Weem, M. Teraa, G.J. de Borst et al. // European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. – 2015. – Vol. 50 (6). – P. 775-783
Neutrophil-to-lymphocyte ratio and its association with critical limb ischemia in PAOD patients / Thomas Gary, Martin Pichler, Klara Belaj et al. // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8 (2). – P. e56745
Lymphocyte-to-monocyte ratio: a novel marker for critical limb ischemia in PAOD patients / T. Gary, M. Pichler, K. Belaj et al. // International Journal of Clinical Practice. – 2014. – 68 (12). – P. 1483-1487

(54) СУСПЕНЗІЯ КЛІТИН

UA 129616 C2

(57) Реферат:

Винахід стосується суспензії клітин, яка включає від 4×10^8 до $1,2\times10^9$ аутологічних або алогенних білих кров'яних тілець, отриманих із кісткового мозку суб’єкта людини, де із загальної кількості від 4×10^8 до $1,2\times10^9$ білих кров’яних тілець.

СУСПЕНЗІЯ КЛІТИН ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ ЛІКУВАННІ ЗАХВОРЮВАНЬ ПЕРИФЕРИЧНИХ АРТЕРІЙ НИЖНІХ КІНЦІВОК

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Даний винахід стосується суспензії клітин, отриманих із кісткового мозку дорослої людини, які можуть бути використані при лікуванні або покращенні стану захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок, переважно критичної ішемії кінцівок.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ ВИНАХОДУ

Захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок (PDA) включає широкий діапазон судинних захворювань, спричинених атеросклеротичним, тромбоемболічним та запальним процесами, які змінюють структуру та функцію артерій нижніх кінцівок. Головною причиною PDA, однак, є атеросклероз.

PDA нижніх кінцівок із клінічними симптомами виникає в результаті недостатності кровообігу, що призводить до недостатнього постачання кисню. PDA пов'язане з атеротромбозом інших судинних лож, включаючи серцево-судинну і церебрально-васкулярну системи. Наявність цукрового діабету (далі по тексту — DM) значно підвищує ризик PDA, пришвидшує перебіг захворювання, роблячи пацієнтів із діабетом більш вразливими до ішемічних подій, з погіршеною судинною функцією, підвищеною захворюваністю та смертністю і погіршеною якістю життя (QoL) (Thiruvoipati et al, 2015). Більше того: пацієнтів із PDA розглядають як гетерогенну групу пацієнтів, починаючи від пацієнтів без симптомів до пацієнтів із переміжною кульгавістю (IC) і пацієнтів з CLI (критична ішемія кінцівок). CLI стосується стану артеріальної недостатності, який так знижує перфузійний тиск у дистальному відділі, що мікроциркуляція і притік крові до тканин та живлення значно порушуються. Легка травма, утворення виразки та інфекція можуть сприяти підвищенню метаболічних потреб уражених тканин, часто призводячи до хронічної виразки, яка не загоюється. Це прогресуюче захворювання характеризується багаторівневим захворюванням, несприятливою ситуацією по захворюваності і обмеженою тривалістю життя.

Не зважаючи на те, що кісточково-плечовий індекс (ABI) використовується для діагностування PDA і є ознакою ступеня важкості PDA, він не повністю корелює з клінічним ступенем важкості захворювання. Тому використовується ширший діапазон клінічних симптомів, аби класифікувати ступінь важкості PDA з допомогою двох систем класифікації, які зазвичай використовуються у клінічній практиці: Резерфорда і Фонтейна (Hirsch AT, 2006). Клінічний ступінь важкості PDA коливається від безсимптомного до гангрени й ішемії кінцівок, що потребує ампутації. PDA являє собою прогресуюче захворювання, причому ступінь важкості стану збільшується з плином часу. Прогресування захворювання більш швидке у пацієнтів із DM.

Класифікація симптомів PDA й анатомічних ушкоджень, відповідальних за ці симптоми, забезпечує об'єктивне вимірювання, з допомогою якого клінічно слідкують за суб'єктами, та, що важливо, забезпечує послідовність при порівнянні стратегій медичного й інтервенційного лікування у клінічних дослідженнях.

Класифікація за Резерфордом — це широкозастосовувана система визначення клінічної стадії захворювання для опису PDA і вона схожа на класифікацію за Фонтейном, але більш широко цитується у новіших публікаціях у галузі судинної медицини. Оклюзійне захворювання периферичних артерій зазвичай поділяється на стадії за Фонтейном, визначені Рене Фонтейном у 1954, від Стадії I (безсимптомне) до Стадії IV (утворення виразки або гангрени). Класифікація, представлена Резерфордом у 1986 та виправлена у 1997, складається з чотирьох ступеней і семи категорій, починаючи від Категорії 0 (безсимптомне) до Категорії 6 (важкі ішемічні виразки або гангрени) (

Таблиця 1).

Таблиця 1: Класифікація PDA за Фонтейном і Резерфордом

Класифікація за Фонтейном		Класифікація за Резерфордом			
Ступінь за Фонтей-ном	Клінічний опис	Ступінь за Резерфор-дом	Категорія за Резерфор-дом	Клінічний опис	Об'єктивні критерії
I	Безсимптом-не	0	0	Безсимптомне — нема гемодинамічно значущого оклюзійного захворювання	Звичайне випробування на біговій доріжці або випробування реактивної гіперемії
II-a	Переміжна кульгавість після більше ніж 200 метрів безболісної ходьби	I	1	Незначна кульгавість	Виконання вправи на біговій доріжці†; АР після вправи >50 мм рт. ст., але щонайменше 20 мм рт. ст. нижче, ніж значення у стані спокою
II-b	Переміжна кульгавість після менше ніж 200 метрів ходьби	I	2 3	Помірна кульгавість	Між Категоріями 1 і 3
			3	Важка кульгавість	Не може завершити звичайну вправу на біговій доріжці† і АР після вправи <50 мм рт. ст.
III	Біль у стані спокою	II*	4	Ішемічний біль у стані спокою	АР у стані спокою <40 мм рт. ст., слабкий або ледь пульсуючий біль у щиколотці або метатарзальний PVR; ТР <30 мм рт. ст.
IV	Утворення виразки або гангрени	III*	5	Незначний некроз тканин — виразка, що не загоюється, фокальна гангрена з дифузною ішемією стопи	АР у стані спокою <60 мм рт. ст., біль у щиколотці або метатарзальний PVR слабкий або ледь пульсуючий; ТР <40 мм рт. ст.
			6	Значний некроз тканин — який перевищує рівень ТМ, здорову ногу більше не можна відновити	Така ж, як Категорія 5

*Ступені II і III, Категорії 4, 5 і 6 охоплюються терміном "хронічна критична ішемія".

†П'ять хвилин при 2 миль/год. під нахилом 12 %.

АР=Тиск на кісточку; PVR=записування пульсового кровонаповнення; ТР=тиск на палець ноги; ТМ=трансметатарзальний.

CLI — це прогресуюче захворювання, яке характеризується багатоступеневим

захворюванням, несприятливою ситуацією по захворюваності і обмеженою тривалістю життя. Документ із лікування захворювань периферичних артерій II, 2007 (TASCII, 2007) Трансатлантичного міжгромадського погоджувального документа (TASC) рекомендує, що термін CLI повинен використовуватися для усіх суб'єктів із хронічним ішемічним болем у стані спокою, виразками або гангреною, пов'язаними з об'єктивно доведеним артеріальним оклюзійним захворюванням. Дане визначення CLI включає суб'єкти з болем нижніх кінцівок у стані спокою, виразками або гангрена, зумовленими серйозним порушенням притоку крові у кінцівку, що триває більше двох тижнів. Це визначає 4–6 Категорії за Резерфордом (ішемічний біль у стані спокою, незначний некроз тканин та значний некроз тканин, відповідно) або III і IV Ступінь за Фонтейном.

Єдиним лікуванням вихідного захворювання CLI є реваскуляризація. Однак, значна частина населення (розрахована при між 50 % і 90 % населення) не піддається лікуванню з допомогою мануальної реваскуляризації (хірургічного відключення або ендоваскулярної процедури), що викликано або відсутністю життєздатних кровеносних судин, несприятливим результатом попередніх процедур мануальної реваскуляризації, або супутнім захворювання. Багато пацієнтів із CLI мають поліпатію, яка може заважати їм проходити мануальну реваскуляризацію. Врешті-решт, часто єдиним вибором, який залишається для великої частини цих пацієнтів, є ампутація, де мета полягає в тому, щоб усунути неусувний біль, запобігти прогресуванню гангрени або боротися з інфекцією. Тому терміново необхідні нові методи лікування.

Сьогодні початкова стадія лікування для пацієнтів з CLI зазвичай складається з оцінки ураженої кінцівки (за показниками) на допустимість бути реваскуляризованими або з допомогою хірургічного відключення, або із застосуванням ендоваскулярних методів. Усі пацієнти будуть лікуватися від існуючих симптомів захворювання, зокрема болю, виразок та інфекцій. Усунення болю, однак, дуже часто є неефективним, а так як ішемічні виразки дуже рідко загоюються, профілактика ран зазвичай зосереджується на контролюванні інфекції, профілактиці погіршення і збереженні кінцівки. Загалом цілі лікування для CLI включають:

- Усунення болю.
- Загоєння ран.
- Збереження кінцівки.
- Покращення QoL, включаючи підтримування ходячого стану.
- Зниження загального ризику серцево-судинних ускладнень.

Суспензія клітин за даним винаходом особливо призначається для пацієнтів із CLI, зокрема для пацієнтів із CLI з DM, які не піддаються реваскуляризації із застосуванням хірургічного відключення або ендоваскулярних методів. Для цих пацієнтів незадоволена потреба є вищою, оскільки відсутні можливі методи лікування для лікування вихідного захворювання. Будь-яке лікування, що застосовується для цих пацієнтів, є симптоматичним: догляд за раною, контроль інфекції і усунення болю. Для цих пацієнтів, непридатних для мануальної реваскуляризації, в міру прогресування захворювання єдиним клінічним вибором може бути ампутація або під впливом прогресуючої гангрени, неконтрольованої інфекції, або неусувного болю. Із пацієнтів із PDA, які хворіють на CLI, приблизно 25 % вмирають протягом року (NICE, 2012). Залежно від ступеня важкості CL, річні норми первинної ампутації варіюють від 5 % до 40 %, з найвищими нормами у пацієнтів, які не піддаються реваскуляризації, які мають неврологічні порушення або є лежачими хворими.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фіг. 1. Схема послідовності процесу виробництва суспензії клітин за винаходом.

Фіг. 2. Класифікація за Резерфордом на 3, 6, 9 і 12 місяцях після введення суспензії клітин за винаходом, LOCF контрольних пацієнтів порівняно з пацієнтами, яких лікували (включаючи пацієнтів з ампутаціями та летальні випадки).

Фіг. 3. Класифікація за Резерфордом на 3, 6, 9 і 12 місяцях після введення суспензії клітин за винаходом, LOCF ефекту трьох доз, які зростають (включаючи ампутації та летальні випадки).

Фіг. 4. Покращення за Класифікацією за Резерфордом (відсоток суб'єктів) на 3, 6, 9 і 12 місяцях для контрольної групи і трьох груп (доз) суспензії клітин за винаходом.

Фіг. 5. Частка суб'єктів, класифікованих за кількістю виразок на ураженій кінцівці на 3, 6, 9 і 12 місяцях (ліва панель: контрольна група; права панель: група з суспензією клітин за винаходом).

Фіг. 6. Ангіографічні зображення трьох із 24 випадків васкулогенезу, який відбувся, представлені відносно вихідних даних на Фігурі 6: поздовжній ріст артерій (Фігура 6A), поява нових судин (Фігура 6B) і поперечний ріст колатералі, що націлена на шкіру (Фігура 6C).

Фіг. 7. Схема послідовності технологічного процесу виробництва суспензії клітин за

винаходом.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Проблема, вирішена даним винаходом, полягає у наданні пацієнтам, які страждають на захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок (PDA), переважно пацієнтам з CLI, більш переважно пацієнтам із CLI з DM, які не піддаються реваскуляризації із застосуванням хірургічного відключення або ендоваскулярних методів, покращеного альтернативного способу лікування. Такий альтернативний покращений спосіб лікування наданий даним винаходом у вигляді суспензії клітин аутологічних або алогенних клітин, отриманих із кісткового мозку дорослої людини, як визначено аспектами та переважними варіантами здійснення, наведеними нижче.

Тому перший аспект винаходу стосується суспензії клітин (надалі по тексту — "суспензія клітин за винаходом") аутологічних або алогенних, переважно аутологічних, білих кров'яних тілець, отриманих із кісткового мозку дорослої людини, переважно отриманих з гребеня клубової кістки, яка збагачена мононуклеарними клітинами, що означає, що більше ніж 25 % білих кров'яних тілець (WBCs), присутніх у суспензії клітин, є мононуклеарними клітинами, і яка містить:

A. Мононуклеарні клітини (MNC), вибрані з переліку, що включає або складається з:

i. Популяцію лімфоцитів;

ii. Популяцію моноцитів; і

iii. Популяцію гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34;

і де суспензія клітин додатково включає:

B. Гранулоцити;

для застосування при лікуванні або покращенні стану захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок.

Зазначено, що загалом популяції клітин A) та B), своєю чергою, включають популяцію клітин, які експресують CXCR4, рецептор фактора міграції SDF1, для цієї популяції важливо зазначити присутність субпопуляції гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34 і CXCR4. Крім того, популяції клітин A) та B), своєю чергою, включають додаткову популяцію клітин, які експресують VEGFR2, рецептор для фактора ангіогенезу VEGF, який залучений в ангіогенез і васкулогенез.

Нарешті, популяція клітин A. iii), своєю чергою, включає популяцію клітин, які не експресують CD38, які являють собою недиференційовані нейтральні гематопоетичні стовбурові клітини.

Зазначено, що мононуклеарні клітини (MNCs) вважаються основним активним компонентом суспензії клітин за винаходом. Зокрема, активні компоненти або інгредієнти суспензії клітин за даним винаходом являють собою MNC, вибрані з переліку, який складається з лімфоцитів, моноцитів і гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34, конкретніше — субпопуляцій недиференційованих нейтральних гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34 і не експресують CD38, білих кров'яних тілець, здатних до опосередкованої SDF-1 міграції, які експресують CXCR4, стовбурових клітин, здатних до опосередкованої SDF-1 міграції, які експресують CD34 і CXCR4, і білих кров'яних тілець, які здатні до ангіогенезу, які експресують VEGFR2. Усі ці мононуклеарні клітини являють собою клітини, отримані з кісткового мозку, переважно отримані з гребеня клубової кістки.

Крім того, далі зазначено, що суспензія білих кров'яних тілець за винаходом додатково включає гранулоцити, які є нейтрофілами, еозинофілами та/або базофілами. У зв'язку з цим, важливо зазначити, що кінцевий продукт суспензії клітин за винаходом, як показано на прикладах, дозується на основі життєздатних білих кров'яних тілець, отриманих із кісткового мозку, включаючи не тільки фракцію MNC білих кров'яних тілець (лімфоцити і моноцити і стовбурові клітини), а й також гранулоцити.

У переважному варіанті здійснення першого аспекту винаходу суспензія клітин за винаходом у кінцевому складі, що збагачений мононуклеарними клітинами, що означає, що більше ніж 25 % загальної кількості білих кров'яних тілець (WBCs), присутніх у суспензії клітин, являють собою мононуклеарні клітини, включає від близько 4×10^8 до близько 2×10^9 аутологічних або алогенних білих кров'яних тілець, отриманих із кісткового мозку, переважно аутологічних, переважно отриманих з гребеня клубової кістки, де із загальної кількості від близько 4×10^8 до близько 2×10^9 білих кров'яних тілець,

i. від близько 20 % до близько 51 % являють собою лімфоцити, і близько 3,9 % до близько 22,3 % являють собою моноцити;

ii. від близько 1,4 % до близько 10 % являють собою гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34;

iii. від близько 25,3 % до близько 83,3 %, переважно від близько 32,3 % до близько 80,0 %, із загальної кількості білих кров'яних тілець являють собою мононуклеарні клітини, переважно вибрані з переліку, що складається з лімфоцитів, моноцитів і клітин CD34;

iv. від близько 16,7 % до близько 74,7 %, переважно від близько 20,0 % до близько 67,7 % являють собою гранулоцити;

v. від загальної кількості гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34, від близько 7,7 % до близько 55,5 % являють собою недиференційовані нейтральні гематопоетичні стовбурові клітини, які не експресують CD38;

vi. від близько 5,4 % до близько 38,8 % білих кров'яних тілець експресують CXCR4;

vii. із загальної кількості гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34, від близько 0,7 % до близько 10,3 % являють собою стовбурові клітини, які експресують CD34 і CXCR4;

viii. від близько 0,07 % до близько 24,7 % білих кров'яних тілець експресують VEGFR2; і

ix. максимальне співвідношення між червоними кров'яним тільцями і клітинами лейкоцитів становить 6,7, а максимальне співвідношення між тромбоцитами та клітинами лейкоцитів становить 32.

В іншому переважному варіанті здійснення першого аспекту винаходу суспензія клітин за винаходом, у кінцевому складі, як визначено у попередньому параграфі, включає від близько 4×10^8 до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, більш переважно від близько 5×10^8 до близько 2×10^9 білих кров'яних тілець, ще більш переважно від близько 5×10^8 до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, і всі значення дозування між кожним із перерахованих значень.

Певні варіанти здійснення можуть бути вибрані як піддіапазони цих значень білих кров'яних тілець у кінцевому складі. Наприклад, конкретний варіант здійснення може бути вибраний як вміст білих кров'яних тілець у кінцевому складі від вище 8×10^8 до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець. Іншим прикладом того, як може бути вибраний діапазон у варіанті здійснення, буде вибір вмісту від близько 9×10^8 до близько $1,1 \times 10^9$ білих кров'яних тілець. Третім прикладом діапазонів, що можуть бути вибрані для конкретного варіанта здійснення, буде вибір від близько $9,5 \times 10^8$ до близько $1,05 \times 10^9$ білих кров'яних тілець. Четвертим прикладом діапазонів, які можуть бути вибрані для конкретного варіанта здійснення, буде вибір такого вмісту, як від вище $9,8 \times 10^8$ до близько $1,02 \times 10^9$ білих кров'яних тілець.

Інші приклади того, як можуть бути вибрані діапазон варіанта здійснення вмісту або дозування, включають діапазон від близько 6×10^8 до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Інший приклад буде вибором діапазону від близько 7×10^8 до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Інший приклад буде вибором діапазону від близько 8×10^8 до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Інший приклад буде вибором діапазону від близько $8,5 \times 10^8$ до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Інший приклад буде вибором діапазону від близько 9×10^8 до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Інший приклад буде вибором діапазону від близько $9,5 \times 10^8$ до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Таким чином, усі значення дозування, які можуть бути вибрані зі значень, вказаних тут, і як буде зрозуміло фахівцеві у галузі техніки, охоплені даним винаходом.

Способи вимірювання кожної з популяцій клітин, зазначених вище, чітко викладені у детальному описі винаходу.

Зазначено, що така суспензія клітин може включати фармацевтично прийнятні носії та/або допоміжні речовини.

В іншому переважному варіанті здійснення першого аспекту винаходу або будь-якому з його переважних варіантів здійснення захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок являє собою критичну ішемію кінцівок.

В іншому переважному варіанті здійснення першого аспекту винаходу або будь-якому з його переважних варіантів здійснення клітини суспендовані в об'ємі від 5 до 30 мл гепаринізованого сольового розчину або лактат-розчину Рінгера, що переважно включає близько 1 % HSA і близько 2,5 % глюкози.

Другий аспект винаходу стосується суспензії клітин, як визначено у першому аспекті винаходу або будь-якому з його переважних варіантів здійснення, для застосування у способі лікування захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок, переважно критичної ішемії кінцівок, з допомогою внутрішньоартеріального введення, де притік крові низького тиску до 4

атмосфер досягається шляхом розміщення надувного балона близько до оклюзійного ураження судини на дистальній стегновій або підколінній артерії, та вливання зазначеної суспензії клітин внутрішньоартеріально.

Третій аспект винаходу стосується одного або кількох попередньо наповненого шприца/ів, що включає/ють суспензію клітин, як визначено у першому аспекті винаходу або будь-якому з його переважних варіантів здійснення.

Четвертий аспект винаходу стосується шприца (попередньо наповненого шприца), як визначено у третьому аспекті винаходу, для застосування при лікуванні або покращенні стану захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок, переважно критичної ішемії кінцівок. Зазначено, що один або більше попередньо наповнених шприців може бути використаний для одного пацієнта.

П'ятий аспект винаходу стосується шприца (попередньо наповненого шприца), як визначено у третьому аспекті винаходу, для застосування у способі лікування захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок, переважно критичної ішемії кінцівок, з допомогою внутрішньоартеріального введення, де притік крові низького тиску до 4 атмосфер отримується шляхом розміщення надувного балона близько до оклюзійного ураження судини на дистальній стегновій або підколінній артерії, і вливання зазначеної суспензії клітин внутрішньоартеріально.

У переважному варіанті здійснення від першого до п'ятого аспектів за винаходом суспензія клітин або шприци надані як одноразова доза.

У переважному варіанті здійснення другого і п'ятого аспектів за винаходом спричинення притоку низького тиску здійснюється протягом 1-6 хвилин, а вливання зазначеної суспензії клітин здійснюється протягом 2-10 хвилинами.

Шостий аспект винаходу стосується процесу виробництва суспензії клітин за винаходом як визначено у першому аспекті винаходу або у будь-якому з його переважних варіантів здійснення, який включає:

1. Забір кісткового мозку (BM) здійснюється шляхом багаторазових аспірацій, переважно із задньої частини гребеня клубової кістки суб'єкта під місцевою або загальною анестезією. Потім аспірати BM забирають, переважно у мішок для перенесення, який містить антикоагулянтний розчин, більш переважно розчин цитрату декстрози A (ACD-A).

2. BM фільтрується, переважно під дією сили тяжіння, для видалення будь-яких невеликих кісткових уламків і для запобігання закупорюванню протягом пізніших стадій.

3. Початковий об'єм BM знижується, переважно до близько 50-100 мл, переважно шляхом використання програми SmartRedux на пристрої Sepax 2,0 і пов'язаного з ним стерильного одноразового набору SmartRedux (CS-490,1). Ця стадія, яка включає видалення плазми і червоних кров'яних тілець (RBC), що переважно призводить до близько 50-100 мл світлого шару кров'яного згустка, також сприяє чистоті кінцевого продукту.

4. Необов'язково стадія зниження об'єму здійснюється за один або два цикли – залежно від об'єму вихідного матеріалу, що підлягає обробці. Зразки BM з об'ємами до 220 мл обробляються за один цикл, а зразки з більше ніж 220 мл обробляються за два цикли із використанням того ж самого набору. Переважно, і для одиничного, і для подвійного циклу зниження об'єму кінцевий об'єм встановлений до близько 50-100 мл.

5. Стерильний допоміжний мішок для зразків, який містить BM зі зменшеним об'ємом, як встановлено на стадіях 3 або 4, проходить автоматичне центрифугування в градієнті густини, що супроводжується двома промиваннями суспензії мононуклеарних клітин (MNC) з використанням промивного розчину, який переважно складається з 2-4 % HSA у сольовому розчині (обидва фармацевтичного ступеня чистоти). Приблизно близько 45 мл продукту BM-MNC збирається у вихідний мішок, а інші компоненти переміщуються до мішка для відходів. Переважно, стерильний допоміжний мішок для зразків, який містить BM зі зменшеним об'ємом, проходить центрифугування в градієнті густини NeatCell, що супроводжується двома промиваннями суспензії мононуклеарних клітин (MNC) з використанням промивного розчину, що переважно складається з 2-4 % HSA у сольовому розчині (обидва фармацевтичного ступеня чистоти). Приблизно близько 45 мл продукту BM-MNC збирається у вихідний мішок, а інші компоненти переміщуються до мішка для відходів.

6. BM-MNCs збираються із мішка продукту, переважно використовуючи 50 мл шприц, і фільтруються, переважно через 50 мкм фільтр, переважно у стерильну пробірку фалькон. Мішок продукту промивається промивним розчином і фільтрується для покращення відновлення MNC. Кінцевий об'єм фармацевтичної субстанції BM-MNC регулюється до 40-60 мл.

Фармацевтична субстанція центрифугується, і гранула ресуспендується у суміші кінцевого складу, переважно сольовому розчині з гепарином, або лактат-розчині Рінгера з переважно 1 %

HSA і переважно 2,5 % глюкози в об'ємі переважно 5-30 мл.

Як уже зазначалося вище, вказано, що кінцевий продукт суспензії клітин, отриманий з шостого аспекту винаходу, дозується на основі життєздатних білих кров'яних тілець, включаючи не лише фракцію MNC, а й також гранулоцити. Оскільки MNCs є активним компонентом, відсоток MNCs у кінцевому продукті вважається характеристикою якості.

Сьомий аспект винаходу стосується суспензії клітин або ємності, переважно одного або кількох шприців, які отримані або отримуються з допомогою способу за шостим аспектом винаходу. Зазначено, що така суспензія клітин або ємність може бути використана, як встановлено у будь-якому від першого до п'ятого аспектів винаходу.

ОПИС ВИНАХОДУ

ВИЗНАЧЕННЯ

Як використовується у даному документі, "аутологічний" розуміється як такий, що стосується отримання клітин, коли донор і реципієнт є однією особою.

Як використовується у даному документі, "алогенний" розуміється як такий, що стосується отримання клітин, коли донор і реципієнт не є однією особою.

Як використовується у даному документі, "клітини, отримані з кісткового мозку дорослої людини" розуміється як препарат, що містить клітини, які не є ембріональними і отримані з кісткового мозку, отриманого від донора-людина.

Як використовується у даному документі, "суспензія клітин" розуміється як отримання клітин, суспендованих у рідкому середовищі.

Як використовується у даному документі, "суспензія клітин, отриманих із кісткового мозку дорослої людини" розуміється як отримання клітин, які не є ембріональними та отримані з кісткового мозку, отриманого від донора-людини, суспендовані у рідкому середовищі.

Як використовується у даному документі, "гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34" розуміються як гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують маркер поверхні CD34 та ідентифіковані як CD34-позитивні з допомогою забарвлення антитілами і проточної цитометрії CD34.

Як використовується у даному документі, "недиференційовані нейтральні гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34 і не експресують CD38" розуміються як гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують маркер поверхні CD34 та ідентифіковані як CD34-позитивні з допомогою забарвлення антитілами і проточної цитометрії CD34, проте ідентифіковані негативними для маркера поверхні CD38 з допомогою забарвлення антитілами і проточної цитометрії CD38.

Як використовується у даному документі, "білі кров'яні тільця, які експресують CXCR4" розуміються як клітини, які експресують маркер поверхні CD45 і CXCR4 та ідентифіковані як CD45- і CXCR4-позитивні з допомогою забарвлення антитілами і проточної цитометрії CD45 і CXCR4. CXCR4 являє собою рецептор для фактора міграції SDF-1.

Як використовується у даному документі, "стовбурові клітини, які експресують CD34 і CXCR4" розуміються як клітини, які експресують маркер поверхні CD45, CD34 і CXCR4 та ідентифіковані як CD45-, CD34- і CXCR4-позитивні з допомогою забарвлення антитілами і проточної цитометрії CD45, CD34 і CXCR4. CXCR4 являє собою рецептор для фактора міграції SDF-1.

Як використовується у даному документі, "білі кров'яні тільця, які експресують VEGFR2" розуміються як клітини, які експресують маркер поверхні CD45 і VEGFR2 та ідентифіковані як CD45- і VEGFR2-позитивні з допомогою забарвлення антитілами і проточної цитометрії CD45 та VEGFR2. VEGFR2 являє собою рецептор VEGF, що передбачає ангіогенез і васкулогенез.

Як використовується у даному документі, "мононуклеарні клітини" розуміються як будь-які клітини крові або білі кров'яні тільця кісткового мозку (також згадуються як лейкоцити), які мають кругле ядро, тим самим виключаючи гранулоцити.

Як використовується у даному документі, "захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок" розуміється як звуження артерій, крім тих, які постачають кров до серця або мозку. Захворювання периферичних артерій зазвичай вражають ноги, але можуть бути залучені інші артерії.

Як використовується у даному документі, "критична ішемія кінцівок" розуміється як підгрупа захворювань периферичних артерій, де стан характеризується хронічним ішемічним болем у стані спокою, виразками або гангреною в одній або обох ногах, пов'язаними з об'єктивно доведеним артеріальним оклюзійним захворюванням.

Термін "близько" відносно числового значення означає +/- 20 % того числового значення. Термін "близько" відносно числового значення також включає +/- 10 % того числового значення. Термін "близько" відносно числового значення також включає +/- 5 % того числового значення.

Термін "близько" відносно числового значення також включає +/- 1 % того числового значення.

Терміни "включає" і "що включає" використовуються в інклюзивному, відкритому сенсі, означаючи, що додаткові елементи можуть бути включені. Термін "включає" також охоплює і може бути використаний взаємозамінно з термінами "складається з" і "по суті складається з".

Як використовується у даному документі, термін "доросла людина" означає, що стовбурові клітини не ембріональними. В одному варіанті здійснення "доросла людина" означає постембріональний або "постнатальний". Відносно стовбурових клітин за даним винаходом термін "стовбурові клітини дорослої людини" означає, що стовбурова клітина виділена з тканини або органа тварини на стадії росту пізніше ембріональної стадії. Стовбурові клітини дорослої людини несхожі на ембріональні стовбурові клітини, які визначаються їхнім походженням, внутрішньою клітинною масою бластоциста. Стовбурові клітини дорослої людини згідно з винаходом можуть бути виділені з будь-якої неембріональної тканини та будуть включати новонароджених, юнаків, підлітків і дорослих людей. Як правило, стовбурова клітина за даним винаходом буде виділена з неновонародженого ссавця, і, наприклад, з неновонародженої людини. Переважно, стовбурові клітини за даним винаходом виділені з людини.

Термін "виділений" означає, що клітина або популяція клітин, яких це стосується, не знаходиться в її природному середовищі. Клітина або популяція клітин по суті була відокремлена від тканини, яка її оточує.

Профіль маркера нового продукту суспензії клітин відносно даного винаходу може бути додатково визначений за наявністю та/або відсутністю додаткових маркерів, або з допомогою заданого профілю комбінації присутніх і відсутніх маркерів. У кожному випадку конкретна комбінація маркерів може бути присутня як певний профіль у популяції клітин та/або певний профіль маркерів на окремих клітинах у популяції.

Термін "маркер", як використовується у даному документі, охоплює будь-яку біологічну молекулу, присутність, концентрація, активність або стан фосфорилування якої може бути визначений та використаний, щоб ідентифікувати фенотип клітини.

Тоді клітини за винаходом є позитивними для певних фенотипічних маркерів і негативними для інших. "Позитивний" значить, що маркер експресується всередині клітини. Для того, щоб вважатися експресованим, маркер повинен бути присутнім на виявлюваному рівні. "Виявлюваний рівень" означає, що маркер може виявлятися з допомогою використання одного зі стандартних лабораторних методів, таких як ПЛР, блотинг або проточна цитометрія, як описано.

Термін "експресований" використовується для опису наявності маркера на поверхні або всередині клітини. Для того, щоб вважатися експресованим, маркер повинен бути присутнім на виявлюваному рівні. "Виявлюваний рівень" означає, що маркер може виявлятися з допомогою використання одного зі стандартних лабораторних методів, таких як ПЛР, блотинг, імунофлуорисценція, аналіз ELISA або FACS. "Експресований" може стосуватися, але не обмежуючись цим, виявлюваної присутності білка, стану фосфорилування білка або мРНК, що кодує білок. Ген вважається експресованим клітиною за винаходом або клітиною популяції за винаходом, якщо експресія може бути помірно виявлена після 30 циклів ПЛР, переважно після 37 циклів ПЛР, що відповідає рівню експресії у клітині щонайменше близько 100 копій на клітину. Терміни "експресувати" і "експресія" мають відповідні значення. На рівні експресії нижче цього порогу вважається, що маркер не експресується.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС

- ПРОДУКТ СУСПЕНЗІЇ КЛІТИН

Суспензія клітин згідно з даним винаходом являє собою продукт, придатний для лікування або покращення стану захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок, зокрема для лікування критичної ішемії кінцівок (CLI), конкретніше — для лікування критичної ішемії кінцівок (CLI) у пацієнтів із DM, які не піддаються реваскуляризації із застосуванням хірургічного відключення або ендоваскулярних методів, як покращеної лікувальної корисної альтернативи. У цьому смислі несподівано було виявлено, що суспензія клітин згідно з даним винаходом під час використання при лікуванні або покращенні стану захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок призводить до багатьох клінічно значних покращень, таких як зміна у класифікації за Резерфордом зі CLI Ступеня II (категорія 4) або III (категорія 5) на Ступінь I (категорія 1-3) або Ступінь 0 (категорія 0); покращений процес загоювання не тільки виразок, а навіть великих ампутацій; та підвищення розширення судин та/або щільність судин. Усіх зазначених вище переваг можна досягнути навіть з допомогою одноразового введення суспензії клітин, і вони чітко показані у прикладі 2.

Як правило, суспензія клітин за винаходом стосується суспензії клітин аутологічних або

алогенних, переважно аутологічних, клітин, отриманих із кісткового мозку дорослої людини, переважно отриманих з гребеня клубової кістки, яка включає:

A. Мононуклеарні клітини (MNC), вибрані з переліку, що включає або складається з:

i. Популяцію лімфоцитів;

ii. Популяцію моноцитів; і

iii. Популяцію гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34;

і де суспензія клітин додатково включає:

B. Гранулоцити.

Зазначено, що популяції клітин A) і B), своєю чергою, включають популяцію клітин, які експресують CXCR4, рецептор для фактора міграції SDF-1, з цієї популяції важливо вказати на присутність субпопуляції гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34 і CXCR4. Крім того, популяції клітин A) і B), своєю чергою, включають популяцію клітин, які експресують VEGFR2, рецептор для фактора ангіогенезу VEGF, що залучений в ангіогенез і васкулогенез.

Нарешті, популяція клітин A. iii), своєю чергою, включає популяцію клітин, які не експресують CD38, які є недиференційованими нейтральними гематопоетичними стовбуровими клітинами.

Тому конкретно суспензія згідно з даним винаходом являє собою суспензію клітин аутологічних або алогенних, переважно аутологічних, клітин, отриманих із кісткового мозку дорослої людини, що включають: i) гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34; ii) недиференційовані нейтральні гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34 і не експресують CD38; iii) білі кров'яні тільця, які експресують CXCR4, що являє собою рецептор для фактора міграції SDF-1; iv) гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34 і CXCR4, що являє собою рецептор для фактора міграції SDF-1; v) білі кров'яні тільця, які експресують VEGFR2, що являє собою рецептор для фактора росту ендотелію судин (VEGF), і vi) моноцити, гранулоцити і лімфоцити.

Важливо зазначити, що кінцевий продукт суспензії клітин за винаходом дозується на основі життєздатних білих кров'яних тілець, отриманих із кісткового мозку, в тому числі не лише фракції мононуклеарних білих кров'яних тілець (лімфоцитів і моноцитів і стовбурових клітин), а також гранулоцитів.

Отже, суспензія клітин за винаходом стосується аутологічних або алогенних, переважно аутологічних, клітин, отриманих із кісткового мозку дорослої людини, що включають: i) гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34, ii) недиференційовані нейтральні гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34 і не експресують CD38; iii) білі кров'яні тільця, які експресують CXCR4, що являє собою рецептор для фактора міграції SDF-1, тобто; iv) гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34 і CXCR4, що являє собою рецептор для фактора міграції SDF-1, v) білі кров'яні тільця, які експресують VEGFR2, що являє собою рецептор для фактор росту ендотелію судин (VEGF), і vi) моноцити, гранулоцити і лімфоцити.

У переважному варіанті здійснення суспензія клітин, яка у кінцевому складі збагачена мононуклеарними клітинами, що означає, що більше ніж 25 % білих кров'яних тілець (WBCs), наявних у суспензії клітин, є мононуклеарними клітинами, включає від близько 4×10^8 до близько 2×10^9 аутологічних або алогенних білих кров'яних тілець, отриманих із кісткового мозку, переважно аутологічних, переважно отриманих з гребеня клубової кістки, де із загальної кількості від близько 4×10^8 до близько 2×10^9 білих кров'яних тілець:

i. від близько 20 % до близько 51 % являють собою лімфоцити, і від близько 3,9 % до близько 22,3 % являють собою моноцити;

ii. від 1,4 % до 10 % являють собою гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34;

iii. від близько 25,3 % до близько 83,3 % загальної кількості білих кров'яних тілець являють собою мононуклеарні клітини;

iv. від близько 16,7 % до близько 74,7 % являють собою гранулоцити;

v. від близько 5,4 % до близько 38,8 % загальної кількості білих кров'яних тілець експресують CXCR4;

vi. від близько 0,07 % до близько 24,7 % загальної кількості білих кров'яних тілець експресують VEGFR2;

vii. із загальної кількості гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34, від близько 7,7 % до близько 55,5 % являють собою недиференційовані нейтральні гематопоетичні стовбурові клітини, які не експресують CD38, і від близько 0,7 % до близько 10,3 % являють собою стовбурові клітини, які експресують CD34 і CXCR4; і

viii. максимальне співвідношення між червоними кров'яними тільцями і клітинами лейкоцитів становить 6,7, і максимальне співвідношення між тромбоцитами і клітинами лейкоцитів

становить 32.

В іншому переважному варіанті здійснення із загальної кількості білих кров'яних тілець від 32,3 % до 80,0 % являють собою мононуклеарні клітини, вибрані з переліку, що складається із клітин лімфоцитів, моноцитів і гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34, та від 20,0 % до 67,7 % являють собою гранулоцити.

У ще іншому переважному варіанті здійснення суспензія клітин за винаходом, у кінцевому складі, як визначено у попередньому параграфі, включає від близько 4×10^8 до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, більш переважно від близько 5×10^8 до близько 2×10^9 білих кров'яних тілець, ще більш переважно від близько 5×10^8 до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, і усі значення дозування між кожним із перерахованих вище значень.

Певні варіанти здійснення можуть бути вибрані як піддіапазони з цих значень білих кров'яних тілець у кінцевому складі. Наприклад, конкретний варіант здійснення може бути вибраний як вміст білих кров'яних тілець від вище 8×10^8 до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець. Інший приклад того, як може бути вибраний діапазон у варіанті здійснення, буде вибором із вмісту від близько 9×10^8 до близько $1,1 \times 10^9$ білих кров'яних тілець. Третій приклад діапазонів, які можуть бути вибрані для конкретного варіанта здійснення, буде вибором від близько $9,5 \times 10^8$ до близько $1,05 \times 10^9$ білих кров'яних тілець. Четвертий приклад діапазонів, які можуть бути вибрані для конкретного варіанта здійснення, буде вибором такого вмісту, як від вище $9,8 \times 10^8$ до близько $1,02 \times 10^9$ білих кров'яних тілець.

Інші приклади того, як може бути вибраний діапазон варіанта здійснення вмісту або концентрації, включають діапазон від близько 6×10^8 до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Інший приклад буде вибором діапазону від близько 7×10^8 до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Інший приклад буде вибором діапазону від близько 8×10^8 до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Інший приклад буде вибором діапазону від близько $8,5 \times 10^8$ до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Інший приклад буде вибором діапазону від близько 9×10^8 до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Інший приклад буде вибором діапазону від близько $9,5 \times 10^8$ до близько 2×10^9, переважно до близько $1,2 \times 10^9$ білих кров'яних тілець, охоплюючи усі значення дозування між ними. Таким чином, усі значення дозування, що можуть бути вибрані зі значень, зазначених у даному документі, і як буде зрозуміло фахівцеві у галузі техніки, охоплюються даним винаходом.

Способи вимірювання кожної із популяцій клітин, зазначених вище, чітко встановлені у детальному описі винаходу. Зокрема, способи вимірювання кожного з лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів, тромбоцитів та RBCs здійснюються з використанням загального і диференційованого підрахунків лейкоцитів з допомогою автоматичного гематологічного аналізатора (ABX Pentra 60, Horiba Medical). Процентні вмісти клітин-попередників, процентні вмісти клітин, які експресують CXCR4, та процентні вмісти клітин, які експресують VEGFR2, були визначені з використанням проточного цитометра (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotec).

Зазначено, що така суспензія клітин може включати фармацевтично прийнятні носії та/або допоміжні речовини.

В іншому переважному варіанті здійснення клітини суспензії клітин за винаходом суспендовані в об'ємі від 5 до 30 мл гепаринізованого сольового розчину або лактат-розчину Рінгера, що переважно включає близько 1 % HSA і близько 2,5 % глюкози.

Винахід також надає фармацевтичну композицію, яка містить суспензію клітин за винаходом, як визначено вище, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтично прийнятний носій може включати середовище, яке сприяє життєздатності і функціонуванню клітин. Таке середовище може бути безсироватковим, щоб уникнути викликання імунної відповіді у реципієнта. Носій буде буферним та не міститиме пірогенів.

Фармацевтично прийнятні носії і розчинники включають сольовий розчин, водні буферні розчини та/або диспергент. Застосування таких носіїв та розчинників добре відоме у галузі техніки. Розчин є стерильним і достатньо низької в'язкості, щоб дозволити застосовувати шприц для введення.

Приклади матеріалів та розчинів, які можуть служити як фармацевтично прийнятні носії, також добре відомі у галузі техніки.

Зазначено, що у переважному варіанті здійснення кінцевий розчин фармацевтичної композиції продукту суспензії клітин, як показано на прикладах даного опису, був складений з

гепаринізованого сольового розчину (дивитися таблицю 4). Також може бути використаний лактат-розчин Рінгера (2,7 мг/100 мл дигідрату хлориду кальцію, 320 мг/100 мл лактату натрію, 40 мг/100 мл хлориду калію та 600 мг/100 мл хлориду натрію) з додаванням 2,5 % глюкози та 1 % HSA (дивитися таблицю 2).

Середовище кінцевого складу, як показано на прикладах за винаходом, готували свіжим для кожної партії в день оброблення, у класі A BSC, шляхом додавання 10 мл глюкози (2,5 %) та 1 мл HSA (20 %) до 9 мл лактат-розчину Рінгера.

Таблиця 1:

Буфер для композиції*

Компонент	Концентрація	Ступінь
Розчин Рінгера		EP, USP для вливання
Глюкоза	2,5 %	EP USP для вливання
Людський альбумін Сольовий розчин (0,9 % NaCl) гепаринізований	1 % 20 Од./мл	EP USP для вливання EP USP для вливання EP USP для вливання

Абревіатури: EP = Європейська фармакопея; USP = Фармакопея США

* також дивитися Таблицю

Тому, зокрема, переважні допоміжні речовини являють собою лактат-розчин Рінгера, переважно з додаванням глюкози та HSA.

В іншому переважному варіанті здійснення суспензія клітин за винаходом або фармацевтична композиція за винаходом може бути заморожена у заморожувальному середовищі. Будь-яке середовище, яке підтримує життєздатність клітин при температурах між -135 °C та -190 °C, придатне як заморожувальне середовище. Наприклад, заморожувальне середовище може включати від 2,5 % до 10 % DMSO. Більш конкретно, заморожувальне середовище може включати 5-10 % DMSO.

Заморожувальне середовище може базуватися на середовищі культивування або середовищі для розмноження, описаних у даному документі, додатково включаючи людську сироватку або будь-який інший білок чи суміш білків, здатних підтримувати цілісність клітини після розморожування клітин.

Після розморожування клітини за винаходом можуть бути промиті для видалення DMSO або інших компонентів заморожувального середовища перед введенням або ресуспендуванням у розчині для введення. Розчин для введення буде будь-яким фізіологічним розчином, що здатний вводитися пацієнтам без токсичності. Розчин для введення може включати 1-15 % білка, такого як альбумін людської сироватки.

Фармацевтичні композиції за винаходом також можуть бути використані у будь-якому зі способів лікування або терапавтичних застосувань, описаних у даному документі.

Як уже зазначалося, суспензія клітин за даним винаходом пришвидшує (ре)генерацію нових та існуючих кровеносних судин і покращує притік крові в існуючих судинах, як показано у прикладі 2. Таким чином, суспензія клітин за винаходом є особливо прийнятною при лікуванні захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок (PDA), переважно CLI, більш переважно CLI з DM у пацієнтів, які не піддаються реваскуляризації із застосуванням хірургічного відключення або ендоваскулярних методів. Приклад 2 був здійснений шляхом використання спеціального фармацевтичного продукту суспензії клітин, що підпадає під визначення суспензії клітин за винаходом, як визначено у першому аспекті винаходу. Такий фармацевтичний продукт суспензії клітин був виготовлений із фармацевтичної субстанції BM-MNC, приготовленої у 10-30 мл гепаринізованого сольового розчину. Такий фармацевтичний продукт суспензії клітин використовували у різних дозуваннях, переважні дозування становили від близько 5×10^8 до близько 1×10^9. Кінцевою використаною ємністю були 1-3 шприци для введення. Дані про цей продукт суспензії клітин зібрані на Етапі II (дослідження CMMo/ICPD/2008) для 32 груп пацієнтів. Таблиця 2 нижче підсумовує дані автоматичного аналізатора для кожного окремого суб'єкта, включаючи WBC та визначення лейкоцитарної формули (лімфоцити, моноцити). Також для кожного суб'єкта перераховані споріднені домішки, включаючи RBC та концентрацію тромбоцитів, і процентний вміст гранулоцитів.

Фенотипічний аналіз тих же продуктів також показаний у Таблиці 3, що включає аналіз наступних типів клітин:

CD34+ Гематопоетичні стовбурові клітини

CD34+CD38- Недиференційовані нейтральні HSCs
CD133+ Ендотеліальний попередник, що містить популяцію клітин
CD90+ Недиференційовані гематопоетичні стовбурові клітини
CXCR4+ Клітини, які експресують рецептор SDF-1
VEGFR2+ Клітини, які експресують рецептор 2 фактора росту ендотелію судин
CD31+CD146+CD133- Зрілі ендотеліальні клітини
CD34+VEGFR2+CD133+ Диференційовані ендотеліальні клітини-попередники росту
CD34-CD105+CD90+CD73+MSCs
Дані, зібрані про лікарську субстанцію, показані у таблиці 2 і таблиці 3.

Таблиця 2:

Автоматичний підрахунок клітин і диференційований підрахунок лейкоцитів фармацевтичної субстанції CMMo/ICPD/2008. Показані дані для середньої дози (5 × 10^8 WBCs або лейкоцити) та високої дози (1,0 × 10^9 WBCs або лейкоцити).

Група пацієнтів	LEU (x10^3)	RBC (x10^6)	PLA (x10^3)	LYMPH (%)	MONO (%)	CD34+ (%)	MNCs	NEU (%)	EOS (%)	BAS (%)	GRA (%)
Спосіб	ACC	ACC	ACC	ACC	ACC	PHE	MNC	ACC	ACC	ACC	SUM
F01	19,59	0,05	259	48,5	6,4	N/A	45	33	0,1	3,0	55,0
F03	19,43	0,11	603	42,5	12,2	1,44	45,2	33,9	0,1	1,2	54,8
F04	20,59	0,04	69	24,1	7,2	3,77	68,6	57,7	0,1	3,1	31,4
F05	16,87	0,04	56	20,1	6,4	7,23	73,4	62	0,1	2,5	26,6
F07	8,96	0,06	242	42,2	12,6	N/A	44,8	31,2	0,4	3,1	55,2
F08	21,94	0,06	310	36,4	7,5	3,69	56,1	42,6	0	2,7	43,9
F09	43,29	0,06	329	37,4	5,4	4,34	57,2	47,2	0	4,1	42,8
F10	8,75	0,04	277	45,1	22,1	2,54	32,7	25,3	0,1	2,3	67,3
F11	17,28	0,02	38	28,1	7,0	10,05	64,8	54	0,1	4,9	35,2
F14	30,74	0,07	232	47,4	10,5	4,20	42,1	27,3	0	7,1	57,9
F15	23,12	0,06	280	47,1	11,1	6,50	41,7	30,4	0,1	4,2	58,3
F16	14,39	0,04	153	26,6	11	4,75	62,3	51,2	0,1	4,6	37,7
F17	25,31	0,06	235	36,2	6,7	3,68	57,1	49	0	2,3	42,9
F18	22,89	0,07	191	30,2	8,2	3,00	61,6	48,9	0	3,3	38,4
F20	16,46	0,06	229	51,1	11,2	N/A	37,7	21,8	0	4,1	62,3
F21	31,55	0,05	153	48,2	9,4	2,20	42,2	32,5	0,2	2,9	57,8
F22	10,46	0,05	157	42,0	17,4	1,67	40,5	31,1	0,1	3,4	59,5
F23	18,36	0,03	144	40,2	6,2	3,30	53,5	42,9	0,1	2,9	46,5
F25	27,86	0,06	239	36,5	6,0	3,30	57,5	51,7	0	6,4	42,5
F26	25,83	0,08	337	43,0	14,3	4,28	42,7	28,4	0	2,8	57,3
F27	23,8	0,06	538	38,1	7,0	2,06	54,9	39,9	0	3,2	45,1
F28	19,56	0,04	93	46,4	5,9	3,67	47,7	33,5	0	2,2	52,3
F30	20,74	0,09	246	45,4	7,7	2,19	46,9	31,7	0	4,1	53,1
F31	15,67	0,06	230	41,6	14,6	4,68	43,7	32,2	0,1	4,8	56,3
F32	26,34	0,15	489	50,6	16,9	5,40	32,3	17,5	0,2	4,5	67,7
F33	35,3	0,1	370	40,7	3,9	3,59	55,4	44,7	0	4,7	44,6
F34	56,97	0,11	398	26,5	5,7	2,73	67,8	56,1	0	5,1	32,2
F35	28,94	0,05	107	25,6	6,4	9,24	67,8	60,5	0,2	3,2	32,2
F37	19,71	0,04	201	26,7	10,7	3,92	62,5	51,2	0,1	3,6	37,5
F38	29,41	0,07	504	30,0	20,8	4,12	49,1	39,5	0,1	2,7	50,9
F39	26,03	0,03	174	31,7	22,3	4,44	45,9	40,6	0,1	3,6	54,1
F40	24,72	0,07	304	N/M	19,9	3,18	80	48,9	0,1	2,7	20,0
Мін.	8,75	0,02	38	20,1	3,9	1,44	32,3	17,5	0	1,2	20,0
Макс.	56,97	0,15	603	51,1	22,3	10,05	80,0	62,0	0,4	7,1	67,7

Використані способи: ACC = композиція фармацевтичної субстанції оцінена з використанням автоматичного аналізатора (ABX Pentra 60); PHE = фенотипічний аналіз фармацевтичної субстанції (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotec); MNC = розраховується як частка білих кров'яних тілець, не гранулоцитів; SUM = розраховується на основі кількості клітин.

Абревіатури: LEU = лейкоцит; RBC = червоне кров'яне тільце; PLT = тромбоцит; LYMPH =

лімфоцит; MONO = моноцит; CD34+ = клітини, які експресують CD34; MNCs = мононуклеарні клітини; NEU = нейтрофіл; BAS = базофіл; EOS = еозинофіл; GRA = гранулоцити; N/A = відсутній; N/M = незначний.

Таблиця 2:

Фенотипічний аналіз фармацевтичної субстанції CMMo/ICPD/2008.
Дані зібрані на Етапі II (дослідження CMMo/ICPD/2008) для 32 суб'єктів.

Група пацієнтів	CD34+ (%)	CD34+/CD38- (%)	CXCR4+ (%)	CD34+/CXCR4 (%)	VEGFR2+ (%)
Спосіб	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE
F01	N/A				
F03	1,44	18,05	15,10	0,69	24,73
F04	3,77	26,25	5,38	1,06	2,23
F05	7,23	7,74	18,63	1,10	0,30
F07	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F08	3,69	14,9	22,59	9,48	0,25
F09	4,34	22,11	31,93	9,44	0,19
F10	2,54	20,47	32,00	2,75	0,25
F11	10,05	25,77	31,56	4,87	0,40
F14	4,20	18,33	20,27	6,66	0,30
F15	6,50	41,84	21,93	0,92	0,53
F16	4,75	22,1	38,79	4,00	0,28
F17	3,68	28,53	25,62	5,43	0,76
F18	3,00	34	21,10	3,33	0,07
F20	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F21	2,20	55,45	11,20	6,81	0,13
F22	1,67	19,16	16,00	3,59	0,64
F23	3,30	10,00	27,10	10,3	0,47
F25	3,30	18,48	20,05	3,33	0,36
F26	4,28	21,26	26,66	5,84	0,65
F27	2,06	17,47	23,79	1,45	0,21
F28	3,67	18,52	14,55	5,17	0,56
F30	2,19	23,74	29,44	10,04	0,33
F31	4,68	42,73	32,06	9,61	0,66
F32	5,40	24,07	22,88	5,37	0,45
F33	3,59	11,14	15,62	1,94	0,37
F34	2,73	34,43	7,69	1,83	0,46
F35	9,24	20,23	21,53	2,59	1,07
F37	3,92	33,92	35,21	4,84	0,65
F38	4,12	35,92	30,42	2,66	1,78
F39	4,44	18,01	27,51	1,80	0,99
F40	3,18	30,50	15,88	2,83	1,37
Мін.	1,44	7,74	5,38	0,69	0,07
Макс.	10,05	55,45	38,8	10,3	24,7

використані способи: PHE = фенотипічний аналіз фармацевтичної субстанції (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotec);

Абревіатури: CD34+ = гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34; CD34+/CD38- = частка гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34, які не експресують CD38; CD45+/CXCR4+ = частка лейкоцитів, які експресують CD45 і також експресують CXCR4; CD34+/CXCR4 = частка гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34, які також експресують CXCR4; CD45+ /VEGF+ = частка білих кров'яних тілець, які експресують VEGF; N/A = відсутній. Усі клітини також експресують CD45.

На основі результатів, зібраних на Етапі II (дослідження CMMo/ICPD/2008) для 32 груп пацієнтів, показаних у таблицях 2 та 3 вище, ми надали характеристику продукту суспензії клітин за даним винаходом.

Зазначено, що даний винахід додатково охоплює 1-3 (попередньо наповнені) шприци, які

містять суспензію клітин за винаходом.

Крім того, якщо бажано, клітини суспензії клітин за винаходом можуть бути генетично модифіковані з допомогою будь-якого традиційного способу, включаючи, для ілюстрації, а не обмеження, процеси трансгенезу, делеції або інсерції у їхній геном тощо.

ПРОЦЕС ВИРОБНИЦТВА ПРОДУКТУ СУСПЕНЗІЇ КЛІТИН

Продукт суспензії клітин за винаходом може бути виготовлений різними способами, однак він переважно виготовляється так, як детально описано у прикладі 1, так що суспензія клітин за винаходом може вважатися мінімально обробленим продуктом BM-MNC (кістковий мозок-мононуклеарна клітина), тому що процес виробництва складається тільки зі стадій загущення, визначення розміру частинок та гравітаційної сепарації, призначених для збагачення фракції MNC в аспіраті BM, шляхом видалення плазми, тромбоцитів, RBCs і гранулоцитів.

Процес виробництва, як описано у прикладі 1, коротко викладений таким чином:

Стадія 0. Забір кісткового мозку (BM) здійснюється з допомогою багаторазових аспірацій, переважно із задньої частини гребеня клубової кістки суб'єкта під місцевою анестезією. Потім аспірати BM збирають, переважно у мішок для перенесення, який містить антикоагулянтний розчин цитрату декстрози A (ACD-A).

Стадія 1: Фільтрація — BM фільтрується, переважно під дією сили тяжіння, для видалення будь-яких невеликих кісткових уламків та для запобігання закупорюванню протягом пізніших стадій.

Стадія 2: Зниження об'єму SmartRedux — Початковий об'єм BM знижується до близько 50-100 мл, переважно шляхом використання програми SmartRedux на пристрої Sepax 2,0 та пов'язаного з ним стерильного одноразового набору SmartRedux (CS-490,1), дотримуючись інструкцій виробника. Ця стадія, яка включає видалення плазми і червоних кров'яних тілець (RBC), в результаті призводить до близько 50-100 мл продукту світлого шару кров'яного згустка, також сприяє чистоті кінцевого продукту.

Стадія зниження об'єму здійснюється один або два рази, залежно від об'єму вихідного матеріалу, що підлягає обробці. Зразки BM з об'ємами до 220 мл обробляються за один цикл, а зразки з більше ніж 220 мл обробляються за два цикли із використанням того ж самого набору.

І для одиничного, і для подвійного циклу зниження об'єму кінцевий об'єм встановлений до близько 50-100 мл.

Стадії 3-4: Градієнт густини NeatCell — Стерильний допоміжний мішок для зразків, що містить BM зі зменшеним об'ємом, проходить центрифугування в градієнті густини, що супроводжується двома промиваннями суспензії мононуклеарних клітин (MNC) з використанням промивного розчину, який переважно складається з 2-4 % HSA у сольовому розчині (обидва фармацевтичного ступеня чистоти). Приблизно близько 45 мл продукту BM-MNC збирається у вихідний мішок, а інші компоненти переміщуються до мішка для відходів.

Стадія 5: Фільтрація BM-MNC — BM-MNCs збираються із мішка продукту з використанням 50 мл шприца та фільтруються через 50 мкм фільтр у стерильну пробірку фалькон. Мішок продукту промивається промивним розчином та фільтрується для покращення відновлення MNC. Кінцевий об'єм фармацевтичної субстанції BM-MNC регулюється до 40-60 мл.

Кінцева стадія (стадія 6) полягає в отриманні кінцевого продукту суспензії клітин за винаходом. Такий кінцевий продукт дозується на основі життєздатних білих кров'яних тілець, включаючи не тільки фракцію MNC, а також гранулоцити. Оскільки MNCs є активними компонентами, процентний вміст MNCs у кінцевому продукті вважається характеристикою якості. У цьому смислі існують певні параметри процесу, які можуть впливати на характеристики якості кінцевого продукту. У зв'язку з цим стадії, які можуть впливати на процентний вміст MNCs у кінцевому продукті, які вважаються важливими під час виробництва продукту, показані у таблиці 5.

Таблиця 5:

Стадії та параметри, пов'язані з процесом виробництва

Стадія	Параметр	Умови перебігу процесу
Фільтрація	Розмір	Наявність шматочків кістки може перешкоджати ефективності очищення та може перешкоджати процедурі введення
SmartRedux	Центрифугування: швидкість та тривалість	Ця стадія гравітаційної сепарації робить безпосередній внесок у чистоту кінцевого продукту. Тому налаштування параметрів, необхідних для встановлення сепарації, є критичним.
NeatCell	Густина фіколу Об'єм фіколу	Встановлюють популяції клітин, які піддаватимуться очищенню. Використана густина - 1,077 гр/мл Впливає на відновлення MNC
	Швидкість та тривалість центрифугування фіколу	Впливає на відновлення MNC
	Швидкість та тривалість промивання центрифугування	Впливає на відновлення MNC

Абревіатури: MNC = мононуклеарні клітини

Стадія SmartRedux — ця стадія призначена для зниження початкового об'єму BM до достатньо невеликого об'єму, що підлягає обробці під час процедури Neatcell (NeatCell має максимальний вхідний об'єм 120 мл). Крім того, стадія SmartRedux включає фракціонування у RBCs, плазму та продукт світлого шару кров'яного згустка, що сприяє чистоті продукту NeatCell.

Важливі параметри, пов'язані з цією стадією, — швидкість і тривалість центрифугування, оскільки ці параметри прямо впливатимуть на відновлення MNCs з аспірату BM.

Стадія NeatCell — Використаний спосіб автоматичного збагачення MNC розроблений та стандартизований виробником, призначений для збагачування аспірату BM MNCs і тому є важливим. Hct вихідного матеріалу NeatCell — це важлива властивість матеріалу, тому що вона впливає на ефективність очищення MNC. Важливі параметри процесу зафіксовані у програмі NeatCell, включно зі швидкістю та тривалістю центрифугування, та густиною і об'ємом фіколу.

Вважається, що у компартменті MNC численні популяції клітин відіграють важливі ролі у способі дії кінцевого продукту. Отже, наявність та функціональність цих клітин розглядаються як характеристики якості (CQAs).

Фракція MNC, отримана після центрифугування в градієнті густини у розчині фіколу, містить ці клітини, що мають нижчу густину, ніж фікол, і тому не достатньо густі, щоб проникати у шар фіколу під час центрифугування. Отже, густина фіколу, використаного у процесі, прямо впливає на склад популяції MNC, і тому вважається важливим параметром процесу. Використана густина становить 1,077 г/мл.

Виробництво — це безперервний процес і не включає будь-які стадії активації або інші широкомасштабні маніпуляції з клітинами, які можуть впливати на функціональність конкретних популяцій клітин у фракції MNC. Тривалість процесу може впливати на функціональність клітин і тому у процес не включений час утримання, а повний процес переважно завершується протягом 4-5 годин в умовах чистої кімнати. Функціональність також може залежати від стану захворювання суб'єкта та загальної фізіологічної мінливості суб'єкта.

На основі зазначеного вище додатковий аспект винаходу стосується процесу виробництва суспензії клітин за винаходом, який включає:

1. Забір кісткового мозку (BM) здійснюється з допомогою багаторазових аспірацій, переважно із задньої частини гребеня клубової кістки пацієнтів під місцевою або загальною анестезією. Потім аспірати BM збирають, переважно у мішок для перенесення, який містить антикоагулянтний розчин, більш переважно розчин цитрату декстрози A (ACD-A).

2. BM фільтрується, переважно під дією сили тяжіння, для видалення будь-яких невеликих кісткових уламків та для запобігання закупорюванню протягом пізніших стадій.

3. Початковий об'єм BM знижується, переважно до близько 50-100 мл, переважно шляхом використання програми SmartRedux на пристрої Sepax 2,0 та пов'язаного з ним стерильного одноразового набору SmartRedux (CS-490,1). Ця стадія, яка включає видалення плазми та

червоних кров'яних тілець (RBC), що переважно призводить до близько 50-100 мл продукту світлого шару кров'яного згустка, також сприяє чистоті кінцевого продукту.

4. Необов'язково стадія зниження об'єму здійснюється за один або два цикли залежно від об'єму вихідного матеріалу, що підлягає обробці. Зразки BM з об'ємами до 220 мл обробляються за один цикл, а зразки з більше ніж 220 мл обробляються за два цикли із використанням того ж самого набору. Переважно, і для одиничного, і для подвійного циклу зниження об'єму кінцевий об'єм встановлений до близько 50-100 мл.

5. Стерильний допоміжний мішок для зразків, який містить BM зі зменшеним об'ємом як встановлено на стадіях 3 або 4, проходить центрифугування в градієнті густини, що супроводжується двома промиваннями суспензії мононуклеарних клітин (MNC) з використанням промивного розчину, який переважно складається з 2-4 % HSA у сольовому розчині (обидва фармацевтичного ступеня чистоти). Приблизно близько 45 мл продукту BM-MNC збирається у вихідний мішок, а інші компоненти переміщуються до мішка для відходів. Більш переважно, стерильний допоміжний мішок для зразків, який містить BM зі зменшеним об'ємом, проходить центрифугування NeatCell в градієнті густини, що супроводжується двома промиваннями суспензії мононуклеарних клітин (MNC) з використанням промивного розчину, який переважно складається з 2-4 % HSA у сольовому розчині (обидва фармацевтичного ступеня чистоти). Приблизно близько 45 мл продукту BM-MNC збирається у вихідний мішок, а інші компоненти переміщуються до мішка для відходів.

6. BM-MNCs збираються із мішка продукту, переважно з використанням 50 мл шприца, та фільтруються, переважно через 50 мкм фільтр, у стерильну пробірку фалькон. Мішок продукту промивається промивним розчином та фільтрується для покращення відновлення MNC. Кінцевий об'єм фармацевтичної субстанції BM-MNC регулюється до 40-60 мл.

Також важливо зазначити, що виробництво суспензії клітин за винаходом переважно являє собою безперервний процес, який включає збагачення мононуклеарними клітинами, де процес не включає варіанта переробки.

Після отримання фармацевтичної субстанції переважно здійснюється центрифугування MNCs при 760 x г протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Клітини ресуспендуються у кінцевому складі (переважно гепаринізованому сольовому розчині або лактат-розчині Рінгера, доповненому 2,5 % глюкозою та 1 % HSA і перенесеному до стерильного непірогенного пластикового шприца(ів) у стерильних умовах).

2-3 мл кінцевого продукту може необов'язково бути перенесено у пробірку для контролю якості (QC) та переважно 8-12 мл набирається у кожен стерильний непірогенний пластиковий шприц у стерильних умовах. Потім шприц, із захисним ковпачком для запобігання забрудненню, пакують у стерильний одноразовий пластиковий пакет із застібкою "блискавка" та транспортувальну коробку для транспортування до відділення інтервенційної радіології, яке бере участь у дослідженні, для введення суб'єкту.

Загальний огляд процесу виробництва показаний на фігурах.

- ЗАСТОСОВНІСТЬ ПРОДУКТУ СУСПЕНЗІЇ КЛІТИН

Результати, чітко проілюстровані у прикладі 2, показують, що протягом перших 12 місяців введення суспензії клітин за винаходом суб'єкти досягли клінічно значної відповіді, як продемонструвало зниження їхніх класифікацій категорій за Резерфордом 1-3 (ступінь 1) (29 (64 %) суб'єктів), що виграють порівняно з контрольною групою, у якій відреагувало лише 2 (13 %) суб'єкти.

На відвідування оцінки вихідного стану 25 (56 %) суб'єктів у терапевтичній групі, які отримують вливання суспензії клітин за винаходом, представлені з ішемічними виразками, які не загоюються, проте після 12-ого місяця після-введення на контрольному відвідуванні 18 (75 %) суб'єктів більше не мали виразок (одна велика ампутація), у 24 (60 %) суб'єктів спостерігалося підвищення TcPO2 ≥ 40 мм рт.ст., що є достовірним прогнозом вилікування. Васкулогенез оцінювали на 6-ому місяці після-введення суспензії клітин за винаходом. У пацієнтів, яких лікували суспензією клітин за винаходом, васкулогенез був присутній у 26 (62 %) суб'єктів: 7, 8 та 9 суб'єктів у найнижчій, середній, найвищій групах, відповідно.

У жодного пацієнта протягом лікування під час подальшого спостереження не спостерігалося Непередбачуваної серйозної небажаної реакції, що передбачається (SUSAR). Три AEs вважалися пов'язаними зі способом введення та були незначними реакціями в місці ін'єкції. Жоден суб'єкт не припинив випробування передчасно як результат AE і у жодного суб'єкта не було AE, пов'язаного із суспензією клітин за винаходом. Не відбувалося ніяких SAEs до введення Rexmyelocel-T та не відбувалося ніяких SAE під час перших 24 годин після введення Rexmyelocel-T. Загалом 23 суб'єктами було зареєстровано 41 SAEs протягом періоду подальшого спостереження (12 місяців), 17 SAEs (дев'ятьма суб'єкти) у контрольній групі та 24

SAEs (14 суб'єктами) у терапевничних групах, які приймали Rexmyelocel-T: BM-MNCs з нижчою дозою 1 × 10^8: чотири суб'єкти; BM-MNCs з середньою дозою 5 × 10^8: чотири суб'єкти; BM-MNCs з найвищою дозою 1 × 10^9: шість суб'єктів. Два суб'єкти померли в результаті серцево-судинного захворювання.

Тому, таким чином, зрозуміло, що суспензія клітин за винаходом є особливо переважною при лікуванні захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок (PDA), переважно CLI, більш переважно CLI із DM у пацієнтів, що не піддаються реваскуляризації із застосуванням хірургічного відключення або ендоваскулярних методів.

Отже, додатковий аспект винаходу стосується суспензії клітин, попередньо наповненого шприца або фармацевтичної композиції, як визначено у розділі, який називається "ПРОДУКТ СУСПЕНЗІЇ КЛІТИН", які застосовуються при лікуванні або покращенні стану захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок, переважно у суб'єкта людина.

Переважно захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок являє собою критичну ішемію кінцівок.

Більш переважно суспензія клітин, попередньо наповнений шприц або фармацевтична композиція, як визначено у розділі, який називається "ПРОДУКТ СУСПЕНЗІЇ КЛІТИН", застосовуються у способі лікування захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок, переважно критичної ішемії кінцівок, з допомогою внутрішньоартеріального введення, де притік крові низького тиску до 4 атмосфер отримується шляхом розміщення надувного балона близько до оклюзійного ураження судини на дистальній стегновій або підколінній артерії, та вливання зазначеної суспензії клітин внутрішньоартеріально.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Матеріали та способи

1. Суспензія клітин та спосіб її виробництва.

Щоб проілюструвати даний винахід, у подальших прикладах використано суспензію клітин згідно з даним винаходом, виготовлену з аутологічної суспензія клітин BM-MNCs, складеної з кількох типів зрілих клітин, а також гематопоетичних клітин-попередників. Склад кінцевого продукту базувався на кількості присутніх життєздатних WBCs.

Була проведена характеристика суспензії клітин за винаходом, використовуючи загальний та диференційований підрахунки лейкоцитів з допомогою автоматичного гематологічного аналізатора (ABX Pentra 60, Horiba Medical). Встановлювали процентні вмісти клітин-попередників та WBCs (CD45+ клітини), які експресують рецептор CXCR4 фактора міграції SDF-1, або WBCs, які експресують рецептор 2 фактора ангіогенезу VEGF, застосовуючи проточний цитометр (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotec).

У таблиці 6 представлені концентрація білих кров'яних тілець (WBCs), частка лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів та клітин-попередників і загальна кількість WBCs, які експресують CXCR4 або VEGFR2, із 32 партій, які пройшли клінічне випробування.

Таблиця 6

Склад клітин із 32 партій, які пройшли клінічне випробування, з CMMo/ICPD/2008

Тип клітини	Спосіб/маркер поверхні клітини	Кількість/ співвідношення клітин
Лейкоцити (білі кров'яні тільця)	ACC	$1 \times 10^8 – 1 \times 10^9$
Червоні кров'яні тільця/білі кров'яні тільця	Співвідношення	1,15-6,7x
Тромбоцити/білі кров'яні тільця	Співвідношення	2,2-31,7x
Нейтрофіли	ACC	$2,5 \times 10^7$-$5,6 \times 10^8$
Лімфоцити	ACC	$2,4 \times 10^7 – 5,1 \times 10^8$
Моноцити	ACC	$6,4 \times 10^6 – 2,0 \times 10^8$
Еозинофіли	ACC	0-$7,1 \times 10^7$
Базофіли	ACC	$1,2 \times 10^6$-$7,1 \times 10^7$
Гранулоцити	ACC	$2,8 \times 10^7$-$6,1 \times 10^8$
Мононуклеарні клітини	WBC – гранулоцити	$3,6 \times 10^7$-$7,8 \times 10^8$
Гематопоетичні стовбурові клітини	Проточна цитометрія CD34+	$1,4 \times 10^6$-$5,4 \times 10^7$
Клітини, які експресують CXCR4, що являє собою рецептор для маркера міграції SDF-1	Проточна цитометрія CXCR4+	$5,4 \times 10^6$-$3,2 \times 10^8$
Стовбурові клітини, які експресують CXCR4, що являє собою рецептор для маркера міграції SDF-1	Проточна цитометрія CD34+/CXCR4+	$1,0 \times 10^4$-$4,1 \times 10^6$
Клітини, які експресують рецептор VEGFR2 для фактора ангіогенезу VEGF	Проточна цитометрія VEGFR2	$7,0 \times 10^4$-$2,5 \times 10^7$

Абревіатури: ACC = автоматичний аналізатор, WBC = білі кров'яні тільця. Дані представлені як від мінімуму до максимуму.

Суспензія клітин за винаходом виготовлена в умовах GMP. Усі стадії процесу здійснені у чистій кімнаті класу B, де напівзакриті маніпуляції (кріплення голки та кріплення типу Люера-Лока) та відкриті маніпуляції здійснювали у BSC класу A.

Коротко, кістковий мозок фільтрувався в асептичних умовах для видалення шматочків кістки, з подальшою автоматичною стадією зниження об'єму для досягення достатньо невеликого об'єму, що підлягає подальшій обробці.

Далі клітини піддавали автоматичному центрифугуванню в градієнті густини у розчині фіколу включно зі стадіями промивання. Продукт фільтрували, що в результаті призводило до 50 мл фракції BM-MNCs, яка й була фармацевтичною субстанцією.

Повний процес виробництва фармацевтичної субстанції був закінчений, за винятком кріплення голки та кріплення типу Люера-Лока. Стадії відокремлення клітин здійснені в автоматизованій системі, щоб забезпечити стандартизацію процесу.

Схема послідовності процесу виробництва суспензії клітин за винаходом надана на фігурі 1. Крім того, процес виробництва детально описаний нижче:

- Стадія 0: Забір кісткового мозку (BM) здійснений з допомогою багаторазових аспірацій із задньої частини гребеня клубової кістки суб'єкта під місцевою анестезією, з використанням 5 мл шприців, приєднаних до аспіратора BM. Аспірати BM були зібрані у 600 мл мішок для перенесення, який містить антикоагулянтний розчин цитрату декстрози A (A ACD-A), поки не досягався об'єм приблизно 250-350 мл. Мішок для перенесення, який містить свіжий BM, упаковується відповідно до інструкцій та готується для відправлення. BM перевозиться при кімнатній температурі (15-21 °C) до Rexgenero в одноразовому відправленні для негайної обробки.

- Стадія 1: Фільтрація — BM фільтрували під дією сили тяжіння через 200 мкм вбудований фільтр для видалення будь-яких невеликих кісткових уламків та запобігання закупорюванню

протягом пізніших стадій. Після фільтрації зразок збирали для випробування у процесі виробництва, а мішок для забору зважили, з масою, перетвореною в об'єм, що забезпечує вхідний об'єм у налаштуваннях для обробки клітин.

- Стадія 2: Зниження об'єму SmartRedux — Початковий об'єм BM приблизно 300 мл знижували до 50 мл, використовуючи програму SmartRedux на пристрої Sepax 2,0 та пов'язаний з ним стерильний одноразовий набір SmartRedux (CS-490,1), дотримуючись інструкцій виробника. Ця стадія, яка включає видалення плазми та червоних кров'яних тілець (RBC), в результаті призводить до 50 мл продукту світлого шару кров'яного згустка, також сприяє чистоті кінцевого продукту. Стадія зниження об'єму здіснена один раз або двічі — залежно від об'єму вихідного матеріалу, що підлягає обробці. Зразки BM з об'ємами до 220 мл обробляли за один цикл, а зразки з більше ніж 220 мл обробляли за два цикли із використанням того ж самого набору. І для одиничного, і для подвійного циклу зниження об'єму був встановлений кінцевий об'єм до 50 мл.

- Стадії 3-4: Градієнт густини NeatCell — Стерильний допоміжний мішок для зразків, який містить BM зі зменшеним об'ємом, під'єднували до набору Neatcell (CS-900,2) та обробляли, використовуючи програму NeatCell на пристрої Sepax 2,0, дотримуючись інструкцій виробника. Ця стадія складається з центрифугування в градієнті густини у розчині фіколу 1077, що супроводжується двома промиваннями суспензії мононуклеарних клітин (MNC) з використанням промивного розчину, який складається з 2,5 % глюкози або 4 % HSA у сольовому розчині (обидва фармацевтичного ступеня чистоти). Приблизно 45 мл продукту BM-MNC відбирали у вихідний мішок, а інші компоненти видаляли до мішка для відходів.

- Стадії 5: Фільтрація BM-MNC — BM-MNCs були зібрані з мішка продукту, використовуючи 50 мл шприц, та фільтрували через 50 мкм фільтр у стерильну пробірку фалькон. Мішок продукту промивали промивним розчином та фільтрували для покращення відновлення MNC. Кінцевий об'єм фармацевтичної субстанції BM-MNC доводили до 50 мл.

2. Відбір досліджуваної популяції

Загалом 60 суб'єктів з CLI Ступеня II за Резерфордом (Категорія 4) або ступеня III (Категорія 5) та DM, які не змогли пройти хірургічну або ендоваскулярну реваскуляризацію (50 чоловіків (83 %) та 10 жінок (17 %)) середнього віку 64,3 (± 9,5) (діапазон: 46-80 років) були зареєстровані та рандомізовано розділені у співвідношенні 1:1:1:1 для отримання одноразового введення суспензії клітин за винаходом (на одній із трьох рівнів доз; 1×10^8, 5×10^8 або 1×10^9 BM-MNCs; 15 суб'єктів на терапевтичну групу), додатково до стандарту лікування або для лікування лише відповідно до стандарту лікування (15 суб'єктів). Суспензія клітин за винаходом була введена внутрішньоартеріально як одноразове вливання. Для цього випробування була застосована стратифікаційна рандомізація, а страти були побудовані для CLI Ступеня II та III за Резерфордом (Категорії 4 та 5), що не піддавалися ендоваскулярній або хірургічній реваскуляризації згідно з Документом із лікування захворювань периферичних артерій (TASC II) Транс-атлантичного міжгромадського погоджувального документа. У випадку, якщо CLI наявна в обох ногах, вливання вводили у ногу, яка визначена дослідником як така, що має захворювання на більш пізній стадії/важке захворювання, за умови, що на нозі ще не було хірургічної ампутації пальців або вище. Суб'єктів випробування оцінювали на відвідуванні для оцінки вихідного стану (візит 1), через 24 години та 1, 3, 6, 9, 12 місяці після-введення Rexmyelocel-T (відвідування 3, 4, 5, 6, 7, та 8 відповідно). Суб'єкти, віднесені до контрольної групи, не були зобов'язані з'являтися на відвідування 2 та 3.

3. Критерії включення

Суб'єкти були допущені до включення у випробування, якщо вони відповідали усім наступним критеріям включення:

1. Суб'єкти обох статей віком ≥ 18 та ≤ 80 років.

2. Суб'єкти, які проходять лікування від DM типу I або типу II.

3. CLI Ступеня II та III (Категорія 4 та 5) за Резерфордом.

4. Нездатність до хірургічної або недоваскулярної реваскуляризації згідно з рекомендаціями TASC II.

5. Тривалість життя> двох років.

6. У кінцівці, яка підлягатиме лікуванню протягом наступних 12 місяців після включення, не очікується великої ампутації.

7. Нормальні біохімічні показники, що характеризуються: лейкоцити ≥ 3000/мл, нейтрофіли ≥ 1500/мл, тромбоцити ≥ 100000/мм^3, AST/ALT ≤ 2,5 х стандартний діапазон, креатинін ≤ 2,5 мг/дл.

8. Суб'єкти надали письмову інформовану згоду на участь у випробуванні.

9. Жінки репродуктивного віку повинні мати негативні результати тесту на вагітність,

дотримуючись стандартних процедур кожної лікарні, що виконуються під час включення у випробування, та зобов'язуються використовувати медично затвердженні протизаплідні засоби упродовж випробування.

4. Критерії виключення

Суб'єкти були виключені із участі у випробуванні, якщо вони відповідали будь-якому із наступних критеріїв виключення:

1. Неоплазія або гематологічне захворювання в анамнезі (мієлопроліферативне захворювання, лейкемія або мієлодиспластичний синдром).

2. Суб'єкти із неконтрольованою гіпертензією (визначена як кров'яний тиск > 180 мм рт.ст./110 мм рт.ст. на більше ніж один випадок).

3. Важка серцева недостатність (Нью-Йоркська асоціація кардіологів, стадія IV).

4. Суб'єкти зі злоякісною шлуночковою аритмією або нестабільною стенокардією.

5. Діагностування тромбозу глибоких вен за три місяці до скринінгу.

6. Активна інфекція або гангрена, присутні у той же день, коли заплановане введення Rexmyelocel-T.

7. Супутні терапії, включно з гіпербаричною оксигенотерапією, вазоактивними речовинами, інгібіторами Cox-II.

8. BMI > 40 кг/м^2.

9. Суб'єкти з діагнозом алкоголізм на момент включення.

10. Проліферативна ретинопатія.

11. Супутнє захворювання, яке зменшило тривалість життя до < одного року.

12. HIV інфекція, гепатит B або гепатит C.

13. Суб'єкти, які не бажали або не змогли виконати всі аспекти протоколу.

14. Серцева недостатність або фракція викиду < 30 %.

15. Інсульт або інфаркт міокарда за три місяці до скринінгового візиту.

16. Анемія (гемоглобін < 10 г/дл).

17. Лейкопенія.

18. Тромбоцитопенія (< 100,000 тромбоцитів/мм^3).

19. Вагітні жінки або жінки репродуктивного віку, які не застосовували відповідну контрацепцію.

20. Суб'єкти, які брали участь у клінічному випробуванні протягом трьох місяців перед скринінгом для цього випробування.

5. Виключення суб'єктів із дослідження

Суб'єкти можуть бути виключені з випробування через будь-яку із наступних причин:

• Нездатність досягати оптимальної кінцевої концентрації суспензії клітин на основі результату при рандомізації. У цьому випадку PI повинен вирішити чи буде вводитися продукт.

• Наявність серйозного небажаного явища (SAE) між інформованою згодою на заплановану дату введення.

• Серйозне відхилення від протоколу. Відкриття після рандомізації про те, що суб'єкт не відповідає протокольним критеріям включення в дослідження або не дотримувався вимог протоколу, та подальша участь представляла неприйнятний ризик для здоров'я суб'єкта.

• Суб'єкт був підданий AE або події попередньої обробки, що вимагало недиференційованого припинення, оскільки продовження участі наклало б неприйнятний ризик для здоров'я суб'єкта або суб'єкт не бажав продовжувати через AE або небажані якища, які виникли до початку лікування.

• Добровільне вилучення. Суб'єкт (або законний представник суб'єкта) забажав вийти із випробування.

• Пацієнт, з яким втрачений зв'язок для спостереження. Пацієнт не повернувся до клініки, а спроби зв'язатися з ним виявилися безуспішними. Спроби зв'язатися з пацієнтом були задукоментовані. Якщо пацієнт вийшов із випробування, то, якщо це можливо, виконані усі процедури, заплановані на візит передчасного завершення дослідження.

Згідно з Правилами проведення якісних клінічних досліджень, усім суб'єктам, які вийшли із випробування передчасно, були рекомендовані альтернативні способи лікування. Якщо вихід із випробування пов'язаний з появою значних AE (побічні ефекти), дослідник повинен був контролювати суб'єкт до завершення, тобто, поки AE не будуть усунуті або поки не буде визначено, що вони будуть постійною подією. Головна причина для призупинення випробування була записана на CRF.

6. Призначення лікування

Досліджуваний продукт

Під місцевою анестезією та заспокійливим був зібраний об'єм BM (90-420 мл) з допомогою

послідовних аспірацій із гребеня клубової кістки. ВМ зібрали у мішок для перенесення, який містить розчин ACD-A як антикоагулянт у співвідношенні ВМ:об'єм 1:5 (див. пункт 1 вище).

Суспензія BM-MNCs була отримана з допомогою центрифугування в градієнті густини, без модифікації або додавання будь-якого продукту, який може вплинути на її біологічну функціональність.

Суспензію клітин за винаходом вводили в одноразових дозах:

- 1×10^8 BM-MNCs.
- 5×10^8 BM-MNCs.
- 1×10^9 BM-MNCs.

Суспензію клітин за винаходом вводили, використовуючи внутрішньоартеріальний катетер. Артерії цільової кінцівки були канюльовані через трансфеморальний доступ з допомогою балонного катетера з системою доставки стента по провіднику "over-the-wire" (пристосований до підколінного діаметра), що був просунутий максимально дистально, проте в усіх випадках нижче коліна та розташований близько до оклюзійних уражень судини, зазвичай на дистальній стегновій або підколінній артерії. На цьому етапі надувний балон був наповнений повітрям, щоб заблокувати притік крові, і суспензію клітин за винаходом повільно вливали упродовж трьох хвилин (хв.). Після введення з надувного балона випускали повітря і початковий притік крові відновлювався.

Введення суспензії клітин за винаходом здійснювали протягом трьох-п'яти годин після забору ВМ спеціалістом із лікування судин (інтервенційним радіологом або судинним хірургом), доставленим безпосередньо із відділення клітинної терапії.

Усіх суб'єктів лікували згідно з сучасним стандартом лікування для підколінного важкого атеросклеротичного захворювання судин, як описано протоколом лікування TASC II.

7. Зміна класифікації за Резерфордом

Критична ішемія кінцівок включає пацієнтів із болем у стані спокою у нижній кінцівці, ішемічними виразками або гангреною, зумовленими серйозним порушенням притоку крові в уражену кінцівку, що триває протягом більше ніж двох тижнів. Класифікація суб'єктів із PDA проводилася упродовж усього випробування спеціалістами із лікування судин з використанням Ступеня за Резерфордом, замість Категорій, тому що не здійснювалося стандартне випробування вправи на біговій доріжці і тому неможливо було формально відрізнити легку, середню або важку ІС.

ІС (Ступінь I, Категорії 1-3) була визначена як м'язовий біль у кінцівці, дискомфорт або слабкість, що викликається вправами (виробляється при ходьбі або м'язовій активності) та швидко полегшується завдяки припиненню активності, на відміну від болю у стані спокою, який продовжується у пацієнтів із CLI.

Ступінь за Резерфордом 0 використовували для визначення тих суб'єктів, які не мали симптомів, або просто мали відчуття холоду, або не мали клінічних ознак оклюзійного захворювання, або помірного зниження пульсу.

Ішемічна виразка, яка не виліковується, означає, що має місце недостатня артеріальна перфузія у нижній кінцівці для підтримання запальної відповіді, необхідної для вилікування. У зв'язку з цим, зазвичай присутній ішемічний біль у стані спокою та об'єктивне підтвердження дифузної ішемії стопи (CLI Ступінь за Резерфордом III-IV, Категорії 5-6).

Ішемічний біль у стані спокою вказує на дифузну ішемію стопи (Ступені II-IV, Категорії 4-6) та не може легко знеболюватися аналгетиками. Біль локалізується у передній частині стопи та пальцях ноги або біля фокальних ішемічних ділянок пошкодження. Стан погіршується при підніманні кінцівки. Дифузна ішемія стопи з ішемічним болем у стані спокою зазвичай асоціюється з тиском на кісточку < 40 мм рт.ст. та ABI <0,8.

Суб'єктів класифікували на основі наявності ішемічного болю у стані спокою (з або без ішемічних виразок, які не виліковуються), ішемічного м'язового болю, що викликається вправами (ІС), або асимптоматичного захворювання. Щоб класифікувати суб'єкти випробування, клінічні симптоми поєднували з об'єктивним підтвердженням дифузної ішемії стопи шляхом вимірювання ABI (якщо це можна було б достовірно оцінити).

Була оцінена зміна класифікації за Резерфордом від вихідних даних до даних на 1, 3, 6, 9 та 12 місяцях.

Клінічне покращення було визначене як разове покращення Ступеня за Резерфордом (Категорія) від вихідних даних. Клінічно значне покращення визначали як зміну класифікації за Резерфордом від Категорії CLI 4 або 5 до Категорії ІС 3 або нижче на 3, 6, 9, або 12 місяцях після введення Rexmyelocel-T.

8. Зміна кількості виразок та розміру виразок

Розмір найбільшої виразки у цільовій нижній кінцівці, а також загальну кількість виразок на

обох ногах записували в Індивідувальну реєстраційну карту (CRF). Оцінили вилікування виразок та зміни розміру виразок від вихідних даних до даних на 1, 3, 6, 9 та 12 місяцях.

9. Васкулогенез

Васкулогенез оцінювали на шостому місяці після введення суспензії клітин за винаходом Комітетом з оцінки, який складали два інтервенційні радіологи, які провели незалежне сліпе оцінювання шляхом порівняння ангіограми вихідних даних, зробленої перед лікуванням, із ангіограмою, зробленою на шостому місяці після-введення Rexmyelocel-T.

Вважалося, що васкулогенез відбувався, якщо були наявні: поздовжній ріст артерій, які вже існували, поперечний ріст артерій, які вже існували, збільшення кількості колатеральних кровеносних судин, збільшення розміру та/або щільності колатеральних кровеносних судин або збільшення розміру та/або щільності великої підколінної судини.

10. Великі ампутації (цільова кінцівка)

Велику ампутацію розглядали як ампутацію нижньої кінцівкі над щиколоткою.

11. Зміна ABI

ABI визначений як співвідношення систолічного кров'яного тиску, виміряного на щиколотці, до такого, що виміряний на плечовій артерії. Пацієнту доручили відпочити протягом 5-10 хв. у положенні лежачи на спині, розслабитися, голова та п'яти підтримуються, у кімнаті при температурі 19 °C–22 °C. Для вимірювання кров'яного тиску і на щиколотці, і на руці вибирали манжету для вимірювання кров'яного тиску відповідного розміру. І для щиколокти, і для руки манжету розміщували навколо кінцівки, застосовуючи спосіб прямого обгортання. Використали 8-10-МГц доплерівський ультразвуковий датчик, а на датчик нанесли доплерівський гель. Доплерівський ультразвуковий датчик також використали для встановлення брахіального притоку крові під час вимірювання тиску на руці. Були виміряні брахіальний систолічний тиск обох рук і передній великогомілковий та задній великогомілковий систолічний тиски кінцівки, про яку йдеться.

Була записана зміна ABI від вихідних даних до даних на 1, 3, 6, 9 та 12 місяцях у суб'єктів, у яких може бути надійно оцінений тиск на кісточку.

12. Зміни черезшкірного дослідження парціального тиску кисню

Черезшкірна оксиметрія, TcPO2, - це місцеве неінвазивне вимірювання, що відображає кількість O_2, що поширився від капілярів, через епідерміс. TcPO2 вимірювали з допомогою TCM3 (Radiometer Medical ApS, Копенгаген, Данія).

Записували зміну TcPO2 від вихідних даних до даних на 1, 3, 6, 9 та 12 місяцях.

13. Визначення побічних ефектів

Побічні ефекти (AEs) визначали як будь-яке небажане явище, що виникає у суб'єкта під час випробування, що вважається або не вважається пов'язаним із досліджуваним продуктом. Тому AE може бути будь-яким несприятливим та непердбаченим проявом (включаючи ненормальні дані дослідження), симптомом або захворюванням, тимчасово пов'язаним із застосуванням лікарського (досліджуваного) препарату, чи було це пов'язано або не пов'язано з лікарським (досліджуваним) препаратом. Це включало загострення існуючих станів або подій, супутні хвороби, взаємодію ліків або значне погіршення ознаки, що досліджується, що не було зазначено в іншому місці в історії хвороби відповідно до певних оцінок ефективності. Передбачені коливання існуючих станів, включаючи захворювання, яке досліджується, що не представляє клінічно значного загострення або погіршення, не вважалися AEs.

Наступні дані були задукоментовані для кожного AE:

• Опис ефекту симптому.

• Класифікація "серйозний" або "несерйозний".

• Ступінь важкості: слабкий (AE, що легко переноситься суб'єктом, спричиняє мінімальний дискомфорт та не перешкоджає щоденній активності), середній (AE, що достатньо дискомфортний, щоб перешкоджати нормальній щоденній активності; може бути необхідне втручання), важкий (AE, що заважає нормальній щоденній активності; зазвичай необхідне лікування або інше втручання).

• Дата першої події та дата припинення запальних явищ (якщо необхідно).

• Вжиті заходи: будь-які заходи, повна відміна експериментального лікування, введення супутнього лікарського препарату, ведення нефармакологічного лікування або госпіталізація/продовжена госпіталізація (SAE).

• Причинно-наслідковий зв'язок. Дослідник докладав усіх зусиль для оцінки взаємозв'язку AE, якщо такий є, з Rexmyelocel-T. Причинний зв'язок був оцінений з використанням наступних категорії:

- Наврядчи, якщо було мало доказів, щоб запропонувати причинно-наслідковий зв'язок (наприклад, ефект не відбувся протягом відповідного періоду після введення Rexmyelocel-T,

або мало місце інше обгрунтоване пояснення для ефекту (наприклад клінічний стан суб'єкта, інші супутні терапії). Можливо, якщо є доказ, щоб запропонувати можливий причинно-наслідковий зв'язок (наприклад, тому що ефект відбувся протягом відповідного періоду після введення Rexmyelocel-T, навіть якщо інші фактори можуть сприяти ефекту (наприклад, клінічний стан суб'єкта, інші супутні терапії). Можливо, якщо є доказ, щоб запропонувати причинно-наслідковий зв'язок, то вплив інших факторів малоймовірний.

- Безсумнівно, якщо є явний доказ, щоб запропонувати причинно-наслідковий зв'язок, то можливий внесок інших факторів можна виключити.

- Незчитувано, якщо є недостатній або неповній доказ для здійснення клінічної оцінки з причинно-наслідкового зв'язку.

• Підсумок ефекту (невідомий, вилікований, ще не вилікований, видужання з наслідками, смерть (із зазначенням дати та причини)).

14. Визначення серйозного небажаного явища

SAE було визначене як AE, що відповідає одному або кільком із наступних критеріїв серйозних наслідків:

- Призвело до смерті.
- Становило загрозу для життя.
- Потребувало стаціонарної госпіталізації або продовження існуючої госпіталізації.
- Призвело до достійкої або значної непрацездатності або інвалідності.
- Було вродженою аномалією або пороком розвитку.
- Було важливим медичним явищем, яке, на основі медичного та наукового висновку, мало можливість піддавати суб'єкта небезпеці або потребувало втручання, щоб запобігти одному із зазначених вище наслідків.

AE вважався таким, що становить загрозу для життя, якщо суб'єкт був на межі смерті на момент ефекту. Це не вважалося ефектом, що теоретично міг стати причиною смерті, якби він був більш важким.

Приклад 2. Результати

1. Зміна класифікації за Резерфордом

Зміна категорії за Резерфордом PDA у пацієнтів у контрольній групі та пацієнтів, яких лікували суспензією клітин за винаходом, на вихідному рівні та після 3, 6, 9, та 12 місяців представлена у таблиці 7 нижче.

Під час відвідування для оцінки вихідного стану суб'єкти у терапевтичних групах із суспензією клітин за винаходом були класифіковані як CLI Категорії 4 за Резерфордом (Ступінь II) або Категорії 5 за Резерфордом (Ступінь III) (20 (44 %) суб'єктів та 25 (56 %) суб'єктів, відповідно. Результати показали, що протягом перших 12 місяців більшість суб'єктів, яких лікували суспензією клітин за винаходом, досягли клінічно значної відповіді, як продемонстровано покращенням, тобто зниженням їхньої класифікації до Категорій 0-3 за Резерфордом (Ступінь 0 та 1) у 28 (68 %) суб'єктів.

Таблиця 7:

Класифікація за Резерфордом на вихідному рівні та на 3, 6, 9 і 12 місяцях після введення Rexmyelocel-T

Категорія	Сту-пінь	Конт-рольні пацієн-ти (n, %)	Найнижча доза 1×10^8 BM-MNCs (n, %)	Середня доза 5×10^8 BM-MNCs (n, %)	Найвища доза 1×10^9 BM-MNCs (n, %)	Усі суб'єкти, яких лікували (n, %)
Вихідні дані						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	0	0	0	0	0
4	II	6 (40)	7 (47)	7 (47)	6 (40)	20 (44)
5	III	9 (60)	8 (53)	8 (53)	9 (60)	25 (56)
6	IV	0	0	0	0	0
Загалом		15	15	15	15	45
3-й місяць						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	0	3 (20)	6 (40)	6 (40)	15 (33)
4	II	7 (50)	6 (40)	3 (20)	1 (7)	10 (22)

5	III	6 (43)	6 (40)	6 (40)	8 (53)	20 (44)
6	IV	1 (7)	0	0	0	0
Загалом		14	15	15	15	45
6-й місяць						
0	0	0	0	1 (7)	0	1 (2)
1-3	I	1 (8)	7 (47)	6 (40)	7 (47)	20 (44)
4	II	7 (58)	5 (33)	3 (20)	0 (0)	8 (18)
5	III	3 (25)	3 (20)	5 (33)	8 (53)	16 (36)
6	IV	1 (8)	0	0	0	0
Загалом		12	15	15	15	45
9-й місяць						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	1 (8)	9 (69)	8 (57)	7 (47)	24 (57)
4	II	7 (58)	2 (15)	2 (14)	2 (13)	6 (14)
5	III	3 (25)	2 (15)	4 (29)	6 (40)	12 (29)
6	IV	1 (8)	0	0	0	0
Загалом		12	13	14	15	42
12-й місяць						
0	0	0	0	2 (14)	0	2 (5)
1-3	I	2 (18)	10 (77)	9 (64)	7 (50)	26 (63)
4	II	5 (46)	0	2 (14)	5 (36)	7 (17)
5	III	4 (36)	3 (23)	1 (7)	2 (14)	6 (15)
6	IV	0	0	0	0	0
Загалом		11	13	14	14	41

Абревіатури: BMNCs = Мононуклеарні клітини, отримані з кісткового мозку

Через три місяці після введення 15 (33 %) суб'єктів, яких лікували суспензією клітин за винаходом, та 12 (40 %) суб'єктів у групах із середньою та високою дозами більше не страждали від болю у стані спокою або некрозу тканин та були класифіковані як Категорії 0-3 за Резерфордом (Ступінь 0 та I), що надалі збільшилася до 21 (46 %) суб'єкта, 24 (57 %) та 28 (68 %) на 6, 9 та 12-й місяць після-введення, відповідно. Для суб'єктів у групах із середньою та високою дозами це було 13 (43 %), 15 (50 %) та 18 (64 %) на 6, 9 та 12-й місяць після-введення, відповідно. Це вигідно порівняно з контрольною групою, у якій 0 (0 %), 1 (8 %), 1 (8 %) та 2 (18 %) суб'єкти, стан яких покращився до Категорій 1-3 за Резерфордом (Ступінь I) після 3, 6, 9 та 12 місяців, відповідно.

Один суб'єкт, віднесений до контрольної групи, відкликав інформовану згоду після рандомізації, один суб'єкт помер через серцево-судинне захворювання перед Контрольним відвідуванням на 6 місяці, один пацієнт був підданий великій ампутації перед Контрольним відвідуванням на 6 місяці, а один суб'єкт був втрачений для подальшого спостереження до відвідування через 12 місяців. Два суб'єкти, які отримали нижчу дозу Rexmyelocel-T, були піддані великій ампутації після шести місяців після введення у цільовій кінцівці.

Загалом 28 із 45 (62 %) суб'єктів у терапевтичних групах із суспензією клітин за винаходом на 12-й місяць після-введення, з яких 18 із 30 (63 %) у групах із середньою та високою дозами, не виявляли ішемічного болю у стані спокою або ішемічних виразок порівняно з контрольною групою, де 9 із 11 (82 %) суб'єктів повідомили про біль у стані спокою або про наявність ішемічних виразок, які не виліковуються (4 (36 %) суб'єкти).

Коли застосовується перенесення даних останнього спостереження (LOCF) (виключаючи суб'єкти з великою ампутацією кінцівки; ці суб'єкти вважалися такими, що не відповідають на лікування), результати показують, що протягом перших 12 місяців після-введення суспензії клітин за винаходом досягнута клінічно значна відповідь, як продемонстровано зниженням їхньої класифікації до Категорій 0-3 за Резерфордом (Ступінь 0 та I) у 28 (64 %) з усіх суб'єктів, яких лікували, та 18 (63 %) у групах із середньою та високою дозами (дивитися таблицю 8 та Фігуру 2 і Фігуру 3).

Через три місяці після введення Rexmyelocel-T 15 (33 %) суб'єктів, яких лікували Rexmyelocel-T, з яких 12 (40 %) у групах із середньою та високою дозами, більше не страждали від болю у стані спокою або некрозу тканин та були класифіковані як Категорії 0-3 за Резерфордом (Ступінь 0 та I), що надалі збільшилася до 21 (46 %) суб'єкта та 24 (53 %) суб'єктів на 6 і 9 місяцях після-введення, відповідно для усіх пацієнтів, яких лікували. У групах із середньою та високою дозами 14 (47 %) та 15 (50 %) суб'єктів були класифіковані як Категорії 0-

3 за Резерфордом на 6 та 9 місяцях, відповідно. Це вигідно порівняно з контрольною групою, у якій лише 0 (0 %), 1 (8 %), 1 (7 %) та 2 (13 %) суб'єкти, стан яких покращився до Категорій 1-3 за Резерфордом (Ступінь I) після 3, 6, 9 та 12 місяців, відповідно.

Таблиця 8:

Класифікація за Резерфордом на вихідному рівні та на 3, 6, 9 і 12 місяцях після введення Rexmyelocel-T (включаючи ампутації та летальні випадки) — LOCF

Категорія	Сту-пінь	Конт-рольні пацієн-ти (N, %)	Низька доза 1×10^8 BM-MNCs (N, %)	Середня доза 5×10^8 BM-MNCs (N, %)	Висока доза 1×10^9 BM-MNCs (N, %)	Усі пацієнти, яких лікували (N, %)
Вихідні дані						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	0	0	0	0	0
4	II	6 (40)	7 (47)	7 (47)	6 (40)	20 (44)
5	III	9 (60)	8 (53)	8 (53)	9 (60)	25 (56)
6	IV	0	0	0	0	0
З ампутацією		0	0	0	0	0
Померли		0	0	0	0	0
Загалом		15	15	15	15	45
3-й місяць						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	0	3 (20)	6 (40)	6 (40)	15 (33)
4	II	7 (47)	6 (40)	3 (20)	1 (7)	10 (22)
5	III	7 (47)	6 (40)	6 (40)	8 (53)	20 (44)
6	IV	1 (6)	0	0	0	0
З ампутацією		0	0	0	0	0
Померли		0	0	0	0	0
Загалом		15	15	15	15	45
6-й місяць						
0	0	0	0	1 (7)	0	1 (2)
1-3	I	1 (7)	7 (47)	6 (40)	7 (47)	20 (44)
4	II	7 (47)	5 (33)	3 (20)	0	8 (18)
5	III	4 (27)	3 (20)	5 (33)	8 (53)	16 (36)
6	IV	1 (7)	0	0	0	0
З ампутацією		1 (7)	0	0	0	0
Померли		1 (7)	0	0	0	0
Загалом		15	15	15	15	45
9-й місяць						
0	0	0	0	0	0	0
1-3	I	1 (7)	9 (60)	8 (53)	7 (47)	24 (53)
4	II	7 (47)	2 (20)	3 (20)	2 (13)	8 (18)
5	III	4 (27)	2 (20)	4 (27)	6 (40)	13 (29)
6	IV	1 (7)	0	0	0	0
З ампутацією		1 (7)	2 (13)	0	0	2 (4)
Померли		1 (7)	0	0	0	0
Загалом		15	15	15	15	45
12-й місяць						
0	0	0	0	2 (13)	0	2 (4)
1-3	I	2 (13)	10 (67)	9 (60)	7 (50)	26 (58)
4	II	6 (40)	0 (7)	3 (20)	5 (36)	8 (18)
5	III	5 (33)	3 (27)	1 (7)	2 (14)	6 (13)

6	IV	0	0	0	0	0
3 ампута-цією		1 (7)	2 (13)	0	0	2 (4)
Померли		1 (7)	0	0	1 (7)	1 (2)
Загалом		15	15	15	15	45

Абревіатури: BMNCs = Мононуклеарні клітини, отримані з кісткового мозку

Фігура 4 і

Таблиця 9 показали клінічно значну відповідь у багатьох суб'єктів у терапевтичних групах із суспензією клітин за винаходом порвіняно з контрольною групою на усіх контрольних відвідуваннях після введення. Через 12 місяців після введення Rexmyelocel-T більшість суб'єктів в усіх групах з Rexmyelocel-T показала клінічно значну відповідь порівняно з контрольною групою: 34 (76 %) суб'єкти (10, 13 та 11 суб'єктів у групах з найнижчою, середньою, найвищою дозами Rexmyelocel-T, відповідно) порівняно з 2 (13 %) суб'єктами.

Таблиця 9:

Класифікація за Резерфордом на 3, 6, 9 та 12 місяцях після введення Rexmyelocel-T — LOCF

		Контро-льні пацієнти (N, %)	Найнижча доза 1×10^8 BM-MNCs (N, %)	Середня доза 5×10^8 BM-MNCs (N, %)	Найвища доза 1×10^9 BM-MNCs (N, %)	Усі пацієнти, яких лікували (N, %)
3-й місяць						
Відповідь		1 (7)	5 (33)	7 (47)	6 (40)	18 (40)
Утримання		13 (87)	10 (67)	8 (53)	9 (60)	27 (60)
Відсутність відповіді		1 (7)	0	0	0	0
Загалом		15	15	15	15	45
6-й місяць						
Відповідь		2 (13)	10 (67)	8 (53)	7 (47)	25 (56)
Утримання		11 (73)	5 (33)	7 (47)	7 (47)	19 (42)
Відсутність відповіді		2 (13)	0	0	1 (7)	1 2)
Загалом		15	15	15	15	45
9-й місяць						
Відповідь		2 (13)	11 (73)	9 (60)	9 (60)	29 (64)
Утримання		11 (73)	4 (27)	6 (40)	5 (33)	15 (33)
Відсутність відповіді		2 (13)	0	0	1 (7)	1 (2)
Загалом		15	15	15	15	45
12-й місяць						
Відповідь		2 (13)	10 (67)	13 (87)	12 (80)	35 (78)
Утримання		12 (80)	5 (33)	2 (13)	3 (20)	7 (22)
Відсутність відповіді		1 (7)	0	0	0	0
Загалом		15	15	15	15	45

Абревіатури: BMNCs = Мононуклеарні клітини, отримані з кісткового мозку

2. Зміна кількості виразок в ураженій кінцівці

Зміна кількості виразок в ураженій кінцівці представлена у таблиці 10 та на Фігурі 5. На відвідуванні для оцінки вихідного стану 25 суб'єктів (56 %) у терапевтичних групах із суспензією клітин за винаходом та 9 суб'єктів (60 %) у контрольній групі були класифіковані як Категорія 5 за Резерфордом та представлені з ішемічними виразками, які не виліковуються. Більшість суб'єктів мали одну виразку та не існувало значних відмінностей між терапевтичною і контрольною групами (5, 7 та 6 суб'єктів у групах із найнижчою, середньою, найвищою дозами суспензії клітин за винаходом, відповідно, та 6 суб'єктів у контрольній групі). Чотири суб'єкти у лікувальних групах із найнижчою, середньою, найвищою дозами суспензії (1, 1 та 2 суб'єкти,

відповідно) і один суб'єкт у контрольній групі мали ≥ 3 виразки(ок).

Не зважаючи на те, що середній розмір виразки на вихідному рівні у суб'єктів у терапевтичній групі з суспензією клітин за винаходом був вищим, ніж такий для суб'єктів у контрольній групі (39,9±23,0 мм порівняно з 26,3±23,5 мм у групі пацієнтів, яких лікували, та контрольній групі, відповідно), результати показали, що у суб'єктів, у яких виразка не лікувалася, розмір виразки зменшився (29,7±13,5 мм), тоді як у контрольній групі середній розмір виразки збільшився (43,8±29,3 мм) (

Таблиця 11).

Таблиця 10: Зміна кількості виразок в ураженій кінцівці

		Контро-льні пацієнти (n, %)	Найнижча доза 1 × 10^8 BM-MNCs (n, %)	Середня доза 5 × 10^8 BM-MNCs (n, %)	Найвища доза 1 × 10^9 BM-MNCs (n, %)	Усі пацієнти, яких лікували (n, %)
Вихідні дані						
0 виразок						
0 виразка		6 (67)	5 (63)	7 (88)	6 (67)	18 (72)
2 виразки		2 (22)	2 (25)	0	1 (11)	3 (12)
≥3 виразки		1 (11)	1 (12)	1 (12)	2 (22)	4 (16)
Загалом		9	8	8	9	25
3-й місяць після введення Rexmyelocel-T						
0 виразок		1 (13)	2 (25)	2 (25)	1 (11)	5 (20)
0 виразка		4 (50)	4 (50)	5 (63)	4 (44)	13 (52)
2 виразки		1 (12)	0	0	3 (33)	3 (12)
≥3 виразки		2 (25)	2 (25)	1 (12)	1 (11)	4 (16)
Загалом		8	8	8	9	25
6-й місяць після введення Rexmyelocel-T						
0 виразок		2 (33)	4 (57)	3 (38)	2 (22)	9 (38)
0 виразка		4 (67)	1 (14)	4 (50)	6 (67)	11 (46)
2 виразки		0	2 (29)	0	0	2 (8)
≥3 виразки		0	0	1 (12)	1 (11)	2 (8)
Загалом		6	7	8	9	24
9-й місяць після введення Rexmyelocel-T						
0 виразок		2 (33)	5 (71)	4 (50)	4 (44)	13 (54
0 виразка		4 (67)	2 (29)	3 (38)	4 (44)	9 (38)
2 виразки		0	0	0	1 (11)	1 (4)
≥3 виразки		0	0	1 (12)	0	1 (4)
Загалом		6	7	8	9	24
12-й місяць після введення Rexmyelocel-T						
0 виразок		2 (33)	4 (57)	7 (88)	7 (78)	18 (75)
0 виразка		4 (66)	3 (43)	0	2 (22)	5 (21)
2 виразки		0	0	0	0	0
≥3 виразки		0	0	1 (12)	0	1 (4)
Загалом		6	7	8	9	24

Таблиця 11:

Розмір виразки в ураженій кінцівці (найбільший діаметр)

		Контрольні пацієнти (n=15)	Найнижча доза 1×10^8 BM-MNCs (n=15)	Середня доза 5×10^8 BM-MNCs (n=15)	Найвища доза 1×10^9 BM-MNCs (n=15)	Усі пацієнти, яких лікували (n=45)
Вихідні дані						
N		9	8	7	8	23
Середнє ± SD		26,3±23,5	41,5±29,1	31,4±19,7	45,6±19,2	39,9±23,0
3-й місяць						
N		5	6	6	7	19
Середнє ± SD		21,8±17,9	51,7±39,7	23,7±19,5	27,9±12,9	34,1±27,4
6-й місяць						
N		3	4	5	7	16
Середнє ± SD		36,7±15,3	42,5±43,5	24,0±19,8	24,3±13,7	28,8±25,0
9-й місяць						
N		3	2	4	5	11
Середнє ± SD		26,7±5,8	27,5±17,7	12,5±6,5	23,0±14,8	20,0±13,0
12-й місяць						
N		4	3	1	2	6
Середнє ± SD		43,8±29,3	31,7±17,6	15,0*	34,0±35,7	29,7±13,5

*На 12 місяці один суб'єкт у групі із середньою дозою з виразкою на ураженій кінцівці. Представлений справжній розмір цієї виразки.

3. Зміна TcPO2

Зміна TcPO2 представлена у таблиці 12.

На вихідному рівні 35 (79 %) суб'єктів у терапевтичних групах з суспензією клітин за винаходом мали TcPO2 < 40 мм рт.ст. (12, 12 та 11 суб'єктів у трьох дозових групах (групи з найнижчою, середньою, найвищою дозами, відповідно) порівняно з 6 (43 %) суб'єктами у контрольній групі.

Результати показали, що до Контрольного відвідування через 12 місяців рівні TcPO2 підвищилися до ≥ 40 мм рт.ст. у більшості пацієнтів, яких лікували Rexmyelocel-T (24 (60 %) суб'єкти), порівняно з 5 (46 %) суб'єктами у контрольній групі.

Таблиця 12:

Зміна черезшкірного дослідження парціального тиску кисню

		Контро-льні пацієнти (N, %)	Найнижча доза 1×10^8 BM-MNCs (N, %)	Середня доза 5×10^8 BM-MNCs (N, %)	Найвища доза 1×10^9 BM-MNCs (N, %)	Усі пацієнти, яких лікували (N, %)
Вихідні дані						
TcO_2 ≥40 мм рт.ст.		8 (57)	2 (14)	3 (20)	4 (27)	9 (21)
TcO_2 <40 мм рт.ст		6 (43)	12 (86)	12 (80)	11 (73)	35 (79)
Загалом		14	14	15	15	44
3-й місяць після введення Rexmyelocel-T						
TcO_2 ≥40 мм рт.ст.		7 (64)	6 (43)	6 (43)	8 (53)	20 (47)
TcO_2 <40 мм рт.ст		4 (36)	8 (57)	8 (57)	7 (47)	23 (53)
Загалом		11	14	14	15	43
6-й місяць після введення Rexmyelocel-T						
TcO_2 ≥40 мм		6 (55)	7 (47)	5 (39)	8 (53)	20 (47)

рт.ст						
TcO_2 <40 мм рт.ст		5 (45)	8 (53)	8 (61)	7 (47)	23 (53)
Загалом		11	15	13	15	43
12-й місяць після введення Rexmyelocel-T						
TcO_2 ≥40 мм рт.ст.		5 (46)	9 (69)	7 (54)	8 (57)	24 (60)
TcO_2 <40 мм рт.ст		6 (54)	4 (31)	6 (46)	6 (43)	16 (40)
Загалом		11	13	13	14	40

4. Васкулогенез

Васкулогенез оцінювали на 6 місяці після введення суспензії клітин за винаходом. У пацієнтів, яких лікували суспензією клітин за винаходом, васкулогенез був наявний у 26 (62 %) суб'єктів: 7, 8 та 9 суб'єктів у групах із найнижчою, середньою, найвищою дозою, відповідно (дивитися таблицю 13).

Таблиця 13:

Васкулогенез

			Найнижча доза 1×10^8 BM-MNCs (n, %)	Середня доза 5×10^8 BM-MNCs (n, %)	Найвища доза 1×10^9 BM-MNCs (n, %)	Усі пацієнти, яких лікували (n, %)
6-й місяць після введення Rexmyelocel-T						
Васкулогенез			7 (58)	8 (62)	9 (64)	24 (62)
Відсутність васкулогенезу			5 (42)	5 (38)	5 (36)	15 (38)
Загалом			12	13	14	39

Представлені ангіографічні зображення трьох із 24 випадків захворювання васкулогенезу, що відбувся, порівняно з вихідними даними на Фігурі 6: поздовжній ріст артерій (Фігура 6A), поява нових судин (Фігура 6B) та поперечний ріст колатералі, націленої на шкіру (Фігура 6C).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Суспензія клітин, яка містить від 4×10^8 до $1{,}2\times10^9$ аутологічних або алогенних білих кров'яних тілець, отриманих із кісткового мозку суб'єкта людини, де із загальної кількості від 4×10^8 до $1{,}2\times10^9$ білих кров'яних тілець:

i) від 20 до 51 % являють собою лімфоцити та від 3,9 до 22,3 % являють собою моноцити;

ii) від 1,4 до 10 % являють собою гематопоетичні стовбурові клітини, які експресують CD34;

iii) від 25,3 до 83,3 % із загальної кількості білих кров'яних тілець являють собою мононуклеарні клітини;

iv) від 16,7 до 74,7 % являють собою гранулоцити;

v) від 5,4 до 38,8 % із загальної кількості білих кров'яних тілець експресують CXCR4;

vi) від 0,07 до 24,7 % із загальної кількості білих кров'яних тілець експресують VEGFR2;

vii) із загальної кількості гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34, від 7,7 до 55,5 % являють собою недиференційовані нейтральні гематопоетичні стовбурові клітини, які не експресують CD38, та від 0,7 до 10,3 % являють собою стовбурові клітини, які експресують CD34 і CXCR4; та

viii) максимальне співвідношення між червоними кров'яними тільцями і клітинами лейкоцитів становить 6,7, а максимальне співвідношення між тромбоцитами і клітинами лейкоцитів становить 32.

2. Суспензія клітин для застосування за п. 1, яка **відрізняється** тим, що із загальної кількості білих кров'яних тілець від 32,3 до 80,0 % являють собою мононуклеарні клітини, вибрані з переліку, що складається з лімфоцитів, моноцитів та гематопоетичних стовбурових клітин, які експресують CD34, та від 20,0 до 67,7 % являють собою гранулоцити.

3. Суспензія клітин для застосування за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що суспензія клітин містить від 5×10^8 до $1{,}2\times10^9$.

4. Суспензія клітин для застосування за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що суспензія клітин містить від 8×10^8 до $1,2\times10^9$.

5. Суспензія клітин для застосування за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що суспензія клітин містить від 9×10^8 до $1,1\times10^9$.

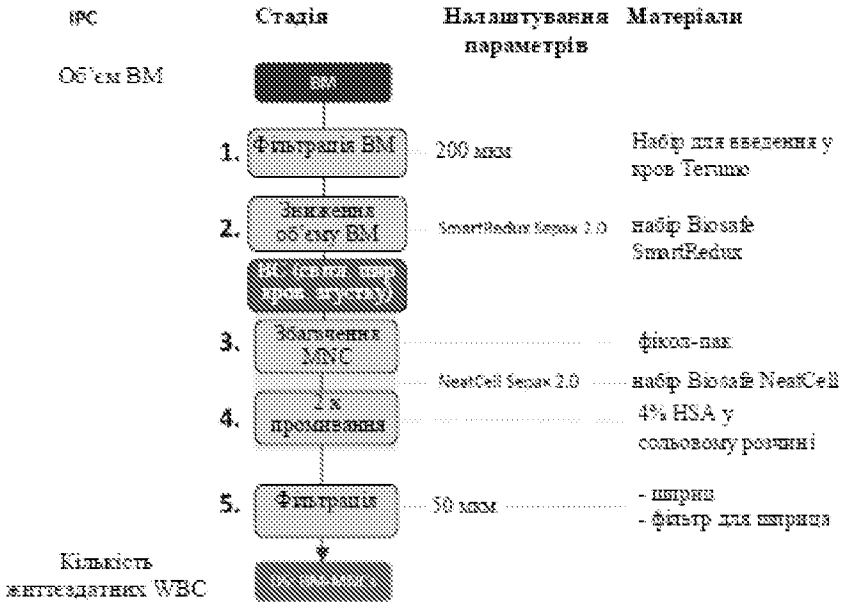
6. Суспензія клітин для застосування за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що суспензія клітин містить від $9,5\times10^8$ до $1,05\times10^9$.

7. Суспензія клітин для застосування за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що суспензія клітин містить від $9,8\times10^8$ до $1,02\times10^9$.

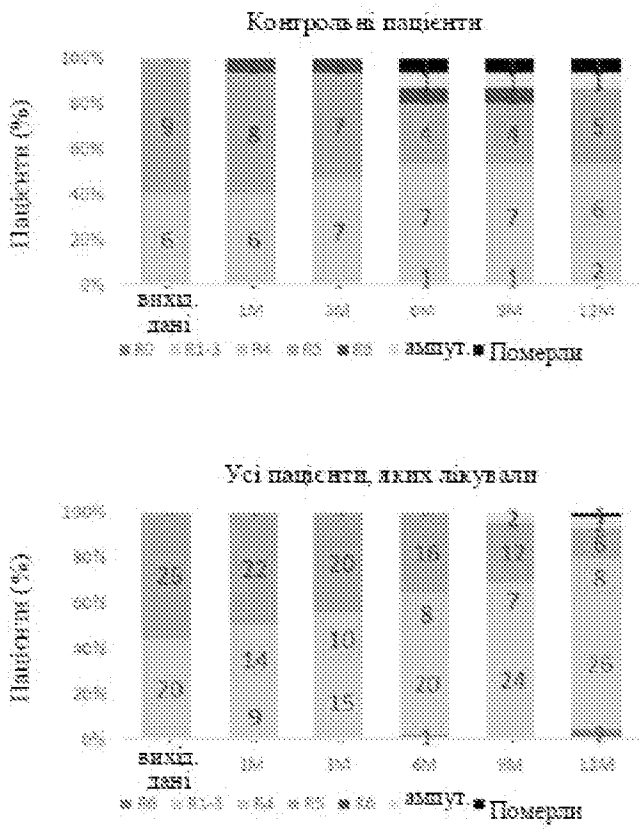
8. Суспензія клітин для застосування за будь-яким із пп. 1-7, де захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок являє собою критичну ішемію кінцівок.

9. Суспензія клітин для застосування за будь-яким із пп. 1-8, яка **відрізняється** тим, що клітини такої суспензії клітин суспендовані в об'ємі від 5 до 30 мл гепаринізованого сольового розчину або лактат-розчину Рінгера, що переважно містить близько 1 % HSA та близько 2,5 % глюкози.

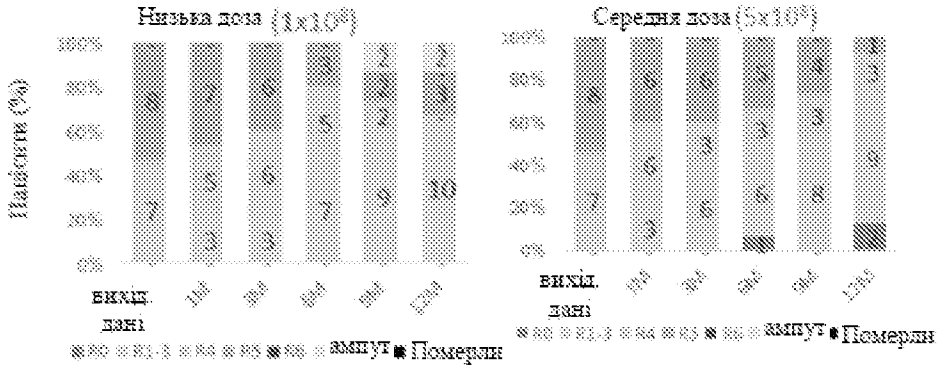
10. Суспензія клітин, як визначено у будь-якому із пп. 1-7, для застосування у способі лікування захворювання периферичних артерій нижніх кінцівок, переважно критичної ішемії кінцівок, з допомогою внутрішньоартеріального введення, де притік крові низького тиску до 4 атмосфер отримується шляхом розміщення надувного балона близько до оклюзійного ураження судини на дистальній стегновій або підколінній артерії, та вливання зазначеної суспензії клітин внутрішньоартеріально.

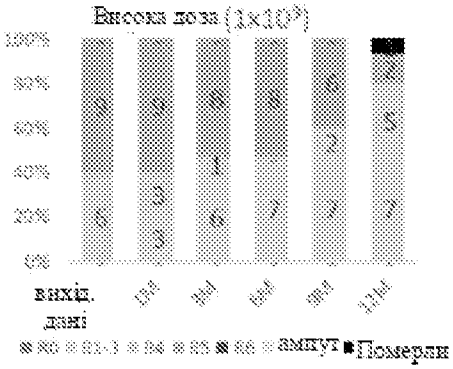


Фіг. 1

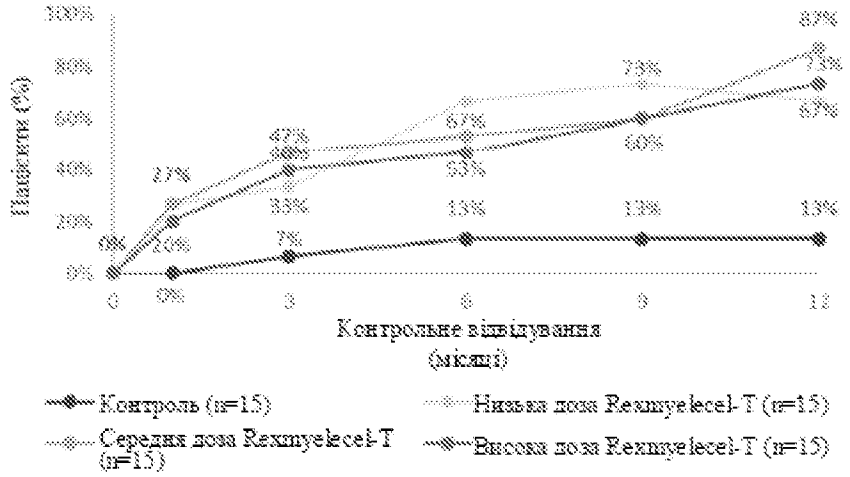

Контрольні пацієнти
Пацієнти (%)
100%
80%
60%
40%
20%
0%
вихід. дані
Померли
Усі пацієнти, яких лікували
Пацієнти (%)
100%
80%
60%
40%
20%
0%
вихід. дані
Померли

Фіг. 2

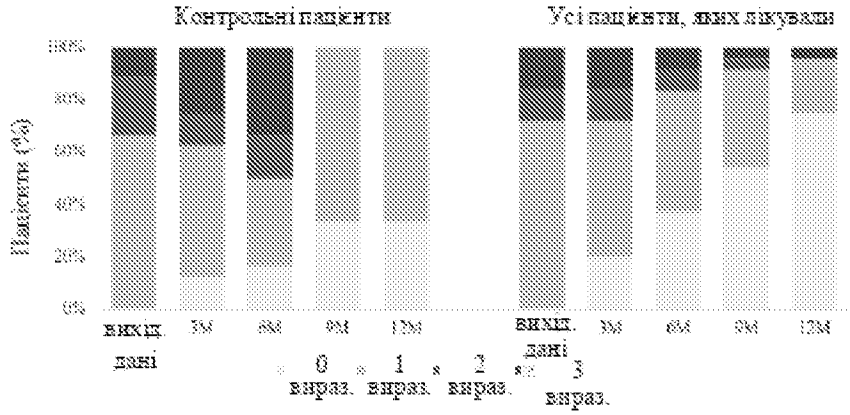

Низька доза (1x10⁸)
Середня доза (5x10⁸)
Пацієнти (%)
вихід. дані
ампут
Померли


Висока доза (1x10⁹)
вихід. дані
ампут
Померли

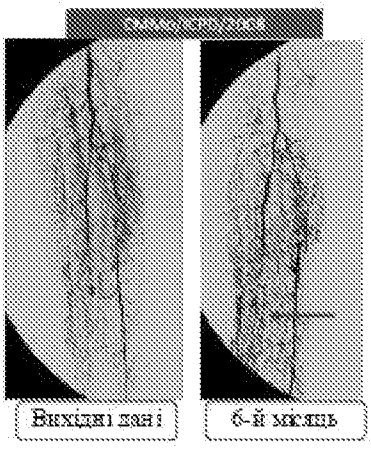
Фіг. 3


Пацієнти (%)
Контрольне відвідування (місяці)
Контроль (n=15)
Низька доза Rexmyelocel-T (n=15)
Середня доза Rexmyelocel-T (n=15)
Висока доза Rexmyelocel-T (n=15)

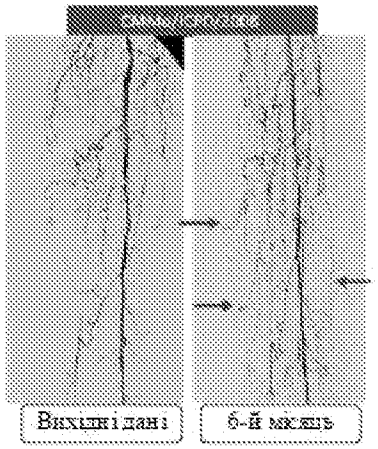
Фіг. 4



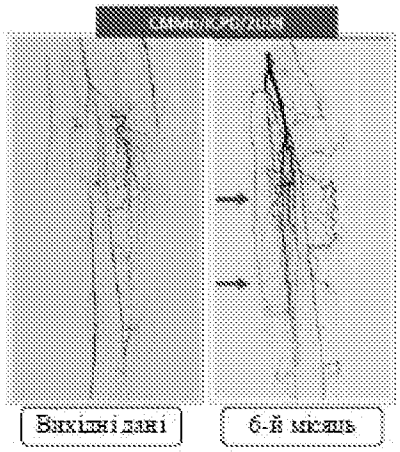
Фіг. 5



Фіг. 6А Поздовжній зріз артерій

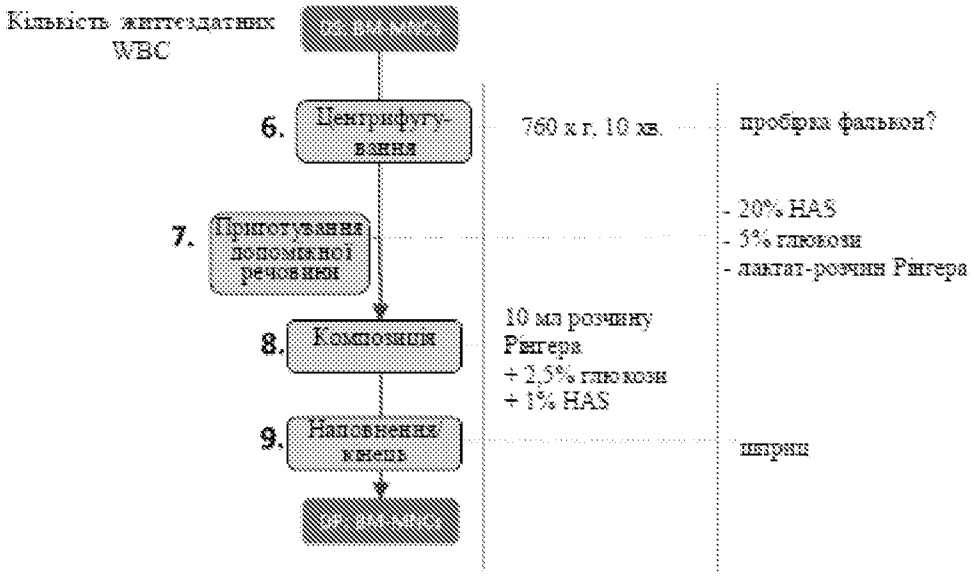


Фіг. 6В Нові судини на ділянці



6С.

Фіг. 6



Фіг. 7

Комп'ютерна верстка О. Рябко

ДО "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій", вул. Дмитра Годзенка, 1, м. Київ – 42, 01601