



Костнозамещающие материалы: тренды биотехнологического подхода

Москва-Красноярск, 2012



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

Актуальность

Области применения

**Хирургическая
стоматология и
челюстно-лицевая
хирургия**

**Травматология и
ортопедия**

**Реконструктивная
и пластическая
хирургия**



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

Существующие подходы к классификации

- По способу получения
- По химическому составу
- По строению
- По происхождению
- По длительности нахождения в тканях

Фундаментальные основы разработки костнопластических материалов

Знание морфофункциональной организации и метаболизма костной ткани

Установление факторов, индуцирующих и ингибирующих репаративный остеогенез

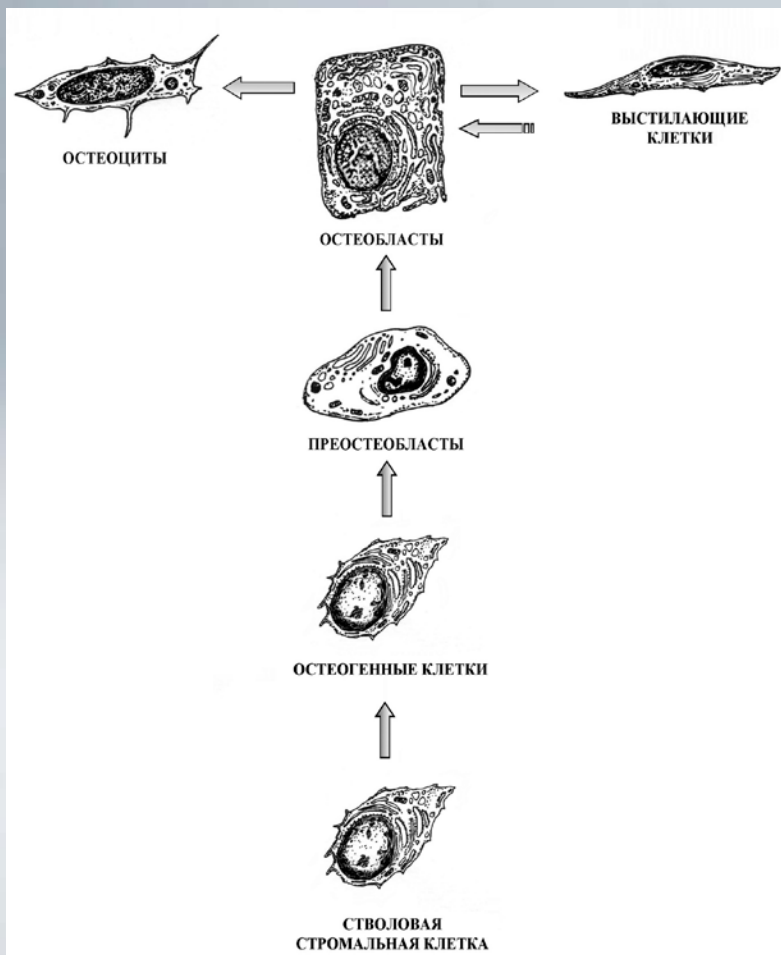
Идентификация клеточных источников репаративного остеогенеза

Цитофизиология костной ткани

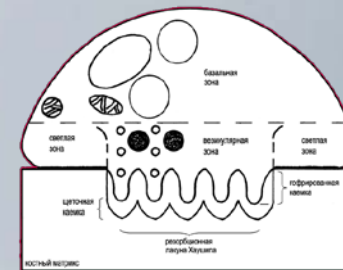


Клеточно-дифференциальная организация костной ткани

Остеобластический клеточный дифферон



Остекластический клеточный дифферон



Остеокласт

Преостеокласт

**Стволовая кроветворная
клетка**

Факторы регуляции остеогенеза



Костная пластика

Малые костные дефекты

- Это дефекты, характеризующиеся действием факторов и клеточных источников репаративного остеогенеза, в целом, достаточным для восстановления костной ткани.
- Необходима лишь оптимизация репаративного остеогенеза

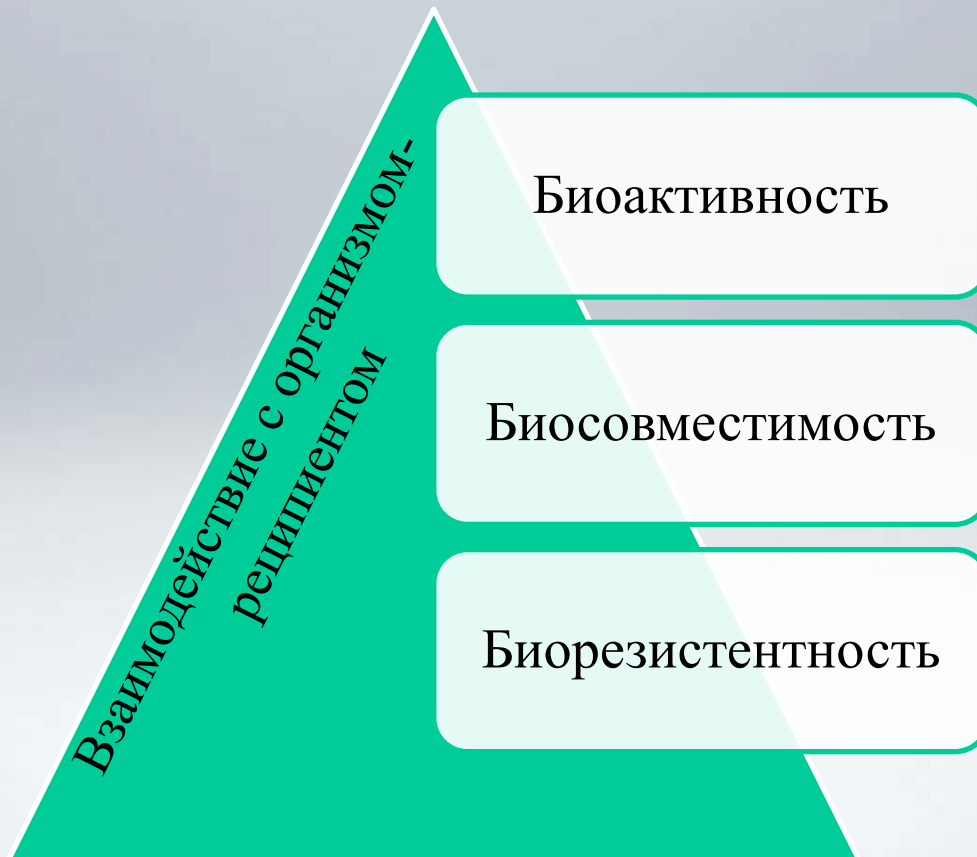
Крупные костные дефекты

- Это дефекты, характеризующиеся недостаточным для гистотипического восстановления костной ткани действием факторов и клеточных источников репаративного остеогенеза.
- Необходима индукция и поддержание репаративного остеогенеза

Целевые характеристики костнопластических материалов

1. Доступность получения исходных материалов и возможность серийного стандартизованного производства.
2. Возможность стандартизации строения, состава, свойств, а также технологии производства.
3. Эффективность оптимизации репаративного остеогенеза.
4. Удобство применения при выполнении оперативного вмешательства (удобная упаковка, готовность к использованию без дополнительных подготовительных мероприятий).
5. Коммерческая целесообразность.

Биодинамические характеристики остеопластических материалов



Свойства, определяющие механизм участия в репаративном остеогенезе

Остеокондукция

Остеоиндукция

Остеопротекция

Остеогенность



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
К Л Е Т О К
Ч Е Л О В Е К А

5 поколений костнопластических материалов

1. «Живая» костная ткань (ауто-, алло-, ксеногенная).
2. Консервированная костная ткань.
3. Синтетические костнопластические материалы.
4. Тканеинженерные эквиваленты кости.
5. «Индукционные» костнопластические материалы.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

1 поколение

- Аутогенная кость (участок подвздошной кости, ребра, костей голени, ветвь и тело нижней челюсти).
- Аллогенная и ксеногенная «живая» костная ткань не применяется.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

1 поколение. Преимущества

- Полное иммунологическое и гистотипическое соответствие костной ткани реципиентного ложа.
- Оптимальная выраженность биодинамических качеств и свойств.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

1 поколение. Недостатки

- Необходимость нанесения дополнительной операционной травмы, определяющей повышение риска оперативного вмешательства и осложнений, удлинение послеоперационного периода.
- Ограниченный объем получаемого трансплантата.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

Предпосылки для перехода ко 2 поколению

- Появление новых технологий получения и консервации аллогенной костной ткани.
- Развитие необходимой инфраструктуры (появление тканевых банков).



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
К Л Е Т О К
Ч Е Л О В Е К А

2 поколение

Аллогенная костная ткань
различной технологии обработки:

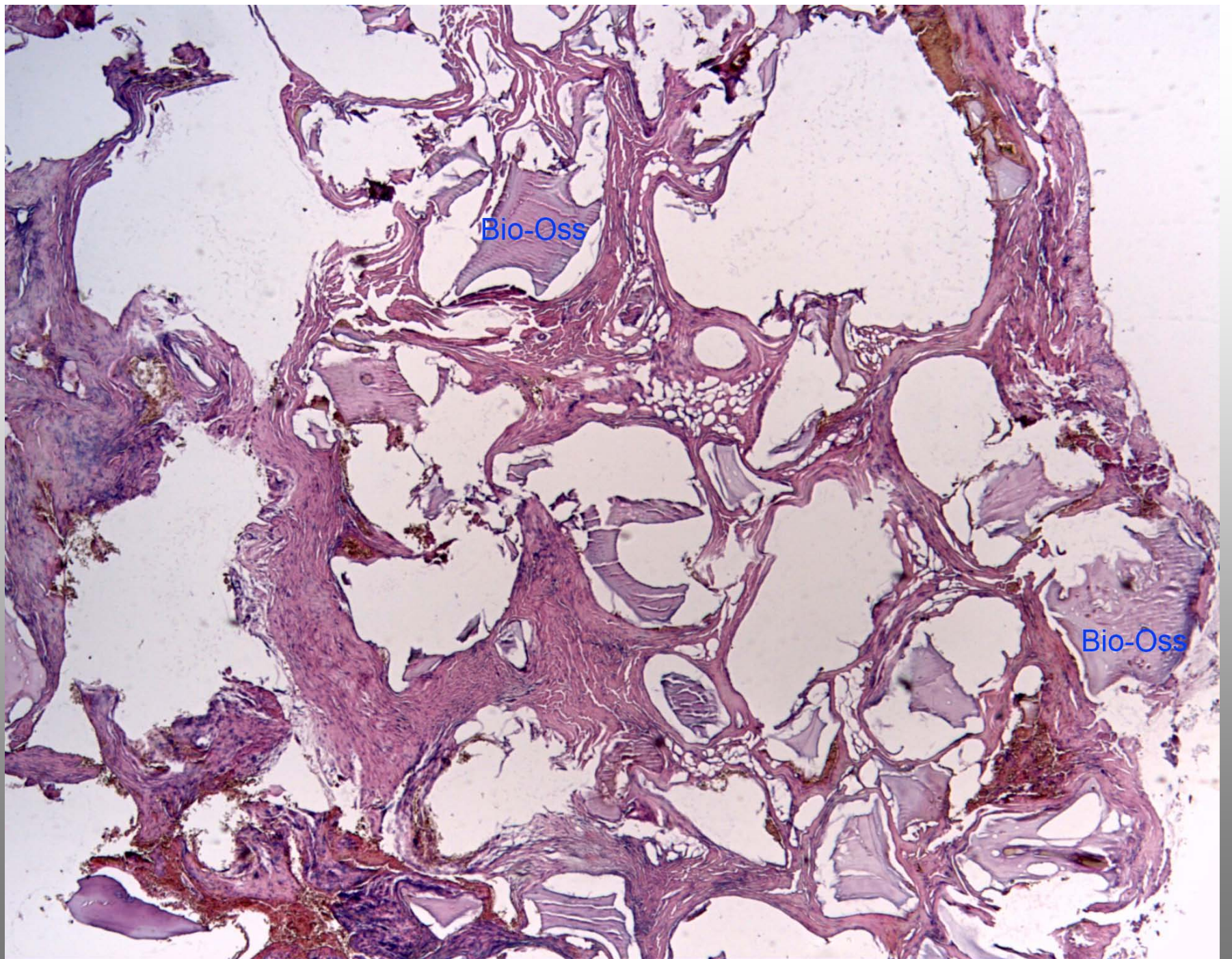
- деминерализованный костный матрикс (ДКМ);
- аллокость специальной обработки (аллоплант);
- депротеинизированная губчатая кость (ДГТ);
- аллотрансплантат декальцинированной лиофилизированной кости;
- прочие аналоги.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
К Л Е Т О К
Ч Е Л О В Е К А

2 поколение. Преимущества

- Сходные строение и состав с костной тканью реципиентного ложа.
- Выраженная остеокондукция, значительная остеопротекция (в зависимости от степени деминерализации), определенная остеоиндукция.





ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

2 поколение. Недостатки

- Правовые, этические и медицинские сложности заготовки.
- Короткий срок хранения.
- Необходимость постоянного бактериологического и иных видов контроля.
- Невозможность стандартизации строения и состава.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

Предпосылки для перехода к третьему поколению

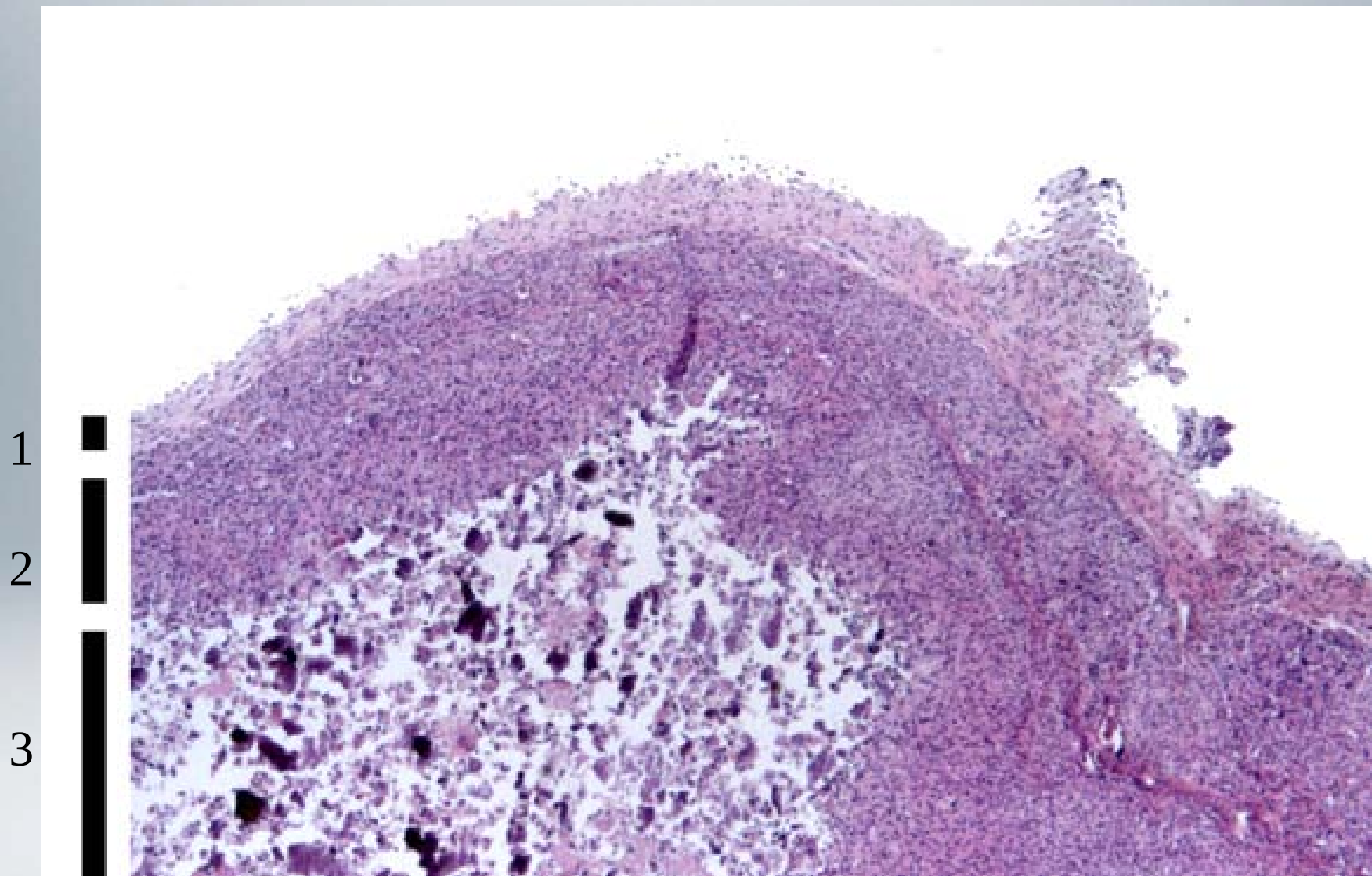
- Разработка технологий синтеза химических аналогов компонентов костного межклеточного матрикса.
- Внедрение методов переработки алло- и ксеногенной костной ткани с минимизацией иммуногенности.
- Высокая востребованность и платежеспособность рынка.



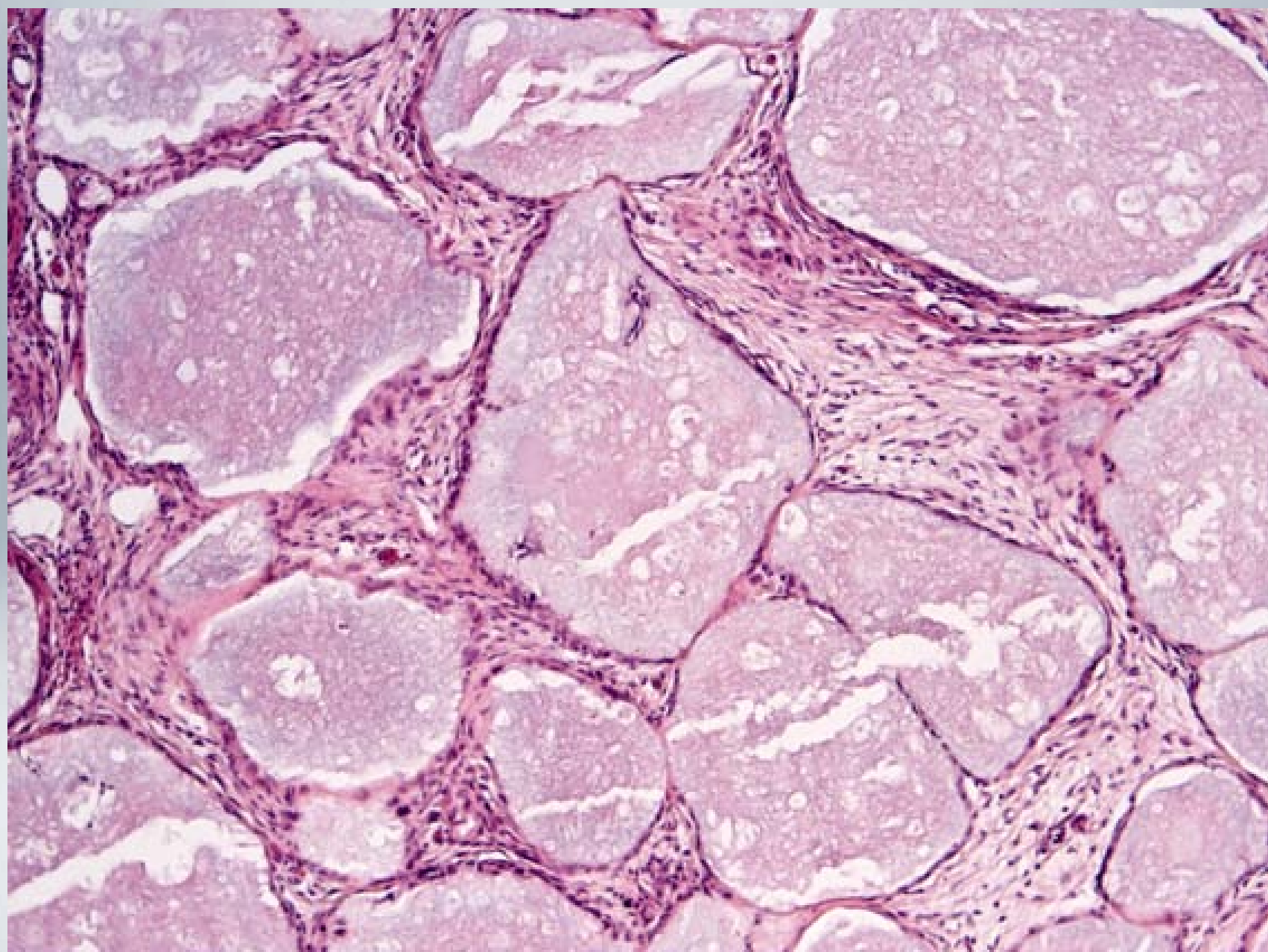
ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

3 поколение. Преимущества

- Стандартизированное строение и состав – основа серийного производства.
- Возможность включения в состав биологически активных веществ (факторов роста, цитокинов), антибиотиков.
- Выраженная остеокондукция, некоторая остеоиндукция.



1 – соединительнотканная капсула; 2 – грануляционная ткань;
3 – костнопластический материал



«GEM21S» (BioMimetic Therapeutics Inc.)



recombinant human
platelet-derived
growth factor,
rhPDGF-BB

«Infuse» (Medtronic)



recombinant human
bone morphogenetic
protein (rhBMP-2)



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

3 поколение. Недостатки

- Недостаточное действие биологически активных веществ – «короткоживущих» белковых соединений, включенных в состав.
- Недостаточная остеоиндукция.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
К Л Е Т О К
Ч Е Л О В Е К А

Предпосылки для перехода к 4 поколению

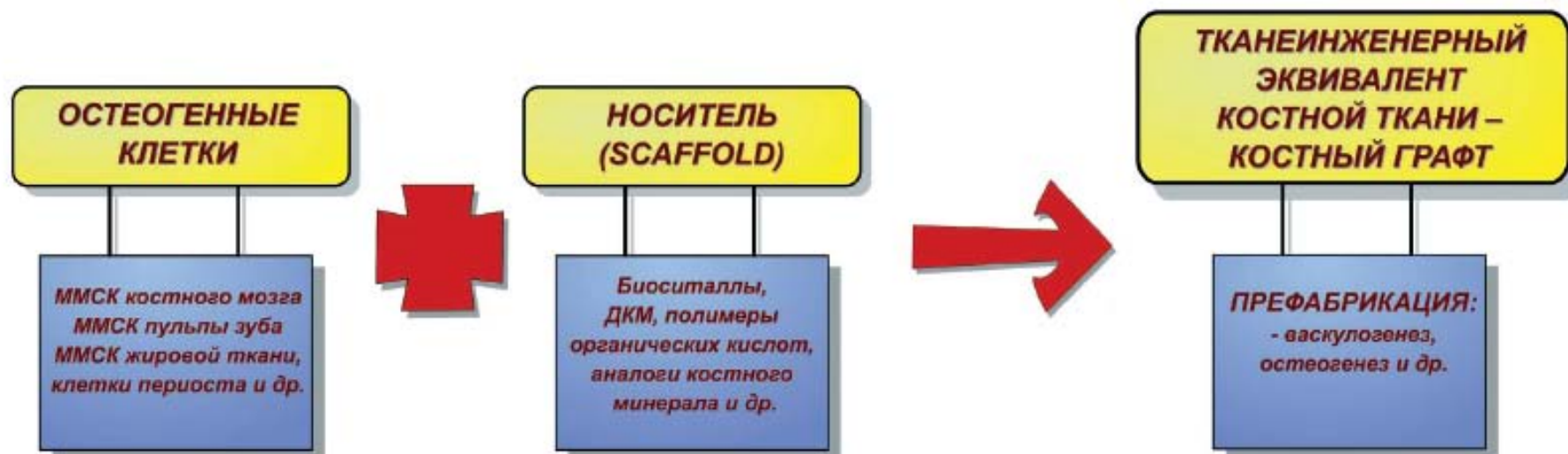
- Развитие технологий получения, культивирования, клеточного процессинга, хранения клеточных культур.
- Необходимость усиления остеоиндукционных свойств материалов

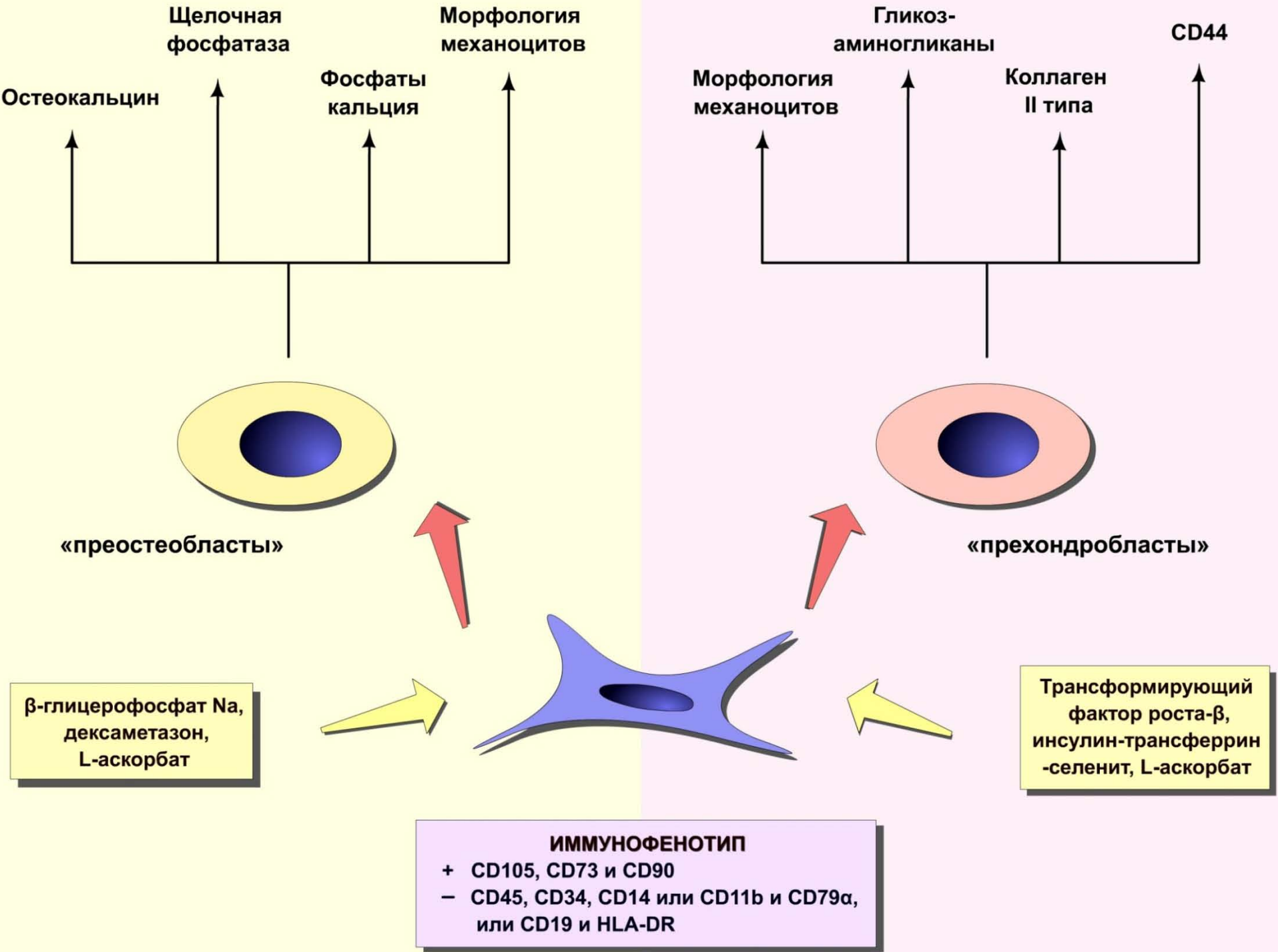


ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

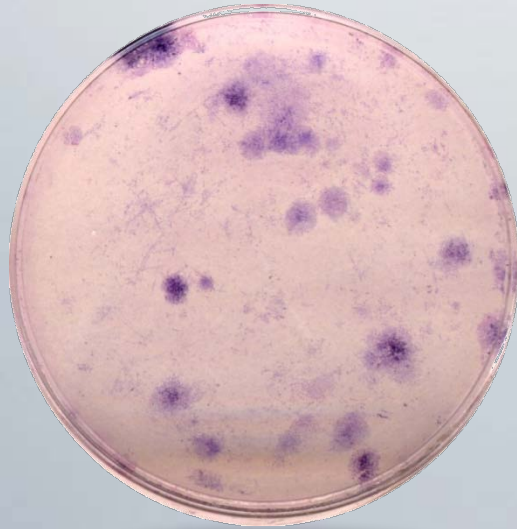
4 поколение

Экспериментальные изделия
медицинского назначения
представляют собой носитель из
материала 2-3 поколения и
культуру клеток, способных к
дифференцировке в
остеобластическом направлении.

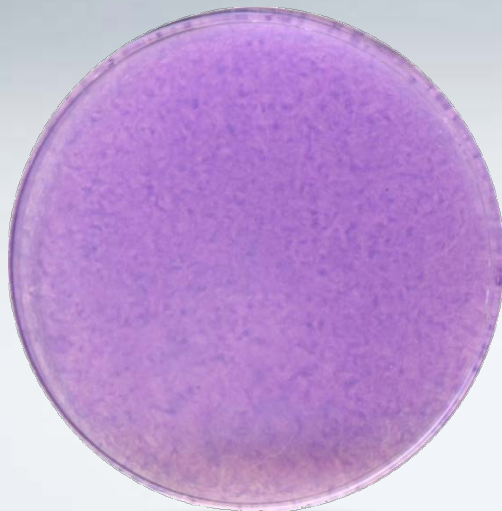




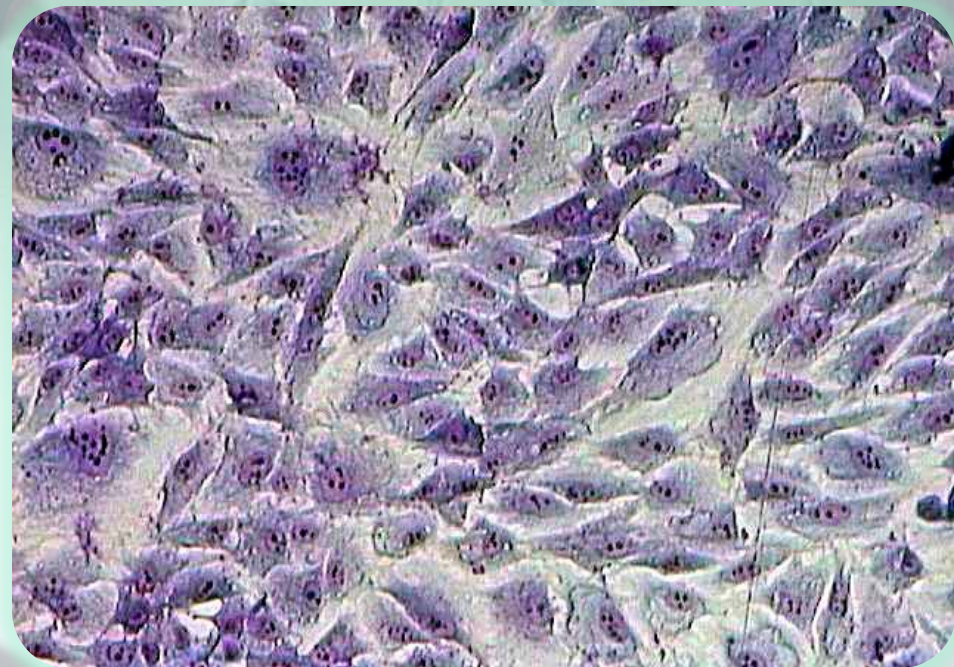
Культура ММСК



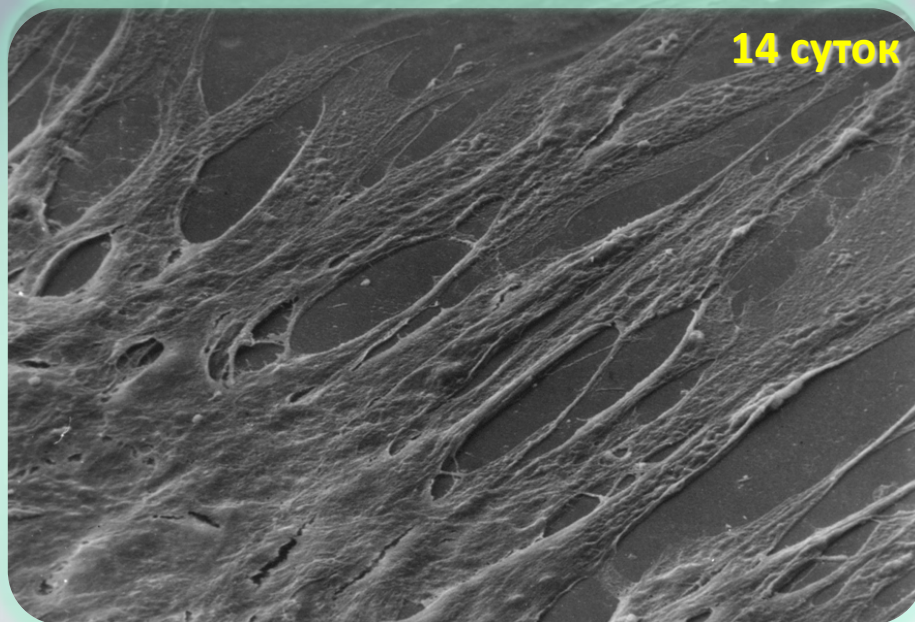
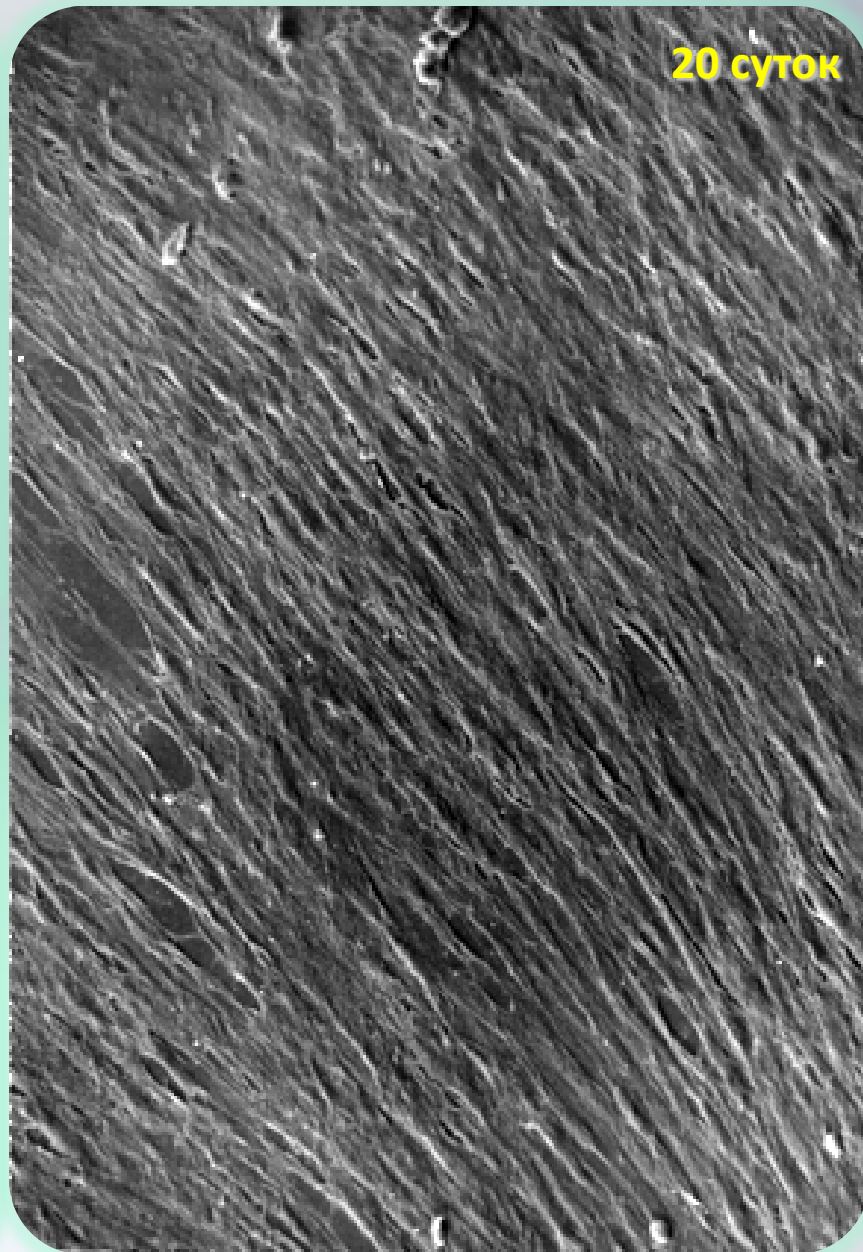
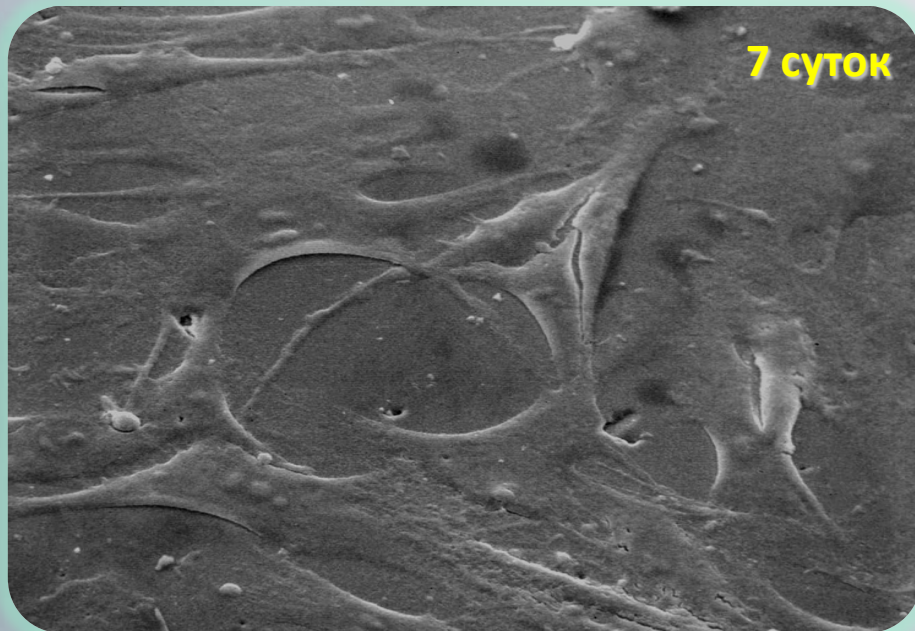
7 суток



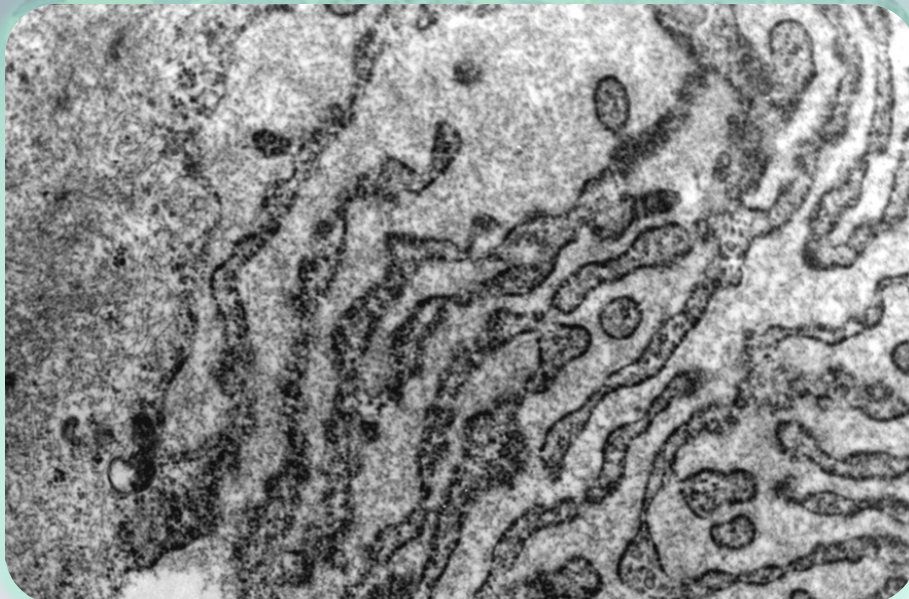
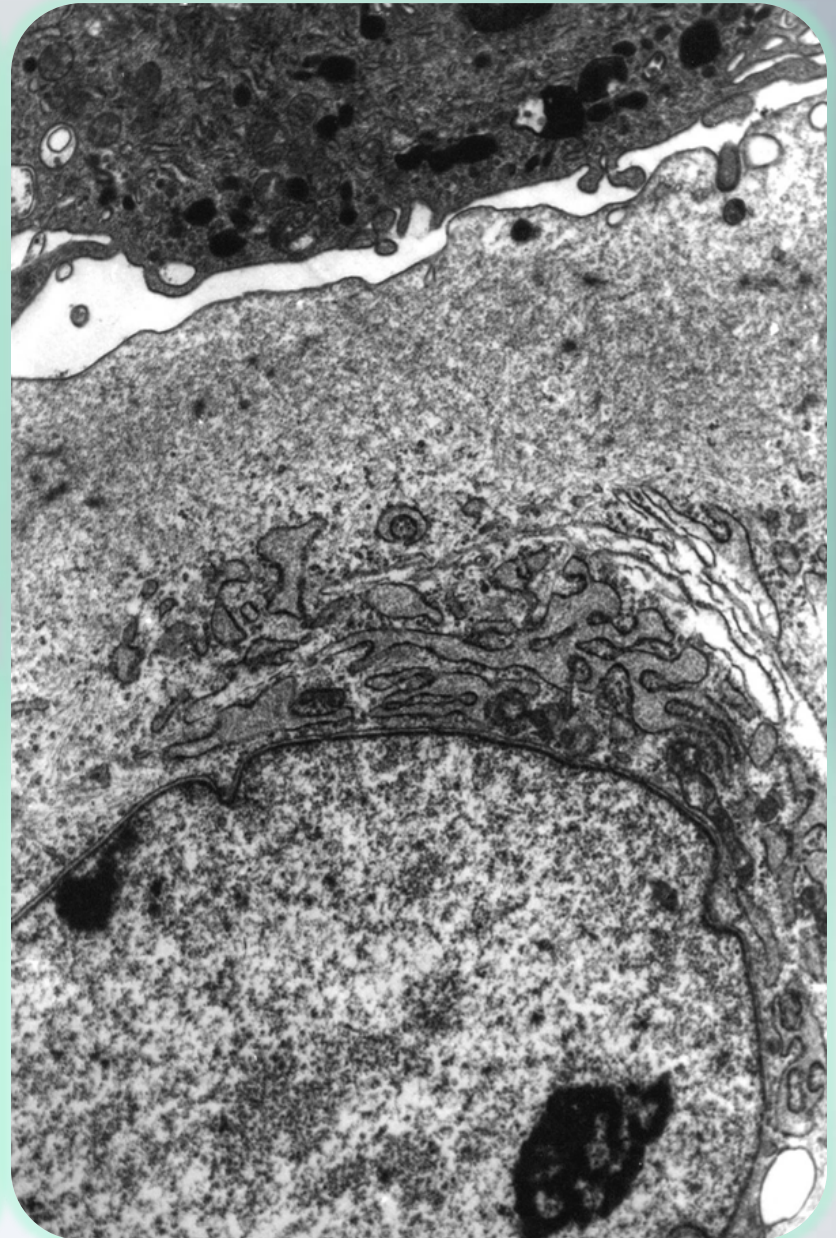
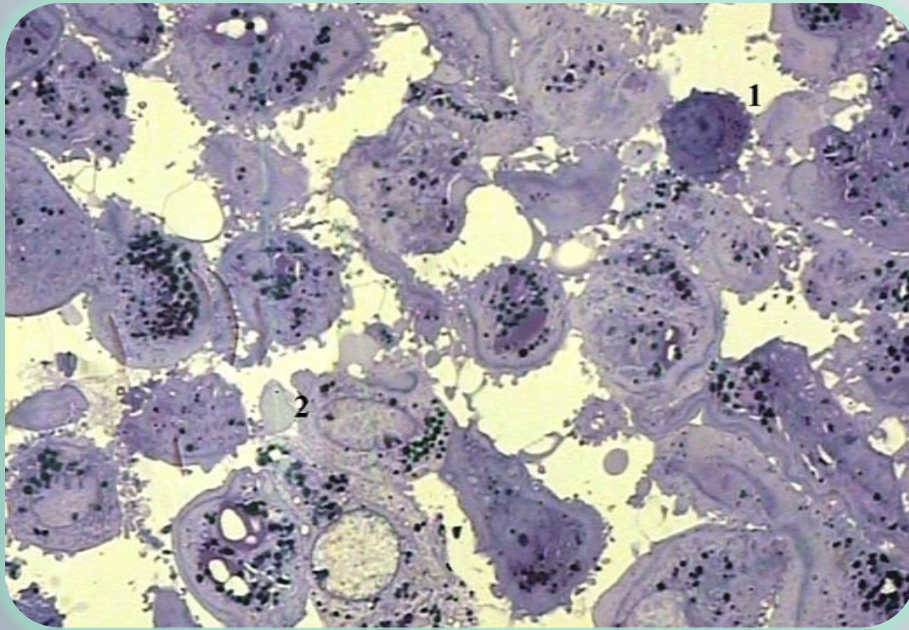
14 суток



Культура ММСК



Ультраструктура ММСК in vitro

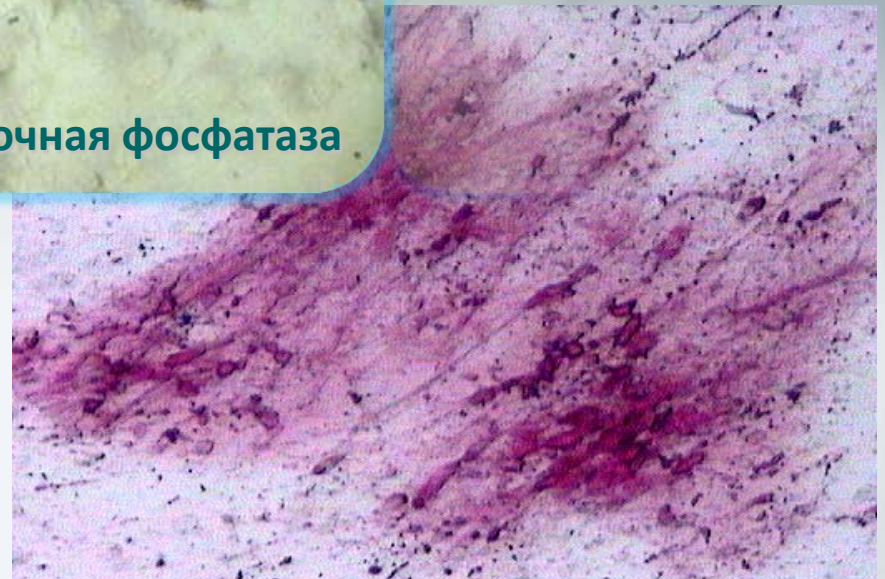


Цитохимическая характеристика ММСК



Щелочная фосфатаза

Фосфаты кальция

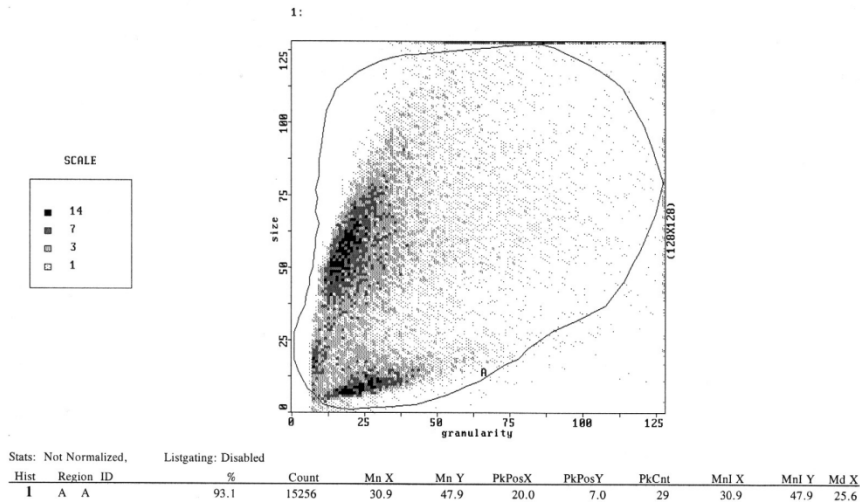


Backman Coulter

COULTER(R) EPICS(R) Listmode Replay Flow Cytometry Report
C:\XL\LMD\Z0013825.LMD, XL AG15069, Run time protocol

OP ID: KATERINA

03Feb09 15:57:03
hMSC no stain 3color
Z0013825
hMSC exp
214 seconds, 16392 events
Manual Stop



Маркеры гемопоэтических клеток

CD34 0,05%

CD45 0,01%

CD11 0,04%

HLA-DR 0,01%

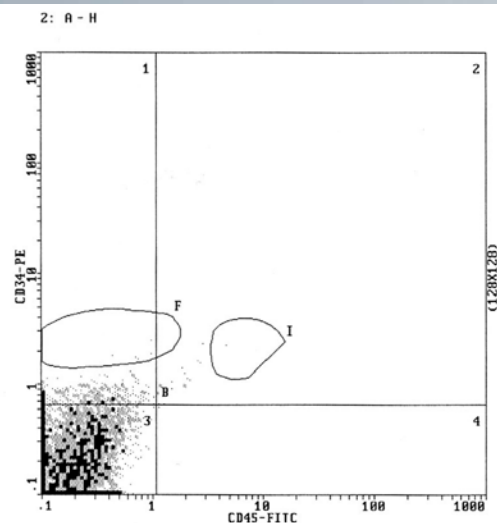
CD19 0,05%

Маркеры MMCK

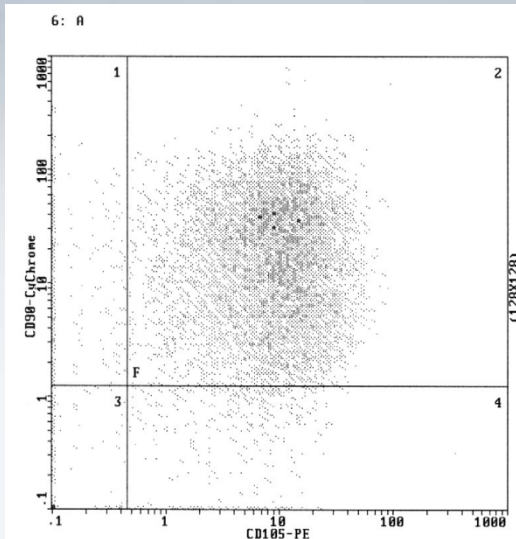
CD105 94,9%

CD73 95%

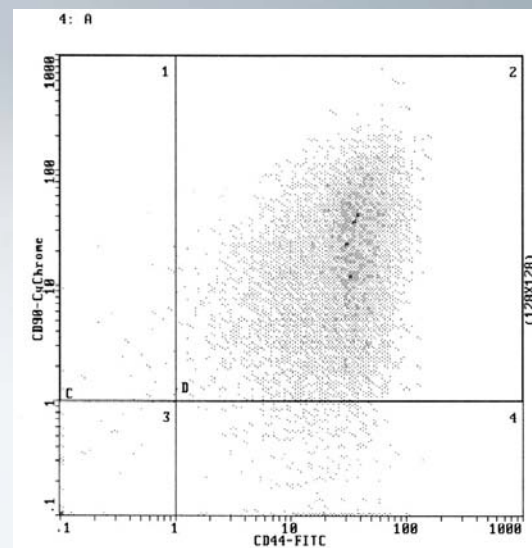
CD90 94,9%



CD34, CD45

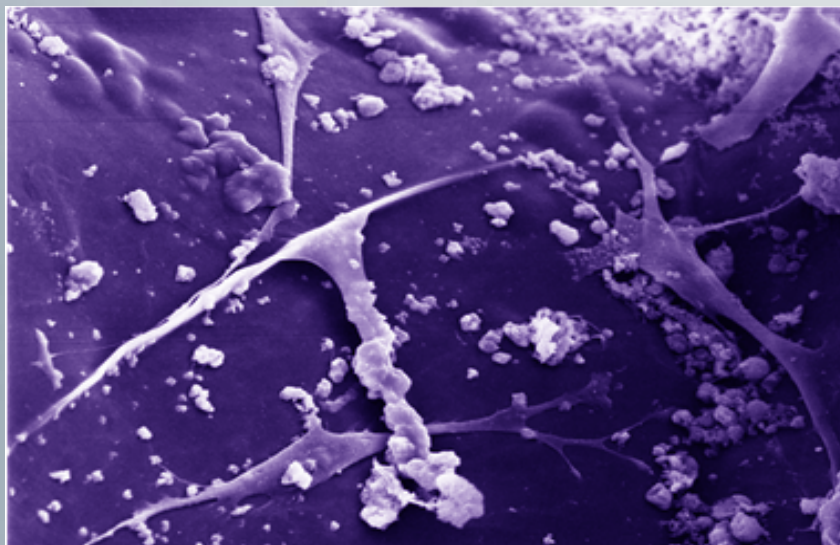


CD105

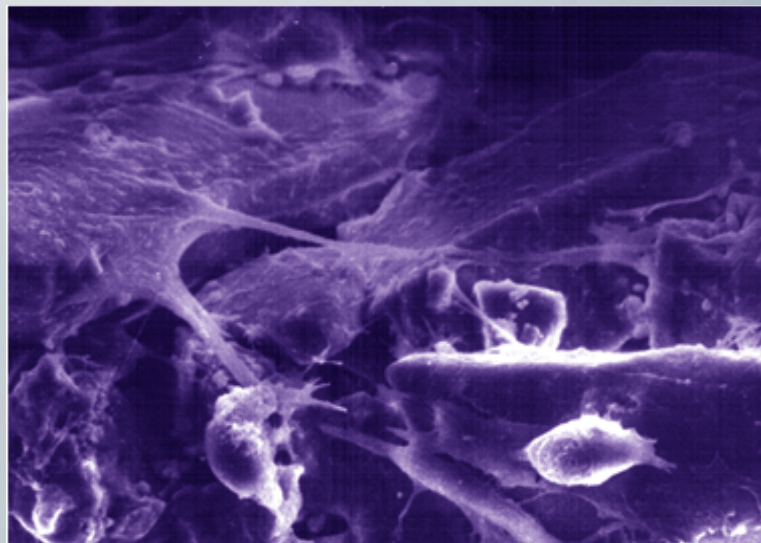


CD44

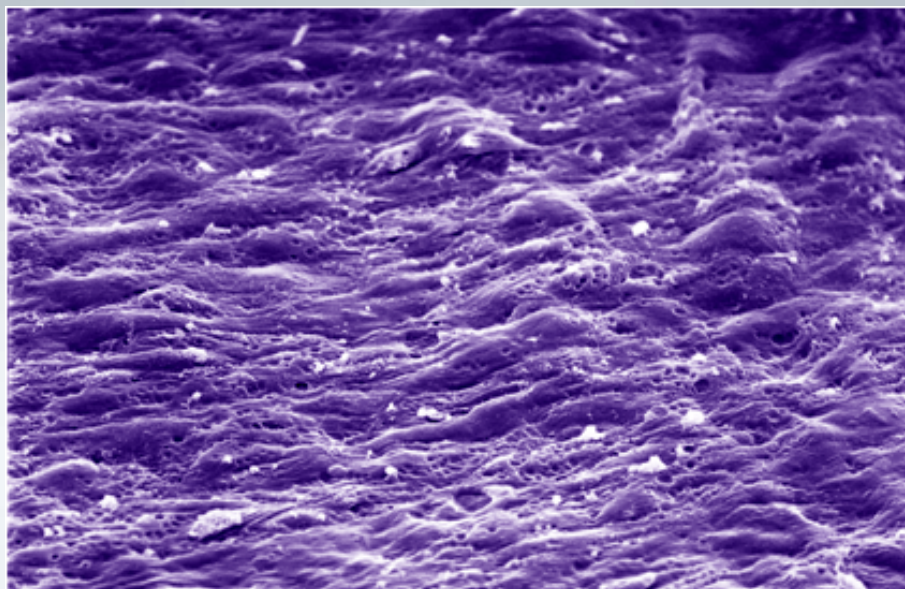
Культура ММСК на различных носителях



На
коллагеновом
криогеле

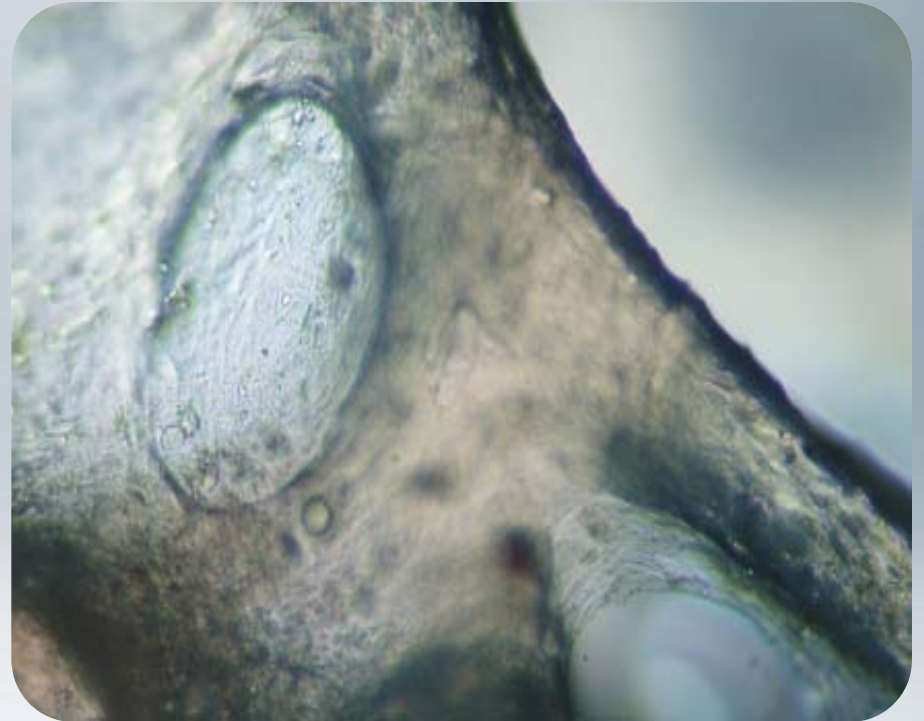


На биоситалле

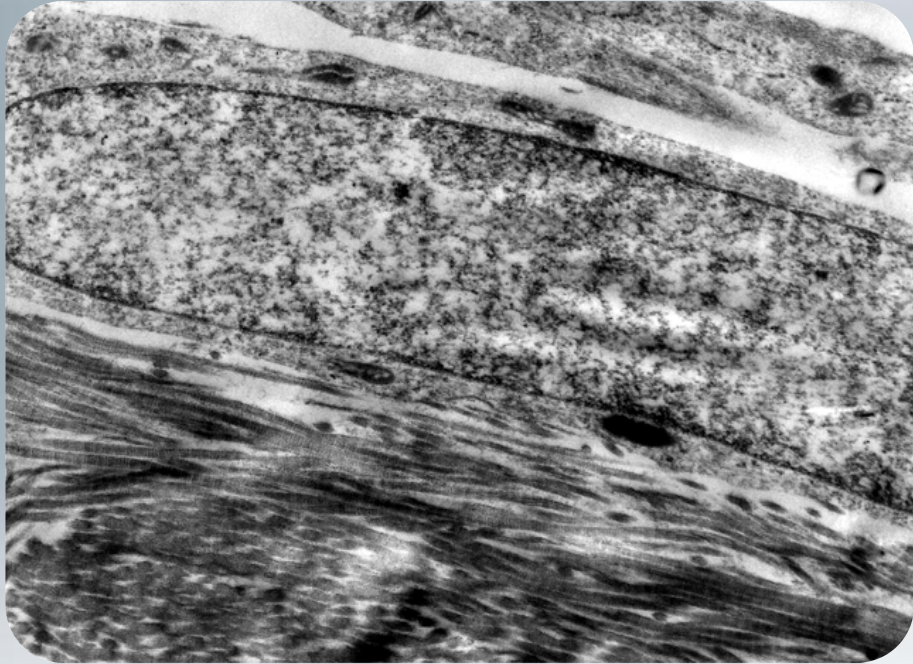


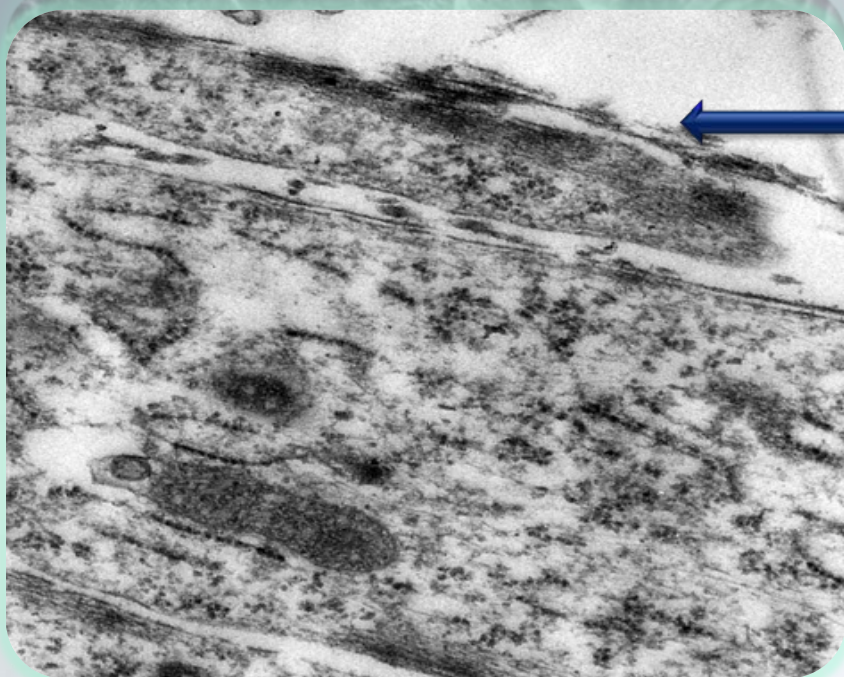
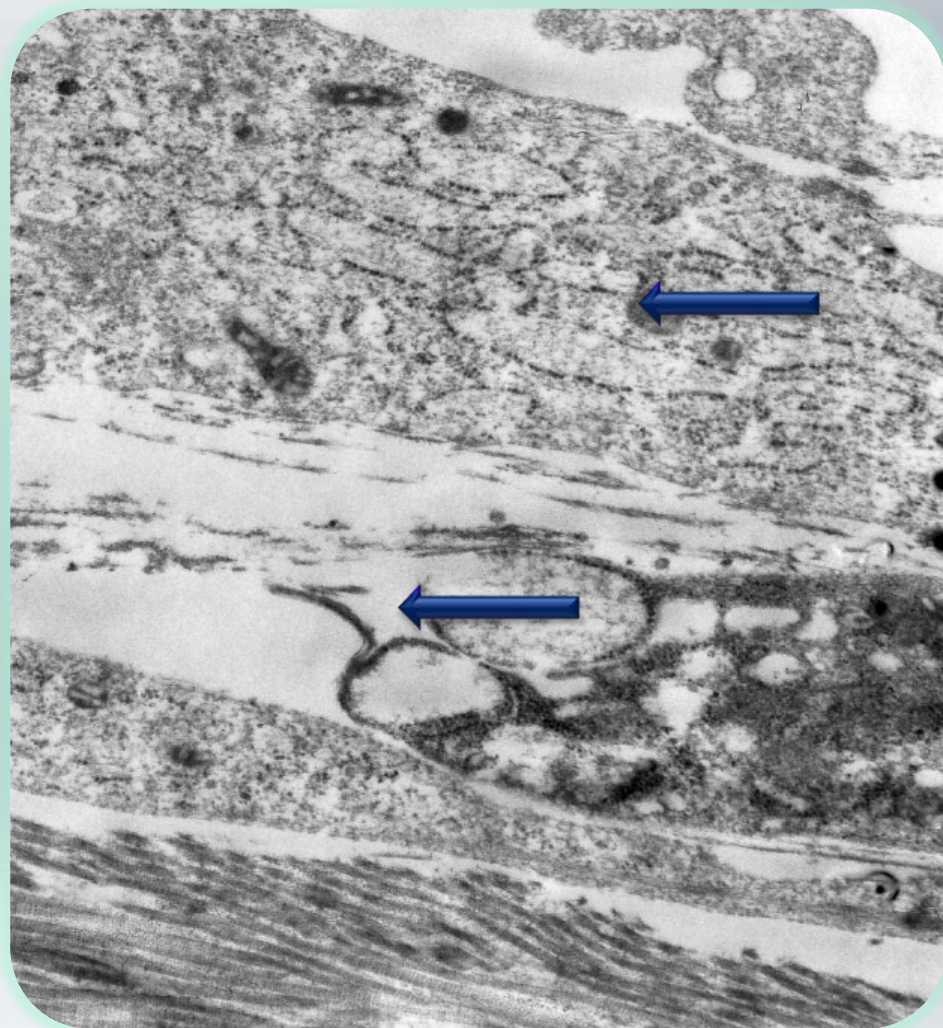
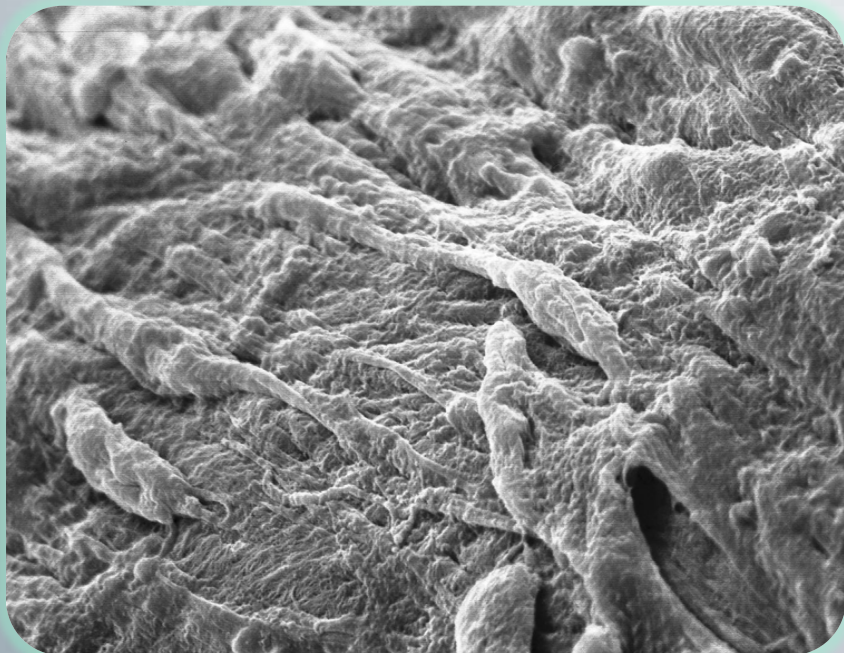
На деминерализованном костном матриксе

Тканеинженерный эквивалент кости



Совмещение клеток и материала-носителя



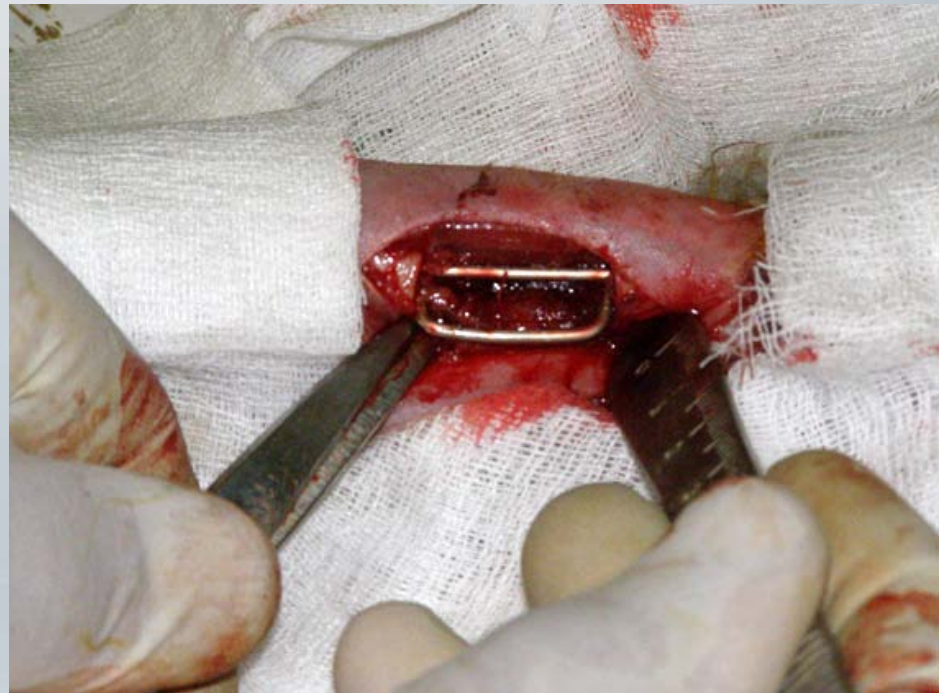


Культура ММСК на деминерализованном
костном матриксе

Эксперимент in vivo



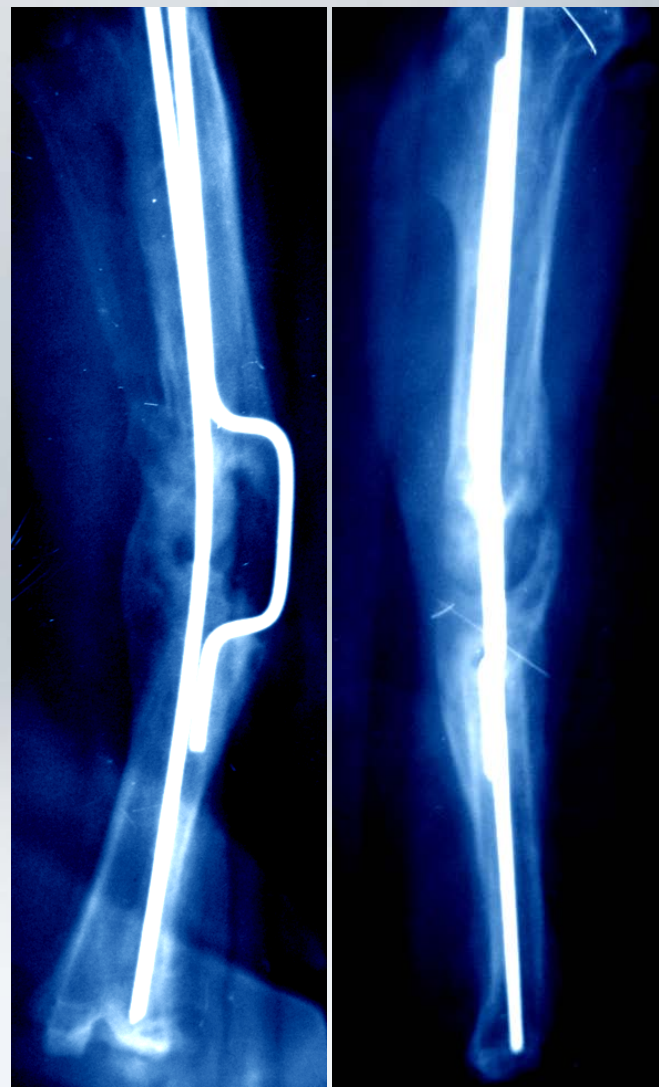
2 cm



Эксперимент in vivo

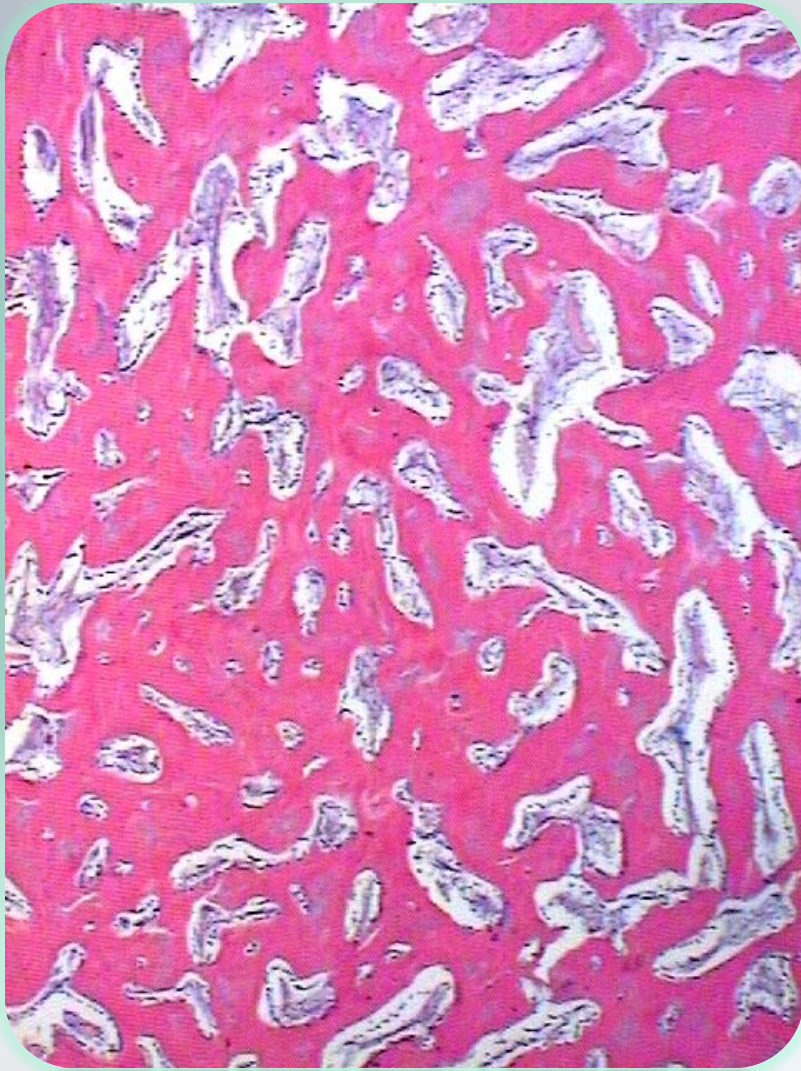


Эксперимент
150 суток

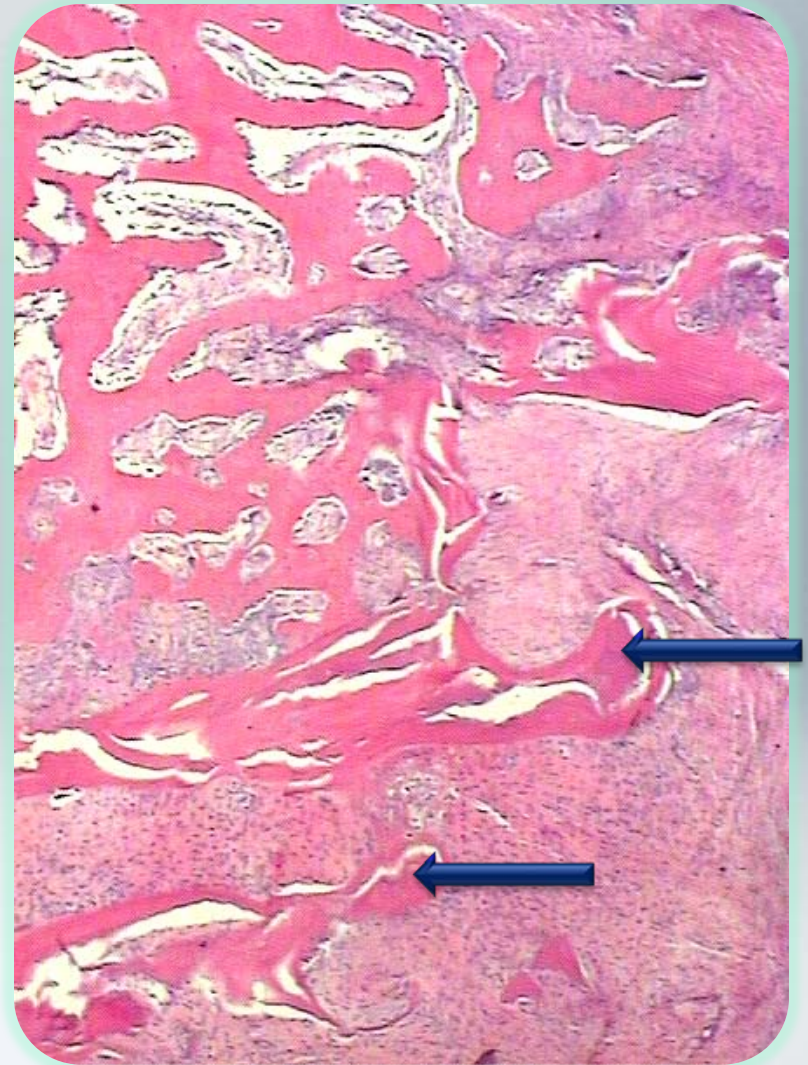


Контроль
150 суток

Эксперимент in vivo

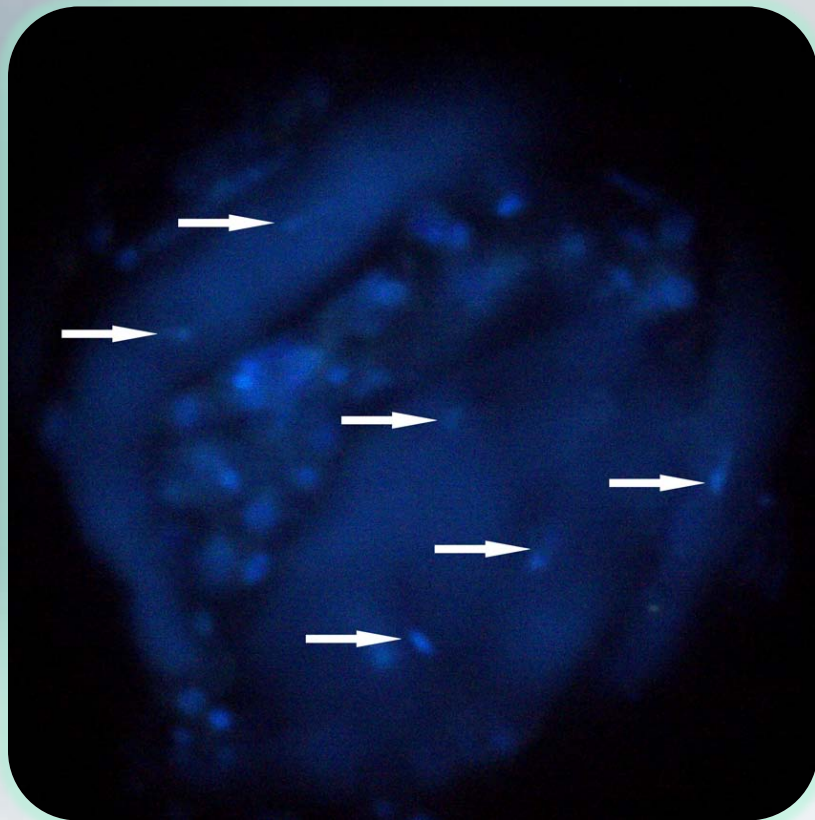


Эксперимент
30 суток

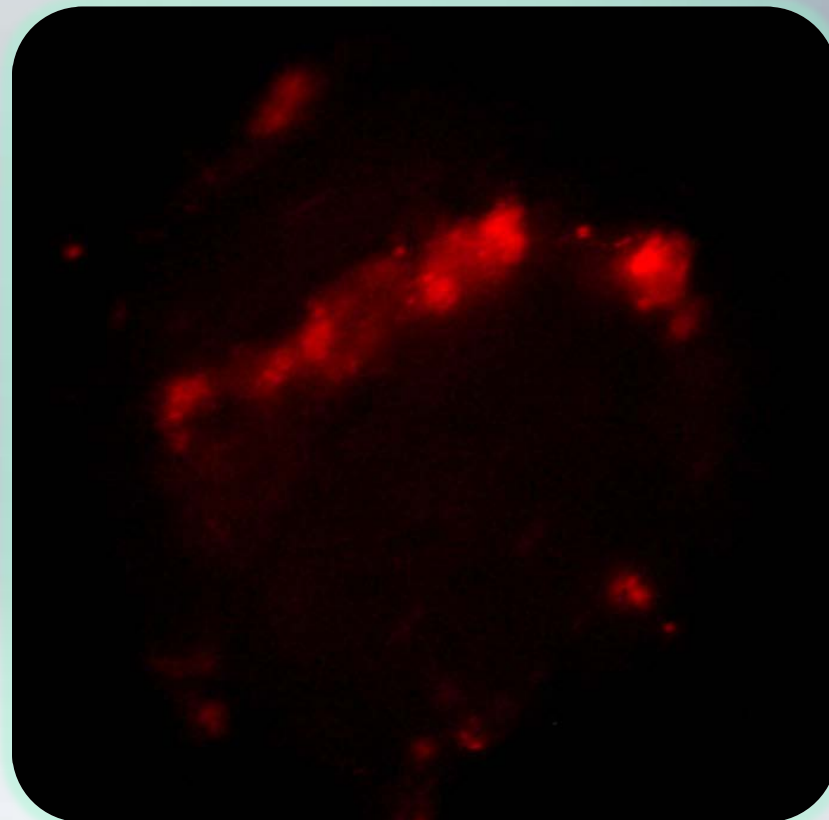


Контроль
60 суток

Эксперимент in vivo

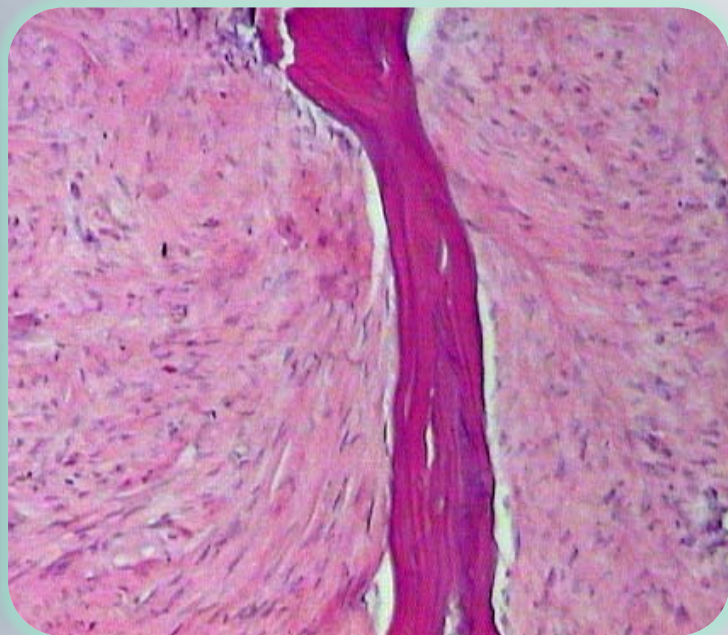


DAPI

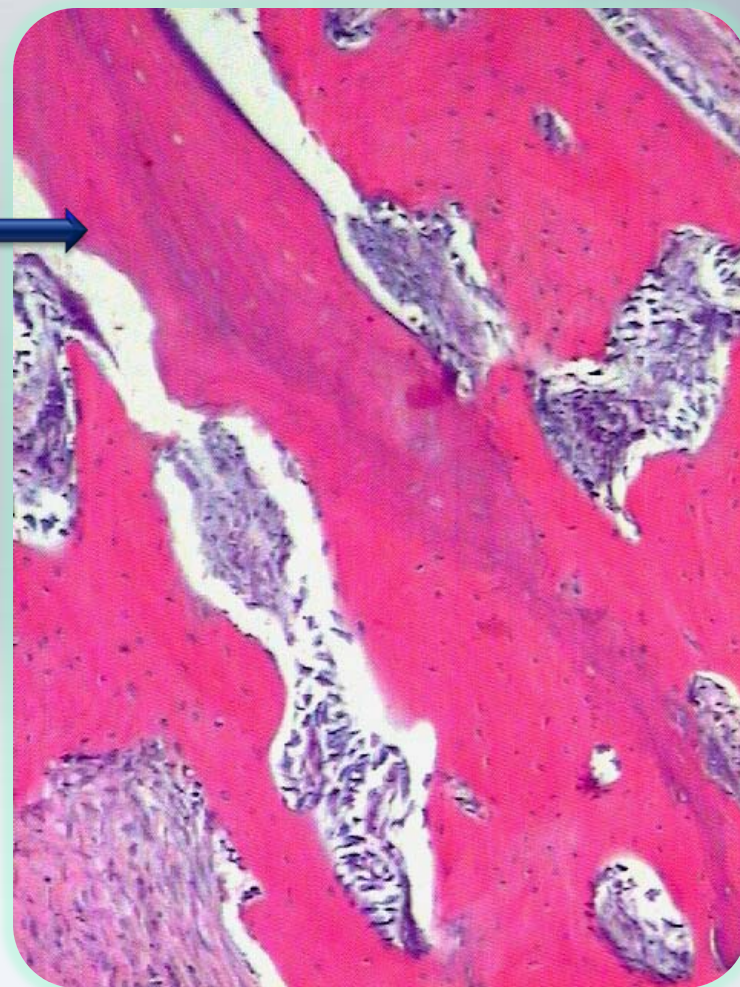


PKH-26

Эксперимент in vivo

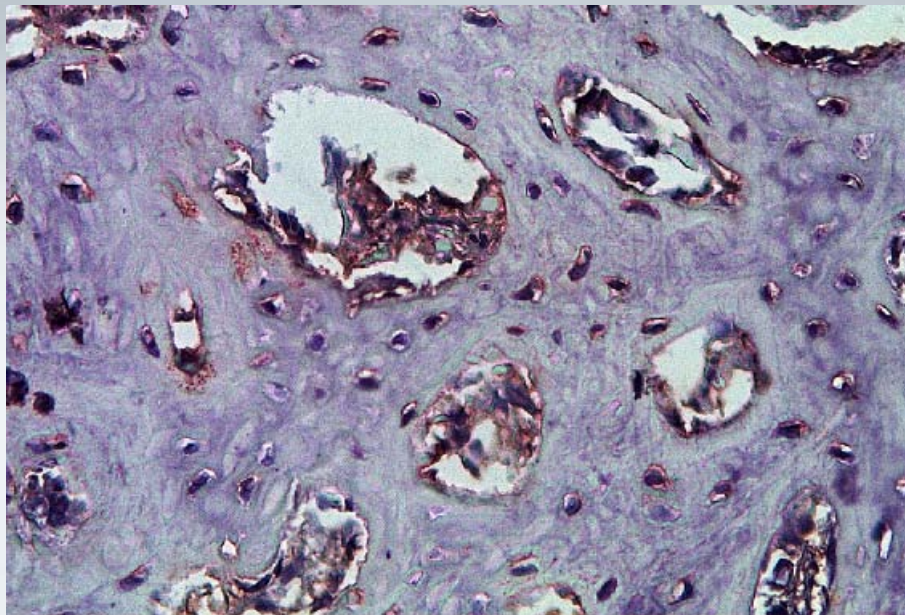
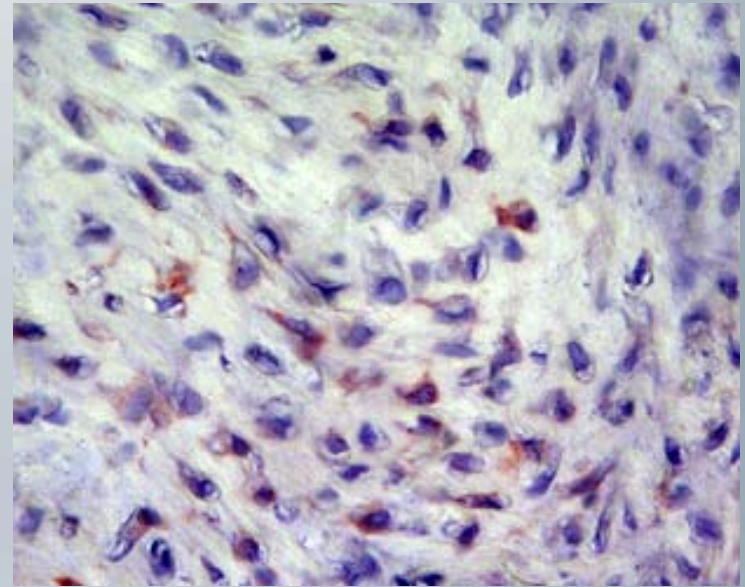
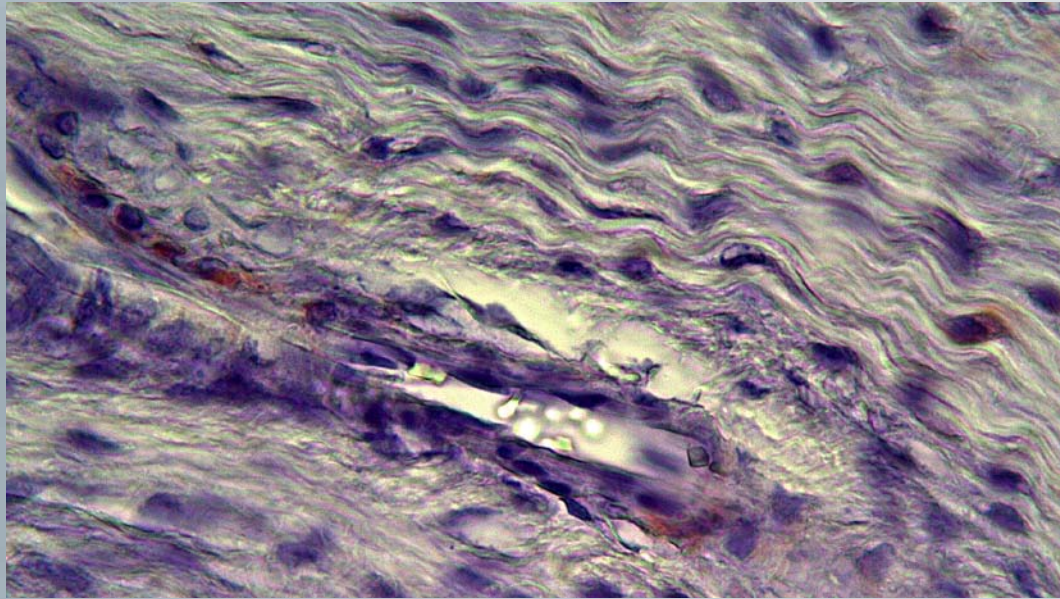


Контроль
60 суток



Эксперимент
60 суток

Эксперимент in vivo



- стерильность
- малая инвазивность
- индивидуальные особенности
- влияние возраста

1
**получение
клеток**

2
культивирование

4
трансплантация

3
**конструирование
графта**

- статус состояния здоровья пациента
- квалификация хирурга
- способность функционирования графта в реципиентном ложе
- результат

- стерильность
- стабильность фенотипа
- культивирование в монослое или на трехмерном носителе
- механическое стимулирование
- контроль пролиферации
- контроль дифференцировки
- воспроизводимость

- стерильность
- выбор оптимального материала для носителя
- технология заселения его клетками
- контроль состояния графта
- характеристика конечного продукта
- определение требований для сохранения его качеств

4 поколение. Недостатки

- Необходимость реализации клеточного сервиса для создания изделия медицинского назначения, что определяет необходимость развития специфической инфраструктуры, повышает финансовые затраты.
- Необходимость получения исходного тканевого материала для выделения клеток.
- Невозможность стандартизации биологических потенций клеток.



Osiris Therapeutics Inc.

Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. Lancet. 2004 Aug 28-Sep 3;364(9436):766-70.





ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

Предпосылки перехода к 5 поколению

- Появление новых инструментов и методов в рамках генных технологий.
- Потребность в высокоиндукционном костнопластическом материале.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

Высокоочищенная сверхскрученная плазмида pCMV-VEGF165.

Компоненты:

Регуляторный участок,

который определяет транскрипцию гена;

-ген VEGF, при экспрессии которого
синтезируется изоформа VEGF, состоящая
из 165 аминокислот;

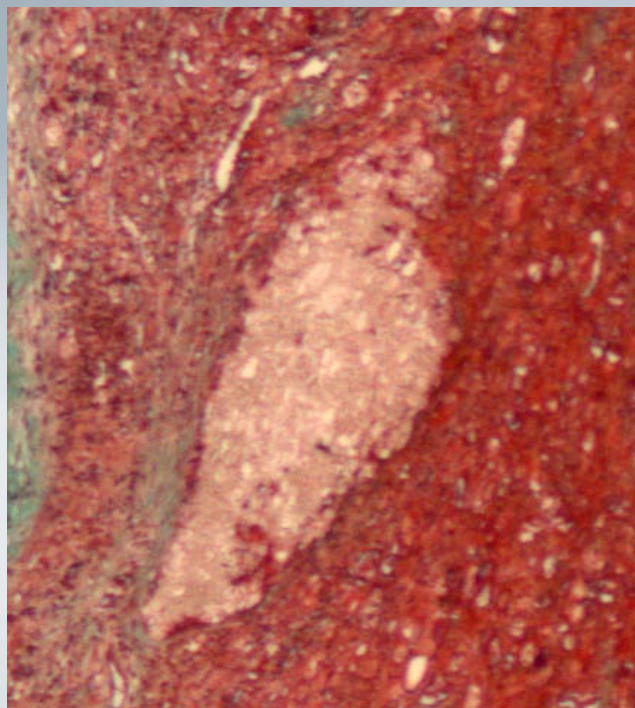
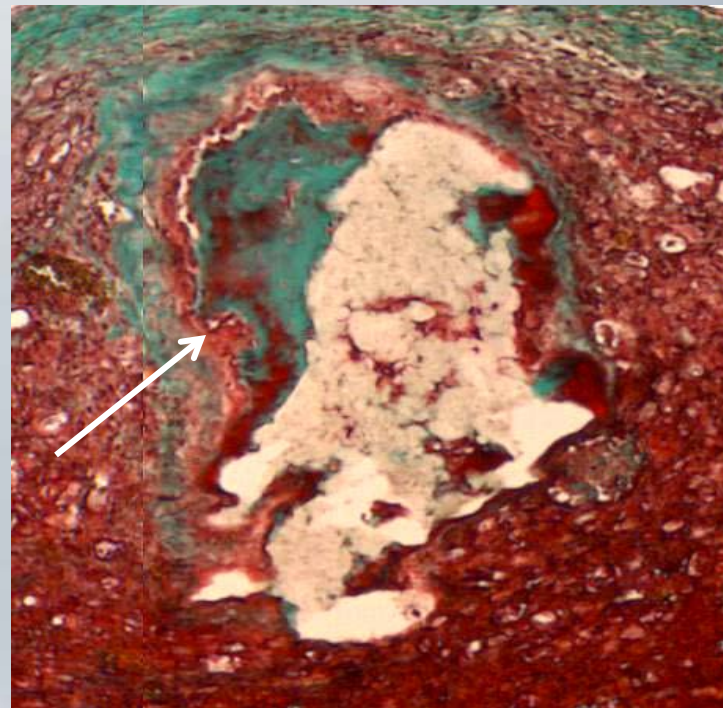
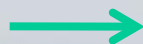
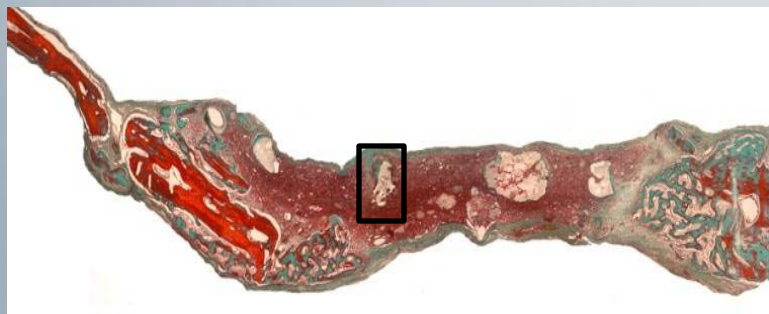
**-сигнала сплайсинга, сигнала
полиаденилирования и терминатора
транскрипции SV40;**

**-вспомогательные области, необходимые
для эффективного биосинтеза плазмидной
ДНК в клетках штамма-продуцента E. coli.**

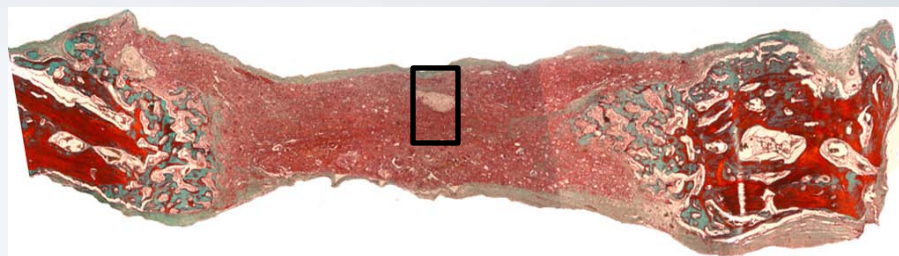
 МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ			
РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ лекарственного препарата для медицинского применения			
Номер регистрационного удостоверения:	ЛП-000671		
Дата регистрации:	28.09.2011		
Наименование и адрес юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение:	ОАО "Институт Стволовых Клеток Человека", Россия 129110, г. Москва, Олимпийский пр-т, д. 18/1		
Торговое наименование лекарственного препарата:	Неоваскулген		
Международное непатентованное наименование или химическое наименование лекарственного препарата:			
Лекарственная форма:	лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения	Дозировка:	1,2 мг
Перечень веществ, входящих в состав лекарственного препарата, с указанием количества каждого из них:			
Состав на 1 флакон:			
Действующие вещества:		Вспомогательные вещества:	
• Дезоксирибонуклеиновая кислота плазмидная сверхскрученная pCMV- VEGF165 1,2 мг		• Декстрозы моногидрат 60,0 мг • Натрия гидрофосфата додекагидрат 3,94 мг • Натрия дигидрофосфат дигидрат 0,160 мг	
Первичная упаковка лекарственного препарата, количество доз в упаковке, комплектность упаковки:			
Первичная упаковка:	флакон		
Объем/ количество лекарственного препарата в	1,2 мг		
			002025

Результаты: гистологический анализ; 15 сут.

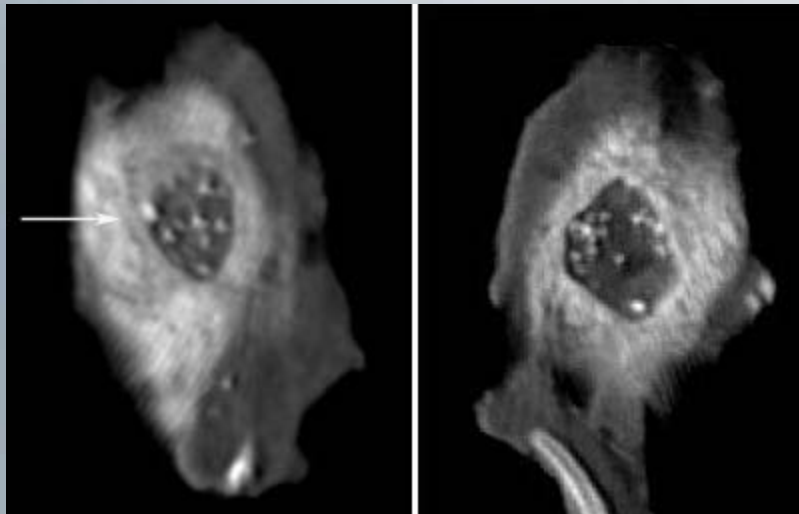
Синтетический материал с pVEGF₁₆₅



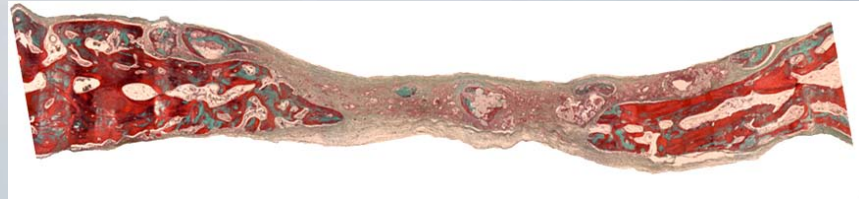
Синтетический материал без pVEGF₁₆₅



Результаты: 30 сут.



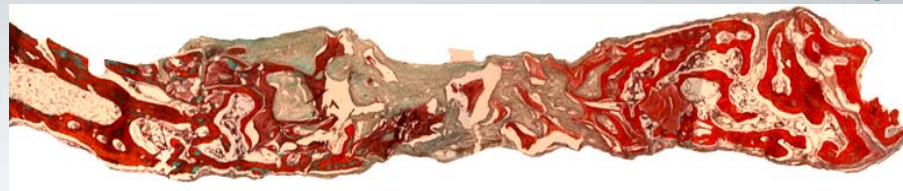
Синтетический материал с pVEGF₁₆₅



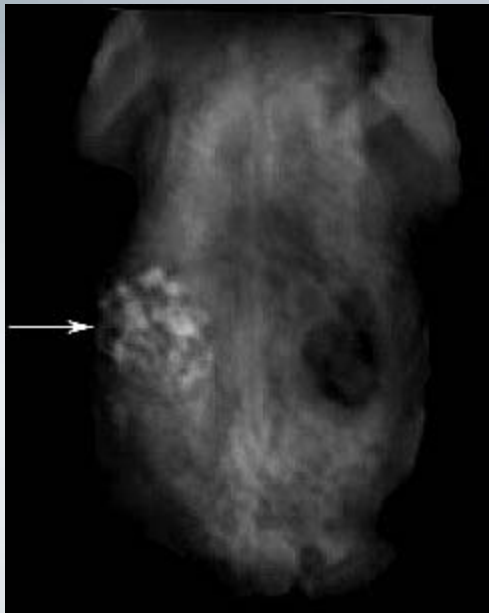
Синтетический материал без pVEGF₁₆₅



Ксеногенный материал без pVEGF₁₆₅



Дефект без имплантации



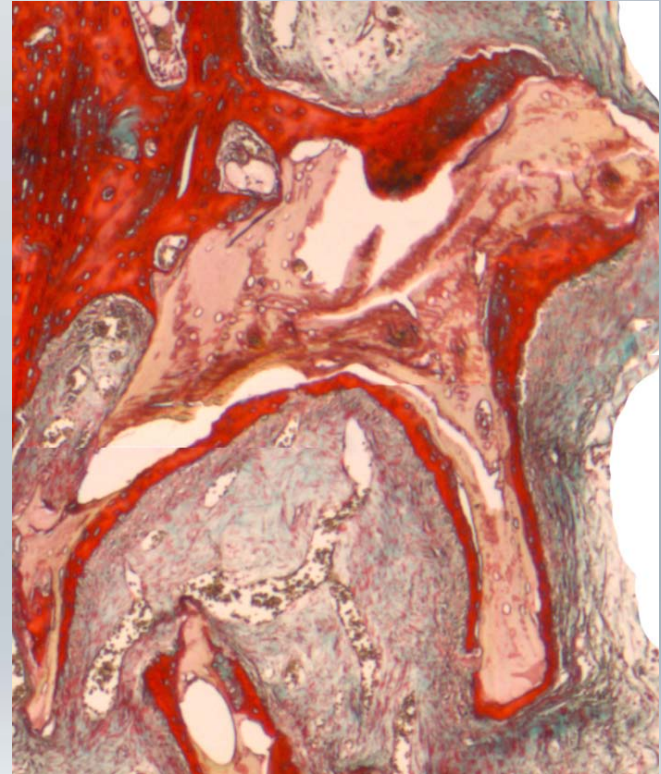
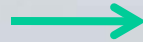
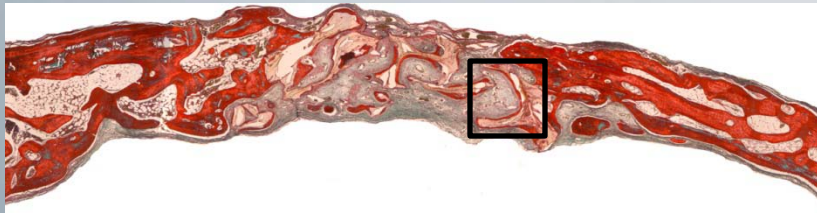
Результаты эксперимента, 45 сут.

Синтетический материал с pVEGF_{165}

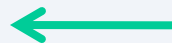


Результаты: гистологический анализ

Ксеногенный материал с pVEGF_{165}



Ксеногенный материал
без pVEGF_{165}



Результаты, 60 сут.

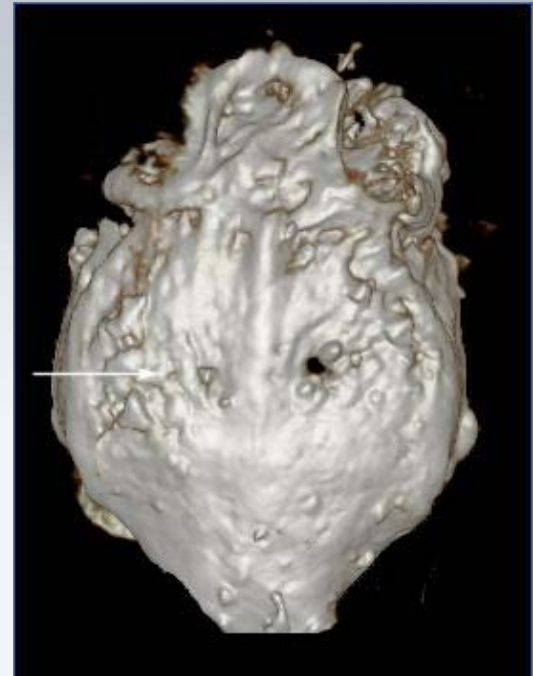
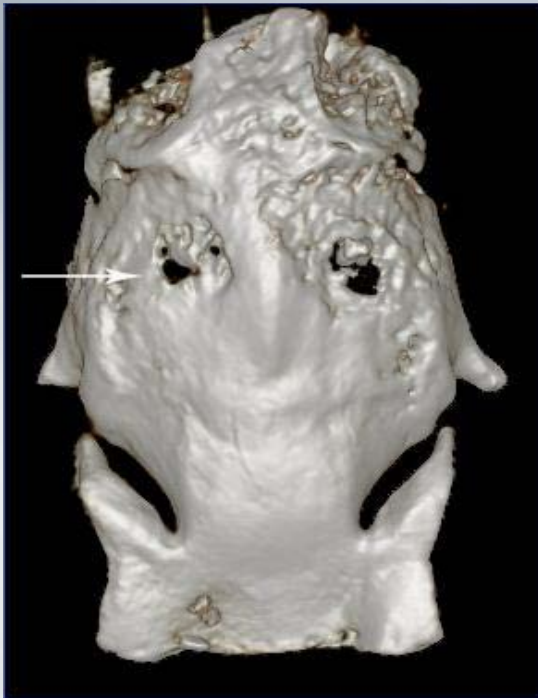
Синтетический

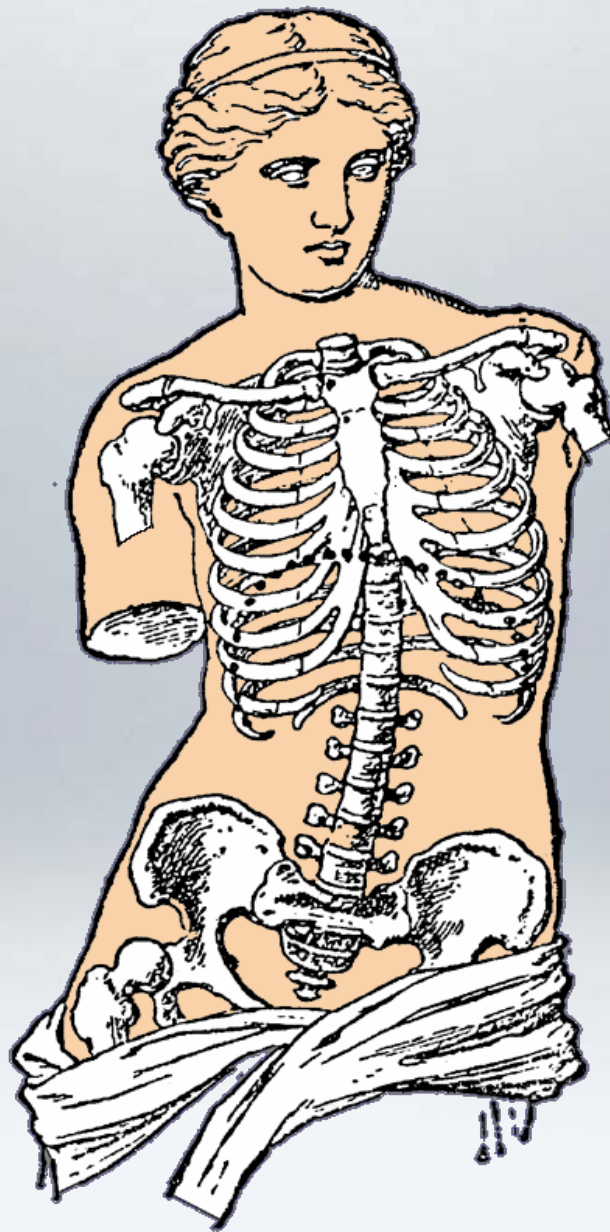
материал с pVEGF₁₆₅/
контроль



Ксеногенный материал с

pVEGF₁₆₅/
контроль





Спасибо за внимание!