

Наши исследования терапевтических эффектов МСК

Достижения и проблемы

Канов Евгений Викторович

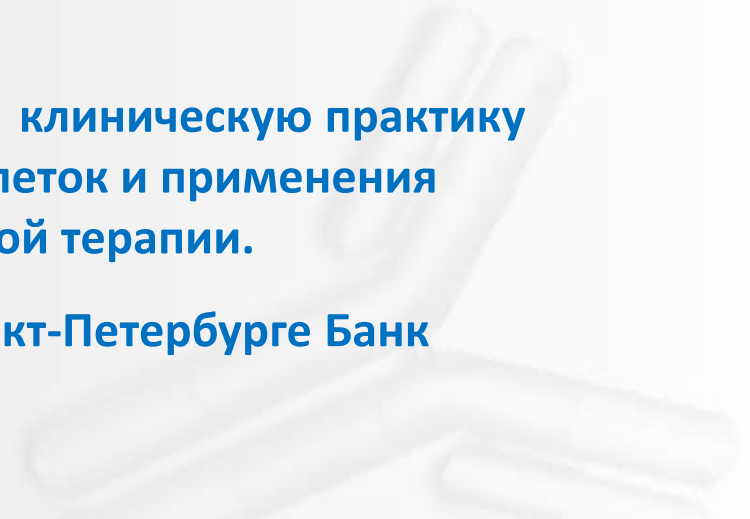
V Всероссийская конференция с международным участием

*Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, биомедицинских
клеточных продуктов и клинических испытаний медицинских изделий*

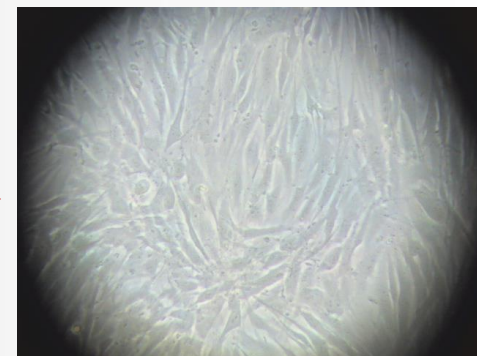
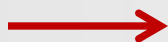
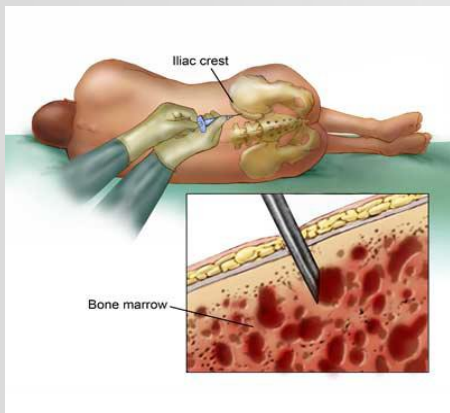
Санкт-Петербург, 1-2 июня 2017 г.

КТО МЫ?

- ООО «Транс-Технологии» основано в 2002 году, входит в ГК «Алкор Био».
- Цель компании – разработка и внедрение в клиническую практику технологий лечения с помощью стволовых клеток и применения продуктов, созданных на принципах клеточной терапии.
- В 2005 году компания открыла первый в Санкт-Петербурге Банк стволовых клеток.

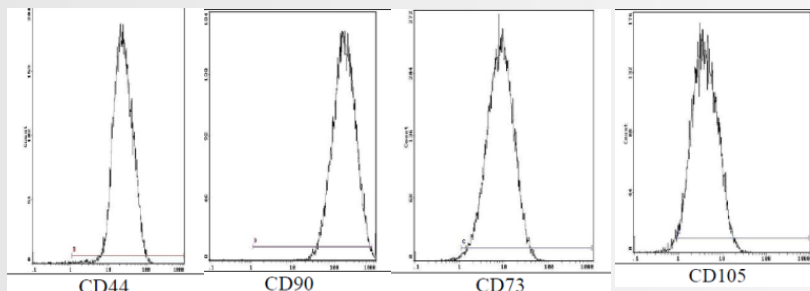
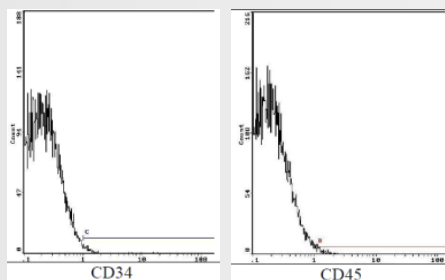


Выделение МСК из костного мозга донора и их культивирование in vitro.



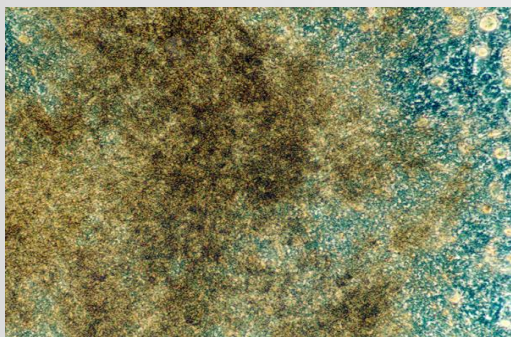
Иммунофенотип МСК
человека

- CD34 -
- CD45 -
- CD 44 +
- CD 90 +
- CD 73 +
- CD 105 +

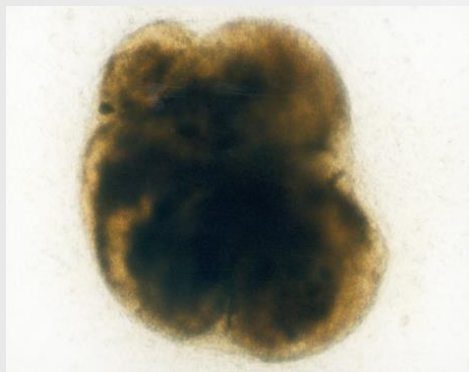


Ортодоксальные направления дифференцировки МСК

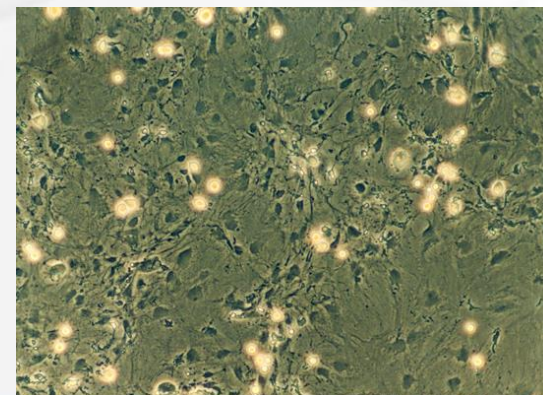
Остеогенное



Хондрогенное



Адиipoцитарное



318 зарегистрированных КИ МСК костного
мозга.

142 зарегистрированных КИ МСК пупочного
канатика.

144 зарегистрированных КИ МСК из других
источников
(жировая ткань, слизистая рта, пульпа зуба,
менструальная кровь)

<https://clinicaltrials.gov/>

Данные доклинических исследований

Ложная операция



Раствор-носитель



Контроль



Раствор-носитель



Клеточная терапия



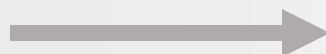
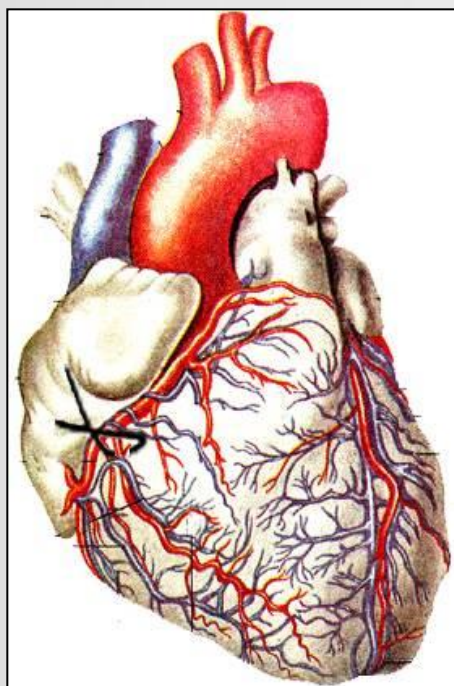
Раствор-носитель + МСК



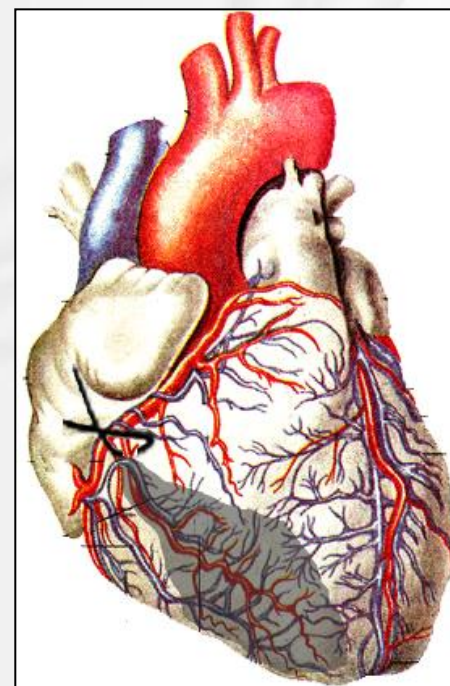
5×10^6 МСК, полученных из костного мозга крыс, вводили внутривенно в день операции

Данные доклинических исследований

Перевязка нисходящей
ветви правой
коронарной артерии



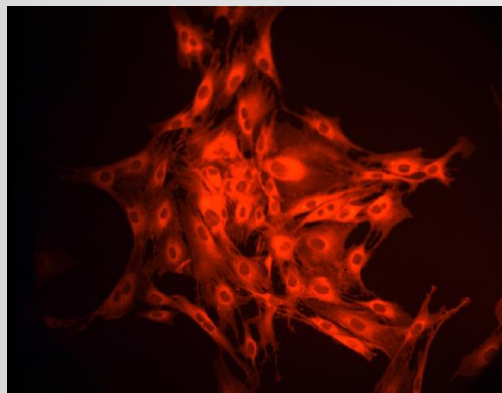
Развитие
трансмурального
инфаркта миокарда



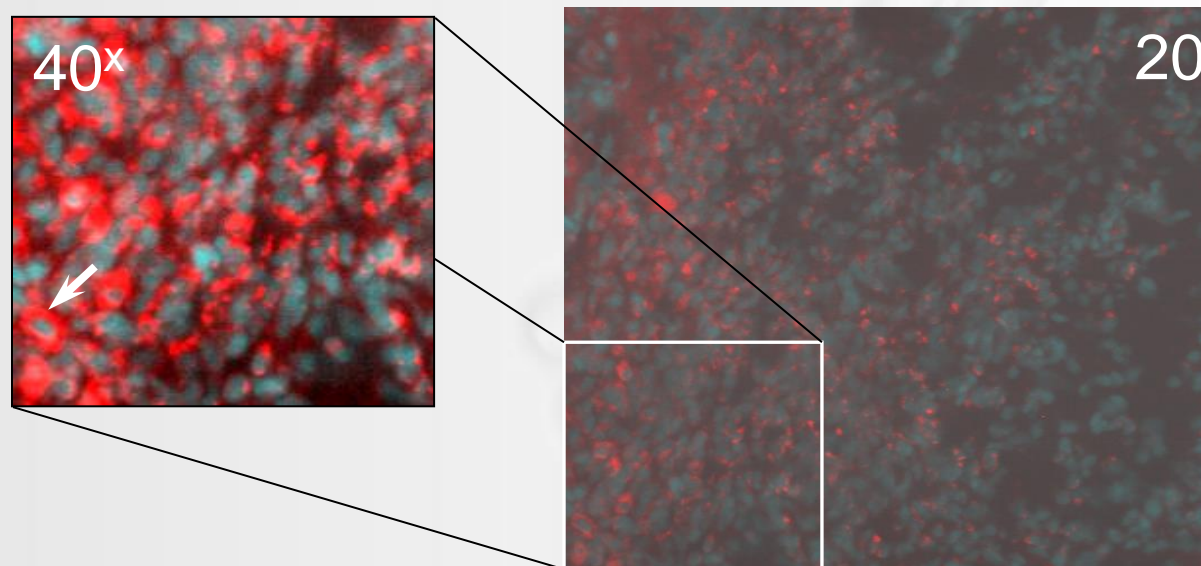
Трансплантированные клетки обнаружены в поврежденном миокарде

Данные доклинических исследований

МСК, меченые красителем
PKH26, in vitro



МСК, меченые красителем PKH26, в миокарде

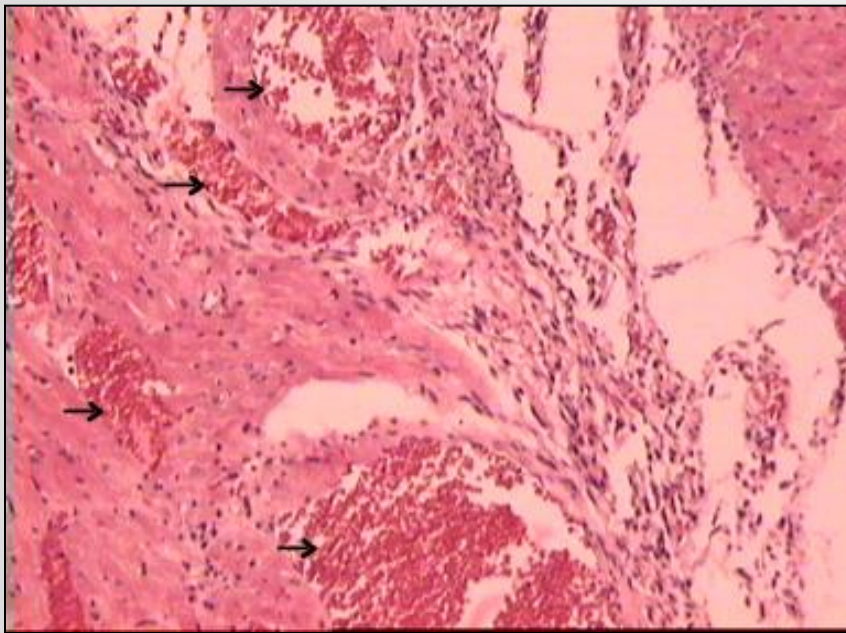


1 неделя после операции

Поврежденный участок миокарда после введения МСК

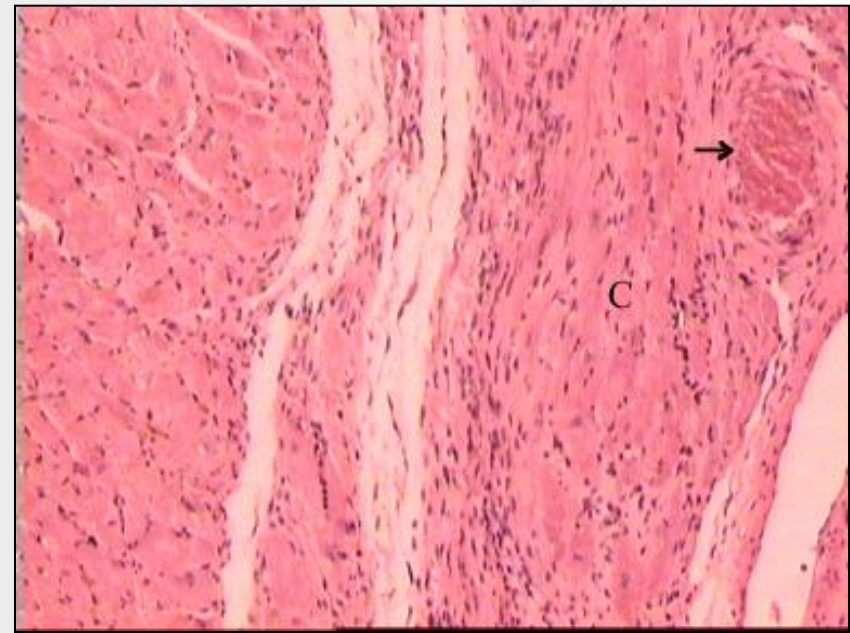
Данные доклинических исследований

Контроль



Образующаяся рубцовая ткань с
большим количеством сосудов
синусоидного типа

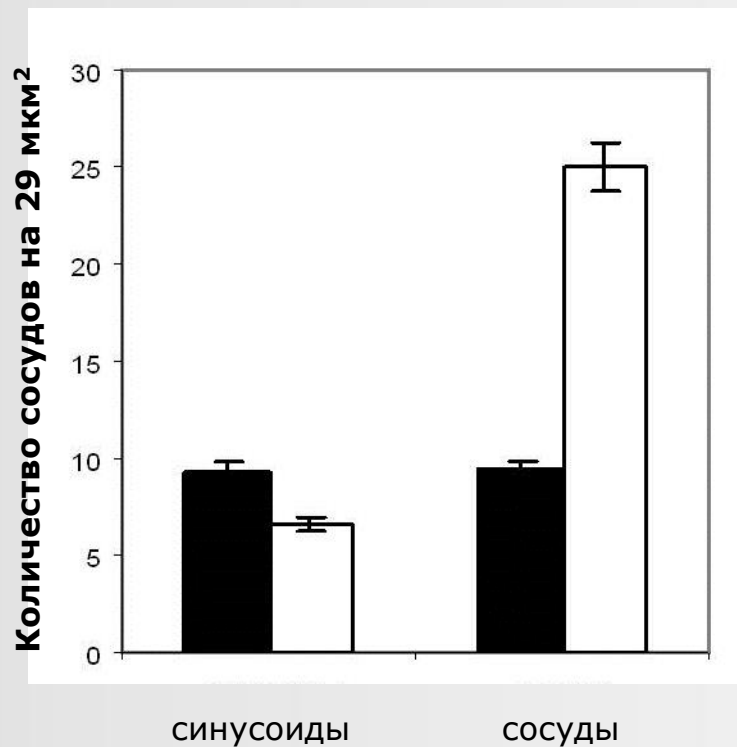
Трансплантация МСК



Образующаяся рубцовая ткань с
субэпикардальными островками
кардиомиоцитов.

Восстановление сосудистой сети в группе клеточной терапии

Данные доклинических исследований



N = 10

5 недель после операции

Данные доклинических исследований

- Ускорение процессов воспаления в зоне ишемии, уменьшение захваченной воспалением области миокарда;
- Усиление васкуляризации поврежденной области (более чем в 2 раза);
- Увеличение количества жизнеспособных кардиомиоцитов в пограничной с повреждением области;
- Увеличение количества эластических волокон в рубце.

Трансплантация МСК для лечения ишемической болезни сердца

Данные клинических исследований

	Группа клеточной терапии	Контрольная группа
Возраст	40-65 лет	
Пол	Женщины и мужчины	
Стандартное лечение	β-блокаторы, мононитраты, ингибиторы АПФ, тромболизис	
Трансплантация аутологичных МСК (однократное внутривенное введение 1×10^6 клеток/кг массы тела)	да	нет
Время наблюдения, месяцев	12 – 36, в среднем 18	
Количество пациентов	38	15

Совместно с РНЦРХТ

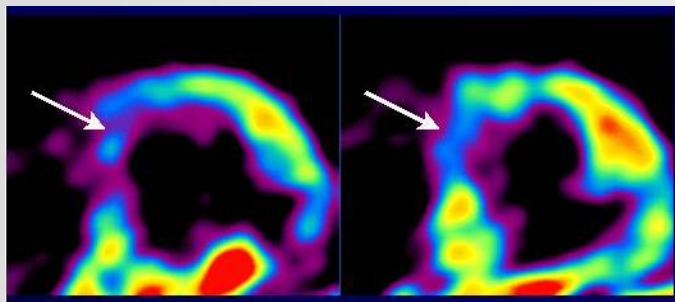
В исследование включали пациентов с ишемией миокарда (со случившимися инфарктами миокарда)

Данные клинических исследований

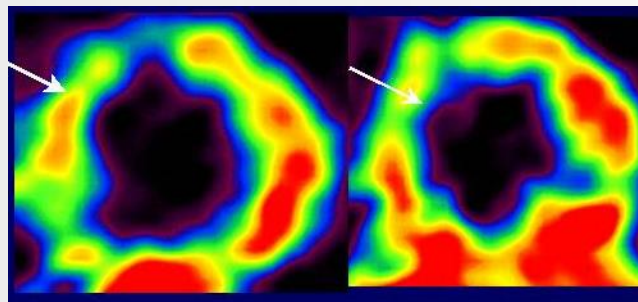
Группа клеточной терапии	Контрольная группа
ПЭТ (перфузия, метаболизм)	
Тест с шестиминутной ходьбой	
Ультразвуковая эхография	
Миннесотский опросник качества жизни у больных хронической сердечной недостаточностью	

Данные клинических исследований

До трансплантации

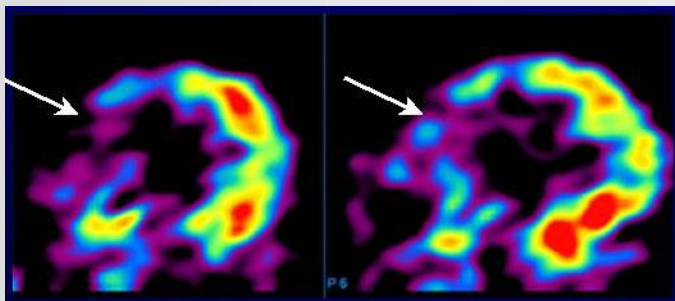


12 месяцев после трансплантации

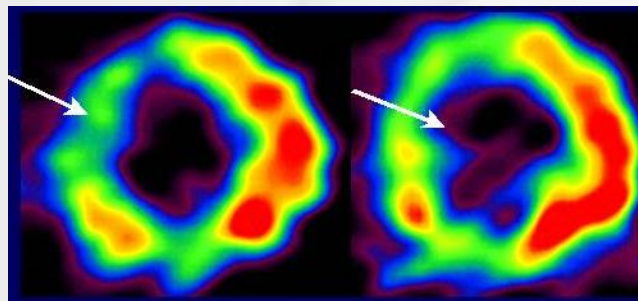


Изучение перфузии миокарда методом ПЭТ с использованием ^{15}N -меченного аммиака

До трансплантации



12 месяцев после трансплантации



Изучение метаболической активности миокарда методом ПЭТ с использованием ^{18}F -фтордезоксиглюкозы

Данные клинических исследований

- Трансплантация аутологичных МСК не приводила к видимым нежелательным эффектам;
- У пациентов, которым были трансплантированы МСК, наблюдалось восстановление перфузии и метаболизма в миокарде;
- Уменьшалась дилатация камер сердца (конечный диастолический объем через 3 месяца после трансплантации МСК существенно увеличивался);
- Улучшалось качество жизни пациентов через 3 месяца после трансплантации.

Трансплантация МСК для лечения хронической ишемии нижних конечностей

Совместно с
РНЦРХТ

Данные клинических исследований

	Группа клеточной терапии	Контрольная группа
Возраст	35-70 лет	
Пол	Женщины и мужчины	
Стадия заболевания (Fontaine)	3б-4 (Критическая ишемия, хирургическая коррекция невозможна)	
Трансплантация аутологичных МСК	да	нет
Время наблюдения, месяцев	5-34 (в среднем 19.9)	ретроспективное
Количество пациентов	16	50

Из исследования исключались пациенты с тяжелыми декомпенсированными сопутствующими заболеваниями (инфаркт миокарда, инсульт)

Данные клинических исследований

Введение МСК в мышцы голени пораженной конечности, 30-40 инъекций, 1×10^6 клеток на 1 инъекцию



+ Внутривенное введение 1×10^6 клеток на 1 кг массы тела



Контроль и исследования

Группа клеточной терапии

Контрольная группа

Ангиография/Компьютерная томография

Тест с шестиминутной ходьбой

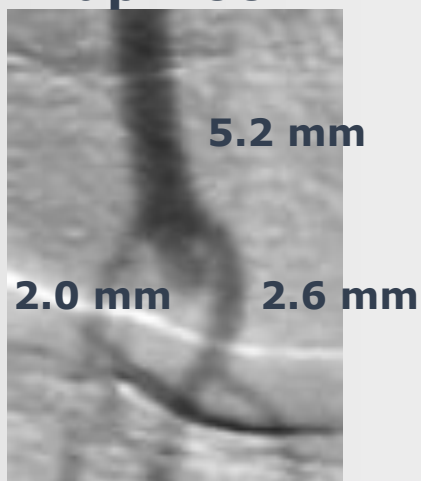
Модифицированный Миннесотский опросник

Лодыжечное давление на пораженной конечности

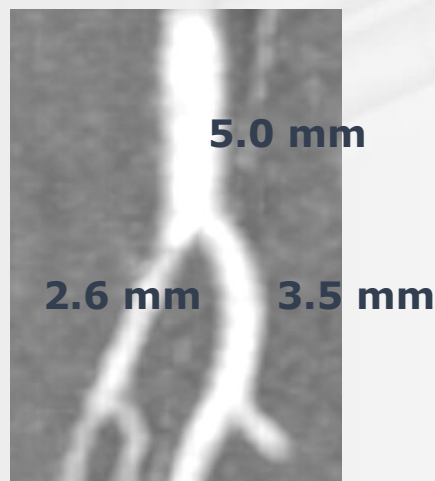
Транскутанное определение напряжения кислорода ($T_{cp}O_2$, mmHg)

**Данные
клинических
исследований**

Март 2007



Сентябрь 2009



Ангиография
подколенной
артерии

Данные клинических исследований

	Контроль	Клеточная терапия	p
Улучшение	2/50 (4 %)	5/16 (56 %)	p=0.0074
Без изменений	26/50 (52 %)	2/16 (13 %)	p=0.008
Ухудшение	22/50 (44 %)	5/16 (31 %)	p=0.008
Ампутация	40/50 (60 %)	5/16 (31 %)	p=0.006
Заживление язвенных дефектов	2/50 (4 %)	5/12 (42 %)	p=0.002
Исчезновение болей покоя	2/50 (4 %)	7/13 (54 %)	p=0.001

Трансплантация аутологичных МСК не привела к видимым нежелательным эффектам

Трансплантация МСК для лечения и профилактики РТПХ

Данные клинических исследований

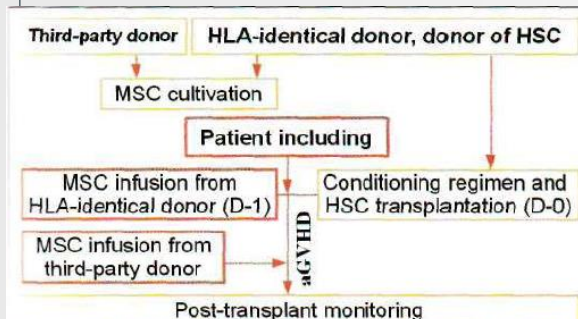


M., 6 y.o.
ALL, II CR,
alloHSC T 08.03.06

← Acute GVHD with skin involvement grade III



Acute GVHD with skin involvement grade II →
3 days after MSCs infusion



	Number of patients	Dosage of MSCs per infusion
Co-transplantation	8	2 mln. cells/kg
Acute GVHD		
1 infusion	7	2 mln. cells/kg
2 infusion	2	2 mln. cells/kg
3 infusion	1	2 mln. cells/kg
Chronic GVHD		
1 infusion	3	2 mln. cells/kg
2 infusion	3	2 mln. cells/kg

	HSC + MSC	Without MSC
Engraftment Leu, D+	21 (16-38)	18(11 -32)
Engraftment Pit, D+	24(14-45)	21 (9 -33)
Acute GVHD, %		
0 - 1	85,8	57,8
II-IV	14,2	42,2
Chronic GVHD, %	0	18
Infection, %	25	48
Overall 2,5 years survival, %	71	34

Involvement organ	Number of pts	Effect of MSCs	Overall response
Acute GVHD			
Skin	4	PR,CR,CR,No	70%
Skin+gut	2	PR,PR	
Skin+gut+liver	4	PR,PR,No,No	
Chronic GVHD			
Skin	2	CR,No	67%
Skin+gut	2	PR,No	
Skin+gut+liver	2	CR,PR	

Совместно с ПСПБГМУ

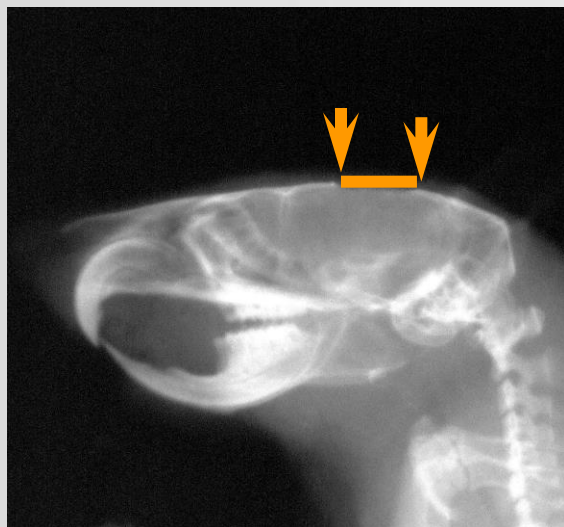
Восстановление костной ткани при помощи терапии МСК

Данные доклинических исследований



Восстановление удаленной кости черепа при помощи деминерализованного ксеногенного костного матрикса (цыпленок), заселенного аутологичными МСК.

N = 8



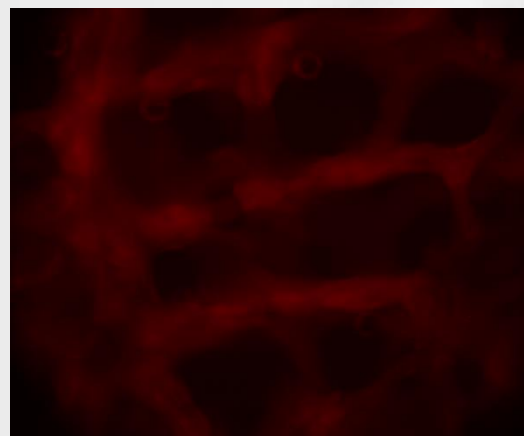
Локализация
трансплантата

1

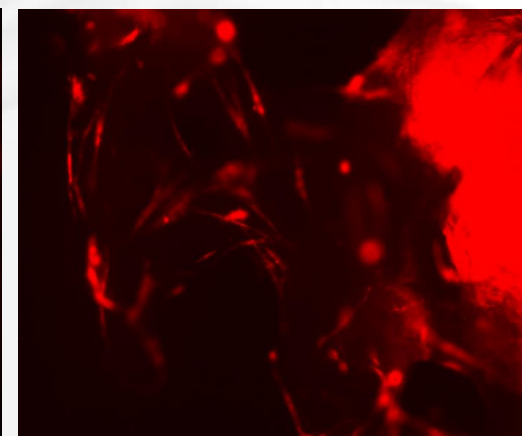
Данные доклинических исследований

МСК, меченые PKH26

1. Металлическая пластина;
2. Ксеногенный деминерализованный костный матрикс (цыпленок);
3. Ксеногенный деминерализованный костный матрикс (цыпленок) заселенный аутологичными крысиными МСК.



2



3

Данные доклинических исследований

Контроль – металлическая пластина



Не сформировано рентгеноплотной костной ткани в области повреждения

Контроль – ксеногенный матрикс



В области повреждения образовалась ткань небольшой рентгеноплотности

Ксеногенный матрикс с МСК



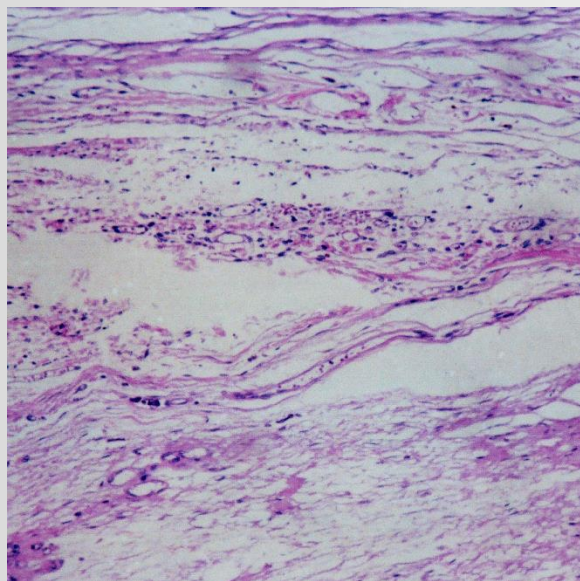
В области дефекта сформирована рентгеноплотная костная ткань

119 дней после трансплантации

Матрикс, заселённый МСК, эффективно замещает костный дефект

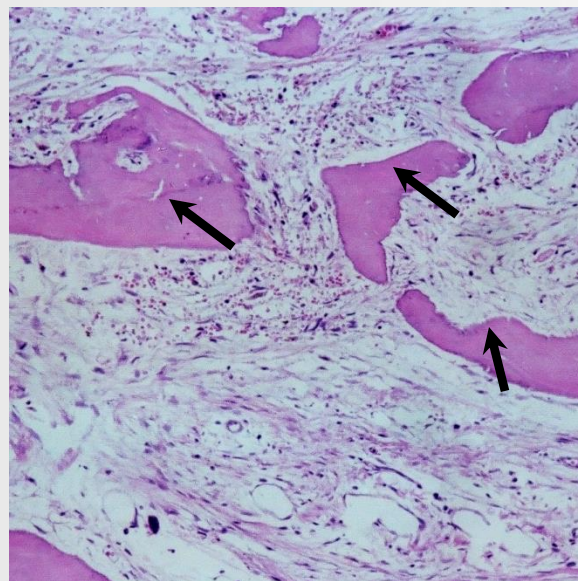
Данные доклинических исследований

Контроль – металлическая пластина



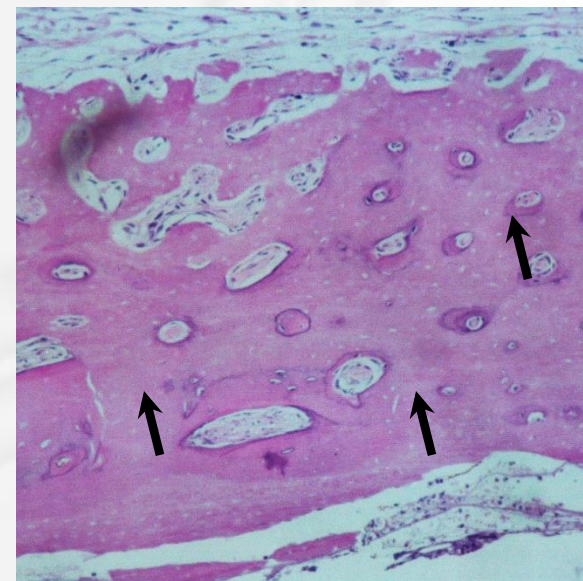
Дефект кости заполнен соединительной тканью

Контроль – ксеногенный матрикс



Область повреждения заполнена соединительной тканью с некоторым количеством отдельно лежащих островков костной ткани

Ксеногенный матрикс с МСК



Область повреждения заполнена образующейся костной тканью

119 дней после трансплантации

Трансплантация МСК для лечения несрастающихся переломов

Совместно с
РосНИИТО

Данные клинических исследований

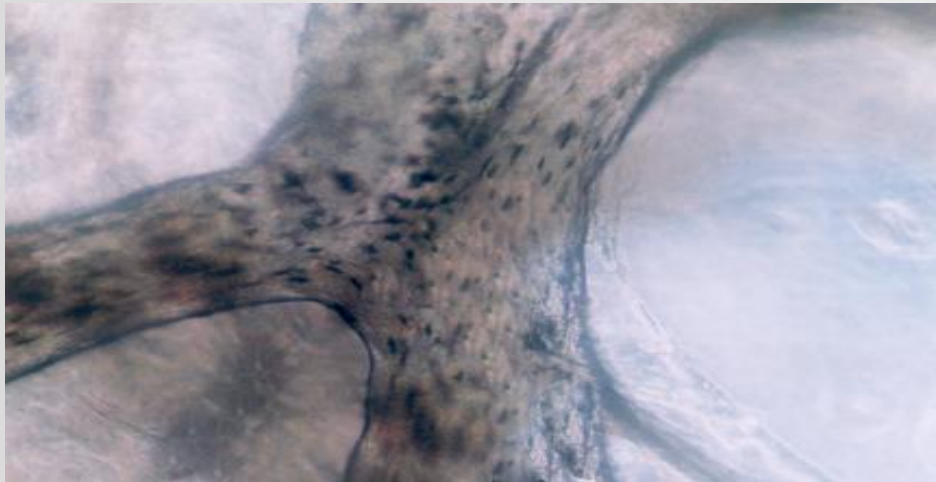
	Группа клеточной терапии	Контрольная группа
Возраст	35-70 лет	
Пол	Мужчины и женщины	
Диагноз	Ложный сустав бедренной/большеберцовой кости	
Деминерализованный костный аллотрансплантат	да	
Аутологичные МСК	да	нет
Сроки наблюдения, месяцев	18-34 (в среднем 22)	18-20 (в среднем 18.3)
Количество пациентов	10	10

Трансплантат заселяли 10^7 МСК на см^3 в аутологичной сыворотке и инкубировали в течение 24-72 часов

Данные клинических исследований

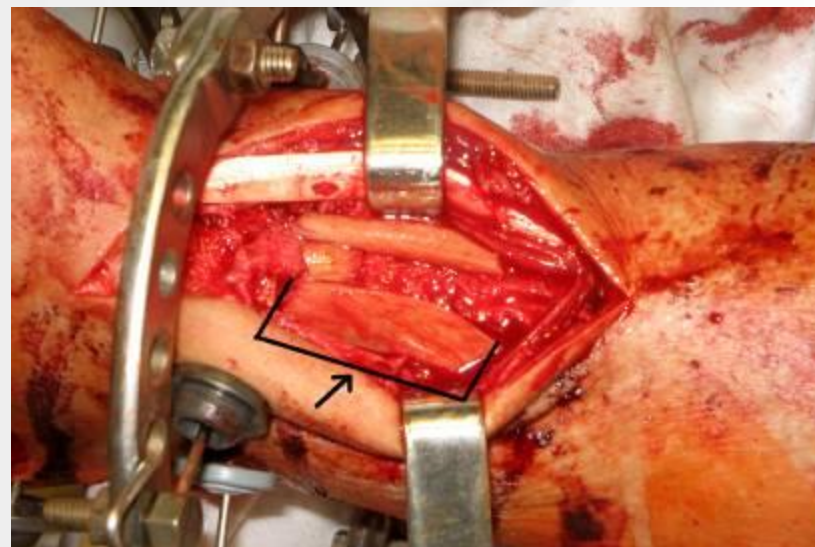
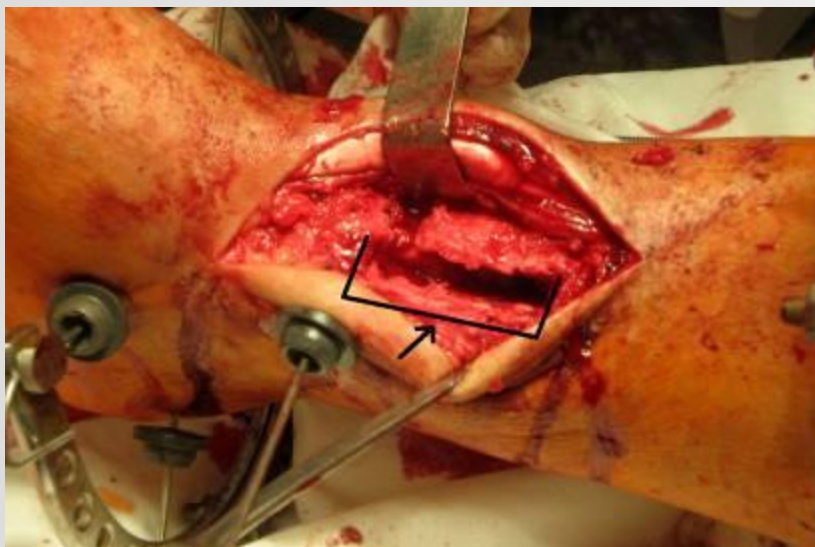


Деминерализованный аллотрансплантат из трубчатой кости (ДКТ)



Деминерализованный аллотрансплантат из трубчатой кости, заселенный аутологичными МСК

Данные клинических исследований



Оценка эффекта

Группа клеточной терапии

Контрольная группа

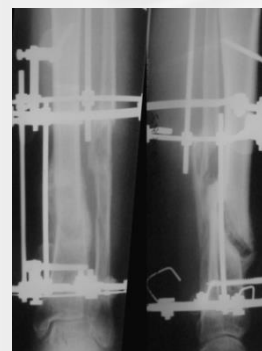
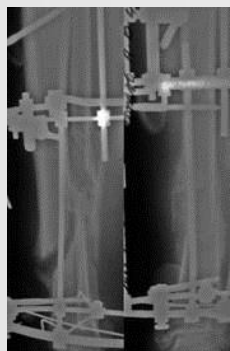
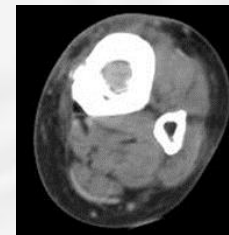
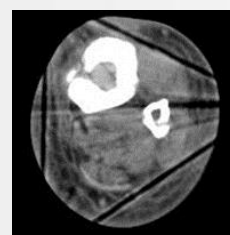
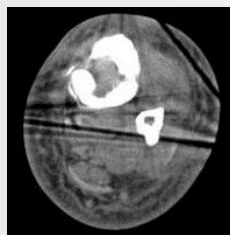
Рентгенография

Компьютерная томография

Денситометрия

**Данные
клинических
исследований**

Динамика образования кости, рентгенография и КТ



После
операции

Через 1
месяц

Через 3
месяца

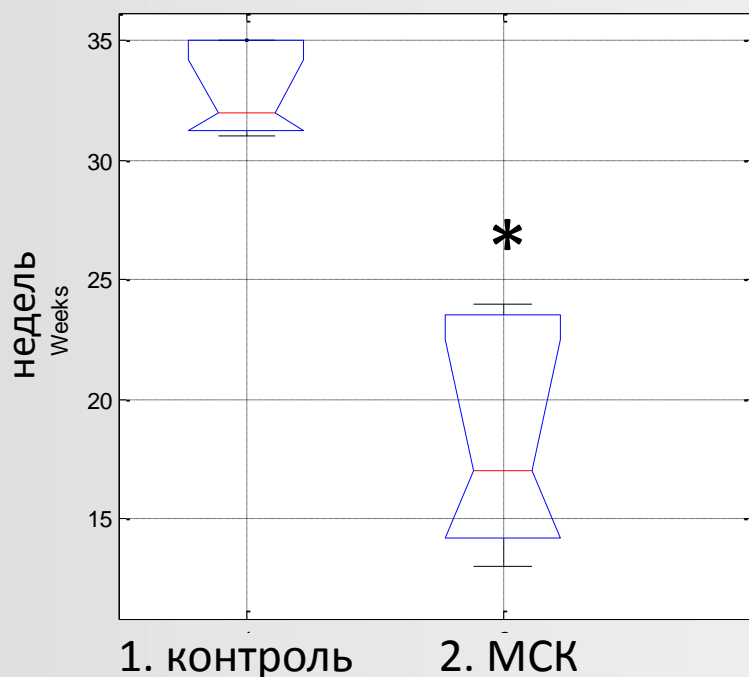
Через 6
месяцев

Результаты

Срок демонтажа аппарата внешней фиксации

Контрольная группа	Группа клеточной терапии
$32,85 \pm 2,03$ недель ($p < 0.02$)	$18,9 \pm 4,7$ недель ($p < 0.05$)

Данные клинических исследований



1. Время использования аппарата внешней фиксации в группе контроля
2. Время использования аппарата внешней фиксации в группе МСК-терапии

$$p \approx 0.000002$$

Данные доклинических исследований

Ложная операция



Раствор-носитель



Контроль



Раствор-носитель



Клеточная терапия



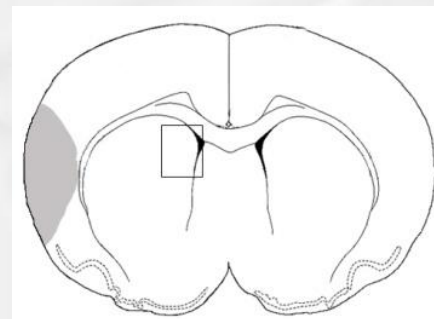
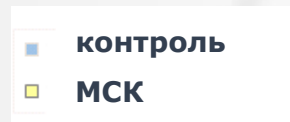
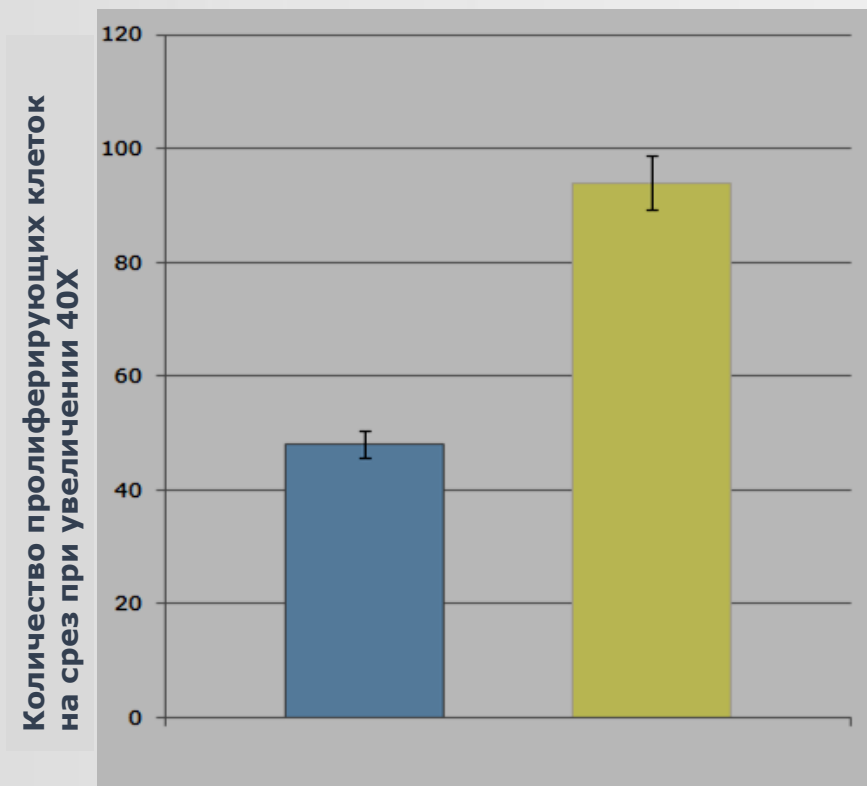
Раствор-носитель + МСК



5×10^6 МСК, полученных из костного мозга крыс, вводили внутривенно через 3 дня после операции

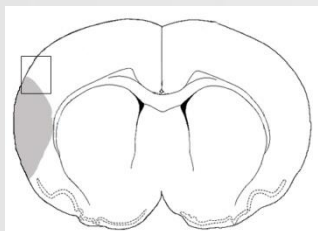
Увеличение количества пролиферирующих клеток в субвентрикулярной зоне мозга

Данные доклинических исследований

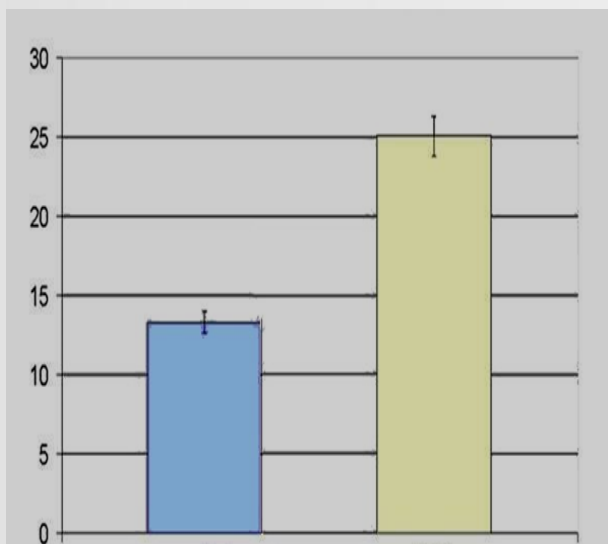


1 неделя после ОСМА

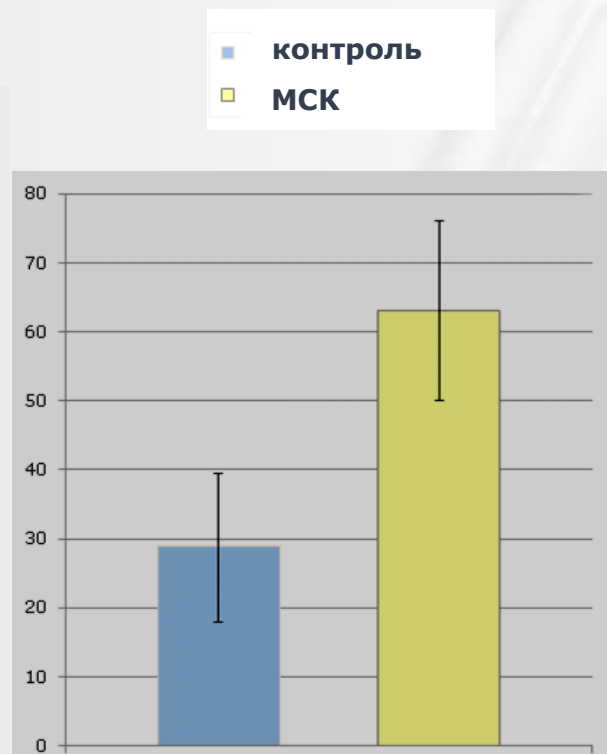
Данные доклинических исследований



Количество сосудов на поле зрения при увеличении 40X



Количество жизнеспособных нейронов на поле зрения при увеличении 40X



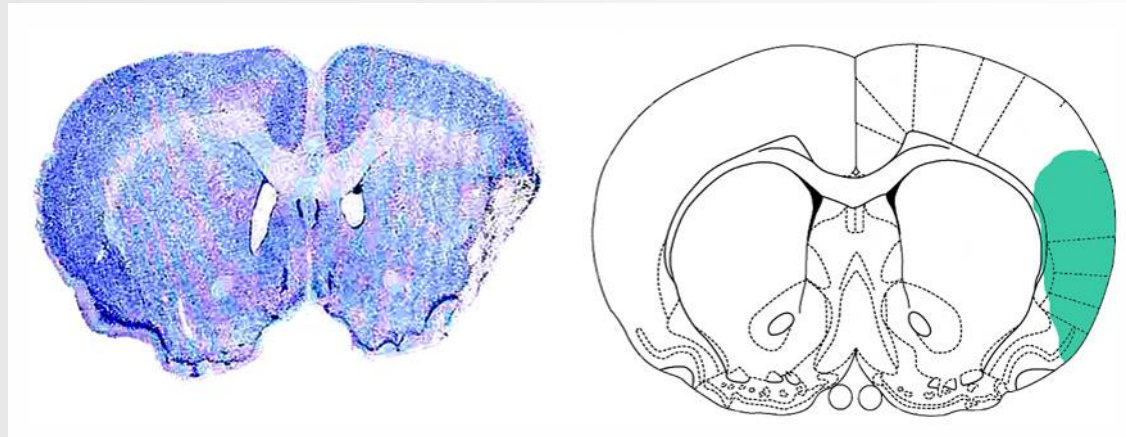
6 недель после ОСМА

**В группе клеточной терапии
меньше размер повреждения**

Данные доклинических исследований

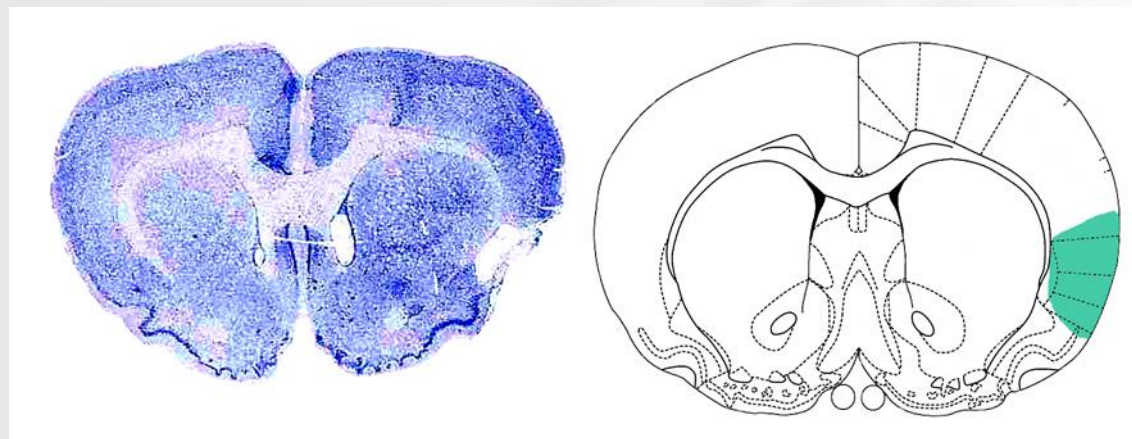
Контрольная группа

Первичная и вторичная
соматосенсорная кора,
пириформная и
инсулярная кора



Введение МСК

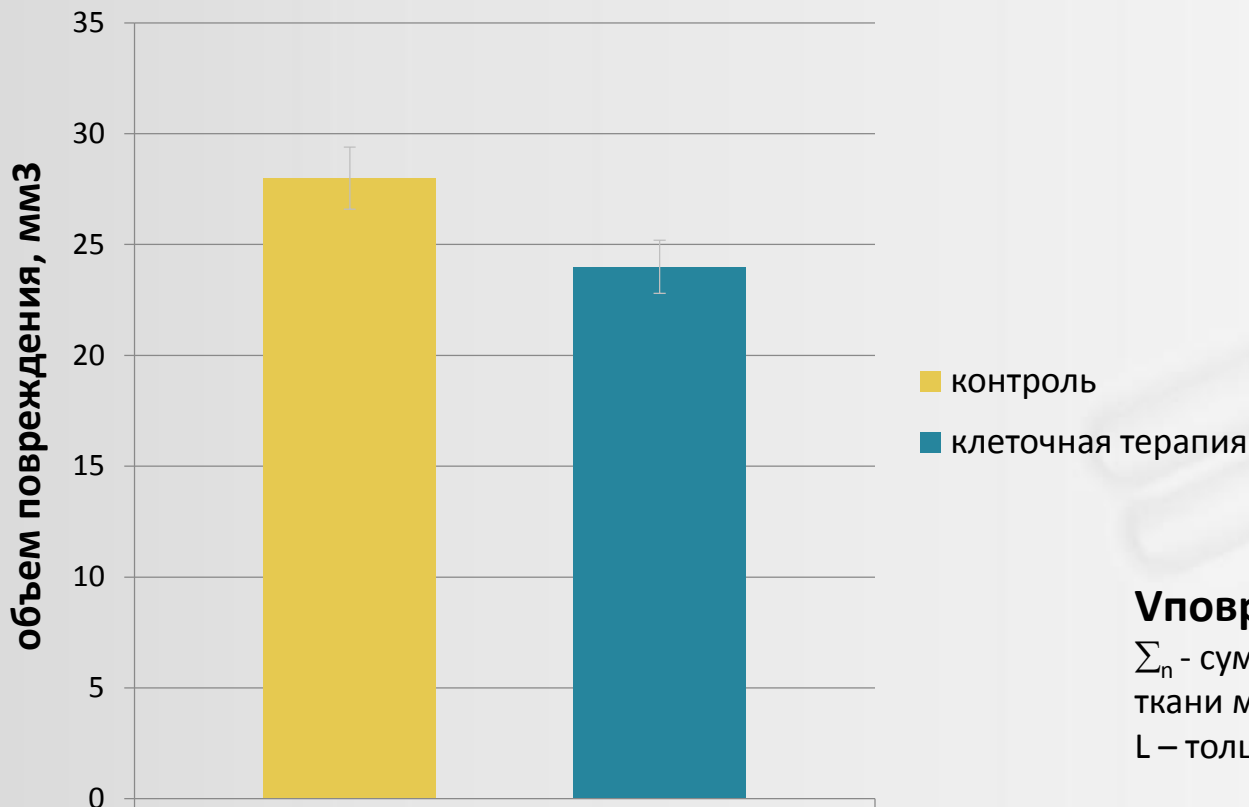
Небольшие участки
сенсомоторной и
инсулярной коры



6 недель после ОСМА

В группе клеточной терапии меньше размер повреждения

Данные доклинических исследований



$V_{\text{повр}} = \sum_n (S_{\text{контр}} - S_{\text{ипс}}) \times L$, где
 \sum_n - сумма площадей повреждения
ткани мозга на n срезах,
L – толщина 15 срезов (105 мкм)

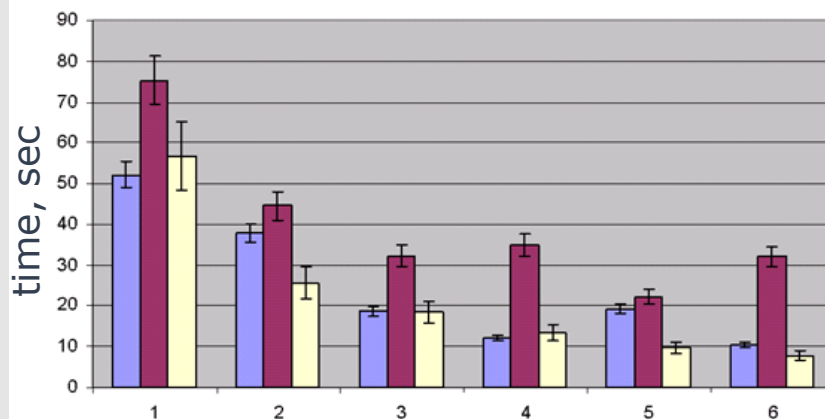
6 недель после ОСМА

Улучшение результатов поведенческого тестирования (водный лабиринт Морриса) в группе клеточной терапии

Данные доклинических исследований

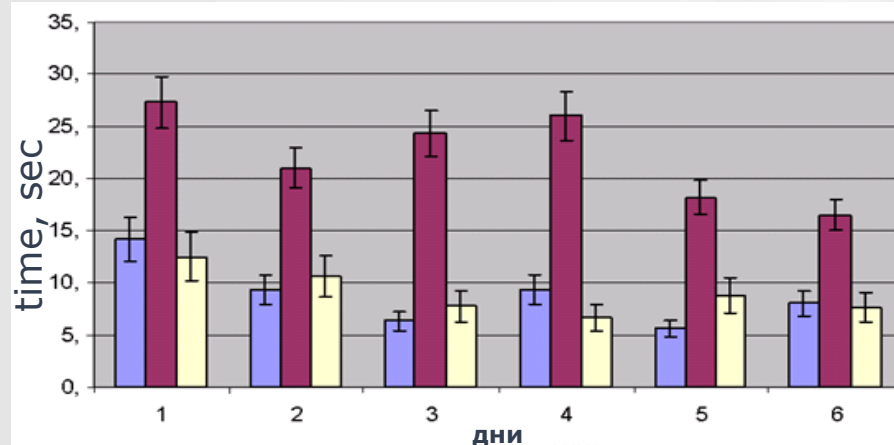
N = 10, p < 0,05

2 недели
после
операции



■ Ложная операция
■ контроль
■ Клеточная терапия

5 недель
после
операции

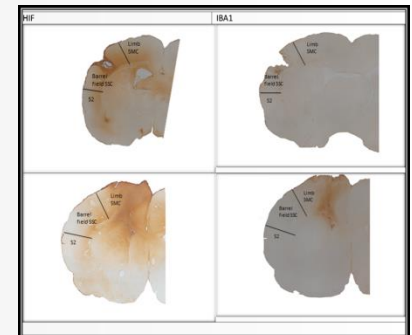
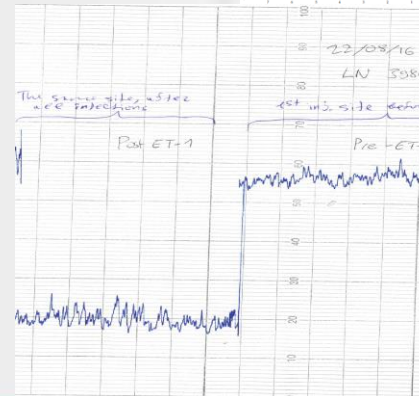
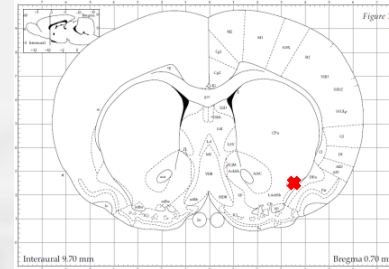
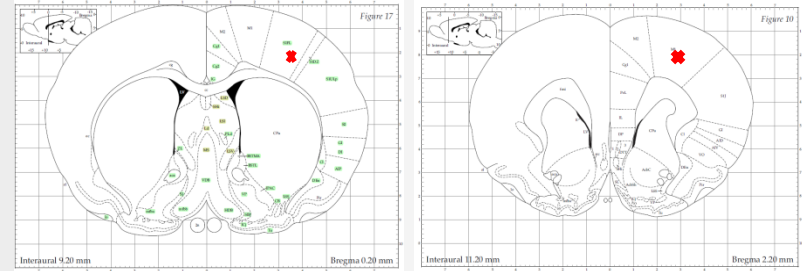
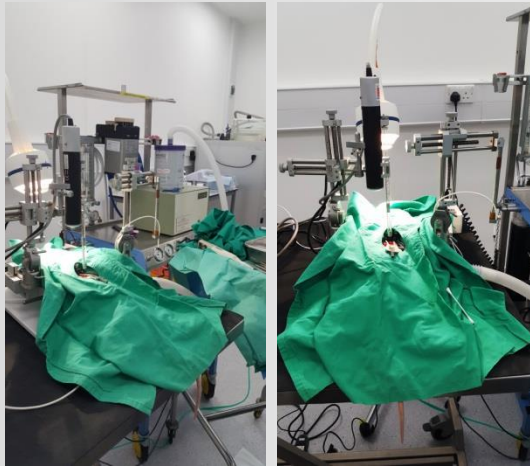


Данные доклинических исследований

- Увеличение количества выживших животных (выжило на 20% больше, чем в контрольной группе)
- Менее выраженные воспалительные процессы и глиоз;
- Усиление васкуляризации в пограничной с повреждением зоне (в 1,8 раз);
- Увеличение количества жизнеспособных нейронов (более чем в 2 раза);
- Увеличение количества пролиферирующих клеток в СВЗ (~ в 2 раза);
- Уменьшение частоты такого осложнения, как расширение желудочков мозга;
- Меньший размер повреждения;
- Улучшение результатов поведенческого тестирования.

Исследование «ИИ2»: новая модель инсульта у крыс

Стереотаксические внутримозговые инъекции эндотелина-1



Данные доклинических исследований

Клеточный контроль



Раствор-носитель
+ фибробласты
дермы человека
(hDF)

Клеточная терапия



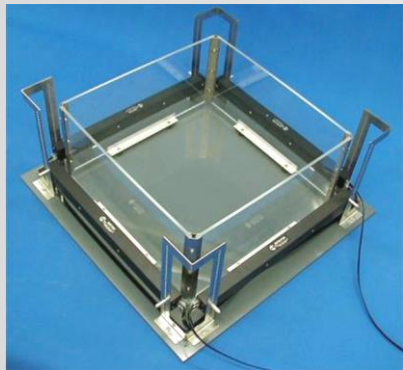
Раствор-носитель
+ МСК человека
(hMSC)

2×10^6 МСК или фибробластов человека вводили внутривенно через 3 дня после операции

Данные доклинических исследований

Время в покое, сек

Увеличилось у hDF, не изменилось у hMSC

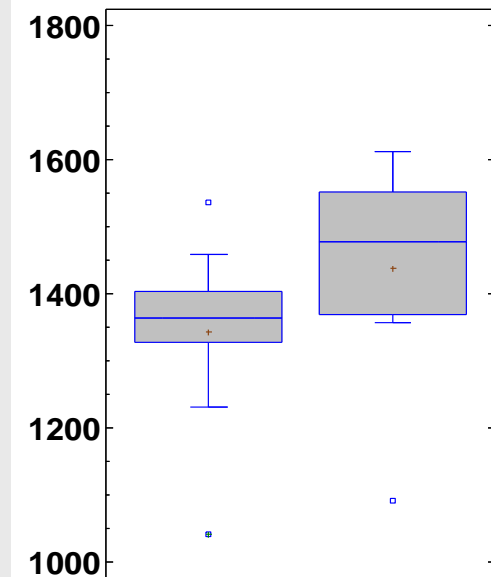


Opto-Varimex-4 Auto-Track™
(Columbus Instrument)

14 дней после
поражения
эндотелином-1

$N = 9, p < 0,05$

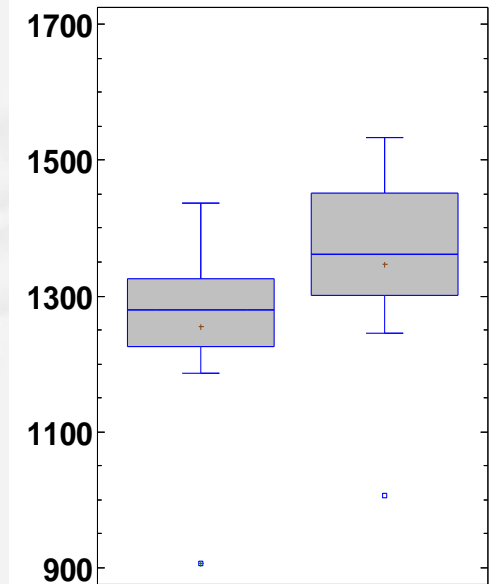
hDF



До поражения

После поражения

hMSC



До поражения

После поражения

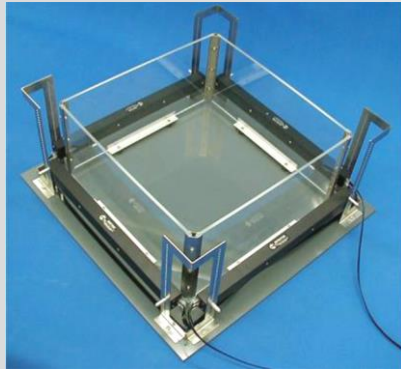
Данные доклинических исследований

Время в движении, сек

Уменьшилось у hDF, не изменилось у hMSC

hDF

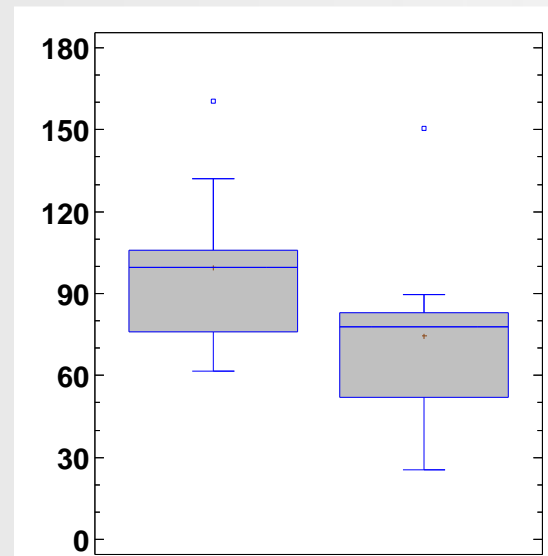
hMSC



Opto-Varimex-4 Auto-Track™
(Columbus Instrument)

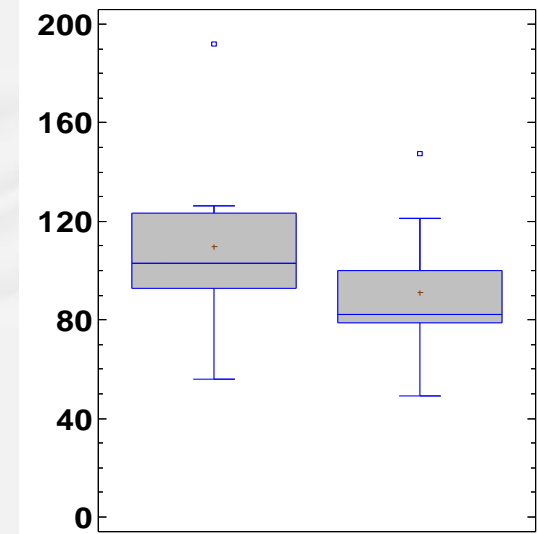
14 дней после
поражения
эндотелином-1

$N = 9, p < 0,05$



До поражения

После поражения



До поражения

После поражения

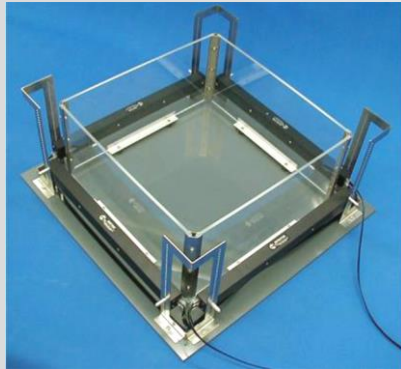
Данные доклинических исследований

Подъёмы на задние конечности

Число уменьшилось у hDF, не изменилось у hMSC

hDF

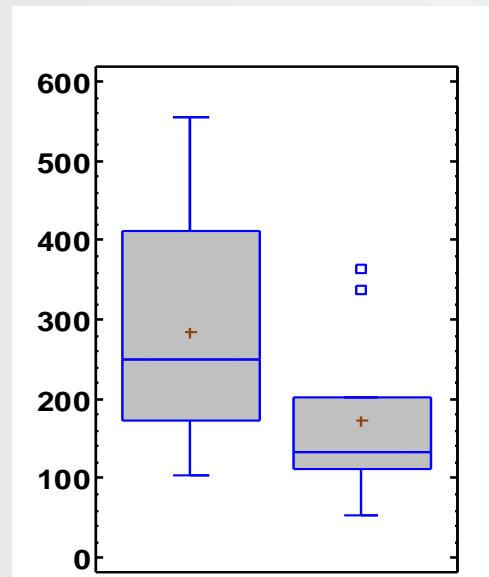
hMSC



Opto-Varimex-4 Auto-Track™
(Columbus Instrument)

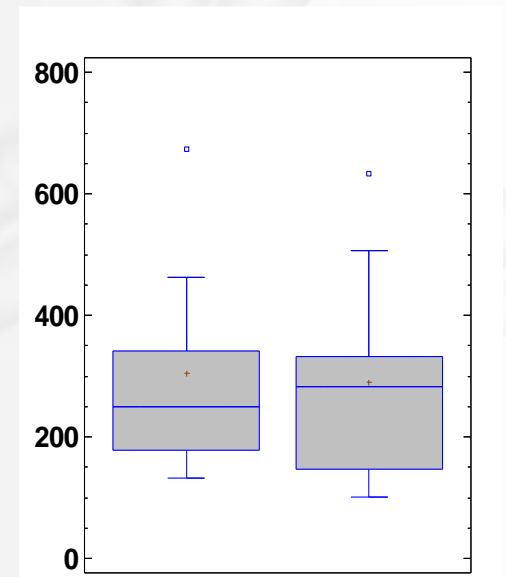
14 дней после
поражения
эндотелином-1

$N = 9, p < 0,05$



До поражения

После поражения



До поражения

После поражения

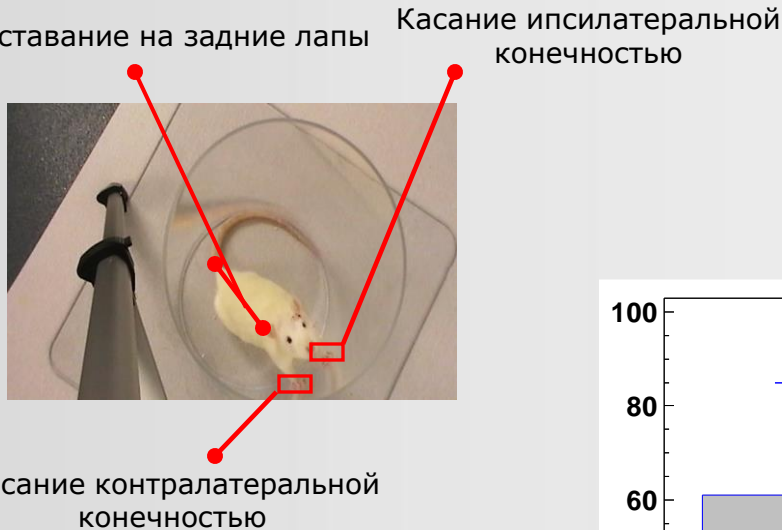
Данные доклинических исследований

Прикосновения контралатеральной конечностью

Число уменьшилось в обеих группах

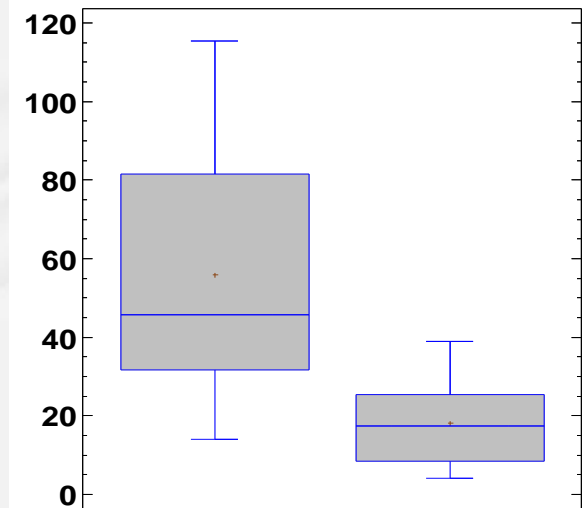
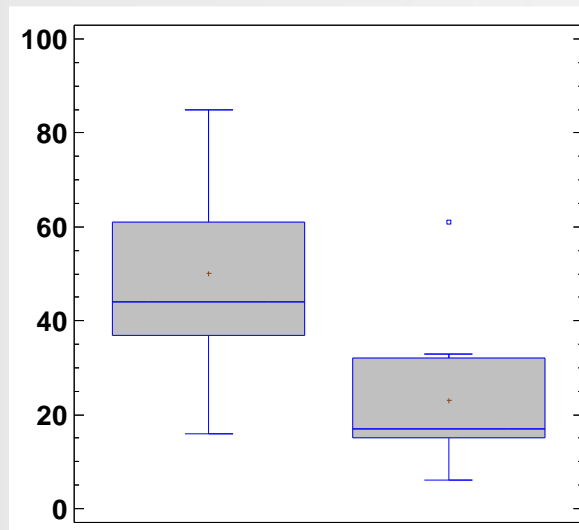
hDF

hMSC



14 дней после поражения эндотелином-1

$N = 9, p < 0,05$



До поражения

После поражения

До поражения

После поражения

Исследование «ИИ2»: функция передних конечностей

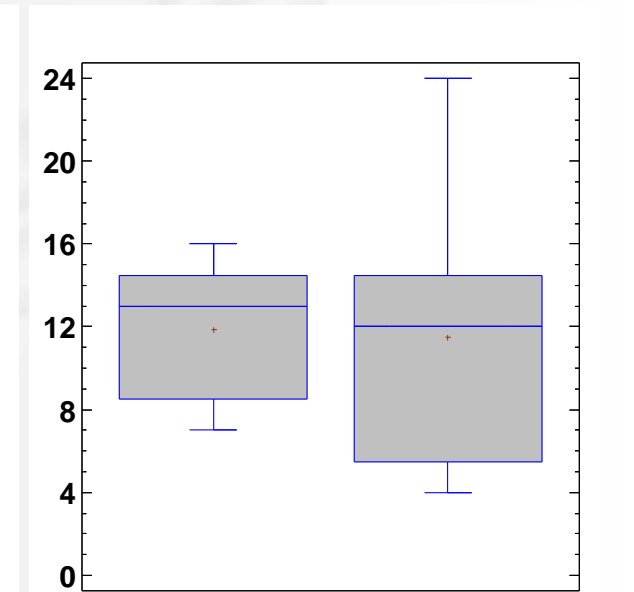
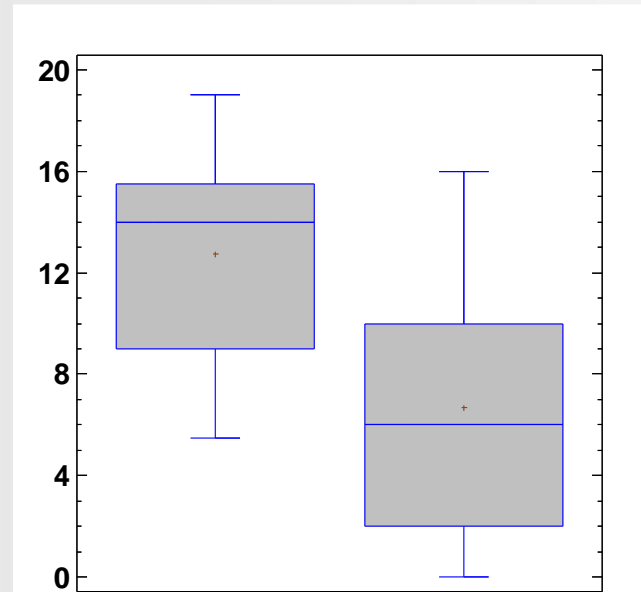
Данные доклинических исследований

Подъёмы на задние конечности

Число уменьшилось у hDF, не изменилось у hMSC

hDF

hMSC

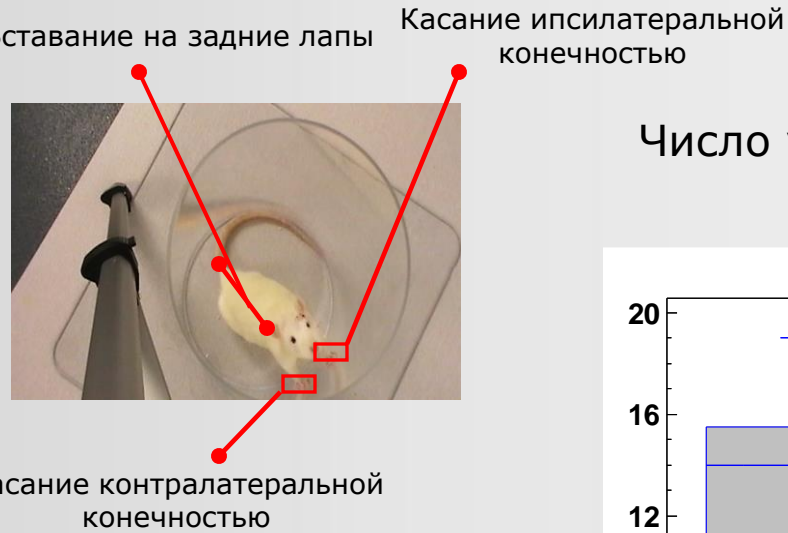


До поражения

После поражения

До поражения

После поражения



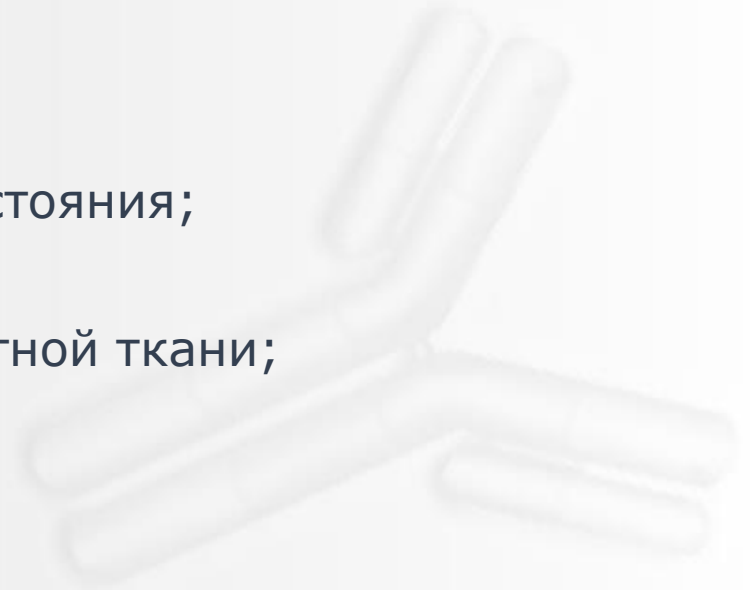
14 дней после поражения эндотелином-1

$N = 9, p < 0,05$

Данные доклинических исследований

- У крыс предупреждается развитие поведенческого дефекта, что может говорить о положительном влиянии введения этих клеток на повседневное функционирование после инсульта.

- Ишемические состояния;
- Восстановление костной ткани;
 - РТПХ (?).



Почему наблюдается «умеренный эффект» МСК?

Если замороженные:
вопросы логистики;
валидация транспортировки;
протоколы размораживания
и
т.п.

Адекватен ли
путь введения?

Раствор-носитель!

**Замороженные или
культивируемые
клетки?**

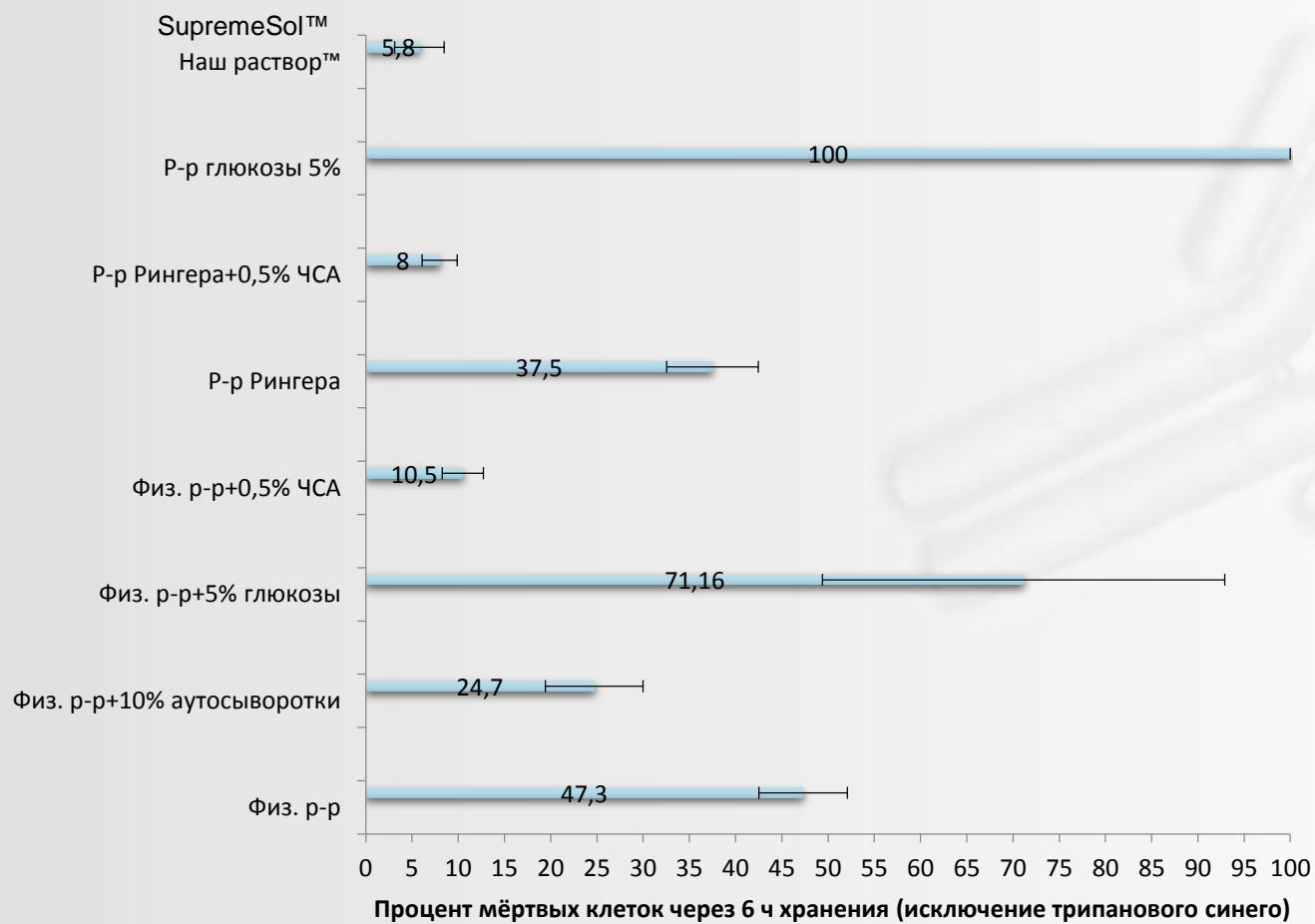
ДКИ только на
грызунах.

Нет экспресс-метода
функциональной
оценки.

Плацебо/контроль
в ДКИ и КИ.

Если культивируемые:
учитываются/не учитываются
эти факторы!

Сохранность МСК в обычно используемых инфузионных средах



Длительное сохранение МСК в SupremeSol™



**Благодарю за внимание.
Вопросы?**



Канов Евгений Викторович

V Всероссийская конференция с международным участием

*Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, биомедицинских
клеточных продуктов и клинических испытаний медицинских изделий*

Санкт-Петербург, 1-2 июня 2017 г.