

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045001**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.26

(21) Номер заявки
201990583

(22) Дата подачи заявки
2017.08.28

(51) Int. Cl. **C12N 5/078** (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)

(54) **КЛЕТОЧНАЯ СУСПЕНЗИЯ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

(31) **16382405.5**

(32) **2016.08.26**

(33) **EP**

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/EP2017/071580**

(87) **WO 2018/037134 2018.03.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕКСДЖИНЕРО БАЙОСАЙЕНСИЗ,
С.Л.; СЕРВИСИО АНДАЛУС ДЕ
САЛУД; ФУНДАСИОН ПУБЛИКА
АНДАЛУСА ПРОГРЕСО И САЛУД
(ES)**

(72) Изобретатель:
**Дупере Джонатан Роберт Барклай, Де
Хонг Лисбет, Вахена Эдвин Х. (ES)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2011076255
BELAJ KLARA ET AL.: "Association of the
Derived Neutrophil-Lymphocyte Ratio With Critical Limb
Ischemia.", ANGIOLOGY APR 2016, vol. 67, no. 4, 1 April
2016 (2016-04-01), pages 350-354, XP002765755, ISSN:
1940-1574, page 352, column 1, paragraph 2; figure 1

GARY T. ET AL.: "Lymphocyte-to-monocyte ratio:
a novel marker for critical limb ischemia in PAOD
patients.", INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL
PRACTICE DEC 2014, vol. 68, no. 12, December

2014 (2014-12), pages 1483-1487, XP002765756, ISSN:
1742-1241 page 1484, column 2, paragraph 2; figure 1; table
2

GARY THOMAS ET AL.: "Platelet-to-Lymphocyte
Ratio: A Novel Marker for Critical Limb Ischemia in
Peripheral Arterial Occlusive Disease Patients", PLOS ONE,
vol. 8, no. 7, July 2013 (2013-07), XP0055333574, ISSN:
1932-6203, page 2, column 2, paragraph 3; tables 2,3

THOMAS GARY ET AL.: "Neutrophil-to-
Lymphocyte Ratio and Its Association with Critical Limb
Ischemia in PAOD Patients", PLOS ONE, vol. 8, no. 2, 15
February 2013 (2013-02-15), page e56745, XP055333688,
DOI: 10.1371/journal.pone.0056745, page 2, column 2,
paragraph 3; tables 2,3

HOLGER LAWALL ET AL.: "Treatment of
peripheral arterial disease using stem and progenitor cell
therapy", JOURNAL OF VASCULAR SURGERY, C.V.
MOSBY CO., ST. LOUIS, MO, US, vol. 53, no. 2, 21 August
2010 (2010-08-21), pages 445-453, XP028128909, ISSN:
0741-5214, DOI: 10.1016/J.JVS.2010.08.060 [retrieved on
2010-08-31], figures 1,2; table 1

PEETERS WEEM S. M. O. ET AL.: "Bone
Marrow derived Cell Therapy in Critical Limb Ischemia:
A Meta-analysis of Randomized Placebo Controlled
Trials", EUROPEAN JOURNAL OF VASCULAR AND
ENDOVASCULAR SURGERY, vol. 50, no. 6, 1 January
2015 (2015-01-01), pages 775-783, XP029337140, ISSN:
1078-5884, DOI: 10.1016/J.EJVS.2015.08.018, the whole
document

LAMBERT M. A. ET AL.: "Medical management
of critical limb ischaemia: where do we stand today?",
JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE OCT 2013, vol.
274, no. 4, October 2013 (2013-10), pages 295-307,
XP002765757, ISSN: 1365-2796, the whole document

(57) Изобретение относится к клеточной суспензии аутологичных или аллогенных, предпочтительно аутологичных, зрелых белых клеток крови костномозгового происхождения, предпочтительно происходящих из гребня подвздошной кости (или подвздошного гребня), обогащенных мононуклеарными клетками, что обозначает больше чем 25% белых клеток крови (WBC), присутствующих в клеточной суспензии, представляющих собой мононуклеарные клетки, которая содержит: А. мононуклеарные клетки (MNC), выбранные из списка, содержащего или состоящего из: i) популяции лимфоцитов; ii) популяции моноцитов и iii) популяции гематопозитических стволовых клеток, экспрессирующих CD34; и где клеточная суспензия дополнительно содержит: В. гранулоциты; для использования в лечении или улучшении заболевания периферических артерий нижних конечностей.

B1**045001****045001****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к клеточной суспензии зрелых клеток костномозгового происхождения, которые можно использовать при лечении или улучшении заболевания периферических артерий нижних конечностей, предпочтительно критически ишемизированной конечности.

Предпосылки изобретения

Заболевание периферических артерий нижних конечностей (PAD) включает широкий диапазон заболеваний сосудов, обусловленных атеросклеротическими, тромбозными и воспалительными процессами, которые изменяют структуру и функцию артерий нижних конечностей. Однако первопричиной PAD является атеросклероз.

Симптоматическое PAD нижних конечностей является результатом недостаточного потока крови, что ведет к недостаточному снабжению кислородом. PAD связано с атеротромбозом другого сосудистого русла, включая сердечнососудистую и цереброваскулярную системы. Наличие сахарного диабета (далее в настоящем описании DM) значительно увеличивает риск PAD, ускоряет течение заболевания, делая пациентов с диабетом более восприимчивыми к ишемическим эпизодам, ослабленной функции сосудов, увеличенной распространенности болезни и смертности, а также снижению качества жизни (QoL) (Thiruvoipati et al., 2015). В действительности, пациентов с PAD рассматривают в качестве гетерогенной группы пациентов в диапазоне от асимптоматических до пациентов с перемежающейся хромотой (IC) и пациентов с CLI (критической ишемией конечностей). CLI относится к состоянию артериальной недостаточности, которое снижает дистальное перфузионное давление до такой степени, что происходит тяжелое нарушение микроциркуляции и потока крови к тканям, а также питания. Незначительная травма, образование язв и инфекция могут сопутствовать возрастающим метаболическим потребностям пораженной ткани, что часто ведет к хроническим незаживающим язвам. Это представляет собой прогрессирующее заболевание, отличающееся многоуровневым заболеванием, тяжелым бременем сопутствующего заболевания и ограниченным сроком жизни.

Несмотря на то, что лодыжечно-плечевой индекс (ABI) используют для того, чтобы диагностировать PAD, и он является показателем тяжести PAD, он не полностью коррелирует с клинической тяжестью заболевания. Следовательно, более широкий диапазон клинических симптомов используют для того, чтобы классифицировать тяжесть PAD, используя две системы классификации, которые обычно применяют в клинической практике: Rutherford и Fontaine (Hirsch AT, 2006). Клиническая тяжесть PAD варьирует от асимптоматической до гангрены и ишемии конечностей, которые требуют ампутации. PAD представляет собой прогрессирующее заболевание с тяжестью состояния, возрастающей с течением времени. Прогрессирование заболевания протекает более быстро у пациентов с DM.

Ранжирование симптомов PAD и анатомических повреждений, отвечающих за эти симптомы, предоставляет объективную меру, с помощью которой можно наблюдать субъектов клинически и, что важно, обеспечивает согласованность при сравнении медицинских и интервенционных стратегий лечения в клинических исследованиях.

Классификацию Rutherford представляет собой обычно используемую клиническую систему определения стадии для описания PAD, которая схожа с классификацией Fontaine, но более широко цитируется в более новых публикациях в области сосудистой медицины. Оклюзионное заболевание периферических артерий обычно подразделяют на стадии по Fontaine, которые ввел Rene Fontaine в 1954 году, от стадии I (асимптоматической) до стадии IV (образование язв или гангрена). Классификация, введенная Rutherford в 1986 году и пересмотренная в 1997 году, состоит из четырех степеней и семи категорий, в диапазоне от категории 0 (асимптоматическая) до категории 6 (тяжелые ишемические язвы или гангрена) (табл. 1).

Таблица 1. Классификация PAD по Fontaine и Rutherford

Классификация по Fontaine		Классификация по Rutherford			
Степень по Fontaine	Клиническое описание	Степень по Rutherford	Категория по Rutherford	Клиническое описание	Объективные критерии
I	Асимптоматическая	0	0	Асимптоматическая — без гемодинамически значимого окклюзионного заболевания	Нормальный тест на беговой дорожке или на реактивную гиперемия
II-a	Перебегающая хромота после больше чем 200 метров безболезненной ходьбы	I	1	Умеренная хромота	Выполняет упражнение на беговой дорожке†; AP после упражнения >50 мм Hg, но по меньшей мере на 20 мм Hg ниже, чем значение в покое
II-b	Перебегающая хромота после меньше чем 200 метров ходьбы	I	2	Умеренная хромота	Между категориями 1 и 3
			3	Тяжелая хромота	Не может выполнить стандартное упражнение на беговой дорожке† и AP после упражнения < 50 мм Hg
III	Боль в покое	II*	4	Ишемическая боль в покое	AP в покое < 40 мм Hg, спокойная или едва пульсирующая лодыжка или метатарзальная PVR; TP <30 мм Hg
IV	Образование язв или гангрена	III*	5	Незначительная утрата ткани — не язвующая язва, очаговая гангрена с диффузной ишемией стопы	AP в покое < 60 мм Hg, лодыжечная или метатарзальная PVR спокойная или едва пульсирующая; TP < 40 мм Hg
			6	Существенная утрата ткани — выходит выше уровня ТМ, более не возможно восстановление функциональной стопы	То же, что и категория 5

*Степени II и III, категории 4, 5 и 6 включены в термин хронической критической ишемии.

†5 мин при скорости 2 мили/ч с уклоном 12%.

AP = лодыжечное давление;

PVR = регистрация пульсового наполнения;

TP = давление в пальце ноги;

TM = трансметатарзальн.

CLI представляет собой прогрессирующее заболевание, отличающееся многоуровневым заболеванием, тяжелым бременем сопутствующего заболевания и ограниченным сроком жизни. В Trans-Atlantic Inter-Society Consensus (TASC) Document on Management of Peripheral Arterial Disease II, 2007 (TASCII, 2007) даны рекомендации о том, что термин CLI следует использовать для всех субъектов с хронической ишемической болью в покое, язвами или гангреной, свойственными объективно доказанному артериальному окклюзионному заболеванию. Текущее определение CLI включает субъектов с болью в нижних

конечностях в покое, язвами или гангреной, вторичными по отношению к тяжело нарушенному потоку крови в конечности, сохраняющемуся в течение больше чем двух недель. Оно составляет категории 4-6 по Rutherford (ишемическая боль в покое, незначительная утрата ткани и существенная утрата ткани соответственно) или степени III и IV по Fontaine.

Единственным лечением основного заболевания при CLI является реваскуляризация. Однако значимая доля популяции (по оценкам, между 50 и 90% популяции) не подходит для ручной реваскуляризации (хирургический шунт или эндоваскулярная процедура) вследствие отсутствия жизнеспособных кровеносных сосудов, неудачи при предыдущих ручных процедурах реваскуляризации или сопутствующих заболеваний. Многие пациенты с CLI имеют множество состояний, которые могут препятствовать прохождению ими ручной реваскуляризации. В конечном итоге, для большей доли этих пациентов ампутация часто является единственным остающимся вариантом, целью которого является лечение некупируемой боли, предотвращение прогрессирования гангрены или борьба с инфекцией. Следовательно, остро необходима новая терапия.

В настоящее время начальное лечение пациентов с CLI обычно состоит в оценке пораженной (индекс) конечности на пригодность к реваскуляризации с использованием или хирургического шунта или эндоваскулярных способов. Всех пациентов следует лечить от существующих симптомов заболевания, в частности боли, язв и инфекций. Однако лечение боли очень часто является неэффективным и поскольку ишемические язвы заживают редко, лечение ран обычно сосредоточено на контроле инфекции, предотвращении ухудшения и спасении конечности.

Общие цели лечения для CLI включают лечение боли, заживление ран, спасение конечности, усовершенствование QoL, включая поддержание амбулаторного состояния, снижение общего кардиологического риска.

Клеточная суспензия по настоящему изобретению, в частности, показана для пациентов с CLI, в частности для пациентов с CLI и DM, которым не доступна реваскуляризация с использованием хирургического шунта или эндоваскулярных способов. Для этих пациентов неудовлетворенная потребность является наивысшей, поскольку отсутствуют терапевтические возможности для лечения основного заболевания. Любое лечение, используемое у этих пациентов, является симптоматическим: уход за раной, контроль инфекции и лечение боли. Для таких пациентов, не подходящих для ручной реваскуляризации, по мере прогрессирования заболевания, единственной клинической возможностью может быть ампутация в ответ на прогрессирующую гангрену, неконтролируемую инфекцию или некупируемую боль. Среди пациентов с PAD, у которых развивается CLI, приблизительно 25% погибают в течение года (NICE, 2012). В зависимости от тяжести CLI, годовые уровни первичных ампутаций варьируют от 5 до 40%, причем самые высокие уровни у пациентов, которые не подходят для реваскуляризации, которые имеют неврологические нарушения или являются лежачими.

Краткое описание фигур

- Фиг. 1 - блок-схема изготовления клеточной суспензии по изобретению;
- фиг. 2 - классификация по Rutherford через 3, 6, 9 и 12 месяцев после введения клеточной суспензии по изобретению, контроль в сравнении с лечением (включая ампутации и смерть), LOCF;
- фиг. 3 - классификация по Rutherford через 3, 6, 9 и 12 месяцев после введения клеточной суспензии по изобретению, эффект трех возрастающих доз (включая ампутации и смерть), LOCF;
- фиг. 4 - улучшение классификации по Rutherford (процентная доля субъектов) через 3, 6, 9 и 12 месяцев для контрольной группы и трех групп (доз) клеточной суспензии по изобретению;
- фиг. 5 - доля субъектов, классифицированных по числу язв в пораженной конечности через 3, 6, 9 и 12 месяцев (левая часть: контрольная группа; правая часть: группа клеточной суспензии по изобретению);
- на фиг. 6 представлены ангиографические изображения для трех из 24 случаев возникшего васкулогенеза по сравнению с базовым уровнем на фиг. 6: продольный рост артерий (фиг. 6A), возникновение новых сосудов (фиг. 6B) и поперечный рост коллатерали, которая направлена к коже (фиг. 6C);
- фиг. 7 - блок-схема процесса изготовления продукта клеточной суспензии по изобретению.

Краткое описание изобретения

Проблема, на которую направлено настоящее изобретение, состоит в том, чтобы предоставить пациентам, страдающим заболеванием периферических артерий нижних конечностей (PAD), предпочтительно пациентам с CLI, более предпочтительно пациентам с CLI и DM, которые не имеют возможности реваскуляризации с использованием хирургического шунта или эндоваскулярных способов, усовершенствованную терапевтическую альтернативу. Такая терапевтическая усовершенствованная альтернатива предусмотрена настоящим изобретением в форме клеточной суспензии аутологичных или аллогенных зрелых клеток костномозгового происхождения, как определено аспектами и предпочтительными вариантами осуществления, на которые ссылаются ниже.

Следовательно, первый аспект изобретения относится к клеточной суспензии (далее в настоящем

описании "клеточная суспензия по изобретению") аутологичных или аллогенных, предпочтительно аутологичных, зрелых белых клеток крови костномозгового происхождения, предпочтительно происходящих из гребня подвздошной кости (или подвздошного гребня), обогащенных мононуклеарными клетками, что обозначает, что больше чем 25% белых клеток крови (WBC), присутствующих в клеточной суспензии, представляют собой мононуклеарные клетки, которая содержит:

А. Мононуклеарные клетки (MNC), выбранные из списка, содержащего или состоящего из:

- i) популяции лимфоцитов;
- ii) популяции моноцитов и
- iii) популяции гематопозитических стволовых клеток, экспрессирующих CD34;

и где клеточная суспензия дополнительно содержит:

В. гранулоциты;

для использования в лечении или улучшении заболевания периферических артерий нижних конечностей.

Следует отметить, что, вообще говоря, популяции клеток А) и В) в свою очередь содержат популяцию клеток, которая экспрессирует CXCR4, рецептор для фактора миграции SDF1, из этой популяции важно отметить присутствие субпопуляции гематопозитических стволовых клеток, экспрессирующих CD34 и CXCR4. Кроме того, популяции клеток А) и В) в свою очередь содержат дополнительную популяцию клеток, которая экспрессирует VEGFR2, рецептор для фактора ангиогенеза VEGF, который вовлечен в ангиогенез и васкулогенез.

Наконец, популяция клеток А, iii) в свою очередь содержит популяцию клеток, которая не экспрессирует CD38, которые представляют собой ранние не коммитированные гематопозитические стволовые клетки.

Следует отметить, что мононуклеарные клетки (MNC) считают основным активным компонентом клеточной суспензии по изобретению. В частности, активные компоненты или ингредиенты клеточной суспензии по настоящему изобретению представляют собой MNC, выбранные из списка, состоящего из лимфоцитов, моноцитов и гематопозитических стволовых клеток, которые экспрессируют CD34, более конкретно субпопуляций ранних не коммитированных гематопозитических стволовых клеток, которые экспрессируют CD34 и не экспрессируют CD38, белых клеток крови, способных к опосредованной SDF-1 миграции, которые экспрессируют CXCR4, стволовых клеток, способных к опосредованной SDF-1 миграции, которые экспрессируют CD34 и CXCR4, и белых клеток крови, способных к ангиогенезу, которые экспрессируют VEGFR2. Все эти мононуклеарные клетки представляют собой клетки костномозгового происхождения, предпочтительно происходящие из гребня подвздошной кости (или подвздошного гребня).

Кроме того, дополнительно отмечено, что суспензия белых клеток крови по изобретению дополнительно содержит гранулоциты, которые представляют собой нейтрофилы, эозинофилы и/или базофилы. В связи с этим важно отметить, что конечный продукт клеточной суспензии по изобретению, как проиллюстрировано в примерах, дозируют, исходя из жизнеспособных белых клеток крови костномозгового происхождения, включая не только фракцию MNC белых клеток крови (лимфоциты и моноциты и стволовые клетки), но также гранулоциты.

В предпочтительном варианте осуществления по первому аспекту изобретения, клеточная суспензия по изобретению, в конечном составе, который обогащен мононуклеарными клетками, что обозначает, что больше чем 25% от общего числа белых клеток крови (WBC), присутствующих в клеточной суспензии, представляют собой мононуклеарные клетки, содержит приблизительно от 4×10^8 приблизительно до 2×10^9 аутологичных или аллогенных белых клеток крови костномозгового происхождения, предпочтительно аутологичных, предпочтительно происходящих из гребня подвздошной кости (или подвздошного гребня), где из общего числа приблизительно от 4×10^8 приблизительно до 2×10^9 белых клеток крови

i) приблизительно от 20% приблизительно до 51% представляют собой лимфоциты и приблизительно от 3,9% приблизительно до 22,3% представляют собой моноциты;

ii) приблизительно от 1,4% приблизительно до 10% представляют собой гематопозитические стволовые клетки, которые экспрессируют CD34;

iii) приблизительно от 25,3% приблизительно до 83,3%, предпочтительно приблизительно от 32,3% приблизительно до 80,0%, от общего числа белых клеток крови представляют собой мононуклеарные клетки, предпочтительно выбранные из списка, состоящего из лимфоцитов, моноцитов и CD34 клеток;

iv) приблизительно от 16,7% приблизительно до 74,7%, предпочтительно приблизительно от 20,0% приблизительно до 67,7%, представляют собой гранулоциты

v) из общего числа гематопозитических стволовых клеток, которые экспрессируют CD34, приблизительно от 7,7% приблизительно до 55,5% представляют собой ранние не коммитированные гематопозитические стволовые клетки, которые не экспрессируют CD38;

vi) приблизительно от 5,4% приблизительно до 38,8% белых клеток крови экспрессируют CXCR4;

vii) из общего числа гематопозитических стволовых клеток, которые экспрессируют CD34, прибли-

зительно от 0,7% приблизительно до 10,3% представляют собой стволовые клетки, которые экспрессируют CD34 и CXCR4;

viii) приблизительно от 0,07% приблизительно до 24,7% белых клеток крови экспрессируют VEGFR2 и

ix) максимальное соотношение красных клеток крови и лейкоцитарных клеток составляет 6,7 и максимальное соотношение тромбоцитов и лейкоцитарных клеток составляет 32.

В другом предпочтительном варианте осуществления по первому аспекту изобретения клеточная суспензия по изобретению, в конечном составе, как определено в предшествующем абзаце, содержит приблизительно от 4×10^8 приблизительно до $1,2 \times 10^9$ белых клеток крови, более предпочтительно приблизительно от 5×10^8 приблизительно до 2×10^9 белых клеток крови, еще более предпочтительно приблизительно от 5×10^8 приблизительно до $1,2 \times 10^9$ белых клеток крови, и все значения доз между каждым из вышеперечисленных значений.

Определенные варианты осуществления можно выбирать в виде поддиапазонов из этих значений белых клеток крови в конечном составе. Например, конкретный вариант осуществления можно выбирать в виде содержания белых клеток крови, в конечном составе, от 8×10^8 приблизительно до $1,2 \times 10^9$ белых клеток крови. Другой пример того, как диапазон можно отбирать в одном из вариантов осуществления, состоит в выборе содержания приблизительно от 9×10^8 приблизительно до $1,1 \times 10^9$ белых клеток крови. Третий пример диапазонов, которые можно выбирать для конкретного варианта осуществления, состоит в выборе приблизительно от $9,5 \times 10^8$ приблизительно до $1,05 \times 10^9$ белых клеток крови. Четвертый пример диапазонов, которые можно выбирать для конкретного варианта осуществления, состоит в выборе содержания, такого как от $9,8 \times 10^8$ приблизительно до $1,02 \times 10^9$ белых клеток крови.

Другие примеры того, как можно выбирать диапазон по варианту осуществления для содержания или дозы, включают диапазон от 6×10^8 приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Другой пример состоит в выборе диапазона от 7×10^8 приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Другой пример состоит в выборе диапазона от 8×10^8 приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Другой пример состоит в выборе диапазона от $8,5 \times 10^8$ приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Другой пример состоит в выборе диапазона от 9×10^8 приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Другой пример состоит в выборе диапазона от $9,5 \times 10^8$ приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Таким образом, все диапазоны доз, которые можно выбирать из значений в настоящем описании и как поймут средние специалисты в данной области, находятся в объеме данного изобретения.

Способы измерения каждой из популяций клеток, указанных выше, четко определены в подробном описании изобретения.

Следует отметить, что такая клеточная суспензия может содержать фармацевтически приемлемые носители и/или эксципиенты.

В другом предпочтительном варианте осуществления по первому аспекту изобретения или любых из его предпочтительных вариантов осуществления, заболевание периферических артерий нижних конечностей представляет собой критическую ишемию конечностей.

В другом предпочтительном варианте осуществления по первому аспекту изобретения или любых из его предпочтительных вариантов осуществления клетки суспендируют в объеме от 5 до 30 мл гепаринизированного солевого раствора или лактатного раствора Рингера, предпочтительно содержащего приблизительно 1% HSA и приблизительно 2,5% глюкозы.

Второй аспект изобретения относится к клеточной суспензии, как определено в первом аспекте изобретения или любых из его предпочтительных вариантов осуществления, для использования в способе лечения заболевания периферических артерий нижних конечностей, предпочтительно критической ишемии конечностей, через внутриаартериальное введение, в котором поток крови низкого давления вплоть до 4 атмосфер получают посредством расположения надуваемого баллона проксимально от окклюзионного повреждения сосудов в дистальной бедренной или подколенной артерии, и инфузию указанной клеточной суспензии внутриаартериально.

Третий аспект изобретения относится к одному или нескольким предварительно заполненным шприцам, содержащим клеточную суспензию, как определено в первом аспекте изобретения или любых из его предпочтительных вариантов осуществления.

Четвертый аспект изобретения относится к шприцу (предварительно заполненному шприцу), как определено в третьем аспекте изобретения, для использования в лечении или улучшении заболевания периферических артерий нижних конечностей, предпочтительно критической ишемии конечностей. Следует отметить, что один или несколько предварительно заполненных шприцов можно использовать у

одного пациента.

Пятый аспект изобретения относится к шприцу (предварительно заполненному шприцу), как определено в третьем аспекте изобретения, для использования в способе лечения заболевания периферических артерий нижних конечностей, предпочтительно критической ишемии конечностей, через внутриартериальное введение, где поток крови низкого давления вплоть до 4 атмосфер получают посредством расположения надуваемого баллона проксимально от окклюзионного повреждения сосудов в дистальной бедренной или подколенной артерии, и инфузию указанной клеточной суспензии внутриартериально.

В предпочтительном варианте осуществления с первого до пятого аспектов изобретения клеточную суспензию или шприцы предоставляют в виде однократной дозы.

В предпочтительном варианте осуществления второго и пятого аспектов изобретения индуцирование потока низкого давления получают между 1 и 6 мин и инфузию указанной клеточной суспензии выполняют между 2 и 10 мин.

Шестой аспект изобретения относится к процессу изготовления клеточной суспензии по изобретению, как определено в первом аспекте изобретения или в любом из его предпочтительных вариантов осуществления, который включает:

1. Взятие костного мозга (ВМ) осуществляют посредством повторных аспираций, предпочтительно из заднего подвздошного гребня субъекта под местной или общей анестезией. Затем аспираты ВМ собирают предпочтительно в мешок для переноса, содержащий антикоагулянт раствор, более предпочтительно раствор А цитрата декстрозы (ACD-A).

2. ВМ фильтруют, предпочтительно под действием гравитации, чтобы удалять любые мелкие костные фрагменты и предотвращать засорение в ходе последующих стадий.

3. Начальный объем ВМ уменьшают, предпочтительно приблизительно до 50-100 мл, предпочтительно с использованием программы SmartRedux на устройстве Sepax 2.0 и ассоциированного стерильного одноразового набора SmartRedux (CS-490.1). Эта стадия, которая включает удаление плазмы и красных клеток крови (RBC), что предпочтительно ведет к приблизительно 50-100 мл продукта лейкоцитарного слоя, также вносит вклад в чистоту конечного продукта.

4. Необязательно, стадию уменьшения объема осуществляют за один или два цикла в зависимости от объема исходного материала, подлежащего обработке. Образцы ВМ объемами вплоть до 220 мл обрабатывают за один цикл и образцы больше чем 220 мл обрабатывают за два цикла с использованием того же набора. Предпочтительно для уменьшения объема как за один, так и за два цикла, конечный объем устанавливают приблизительно 50-100 мл.

5. Стерильный промежуточный мешок для образца, содержащий ВМ уменьшенного объема, как установлено на стадиях 3 или 4, проходит через автоматизированное центрифугирование в градиенте плотности, после чего следуют два промывания суспензии мононуклеарных клеток (MNC) с использованием раствора для промывания, предпочтительно состоящего из 2-4% HSA в солевом растворе (и то и другое фармацевтической степени чистоты). Приблизительно 45 мл продукта ВМ-MNC собирают в выходной мешок, а другие компоненты удаляют в мешок для отходов. Предпочтительно стерильный промежуточный мешок для образца, содержащий ВМ уменьшенного объема, проходит через центрифугирование в градиенте плотности NeatCell, после чего следуют два промывания суспензии мононуклеарных клеток (MNC) с использованием раствора для промывания, предпочтительно состоящего из 2-4% HSA в солевом растворе (и то и другое фармацевтической степени чистоты). Приблизительно 45 мл продукта ВМ-MNC собирают в выходной мешок, а другие компоненты удаляют в мешок для отходов.

6. ВМ-MNC собирают из мешка для продукта, предпочтительно используя 50 мл шприц, и фильтруют, предпочтительно через 50 мкм фильтр, предпочтительно в стерильную пробирку Falcon. Мешок для продукта споласкивают раствором для промывания и фильтруют для усовершенствования извлечения MNC. Конечный объем лекарственного вещества ВМ-MNC корректируют до 40-60 мл.

Лекарственное вещество центрифугируют и осадок ресуспендируют в смеси для конечного формулирования, предпочтительно соевом растворе с гепарином или лактатном растворе Рингера с предпочтительно 1% HSA и предпочтительно 2,5% глюкозы в объеме предпочтительно 5-30 мл.

Как уже установлено выше, следует отметить, что конечный продукт клеточной суспензии, получаемый по шестому аспекту изобретения, дозируют на основе жизнеспособных белых клеток крови, включающих не только фракцию MNC, но также гранулоциты. Поскольку MNC представляют собой активный компонент, процентную долю MNC в конечном продукте считают признаком качества.

Седьмой аспект изобретения относится к продукту клеточной суспензии или контейнеру продукта, предпочтительно одному или нескольким шприцам, которые получают или можно получать способом по шестому аспекту изобретения. Следует отметить, что такой продукт клеточной суспензии или контейнер продукта можно использовать, как установлено в любом от первого до пятого аспектов изобретения.

Описание изобретения

Определения

Как используют в настоящем описании, "аутологичный" понимают как относящийся к клеточному препарату, где донор и реципиент представляют собой одного и того же индивидуума.

Как используют в настоящем описании, "аллогенный" понимают как относящийся к клеточному

препарату, где донор и реципиент не представляют собой одного и того же индивидуума.

Как используют в настоящем описании, "зрелые клетки костномозгового происхождения" понимают как препарат, содержащий клетки, которые не являются эмбриональными и происходят из костного мозга, полученного у донора-человека.

Как используют в настоящем описании, "клеточную суспензию" понимают как препарат клеток, суспендированных в жидкой среде.

Как используют в настоящем описании, "клеточную суспензию зрелых клеток костномозгового происхождения" понимают как препарат клеток, не являющихся эмбриональными и происходящих из костного мозга, полученного у донора-человека, которые суспендированы в жидкой среде.

Как используют в настоящем описании, "гематопоэтические стволовые клетки, которые экспрессируют CD34" понимают как гематопоэтические стволовые клетки, которые экспрессируют поверхностный маркер CD34 и идентифицируют как CD34-положительные с помощью окрашивания антителом к CD34 и проточной цитометрии.

Как используют в настоящем описании "ранние не коммитированные гематопоэтические стволовые клетки, которые экспрессируют CD34 и не экспрессируют CD38" понимают как гематопоэтические стволовые клетки, которые экспрессируют поверхностный маркер CD34 и идентифицируют как CD34-положительные с помощью окрашивания антителом к CD34 и проточной цитометрии, но идентифицируют как отрицательные по поверхностному маркеру CD38 с помощью окрашивания антителом к CD38 и проточной цитометрии.

Как используют в настоящем описании, "белые клетки крови, которые экспрессируют CXCR4" понимают как клетки, которые экспрессируют поверхностный маркер CD45 и CXCR4 и идентифицируют как CD45- и CXCR4-положительные с помощью окрашивания антителами к CD45 и CXCR4 и проточной цитометрии. CXCR4 представляет собой рецептор для фактора миграции SDF-1.

Как используют в настоящем описании, "стволовые клетки, которые экспрессируют CD34 и CXCR4" понимают как клетки, которые экспрессируют поверхностный маркер CD45, CD34 и CXCR4 и идентифицируют как CD45-, CD34- и CXCR4-положительные с помощью окрашивания антителами к CD45, CD34 и CXCR4 и проточной цитометрии. CXCR4 представляет собой рецептор для фактора миграции SDF-1.

Как используют в настоящем описании, "белые клетки крови, которые экспрессируют VEGFR2" понимают как клетки, которые экспрессируют поверхностные маркеры CD45 и VEGFR2 и идентифицируют как CD45- и VEGFR2-положительные с помощью окрашивания антителами к CD45 и VEGFR2 и проточной цитометрии. VEGFR2 представляет собой рецептор VEGF, который вовлечен в ангиогенез и васкулогенез.

Как используют в настоящем описании, "мононуклеарные клетки" понимают как любые кровяные или костномозговые белые клетки крови (также обозначаемые как лейкоциты), которые имеют круглое ядро, тем самым исключая гранулоциты.

Как используют в настоящем описании, "заболевание периферических артерий нижних конечностей" понимают как сужение артерий, отличных от тех, которые снабжают сердце или головной мозг. Заболевание периферических артерий обычно затрагивает нижние конечности, но могут быть вовлечены другие артерии.

Как используют в настоящем описании, "критическую ишемию конечностей" понимают как частный случай заболевания периферических артерий, где состояние отличается хронической ишемической болью в покое, язвами или гангреной в одной или обеих ногах, что свойственно для объективно доказанного артериального окклюзионного заболевания.

Термин "приблизительно" по отношению к числовому значению обозначает +/- 20% от этого числового значения. Термин "приблизительно" по отношению к числовому значению также включает +/- 10% от этого числового значения. Термин "приблизительно" по отношению к числовому значению также включает +/- 5% от этого числового значения. Термин "приблизительно" по отношению к числовому значению также включает +/- 1% от этого числового значения.

Термины "содержать" и "содержащий" используют во включающем открытом смысле, что обозначает, что могут быть включены дополнительные элементы. Термин "содержит" также охвачен и может быть использован взаимозаменяемо с терминами "состоит из" и "состоит по существу из".

Как используют в настоящем описании, термин "зрелый" обозначает, что стволовые клетки не являются эмбриональными. В одном из вариантов осуществления "зрелый" обозначает постэмбриональный или "постнатальный". В отношении стволовых клеток по настоящему изобретению, термин "зрелая стволовая клетка" обозначает, что стволовая клетка выделена из ткани или органа животного на стадии роста, наступающей позже эмбриональной стадии. Зрелые стволовые клетки отличаются от эмбриональных стволовых клеток, которые определяются их происхождением, внутренней клеточной массой бластоцисты. Зрелые стволовые клетки в соответствии с изобретением можно выделять из любой не эмбриональной ткани, и они включают младенцев, детей, подростков и зрелых субъектов. В целом, стволовую клетку по настоящему изобретению выделяют у млекопитающего не младенца и, например, у человека не младенца. Предпочтительно, стволовые клетки по настоящему изобретению выделяют у человека.

Термин "выделенный" указывает на то, что клетка или популяция клеток, к которой он относится, не находится в своем естественном окружении. Клетка или популяция клеток по существу отделена от окружающей ткани.

Профиль маркеров нового продукта клеточной суспензии, упоминаемого в настоящем изобретении, дополнительно можно определять по присутствию и/или отсутствию дополнительных маркеров или по конкретному профилю из комбинации присутствующих и отсутствующих маркеров. В каждом случае конкретная комбинация маркеров может присутствовать в виде конкретного профиля в популяции клеток и/или конкретного профиля маркеров на индивидуальных клетках в популяции.

Термин "маркер", как используют в настоящем описании, охватывает любую биологическую молекулу, присутствие, концентрация, активность или состояние фосфорилирования которой можно обнаруживать и использовать для того, чтобы идентифицировать фенотип клетки.

Тогда клетки по изобретению являются положительными по определенным фенотипическим маркерам и отрицательными по другим. Под "положительным" понимают, что маркер экспрессирован в клетке. Для того чтобы считаться экспрессируемым, маркер должен присутствовать на поддающемся обнаружению уровне. Под "поддающимся обнаружению уровнем" понимают, что маркер можно обнаруживать с использованием одного из стандартных лабораторных способов, таких как анализ ПЦР, блоттинга или проточной цитометрии, как описано.

Термин "экспрессированный" используют для того, чтобы описывать присутствие маркера на поверхности или внутри клетки. Для того чтобы считаться экспрессированным, маркер должен присутствовать на поддающемся обнаружению уровне. Под "поддающимся обнаружению уровнем" понимают, что маркер можно обнаруживать с использованием одного из стандартных лабораторных способов, таких как анализ ПЦР, блоттинга, иммунофлуоресценции, ELISA или FACS. "Экспрессированный" может относиться, но не ограничиваясь этим, к поддающемуся обнаружению присутствию белка, состояния фосфорилирования белка или мРНК, кодирующей белок. Ген считают экспрессируемой клеткой по изобретению или клеткой из популяции по изобретению, если экспрессию можно обоснованно обнаруживать после 30 циклов ПЦР, предпочтительно после 37 циклов ПЦР, что соответствует уровню экспрессии в клетке по меньшей мере приблизительно 100 копий на клетку. Термины "экспрессирует" и "экспрессия" имеют соответствующие значения. При уровне экспрессии ниже этого порога маркер считают не экспрессированным.

Подробное описание Продукт клеточной суспензии

Клеточная суспензия в соответствии с настоящим изобретением представляет собой продукт, подходящий для лечения или улучшения заболевания периферических артерий нижних конечностей, в частности для лечения критической ишемии конечностей (CLI), более конкретно для лечения критической ишемии конечностей (CLI) у пациентов с DM, которые не имеют возможности реваскуляризации с использованием хирургического шунта или эндоваскулярных способов, в качестве усовершенствованной терапевтической эффективной альтернативы. В этом смысле, к удивлению обнаружено, что клеточная суспензия в соответствии с настоящим изобретением, когда используют при лечении или улучшении заболевания периферических артерий нижних конечностей, ведет ко многим клинически релевантным усовершенствованиям, таким как изменение в классификации по Rutherford с CLI степени II (категория 4) или III (категория 5) на степень I (категория 1-3) или степень 0 (категория 0); усовершенствованный процесс заживления не только для язв, но даже для больших ампутаций; и увеличение протяженности сосудов и/или плотности сосудов. Все вышеуказанные преимущества можно получать даже при одном введении клеточной суспензии, и они ясно проиллюстрированы в примере 2.

В целом, клеточная суспензия по изобретению относится к клеточной суспензии аутологичных или аллогенных, предпочтительно аутологичных, зрелых клеток костномозгового происхождения, предпочтительно происходящих из гребня подвздошной кости (или подвздошного гребня), которая содержит:

A. Мононуклеарные клетки (MNC), выбранные из списка, содержащего или состоящего из:

- i) популяции лимфоцитов;
 - ii) популяции моноцитов и
 - iii) популяции гематопоэтических стволовых клеток, экспрессирующих CD34;
- и где клеточная суспензия дополнительно содержит:

B. Гранулоциты.

Следует отметить, что популяции клеток A) и B), в свою очередь, содержат популяцию клеток, которая экспрессирует CXCR4, рецептор для фактора миграции SDF1, из этой популяции важно отметить присутствие субпопуляции гематопоэтических стволовых клеток, экспрессирующих CD34 и CXCR4. Кроме того, популяции клеток A) и B) в свою очередь содержат популяцию клеток, которая экспрессирует VEGFR2, рецептор для фактора ангиогенеза VEGF, который вовлечен в ангиогенез и васкулогенез.

Наконец, популяция клеток A iii) в свою очередь содержит популяцию клеток, не экспрессирующую CD38, которые представляют собой ранние не коммитированные гематопоэтические стволовые клетки.

Следовательно, в частности, суспензия в соответствии с настоящим изобретением представляет со-

бой клеточную суспензию аутологичных или аллогенных, предпочтительно аутологичных, зрелых клеток костномозгового происхождения, которая содержит: i) гематопозитические стволовые клетки, которые экспрессируют CD34; ii) ранние не коммитированные гематопозитические стволовые клетки, которые экспрессируют CD34 и не экспрессируют CD38; iii) белые клетки крови, которые экспрессируют CXCR4, который представляет собой рецептор для фактора миграции SDF-1; iv) гематопозитические стволовые клетки, которые экспрессируют CD34 и CXCR4, который представляет собой рецептор для фактора миграции SDF-1; v) белые клетки крови, которые экспрессируют VEGFR2, который представляет собой рецептор для (VEGF), и vi) моноциты, гранулоциты и лимфоциты.

Важно отметить, что конечный продукт клеточной суспензии по изобретению дозируют на основе жизнеспособных белых клеток крови костномозгового происхождения, включающих не только мононуклеарную фракцию белых клеток крови (лимфоциты и моноциты и стволовые клетки), но также гранулоциты.

Следовательно, клеточная суспензия по изобретению относится к аутологичным или аллогенным, предпочтительно аутологичным, зрелым клеткам костномозгового происхождения, содержащим: i) гематопозитические стволовые клетки, которые экспрессируют CD34, ii) ранние не коммитированные гематопозитические стволовые клетки, которые экспрессируют CD34 и не экспрессируют CD38; iii) белые клетки крови, которые экспрессируют CXCR4, который представляет собой рецептор для фактора миграции SDF-1, т.е.; iv) гематопозитические стволовые клетки, которые экспрессируют CD34 и CXCR4, который представляет собой рецептор для фактора миграции SDF-1, v) белые клетки крови, которые экспрессируют VEGFR2, который представляет собой рецептор для фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), и vi) моноциты, гранулоциты и лимфоциты.

В предпочтительном варианте осуществления клеточная суспензия, в конечном составе, который обогащен мононуклеарными клетками, что обозначает, что больше чем 25% белых клеток крови (WBC), присутствующих в клеточной суспензии, представляют собой мононуклеарные клетки, содержит приблизительно от 4×10^8 приблизительно до 2×10^9 аутологичных или аллогенных белых клеток крови костномозгового происхождения, предпочтительно аутологичных, предпочтительно происходящих из гребня подвздошной кости (или подвздошного гребня), где из общего числа приблизительно от 4×10^8 приблизительно до 2×10^9 белых клеток крови:

i) приблизительно от 20% приблизительно до 51% представляют собой лимфоциты и приблизительно от 3,9% приблизительно до 22,3% представляют собой моноциты;

ii) от 1,4 до 10% представляют собой гематопозитические стволовые клетки, которые экспрессируют CD34;

iii) приблизительно от 25,3% приблизительно до 83,3% от общего числа белых клеток крови представляют собой мононуклеарные клетки;

iv) приблизительно от 16,7% приблизительно до 74,7% представляют собой гранулоциты;

v) приблизительно от 5,4% приблизительно до 38,8% от общего числа белых клеток крови экспрессируют CXCR4;

vi) приблизительно от 0,07% приблизительно до 24,7% от общего числа белых клеток крови экспрессируют VEGFR2;

vii) из общего числа гематопозитических стволовых клеток, которые экспрессируют CD34, приблизительно от 7,7% приблизительно до 55,5% представляют собой ранние не коммитированные гематопозитические стволовые клетки, которые не экспрессируют CD38, и приблизительно от 0,7% приблизительно до 10,3% представляют собой стволовые клетки, которые экспрессируют CD34 и CXCR4; и

viii) максимальное соотношение красных клеток крови и лейкоцитарных клеток составляет 6,7 и максимальное соотношение тромбоцитов и лейкоцитарных клеток составляет 32.

В другом предпочтительном варианте осуществления из общего числа белых клеток крови от 32,3% до 80,0% представляют собой мононуклеарные клетки, выбранные из списка, состоящего из лимфоцитов, моноцитов и гематопозитических стволовых клеток, которые экспрессируют CD34 клетки, и от 20,0 до 67,7%, представляют собой гранулоциты.

В еще одном другом предпочтительном варианте осуществления, клеточная суспензия по изобретению, в конечном составе, как определено в предшествующем абзаце, содержит приблизительно от 4×10^8 приблизительно до $1,2 \times 10^9$ белых клеток крови, более предпочтительно приблизительно от 5×10^8 приблизительно до 2×10^9 белых клеток крови, еще более предпочтительно приблизительно от 5×10^8 приблизительно до $1,2 \times 10^9$ белых клеток крови и все значения доз между каждым из вышеперечисленных значений.

Определенные варианты осуществления можно выбирать в виде поддиапазонов из этих значений белых клеток крови в конечном составе. Например, конкретный вариант осуществления можно выбирать в виде содержания белых клеток крови от 8×10^8 приблизительно до $1,2 \times 10^9$ белых клеток крови. Другой пример того, как диапазон можно выбирать в одном из вариантов осуществления, состоит в выборе содержания приблизительно от 9×10^8 приблизительно до $1,1 \times 10^9$ белых клеток крови. Третий пример диапазонов, которые можно выбирать для конкретного варианта осуществления, состоит в выборе прибли-

зительно от $9,5 \times 10^8$ приблизительно до $1,05 \times 10^9$ белых клеток крови. Четвертый пример диапазонов, которые можно выбирать для конкретного варианта осуществления, состоит в содержании, таком как от $9,8 \times 10^8$ приблизительно до $1,02 \times 10^9$ белых клеток крови.

Другие примеры того, как по варианту осуществления диапазон содержания или концентрации можно выбирать, включают диапазон от 6×10^8 приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Другой пример состоит в выборе диапазона от 7×10^8 приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Другой пример состоит в выборе диапазона от 8×10^8 приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Другой пример состоит в выборе диапазона от $8,5 \times 10^8$ приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Другой пример состоит в выборе диапазона от 9×10^8 приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Другой пример состоит в выборе диапазона от $9,5 \times 10^8$ приблизительно до 2×10^9 , предпочтительно приблизительно до $1,2 \times 10^9$, белых клеток крови, охватывая все значения доз между ними. Таким образом, все диапазоны доз, которые можно выбирать из значений в настоящем описании и как поймут средние специалисты в данной области, находятся в объеме данного изобретения.

Способы измерения каждой из популяций клеток, указанных выше, ясно изложены в подробном описании изобретения. В частности, способы измерения каждого из лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов, тромбоцитов и RBC проводят с использованием общего и дифференциального числа клеток и автоматизированного гематологического счетчика клеток (ABX Pentra 60, Horiba Medical). Процентные доли клеток-предшественников, процентные доли экспрессирующих CXCR4 клеток и процентные доли экспрессирующих VEGFR2 клеток определяли с использованием проточного цитометра (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotec).

Следует отметить, что такая клеточная суспензия может содержать фармацевтически приемлемые носители и/или эксципиенты.

В другом предпочтительном варианте осуществления клетки клеточной суспензии по изобретению суспендируют в объеме от 5 до 30 мл гепаринизированного солевого раствора или лактатного раствора Рингера, предпочтительно содержащего приблизительно 1% HSA и приблизительно 2,5% глюкозы.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей клеточную суспензию по изобретению, как определено выше, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель может содержать среду, которая поддерживает жизнеспособность и функциональность клеток. Такая среда может быть бессывороточной во избежание провокации иммунного ответа у реципиента. Носитель должен быть буферным и апирогенным.

Фармацевтически приемлемые носители и разбавители включают солевой раствор, водные буферные растворы и/или дисперсионные среды. Использование таких носителей и разбавителей хорошо известно в данной области. Раствор стерилен и имеет достаточно низкую вязкость для того, чтобы сделать возможным использование шприца для введения.

Примеры материалов и растворов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, также хорошо известны в данной области.

Следует отметить, что в предпочтительном варианте осуществления раствор конечного фармацевтического состава продукта клеточной суспензии, как проиллюстрировано в примерах в данном описании, состоит из гепаринизированного солевого раствора (см. табл. 4). Можно использовать лактатный раствор Рингера (2,7 мг/100 мл дигидрата хлорида кальция, 320 мг/100 мл лактата натрия, 40 мг/100 мл хлорида калия и 600 мг/100 мл хлорида натрия) с добавлением 2,5% глюкозы и 1% HSA также (см. табл. 2).

Среду конечного состава, как проиллюстрировано в примерах изобретения, получали свежей для каждой партии в день обработки, в BSC класса А, посредством добавления 10 мл глюкозы (2,5%) и 1 мл HSA (20%) в 9 мл лактатного раствора Рингера.

Буфер для составов*

Компонент	Концентрация	Степень
Раствор Рингера		EP, USP для инфузии
Глюкоза	2,5%	EP USP для инфузии
Альбумин человека	1%	EP USP для инфузии
Солевой раствор (0,9% NaCl)		EP USP для инфузии
Гепарин	20 Ед/мл	EP USP для инфузии

Сокращения: EP = Европейская фармакопея;

USP = Фармакопея США

* см. также таблицу

Следовательно, особенно предпочтительные эксципиенты представляют собой лактатный раствор Рингера, предпочтительно с добавлением глюкозы и HSA.

В другом предпочтительном варианте осуществления клеточную суспензию по изобретению или фармацевтическую композицию по изобретению можно замораживать в среде для заморозки. Любая среда, которая сохраняет жизнеспособность клеток при температурах между -135 и -190°C , подходит в качестве среды для заморозки. Например, среда для заморозки может содержать от 2,5 до 10% DMSO. Более конкретно, среда для заморозки может содержать 5-10% DMSO.

Среда для заморозки может быть основана на среде для культивирования или среде для размножения, описанных в настоящем описании, которая дополнительно содержит сыворотку человека или любой другой белок или смесь белков, способных поддерживать целостность клеток после оттаивания клеток.

После оттаивания клетки по изобретению можно промывать для того, чтобы удалять DMSO или другие компоненты среды для заморозки перед введением или повторным суспендированием в растворе для введения. Раствор для введения представляет собой любой физиологический раствор, который можно инъецировать пациентам без токсичности. Раствор для введения может содержать 1-15% белка, такого как сывороточный альбумин человека.

Фармацевтические композиции по изобретению также можно использовать в любом из способов лечения или терапевтических использований, описанных в настоящем описании.

Как уже установлено, клеточная суспензия по настоящему изобретению ускоряет (ре)генерацию новых и существующих кровеносных сосудов и усовершенствует поток крови в существующих сосудах, как проиллюстрировано в примере 2. Таким образом, клеточная суспензия по изобретению, в частности, благоприятна при лечении заболевания периферических артерий нижних конечностей (PAD), предпочтительно CLI, более предпочтительно CLI с DM у пациентов, которые не имеют возможности реваскуляризации с использованием хирургического шунта или эндоваскулярных способов. Пример 2 осуществляли с использованием конкретного лекарственного продукта клеточной суспензии, подпадающего под определение клеточной суспензии по изобретению, как определено в первом аспекте изобретения. Такой лекарственный продукт клеточной суспензии получали из лекарственного вещества BM-MNC, сформулированного в 10-30 мл гепаринизированного солевого раствора. Такой лекарственный продукт клеточной суспензии использовали в различных дозах, предпочтительные дозы составляли приблизительно от 5×10^8 приблизительно до 1×10^9 . Конечный контейнер, который использовали, представлял собой 1-3 шприцов для введения. Данные об этом продукте клеточной суспензии собирали во II фазе (исследование CMMo/ICPD/2008) для 32 рассматриваемых партий. Далее в табл. 2 сведены данные от автоматизированного счетчика клеток для каждого индивидуального субъекта, включая WBC и дифференциальные (лимфоциты, моноциты) подсчеты. Связанные с продуктом примеси также перечислены для каждого субъекта, включая концентрацию RBC и тромбоцитов, а также процентную долю гранулоцитов.

Фенотипический анализ тех же продуктов также представлен в табл. 3, включая анализ следующих типов клеток:

CD34+	Гематопоэтические стволовые клетки
CD34+CD38-	Ранние не коммитированные HSC
CD133+	Эндотелиальная содержащая предшественников популяция клеток
CD90+	Ранние гематопоэтические стволовые клетки
CXCR4+	Клетки, экспрессирующие рецептор SDF-1
VEGFR2+	Клетки, экспрессирующие рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2-го типа
CD31+CD146+CD133-	Зрелые клетки эндотелия
CD34+VEGFR2+CD133+	Поздние потомки эндотелиальных клеток-предшественников
CD34-CD105+CD90+CD73+	MSC

Данные, собранные для лекарственного вещества, представлены в табл. 2 и 3.

Таблица 2. Автоматизированный подсчет клеток и дифференциал для лекарственного вещества СММо/ICPD/2008. Представлены данные для средней дозы (5×10^8 WBC или лейкоцитов) и высокой дозы ($1,0 \times 10^9$ WBC или лейкоцитов)

Партия пациентов	LEU ($\times 10^3$)	RBC ($\times 10^6$)	PLA ($\times 10^3$)	LYMPH (%)	MONO (%)	CD34+ (%)	MNC	NEU (%)	EOS (%)	BAS (%)	GRA (%)
Способ	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
Мин.	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

Используемые способы: ACC = композицию лекарственного вещества оценивали с использованием автоматизированного счетчика клеток (ABX Pentra 60); PHE = фенотипический анализ лекарственного вещества (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotec); MNC = вычисляли как долю белых клеток крови не гранулоцитов; SUM = вычисляли по числу составляющих клеток.

Сокращения: LEU = лейкоциты; RBC = красные клетки крови; PLT = тромбоциты; LYMPH = лимфоциты; MONO = моноциты; CD34+ = клетки, экспрессирующие CD34; MNC = мононуклеарные клетки; NEU = нейтрофилы; BAS = базофилы; EOS = эозинофилы; GRA = гранулоциты; N/A = не доступно; N/M = не имеет значения.

Таблица 3. Фенотипический анализ лекарственного вещества СММо/ICPD/2008. В фазе II (исследование СММо/ICPD/2008) данные собраны для 32 субъектов

Партия пациентов	CD34+ (%)	CD34+/CD38- (%)	CXCR4+ (%)	CD34+/CXCR4 (%)	VEGFR2+ (%)
Способ	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
Мин.	1,44	7,74	5,38	0,69	0,07
Макс.	10,05	55,45	38,8	10,3	24,7

Используемые способы: PHE = фенотипический анализ лекарственного вещества (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotec);

Сокращения: CD34+ = гематопозитические стволовые клетки, экспрессирующие CD34; CD34+/CD38- = доля гематопозитических стволовых клеток, экспрессирующих CD34, которые не экспрессируют CD38; CD45+/CXCR4+ = доля лейкоцитов, которые экспрессируют CD45 и также экспрессируют CXCR4; CD34+/CXCR4 = доля гематопозитических стволовых клеток экспрессирующих CD34, которые также экспрессируют CXCR4; CD45+/VEGF+ = доля белых клеток крови, экспрессирующих; N/A = не доступно. Все клетки также экспрессируют CD45.

На основе результатов, собранных в фазе II (исследование CMMo/ICPD/2008) для 32 рассматриваемых партий, проиллюстрированных выше в табл. 2 и 3, авторы изобретения обеспечили определение характеристик продукта клеточной суспензии по настоящему изобретению.

Следует отметить, что настоящее изобретение, кроме того, охватывает 1-3 (предварительно заполненных) шприцов, содержащих клеточную суспензию по изобретению.

Кроме того, при желании, клетки клеточной суспензии по изобретению по изобретению можно модифицировать генетически любым стандартным способом, включая, в качестве иллюстрации, но неограничивающей, процессы переноса трансгенов, делеции или инсерции в их геном и т.д.

Процесс изготовления продукта клеточной суспензии

Продукт клеточной суспензии по изобретению можно изготавливать многими путями, однако предпочтительно его изготавливают, как подробно изложено в примере 1, чтобы клеточную суспензию по изобретению можно было считать минимально подверженным манипуляциям продуктом BM-MNC (моноклеарные клетки костного мозга), поскольку процесс изготовления состоит только из стадий разделения на основе плотности, размеров частиц и гравитации, которые предназначены для того, чтобы обогащать фракцию MNC в аспирате BM посредством удаления плазмы, тромбоцитов, RBC и гранулоцитов.

Процесс изготовления, как описано в примере 1, в кратком изложении сводится к следующему:

Стадия 0. Взятие костного мозга (BM) осуществляют посредством повторных аспираций, предпочтительно из заднего подвздошного гребня субъекта под местной анестезией. Затем аспираты BM собирают, предпочтительно в мешок для переноса, содержащий антикоагулянтный раствор А цитрата декстрозы (ACD-A).

Стадия 1: фильтрация - BM фильтруют, предпочтительно под действием гравитации, чтобы удалить любые мелкие костные фрагменты и чтобы предотвращать засорение в ходе последующих стадий.

Стадия 2: уменьшение объема SmartRedux - начальный объем BM уменьшают приблизительно до 50-100 мл, предпочтительно с использованием программы SmartRedux на устройстве Sepax 2.0 и ассо-

цированного стерильного одноразового набора SmartRedux (CS-490.1), придерживаясь инструкций производителя. Эта стадия, включающая удаление плазмы и красных клеток крови (RBC), которая ведет приблизительно к 50-100 мл продукта лейкоцитомоноцитарного слоя, также вносит вклад в чистоту конечного продукта.

Стадию уменьшения объема осуществляют один или два раза в зависимости от объема исходного материала, подлежащего обработке. Образцы BM объемов вплоть до 220 мл обрабатывают за один цикл и образцы больше 220 мл обрабатывают за два цикла с использованием того же набора.

Для уменьшения объема как за один, так и за два цикла, конечный объем устанавливают приблизительно равным 50-100 мл.

Стадии 3-4: градиент плотности NeatCell - стерильный промежуточный мешок для образца, содержащий BM уменьшенного объема, проходит через центрифугирование в градиенте плотности, после чего следуют два промывания суспензии мононуклеарных клеток (MNC) с использованием раствора для промывания, предпочтительно состоящего из 2-4% HSA в солевом растворе (и то и другое фармацевтической степени чистоты). Приблизительно 45 мл продукта BM-MNC собирают в выходной мешок и другие компоненты удаляют в мешок для отходов.

Стадия 5: фильтрация BM-MNC - BM-MNC собирают из мешка для продукта с использованием 50 мл шприца и фильтруют через 50 мкм фильтр в стерильную пробирку Falcon. Мешок для продукта споласкивают раствором для промывания и фильтруют для того, чтобы усовершенствовать извлечение MNC. Конечный объем лекарственного вещества BM-MNC корректируют до 40-60 мл.

Конечная стадия (стадия 6) состоит в получении конечного продукта клеточной суспензии по изобретению. Такой конечный продукт дозируют на основе жизнеспособных белых клеток крови, включая не только фракцию MNC, но также гранулоциты. Поскольку MNC представляют собой активный компонент, процентная доля MNC в конечном продукте считают признаком качества. В этом смысле, имеют место некоторые параметры процесса, которые могут влиять на признаки качества конечного продукта. В связи с этим, стадии, способные влиять на процентную долю MNC в конечном продукте, которые считают важными для изготовления продукта, представлены в табл. 5.

Таблица 5. Стадии и параметры, ассоциированные с процессом изготовления

Стадия	Параметр	Критичность
Фильтрация	Размер	Присутствие костных фрагментов может влиять на эффективность очистки и может мешать процедуре введения
SmartRedux	Центрифугирование: скорость и длительность	Эта стадия разделения на основе гравитации вносит вклад непосредственно в чистоту конечного продукта. Следовательно, настройки параметров, необходимые для выполнения разделения, являются критическими.
NeatCell	Плотность Ficoll, объем Ficoll	Определяет популяции клеток, которые будут очищены. Используемая плотность составляет 1,077 г/мл, вызывает извлечение MNC
	Скорость и длительность центрифугирования в Ficoll	Вызывает извлечение MNC
	Скорость и длительность промывания центрифугированием	Вызывает извлечение MNC

Сокращения: MNC = мононуклеарные клетки

Стадия SmartRedux - эта стадия предназначена для того, чтобы снижать начальный объем BM до объема, который достаточно мал для обработки в процедуре Neatcell (NeatCell имеет максимальный входной объем 120 мл). Кроме того, стадия SmartRedux включает фракционирование на RBC, плазму и

продукт лейкоцитомбоцитарного слоя, что вносит вклад в чистоту продукта NeatCell.

Важными параметрами, связанными с этой стадией, являются скорость и длительность центрифугирования, поскольку эти параметры будут непосредственно влиять на извлечение MNC из аспирата BM.

Стадия NeatCell - используемый автоматизированный способ обогащения MNC разработан и стандартизован производителем, и предназначен для обогащения аспирата BM по MNC и, следовательно, является важным. Ист исходного материала для NeatCell является важным свойством материала, поскольку он влияет на эффективность очистки MNC. Важные параметры процесса зафиксированы в программе NeatCell, включая скорость и длительность центрифугирования, а также плотность и объем Ficoll.

Полагают, что в компартменте MNC несколько популяций клеток играют важные роли в механизме действия конечного продукта. Таким образом, присутствие и функциональность этих клеток считают признаками качества (CQA).

Фракция MNC, полученная после центрифугирования в градиенте плотности Ficoll, содержит те клетки, которые имеют более низкую плотность, чем Ficoll, и, следовательно, не достаточно плотны для того, чтобы проникать в слой Ficoll в течение центрифугирования. Следовательно, плотность Ficoll, используемого в процессе, непосредственно влияет на композицию популяции MNC и, следовательно, считается важным параметром процесса. Используемая плотность составляет 1,077 г/мл.

Изготовление является непрерывным процессом и не включает какие-либо стадии активации или другие экстенсивные манипуляции с клетками, которые могут влиять на функциональность конкретных популяций клеток в фракции MNC. Длительность процесса может влиять на функциональность клеток и, следовательно, время задержки не включено в процесс, а весь процесс предпочтительно завершают в пределах 4-5 ч в условиях чистой комнаты. На функциональность также может влиять состояние заболевания субъекта и общая физиологическая вариабельность субъекта.

На основе вышеуказанного, дополнительный аспект изобретения относится к процессу изготовления клеточной суспензии по изобретению, который включает:

1. Взятие костного мозга (BM) осуществляют посредством повторных аспираций, предпочтительно из заднего подвздошного гребня субъект**а под местной или общей анестезией. Затем аспиранты BM собирают, предпочтительно в мешок для переноса, содержащий антикоагулянтный раствор, более предпочтительно раствор А цитрата декстрозы (ACD-A).

2. BM фильтруют, предпочтительно под действием гравитации, чтобы удалять любые мелкие костные фрагменты и чтобы предотвращать засорение в ходе последующих стадий.

3. Начальный объем BM уменьшают, предпочтительно приблизительно до 50-100 мл, предпочтительно с использованием программы SmartRedux на устройстве Sepax 2.0 и ассоциированного стерильного одноразового набора SmartRedux (CS-490.1). Эта стадия, включающая удаление плазмы и красных клеток крови (RBC), предпочтительно ведущее к приблизительно 50-100 мл продукта лейкоцитомбоцитарного слоя, также вносит вклад в чистоту конечного продукта.

4. Необязательно, стадию уменьшения объема осуществляют за один или два цикла в зависимости от объема исходного материала, подлежащего обработке. Образцы BM объемом вплоть до 220 мл обрабатывают за один цикл и образцы больше 220 мл обрабатывают за два цикла с использованием того же набора. Предпочтительно, для уменьшения объема как за один цикл, так и за два цикла, конечный объем устанавливают приблизительно равным 50-100 мл.

5. Стерильный промежуточный мешок для образца, содержащий BM уменьшенного объема, как установлено на стадиях 3 или 4, проходит через центрифугирование в градиенте плотности, после чего следуют два промывания суспензии мононуклеарных клеток (MNC) с использованием раствора для промывания, предпочтительно состоящего из 2-4% HSA в солевом растворе (и то и другое фармацевтической степени чистоты). Приблизительно 45 мл продукта BM-MNC собирают в выходной мешок, а другие компоненты удаляют в мешок для отходов. Более предпочтительно, стерильный промежуточный мешок для образца, содержащий BM уменьшенного объема, проходит через центрифугирование в градиенте плотности NeatCell, после чего следуют два промывания суспензии мононуклеарных клеток (MNC) с использованием раствора для промывания, предпочтительно состоящего из 2-4% HSA в солевом растворе (и то и другое фармацевтической степени чистоты). Приблизительно 45 мл продукта BM-MNC собирают в выходной мешок, а другие компоненты удаляют в мешок для отходов.

6. BM-MNC собирают из мешка для продукта, предпочтительно с использованием 50 мл шприца, и фильтруют, предпочтительно через 50 мкм фильтр, в стерильную пробирку Falcon. Мешок для продукта споласкивают раствором для промывания и фильтруют для того, чтобы усовершенствовать извлечение MNC. Конечный объем лекарственного вещества BM-MNC корректируют до 40-60 мл.

Также важно отметить, что изготовление клеточной суспензии по изобретению предпочтительно представляет собой непрерывный процесс, включающий обогащение мононуклеарных клеток, где процесс не включает возможность повторной обработки.

После получения лекарственного вещества, центрифугирование MNC предпочтительно осуществляют при 760×g в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки ресуспендируют в конечном составе (предпочтительно гепаринизированном солевом растворе или лактатном растворе Рингера с добавлением 2,5% глюкозы и 1% HSA и переносят в стерильный апиrogenный пластмассовый шприц(ы) в сте-

рильных условиях).

2-3 мл конечного продукта можно необязательно переносить во флакон для тестирования контроля качества (QC) и предпочтительно от 8 до 12 мл переносят в каждый стерильный апирогенный пластмассовый шприц в стерильных условиях. У шприца закрывают конус, чтобы предотвращать контаминацию, затем упаковывают в стерильный одноразовый пластмассовый мешок с застежкой-молнией и транспортировочную коробку для транспортировки в участвующее отделение интервенционной радиологии для введения субъекту.

Обзор процесса изготовления приведен на чертеже.

Применимость продукта клеточной суспензии

Результаты, ясно проиллюстрированные в примере 2, показывали, что в пределах первых 12 месяцев после введения клеточной суспензии по изобретению, субъекты достигали клинически релевантного ответа, как продемонстрировано снижением их классификации до категории 1-3 по Rutherford (степень 1) (29 (64%) субъектов), которое благоприятно сравнивать с контрольной группой, в которой отвечали только 2 (13%) субъекта.

При визите базового уровня, 25 (56%) субъектов в группе лечения, которые получали инфузию клеточной суспензии по изобретению, обладали незаживающими ишемическими язвами, но к визиту последующего наблюдения через 12 месяцев после введения, 18 (75%) субъектов более не имели язв (одна большая ампутация), причем 24 (60%) субъектов демонстрировали увеличение $TcPO_2 \geq 40$ мм рт.ст., что является надежным предсказанием заживления. Васкулогенез оценивали через 6 месяцев после введения клеточной суспензии по изобретению. У субъектов, которых лечили клеточной суспензией по изобретению, васкулогенез имел место у 26 (62%) субъектов: 7, 8 и 9 субъектов в наименьшей, средней, наибольшей группах, соответственно.

Ни один субъект не испытывал Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction (SUSAR) в течение лечения или в течение наблюдения. Три АЕ считали связанными с путем введения, и они представляли собой небольшие реакции в месте инъекции. Ни один субъект не прерывал исследование преждевременно в результате АЕ и ни один субъект не испытывал АЕ, связанные с клеточной суспензией по изобретению. SAE не возникали перед введением Rexmyelocel-T и SAE не возникали в течение первых 24 ч после введения Rexmyelocel-T. Всего 41 SAE регистрировали у 23 субъектов в течение периода наблюдения (12 месяцев), 17 SAE (9 субъектов) в контрольной группе и 24 SAE (14 субъектов) в группах лечения Rexmyelocel-T: более низкая доза 1×10^8 BM-MNC: четыре субъекта; средняя доза 5×10^8 BM-MNC: четыре субъекта; наибольшая доза 1×10^9 BM-MNC: 6 субъектов. Два субъекта погибли в результате сердечно-сосудистого заболевания.

Следовательно, таким образом, ясно, что клеточная суспензия по изобретению, в частности, благоприятна при лечении заболевания периферических артерий нижних конечностей (PAD), предпочтительно CLI, более предпочтительно CLI с DM у пациентов, которые не имеют возможности реваскуляризации с использованием хирургического шунта или эндоваскулярных способов.

Таким образом, дополнительный аспект изобретения относится к клеточной суспензии, предварительно заполненному шприцу или фармацевтической композиции, как определено в разделе с названием "Продукт клеточной суспензии", представляет собой использование при лечении или улучшении заболевания периферических артерий нижних конечностей, предпочтительно у человеческого субъекта.

Предпочтительно заболевание периферических артерий нижних конечностей представляет собой критическую ишемию конечностей.

Более предпочтительно, клеточная суспензия, предварительно заполненный шприц или фармацевтическая композиция, как определено в разделе с названием "Продукт клеточной суспензии", представляет собой использование в способе лечения заболевания периферических артерий нижних конечностей, предпочтительно критической ишемии конечностей, через внутриартериальное введение, где поток крови низкого давления вплоть до 4 атм получают посредством расположения надуваемого баллона проксимально к окклюзионному повреждению сосудов в дистальной бедренной или подколенной артерии, и инфузию указанной клеточной суспензии внутриартериально.

Примеры

Пример 1. Материалы и способы

1. Клеточная суспензия и способ ее получения.

Для того чтобы иллюстрировать настоящее изобретение, в следующих примерах использовали клеточную суспензию в соответствии с настоящим изобретением, полученную из аутологичной клеточной суспензии BM-MNC, состоящей из нескольких зрелых типов клеток, а также гематопоэтических клеток-предшественников. Состав конечного продукта основан на числе присутствующих жизнеспособных WBC.

Определение характеристик клеточной суспензии по изобретению проводили с использованием общего и дифференциального числа клеток с использованием автоматизированного гематологического счетчика клеток (ABX Pentra 60, Horiba Medical). Процентные доли клеток-предшественников и WBC (CD45+ клетки), экспрессирующих рецептор CXCR4 фактора миграции SDF-1, или WBC, экспресси-

рующих рецептор фактора ангиогенеза VEGF 2-го типа, определяли с использованием проточного цитометра (MACS Quant Analyzer 10, Miltenyi Biotec).

Концентрация белых клеток крови (WBC), доля лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и клеток-предшественников, а также общие WBC, экспрессирующие CXCR4 или VEGFR2, из 32 клинических партий представлены в табл. 6.

Таблица 6. Клеточная композиция из 32 клинических партий из СММО/ICPD/2008

Тип клеток	Прием/ поверхностный клеточный маркер	Число клеток/доля
Лейкоциты (белые клетки крови)	АСС	$1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$
Красные клетки крови/белые клетки крови	Соотношение	1,15-6,7x
Тромбоциты/белые клетки крови	Соотношение	2,2-31,7x
Нейтрофилы	АСС	$2,5 \times 10^7 - 5,6 \times 10^8$
Лимфоциты	АСС	$2,4 \times 10^7 - 5,1 \times 10^8$
Моноциты	АСС	$6,4 \times 10^6 - 2,0 \times 10^8$
Эозинофилы	АСС	$0 - 7,1 \times 10^7$
Вазофилы	АСС	$1,2 \times 10^6 - 7,1 \times 10^7$
Гранулоциты	АСС	$2,8 \times 10^7 - 6,1 \times 10^8$
Мононуклеарные клетки	WBC - гранулоциты	$3,6 \times 10^7 - 7,8 \times 10^8$
Гематопозитические стволовые клетки	Проточная цитометрия CD34+	$1,4 \times 10^6 - 5,4 \times 10^7$
Клетки, экспрессирующие CXCR4, который представляет собой рецептор для маркера миграции SDF-1	Проточная цитометрия CXCR4+	$5,4 \times 10^6 - 3,2 \times 10^8$
Стволовые клетки, экспрессирующие CXCR4, который представляет собой рецептор для маркера миграции SDF-1	Проточная цитометрия CD34+/CXCR4+	$1,0 \times 10^4 - 4,1 \times 10^6$
Клетки, экспрессирующие рецептор VEGFR2 для фактора ангиогенеза VEGF	Проточная цитометрия VEGFR2	$7,0 \times 10^4 - 2,5 \times 10^7$

Сокращения: АСС = автоматизированный счетчик клеток,
WBC = белые клетки крови.

Данные представлены от минимума до максимума.

Клеточную суспензию по изобретению изготавливали согласно требованиям GMP. Все стадии процесса осуществляли в чистой комнате класса В, где полузакрытые манипуляции (прокальваемое соединение и люэровские блокирующие соединения) и открытые манипуляции осуществляли в BSC класса А.

Вкратце костный мозг фильтровали асептически для того, чтобы удалить костные фрагменты, после чего следовала автоматизированная стадия уменьшения объема для получения объема, который достаточно мал для дальнейшей обработки.

Затем клетки подвергали автоматизированному центрифугированию в градиенте плотности Ficoll, включающему стадии промывания. Продукт фильтровали, что давало 50 мл фракции BM-MNC, которая представляет собой лекарственное вещество.

Весь процесс изготовления лекарственного вещества был закрытым, за исключением прокальваемых и люэровских блокирующих соединений. Стадии разделения клеток осуществляли в автоматизированной системе для того, чтобы обеспечивать стандартизацию процесса.

Блок-схема процесса изготовления клеточной суспензии по изобретению представлена на фиг. 1. Кроме того, процесс изготовления подробно описан далее:

Стадия 0: взятие костного мозга (BM) осуществляли посредством повторных аспирации из заднего подвздошного гребня субъекта под местной анестезией, используя 5 мл шприцы, соединенные с аспира-

тором для ВМ. Аспираты ВМ собирали в 600 мл мешок для переноса, содержащий антикоагулянтный раствор А цитрата декстрозы (А АCD-A), пока не достигали объема приблизительно 250-350 мл. Мешок для переноса, содержащий свежий ВМ, упаковывают в соответствии с инструкциями и подготавливают к отгрузке. ВМ отгружают при комнатной температуре (15-21°C) в Rexgene за одну погрузку для немедленной обработки

Стадия 1: фильтрация - ВМ фильтровали под действием гравитации через 200 мкм встроенный фильтр для того, чтобы удалять любые мелкие костные фрагменты и предотвращать засорение в ходе последующих стадий. После фильтрации образец собирали для тестов в процессе изготовления и взвешивали мешок для сбора, с переводом массы в объем, что дает входной объем в настройках для обработки клеток.

Стадия 2: уменьшение объема SmartRedux - начальный объем ВМ приблизительно 300 мл уменьшали до 50 мл с использованием программы SmartRedux на устройстве Sepax 2.0 и ассоциированного стерильного одноразового набора SmartRedux (CS-490.1), придерживаясь инструкций производителя. Эта стадия, включающая удаление плазмы и красных клеток крови (RBC), ведущее к 50 мл продукта лейкоцитомбоцитарного слоя, также вносит вклад в чистоту конечного продукта. Стадию уменьшения объема осуществляли один или два раза в зависимости от объема исходного материала, подлежащего обработке. Образцы ВМ объемом вплоть до 220 мл обрабатывали за один цикл, а образцы больше чем 220 мл обрабатывали за два цикла с использованием того же набора. Для уменьшения объема как за один цикл, так и за два цикла, конечный объем устанавливали равным 50 мл.

Стадии 3-4: градиент плотности NeatCell - стерильный мешок для промежуточного образца, содержащий ВМ уменьшенного объема, соединяли с набором Neatcell (CS-900.2) и обрабатывали с использованием программы NeatCell на устройстве Sepax 2.0, придерживаясь инструкций производителя. Эта стадия состояла из центрифугирования в градиенте плотности Ficoll 1077, после чего следовало два промывания суспензии мононуклеарных клеток (MNC) с использованием раствора для промывания, состоящего из 2,5% или 4% HSA в солевом растворе (и то и другое фармацевтической степени чистоты). Приблизительно 45 мл продукта ВМ-MNC собирали в выходной мешок, а другие компоненты удаляли в мешок для отходов.

Стадия 5: фильтрация ВМ-MNC - ВМ-MNC собирали из мешка для продукта с использованием 50 мл шприца и фильтровали через 50 мкм фильтр в стерильную пробирку Falcon. Мешок для продукта споласкивали раствором для промывания и фильтровали для того, чтобы усовершенствовать извлечение MNC. Конечный объем лекарственного вещества ВМ-MNC корректировали до 50 мл.

2. Отбор популяции исследования

Всего 60 субъектов с CLI II степени (категория 4) или III степени (категория 5) по Rutherford и DM, которые не могли проходить хирургическую или эндоваскулярную реваскуляризацию (50 мужчин (83%) и 10 женщин (17%)) с усредненным возрастом 64,3 ($\pm 9,5$) (диапазон: 46-80 лет) вводили и случайным образом распределяли в соотношении 1:1:1 для того, чтобы принимать одно введение клеточной суспензии по изобретению (с одним из трех уровней доз; 1×10^8 , 5×10^8 или 1×10^9 ВМ-MNC; 15 субъектов на группу лечения) в дополнение к стандарту лечения или для лечения в соответствии со стандартом лечения отдельно (15 субъектов). Клеточную суспензию по изобретению вводили внутриаартериально одной инфузией. Для этого исследования применяли стратифицированную рандомизацию и страты конструировали для CLI II и III степени по Rutherford (категории 4 и 5) без возможности эндоваскулярной или хирургической реваскуляризации в соответствии с Transatlantic Inter-Society Consensus Document on Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). В том случае, если CLI присутствовала в обеих ногах, инфузию вводили в ногу, определяемую исследователем, чтобы иметь более запущенное/тяжелое заболевание при условии, что на ногах ранее не проводили хирургическую ампутацию пальцев или выше. Испытуемых субъектов оценивали при визите базового уровня (визит 1), через 24 ч и 1, 3, 6, 9, 12 месяцев после введения Rexmyelocel-T (визиты 3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно). Субъекты, которых распределяли в контрольную группу, не должны были присутствовать на визитах 2 и 3.

3. Критерии включения

Субъекты подходили для включения в исследование, если они отвечали всем из следующих критериев включения:

1. Субъекты обоих полов в возрасте ≥ 18 и ≤ 80 лет.
2. Субъекты, получающие лечение для DM I или II типа.
3. CLI II и III степени (категория 4 и 5) по Rutherford.
4. Неспособность к хирургической или эндоваскулярной реваскуляризации согласно рекомендациям TASC II.
5. Ожидаемая продолжительность жизни больше двух лет.
6. Больше не ожидают ампутацию в конечности, подлежащей лечению в следующие 12 месяцев после включения.
7. Нормальные биохимические параметры, определяемые по следующему: лейкоциты ≥ 3000 /мл, нейтрофилы ≥ 1500 /мл, тромбоциты ≥ 100000 /мм³, AST/ALT $\leq 2,5 \times$ стандартный диапазон, креатинин \leq

2,5 мг/дл

8. Субъекты предоставляли письменное информированное согласие на участие в исследовании.

9. Женщины с репродуктивным потенциалом должны иметь отрицательные результаты теста на беременность, придерживаясь стандартных процедур каждой больницы, выполняемых в момент включения в исследование, и придерживаться использования одобренного медициной контроля рождаемости в течение исследования.

4. Критерии исключения

Субъектов исключали из участия в исследовании, если они отвечали любому из следующих критериев исключения:

1. В анамнезе неоплазия или гематологическое заболевание (миелопролиферативное заболевание, лейкоз или миелодиспластический синдром).

2. Субъекты неконтролируемой гипертензии (определяемой как кровяное давление > 180 мм рт. ст./110 мм рт. ст. больше чем в одном эпизоде).

3. Тяжелая сердечная недостаточность (IV стадия по New York Heart Association).

4. Субъекты со злокачественными желудочковыми аритмиями или нестабильной стенокардией.

5. Диагноз тромбоза глубоких вен за три месяца до скрининга.

6. Активная инфекция или гангрена, имеющая место в те же сутки, когда планируют введение Remyelocel-T.

7. Сопутствующая терапия, включающая гипербарическую кислородную терапию, вазоактивные вещества, ингибиторы Соx-II.

8. ВМІ > 40 кг/м².

9. Субъекты с диагнозом алкоголизма в момент включения.

10. Пролиферативная ретинопатия.

11. Сопутствующее заболевание, которое уменьшает ожидаемую продолжительность жизни до меньше чем одного года.

12. ВИЧ-инфекция, гепатит В или гепатит С.

13. Субъекты, которые не желают или не способны соответствовать всем аспектам протокола.

14. Сердечная недостаточность или фракция выброса < 30%.

15. Инсульт или инфаркт миокарда за три месяца до скринингового визита.

16. Анемия (гемоглобин < 10 г/дл).

17. Лейкопения.

18. Тромбоцитопения (< 100000 тромбоцитов/мм³).

19. Беременные женщины или женщины в репродуктивном возрасте, которые не используют достаточную контрацепцию.

20. Субъекты, которые участвовали в клиническом исследовании в пределах трех месяцев до скрининга для этого исследования.

5. Удаление субъектов из исследования.

Субъектов можно удалять из исследования по любой из следующих причин:

Невозможность достигать оптимальной конечной концентрации клеточной суспензии на основе результата при рандомизации. В этом случае, PI следует принимать решение о том, будет ли введен продукт.

Присутствие серьезного нежелательного явления (SAE) между информированным согласием до планируемой даты введения.

Значительное отклонение от протокола. Обнаружение после рандомизации, что субъект не может соответствовать критериям включения в протокол или не придерживается требований протокола и продолжение исследования влечет неприемлемый риск для здоровья субъектов.

Субъект испытывал АЕ или явление перед лечением, которое требовало раннего завершения, поскольку продолжение участия влекло неприемлемый риск для здоровья субъекта или субъект не желал продолжать по причине АЕ или явления перед лечением.

Добровольное прекращение. Субъект (или законный представитель субъекта) желал прекратить участие в исследовании.

Утрата возможности наблюдения. Субъект не возвращался в клинику, а попытки связаться с субъектом не принесли успеха. Попытки связаться с субъектом задокументированы. Если субъект прекращал участие в исследовании, осуществляли все процедуры, запланированные для визита раннего завершения, если возможно.

В соответствии с надлежащей клинической практикой все субъекты, которые прекращали участие в исследовании, преждевременно получали рекомендации по альтернативному лечению. Если прекращение было обусловлено возникновением значимых АЕ (нежелательных эффектов), исследователь должен был осуществлять мониторинг субъекта до завершения, т.е. до разрешения АЕ или до тех пор, пока не определяли, что оно является постоянным явлением. Основную причину прекращения исследования регистрировали в CRF.

6. Вводимое лечение

Исследуемый продукт

Под местной анестезией и успокоением объем ВМ (90-420 мл) собрали посредством последовательных аспираций из подвздошного гребня. ВМ собирали в мешок для переноса, содержащий раствор АСD-А в качестве антикоагулянта в соотношении 1:5 объем ВМ (см. п.1 выше)

Суспензию ВМ-MNC получали посредством центрифугирования в градиенте плотности, без модификации или добавления любого продукта, вероятно влияющего на ее биологическую функцию.

Клеточную суспензию по изобретению вводили в однократных дозах:

1×10^8 ВМ-MNC.

5×10^8 ВМ-MNC.

1×10^9 ВМ-MNC.

Клеточную суспензию по изобретению вводили с использованием внутриартериального катетера. Целевые артерии конечности канюлировали через доступ через бедренную артерию с использованием баллона на проволочном катетере (адаптированного к подколенному диаметру), который продвигали настолько дистально насколько возможно, но во всех случаях ниже колена, и располагали проксимально к окклюзионным повреждениям сосудов, обычно в дистальной бедренной или подколенной артерии. В этой точке баллон надували для того, чтобы заблокировать поток крови, и медленно инфузировали клеточную суспензию по изобретению в течение минут (мин). После введения

баллон сдували и восстанавливали антеградный поток крови.

Между тремя и пятью часами после взятия ВМ специалист по сосудам (интервенционный радиолог или сосудистый хирург) осуществлял введение клеточной суспензии по изобретению, доставляемой непосредственно из подразделения клеточной терапии.

Всех субъектов лечили по существующему стандарту лечения от тяжелого атеросклеротического заболевания сосудов ниже подколенной области, как описано в руководстве по лечению TASC II.

7. Изменение классификации по Rutherford

Критическая ишемия конечностей включает пациентов с болью в нижних конечностях в покое, ишемическими язвами или гангреной, вторичной по отношению к тяжелому нарушению потока крови в пораженной конечности, сохраняющемся в течение больше чем двух недель. Классификацию субъектов по PAD проводили на всем протяжении исследования с помощью специалистов по сосудам, используя степени по Rutherford вместо категорий, поскольку не осуществляли стандартное упражнение на беговой дорожке и, следовательно, не было возможно формально различать легкую, умеренную или тяжелую IC.

IC (степень I, категории 1-3) определяли как мышечную боль, дискомфорт или слабость в конечности, вызванные упражнением (выполняемым посредством ходьбы или мышечной активности) и быстро снимаемые посредством прекращения активности, в отличие от боли в покое, которая является непрерывной у пациентов с CLI.

Степень 0 по Rutherford использовали для того, чтобы идентифицировать тех субъектов, которые не имели симптомов или лишь имели ощущение холода или не имели клинических признаков окклюзионного заболевания или умеренное уменьшение пульса.

Незаживающая ишемическая язва подразумевает, что имеет место недостаточная артериальная перфузия в нижней конечности, чтобы поддерживать воспалительную реакцию, необходимую для заживления. Обычно с этим ассоциирована ишемическая боль в покое и объективное свидетельство диффузной ишемии стопы (CLI степени III-IV по Rutherford, категории 5-6).

Ишемическая боль в покое указывает диффузную ишемию стопы (степень II-IV, категории 4-6) и не поддается простому контролю с помощью анальгетиков. Боль локализована в переднем отделе стопы и пальцах или вблизи очаговых ишемических повреждений. Это усугубляется поднятием конечности. Диффузная ишемия стопы с ишемической болью в покое обычно связана с давлением в лодыжке < 40 мм рт.ст. и ABI < 0,8.

Субъектов классифицировали на основе присутствия ишемической боли в покое (с незаживающими ишемическими язвами или без них), ишемической мышечной боли, вызываемой упражнением (IC), или бессимптомного заболевания. Для того чтобы классифицировать испытуемых субъектов, клинические симптомы комбинировали с объективным свидетельством диффузной ишемии стопы через измерение ABI (если это поддавалось надежной оценке).

Оценивали изменение классификации по Rutherford относительно базового уровня до 1, 3, 6, 9 и 12 месяцев.

Клиническое усовершенствование определяли как усовершенствование на одну степень по Rutherford (категорию) относительно базового уровня. Клинически релевантное усовершенствование определяли как изменение классификации по Rutherford с CLI категории 4 или 5 на IC категории 3 или ниже, через 3, 6, 9 или 12 месяцев после введения Rexmyelocel-T.

8. Изменение числа язв и размера язв

Размер самой большой язвы в целевой нижней конечности, а также общее число язв в обеих ногах регистрировали в Case Report Form (CRF). Оценивали заживление язв и изменения в размерах язв от ба-

зового уровня до месяцев 1, 3, 6, 9 и 12.

9. Васкулогенез

Васкулогенез оценивали через 6 месяцев после введения клеточной суспензии по изобретению с помощью оценочного комитета, образованного двумя интервенционными радиологами, которые выполняли независимую, слепую оценку посредством сравнения ангиограммы базового уровня, которую получали до лечения, с ангиограммой, которую получали через 6 месяцев после введения Rexmyelocel-T.

Васкулогенез считали имеющим место, если был представлен продольный рост ранее существовавших артерий, поперечный рост ранее существовавших артерий, увеличение числа коллатеральных кровеносных сосудов, увеличение числа коллатеральных кровеносных сосудов, увеличение размера и/или плотности коллатеральных кровеносных сосудов или увеличение размера и/или плотности основных сосудов ниже подколенных.

10. Большие ампутации (целевая конечность)

Большой ампутацией считали ампутацию нижней конечности выше лодыжки.

11. Изменение ABI

ABI определяют как соотношение систолического кровяного давления, измеряемого в лодыжке, и систолического давления, измеряемого в плечевой артерии. Субъект получал указание отдохнуть в течение 5-10 мин в положении лежа на спине, в расслабленном состоянии, с опорой для головы и пяток, в помещении с температурой 19-22°C. Выбирали манжету для измерения кровяного давления надлежащего размера, чтобы измерять кровяное давление как в лодыжке, так и в руке. На лодыжку и руку манжету помещали вокруг конечности способом прямого оборачивания. Использовали доплеровский зонд 8-10 МГц и доплеровский гель наносили на датчик. Доплеровский зонд также использовали для обнаружения потока крови в плече в ходе измерения давления в руке. Измеряли систолическое давление в плечах обеих рук и систолическое давление в передней голени и задней голени рассматриваемой конечности.

Изменение ABI от базового уровня к месяцу 1, 3, 6, 9 и 12 регистрировали у субъектов, у которых можно было надежно оценивать давление в лодыжке.

12. Изменения чрескожного давления кислорода

Чрескожная оксиметрия, TcPO₂, представляет собой местное неинвазивное измерение, отражающее количество O₂, который диффундировал из капилляров, через эпидермис. TcPO₂ измеряли с использованием TCM3 (Radiometer Medical ApS, Copenhagen, Denmark).

Регистрировали изменение TcPO₂ от базового уровня до месяца 1, 3, 6, 9 и 12.

13. Определения нежелательных явлений

Нежелательные явления (AE) определяли как любой нежелательный опыт, переносимый субъектом в течение исследования, независимо от связи с исследуемым продуктом. Следовательно, AE может представлять собой любой неблагоприятный и непредусмотренный признак (включая аномальные лабораторные находки), симптом или заболевание, связанные во времени с использованием медицинского (исследуемого) продукта, независимо от его связи с медицинским (исследуемым) продуктом. Это включает обострение уже существующих состояний или явлений, сопутствующее заболевание, взаимодействие лекарственных средств или значимое ухудшение показаний, используемого в исследовании, которое не регистрировали в другом месте в Case Report Form при оценке конкретных эффектов. Предполагаемые колебания уже существующих состояний, включая заболевание, используемое в исследовании, которые не представляют клинически значимое обострение или ухудшение, не рассматривали в качестве AE.

Для каждого AE документировали следующие данные:

Описание эпизода симптома.

Классификация "серьезное" или "несерьезное".

Тяжесть: легкая (AE, которое легко переносится субъектом, вызывает минимальный дискомфорт и не мешает ежедневной активности), умеренная (AE, которое причиняет достаточный дискомфорт, чтобы мешать нормальной ежедневной активности; может потребоваться вмешательство), тяжелая (AE, которое препятствует нормальной ежедневной активности; обычно необходимо лечение или другое вмешательство).

Дата первого возникновения и дата разрешения (если применимо).

Предпринятые действия: любое действие, безвозвратное прекращение исследуемого лечения, введение сопутствующего лекарственного лечения, проведение нефармакологического лечения или госпитализация/длительная госпитализация (SAE).

Причинная связь. Каждая попытка, предпринятая исследователем для того, чтобы оценить связь AE, если уместно, с Rexmyelocel-T. Причинность оценивали с использованием следующих категорий:

Маловероятно, если имели место незначительные свидетельства, указывающие на причинную связь (например, явление не возникало в оправданный период времени после введения Rexmyelocel-T или если имело место другое обоснованное объяснение явления (например, клиническое состояние субъекта, другое сопутствующее лечение). Возможно, если имеет место свидетельство, указывающее на возможную причинную связь (например, потому что явление возникло в пределах оправданного времени после введения Rexmyelocel-T, даже несмотря на то, что другие факторы могут вносить вклад в явление (например, клиническое состояние субъекта, другое сопутствующее лечение). Правдоподобно, если имеет ме-

сто свидетельство, указывающее на причинную связь, а влияние других факторов маловероятно.

Определенно, если имеет место четкое свидетельство, указывающее на причинную связь, а возможный вклад других факторов можно исключить.

Неопределенно, если имеют место недостаточные или неполные свидетельства для клинического суждения о причинной связи.

Исход явления (неизвестно, выздоровление, выздоровление пока не наступило, выздоровление с осложнениями, смерть (с датой и приведенной причиной)).

14. Определение серьезных нежелательных явлений

SAE определяли как АЕ, которые отвечают одному или нескольким из следующих критериев серьезного исхода:

приводило к смерти;

угрожало жизни;

требовало немедленной госпитализации или продления уже случившейся госпитализации;

приводило к персистирующей или значимой нетрудоспособности или недееспособности;

представляло собой врожденную аномалию или порок развития;

представляло собой важное медицинское явление, которое на основе медицинского и научного суждения несло потенциальную угрозу субъекту или требовало вмешательства для того, чтобы предотвращать один из исходов, которые перечислены выше.

АЕ считали угрожающим жизни, если субъект имел риск смерти во время явления. Не рассматривали явления, которые в теории могли быть причиной смерти, будь они более тяжелыми.

Пример 2. Результаты

1. Изменение классификации по Rutherford

Изменение категории PAD по Rutherford у контрольных субъектов и у субъектов, которых лечили клеточной суспензией по изобретению, находится на базовом уровне и после 3, 6, 9 и 12 месяцев представлено далее в табл. 7.

При визите базового уровня субъекты в группах лечения клеточной суспензией по изобретению классифицировали как CL1 категории 4 по Rutherford (степень II) или категорию 5 по Rutherford (степень III) (20 (44%) субъектов и 25 (56%) субъектов, соответственно). Результаты показывали, что в пределах первых 12 месяцев большинство субъектов, которых лечили клеточной суспензией по изобретению, достигали клинически релевантного ответа, как продемонстрировано с помощью усовершенствования, т. е. понижения их классификации до категории 0-3 по Rutherford (степени 0 и 1) у 28 (68%) субъектов.

Таблица 7. Классификация по Rutherford на базовом уровне и через 3, 6, 9 и 12 месяцев после введения Rexmyelocel-T

Категория	Степень	Контроль (n, %)	Наименьшая доза 1×10^8 BM-MNC (n, %)	Средняя доза 5×10^8 BM- MNC (n, %)	Наибольшая доза 1×10^9 BM-MNC (n, %)	Все субъекты, которых лечили (n, %)
Базовый уровень						
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
Всего		15	15	15	15	45
3 месяца						
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
Всего		14	15	15	15	45
6 месяцев						
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
Всего		12	15	15	15	45
9 месяцев						
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
Всего		12	13	14	15	42
12 месяцев						
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
Всего		11	13	14	14	41

Сокращения: BMNC = моноклеарные клетки костномозгового происхождения

Через 3 месяца после введения 15 (33%) субъектов, которых лечили клеточной суспензией по изобретению, и 12 (40%) субъектов в группах средней и высокой дозы более не страдали от боли в покое или утраты ткани, и их классифицировали как категорию 0-3 по Rutherford (степень 0 и I), которые затем возрастали до 21 (46%) субъекта, 24 (57%) и 28 (68%) через 6, 9 и 12 месяцев после введения, соответственно. Для субъектов в группах средней и высокой дозы это составляло 13 (43%), 15 (50%) и 18 (64%) через 6, 9 и 12 месяцев после введения, соответственно. Это дает благоприятное сравнение с контрольной группой, в которой 0 (0%), 1 (8%), 1 (8%) и 2 (18%) субъекта усовершенствовались до категории 1-3 по Rutherford (степень I) после 3, 6, 9 и 12 месяцев соответственно.

Один субъект, отнесенный к контрольной группе, отозвал информированное согласие после рандомизации, один субъект погиб из-за сердечно-сосудистого заболевания перед визитом последующего наблюдения через 6 месяцев, один пациент подвергся большой ампутации перед визитом последующего наблюдения через 6 месяцев и один субъект вышел из-под наблюдения перед визитом через 12 месяцев. Два субъекта, которые получали более низкую дозу Rexmyelocel-T, подверглись большой ампутации после 6 месяцев после введения в целевой конечности.

Всего 28 из 45 (62%) субъектов в группах лечения клеточной суспензией по изобретению через 12 месяцев после введения, из которых 18 из 30 (63%) в группах средней и высокой дозы, не имели ишемическую боль в покое или ишемические язвы, по сравнению с контрольной группой, где 9 из 11 (82%) субъектов сообщали о боли в покое или присутствии незаживающих ишемических язв (4 (36%) субъекта).

Когда применяли перенос последнего наблюдения вперед (LOCF) (за исключением субъектов с большой ампутацией конечности; этих субъектов считали пациентами с отсутствием клинического ответа), результаты показывали, что в пределах первых 12 месяцев после введения клеточной суспензии по изобретению, клинически релевантного ответа достигали, как продемонстрировано с помощью понижения их классификации по Rutherford. Категория 0-3 (степень 0 и I) у 28 (64%) из всех субъектов, получавших лечение, и 18 (63%) в группах средней и высокой дозы (см. табл. 8 и фиг. 2 и 3).

Через 3 месяца после введения Rexmyelocel-T, 15 (33%) субъектов, которых лечили с использованием Rexmyelocel-T, из которых 12 (40%) в группах средней и высокой дозы, более не страдали от боли в покое или утраты ткани, и их классифицировали как категорию 0-3 по Rutherford (степень 0 и I), которые дополнительно возрастали до 21 (46%) субъекта и 24 (53%) субъектов через 6 и 9 месяцев после введения, соответственно, для всех пациентов, получавших лечение. В группах средней и высокой дозы 14 (47%) и 15 (50%) субъектов классифицировали как категорию 0-3 по Rutherford через 6 и 9 месяцев соответственно. Это дает благоприятное сравнение с контрольной группой, в которой только 0 (0%), 1 (8%), 1 (7%) и два (13%) субъекта усовершенствовались до категории 1-3 по Rutherford (степень I) после 3, 6, 9 и 12 месяцев соответственно.

Таблица 8. Классификация по Rutherford при базовом уровне и через 3, 6, 9 и 12 месяцев после введения Rexmyelocel-T (включая ампутации и смерть) - LOCF

Категория	Степень	Контроль (n, %)	Низкая доза 1×10^8 BM-MNC (N, %)	Средняя доза 5×10^8 BM-MNC (N, %)	Высокая доза 1×10^9 BM-MNC (N, %)	Все субъекты, которых лечили (n, %)
Базовый уровень						
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
Ампутации		0	0	0	0	0
Смерть		0	0	0	0	0
Всего		15	15	15	15	45
3 месяца						
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
Ампутации		0	0	0	0	0
Смерть		0	0	0	0	0
Всего		15	15	15	15	45
6 месяцев						
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
Ампутации		1 (7)	0	0	0	0
Смерть		1 (7)	0	0	0	0
Всего		15	15	15	15	45
9 месяцев						
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
Ампутации		1 (7)	2 (13)	0	0	2 (4)
Смерть		1 (7)	0	0	0	0
Всего		15	15	15	15	45
12 месяцев						
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
Ампутации		1 (7)	2 (13)	0	0	2 (4)
Смерть		1 (7)	0	0	1 (7)	1 (2)
Всего		15	15	15	15	45

Сокращения: BMNC = моноклеарные клетки костномозгового происхождения

На фиг. 4 и в табл. 9 показан клинически релевантный ответ у большего числа субъектов в группах

лечения клеточной суспензией по изобретению по сравнению с контрольной группой во все визиты последующего наблюдения после введения. Через 12 месяцев после введения Rexamucel-T, большинство субъектов во всех группах Rexamucel-T демонстрировали клинически релевантный ответ по сравнению с контрольной группой: 34 (76%) субъектов (10, 13 и 11 субъектов в наименьшей, средней, наибольшей группах Rexamucel-T, соответственно) против 2 (13%) субъектов.

Таблица 9. Классификация по Rutherford через 3, 6, 9 и 12 месяцев после введения Rexamucel-T - LOCF

	Контроль (n, %)	Наименьшая доза 1×10^8 BM-MNC (N, %)	Средняя доза 5×10^8 BM-MNC (N, %)	Наибольшая доза 1×10^9 BM-MNC (N, %)	Все субъекты, которых лечили (n, %)
3 месяца					
Ответ	1 (7)	5 (33)	7 (47)	6 (40)	18 (40)
Сохранение	13 (87)	10 (67)	8 (53)	9 (60)	27 (60)
Без ответа	1 (7)	0	0	0	0
Всего	15	15	15	15	45
6 месяцев					
Ответ	2 (13)	10 (67)	8 (53)	7 (47)	25 (56)
Сохранение	11 (73)	5 (33)	7 (47)	7 (47)	19 (42)
Без ответа	2 (13)	0	0	1 (7)	1 (2)
Всего	15	15	15	15	45
9 месяцев					
Ответ	2 (13)	11 (73)	9 (60)	9 (60)	29 (64)
Сохранение	11 (73)	4 (27)	6 (40)	5 (33)	15 (33)
Без ответа	2 (13)	0	0	1 (7)	1 (2)
Всего	15	15	15	15	45
12 месяцев					
Ответ	2 (13)	10 (67)	13 (87)	12 (80)	35 (78)
Сохранение	12 (80)	5 (33)	2 (13)	3 (20)	7 (22)
Без ответа	1 (7)	0	0	0	0
Всего	15	15	15	15	45

Сокращения: BMNC = мононуклеарные клетки костномозгового происхождения

2. Изменение числа язв в пораженной конечности

Изменение числа язв в пораженной конечности представлено в табл. 10 и на фиг. 5. При визите базового уровня 25 субъектов (56%) в группах лечения клеточной суспензией по изобретению и 9 субъектов (60%) в контрольной группе классифицировали как категорию 5 по Rutherford, и они имели незаживающие ишемические язвы. Большинство субъектов имели одну язву, и отсутствовали существенные различия между группами лечения и контрольной группой (5, 7 и 6 субъектов в наименьшей, средней, наибольшей группах клеточной суспензии по изобретению, соответственно, и 6 субъектов в контрольной группе). Четыре субъекта в наименьшей, средней, наибольшей группах лечения клеточной суспензией по изобретению (1, 1 и 2 субъекта, соответственно) и один субъект в контрольной группе имели ≥ 3 язв.

Несмотря на то, что усредненный размер язв на базовом уровне у субъектов в группе лечения клеточной суспензией по изобретению выше такового у субъектов в контрольной группе ($39,9 \pm 23,0$ мм против $26,3 \pm 23,5$ мм в группах лечения и контрольной группе, соответственно), результаты показывали, что у субъектов, язвы которых не заживали, размер язв уменьшался ($29,7 \pm 13,5$ мм), при этом средний размер язв в контрольной группе возрастал ($43,8 \pm 29,3$ мм) (табл. 11).

Таблица 10. Изменение числа язв в пораженной конечности

	Контроль (n, %)	Наименьшая доза 1×10^8 ВМ-МНС (n, %)	Средняя доза 5×10^8 ВМ-МНС (n, %)	Наибольшая доза 1×10^9 ВМ-МНС (n, %)	Все субъекты, которых лечили (n, %)
Базовый уровень					
0 язв					
1 язва	6 (67)	5 (63)	7 (88)	6 (67)	18 (72)
2 язвы	2 (22)	2 (25)	0	1 (11)	3 (12)
≥ 3 язвы	1 (11)	1 (12)	1 (12)	2 (22)	4 (16)
Всего	9	8	8	9	25
3 месяца после введения Рехмуелосел-Т					
0 язв	1 (13)	2 (25)	2 (25)	1 (11)	5 (20)
1 язва	4 (50)	4 (50)	5 (63)	4 (44)	13 (52)
2 язвы	1 (12)	0	0	3 (33)	3 (12)
≥ 3 язвы	2 (25)	2 (25)	1 (12)	1 (11)	4 (16)
Всего	8	8	8	9	25
6 месяцев после введения Рехмуелосел-Т					
0 язв	2 (33)	4 (57)	3 (38)	2 (22)	9 (38)
1 язва	4 (67)	1 (14)	4 (50)	6 (67)	11 (46)
2 язвы	0	2 (29)	0	0	2 (8)
≥ 3 язвы	0	0	1 (12)	1 (11)	2 (8)
Всего	6	7	8	9	24
9 месяцев после введения Рехмуелосел-Т					
0 язв	2 (33)	5 (71)	4 (50)	4 (44)	13 (54)
1 язва	4 (67)	2 (29)	3 (38)	4 (44)	9 (38)
2 язвы	0	0	0	1 (11)	1 (4)
≥ 3 язвы	0	0	1 (12)	0	1 (4)
Всего	6	7	8	9	24
12 месяцев после введения Рехмуелосел-Т					
0 язв	2 (33)	4 (57)	7 (88)	7 (78)	18 (75)
1 язва	4 (66)	3 (43)	0	2 (22)	5 (21)
2 язвы	0	0	0	0	0
≥ 3 язвы	0	0	1 (12)	0	1 (4)
Всего	6	7	8	9	24

Таблица 11. Размер язв в пораженной конечности (наибольший диаметр)

	Контроль (n = 15)	Наименьшая доза 1×10^8 ВМ-МНС (n = 15)	Средняя доза 5×10^8 ВМ-МНС (n = 15)	Наибольшая доза 1×10^9 ВМ-МНС (n = 15)	Все субъекты, которых лечили (n = 45)
Базовый уровень					
N	9	8	7	8	23
Среднее \pm	26,3 \pm	41,5 \pm	31,4 \pm	45,6 \pm	39,9 \pm 23,0
SD	23,5	29,1	19,7	19,2	
3 месяца					
N	5	6	6	7	19
Среднее \pm	21,8	51,7 \pm	23,7 \pm	27,9 \pm	34,1 \pm 27,4
SD	\pm 17,9	39,7	19,5	12,9	
6 месяцев					
N	3	4	5	7	16
Среднее \pm	36,7 \pm	42,5 \pm	24,0 \pm	24,3 \pm	28,8 \pm 25,0
SD	15,3	43,5	19,8	13,7	
9 месяцев					
N	3	2	4	5	11
Среднее \pm	26,7 \pm	27,5 \pm	12,5 \pm	23,0 \pm	20,0 \pm 13,0
SD	5,8	17,7	6,5	14,8	
12 месяцев					
N	4	3	1	2	6
Среднее \pm	43,8 \pm	31,7 \pm	15,0*	34,0 \pm	29,7 \pm 13,5
SD	29,3	17,6		35,7	

*Через 12 месяцев один субъект со средней дозой имел язву на пораженной конечности. Представлен фактический размер этой язвы.

3. Изменение ТсРО2

Изменение ТсРО2 представлено в табл. 12.

При базовом уровне 35 (79%) субъектов в группах лечения клеточной суспензией по изобретению имели ТсРО2 < 40 мм рт.ст. (12, 12 и 11 субъектов в трех группах доз (наименьшая, средняя, наибольшая группы, соответственно) по сравнению с 6 (43%) субъектами в контрольной группе.

Результаты показывали, что при визите последующего наблюдения через 12 месяцев уровни ТсРО2 возрастали до ≥ 40 мм рт.ст. у большинства субъектов, которых лечили с использованием Rехmyelocel-T (24 (60%) субъектов) по сравнению с 5 (46%) субъектами в контрольной группе.

Таблица 12. Изменение чрескожного давления кислорода

	Контроль (n, %)	Наименьшая доза 1×10^8 ВМ-МНС (N, %)	Средняя доза 5×10^8 ВМ-МНС (N, %)	Наибольшая доза 1×10^9 ВМ-МНС (N, %)	Все субъекты, которых лечили (n, %)
Базовый уровень					
ТсО2 ≥ 40 мм рт. ст.	8 (57)	2 (14)	3 (20)	4 (27)	9 (21)
ТсО2 < 40 мм рт. ст.	6 (43)	12 (86)	12 (80)	11 (73)	35 (79)
Всего	14	14	15	15	44
3 месяца после введения Rехmyelocel-T					
ТсО2 ≥ 40 мм	7 (64)	6 (43)	6 (43)	8 (53)	20 (47)

рт. ст.					
TcO2 < 40 мм	4 (36)	8 (57)	8 (57)	7 (47)	23 (53)
рт. ст.					
Всего	11	14	14	15	43
6 месяцев после введения Rexmyelocel-T					
TcO2 ≥ 40 мм	6 (55)	7 (47)	5 (39)	8 (53)	20 (47)
рт. ст.					
TcO2 < 40 мм	5 (45)	8 (53)	8 (61)	7 (47)	23 (53)
рт. ст.					
Всего	11	15	13	15	43
12 месяцев после введения Rexmyelocel-T					
TcO2 ≥ 40 мм	5 (46)	9 (69)	7 (54)	8 (57)	24 (60)
рт. ст.					
TcO2 < 40 мм	6 (54)	4 (31)	6 (46)	6 (43)	16 (40)
рт. ст.					
Всего	11	13	13	14	40

4. Васкулогенез

Васкулогенез оценивали через 6 месяцев после введения клеточной суспензии по изобретению. Среди субъектов, которых лечили клеточной суспензией по изобретению, васкулогенез присутствовал у 26 (62%) субъектов: 7, 8 и 9 субъектов в наименьшей, средней, наибольшей группах, соответственно (см. табл. 13).

Таблица 13. Васкулогенез

	Наименьшая доза 1×10^8 BM-MNC (n, %)	Средняя доза 5×10^8 BM-MNC (n, %)	Наибольшая доза 1×10^9 BM-MNC (n, %)	Все субъекты, которых лечили (n, %)
6 месяцев после введения Rexmyelocel-T				
Васкулогенез	7 (58)	8 (62)	9 (64)	24 (62)
Нет васкулогенеза	5 (42)	5 (38)	5 (36)	15 (38)
Всего	12	13	14	39

Ангиографические изображения для 3 из 24 случаев васкулогенеза, который возникал, представлены по сравнению с базовым уровнем на фиг. 6: продольный рост артерий (фиг. 6А), возникновение новых сосудов (фиг. 6В) и поперечный рост коллатерали, которая направлена к коже (фиг. 6С).

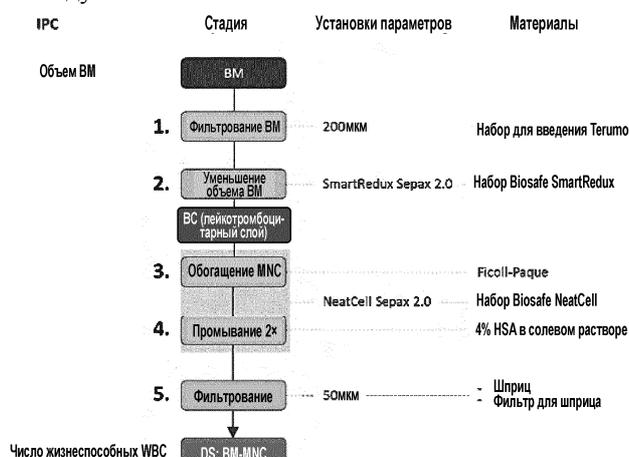
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клеточная суспензия, содержащая от 4×10^8 до $1,2 \times 10^9$ аутологических или аллогенных белых клеток крови, происходящих из костного мозга человеческого субъекта, где из общего числа от 4×10^8 до $1,2 \times 10^9$ белых клеток крови:

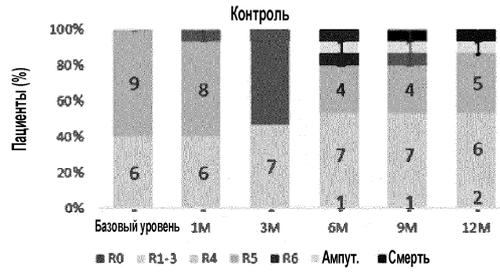
- i) от 20 до 51% представляют собой лимфоциты и от 3,9% до 22,3% представляют собой моноциты;
 - ii) от 1,4 до 10% представляют собой гематопозитические стволовые клетки, которые экспрессируют CD34;
 - iii) от 25,3 до 83,3% от общего числа белых клеток крови представляют собой мононуклеарные клетки;
 - iv) от 16,7 до 74,7% представляют собой гранулоциты;
 - v) от 5,4 до 38,8% от общего числа белых клеток крови экспрессируют CXCR4;
 - vi) от 0,07 до 24,7% от общего числа белых клеток крови экспрессируют VEGFR2;
 - vii) из общего числа гематопозитических стволовых клеток, которые экспрессируют CD34, от 7,7 до 55,5% представляют собой ранние не коммитированные гематопозитические стволовые клетки, которые не экспрессируют CD38, и от 0,7 до 10,3% представляют собой стволовые клетки, которые экспрессируют CD34 и CXCR4; и
 - viii) максимальное соотношение красных клеток крови и лейкоцитарных клеток составляет 6,7 и максимальное соотношение тромбоцитов и лейкоцитарных клеток составляет 32,
- для лечения или улучшения заболевания периферических артерий нижних конечностей.

2. Клеточная суспензия по п.1, где из общего числа белых клеток крови от 32,3 до 80,0% представляют собой мононуклеарные клетки, выбранные из списка, состоящего из лимфоцитов, моноцитов и гематопозитических стволовых клеток, которые экспрессируют CD34 клетки, и от 20,0 до 67,7% представляют собой гранулоциты.

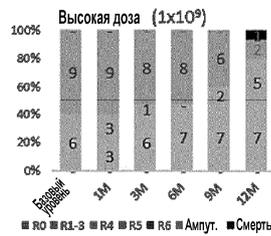
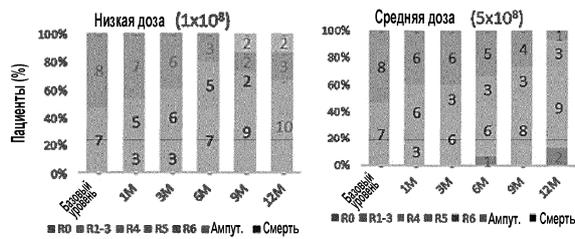
3. Клеточная суспензия по п.1 или 2, где клеточная суспензия содержит от 5×10^8 до $1,2 \times 10^9$.
4. Клеточная суспензия по п.1 или 2, где клеточная суспензия содержит от 8×10^8 до $1,2 \times 10^9$.
5. Клеточная суспензия по п.1 или 2, где клеточная суспензия содержит от 9×10^8 до $1,1 \times 10^9$.
6. Клеточная суспензия по п.1 или 2, где клеточная суспензия содержит от $9,5 \times 10^8$ до $1,05 \times 10^9$.
7. Клеточная суспензия по п.1 или 2, где клеточная суспензия содержит от $9,8 \times 10^8$ до $1,02 \times 10^9$.
8. Клеточная суспензия в соответствии с любым из пп.1-7, где заболевание периферических артерий нижних конечностей представляет собой критическую ишемию конечностей.
9. Клеточная суспензия в соответствии с любым из пп.1-8, где клетки такой клеточной суспензии суспендируют в объеме от 5 до 30 мл гепаринизированного солевого раствора или лактатного раствора Рингера, предпочтительно содержащего приблизительно 1% HSA и приблизительно 2,5% глюкозы.
10. Клеточная суспензия, как определено в любом из пп.1-7, где указанное заболевание периферических артерий нижних конечностей представляет собой критическую ишемию конечностей, и указанное лечение или улучшение включает внутриартериальное введение, где поток крови низкого давления вплоть до 4 атм получают посредством расположения надуваемого баллона проксимально от окклюзионного повреждения сосудов в дистальной бедренной или подколенной артерии, и инфузию указанной клеточной суспензии внутриартериально.
11. Шприц для лечения или улучшения заболевания периферических артерий нижних конечностей, который содержит клеточную суспензию, как определено в любом из пп.1-7.
12. Шприц по п.11, где указанное заболевание периферических артерий нижних конечностей представляет собой критическую ишемию конечностей.
13. Шприц 11, где указанное лечение включает внутриартериальное введение, где поток крови низкого давления вплоть до 4 атм получают посредством расположения надуваемого баллона проксимально от окклюзионного повреждения сосудов в дистальной бедренной или подколенной артерии, и инфузию указанной клеточной суспензии внутриартериально.
14. Клеточная суспензия по любому одному из пп.1-7 или шприц по любому одному из пп.12, 13, где указанную суспензию предоставляют в виде однократной дозы.
15. Клеточная суспензия по любому одному из пп.1-7 или шприц по любому одному из пп.10 или 13, где индукцию потока низкого давления достигают между 1 и 6 мин и где инфузию указанной клеточной суспензии выполняют между 2 и 10 мин.



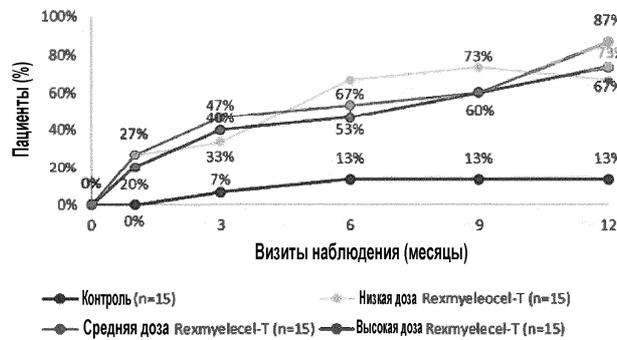
Фиг. 1



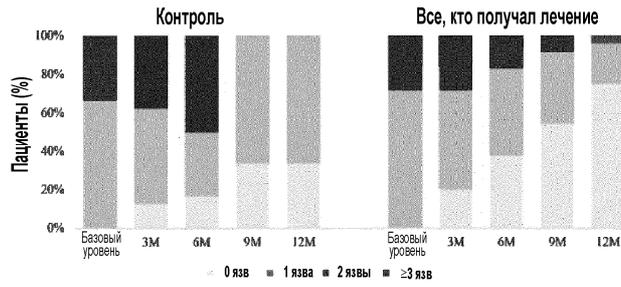
Фиг. 2



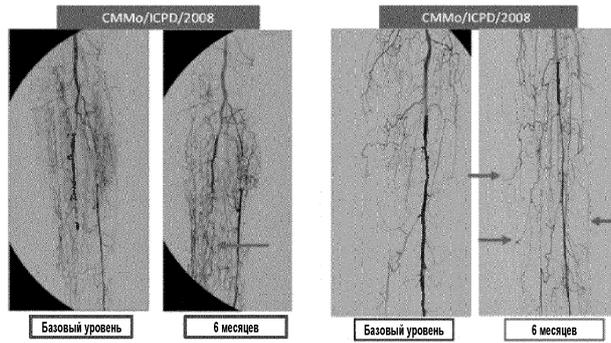
Фиг. 3



Фиг. 4

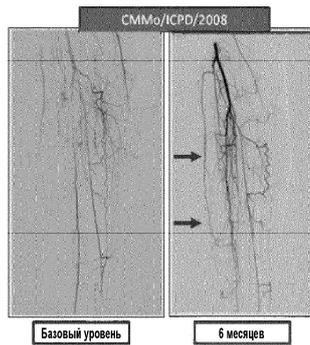


Фиг. 5



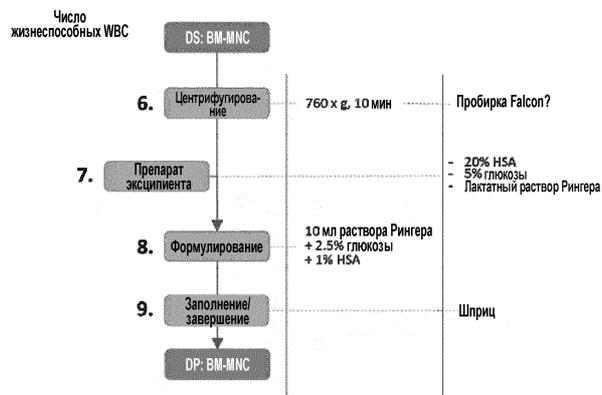
6A Продольный рост артерий

6B Новые сосуды в определенной области



6C.

Фиг. 6



Фиг. 7