

(19)



(10) **LT 2015 501 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2015 501**

(51) Int. Cl. (2015.01): **A61K 35/00**

(22) Paraiškos padavimo data: **2015 01 08**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2015 08 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(71) Pareiškėjas:

Adas DARINSKAS, Turniškių g. 13-8, LT-10104 Vilnius, LT

Mindaugas PAŠKEVIČIUS, Svajonių g. 24-48, LT-10100 Vilnius, LT

(72) Išradėjas:

Adas DARINSKAS, LT

Mindaugas PAŠKEVIČIUS, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Gediminas PRANEVIČIUS, Advokatų kontora VARUL, Konstitucijos pr. 7, LT-09308 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Stromos vaskuliarinės frakcijos (SVF) ląstelių išskyrimo iš riebalinio audinio būdas ir jų panaudojimas

(57) Referatas:

Išradimas skirtas medicinos sričiai, konkrečiai - stromos vaskuliarinės frakcijos (SVF) ląstelių išskyrimo iš žmogaus riebalinio audinio būdai ir jų panaudojimui regeneracinėje medicinoje tokių patologijų kaip degeneraciniai įvairios lokalizacijos smulkiųjų ir stambiųjų sąnarių artritai, artrozoartritai, artrozės, osteochondropatija, tendinopatija, mono- ir polireumatoidiniai artritai, potrauminės artrozės, osteochondrozė, daliniai sausgyslių, raiščių ir raumenų plyšimai, obliteruojanti aterosklerozė, neoperabili kritinė kojų išemija, negyjančios trofinės opos, diabetinė angiopatija, išsėtinė sklerozė, Krono liga, neuropatijos, parodontozė, širdies kraujagyslių išemija, gydymui.

STROMOS VASKULIARINĖS FRAKCIJOS (SVF) LĄSTELIŲ IŠSKYRIMO IŠ RIEBALINIO AUDINIO BŪDAS IR JŲ PANAUDOJIMAS

IŠRADIMO SRITIS

Išradimas skirtas medicinos sričiai, konkrečiai - stromos vaskuliarinės frakcijos (SVF) ląstelių išskyrimo iš žmogaus riebalinio audinio būdu ir jų panaudojimui regeneracinėje medicinoje.

TECHNIKOS LYGIS

Pastaruoju metu regeneracinės medicinos srityje yra atliekama daug tyrimų, jie siejami su labai plačiu ligų spektru. Pagrindine komponente regeneracinėje medicinoje yra laikoma ląstelė, ji gali būti kamieninė arba somatinė. Ypatingas dėmesys skiriamas mažai apdorotoms autologinėms ląstelėms, nes toks ląstelių panaudojimas yra laikomas gydymu, tačiau pati medžiaga - ląstelė, nėra laikoma vaistu. Tokiu būdu visa procedūra gali būti priskiriama transplantacijai.

SVF ląstelės yra ypatingai tinkamos autologinei ląstelių terapijai, kurioje ląstelių, išskirtų iš paties paciento riebalinio audinio, klinikinės dozės implantuojamos atgal, taikant minimalią intervenciją. Medicininiais tyrimais įrodyta, kad SVF ląstelės turi terapinį poveikį, gydant tokius sutrikimus kaip Krono liga, transplantantų atmetimo reakcijos, autoimuninės ir alerginės patologijos, tokios kaip išsėtinė sklerozė ir žarnyno uždegimas, miokardo infarktas, galūnių išemija, negyjančios lėtinės žaizdos, radiaciniai pažeidimai, šlapimo nelaikymas ir t.t. (Gimble et al. *Stem Cell Research & Therapy*, 2010). Jos taip pat turi didžiulį potencialą kosmetikoje ir rekonstrukcinėje medicinoje, siekiant pailginti transplantuotų autologinių riebalų išgyvenimą, pavyzdžiui, rekonstruojant krūtis po atliktų vėžio operacijų, veido raukšlių koregavimo ir pan. (Yoshimura et al. *Aesth Plast Surg*, 2008). Taip pat kliniškai įrodytas jų teigiamas poveikis, gydant sausgyslių ligas (Farshid Sarrafzadeh-Rezaei et al. *Comparative Study on Functional Effects of Allogeneic Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells and Adipose Derived Stromal Vascular Fraction on Tendon Repair: A Biomechanical Study in Rabbits*, 2013), kur jų poveikis buvo rastas pranašesnis už palyginimui naudotas kaulų čiulpų ląsteles. Inovatyvių mokslininkų grupė iš Australijos parodė, jog SVF ląstelės, leidžiamos intraveniniu būdu, gali padėti pacientams, sergantiems migrena (Wayne D Thomas et al. *Migraine and tension-type headache treated with stromal vascular fraction: a case series*, 2014). Tyrimai neurologijos srityje

patvirtino, kad SVF ląstelėmis galima gydyti neuropatinius skausmus (Richard Lilischkis et al. *A preliminary report on stem cell therapy for neuropathic pain in humans*, 2014). SVF ląstelių pritaikymą dermatologijoje patvirtino Reichmann E. ir kt. darbai (*Tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts prevascularized with adipose-derived cells*, 2014).

Vien 2014 metais yra paskelbta daugiau nei 30 ikiklinikinio ir klinikinio SVF ląstelių taikymo būdų. Sritis yra labai jauna ir greitai besivystanti. Dauguma mokslininkų naudoja kultivuotas SVF ląsteles. Ląstelių išskyrimas ir paskesnis kultivavimas (dauginimas) iki efektyvaus pritaikymui kiekio ar koncentracijos trunka savaites (Hagege et al. *Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy*, 2003). Nors šiuo būdu užaugintos ląstelės pasižymi gausumu, švarumu ir giminingumu, pats jų kultivavimo procesas yra palyginti brangus. Būdas dar yra rizikingas tuo, kad ląstelių kultivavimo metu yra potenciali rizika užkrėsti jas aplinkoje esančiais mikroorganizmais.

TRUMPAS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Skirtingai nuo analogų, kuriuose kalbama apie SVF ląstelių kultivavimą ir tokiu būdu gautų ląstelių panaudojimą regeneracinėje medicinoje, šiame išradime aprašytas natūralių SVF ląstelių išskyrimo iš žmogaus riebalinio audinio (lipoaspirato) būdas.

SVF ląstelių išskyrimas iš riebalinio audinio atliekamas dviem etapais, jas atskiriant ir koncentruojant. Riebalinio audinio, paimto iš žmogaus organizmo, apdorojimas bei SVF išskyrimas atliekamas sterilioje aplinkoje. Riebalinis audinys perkeliamas į specialų indą, praplaunamas PBS tirpalu santykiu 1:1, inkubuojamas 10 minučių 37°C temperatūroje, iš tokiu būdu paruošto tirpalo mechaniškai pašalinama apatinė vandeninė tirpalo frakcija. Plovimas PBS tirpalu kartojamas kelis kartus, kol apatinė vandeninė frakcija tampa skaidri.

Į praplautą ir neturintį apatinės vandens frakcijos riebalinį audinį dedama kolagenazės ir Ca gliukonato. Tirpalas inkubuojamas, kol masė tampa homogeniška.

Alternatyviu atveju riebalinis audinys ardomas mechaniškai. Tokiu atveju inkubacija neatliekama.

Po inkubacijos iš riebalų mechaniškai pašalinama nesuardyta stromos dalis ir visas indo turinys perkeliamas į mėgintuvėlį arba kelis mėgintuvėlius bei centrifuguojamas. Susidariusi viršutinė frakcija pašalinama. Apatinę frakciją sudaro SVF, kuri yra suspenduojama PBS, filtruojama ir dar kartą centrifuguojama. Susidariusi viršutinė frakcija vėl pašalinama, nuosėdos suspenduojamos autologiniame paciento serume arba plazmoje. Gauta SVF su autologiniu paciento serumu arba plazma išpilstoma į atitinkamą kiekį švirkštų ir vežama į gydymo įstaigą medicininiam taikymui.

IŠSAMUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

I. Riebalinio audinio paėmimas, pakavimas ir transportavimas

Naudojant švirkštus, paimama nuo 50 iki 100 ml paciento riebalinio audinio. Atlikus riebalinio audinio paėmimo procedūrą, švirkštas ištraukiamas, uždedamas švirkšto kamštukas. Švirkštas dedamas į sterilų maišelį, ant kurio užrašomi paciento identifikavimo duomenys.

Prieš arba po procedūros paimami 4 vakutaineriai paciento veninio kraujo serumui arba plazmai gauti. Ant vakutainerių užrašomi paciento identifikavimo duomenys.

Dėžė su riebaliniu audiniu ir paciento veninio kraujo mėginiais transportuojama į riebalinio audinio apdorojimo laboratoriją. Maksimali audinio saugojimo trukmė iki jo paruošimo ir pritaikymo pacientui yra 6 valandos, skaičiuojant nuo riebalinio audinio paėmimo laiko.

II. Riebalinio audinio paruošimas taikymui

Riebalinio audinio paruošimo medicininiam taikymui metu iš riebalinio audinio išskiriamos SVF ląstelės. Riebalinio audinio apdorojimas bei SVF išskyrimas atliekamas sterilioje aplinkoje.

50 ml švirkšte esantis riebalinis audinys perkeliamas į specialų 200 ml indą. Į indą su perkeltu riebaliniu audiniu santykiu 1:1 pilamas plovimo tirpalas PBS arba fiziologinis tirpalas. Gautasis riebalinio audinio tirpalas inkubuojamas 10 minučių 37°C temperatūroje.

Po inkubacijos, naudojant pipetę, pašalinama apatinė vandeningė frakcija. Plovimas PBS arba fiziologiniu tirpalu kartojamas kelis kartus, kol apatinė vandeningė frakcija tampa skaidri. Jeigu ant riebalinio audinio viršaus susiformuoja riebalinis-aliejinis sluoksnis, jis pašalinamas pipete.

Atlikus riebalinio audinio plovimą ir pašalinus apatinę vandeningą frakciją, į riebalinį audinį dedama 1 ml kolagenazės (10%) tirpalo ir 50 µl Ca gliukonato. Inkubuojama 20 minučių 37°C temperatūroje. Jei, praėjus 20 minučių, masė inde dar nėra homogeniška, inkubuojama papildomai 10 minučių.

Alternatyviai, atlikus riebalinio audinio plovimą ir pašalinus apatinę vandeningą frakciją, riebalinis audinys supilamas į 20 ml arba 50ml Luer Lock švirkštą, švirkštas užsukamas 18G adata ir visas mišinys yra per ją prasunkiamas. Procedūra kartojama dar kartą. Po šių etapų paimamas naujas švirkštas ir procedūra kartojama, naudojant 23G adatą, tai atliekama ne mažiau kaip vieną kartą. Suspensija tampa homogeniška ir tuomet ją galima centrifuguoti.

Po inkubacijos arba mechaninio riebalinio audinio suardymo, iš riebalų masės adata arba Pastero pipete yra pašalinama nesuardyta stromos dalis ir visas indo turinys perkeliamas į 50 ml mėgintuvėlį arba į kelis mėgintuvėlius, paskirstant mėginį į lygias dalis. Centrifuguojama 7 minutes 850 aps/min greičiu.

Susidariusi viršutinė frakcija pašalinama su pipete. Apatinę frakciją sudaro SVF, kuri yra suspenduojama PBS ir filtruojama per 100 µm nailoninį filtrą. Išfiltruota masė centrifuguojama 10 minučių 600-1500 aps/min greičiu.

Susidariusi viršutinė frakcija pašalinama, nuosėdos suspenduojamos autologiniame paciento serume. Gauta SVF su autologiniu paciento serumu išpilstoma į atskirus švirkštus ir vežama į gydymo įstaigą mediciniam taikymui.

III. SVF taikymo indikacijos ir gydymo pavyzdžiai

Indikacijos procedūrai atlikti:

- a) obliteruojanti aterosklerozė;

- b) neoperabili kritinė kojų išemija, kai nėra galimybių atlikti nei chirurginių, nei endovaskulinių operacijų ir pacientui gresia galūnės amputacija;
- c) negyjančios trofinės opos dėl arterinės kraujotakos sutrikimų;
- d) esant distalinei gangrenai, kai yra negrįžtami audinių pakitimai ir pacientui bus atliekama amputacija, siekiant pagerinti pooperacinį periodą ir žaizdos gijimą;
- e) diabetinė angiopatija su ir be trofikos sutrikimų;
- f) trumpa kliaudikacija;
- g) Reino sindromas.

Gydymo procedūra, taikant paruoštą SVF iš paciento riebalinio audinio:

Pacientas guldomas ant nugaros (priklausomai nuo to, kurie segmentai yra užakę). Su markeriu iš abiejų magistralinės arterijos eigos pusių kas 3-4 centimetrus pažymimos injekcijos vietos. Injekcijos vietos patepamos dezinfekciniu tirpalu. Autologinės SVF ląstelės, gautos aukščiau aprašytu būdu, yra injekuojamos į raumenis magistralinių kraujagyslių projekcijoje po 1 ml į kiekvienos injekcijos vietą. Po atliktos procedūros injekcijos vietos patepamos dezinfekciniu tirpalu ir galūnė apibintuojama steriliu bintu.

Ligoniams taikyto gydymo autologinėmis ląstelėmis pavyzdžiai ir jų rezultatai:

Pacientas R. K. Atvyko, skųsdamasis pastoviais skausmais, atsiradusiomis gangreninėmis opomis. Kadangi ligoniui grėsė galūnės amputacija, buvo nutarta pritaikyti gydymą SVF ląstelėmis. Prieš procedūrą žasto kulkšnelio indeksas buvo 0,32. Po gydymo SVF ląstelėmis gangreninės opos pradėjo gyti, skausmai sumažėjo. Ligonis pakartotinai atvyko po šešių savaičių, kulkšnelio indeksas pakilo iki 0,44. Ligonis šiuo metu yra stebimas, jis vaikšto, kliaudikacija apie 100-150 metrų.

Ligonis D. S. Atvyko po operacijos praėjus 6 mėnesiams su trombuotu šuntu. Atlikus angiografiją paaiškėjo, kad atlikti rekonstrukcijų nėra galimybių, pacientui grėsė galūnės amputacija. Kulkšnelio indeksas prieš procedūrą buvo 0,29. Buvo pritaikytas gydymas SVF ląstelėmis. Po procedūros kojos kraujotaka subkompensavosi, kliaudikacija apie 100 metrų.

Ligonis J. G. Atvyko su kritine rankos išemija, ligoniui grėsė rankos amputacija. Buvo taikytas gydymas SVF ląstelėmis. Po gydymo rankos kraujotaka žymiai pagerėjo, skausmai išnyko, jutimai ir motorika atsistatė.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Stomos vaskuliarinės frakcijos (SVF) ląstelių išskyrimo iš žmogaus riebalinio audinio būdas, jas atskiriant ir koncentruojant, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad
 - a) 50-100 ml iš anksto surinkto paciento riebalinio audinio perkelia į atskirą indą ir praplauna PBS arba fiziologiniu tirpalu santykiu 1:1;
 - b) gautą riebalinio audinio tirpalą inkubuoja 10 minučių 37°C temperatūroje;
 - c) po inkubacijos, naudojant pipetę, pašalina apatinę vandeninę frakciją ir viršutinį riebalinį sluoksnį;
 - d) į po stadijos c) gautą riebalinį audinį prideda 1 ml 10% kolagenazės tirpalo ir 50 µl Ca gliukonato ir inkubuoja nuo 20 iki 30 minučių 37°C temperatūroje;
 - e) iš riebalų masės pašalina nesuardytą stomos dalį ir visą indo turinį perkelia į atskirus mėgintuvėlius ir centrifuguoja 7 minutes 850 aps/min greičiu;
 - f) pašalina susidariusią viršutinę frakciją;
 - g) likusią apatinę frakciją, kurią sudaro SVF, suspenduoja PBS ir filtruoja per 100 µm nailoninį filtrą;
 - h) išfiltruotą masę centrifuguoja 10 minučių nuo 600 iki 1500 aps/min greičiu;
 - i) pašalina susidariusią viršutinę frakciją, nuosėdas suspenduoja autologiniame paciento serume, gautą SVF su autologiniu paciento serumu išpildo į atskirus medicininiams pritaikymui skirtus švirkštus.
2. Būdas pagal 1 punkto d) stadiją, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad riebalinį audinį suardo mechaniškai, perkošiant mažiausiai vieną kartą per 18G adatą, po to šią masę perkošiant per 23G adatą.
3. Stomos vaskuliarinės frakcijos (SVF) ląstelės, gautos būdu pagal 1 ar 2 punktą, skirtos panaudoti regeneracinėje medicinoje tokių patologijų kaip degeneraciniai įvairios lokalizacijos smulkiųjų ir stambiųjų sąnarių artritai, artrozoartritai, artrozės, osteochondropatija, tendinopatija, mono- ir polireumatoidiniai artritai, potrauminės artrozės, osteochondrozė, daliniai sausgyslių, raiščių ir raumenų plyšimai, obliteruojanti aterosklerozė, neoperabili kritinė kojų išemija, negyjančios trofinės opos, diabetinė angiopatija, išsėtinė sklerozė, Krono liga, neuropatijos, parodontozė, širdies kraujagyslių išemija, gydymui.