



(51) МПК
A61L 27/12 (2006.01)
A61F 2/02 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)
C01B 25/32 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2010153515/15, 08.07.2009**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.07.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
08.07.2008 EP PCT/EP2008/000482

(43) Дата публикации заявки: **20.08.2012** Бюл. № 23

(45) Опубликовано: **10.09.2013** Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 6905516 B1, 14.06.2005. ТАМИМИ F. «Bone regeneration in rabbit calvaria with novel monetite granules» Journal of Biomedical Materials Research Part A, vol.87A, №4, pp.980-985, first published online: 6 FEB 2008, реферат. Энциклопедический Словарь Ф.А. Брокгауза и И.А. Ефрона 1890-1907 [онлайн]. US 6440444 B2, 27.08.2002.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **08.02.2011**

(86) Заявка РСТ:
ES 2009/000358 (08.07.2009)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/004066 (14.01.2010)

Адрес для переписки:
**191036, Санкт-Петербург, а/я 24,
 "НЕВИНПАТ", пат.пов. А.В.Поликарпову**

(72) Автор(ы):

**ФОНТ ПЕРЕС Хулио (ES),
 КАСТРО ФЕО Мария Бегонья (ES),
 ДЕЛЬ ОЛЬМО БАСТЕРРЕЧЕА Маите (ES),
 ГАРСИЯ ВАСКЕС Мария Долорес (ES),
 РУБИО РЕТАМА Хорхе (ES),
 ЛОПЕС КАБАРКОС Энрике (ES),
 РУЭДА РОДРИГЕС Кармен (ES),
 ТАМИМИ МАРИНЬО Фале (ES),
 ХАМДАН АЛИ АЛХРАИСАТ
 Мохаммад (ES)**

(73) Патентообладатель(и):
Истоселль, С.Л. (ES)

**(54) ТРЕХМЕРНЫЕ МАТРИЦЫ ИЗ СТРУКТУРИРОВАННОГО ПОРИСТОГО МОНЕТИТА ДЛЯ
 ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТИ И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к трехмерной матрице из монетита со структурированной пористостью, способу синтеза указанной матрицы, форме для ее получения и применению матрицы из монетита для регенерации структуры кости. Заявленная матрица из монетита имеет в своей структуре вертикальные цилиндрические макропоры диаметром от 350 до 650 мкм, которые пересекают в продольном направлении

матрицу с одного конца до другого и расположены на расстоянии друг от друга от 0,4 до 0,6 мм. Форма для получения указанной матрицы снабжена однородно распределенными зубцами диаметром 350-650 мкм, равномерно расположенными на расстоянии друг от друга 0,4-0,6 мм. Способ синтеза матрицы из монетита включает стадии смешивания основных фосфатов кальция, кислых фосфатов кальция, порообразующего агента и замедлителя

схватывания и отверждения посредством добавления дистиллированной воды с образованием жидкой фазы, заполнения формы указанной жидкой фазой, стерилизации образованного материала-предшественника и его термического превращения в монетит. Заявленные изобретения направлены на

получение матрицы из биоматериала монетита с заранее заданной пористостью, которая обеспечивает возможность неоваскуляризации и заселения клетками и является биоактивной, нецитотоксичной, немутагенной и гемосовместимой. 5 н. и 39 з.п. ф-лы, 38 ил., 11 пр.

RU 2 4 9 1 9 6 0 C 2

RU 2 4 9 1 9 6 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61L 27/12 (2006.01)**A61F 2/02** (2006.01)**A61F 2/28** (2006.01)**C01B 25/32** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010153515/15, 08.07.2009**

(24) Effective date for property rights:

08.07.2009

Priority:

(30) Convention priority:

08.07.2008 EP PCT/EP2008/000482(43) Application published: **20.08.2012 Bull. 23**(45) Date of publication: **10.09.2013 Bull. 25**(85) Commencement of national phase: **08.02.2011**

(86) PCT application:

ES 2009/000358 (08.07.2009)

(87) PCT publication:

WO 2010/004066 (14.01.2010)

Mail address:

**191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT",
pat.pov. A.V.Polikarpovu**

(72) Inventor(s):

FONT PERES Khulio (ES),**KASTRO FEO Marija Begon'ja (ES),****DEL' OL'MO BASTERREChEA Maite (ES),****GARSIJa VASKES Marija Dolores (ES),****RUBIO RETAMA Khorkhe (ES),****LOPES KABARKOS Ehnrike (ES),****RUEhDA RODRIGES Karmen (ES),****TAMIMI MARIN'O Fale (ES),****KhAMDAN ALI ALKhRAISAT Mokhammad
(ES)**

(73) Proprietor(s):

Istosell', S.L. (ES)(54) **THREE-DIMENSIONAL MATRIXES FROM STRUCTURED POROUS MONETITE FOR TISSUE ENGINEERING AND BONE REGENERATION AND METHOD OF THEIR OBTAINING**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to three-dimensional matrix from monetite with structured porosity, method of claimed matrix synthesis and mould for its obtaining and application of monetite matrix for regeneration of bone structure. In its structure claimed monetite matrix has vertical cylindrical macropores with diameter from 350 to 650 mcm, which cross matrix in longitudinal direction from one end to another, and are located at from 0.4 mm to 0.6 mm distance from each other. Mould for obtaining claimed matrix is provided with uniformly allocated cogs with diameter 350-650 mcm, which are uniformly located at 0.4 - 0.6 mm distance from each

other. Method of synthesis of monetite matrix includes stages of mixing basic calcium phosphates, acid calcium phosphates, pore-forming agent and setting retardant, and solidification by adding distilled water with formation of liquid phase, filling mould with said liquid phase, sterilisation of formed precursor material and its thermal transformation in monetite.

EFFECT: inventions are directed at obtaining matrix from bio-material monetite with predetermined porosity, which ensures possibility of neo-vascularisation and inoculation with cells and is bioactive, non-cytotoxic, non-mutagenic and hemo-compatible.

44 cl, 38 dwg, 11 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области тканевой инженерии, более конкретно к регенерации кости. Изобретение относится к пористой трехмерной матрице из монетита, который является биосовместимым, имеет структурированную пористость и предварительно заданную структуру и обладает способностью к реабсорбции, а также к способу синтеза, обеспечивающему получение указанного материала, и применению этого материала. Эти матрицы составляют отличную основу для заселения и пролиферации клеток, что обеспечивает возможность применения этих матриц в тканевой инженерии и регенерации кости, в результате их преимущественных свойств биосовместимости, реабсорбции, остеоиндукции, реваскуляризации и т.д.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Потеря массы и качества костной ткани является серьезной проблемой со здоровьем, которая является еще более распространенной у пациентов старшего возраста.

Успех при регенерации дефекта кости с использованием трехмерных материалов, которые вначале заселяют клетками-предшественниками *in vitro*, в значительной степени зависит от характеристик и структуры материала.

На протяжении почти века для восстановления или замены костных сегментов опорно-двигательного аппарата используют биоматериалы.

Применение аутокостных трансплантатов, т.е. от самого пациента, является широко используемым способом заполнения костных полостей и восстановления хирургическим путем. Однако запас кости ограничен, и пациент должен подвергаться дополнительным травмам, чтобы получить трансплантат. Другим выходом являются донорские аллотрансплантаты, которые также имеют недостатки, такие как более низкая скорость новообразования, более низкая остеогенная способность, скорость реабсорбции, более низкая реваскуляризация, а также высокий риск иммуногенной реакции и переноса патогенных агентов.

Идеальным является получение материала, аналогичного кости, который является биосовместимым, не проявляет вредных биологических реакций, является реабсорбируемым и постепенно разлагается по мере формирования новой ткани, таким образом постепенно передавая нагрузки на новую кость, предотвращая второе хирургическое вмешательство для удаления имплантата. Также идеальным является материал, продукты деградации которого легко удаляются и не являются токсичными, который является остеоиндуктивным и вызывает образование костной ткани.

В организме разрушение и реабсорбцию кости осуществляют остеокласты. Они представляют собой клетки, образованные из моноцитов, которые прикрепляются к поверхности кости. После прикрепления они начинают выделять наружу протоны, с целью снижения рН внешней среды. В такой кислой окружающей среде кристаллы гидроксиапатита, образующие часть минерального компонента кости, солюбилизируются. Гидроксиапатит кости солюбилизируется с образованием аморфных частиц фосфата кальция, которые удаляются макрофагами, или с образованием ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} , которые накапливаются во внеклеточной жидкости. Эти ионы диффундируют к кровеносным капиллярам, вступая в большой круг кровообращения, и затем выводятся с мочой через почки. Эти освобожденные ионы могут также повторно использоваться остеобластами для образования новой кости. Остеокласты также вносят вклад в деградацию органической фазы кости

посредством ферментных процессов.

Исследования новых биоматериалов для восстановления кости направлены на снижение, насколько это возможно, потребности в костных трансплантатах, поиск искусственного заменителя, который со временем реабсорбируется и/или образует единое целое с близлежащей костью и дополнительно служит в качестве фиксации при остеопоротических переломах. Механические свойства заменителя кости должны быть насколько возможно близкими к свойствам губчатой кости. Материалы должны дополнительно способствовать стабильности перелома и быть достаточно стойкими для снижения необходимой наружной иммобилизации или времени иммобилизации. Указанный материал должен иметь способность к реабсорбции, быть биосовместимым и остеоиндуктивным, т.е. он должен притягивать мезенхимальные клетки и другие типы клеток, расположенные вблизи имплантата, и благоприятно влиять на их дифференцировку в остеобласты, а также остеокондуктивным, т.е. он должен служить в качестве формы для образования новой кости.

В поисках схожести с тем, что существует в организме, используемые до настоящего времени нереабсорбируемые материалы заменяют в костных имплантатах реабсорбируемыми материалами. Эти биоматериалы не мешают развитию и росту формируемой новой кости, поскольку они постепенно замещаются принимающей тканью. Более того, они имеют более высокую биосовместимость, они естественным образом участвуют в регенерации кости, и отсутствует необходимость их удаления посредством хирургического вмешательства после восстановления кости. Эти материалы должны оставаться в течение достаточного времени для того, чтобы происходила правильная регенерация кости, и разлагаться постепенно без нанесения вреда пациенту и без вмешательства в правильное развитие и рост кости.

Биоматериалы, которые приводят к образованию минерального фосфата кальция, представляют особый интерес для регенерации кости, поскольку они имеют сходство с минеральной фазой натуральной кости и подвержены костному ремоделированию и реабсорбции, благодаря своей метастабильной кристаллической структуре.

Реабсорбируемые материалы, которые используют в качестве заменителей кости, включают фосфаты кальция; гидроксипатит (ГАП), трикальцийфосфат (В-ТКФ) и дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД) (Stubbs et al., 2004; Schnettler et al., 2004). Эти материалы имеют отличную биосовместимость, благодаря своему химическому и кристаллическому сходству с минеральным компонентом кости, однако имеют трудности в отношении растворимости и способности к реабсорбции *in vivo*.

Гидроксипатит (ГАП) представляет собой один из материалов, который вызвал наибольший интерес. Этот материал сам по себе является неорганической фазой, из которой образуются кости, и поэтому его широко используют в регенерации кости. Его примерами являются некоторые промышленные продукты, такие как Interpore 200®, Interpore 500®, Cerasorb® и Collagraft®. Однако вследствие того, что он имеет одну из наиболее стабильных кристаллических структур, материал обладает медленной реабсорбцией.

ГАП представляет собой материал, имеющий наиболее высокую биосовместимость, поскольку он наиболее похож на кристаллы, образуемые костью, однако он не способен к реабсорбции *in vivo*. Дегградация этого материала происходит при контакте с растворами с низким рН и путем фагоцитоза.

Посредством растворения выделяются аморфные частицы фосфата кальция, и они могут быть удалены макрофагами посредством фагоцитоза или внедряться в образующуюся новую кость. Макрофаги могут растворять эти частицы и возвращать Са и Р в депо крови организма (Frayssinet et al., 1999; Benahmed et al., 1996). Однако не наблюдали, что эти частицы вызывают активацию остеокластов (Frayssinet et al., 1999).

Все проведенные исследования подтверждают стойкость этого материала к деградации, когда его имплантируют в организм, из-за его плохой растворимости при физиологических рН. Имплантаты этого типа в животных реабсорбируются на 5,4% за 6 месяцев, по сравнению с имплантатами на основе В-ТКФ, которые реабсорбируются на 85% (Egglі et al., 1988).

В организме человека имплантаты, выполненные с Bio-Oss (ГАП), считаются неабсорбируемыми, поскольку проведенные исследования демонстрируют, что для их реабсорбции благодаря активности остеокластов требуется от 3 до 6 лет (Taylor et al., 2002). Присутствие этого материала в организме в течение такого длительного времени может препятствовать процессу ремоделирования кости, а также отрицательно влиять на способность к остеоинтеграции (Affe et al., 2005; De Boever 2005).

В результате, этот материал традиционно используют в смесях с органическим материалом, таким как полимеры, для увеличения его реабсорбции. Примеры таких применений описаны в US 5866155, где описано включение гидроксиапатита в матрицы из полимолочной кислоты, или в US-A 5741329, являющемся вариантом US 5866155, который предназначен для исправления некоторых дефектов, вызванных локальным подкислением среды после включения цементов в организм.

В этой связи, с целью улучшения способности к реабсорбции фосфатов кальция и увеличения их остеокондуктивной способности, в последние годы используют кристаллические фазы фосфата кальция, менее стабильные, чем гидроксиапатит 6, такие как В-ТКФ и ДКФД (брушит), обладающие лучшей растворимостью и реабсорбцией *in vivo*.

В-ТКФ обладает большей осетокондуктивностью и лучшей реабсорбцией, чем ГАП (Franco et al., 2006). Он считается умеренно реабсорбируемым материалом, в исследованиях *in vivo* наблюдали, что для его реабсорбции в организме животных требуется по меньшей мере один год, а в организме человека - от 6 до 8 месяцев (Wiltfang et al., 2003; Suba et al., 2004). Его деградация повышает отложения кальция, и это связано с более высокой активностью щелочной фосфатазы, которая является ферментом, вовлеченным в образование кости (Trisi et al., 2003; Sugawara et al., 2004).

ДКФД также является биосовместимым, остеокондуктивным и наиболее реабсорбируемым, благодаря тому, что он наиболее растворим при физиологических рН. Это обеспечивает возможность более быстрого формирования новой кости. Он является биоразлагаемым в физиологических средах и он реабсорбируется соседними клетками (Tris et al., 2003). Было подтверждено, что он реабсорбируется *in vivo* в три раза быстрее, чем ГАП и В-ТКФ (Herron et al., 2003; Chow et al., 2003; Tas & Bhaduri 2004; Tamini et al., 2006).

В исследованиях предполагают, что часть материала ДКФД может превращаться в ГАП после его имплантации, что может замедлить устранение имплантата остеокластами на несколько недель (Constanz et al., 1998). Это превращение может вызвать подкисление клетками среды и понизить биосовместимость материала, так

же как и снизить его реабсорбцию. Добавление вместе с В-ТКФ солей Mg и Ca (карбоната кальция) или их сочетания может предотвратить это превращение.

При использовании этого материала наблюдали, что образование кости и устранение материала происходит сбалансированным образом спустя 4
5 недели (Fallet et al., 2006) и 8 недель после вмешательства (Constanz et al., 1998). Это является важным, поскольку если деградация была бы больше, чем синтез, возникали бы нестабильность и воспалительные реакции.

Таким образом, среди этих фосфатов кальция брушит (ДКФД) является одним из
10 материалов, представляющим наибольший интерес для регенерации кости. Благодаря их интересным свойствам, в настоящее время разрабатывают брушитовые цементы для затвердевания *in situ*. Так, например, в патентах US 6733582 и US 2006213398 предложены брушитовые цементы с затвердеванием *in situ*,
15 причем Chronoss Inject[®] уже является выпускаемым продуктом этого типа. Однако этот материал имеет серьезную проблему со стерилизацией, поскольку он разлагается при нагревании, что делает затруднительной его надлежащую стерилизацию.

В существующем уровне техники представлены различные публикации,
20 относящиеся к стерилизации цементов, которые могут быть использованы в качестве материалов-заменителей костной ткани, а также к способам получения указанных матриц и их стерилизации. Однако, как отражено в патентной заявке JP 2004018459, когда указанные цементы стерилизуют с помощью автоклава, характеристики
25 указанных цементов изменяются, что приводит к получению минеральных заменителей костной ткани, которые не отвечают характеристикам, необходимым для их применения в регенерации кости, в отношении реабсорбции, стабильности и заселения клетками, и других существенных свойств.

Монетит реабсорбируется *in vivo* за такое же время и аналогичным образом, как и
30 ДКФД. Он постепенно растворяется при физиологических рН во внеклеточных тканях, окружающих имплантат, и фактические клетки, заселяющие его (эндотелиальные клетки, остеокласты, остеобласты, макрофаги...) ответственны за удаление или повторное использование его, как это происходит в кости.

Например, в US 20060263443 описан монетит, безводный дикальцийфосфат
35 (БДКФ), полученный дегидратацией брушита, в сочетании с другими кальцийфосфатными биоматериалами. Благодаря сочетанию, результаты стерилизации были неприемлемы для использования этих материалов в имплантатах и регенерации кости. Кроме того, эти материалы являются промежуточными
40 продуктами реакции, а не структурами со своей собственной возможностью использования в технической области регенерации кости.

Кроме того, для правильной регенерации кости необходимо, чтобы биоматериалы имели подходящую пористость, обеспечивающую возможность заселения и
45 пролиферации клеток, васкуляризации, увеличения поверхности контакта и, следовательно, увеличения поверхности взаимодействия с принимающей тканью, что позволяет ускорить регенерацию кости. Эти характеристики должны сопровождаться надлежащей скоростью реабсорбции, обеспечивающей клеткам
время, необходимое для регенерации.

50 Так, Gbureck, Uwe et al., 2007, описаны имплантаты на основе брушита и монетита, полученные посредством способа трехмерной печати. Для получения указанных имплантатов вначале получали матрицы брушита, которые дегидратировали гидротермическим способом и преобразовывали в монетит. Однако в таблице 2

указанной статьи показано, что кальцийфосфатный материал, определенный как монетит в указанной статье, имеет содержание монетита только 63%, не указаны размер или распределение его пористости, и он обладает нерегулярной пористостью. Таким образом, указанные структуры непригодны для целей настоящего изобретения.

В US 6905516 представлены заменители кости с регулируемой анатомической формой, которую подгоняют точно к морфологии травмы. Указанные заменители образованы химически отвержденными кальцийфосфатными цементными материалами. Изобретение также относится к порообразующим фазам и формам, которые позволяют получать фосфаты кальция с макропористой структурой и внешней геометрией посредством использования указанных форм. Однако в конкретных воплощениях изобретения представлены материалы на основе брушита, а не монетита, и макропористые структуры, представленные в этих материалах, также не подходят для целей настоящего изобретения. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает матрицы из монетита (метастабильной кальцийфосфатной фазы монетита) с высокой термической стабильностью, которая допускает стерилизацию материала посредством обработки в автоклаве, таким образом упрощая процессы стерилизации, и кроме того, эти матрицы, благодаря особому структурному расположению пор, которое получают в результате определенного конструктивного исполнения материала, приводят к улучшению остеокондуктивной способности материалов предшествующего уровня техники, поскольку их синтезируют в форме пористого блока с определенными характеристиками структурированной макропористости, повышающими удельную площадь поверхности, так же как и площадь контакта с остеобластами, облегчающими процессы транспорта питательных веществ к клеткам, что является критическим фактором для регенерации кости; все эти свойства сочетаются с их высокой способностью к реабсорбции в период времени, подходящий для заселения материала близлежащими клетками и обеспечения их способности заменить реабсорбированный материал физиологическим костным матриксом.

Деградация *in vitro* матриц по изобретению не оказывает влияния на пролиферацию клеток, и кроме того, эти матрицы являются биоактивными, нецитотоксичными, немутагенными и гемосовместимыми.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Чтобы биоматериал был способен вызывать стабильную регенерацию кости, клетки в зоне имплантата, остеобласты из близлежащей кости, мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга и эндотелиальные клетки из большого круга кровообращения должны быть способны одновременно и однородно заселять биоматериал. Это обеспечит возможность образования нового физиологического костного матрикса по мере постепенной реабсорбции биоматериала и развития новой сосудистой системы, которая обеспечит кровоснабжение для выживания новой ткани.

В отношении этого аспекта, важным свойством, которое следует принимать в расчет, является пористая структура, поскольку она влияет как на способность к биодеградации, причем чем выше степень пористости, тем лучше реабсорбция, так и на заселение клетками. Материалы должны иметь размер пор и их взаимосвязанность, позволяющие заселение как эндотелиальными клетками (для образования новых кровеносных сосудов), так и костными клетками. Более того, требуется микропористая и взаимосвязанная природа пористой структуры, которая

обеспечивает возможность диффузии питательных веществ и газов, а также типичных метаболитов клеточной жизнедеятельности. Кость не является плотным материалом, а она имеет различные пористые системы, сообщающиеся между собой. Система взаимосвязанных пор обеспечивает сообщение твердой (трубчатой) кости с губчатой (трабекулярной) костью (Фиг.16). Эти пористые системы характеризуются размерами 100-150 мкм в трубчатой кости и 500-600 мкм в губчатой кости.

В настоящем изобретении представлена новая система тканевой инженерии, предназначенная для регенерации костной структуры путем внедрения лекарственной методики, вместо только восстановительной методики. Такую регенерацию можно применять при остеопорозе.

Тканевую инженерию рассматривают как область знаний, направленную на улучшение, сдерживание и вылечивание патологий органов и тканей. Создание системы, основанной на тканевой инженерии, включает объединение жизнеспособных клеток, обеспечение биосовместимого материала, разрабатываемого специально для биомедицинских применений и сигнальных молекул, регулирующих клеточную активность во все периоды лечения.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает матрицы с геометрией нестатистической, т.е. упорядоченной или заранее заданной пористости, образованные из монетита, в конструктивном исполнении которых учтены пористые системы кости, так что происходит неоваскуляризация и заселение клетками. Указанный материал обеспечен стерилизованным, готовым к применению, и в результате его особого конструктивного исполнения, в нем достигают определенного структурного расположения пор, т.е. пространственного расположения и пространственной конфигурации предварительно установленной и намерено упорядоченной пористости, которая приводит к улучшению остеокондуктивной способности, по сравнению с другими фосфатами кальция, включая другие сочетания фосфата кальция, содержащие монетит.

Указанные матрицы получают в форме пористого блока с определенными характеристиками макро-, мезо- и микропористости, которые увеличивают удельную площадь поверхности, так же как и поверхность контакта с остеобластами, облегчая процессы транспорта питательных веществ к клеткам, что является критическим фактором для регенерации кости.

В конструктивном исполнении этих матриц из монетита по изобретению учтены характеристики пористых систем натуральной кости, которые обеспечивают возможность неоваскуляризации и заселения клетками.

Новые матрицы по изобретению образованы из биоматериала монетита, дегидратированного ДКФД (ДКФ), подходящего для регенерации кости. Указанные матрицы образованы по меньшей мере из 95%±5% монетита, предпочтительно из 95% монетита и более предпочтительно из 100% монетита. Незначительное количество другого материала представляет собой бета-тетракальцийфосфат. Дегградация *in vitro* этого материала не влияет на пролиферацию клеток, и кроме того, он является биоактивным, нецитотоксичным, немутагенным и гемосовместимым, как показано в примере 4.

В результате их конструктивного исполнения и состава, матрицы по изобретению реабсорбируются за время, подходящее для заселения материала соседними клетками и обеспечения их способности заменить реабсорбированный материал физиологическим костным матриксом.

Матрица означает любую трехмерную структуру, пригодную для использования в

регенерации кости, которая допускает рост клеток и пролиферацию клеток, заселяющих ее.

Под клетками понимают:

5 - взрослые мезенхимальные стволовые клетки, предпочтительно происходящие из жировой ткани, но они также могут поступать из костного мозга или любой другой области, которая является источником этих клеток. Могут быть использованы эти клетки, дифференцированные в остеобластический или эндотелиальный тип;

- остеобласты, полученные из костных фрагментов;

10 - эндотелиальные клетки;

- сочетания взрослых мезенхимальных стволовых клеток, недифференцированные или дифференцированные в остеобластический или эндотелиальный тип, остеобласты, остеокласты, остециты из кости и эндотелиальные клетки.

Макропорами называют поры, имеющие диаметр, равный или более 100 мкм.

15 Мезопорами называют поры, имеющие диаметр менее 100 мкм, но более или равный 10 мкм.

Микропорами называют поры, имеющие диаметр менее 10 мкм.

20 Аморфная матрица: матрица, имеющая пористость со статистической, неупорядоченной и предварительно не заданной геометрией, которая не подчиняется пространственному распределению и пространственной конфигурации упорядоченной и заранее установленной пористости, независимо от того, является ли указанная пористость естественной (присущей материалу) или созданной.

25 Структурированная матрица или матрица со структурированной пористостью: матрица, имеющая пористость с нестатистической, упорядоченной или предварительно заданной геометрией, имеющая пространственное распределение и пространственную конфигурацию заранее установленной и намерено упорядоченной пористости. Матрицы по настоящему изобретению представляют собой матрицы со структурированной пористостью, с предварительно заданной пористостью, которая придает им ряд свойств, идеальных для применения в регенерации кости.

30 Остеоиндукция; образование новой костной ткани путем приложения к материалу, образование решетки для пролиферации клеток с остеобластической активностью, формирование новой кости. Это является действием или процессом стимулирования остеогенеза.

Остеогенез: образование или развитие костной ткани посредством дифференциации мезенхимальных клеток в остеобласты.

40 Регенерация кости: образование новой кости, которая после процесса ремоделирования является идентичной уже существующей кости. При регенерации кости возникает реакция, в которую вовлекаются кровеносные сосуды, клетки и межклеточный матрикс. Биоматериал по изобретению применим в тканевой инженерии и регенерации кости, и поэтому его можно использовать в лечении

45 следующих костных патологий:

- гипертрофический и негипертрофический псевдоартроз;

- остеонекроз;

- остеопороз;

50 - дефекты кости, возникающие после удаления протеза, экстирпации опухоли, в результате биохимических и метаболических нарушений или наследственных заболеваний;

- лечение ушибов и травм;

- лечение переломов кости;
- любые патологии, при которых необходимо восстановление костной ткани;
- лечение дефектов челюстно-лицевых костей;
- наращивание кости перед установлением зубных имплантатов.

5 Заселение клетками: способность клеток распространяться на биоматериал, будучи способными к пролиферации и увеличению клеточной популяции вплоть до заполнения всей матрицы. Измерение способности к заселению матрицы представляет собой анализ числа клеток в биоматериале в зависимости от времени
10 (данные графика пролиферации).

Клеточная адгезия: способность клеток связываться с другими клетками или матрицей. Адгезия может происходить посредством специфических взаимодействий, таких как электростатические силы, и она регулируется особыми белками, называемыми адгезионными молекулами. Способность к прикреплению к
15 биоматериалу можно изучать посредством наблюдения клеток, расположенных на биоматериале, под микроскопом. Поверхность контакта между клетками и материалом является репрезентативным показателем сродства клеток к данному биоматериалу.

20 В первом аспекте настоящее изобретение относится к биосовместимым трехмерным матрицам со структурированной пористостью, образованным из пористого монетита, здесь и далее матрицам по изобретению, включающим трехмерные матрицы из монетита со структурированной пористостью, соответствующей цилиндрическим макропорам диаметром 350-650 мкм, равномерно
25 расположенным на расстоянии друг от друга 0,4-0,6 мм. Указанный монетит имеет присущую этому материалу пористость, на которой создана указанная структурированная макропористость.

В матрицах по изобретению указанная структурированная пористость
30 распределена в максимальной области матрицы, позволяющей указанной матрице устойчиво сохранять свою механическую стабильность. В конкретном воплощении указанная максимальная область представляет собой область, оставшуюся после вычитания внешней периметрической области матрицы, составляющей от 0,1 до 0,9 мм в ширину, предпочтительно 0,5 мм в ширину.

35 Таким образом, материалы, которые используют в остеогенезе, должны имитировать морфологию, структуру и функцию кости, чтобы достичь надлежащей интеграции в принимающую ткань.

Было показано, что структура, определяемая пористостью и диаметром пор,
40 материалов, используемых при регенерации кости, влияет на образование кости как *in vitro*, так и *in vivo*. Поры необходимы для того, чтобы происходило образование костной ткани, поскольку они обеспечивают возможность миграции и пролиферации остеобластов и мезенхимальных клеток, а также васкуляризации. Таким образом, материал по изобретению обеспечивает условия, необходимые для
45 достижения надлежащей регенерации кости, благодаря своим характеристикам пористости, которые обеспечивают возможность заселения и пролиферации клеток того типа, который необходим для такого эффекта.

50 Результаты исследований *in vitro*, выполненных с использованием матриц из других материалов, показывают, что низкая пористость стимулирует остеогенез, поскольку происходит агрегирование клеток, которое подавляет пролиферацию, посредством чего стимулирует остеогенез. Аналогичные эксперименты показали, что высокая пористость не влияет на клеточную адгезию, но увеличивает

пролиферацию, поскольку происходит увеличение поверхности контакта и также облегчается транспорт кислорода и питательных веществ (Takahashi et al., 2004). Согласно этим результатам, размер пор не влияет на остеогенез, но он увеличивается при малом количестве пор.

К тому же, *in vivo*, интеграция и проникновение клеток в материал, так же как и их васкуляризация, требуются для этого материала, чтобы он был включен в ткань пациента. Высокая пористость и размер пор, такой как размеры, обеспечиваемые матрицами по изобретению, облегчают эти требования.

Вначале согласно первым исследованиям минимальным диаметром, требуемым для образования кости, считался диаметр примерно 100 мкм, чтобы происходила миграция клеток и транспортные процессы. Однако в настоящее время предлагают диаметры более 300 мкм, поскольку присутствие этих макропор увеличивает образование кости, благодаря тому факту, что они допускают образование в них капилляров. Васкуляризация влияет на развитие остеогенеза. Поры малых диаметров благоприятствуют гипоксическим условиям и вызывают не остеогенез, а хондрогенез.

Таким образом, длинные и большие поры туннельной формы матрицы по изобретению обеспечивают возможность васкуляризации и развития остеогенеза.

Более того, поры больших диаметров увеличивают поверхность контакта, что также увеличивает поверхность взаимодействия с принимающей тканью, что ускоряет деградацию, выполняемую макрофагами.

В случае аморфных матриц с геометрией статистической пористости, возможно формируемая сосудистая сеть является нерегулярной в структуре биоматериала и неспособна соединяться с сосудистой сетью кости, так что имплантат неспособен эффективно объединяться с тканью реципиента.

Однако в пористой структуре, принятой для матриц по настоящему изобретению, учитывают включение пор размера, подходящего для совместного существования требуемых разновидностей клеток и образования кости и сосудистого каркаса по всему имплантату, и кроме того, для обеспечения возможности соединения с реципиентной областью, так чтобы происходила интеграция ткани.

Новое конструктивное исполнение включает макропоры цилиндрической формы (туннельной формы) размером 350-650 мкм, полностью пересекающие структуру материала для подходящего заселения (в отношении различных типов клеток и достаточного количества каждого типа) клетками соседних тканей, так же как и объединение с реципиентной тканью. Более того, во всей структуре он включает сеть микропор для достаточной диффузии питательных веществ, газов и продуктов клеточного метаболизма.

Как можно видеть на Фиг.13, преимущество в отношении заселения клетками матриц по изобретению может быть показано при непосредственных исследованиях по наблюдению клеток при помощи сканирующего электронного микроскопа.

Однако, как показано на Фиг.14, аморфные биоматериалы, которые имеют не структурированное и предварительно не заданное распределение макропор, получаемые в способе получения цемента по настоящему изобретению, имеют поры, не связанные с внутренней структурой. Другими словами, количество макропор является недостаточным и их распределение непригодно для того, чтобы происходило подходящее заселение клетками, причем такие клетки по большей части относятся к поверхности материала.

Успех в процессе образования новой кости непосредственно связан с количеством

костеобразующих клеток, задействованных в процессе, от этого также зависит образование плотной сосудистой сети по всему биоматериалу. Таким образом, как показано на Фиг.14, матрицы из материала со структурированной пористостью по изобретению, которые имеют упорядоченное, созданное и предварительно

5 установленное пространственное распределение и пространственную конфигурацию макропор, обеспечивают возможность экстенсивного заселения клетками всего биоматериала, лучшей диффузии питательных веществ и сигнальных молекул, которые определяют поведение клеток.

10 Поэтому матрицы по изобретению, имеющие высокое процентное содержание пористости, особенно макропористости, где присутствуют поры больших диаметров (>300 мкм, более конкретно, от 350 до 650 мкм и предпочтительно 500 ± 60 мкм) и в форме непрерывных туннелей, повышают остеоинтеграцию имплантата после хирургического вмешательства.

15 Во втором аспекте настоящее изобретение относится к способу синтеза матриц по изобретению, включающему образование матрицы из монетита со структурированной пористостью посредством:

- формирования твердой фазы, соответствующей пористой матрице из брушита, путем совместного использования порообразующих агентов, замедлителя схватывания и механических способов во время реакции твердения между кислым фосфатом кальция и основным фосфатом кальция;

20

- смешивания твердой фазы с дистиллированной водой для получения жидкой фазы;

25 - введения в цемент, полученный на стадии 2, одной или более форм, одна из которых снабжена цилиндрическими зубцами, имеющими диаметр от 350 до 650 мкм, и более предпочтительно, 500 ± 60 мкм, во время твердения, чтобы создать в матрицах вертикальные цилиндрические поры диаметром от 350 до 650 мкм, и более предпочтительно, 500 ± 60 мкм, расположенными на расстоянии друг от друга 0,4-0,6 мм, и более предпочтительно, расположенными на расстоянии друг от друга $0,5\pm 60$ мкм;

30

- стерилизацию пористого брушита и превращение его при нагревании в пористый монетит.

35 Более конкретно, в используемом способе синтеза продукт, получаемый на стадии 1, образует твердую фазу, которую смешивают с дистиллированной водой с получением жидкой фазы. В предпочтительном воплощении изобретения предложено использовать бета-трикальцийфосфат в качестве основного фосфата кальция и монофосфат кальция в качестве кислого фосфата кальция.

40

Согласно изобретению для осуществления смешивания молярное отношение основного фосфата к кислому фосфату составляет 1,6-1,8 в течение периода времени приблизительно 10 мин, концентрация порообразующего агента составляет 1-20 масс. % и концентрация замедлителя схватывания составляет 0,4-0,6 масс. %;

45 предпочтительно молярное отношение основного фосфата к кислому фосфату составляет 1,785, концентрация порообразующего агента составляет 3-10 масс. % и концентрация замедлителя схватывания составляет 0,54 масс. %.

Молярное отношение основного фосфата к кислому фосфату для осуществления смешивания составляет 1,6-1,8, предпочтительно 1,785, в течение периода времени приблизительно 10 мин. Карбонат кальция добавляют в концентрации 1-20 масс. %, предпочтительно 3-10%. В качестве замедлителя реакции схватывания предложено использование пирофосфата натрия в количестве 0,4-0,6 масс. %,

50

предпочтительно 0,54%.

Полученную таким образом твердую фазу смешивают с жидкой фазой (дистиллированной водой) при отношении П/Ж (порошок/жидкость), равном 3.

5 Что касается кислого и основного фосфатов кальция, порообразующих агентов и замедлителей схватывания, специалисту в данной области техники известны другие возможные соединения и их сочетания, пригодные для использования.

10 Формы, обеспечивающие возможность получения матриц по изобретению, которые имеют структурированное распределение пор, указанное выше, заполняют полученной пастой.

15 Форма по изобретению, используемая для получения биоматериала, может представлять собой любую форму, имеющую цилиндрические зубцы, основание которых имеет диаметр от 350 до 650 мкм и которые находятся друг от друга на расстоянии от 0,4 до 0,6 мм. Указанная форма может быть выполнена из кремнийорганического материала, металла, стойкой пластмассы или любого типа материала, допускающего ее использование по назначению.

20 Форма может иметь требуемую конфигурацию, в зависимости от конфигурации и размеров, требуемых для восстановления конкретного дефекта кости каждого пациента, полученный биоматериал всегда сохраняет типичные характеристики пористости биоматериала по изобретению, т.е. цилиндрические макропоры диаметром от 350 мкм до 650 мкм, более предпочтительно диаметром 500 ± 60 мкм, равномерно расположенные на расстоянии друг от друга от 0,4 до 0,6 мм, более предпочтительно $0,5\pm 60$ мкм, в дополнение к собственной пористости биоматериала.

25 Указанные формы позволяют получать матрицы по изобретению, в которых структурированная пористость распределена в максимальной области матрицы, позволяющей указанной матрице устойчиво сохранять свою механическую стабильность.

30 В конкретном воплощении указанные формы позволяют получать матрицы, в которых максимальная область, на которой распределена структурированная пористость, представляет собой область, оставшуюся после вычитания внешней периметрической области матрицы от 0,1 до 0,9 мм в ширину, предпочтительно 0,5 мм в ширину.

35 Изобретение также предусматривает использование более чем одной формы:

- первой формы, которая позволяет получать матрицы из монетита требуемой формы, но без структурированной пористости;

40 - второй формы, которая на плоской поверхности снабжена цилиндрическими зубцами диаметром от 350 до 650 мкм, предпочтительно 500 ± 60 мкм и которые находятся на расстоянии друг от друга от 0,4 до 0,6 мм, предпочтительно 500 ± 60 мкм. Указанную вторую форму следует применять после удаления первой формы, вводя в нее части, полученные при помощи первой формы. Вторую форму покрывают крышкой, как показано на Фиг. 1с.

45 Таким образом, биоматериал по изобретению может быть представлен в форме гранул, листов, цилиндров и т.д., и в любой другой форме, которая пригодная для восстановления конкретного дефекта кости пациента.

50 В предпочтительном аспекте изобретения форма имеет конфигурацию гранулы или цилиндра диаметром от 2 до 50 мм, предпочтительно от 2 до 15 мм и высотой от 1 до 50 мм, предпочтительно от 1 до 5 мм и более предпочтительно;

- диаметром 10 мм и высотой от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм, снабженная 64 зубцами;

- диаметром 8 мм и высотой от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм, снабженная 39 зубцами, или

- диаметром 7 мм и высотой от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм, снабженная 28 зубцами, или

5 - диаметром 5 мм и высотой 3 мм, снабженная 12 зубцами.

Во всех случаях зубцы являются цилиндрическими, диаметром $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, находятся друг от друга на расстоянии $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$ и распределены относительно периметрической области 5 мм (взятой от края гранулы), не

10 содержащей зубцов.

Через минуту после начала твердения цемента его помещают приблизительно на 30 минут в форму; перед тем как закончится его затвердевание его удаляют, формируются поры, определенные формой. Как только он полностью затвердевает, сформированную матрицу брушита помещают в автоклав при температуре от 120

15 до 130°C на 24-25 мин, при этом происходит ее превращение в монетит, полностью стерилизованный и готовый к применению.

В другом предпочтительном аспекте изобретения первая форма выполнена из кремнийорганического полимера и имеет цилиндрические полости для гранул или

20 цилиндров, имеющие такие же размеры, как размер изготавливаемых матриц по изобретению. В конкретном воплощении изобретения указанные полости имеют диаметр от 2 до 50 мм, предпочтительно от 2 до 15 мм и высоту от 1 до 50 мм, предпочтительно от 1 до 5 мм и более предпочтительно:

- диаметр 10 мм и высоту от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм;

25 - диаметр 8 мм и высоту от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм;

- диаметр 7 мм и высоту от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм;

- диаметр 5 мм и высоту 3 мм.

Указанные формы не предусмотрены для образования макропор. В этом аспекте

30 изобретения вторая форма является металлической, она имеет размеры каждой из указанных выше деталей и в основании она снабжена однородно распределенными цилиндрическими зубцами размером $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, находящимися друг от друга на расстоянии $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, которые приводят к возникновению макропористого компонента матрицы монетита, и они распределены относительно

35 минимальной периметрической области 0,5 мм (взятой от края гранулы), не содержащей зубцов. В конкретном воплощении указанные металлические формы имеют диаметр от 2 до 50 мм, предпочтительно от 2 до 15 мм и высоту от 1 до 50 мм, предпочтительно от 1 до 5 мм и более предпочтительно:

40 - диаметр 10 мм и высоту от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм и 64 зубца, или

- диаметр 8 мм и высоту от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм и 39 зубцов, или

- диаметр 7 мм и высоту от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм и 28 зубцов, или

- диаметр 5 мм и высоту 3 мм и 12 зубцов,

во всех случаях относительно минимальной периметрической области 0,5 мм

45 (взятой от края цилиндра), не содержащей зубцов.

В этом случае способ является таким же, как описанный выше, с той разницей, что сразу после смешивания твердой фазы и жидкой фазы заполняют первую кремнийорганическую форму. Перед тем, как закончится твердение биоматериала,

50 детали удаляют из кремнийорганической формы. Детали впоследствии вводят в металлическую форму с зубцами (покрытую металлической крышкой согласно Фиг.1с), и выдерживают до окончания твердения на водяной бане при 37°C в течение 30 минут. После затвердевания их извлекают из металлической формы,

получая цилиндрические детали с определенной пористостью. Сформированные матрицы помещают в автоклав при температуре от 120 до 130°C на 24-25 мин; происходит их превращение в монетит, полностью стерилизованный и готовый к применению. Применение этих форм приводит к получению гранул монетита со структурированной пористостью. В конкретном воплощении указанные гранулы имеют диаметр от 2 до 50 мм, предпочтительно от 2 до 15 мм и высоту от 1 до 50 мм, предпочтительно от 1 до 5 мм и более предпочтительно:

- диаметр 10 мм и высоту от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм, и при этом характеризуются равномерным распределением 64 макропор диаметром 500 мкм \pm 60 мкм, находящихся друг от друга на расстоянии 500 мкм \pm 60 мкм;

- диаметр 8 мм и высоту от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм и 39 макропор диаметром 500 мкм \pm 60 мкм, находящихся друг от друга на расстоянии 500 мкм \pm 60 мкм;

- диаметр 7 мм и высоту от 3 до 5 мм, предпочтительно 3 или 5 мм и 28 макропор диаметром 500 мкм \pm 60 мкм, находящихся друг от друга на расстоянии 500 мкм \pm 60 мкм;

- диаметр 0,5 мм и высоту 0,3 мм, и 12 макропор диаметром 500 мкм \pm 60 мкм, находящихся друг от друга на расстоянии 500 мкм \pm 60 мкм.

Во всех случаях гранулы монетита имеют минимальную периметрическую область 0,5 мм (взятую от края гранулы), не содержащую макропор, которая позволяет удовлетворять условиям механической стабильности и прочности, необходимых для использования в предназначенной для них области применения.

Таким образом, конечное распределение макропор в указанных гранулах относится как к минимальной периметрической области 0,5 мм, не содержащей макропор, так и к размеру и расстоянию между порами (как указано выше).

Продукты по настоящему изобретению применимы в области тканевой инженерии и регенерации кости. Таким образом, матрицы из монетита по изобретению, полученные посредством определенных форм, применимы для удерживания и роста клеток, и для областей применения, определенных выше.

В конкретном воплощении гранулы по изобретению применяют в форме нескольких блоков (в виде сборки деталей), скомпонованных таким образом, что они полностью подогаданы к пространству дефекта кости, облегчая однородное поступление питательных веществ, газов и клеток во всю восстанавливаемую область, облегчая ее излечение и предотвращая возникновение некротических областей.

В предпочтительном воплощении изобретение относится к применению матриц по изобретению в качестве подложки для роста мезенхимальных клеток различного происхождения, включая адипозное происхождение, остеобласты, эндотелиальные клетки и сочетания взрослых мезенхимальных стволовых клеток, недифференцированных или дифференцированных в остеобластический или эндотелиальный ряд, остеобласты, остеокласты, остециты из кости и эндотелиальные клетки, для их применения в регенерации кости.

Матрицы из монетита со структурированной пористостью по изобретению реабсорбируются *in vivo* за более длительный период времени и аналогично ДКФД, что предотвращает недостаток их трансформации в ГА (как показано на примере 10, в котором сравнивают матрицы со структурированной пористостью по изобретению с матрицами брушита, выполненными со структурированной пористостью матриц по настоящему изобретению). Таким образом, указанные матрицы постепенно

растворяются при физиологических рН в межклеточных тканях, окружающих имплантат, и фактические клетки, заселяющие их (эндотелиальные клетки, остеокласты, остеобласты, макрофаги...) ответственны за удаление или повторное использование их, как это происходит в кости. Более того, их сочетание с карбонатом кальция в способе их получения, предотвращает их трансформацию в ГАП.

Как это происходит в случае ДКФД, его реабсорбция начинается между 4-й и 8-й неделей, периодом времени, который подходит для того, чтобы близлежащие клетки заселили материал и были способны заменить реабсорбированный материал физиологическим костным матриксом. Эта способность к биодеградации адаптирована к тому, что происходит в организме, когда рост кости в дефекте может протекать в течение периода времени от 2 до 6 месяцев, в зависимости от типа кости от размера дефекта (Francone V. 2004).

Помимо способности к биодеградации, в исследовании матриц были учтены другие свойства, такие как шероховатость и текстура материала по изобретению. Так, согласно биологическим испытаниям, проведенным на матрицах из пористого монетита со структурированной макропористостью по изобретению, была показана адгезия к материалу более 95%, где клетки не изменяют своей морфологии при контакте с материалом и заселяют всю поверхность, сообщаясь между собой, как в любой функциональной ткани.

Следует принимать в расчет, что монетит может проявлять очень низкое сопротивление и упругость, по сравнению с трабекулярной костью (упругость 50-100 МПа и сжатие 5-10 МПа). Однако, практически невозможно достичь таких же механических свойств, как свойства кости. И было показано, что для материала достаточно достичь механических свойств, удовлетворительных для поддержки роста клеток, поскольку когда клетки заселяют материал, они образуют органическую фазу имплантата, и механические свойства улучшаются. Матрицы пористого монетита по изобретению удовлетворяют этому требованию.

Материал на основе монетита является реабсорбируемым, биоактивным и имеет характеристики, сходные с характеристиками кости. Этот материал обеспечивает возможность роста клеток как на своей поверхности, так и внутри него, и в случае костного дефекта он позволяет клеткам (эндотелиальным клеткам, остеобластам, остеокластам ...) образовать необходимый клеточный каркас, который соединяется со здоровой костью. Впоследствии монетит постепенно удаляется понемногу, не претерпевая трансформацию в гидроксиапатит, благодаря действию остеокластов, а остеобласты постепенно синтезируют новую минеральную фазу, которая постепенно замещает монетит, полностью устраняя первоначальный дефект.

Таким образом, первый объект изобретения относится к трехмерной матрице из монетита со структурированной пористостью, характеризующейся тем, что она имеет в своей структуре вертикальные цилиндрические макропоры диаметром от 350 до 650 мкм, которые пересекают матрицу в продольном направлении от одного конца к другому, причем они находятся друг от друга на расстоянии 0,4-0,6 мм. В конкретном воплощении диаметр макропор предпочтительно составляет 500 мкм \pm 60 мкм. В другом конкретном воплощении расстояние между макропорами предпочтительно составляет 500 мкм \pm 60 мкм.

Другой объект изобретения относится к матрице из монетита со структурированной пористостью, содержание монетита в которой составляет по меньшей мере 90%, предпочтительно 95% и более предпочтительно 100%.

Следующий объект изобретения относится к матрицам из монетита со структурной пористостью, характеризующимся тем, что их получают путем трансформации при нагревании материала предшественника. В конкретном воплощении указанный материал предшественника, который трансформируют при нагревании в монетит, состоит из смеси твердой фазы, образованной из основных фосфатов кальция, кислых фосфатов кальция, порообразующего агента и замедлителя схватывания, которую отверждают, добавляя дистиллированную воду. В другом конкретном воплощении молярное отношение основной фосфат/кислый фосфат составляет 1,6-1,8, концентрация порообразующего агента составляет 1-20 масс.%, концентрация замедлителя схватывания составляет от 0,4 до 0,6 масс.% и отношение П/Ж равно 3. В другом конкретном воплощении молярное отношение основного фосфата к кислому фосфату составляет 1,785, концентрация порообразующего агента составляет 3-10 масс.%, концентрация замедлителя схватывания составляет 0,54 масс.%. В другом конкретном воплощении кислый фосфат кальция представляет собой монокальцийфосфат, основной фосфат кальция представляет собой бета-трикальцийфосфат, порообразующий агент представляет собой карбонат кальция и замедлитель схватывания представляет собой пирофосфат натрия. В другом конкретном воплощении материал предшественника представляет собой брусилит.

Другой объект изобретения относится к трехмерным матрицам из монетита со структурированной пористостью по предшествующим пунктам, отличающимся тем, что им можно придать любую форму, требуемую для восстановления конкретного дефекта кости или ткани. В одном конкретном воплощении указанная матрица состоит из цилиндра с диаметром основания от 2 до 50 мм и с высотой от 1 до 50 мм. В другом конкретном воплощении указанный цилиндр имеет диаметр основания от 2 до 15 мм и высоту от 1 до 5 мм. В другом конкретном воплощении указанный цилиндр имеет минимальную периметрическую область, равную 0,5 мм, не содержащую макропор. В других конкретных воплощениях цилиндр имеет:

- диаметр 10 мм, высоту 5 мм и 64 цилиндрических макропоры с диаметром 500 мкм \pm 60 мкм, равномерно отстоящих друг от друга на 500 мкм \pm 60 мкм, которые продольно пересекают матрицу,
- диаметр 10 мм, высоту 3 мм и 64 цилиндрических макропор диаметром 500 мкм \pm 60 мкм, равномерно отстоящих друг от друга на 500 мкм \pm 60 мкм, которые продольно пересекают матрицу,
- диаметр 8 мм, высоту 5 мм и 39 цилиндрических макропор диаметром 500 мкм \pm 60 мкм, отстоящих друг от друга на 500 мкм \pm 60 мкм, которые продольно пересекают матрицу,
- диаметр 8 мм, высоту 3 мм и 39 макропор диаметром 500 мкм \pm 60 мкм, отстоящих друг от друга на 500 мкм \pm 60 мкм, которые продольно пересекают матрицу,
- диаметр 7 мм, высоту 5 мм и 28 макропор диаметром 500 мкм \pm 60 мкм, отстоящих друг от друга на 500 мкм \pm 60 мкм, которые продольно пересекают матрицу,
- диаметр 7 мм, высоту 3 мм и 28 макропор диаметром 500 мкм \pm 60 мкм, отстоящих друг от друга на 500 мкм \pm 60 мкм, которые продольно пересекают матрицу,
- диаметр 5 мм, высоту 3 мм и 12 макропор с диаметром 500 мкм \pm 60 мкм, отстоящих друг от друга на 500 мкм \pm 60 мкм, которые продольно пересекают

матрицу,

во всех этих цилиндрах, периметрическая область, которая не содержит макропор и составляет 0,5 мм от края указанного цилиндра по направлению к его центру.

Другой объект изобретения относится к форме для получения трехмерной матрицы по предшествующим объектам изобретения, отличающейся тем, что она имеет однородное распределение зубцов 350-650 мкм в диаметре, однородно отстоящих друг от друга на 0,4-0,6 мм. Указанная форма может быть выполнена из кремнийорганического полимера, металла, стойкой пластмассы или любого другого материала, обеспечивающего возможность его применения по назначению и способного принимать любую конфигурацию требуемого типа.

В конкретном воплощении форма выполнена в виде цилиндра с диаметром основания от 2 до 50 мм и высотой от 1 до 50 мм. В другом конкретном воплощении указанный цилиндр имеет диаметр основания от 2 до 15 мм и высоту от 1 до 5 мм. В других конкретных воплощениях указанный цилиндр имеет:

- диаметр 10 мм, высоту 5 мм и 64 цилиндрических зубца с диаметром основания $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно отстоящих друг от друга на $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$,

- диаметр 10 мм, высоту 3 мм и 64 цилиндрических зубца с диаметром основания $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно отстоящих друг от друга на $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$,

- диаметр 8 мм, высоту 5 мм и 39 цилиндрических зубцов с диаметром основания $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно отстоящих друг от друга на $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$,

- диаметр 8 мм, высоту 3 мм и 39 цилиндрических зубцов с диаметром основания $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно отстоящих друг от друга на $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$,

- диаметр 7 мм, высоту 5 мм и 28 цилиндрических зубцов с диаметром основания $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно отстоящих друг от друга на $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$,

- диаметр 7 мм, высоту 3 мм и 28 цилиндрических зубцов с диаметром основания $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно отстоящих друг от друга на $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$,

- диаметр 5 мм, высоту 3 мм и 12 цилиндрических зубцов с диаметром основания $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно отстоящих друг от друга на $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$,

распределенные во всех этих цилиндрах относительно периметрической области 0,5 мм в ширину, не содержащей зубцов, взятой от края цилиндра по направлению внутрь цилиндра.

Следующий объект изобретения относится к способу синтеза трехмерных матриц из монетита со структурированной пористостью, включающему стадии:

1) смешивание твердой фазы, образованной основными фосфатами кальция, кислыми фосфатами кальция, порообразующим агентом и замедлителем схватывания, которая затвердевает при добавлении дистиллированной воды, приводящей к образованию жидкой фазы;

2) заполнение по мере одной формы цементом в течение твердения для получения вертикальных цилиндрических макропор диаметром от 350 до 650 мкм, равномерно расположенных на расстоянии от 0,4 до 0,6 мм;

3) стерилизация образованного материала-предшественника и его термическое

превращение в монетит.

В одном конкретном воплощении на стадии 1 способа молярное отношение основной фосфат/кислый фосфат составляет 1,6-1,8, концентрация порообразующего агента составляет 1-20 масс.%, концентрация замедлителя схватывания составляет от 0,4 до 0,6 масс.% и отношение П/Ж равно 3. В другом конкретном воплощении молярное отношение основной фосфат/кислый фосфат составляет 1,785, концентрация порообразующего агента составляет 3-10 масс.% и концентрация замедлителя схватывания составляет 0,54 масс.%. В другом конкретном воплощении кислый фосфат кальция представляет собой монокальцийфосфат, основной фосфат кальция представляет собой бета-трикальцийфосфат, порообразующий агент представляет собой карбонат кальция и замедлитель схватывания представляет собой пирофосфат натрия. В другом конкретном воплощении продукт стадии 1 представляет собой брушит.

В другом конкретном воплощении на стадии 3 способа термическую стерилизацию выполняют путем обработки в автоклаве. В другом конкретном воплощении указанную обработку в автоклаве выполняют при 120-130°C в течение 24-25 мин.

В другом конкретном воплощении на стадии 2 способа используемая форма представляет собой форму, описанную в предшествующих объектах изобретения. В другом конкретном воплощении перед использованием указанных форм используют кремнийорганическую форму, которая выполнена в виде цилиндра с диаметром основания от 2 до 50 мм и высотой от 1 до 50 мм. В другом конкретном воплощении указанная кремнийорганическая форма имеет диаметр основания от 2 до 15 мм и высоту от 1 до 5 мм.

Другой объект изобретения представляет собой применение формы, описанной в предшествующих объектах изобретения, для получения фосфатов кальция, принимающих ее конфигурацию. В одном конкретном воплощении указанный фосфат кальция состоит из монетита.

Другой объект изобретения относится к применению трехмерных матриц монетита со структурированной пористостью в качестве подложки для клеточных культур.

Другой объект изобретения относится к трехмерным матрицам монетита со структурированной пористостью, отличающимся тем, что они дополнительно включают клетки. В конкретном воплощении указанные клетки представляют собой мезенхимальные клетки, остеобласты, остеокласты, остециты, эндотелиальные клетки или их сочетания.

Другой объект изобретения относится к применению трехмерных матриц монетита со структурированной пористостью, как содержащих, так и не содержащих клетки, для приготовления терапевтического агента для регенерации структуры кости. В конкретном воплощении указанную регенерацию структуры кости выполняют для противодействия остеопорозу.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1: а) Металлические детали, зафиксированные в стеклянной пластине такого же размера, как и цилиндры из монетита, которые необходимо синтезировать. б) Кремнийорганические формы, полученные из деталей Фиг.1а), с полостями размером, равным размеру деталей, которые необходимо изготовить, не учитывая момент образования макропор. с) Металлическая форма с металлическими зубцами, которые приводят к регулируемой и однородной макропористости в матрице из

монетита.

Фиг.2: Конструкция образца формы, используемой для получения матрицы из монетита с однородным распределением вертикальных пор 500 ± 60 мкм в диаметре, расположенных регулярно и воспроизводимым образом.

Фиг.3: Фотография одной из форм матрицы из пористого монетита, показанная в вертикальной проекции (а) и в боковой проекции (b). На этом изображении показаны цилиндрические поры равного размера, регулярно распределенные по структуре матрицы, и как эти поры полностью пронизывают структуру.

Фиг.4: Конкретные воплощения мономеров/гранул по изобретению и их размеры, а) гранула 5 мм в диаметре (ф) и 3 мм в высоту (h) с 12 макропорами 0,5 мм в диаметре (ф.м), отстоящими друг от друга на 0,5 мм (d.м), b) гранула 10 мм в диаметре (ф) и 3 или 5 мм в высоту (h) с 64 макропорами 0,5 мм в диаметре (ф.м), отстоящими друг от друга на 0,5 мм (d.м), c) гранула 8 мм в диаметре (ф) и 3 или 5 мм в высоту (h) с 39 макропорами 0,5 мм в диаметре (ф.м), отстоящими друг от друга на 0,5 мм (d.м) и d) гранула 7 мм в диаметре (ф) и 3 или 5 мм в высоту (h) с 28 макропорами 0,5 мм в диаметре (ф.м), отстоящими друг от друга на 0,5 мм (d.м). Все они расположены относительно периметрической области 0,5 мм в ширину, не содержащей макропор.

Фиг.5: Картина рентгеновской дифракции на предшественнике, пористом брусците (до термической обработки), и пористом монетите (после термической обработки), полученном после процесса трансформации и стерилизации материала. 3 наивысших пика, появляющихся на графике рентгеновской дифракции, характеризуют, в случае верхнего графика (а), брусцит и на нижнем графике (b) являются типичными для монетита. Структурный анализ образцов (анализ Ритвелда (Rietveld)) после стерилизации в автоклаве показывает, что материал в основном состоит из $95\pm 5\%$ монетита и остаток представляет собой β -трикальцийфосфат (также называемый β -ТКФ). Для установления состава материала, дифракционную диаграмму биоматериала сравнивали с модельными диаграммами брусцита (ICSD 016132) и монетита (ICSD 38128).

Фиг.6: Фронтальное (а) и боковое (b) изображения матрицы из аморфного монетита, т.е. без структурированной пористости. Наблюдаемая пористость присуща способу его получения, большая часть пористости биоматериала образована микропорами, в которых нельзя осуществить заселение клетками, (с) Изображение конструкции матрицы из монетита по изобретению с характерными размерами пор примерно 500 мкм, распределенными в структуре биоматериала.

Фиг.7: Изображения сканирующей электронной микроскопии при различных увеличениях биоматериала монетита без регулируемой пористости. На этих изображениях показан биоматериал, который является по существу микропористым (с) и имеет минимальное количество некоторых макропор (b), расположенных случайным образом, подобно полостям, которые никоим образом не пересекают матрицу (а, b).

Фиг.8: Изображение сканирующей электронной микроскопии, на котором показан биоматериал монетита по изобретению с порами 500 мкм, распределенными по матрице.

Фиг.9: График изучения цитотоксичности биоматериала монетита по изобретению на клетках L929. Из МТТ-теста наблюдают, что не существует значительного отличия в пролиферации между теми клетками L929, которые находились в контакте с монетитом, и теми клетками, которые не контактировали с ним, что позволяет

заклучить, что монетит со структурированной пористостью по изобретению не является цитотоксичным.

5 Фиг.10: Изображения инвертированной фазово-контрастной микроскопии, полученные из исследования лимфомы мышей. В результате данного исследования показаны характерные изображения лунок, рассматриваемых как положительные, (a) и (b) (мутантные клетки, колония растет), или отрицательные, (c) и (a) (немутантные клетки, отсутствие колоний).

10 Фиг.11: Гистограмма частот мутаций монетита со структурированной пористостью по изобретению в присутствии (монетит +S9) и в отсутствие (монетит) метаболической активации. Сравнение указанных частот с отрицательным и положительным контролем, используемым в присутствии и в отсутствие метаболической активации, позволяет сделать вывод, что монетит со структурированной пористостью по изобретению не является мутагенным
15 материалом.

Фиг.12: Определение гемосовместимости биоматериала монетита по изобретению. Питательные среды остеобластов и ВМСК (взрослые мезенхимальные стволовые клетки), которые контактировали в течение 24 часов с монетитом по изобретению,
20 использовали для определения процента гемолиза в сравнении с положительным и отрицательным контролем. Из графика можно сделать вывод, что монетит по изобретению является гемосовместимым биоматериалом.

Фиг.13: Изображения сканирующей электронной микроскопии при различных
25 увеличениях матрицы из монетита со структурированной макропористостью по изобретению. Макропоры допускают заселение мезенхимальными стволовыми клетками поверхности биоматериала (a) и введение их через указанные макропоры (b, d). Продольное сечение макропоры показано на (c), (c) Клетки взаимодействуют друг с другом, выделяя нитевидные выросты цитоплазмы, такие как возникают в ткани на физиологическом уровне.
30

Фиг.14: Изображения сканирующей электронной микроскопии мезенхимальных
стволовых клеток, расположенных в биоматериале монетите с нерегулируемой пористостью. Можно видеть, что клетки расположены на поверхности матрицы и не способны заселять ее внутренние части, так как они имеют значительно больший
35 размер, чем характерные для биоматериала микропоры.

Фиг.15: Пролиферация мезенхимальных стволовых клеток, расположенных на
материале монетите с нерегулируемой пористостью (серый цвет) в сравнении с подобными клетками, расположенными на биоматериале монетите со структурированной пористостью по изобретению (черный цвет).
40

Фиг.16: Стрoение костной ткани: 1. Трубочатая кость. 2. Губчатая кость. 3. Гаверсова костная система. 4. Кровеносный сосуд. 5. Гаверсов канал. 6. Фолькманнов канал. 7. Периост. 8. Выстилающие клетки кости. 9. Сосуды периоста. 10. Остеокласты. 11. Остеобласты. 12. Остеоциты.
45

Фиг.17 и 18: Изображения сканирующей электронной микроскопии, которые показывают при увеличении $\times 40$ и при увеличении $\times 80$, как различные концентрации ВМСК, предварительно дифференцированных в кость, расположены на одной и той же поверхности биоматериала по изобретению. Фиг.17a и b относятся к биоматериалу без клеток. Фиг.17c-h относятся к различным используемым
50 концентрациям клеток от $0,5 \times 10^6$ до 2×10^6 клеток. Фиг.18a-h относятся к используемым концентрациям клеток от 3×10^6 до 6×10^6 клеток.

Фиг.19: Изображения конфокальной микроскопии клеток на (a) поверхности

биоматериала монетита со структурированной пористостью по изобретению и (b) внутри каналов макропор указанного биоматериала спустя несколько суток в культуре. На изображениях (b) показаны ядра предварительно дифференцированных ВМСК внутри пор биоматериала (реконструкцию поры во всей ее полноте 5 выполняют посредством монтажа набора изображений). Из этих изображений наблюдают, как увеличивается количество клеток на поверхности биоматериала, так же как и на стенках макропор при увеличении времени культивирования.

Фиг.20 и 21: Изображения азимутальной СЭМ при различных увеличениях 10 предварительно дифференцированных клеток ВМСК в биоматериале при различных временах ассоциации (1, 4, 7, 10 и 15 суток на поверхности биоматериала (Фиг.20a-e соответственно)) и внутри каналов макропор биоматериала (Фиг.21a-e соответственно).

Фиг.22 и 23: Анализ экспрессии генов, вовлеченных в остеогенез в ВМСК, таких 15 как остеоонектин (ОТН), остеокальцин (ОКА), остеопонтин (ОПН), коллаген типа-1 (Кол-1), ТФР- β 1 (бета-трансформирующий фактор роста) и щелочная фосфатаза (ЩФ), посредством ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой) в недифференцированных (Фиг.22) и предварительно 20 дифференцированных (Фиг.23) клетках ВМСК самих по себе и ассоциированных с биоматериалом в течение 4, 7, 10 и 15 суток. При рассмотрении гелей можно сделать вывод, что как в недифференцированных, так и в предварительно 25 дифференцированных клетках экспрессия генов, вовлеченных в остеогенез, является немодифицированной, и что они поэтому поддерживают свое функциональное состояние, нацеленное на образование клеток кости, способным к синтезу внеклеточной матрицы, которая замещает биоматериал, который постепенно разрушается, для восстановления дефекта кости.

Фиг.24: Изображения конфокальной микроскопии иммунного мечения. На Фиг.24 30 показаны наблюдения, которые необходимо выполнить при чтении каждой из следующих Фиг.25-31. Таким образом, как можно видеть, Фиг.24 поделена на 4 квадранта: верхний левый квадрант (i) относится к окрашиванию ядер клеток, верхний правый квадрант (ii) относится к мечению только белка, нижний левый 35 квадрант (iii) относится к двойному окрашиванию ядер клеток и белка и нижний правый квадрант (iv) относится к тройному окрашиванию, в котором наблюдают ядра клеток + белок + биоматериал. На Фиг.25-31 каждая из Фиг.a-f также подразделена на упоминавшиеся квадранты, показанную информацию необходимо интерпретировать в каждом из них.

Фиг.25, 26: Изображения конфокальной микроскопии иммунного мечения КОЛ-1 40 предварительно дифференцированных ВМСК на поверхности (вид сверху, Фиг.25) и внутри каналов (вид сбоку, Фиг.26) биоматериала при различных временах в культуре.

Фиг.27, 28: Изображения конфокальной микроскопии иммунного мечения 45 остеокальцина в предварительно дифференцированных ВМСК на поверхности (вид сверху, Фиг.27) и внутри каналов (вид сбоку, Фиг.28) биоматериала при различных временах в культуре.

Фиг.29, 30: Изображения конфокальной микроскопии иммунного мечения 50 остеопонтина в предварительно дифференцированных ВМСК на поверхности (вид сверху, Фиг.29) и внутри каналов (вид сбоку, Фиг.30) биоматериала при различных временах в культуре.

Фиг.31: Изображения конфокальной микроскопии иммунного мечения коллагена

5 типа-1, остеокальцина и остеопонтин в предварительно дифференцированных ВМСК, выращенных на поверхности биоматериала (вид сверху, Фиг.31а-с) и внутри каналов (вид сбоку, Фиг.31d-f) в течение 4 суток. Эти результаты показывают, что предварительно дифференцированные МСК, которые присутствуют в биоматериале, способны к синтезу и секреции белков, связанных с синтезом кости.

10 Фиг.32 и 33: Анализ с помощью СЭМ-РСРЭ (рентгеновская спектроскопия рассеивания энергии) существенных элементов биоматериала и ВМСК, ассоциированных с монетитом со структурированной пористостью по изобретению в течение 4 и 7 суток (Фиг.32) и 10 и 15 суток (Фиг.33). Изображения в левой колонке относятся к изолированным областям в центре каналов, на основе которых выполняли анализ элементов, присутствующих в клетках (изображения в правой колонке). На графиках показано распределение элементов, отличное от того, что обнаружено для биоматериала. Таким образом, существует увеличение синтеза 15 частиц (кальций, фосфор и кремнийорганический полимер) клетками в течение времени нахождения в ассоциации с биоматериалом со структурированной пористостью по изобретению. Поэтому делают вывод, что удовлетворяются условия, подходящие для образования солей кальция, необходимых для 20 формирования минеральной фазы кости.

Фиг.34: Изображение СЭМ-РСРЭ, на котором показано распределение основных элементов в области, в которой присутствуют только ВМСК. На изображениях кальция и фосфора можно видеть электронно-плотные частицы, образованные двумя элементами (они находятся в том же месте области).

25 Фиг.35: Секреция ТФР- β 1 (пг/мл), полученная из различных концентраций предварительно дифференцированных клеток, выращенных без монетита в течение 7 суток в культуре. Наблюдали постепенное увеличение концентрации ТФР- β 1 (пг/мл) для более низких концентраций клеток и небольшое уменьшение или дестабилизацию для более высоких концентраций клеток, обусловленное механизмом отрицательной 30 обратной связи для ТФР- β 1.

Фиг.36: Секреция ТФР- β 1 (пг/мл), полученная из предварительно дифференцированных клеток за время в культуре. 2×10^6 клеток высевали на поверхности 6 см^2 , секрецию анализировали при различных временах в культуре, 35 наблюдая типичное поведение или механизмы обратной связи, состоящие в увеличении синтеза и секреции, за которым следует уменьшение секреции до тех пор, пока не начнется новое увеличение секреции.

Фиг.37: Секреция ТФР- β 1 (пг/мл), полученная из различных концентраций 40 предварительно дифференцированных клеток, выращенных на биоматериале в течение 7 суток в культуре. Из этого графика можно наблюдать, как присутствие данного фактора в среде коррелирует с увеличением числа клеток в биоматериале.

Фиг.38: Секреция ТФР- β 1 (пг/мл), полученная из предварительно дифференцированных клеток, выращенных на биоматериале, за время в культуре. 45 2×10^6 клеток высевали на биоматериал, секрецию анализировали при различных временах в культуре. Из данного графика предполагают, что существует увеличение секреции с первых по десятые сутки в культуре, после чего она начинает стабилизироваться и постепенно понижаться.

50 ПРИМЕРЫ

Следующие примеры служат иллюстрацией, но не ограничивают настоящее изобретение.

Пример 1. Способ синтеза матриц по изобретению.

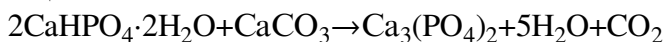
Для синтеза матриц по изобретению твердую фазу смешивают с дистиллированной водой двойной перегонки (жидкая фаза).

Твердая фаза включает, но не ограничивается этим, кислый фосфат кальция, основной фосфат кальция, порообразующий агент, такой как карбонат кальция, и замедлитель схватывания, такой как пирофосфат натрия.

1.1 Получение твердой фазы

Твердую фазу кальциевого цемента изготавливают из основного фосфата кальция и кислого фосфата кальция. Основной фосфат кальция представляет собой бета-трикальцийфосфат (β -ТКФ) и кислый фосфат кальция представляет собой монокальцийфосфат. Два компонента смешивают в молярном отношении 1,785 в ступке вручную в течение 10 минут. Карбонат кальция добавляют при концентрациях от 1 до 20% (масс/масс), предпочтительно от 3 до 10%. 0,54% (масс/масс) пирофосфата натрия используют в качестве замедлителя реакции схватывания.

Конкретно, для приготовления бета-трикальцийфосфата (β -ТКФ) 34,42 г ДКФД и 10,01 г КК (карбонат кальция) смешивают (в молярном отношении 2:1) в стеклянной ступке и гомогенизируют вручную в течение 15 минут. Смесь нагревают в печи (Veckstar) при 900°C в течение 14 часов. Синтез β -ТКФ протекает согласно реакции:



Порошок затем просеивают и используют порошок, имеющий размер частиц менее 322 мкм.

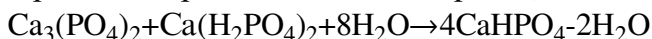
1.2. Получение жидкой фазы и синтез губок из монетита

Жидкую фазу образуют с помощью дистиллированной воды или дистиллированной воды двойной перегонки.

Твердую фазу, образуемую из 0,8 г безводного монокальцийфосфата, 1,4 г бета-трикальцийфосфата, 12 мг пирофосфата натрия и 110 мг карбоната, взвешивают и смешивают с 0,77 мл жидкой фазы в отношении П/Ж (порошок/жидкость), равным 3, в стеклянном блюде в течение 30 секунд.

1.3. Способ отверждения

Цемент отверждают в течение 30 минут на водяной бане при 37°C. Реакция отверждения протекает согласно реакции:



В течение реакции отверждения бикарбонат реагирует с ионами водорода среды, разлагаясь с образованием диоксида углерода, формируя полости и, таким образом, образуя губчатую матрицу брушита.

1.4. Способ промывки

Биоматериал затем промывают несколько раз дистиллированной водой, чтобы устранить остатки кислот в среде до достижения рН, близкого к 7, который является оптимальным для роста клеток, который осуществляют на последующих стадиях.

1.5. Способ преобразования брушита в монетит

После того как описанным выше способом получен отвержденный материал, его стерилизуют. Способ указанной стерилизации включает обработку в автоклаве отвержденного материала при температуре 120-130°C в течение 24-25 минут. В течение этого процесса брушит превращается в монетит.

Процесс преобразования брушита в монетит:



1.6. Способ синтеза матрицы из аморфного пористого монетита

После того как соединения смешаны, как описано выше (примеры 1.1 и 1.2),

полученный цемент, брушит, помещают на поверхность требуемой формы для твердения и его последующей стерилизации, получая таким образом аморфную матрицу с присутствием небольшого количества макропор и их нерегулярным распределением, как можно наблюдать на Фиг.6а и б.

1.7. Способ синтеза матрицы из монетита со структурированной пористостью

После получения цемента посредством способа, описанного в примерах 1.1 и 1.2, через одну минуту после начала твердения, кремнийорганическую форму, показанную на Фиг.2, накладывают на цемент на 30 секунд. После схватывания материала его стерилизуют, как описано выше (пример 1.5).

Использование различных форм позволяет получить материалы, имеющие цилиндрические поры со средним размером 500 ± 60 мкм, которые обеспечивают возможность сообщения микро- и макропор, полученных с помощью порообразующего агента.

На Фиг.3 показан пример матрицы из монетита со структурированной пористостью, полученной посредством способа, описанного в изобретении. В результате образования диоксида углерода в течение реакции отверждения, так же как и в результате применения описанной выше формы, полученный материал имеет вид губки с заданным распределением пор. Таким образом получают стерильный биоматериал монетит со структурированной пористостью, который можно использовать без дополнительных обработок в качестве матрицы для роста клеток.

На Фиг.5 показана дифрактограмма образцов до и после термической обработки в автоклаве. На Фиг.4 можно наблюдать, что помимо стерилизации материала термическая обработка вызывает преобразование кристаллической структуры из брушита в монетит.

Пример 2. Получение определенных гранул монетита со структурированной пористостью

В качестве примера и с целью получения цементов с оптимальными характеристиками порошок компонент, образованный из 0,8 г безводного монокальцийфосфата, 1,4 г бета-трикальцийфосфата, 12 мг пирофосфата натрия и 110 мг карбоната кальция, смешивали в течение 30 секунд с 0,77 мл воды. Через одну минуту после начала твердения описанные ниже формы накладывали на цемент на 30 секунд.

2.1. Использование одной формы в способе получения цилиндрических матриц из монетита со структурированной пористостью

Для конкретного исполнения этого примера использовали кремнийорганические формы со следующими размерами и числом зубцов:

- а) 1 см в диаметре, 5 мм или 3 мм в высоту и с 64 зубцами,
- б) 0,8 см в диаметре, 5 мм или 3 мм в высоту и с 39 зубцами,
- в) 0,7 см в диаметре, 5 мм или 3 мм в высоту и с 28 зубцами,
- г) 0,5 см в диаметре, 3 мм в высоту и с 12 зубцами.

Во всех формах зубцы являются цилиндрическими с диаметром $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, отстоящими друг от друга на $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$ и распределенными относительно периметрической области 0,5 мм (взятой от края по направлению внутрь формы), не содержащей зубцов. Структура указанных зубцов показана на Фиг.2.

В течение реакции отверждения, описанной в примере 1.7, бикарбонат реагирует с ионами водорода среды, разлагаясь с образованием диоксида углерода, формируя полости и, таким образом, образуя губчатую матрицу из брушита.

Биоматериал затем промывают несколько раз дистиллированной водой, чтобы

устранить остатки кислот в среде, до достижения рН, близкого к 7, которое является оптимальным для роста клеток.

Затем материал стерилизуют. При стерилизации в автоклаве при 1°C в течение 24 минут брушит превращается в монетит, образуя таким образом стерильный биоматериал монетит, который можно использовать без дополнительных обработок в качестве матрицы для роста клеток.

Таким образом, полученный материал состоит из определенных губчатых цилиндрических гранул, образованных биологической матрицей со структурированной пористостью по изобретению, имеющих размеры, указанные в каждом случае, с макропорами, однородно распределенными в указанных гранулах.

Применение каждой из указанных форм позволяет получить следующие матрицы с однородно распределенными цилиндрическими порами со средним размером пор 500 мкм ± 60 мкм, отстоящими друг от друга на 0,5 мм ± 60 мкм, что позволяет соединить микро- и макропоры, образованные порообразующим агентом:

а) цилиндрические гранулы 1 см в диаметре, 0,5 см или 0,3 см в высоту и с 64 макропорами (Фиг.4b),

б) цилиндрические гранулы 0,8 см в диаметре, 0,5 см или 0,3 см в высоту и с 39 макропорами (Фиг.4c),

в) цилиндрические гранулы 0,7 см в диаметре, 0,5 см или 0,3 см в высоту и с 28 макропорами (Фиг.4d),

г) цилиндрические гранулы 0,5 см в диаметре, 0,3 см в высоту и с 12 макропорами (Фиг.4a).

Как показано на Фиг.4, эти полученные гранулы из монетита по изобретению имеют периметрическую область 0,5 мм (взятую от края гранулы по направлению к ее внутренней части), не содержащую макропор, что обеспечивает для них возможность поддержания условий механической устойчивости и прочности, необходимых для использования в их применениях.

2.2. Использование двух форм в способе получения цилиндрических матриц из монетита со структурированной пористостью

Для конкретного выполнения этого примера использовали два типа форм - одну, изготовленную из кремнийорганического полимера (Фиг.1b) и другую, изготовленную из металла (Фиг.1c).

Кремнийорганическую форму используют для получения цилиндров из монетита подходящего размера (без вмешательства на этой фазе в образование макропористости).

Для синтеза кремнийорганической формы, цилиндрические детали такого же размера, как требуемые для изготовления детали из монетита (Фиг.1a), сперва фиксировали в стеклянной пластине.

Затем добавляли жидкий кремнийорганический полимер на стеклянную пластину с металлическими деталями и дожидались его полимеризации. После полимеризации его извлекали из стеклянной пластины. Полученные кремнийорганические формы имеют цилиндрические полости с размером, совпадающим с размером требуемых для изготовления деталей из монетита (Фиг.1b). Указанные кремнийорганические формы с полостями необходимого размера для деталей, которые необходимо изготовить, не имеют зубцов и поэтому еще не предполагают образования макропор.

Было получено 7 различных кремнийорганических форм, имеющих цилиндрические полости следующих размеров:

- диаметр 10 мм и высоту 5 мм или 3 мм,

- диаметр 8 мм и высоту 5 мм или 3 мм,
- диаметр 7 мм и высоту 3 мм или 5 мм,
- диаметр 5 мм и высоту 3 мм.

5 Помимо этого были изготовлены металлические формы с размерами, совпадающими с размером каждой детали из монетита, полученной с использованием каждой из обозначенных кремнийорганических форм. Указанные металлические формы изготавливают из двух частей, первая часть снабжена зубцами, обеспечивающими воспроизводимую макропористую составляющую, и крышки (Фиг.1с). Конкретно, размеры изготовленных металлических форм были следующими:

- а) 1 см в диаметре, 0,5 см или 0,3 см в высоту и с 64 зубцами,
- б) 0,8 см в диаметре, 0,5 см или 0,3 см в высоту и с 39 зубцами,
- в) 0,7 см в диаметре, 0,5 см или 0,3 см в высоту и с 28 зубцами,
- 15 г) 0,5 см в диаметре, 0,3 см в высоту и с 12 зубцами.

Во всех формах зубцы являются цилиндрическими с диаметром $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, отстоящими друг от друга на $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$ и распределенными относительно периметрической области 0,5 мм, не содержащей зубцов (взятой от края по направлению внутрь формы).

После того как были изготовлены формы, детали из монетита получали согласно следующему способу:

- во-первых, кремнийорганические формы заполняли продуктом, который сразу же образовывался при смешении твердой фазы и жидкой фазы.
- 25 - во-вторых, до того как заканчивалось твердение биоматериала, детали извлекали из кремнийорганической формы. Это просто, так как форма подобна очень гибкой резине.
- в-третьих, детали помещали в металлическую форму с зубцами и закрывали сверху. Указанную форму помещали на водяную баню при 37°C на 30 минут до окончания твердения.
- 30 - после полного отверждения их извлекали из металлической формы, получая цилиндрические детали с требуемой пористостью.

Полученные матрицы подвергали обработке в автоклаве при температуре от 120°C до 130°C в течение 24-25 минут, при этом происходило их превращение в монетит, полностью стерилизованный и пригодный для применения.

Полученные детали обладают такой же пористостью и размерами, как и детали, полученные в примере 1а (Фиг.4).

40 Пример 3. Сравнительные исследования матриц из монетита со структурированной пористостью и матриц из аморфного монетита

3.1. Исследования на микроскопическом уровне

Затем выполняли сравнительный анализ микроскопической структуры аморфных матриц и матриц со структурированной пористостью по изобретению. Для выполнения указанного анализа использовали технологии сканирующей электронной микроскопии посредством способов, известных специалисту в данном уровне техники.

Микроскопическая структура матрицы из аморфного пористого монетита

50 Биоматериал, обеспеченный в форме аморфной матрицы (Фиг.6а, б), получен с нерегулированной пористостью. Другими словами, он показывает нерегулярное распределение макропор, образованных в способе получения цемента, описанном в Примерах 1.1-1-6. Макропоры аморфной матрицы представляют собой полости в

биоматериале и не соединяются с внутренней структурой (Фиг.7).

Что касается количества и распределения макропор, наблюдают их ограниченность. Присутствие макропор минимальное и они распределены случайным образом (Фиг.7).

5 Таким образом, эти структуры не являются благоприятными для надлежащей регенерации кости, поскольку они не обеспечивают условия, необходимые для надлежащего заселения и пролиферации клеток.

10 Микроскопическая структура матрицы из структурированного пористого монетита

В отличие от этого, на Фиг.6с и 8 показана матрица из монетита со структурированными макропорами. На изображении, полученном с помощью сканирующей микроскопии (Фиг.8), видно однородное распределение макропор.

15 В отличие от предыдущей структуры, матрица из монетита со структурированной пористостью благоприятствует надлежащей регенерации кости, поскольку она обеспечивает условия, подходящие для надлежащего заселения и пролиферации клеток.

3.2. Сравнительное исследование *in vivo*

20 Одним из наиболее значимых аспектов при конструировании биоматериала для стимулирования регенерации кости является разработка структуры, имеющей пористость, подходящую для заселения клетками и диффузии газов и питательных веществ. В частности, макропоры (от 100 до 500 мкм) позволяют обеспечить оптимальную среду для всеобъемлющего заселения клетками, поступающими в матрицу, а также для неоваскуляризации и миграции остеобластов и остеокластов в зоне имплантата, и для гомогенного образования новой кости во всей обеспеченной структуре.

30 Биоматериал со структурированной пористостью, разработанный в настоящем изобретении, имеет характеристическую макропористую структуру, которая дает возможность полного и гомогенного распределения остеогенных клеток, обеспечиваемых в матрице, и более того, поступления клеток реципиентной ткани, которые заселяют и интегрируют новую структуру, чтобы начать процесс ресорбции этого материала, а также сформировать новый костный матрикс, который постепенно осаждается на имплантат, что приводит к образованию новой кости с механическими и физиологическими характеристиками, очень сходными с характеристиками первоначальной ткани.

40 Для определения преимущества, обеспечиваемого конструктивным исполнением, разработанным в этой работе, по сравнению с неструктурированной пористостью макропор, было проведено сравнительное исследование способности к регенерации кости биоматериалов монетита без структурирования макропористости и со структурированием макропористости.

45 Для этого использовали овец, у которых создавали критический дефект в большой берцовой кости и выполняли стабилизацию с помощью технологий остеосинтеза. Трех овцам в созданный дефект устанавливали биоматериал - неструктурированный монетит, а структурированный материал устанавливали трем другим овцам, оставляя у всех из них соседнюю ногу в качестве контрольной (с образованием критического дефекта и стабилизацией перелома, но без внедрения биоматериала). Перед имплантацией биоматериалов, в них высевали одинаковое количество мезенхимальных стволовых клеток из адипозной ткани, полученной от овцы.

50 Для определения формирования новой кости осуществляли непрерывный

радиографический контроль и гистологическое исследование через 3 и 6 месяцев после имплантации. Результаты показывают явное преимущество биоматериала с макропористостью, по сравнению с биоматериалом, не имеющим макропористости. Через 3 месяца после имплантации можно было наблюдать большее заселение 5 остеобластов и остеокластов кости по всей структуре макропористого биоматериала и однородное образование новой кости. Через 6 месяцев наблюдали полную интеграцию макропористого материала с конструкцией по изобретению, при образовании новой васкуляризации, которые обеспечивали возможность создания 10 стабильной кости при диффузии питательных веществ и кислорода во всей ее целостности и без образования некротических областей. Однако, когда биоматериал не имел структурирования макропор, наблюдают образование новой костной ткани, ограниченное периферической областью имплантата, при этом остальная часть матрицы остается незаселенной клетками, либо заселенной предварительно 15 высеянными клетками или клетками реципиентной ткани, и более того, образование новой васкуляризации не вызывается.

Эти результаты позволяют сделать заключение, что макропористый монетит имеет очевидные преимущества в отношении формирования новой кости, благодаря 20 обеспечению заселения всей структуры матрицы клетками зоны имплантации, что приводит к ресорбции, образованию костного матрикса и стимуляции новой васкуляризации, однородным образом.

Пример 4. Исследование биосовместимости *in vitro*

Перед соединением с клетками материала из монетита со структурированной 25 пористостью по изобретению, необходимо показать, что указанный материал является биосовместимым.

Исследования *in vitro* проводили в отношении цитотоксичности, генотоксичности (мутагенности) и гемосовместимости, учитывая то, что биоматериал из монетита со 30 структурированной пористостью по изобретению можно рассматривать как пригодный к имплантации продукт, который будет находиться в постоянном контакте с костью, причем длительность контакта превышает 30 суток.

4.1. Цитотоксичность

Используя технологию клеточных культур, при помощи этих исследований 35 определяли лизис клеток (гибель клеток), ингибирование клеточного роста и другие эффекты, оказываемые на клетки лечебными продуктами, материалами и/или их экстрактами.

Посредством этого исследования определяли, является ли исследуемый материал, 40 монетит со структурированной пористостью, токсичным для клеток, воздействует ли на их пролиферацию и выживаемость.

Анализируемый материал представлял собой матрицу из монетита со структурированной пористостью, полученную в примере 1, имеющую диаметр 1 см, 45 высоту 5 мм и 64 макропоры, с использованием поливинилхлорида (ПВХ) в качестве положительного контроля и полиэтилена высокой плотности в качестве отрицательного контроля.

В отношении условий экстрагирования, поскольку толщина материалов составляла $>0,5$ мм, 3 см^2 материала приводили в контакт с 1 мл среды культурны, 50 действующей как экстрагирующий агент.

Клеточная линия, используемая для испытания цитотоксичности материала представляла собой линию L929 фибробласта мышей, выращенную в культурной среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM) с 10% фетальной

бычьей сывороткой.

Цитотоксичность и пролиферацию монетита со структурированной пористостью определяли посредством МТТ-теста. Этот анализ основан на метаболическом восстановлении 3,4,5-диметилтиазол-2-ил-диметилтетразолий бромид (МТТ-реагента) митохондриальным ферментом сукцинатом дегидрогеназы до окрашенного соединения (формаза) и определяет митохондриальную функциональную способность клеток, которые находились в контакте с монетитом по изобретению, согласно установленным положительному контролю и отрицательному контролю. Таким образом, количество живых клеток в культуре пропорционально количеству полученного формаза, и следовательно, количеству поглощения, регистрируемому посредством спектрофотометра.

Промышленный цитотоксичный стандартный биоматериал использовали в качестве положительного контроля, а полиэтилен высокой плотности и викрил, также выпускаемый в промышленности, использовали в качестве отрицательного контроля. Графическое представление кривых пролиферации, полученных для клеток L929 в каждом случае, показано на Фиг.9.

Полученные результаты не показывают значительной разницы между пролиферацией клеток L929 в структурированном монетите по изобретению и в отрицательном контроле, демонстрируя что матрица из монетита со структурированной пористостью по изобретению не является цитотоксичным биоматериалом.

4.2. Мутагенность

В исследованиях генотоксичности клеточные культуры млекопитающих или не млекопитающих, или другие технологии используют для определения генных мутаций, изменений в структуре или в числе хромосом и других ДНК или генных изменений, вызванных токсичностью лечебных продуктов, материалов и/или их экстрактов.

Мутагенный потенциал *in vitro* монетита со структурированной пористостью по изобретению определяли посредством исследования, называемого «Анализ лимфомы мышей». Указанный анализ основан на количественном определении мутаций в гене тимидинкиназы в клетках лимфомы мышей L5178ТК+/-, вызываемых или не вызываемых после обработки этих клеток биоматериалом из монетита со структурированной пористостью. Клетки, лишённые гена тимидинкиназы (ТК) из-за мутаций ТК-/-, невосприимчивы к цитотоксическим эффектам трифтортимидина (ТФТ). Клетки, способные к производству ТК, являются чувствительными к ТФТ, который замедляет метаболизм и прекращает клеточное деление. Следовательно, мутантные клетки способны к пролиферации в присутствии ТФТ, тогда как нормальные клетки, содержащие по меньшей мере один аллель гена ТК, неспособны к этому. Исследование выполняли в пластинах с 96 лунками, и конечный результат получали после визуального подсчета положительных лунок (Фиг.10а и b, где наблюдают рост колонии клеток) и отрицательных лунок (Фиг.10с и d, где не наблюдают никакого роста). После подсчета положительных и отрицательных лунок в каждой пластине с 96 лунками, применяют ряд формул, установленных для исследования, и результаты выражают в показателях частоты мутаций.

Для выполнения исследования клетки подвергают воздействию испытываемого продукта в присутствии и отсутствие подходящей системы метаболической активации, с учетом того, что иногда может происходить так, что испытываемый продукт не является мутагенным, но метаболиты, образующиеся *in vivo* из этого

продукта, являются мутагенными.

Система, наиболее широко используемая для стимулирования печеночного метаболизма *in vitro*, представляет собой пост-митохондриальную фракцию, называемую S9, к которой добавляют кофакторы и которая получена из печени крыс, обработанной индукторами ферментов, такими как Aroclor 1254. Таким образом, перед обработкой клеток, испытываемый продукт обрабатывают в течение 2 ч смесями, называемыми S9, и по истечении указанного времени клетки обрабатывают надосадочной жидкостью, полученной из этих смесей после их центрифугирования.

Следующие продукты использовали для обработки клеток:

- в качестве положительного контроля:

метилметансульфонат (ММС), в отсутствие метаболической активации; 3-метилхолантрен (3-МХА), в присутствии метаболической активации;

- в качестве отрицательного контроля:

среда из клеток L5178YTK+/-, выращиваемых в течение 24 ч;

среда из клеток L5178YTK+/-, в присутствии метаболической активации, выращиваемых в течение 24 ч;

- в качестве испытываемого продукта:

среда из клеток L5178YTK+/-, выращиваемых в течение 24 ч, с биоматериалом монетитом;

среда из клеток L5178YTK+/-, выращиваемых в течение 24 ч, с биоматериалом монетитом, в присутствии метаболической активации.

Полученные результаты (показанные на Фиг.11) демонстрируют, что как в присутствии, так и в отсутствие метаболической активации наблюдают, что образцы, используемые в эксперименте в качестве негативного контроля, приводили к низкой частоте мутаций, схожей с такой частотой для клеток, которые выращивали в присутствии монетита со структурированной пористостью. Существование мутированных клеток, выращенных в их культурной среде, связано с высокой спонтанной частотой мутаций этих клеток, таким образом, эта частота мутаций устанавливается в качестве основы. В отношении образцов, используемых в качестве положительного контроля, частота мутаций, вызываемая в клетках L5178YTK+/- явно выше (примерно в 7 раз выше во всех случаях), чем частота, вызываемая монетитом или культурной средой. Эти результаты демонстрируют, что монетит не является мутагенным биоматериалом.

4.3. Гемосовместимость

С помощью этих исследований оценивают эффекты, оказываемые на кровь или ее компоненты лечебными продуктами или материалами, которые контактируют с кровью, используя подходящую модель или систему. Исследование гемолиза определяет степень лизиса красных кровяных клеток и выделение гемоглобина, вызываемые лечебными продуктами, материалами и/или их экстрактами *in vitro*.

Гемосовместимость монетита со структурированной пористостью по изобретению определяли посредством колориметрического анализа для определения общего количества гемоглобина в крови и гемоглобина, выделяемого в плазму, когда кровь приводят в контакт с монетитом. С учетом того, что биоматериалы находятся в твердой фазе, испытывали культурные среды клеток (остеобластов и ВМСК), которые находились в контакте с монетитом в течение 24 часов. Результаты показывают, что коэффициент вариаций калибровки, образца и линий контроля качества (%CV - коэффициента вариации) составляет $\leq 20\%$ во всех

случаях (за исключением случая калибровочного стандарта б) и 2/3 значений линии контроля качества имели расхождение в процентах по отношению к теоретическому значению (%ПВДФ) $\leq 20\%$, следовательно, результаты исследования попадают под установленные приемлемые критерии.

Проценты гемолиза для используемых соединений представлены ниже, принимая значение концентрации гемоглобина 10,19 мг/мл крови, используемой в качестве 100% гемолиза.

Соединение	Процент гемолиза
Положительный контроль: 1% Triton X-100	94
Отрицательный контроль: 40% полиэтиленгликоль	1,27
Среда кости	0
Среда ВМСК	0
Среда кости + структурированный монетит	0
Среда ВМСК + структурированный монетит	0

Эти результаты, показанные на Фиг.12, позволяют заключить, что монетит со структурированной пористостью по изобретению является гемосовместимым материалом.

Пример 5. Сравнительное исследование биологической активности матрицы из аморфного пористого монетита и матрицы из монетита со структурированной пористостью

Биологическая активность материала зависит как от его физико-химического состава, так и от его структуры.

Таким образом, в настоящем примере исследование выполняют для определения влияния использования указанной аморфной матрицы или матрицы со структурированной пористостью на способность к пролиферации мезенхимальных стволовых клеток, одного из типов клеток, участвующих в процессе регенерации кости совместно с остеобластами реципиентной ткани.

После получения описанной выше пористой биологической матрицы ее промывали культурной средой с рН 7,4 в течение одного или двух часов для гидратации и нейтрализации рН (изменяя культурную среду 2 или 3 раза). Взрослые, полученные из адипозной ткани, мезенхимальные стволовые клетки (ВТМК) непосредственно высевали на материал с концентрацией $0,5 \times 10^6$ - 6×10^6 клеток на кв. см. Спустя два часа после высевания культурную среду добавляли до тех пор, пока она не покрывала весь материал, возобновляя ее каждые двое или трое суток.

Клетки культивировали в биоматериале в течение 7 суток, после чего биологическую матрицу, к поверхности которой были прикреплены клетки, анализировали посредством сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), чтобы наблюдать адгезию и способность к заселению указанных клеток на пористом биоматериале монетите.

Изображения, полученные с использованием СЭМ (см. Фиг.13а и b), показывают, что мезенхимальные стволовые клетки способны очень хорошо прикрепляться к биоматериалу, принимая подходящую морфологию, и что они, к тому же, образуют межклеточные контакты, такие как возникают в ткани на физиологическом уровне (Фиг.13с и d). Как можно наблюдать на Фиг.13с и d, клетки великолепно распространяются по биологическому материалу, максимально взаимодействуя с ним, и выделяя нитевидные выросты цитоплазмы (филоподии), которые увеличивают поверхность контакта и увеличивают степень межклеточного контакта.

Биоматериал со структурированной пористостью обеспечивает большую

поверхность, к которой могут прикрепляться клетки, на которой они могут пролиферировать и начать выполнение своих функций в процессе регенерации кости. Другими словами, они могут начать создание нового костного матрикса, который замещает биоматериал, и выделять сигнальные молекулы, которые усиливают и направляют ремоделирование кости и неоваскуляризацию.

Наоборот, использование аморфной матрицы в качестве подложки для роста клеток показывает, что случайное распределение пор не подходит для того, чтобы происходило эффективное заселение клеток (Фиг. 14а и б), причем такие клетки по большей части ограничиваются поверхностью матрицы, так как они имеют значительно больший размер, чем характерная для биоматериала микропористость.

Результаты, как показано на Фиг. 15, демонстрируют, что большее число клеток насчитывается в матрице из монетита со структурированной пористостью. При 24 часах в культуре, клетки в матрице из монетита со структурированной пористостью пролиферируют в 1,5 раза больше по сравнению с клетками, которые находятся в матрице из аморфного монетита, причем пролиферация больше в 1,8 раза при 48 часах в культуре.

В матрице из аморфного монетита со временем клетки достигают величин пролиферации более низких, чем число клеток, установленных в момент времени 0 часов. Эти клетки не имеют пространства для распределения и заключены в макропорах, не имеющих непрерывности поверхности, что подавляет их пролиферацию, и они расположены только на поверхности материала без возможности заселения его внутренних частей, их можно только ввести в небольшое количество макропор, расположенных случайным образом. Эти макропоры имеют форму полостей, которые никоим образом не пронизывают всю структуру, что затрудняет их взаимодействие с окружающей тканью *in vivo* и подачу питательных веществ и кислорода во все клетки. Эти клетки могут быть распределены только по поверхности биоматериала. Из-за недостатка пространства эти клетки расположены компактно, что подавляет их пролиферацию, и большинство из них расположены только на поверхности материала.

Однако клетки, расположенные в матрице из монетита со структурированной пористостью, распределены по всем порам, внутри них и по поверхности материала, показывая большие значения роста, чем в момент времени 0 часов. Эти клетки не расположены компактно, так как они имеют большую поверхность контакта с материалом и поэтому их рост не подавлен.

Пример 6. Определение числа клеток, имплантируемых на поверхность матрицы
Не существует исследований, которые позволили бы стандартизировать или узнать оптимальное число клеток в этом типе биоматериалов, поэтому различные исследователи выполняют свои внедрения конкретно для достижения максимального клинического результата.

Для того чтобы регенерация кости была успешной, имплантат необходимо интегрировать в костную структуру организма. С этой целью клетки пациента (эндотелиальные клетки, остеобласты, остеокласты, макрофаги и т.д.) должны взаимодействовать с продуктом и заселять его, совместно с обеспеченными клетками. К тому же, необходимо количество клеток в продукте, достаточное для создания сильного трофического эффекта, который активизирует область и запускает процесс регенерации.

Для обеспечения совместного существования клеток пациента и продукта, сильного трофического эффекта продукта и однородного распределения клеток, а

также диффузии питательных веществ, газов и отходов метаболизма, биоматериал должен поставлять большое количество клеток, но указанные клетки не должны закупоривать пористую структуру биоматериала.

5 Более того, поставка клеток должна быть значительной, так как по мере того, как биоматериал постепенно разлагается, он должен быть заменен матриксом, синтезированным самими клетками.

В заключение, подходящее количество клеток является таким, чтобы они фактически занимали всю поверхность биоматериала, но не закупоривали пористую 10 структуру, по следующим причинам:

- достижение достаточного трофического эффекта для активации процесса регенерации кости;
- синтез внеклеточного матрикса, достаточного для замены биоматериала;
- обеспечение поступления и поселения клеток пациента, участвующих в 15 регенерации кости, включая эндотелиальные клетки, отвечающие за неоваскуляризацию.

Для определения количества клеток, которые нужно имплантировать на поверхность биоматериала, возрастающие концентрации клеток высевали на 20 биоматериале и наблюдали степень заселения структуры под СЭМ. Это исследование также позволяло определить, подходит ли используемая форма засева для того, чтобы распределение клеток было однородным.

Используемый способ заключался в засеивании дисков из монетита 1 см в диаметре, 0,5 см в высоту и с 64 макропорами диаметром 500 мкм возрастающими 25 концентрациями клеток, составляющими от полумиллиона клеток до 6 миллионов на биоматериале ($0,5 \times 10^6$ - 1×10^6 - 2×10^6 - 3×10^6 - 4×10^6 - 5×10^6 - 6×10^6). Клетки поддерживали в течение 8 суток в контакте с биоматериалом, чтобы обеспечить их адаптацию и поселение. Результаты анализировали путем СЭМ.

30 Изображения (Фиг.17 и 18) показывают, что по мере возрастания концентрации клеток степень заселения биоматериала монетита со структурированной пористостью по изобретению увеличивается, так как способность к адгезии биоматериала близка к 100%. Когда применяют наименьшую дозу, для поверхности биоматериала не наблюдают полного проникновения, но это явление становится 35 наблюдаемым после доз 2×10^6 и 3×10^6 клеток. Однако поры 500 мкм начинают закупориваться после высевания 4×10^6 клеток и при дозах 5×10^6 и 6×10^6 они полностью закрываются. Более того, заселенность внутренности пор биоматериала наблюдают уже после дозы 1×10^6 клеток, причем указанная заселенность 40 увеличивается с увеличением дозы клеток.

Согласно полученным результатам для используемых биоматериалов, у которых полная поверхность контакта составляет приблизительно 6 см^2 , значительное количество клеток должно составлять от 2 до 3 миллионов клеток, что дает в 45 результате от 300000 до 500000 клеток на 1 см^2 .

Пример 7. Анализ эволюции клеток в матрице. Анализ состояния клеток в матрице в зависимости от времени

После того как выбран диапазон клеточной дозы, подходящий для размещения в 50 биоматериале, изучали эволюцию во времени клеток в биоматериале со структурированной пористостью. С этой целью выполняли анализ поведения клеток *in vitro* в зависимости от времени.

7.1. Наблюдение с течением времени предварительно дифференцированных

клеток в матрице со структурированной пористостью

Чтобы иметь возможность наблюдать подходящим образом клетки в биоматериале со структурированной пористостью, выполняли непосредственное наблюдение посредством сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), и клетки дополнительно наблюдали с красителем Хехста для ядра клетки с помощью конфокальной микроскопии. Наблюдение посредством СЭМ предоставляет данные о сродстве и способности к взаимодействию клеток с биоматериалом через наблюдение поверхности контакта. Однако является возможным для обработки образцов для СЭМ исключить клетки из биоматериала, который можно рассмотреть посредством флуоресцентных технологий.

Выполняли следующие операции:

- высевание 300000 предварительно дифференцированных ВМСК на 1 см² биоматериала;

- выполнение обработки для СЭМ или окрашивание ядра клетки красителем Хехста и наблюдение посредством конфокальной микроскопии;

- анализ распределения и степени взаимодействия клеток в биоматериале через 1, 4, 7, 10 и 15 суток после ассоциирования.

Изображения результатов наблюдения посредством конфокальной микроскопии показывают окрашенные красителем Хехста ядра клеток очень четко и с минимальной засветкой от фона. Были получены изображения клеток на поверхности биоматериала (вид сверху) и внутри каналов макропор (вид сбоку) после контролируемого разрушения биоматериала.

На изображении вида сверху (Фиг.19а) показано, что с течением времени в культуре увеличивается количество клеток на поверхности биоматериала, которые постепенно покрывают стенки макропор и закупоривают поверхность всех их после 10 суток в культуре.

Изображение вида сбоку (Фиг.19b) представляет собой монтаж нескольких последовательных изображений, чтобы можно было наблюдать клетки по всей длине макропоры. Клетки заселяют внутреннюю часть каналов за 1 сутки ассоциирования. С течением времени наблюдают большое покрытие клетками и большие агрегаты на 10 и 15 сутки в культуре.

На изображениях результатов наблюдения посредством СЭМ также показаны изображения поверхности биоматериала (вид сверху) и внутренней части поры во всей ее полноте (вид сбоку).

На изображениях вида сверху (Фиг.20) показано увеличение степени заселения с течением времени в культуре. Закупоривание пор наблюдают после 7-х суток в культуре, причем возможно, что все поры закупориваются за 15 суток.

На изображениях вида сбоку (Фиг.21) показано меньшее количество клеток, даже за большие промежутки времени, что обусловлено потерями, происходящими при обработке образцов. Однако предложен точный анализ природы взаимодействия клеток с биоматериалом с использованием морфологических критериев. Клетки контактируют с биоматериалом на большой поверхности, причем наблюдают большое количество нитевидных выростов цитоплазмы, и более того, они даже способны проникать в их внутреннюю структуру.

После анализа изображений СЭМ и Хехста можно сделать вывод, что примерно за 4 суток ВМСК взаимодействуют подходящим образом и однородно с биоматериалом монетитом со структурированной пористостью по изобретению, наибольшая часть его поверхности заполнена без закупоривания пор, что позволяет

проходить питательным веществам и принимающим клеткам, которые реагируют на трофический сигнал ВМСК.

7.2. Определение остеоиндуктивного действия материала монетита со структурированной пористостью

Анализ экспрессии генов недифференцированных взрослых полученных из адипозной ткани мезенхимальных клеток (АТМК) путем сравнения структуры матрицы из монетита со структурированной пористостью с аморфным монетитом

Биоматериал монетит со структурированной пористостью имеет распределение макропор, благоприятствующее однородному распределению клеток по всей матрице. Более того, расположение этих пор позволяет улучшить поступление питательных веществ, газов и сигнальных молекул, произведенных самими клетками. Все это определяет, что клетки находятся в лучших условиях, и могут общаться между собой более эффективно для выражения их остеогенного фенотипа. По этой причине возможно для новой структуры биоматериала усилить остеоиндуктивное действие природы матрицы (производное фосфата кальция, подобное кости) и индуцировать экспрессию генов, связанную с остеогенной дифференцировкой.

Для того чтобы определить это индуктивное действие остеогенеза, обусловленное новой макропористой структурой, проводили анализ экспрессии генов, связанной с дифференциацией кости, посредством ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой), сравнивая структуру матрицы аморфного монетита с матрицей со структурированной пористостью.

С этой целью выполняют следующий эксперимент.

1. Размещение взрослых мезенхимальных стволовых клеток, полученных из адипозной ткани, и остеобластов человеческой кости на пористых матрицах из аморфного монетита и из монетита со структурированной пористостью с концентрацией 10^6 клеток/см³.

2. Поддержание в культуре в течение 7 суток на биоматериале, чтобы обеспечить воздействие структуры биоматериала на поведение клеток.

3. Выделение РНК клеток, которые находятся на биоматериале, и анализ экспрессии следующих генов посредством ОТ-ПЦР: щелочная фосфатаза, остеопонтин, остеоонектин и остеокальцин. Эти гены непосредственно имеют отношение к процессу дифференциации кости и активизируются по мере того, как мезенхимальные стволовые клетки и остеобласты выполняют свой процесс дифференциации в кость.

Результаты показывают индукцию экспрессии остеокондуктивных генов в клетках, которые находятся в биоматериале монетите со структурированной пористостью, по сравнению с аморфным монетитом.

В мезенхимальных стволовых клетках существует индукция в генах ранней дифференциации - остеопонтине и остеоонектине, и в меньшей степени в генах поздней дифференциации - щелочной фосфатазе и остеокальцине, по сравнению с клетками, расположенными на аморфном монетите.

Что касается остеобластов, наблюдают индукцию экспрессии генов поздней дифференциации, таких как щелочная фосфатаза и остеокальцин.

Эти результаты показывают, что структура биоматериала оказывает прямое влияние на поведение клеток. Однородное распределение макропор, при том, что поры способны проходить через всю структуру, существование большей взаимосвязи пор обеспечивает большее межклеточное сообщение и лучшее состояние клеток из-за доступа к питательным веществам и газам. Эта ситуация

позволяет более эффективно выразить клеточный фенотип и усилить остеокондуктивное действие, вызванное структурой биоматериала.

Этот эффект умножается, когда биоматериал вводят в дефект кости *in vivo*, когда остеогенные сигналы умножаются в окружающей костный дефект среде так, что может иметь место восстановление ткани. Эти сигналы мобилизуют остеобласты кости и мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, которые могут однородно занимать биоматериал и производить новый костный матрикс; который постепенно замещает биоматериал, который постепенно ресорбируется, вызывая устойчивое восстановление.

Исследование сохранения дифференцированного состояния клеток, расположенных в биоматериале монетите со структурированной пористостью, в течение продолжительного периода (сравнение поведения предварительно дифференцированных и недифференцированных АТМК).

Как показано выше, помимо размещения и распределения клеток, важно выяснить их функциональное состояние в биоматериале со структурированной пористостью с течением времени, чтобы определить сохранение остеогенного дифференцированного состояния, то есть сохраняется ли их направленность на образование клеток кости, способных синтезировать внеклеточный матрикс, который замещает постепенно разлагающийся биоматериал, чтобы восстановить дефект кости.

В этом исследовании анализируют поддержание экспрессии участвующих в остеогенезе генов в предварительно дифференцированных ВМСК, расположенных в биоматериале. С этой целью анализировали посредством ОТ-ПЦР экспрессию следующих генов, участвующих в процессе остеогенеза: остеопонтин (ОПН), остеокальцин (ОКА), остонектин (ОН), ТФР- β 1 (бета-трансформирующий фактор роста), щелочная фосфатаза (ЩФ) и коллаген типа-1 (Кол-1) (Фиг.22). Выполняли следующие операции.

- Размещение 300000 недифференцированных и предварительно дифференцированных ВМСК клеток на 1 см² биоматериала.

Анализ экспрессии щелочной фосфатазы, остеокальцина, остеопонтин, коллагена типа-1 и ТФР- β 1 при 1, 4, 7, 10 и 15 сутках в культуре в ассоциации с биоматериалом.

Что касается результатов с недифференцированными ВМСК, то как можно наблюдать на Фиг.22, клетки ВМСК экспрессируют все исследуемые гены, остонектин, остеокальцин, остеопонтин, коллаген типа-1, ТФР- β 1 и фермент щелочной фосфатазы.

Эта экспрессия не изменяется при культивировании клеток на биоматериале со структурированной пористостью в анализируемые промежутки времени. Конкретно, остонектин, остеокальцин, коллаген типа-1 и ТФР- β 1 поддерживают свою экспрессию при 4, 7, 10 и 15 сутках культивирования на биоматериале. Экспрессия остеопонтин уменьшается за 4 и 7 суток, однако восстанавливается и поддерживается за 10 и 15 суток культивирования на биоматериале. Однако экспрессия фермента щелочной фосфатазы в ВМСК очень невелика, исчезает в течение культивирования в биоматериале, и показывает свою экспрессию после 15 суток культивирования.

Коллаген типа-1, остеопонтин и остонектин экспрессируют ранним образом в клетках-предшественниках кости. Остеокальцин появляется с началом минерализации. В этом случае ВМСК экспрессируют белки, участвующие как в

начале дифференциации остеобластов, так в конечной фазе указанной дифференциации. Более того, они способны синтезировать коллаген, который составляет часть органического компонента костного матрикса. После того как они синтезированы, эти белки могут поглощаться и захватываться новым образующимся матриксом.

Щелочная фосфатаза представляет собой фермент, который высвобождает неорганический фосфор из сложных эфиров фосфорной кислоты, необходимый для минерализации, т.е. она участвует в минерализации кости и в созревании остеоидной матрицы, и поэтому ее экспрессия является очень поздней в процессе дифференциации клеток.

ТФР- β 1 представляет собой сильный стимулятор образования кости, он усиливает дифференциацию остеобластов и синтез костного матрикса и подавляет синтез разрушающих матрицу протеаз. Фактически, его используют как прогностический серологический маркер способности кости к срастанию в процессе развития псевдоартроза.

Что касается результатов с предварительно дифференцированными ВМСК, когда клетки предварительно дифференцируют в кости в течение 8 суток и располагают в культуре на монетите со структурированной пористостью по изобретению (Фиг.23), не происходит изменений в профиле генной экспрессии.

Предварительно дифференцированные клетки все еще показывают такую же картину экспрессии генов, связанных с регенерацией кости, как и недифференцированные ВМСК. Когда предварительно дифференцированные ВМСК располагают в биоматериале, экспрессия этих генов сохраняется, не видно никаких признаков взаимодействия, уменьшающего экспрессию генов, участвующих в регенерации кости (Фиг.23).

Низкая экспрессия фермента щелочной фосфатазы может быть обусловлена тем, что этот фермент предпочтительно не участвует в начальных фазах образования остеоидного матрикса. В начале образования кости сперва протекает синтез и выделение белков в матрицу, эти белки образуют упорядоченную структуру, в которой осаждаются соли кальция. Щелочная фосфатаза вовлекается в конце процесса, когда протекает минерализация. Этот фермент генерирует ионы фосфата (которые в этом случае уже поставлены биоматериалом) и увеличение концентрации этих ионов в матрице создает центры зародышеобразования для отложения минеральных солей.

Таким образом, в качестве конечного заключения следует указать, что структурированный биоматериал монетит по изобретению, в отличие от аморфного биоматериала монетита, допускает полное заселение как своей внешней, так и внутренней структуры клетками, поступление питательных веществ и газов по всей структуре для поддержания высоких уровней жизнеспособности и индуцирует пролиферацию, так же как и более высокую экспрессию генов, имеющих отношение к остеосинтезу и созданию нового костного матрикса.

Пример 8. Анализ секреции внеклеточного матрикса в биоматериале со структурированной пористостью посредством клеток с течением времени.
Эффективность

8.1. Исследование экспрессии белков, участвующих в образовании внеклеточного матрикса с течением времени (ОПН, ОКА, коллаген типа-1).

Кость представляет собой высоко васкуляризованную минерализованную соединительную ткань, содержащую специализированные клетки, органический

матрикс, образованный белками, и минеральную фазу, образованную солями кальция. Белковый матрикс позволяет ей быть гибкой и выдерживать нагрузку, в то время как соли кальция обеспечивают ее твердость и сопротивление давлению. В процессе образования кости компоненты белкового матрикса синтезируются первыми, образуя упорядоченную структуру, в которой впоследствии осаждаются соли кальция.

Белковый матрикс составляет третью часть от массы кости. Он образован такими белками, как коллаген типа-1 (>95%), и другими, участвующими в фиксации кальция, такими как остеокальцин (ОКА - 15%) и остеопонтин (ОПН). Коллаген-1 и ОПН экспрессируют ранним образом в клетках-предшественниках кости. ОКА появляется, когда начинается минерализация и является полезным маркером на конечных стадиях дифференциации остеообластов. Предварительно дифференцированные клетки синтезируют коллаген типа-1, остеопонтин и остеокальцин в своей цитоплазме, как происходит в клетках кости. Также было показано, что предварительно дифференцированные клетки, когда они расположены на матрице из монетита со структурированной пористостью по изобретению, экспрессируют гены ОПН, ОКА и коллагена типа-1. Поэтому важно определить, способны ли эти клетки, помимо экспрессии своих генов, синтезировать эти белки и выделять их для образования упорядоченной структуры в матрице, существенной для осаждения солей кальция при образовании новой кости.

Были выполнены следующие операции

- Размещение 300000 предварительно дифференцированных ВМСК на 1 см² биоматериала.

- Иммунологический анализ белков внеклеточного костного матрикса ОПН, ОКА и Кол-1 в биоматериале.

- Анализ посредством конфокальной микроскопии при временах 1, 4, 7, 10 и 15 суток ассоциации с биоматериалом.

Как и в предыдущих случаях, представлены изображения вида сверху (Фиг.25, 27, 29 и 31 а) поверхности биоматериала и изображения вида сбоку (Фиг.26, 28, 30 и 31b), соответствующие реконструкциям продольного сечения внутренней области поры.

Интерпретация изображений иммунного мечения (Фиг.25 и 26) показывает образование и секрецию коллагена-1 с первых суток ассоциации, которая увеличивается с течением времени. Также наблюдают увеличение количества клеток в биоматериале с первых по пятнадцатые сутки, что подтверждает способность ВМСК к колонизации биоматериала со структурированной пористостью, как было определено в предыдущих экспериментах.

На изображениях вида сбоку (Фиг.26) мечение коллагена не наблюдали после 7 суток ассоциации, что обусловлено закупориванием, происходящим в порах, как наблюдали на изображениях СЭМ (Фиг.17-18 и 20-21), которое препятствует диффузии антител в биоматериале. Это явление происходит во всех выполненных процедурах иммунного мечения после 7 суток ассоциации.

Что касается остеокальцина, то предварительно дифференцированные ВМСК производят и секретируют ОКА в биоматериал в количестве, возрастающем с течением времени ассоциации. Изображения внутренних областей пор показывают мечение только до 7 суток, что опять обусловлено закупориванием пор и затрудненностью диффузии антител. Однако эти изображения позволяют наблюдать высокое заселение ядер с течением времени нахождения культуры в биоматериале по всей длине поры (Фиг.27 и 28).

В случае остеопонтина (ОПН) (Фиг.29 и 30) синтез и выделение белка в биоматериал также наблюдают с первых по пятнадцатые сутки ассоциации. Снова изображения внутренних областей пор (Фиг.30) обеднены из-за затрудненности диффузии антител.

Для того чтобы подтвердить, что недостаток сигнала в продольной внутренней области пор с течением времени обусловлен затрудненностью диффузии антител, выполняли иммунное мечение белков после разрушения биоматериала, так чтобы стенка внутренней поры полностью подвергалась воздействию, таким образом существует прямой доступ ко всей внутренней поверхности пор (Фиг.26, 28, 30 и 31b).

Как можно наблюдать на Фиг.31, за 4 суток, т.е. за возможное время ассоциации биоматериала по изобретению до выполнения имплантации пациенту, наблюдали упомянутое мечение всех анализируемых белков как на поверхности биоматериала по изобретению, так и по всей длине внутренней поверхности пор. Эти результаты показывают, что предварительно дифференцированные МСК, которые находятся в биоматериале со структурированной пористостью, способны синтезировать и секретировать белки, связанные с синтезом кости, такие как коллаген типа-1, остеопонтин и остеокальцин.

8.2. Анализ кальция, синтезированного с течением времени клетками на биоматериале, посредством рентгеновской спектроскопии рассеивания энергии

Было подтверждено, что предварительно дифференцированные ВМСК в биоматериале способны инициировать синтез белков для образования новой кости, однако для стабильности получаемого костного матрикса дополнительно необходимо осуществление процесса минерализации.

Для определения этого факта анализировали, способны ли ВМСК синтезировать кальций, осаждающийся для образования минеральной фазы кости.

В организме остеобласты участвуют в минерализации органического матрикса, производя 100 нм матричные везикулы, окруженные мембраной, в которых накапливаются Ca^{2+} и PO_4^{2-} , обогащенные щелочной фосфатазой и пирофосфатазой, ферменты, способные производить ионы PO_4^{2-} . Увеличение количества этих ионов вызывает образование центров зародышеобразования, необходимых для осаждения минеральных солей.

Одним из связывающих кальций белков является остеокальцин, который согласно полученным результатам образует часть органического матрикса, синтезированного предварительно дифференцированными клетками на биоматериале. Высокая экспрессия этого белка означает, что клетки могут секретировать отложения кальция для образования минеральной части новой кости. Поэтому интересно исследовать, могут ли эти клетки выделять отложения кальция в межклеточную среду. Этот кальций мог бы образовать часть нового матрикса, либо образуя кристаллы гидроксиапатита, либо присоединяясь к белкам и поглощаясь матриксом, как происходит в организме.

Были выполнены следующие операции.

- Размещение предварительно дифференцированных ВМСК на биоматериале с той же концентрацией, как и в предыдущих экспериментах.

- Поддержание в ассоциации в течение 4, 7, 10 и 15 суток.

- Анализ кальция посредством СЭМ, объединенной с РСРЭ (рентгеновской спектроскопией рассеивания энергии). Эта технология позволяет анализировать и различать химические элементы, присутствующие в образце.

Изображения полученных результатов показывают изолированные области, в

которых элементарное распределение химических элементов анализировали посредством СЭМ-РСРЭ (Фиг.32 и 33). Эта технология позволяет с высоким разрешением определить элементы и их доли в образце. В этом случае данная методика позволяет определить, производят ли клетки элементы, связанные с минерализацией костного матрикса.

Отдельные появляющиеся в биоматериале элементы сперва анализировали и искали способ, чтобы отличить их от костного матрикса, произведенного клетками, так как химические элементы, участвующие в процессе, являются такими же (Са и Р).

При анализе биоматериала со структурированной пористостью по изобретению определяли следующие элементы, помимо ВМСК:

- 3 пика кальция, излучающих энергию на трех линиях α , β и λ , в зависимости от того, на какой энергетический уровень попадают электроны. Линия λ перекрывается с линией углерода и является наиболее трудной для определения;

- кислород;
- фосфор;
- углерод.

Анализ ВМСК в биоматериале со структурированной пористостью по изобретению

Для того чтобы можно было определить элементы, присутствующие в клетках, без вмешательства таких же элементов биоматериала, в качестве исходных выбирали места в центре каналов, удаленные от стенок биоматериала, поэтому измерения и обнаруженные элементы относятся только к клеткам. Измерения проводили на 4, 7, 10 и 15 сутки ассоциации.

На графиках Фиг.32 и 33 показано распределение элементов, отличное от распределения, обнаруженного в биоматериале. Распределение элементов полностью отличается, неожиданно включая кремний, характерный элемент, поступающий из клеток, который не появляется в любом образце, взятом из биоматериала, и очень значительное увеличение углерода. Другими словами, в клетках можно выделить следующее:

- кальций на его трех энергетических уровнях
- кислород
- фосфор
- кремний
- углерод.

На 4-е сутки ассоциации еще не наблюдают электронно-плотные частицы, поступающие из клеток. Распределение элементов показывает картину, отличную от распределения в монетите, пики кальция очень низки и существуют другие пики, такие как пики кремния и других элементов, образующих часть клеток (Фиг.32b и c).

На 7-е сутки в клетках наблюдают частицы, которые являются более электронно-плотными, и распределение этих элементов немного отличается, особенно в связи с пиками кальция, которые более интенсивны в частицах (Фиг.32d и e).

На 10-е и 15-е сутки в культуре наблюдают, что клетки полностью занимают центр поры, и что в нем явно существуют электронно-плотные частицы с очень интенсивными пиками кальция и фосфора. При анализе химического состава клеток получают картину в некоторой степени более низкой интенсивности линий кальция, чем при анализе состава электронно-плотных частиц, как на 10-е, так и на 15-е сутки культивирования (Фиг.33a-b и c-d).

Согласно результатам, полученным в течение времени ассоциации, электронно-

плотные частицы проявляются более явно, причем в основном их химический состав представляет собой фосфор и кальций (Фиг.34).

Эти электронно-плотные частицы кальция и фосфора синтезируются и выделяются клетками, так как они оказываются связанными с кремнием (помимо клеток), и места для измерений выбирали в области вне биоматериала. Эти частицы могут быть матричными везикулами, которые присутствуют в организме, в которых накапливаются Ca^{2+} и PO_4^{2-} . Эти элементы являются такими элементами, которые инициируют образование нового минерализованного костного матрикса.

Тот факт, что обнаруживают кремний, образованный клетками, является очень важным в качестве индикатора образования нового матрикса и способности кости к регенерации. В организме кремний концентрируется в остеобластах и участвует в производстве матрикса и в осаждении минеральных солей.

Выполненные Шварцем и Карлистом (Schwarz и Carlisle) исследования показывают важную роль кремния в остеогенезе. Согласно этим авторам кремний присутствует на высоких уровнях в центрах обызвествления. Они показывают, что в местах, в которых происходит интенсивный процесс обызвествления, как в случае переломов, существуют значительные концентрации кремния.

Кремний действует как элемент, который обеспечивает продольные связи между белками и полисахаридами или между полисахаридами. Он участвует в образовании упорядоченной белковой структуры в матрице, так чтобы минерализация кости осуществлялась правильным образом.

В итоге, увеличение синтеза образованных кальцием, фосфором и кремнием частиц с течением времени ассоциации с биоматериалом из монетита со структурированной пористостью, показывает, что удовлетворяются условия, подходящие для образования солей кальция, необходимых для того, чтобы образовалась минеральная фаза кости.

Пример 9. Анализ способности к аутокринной секреции факторов роста, связанных с регенерацией кости клетками, расположенными в биоматериале из монетита со структурированной пористостью. Эффективность.

Факторы роста представляют собой белки, производимые клетками кости, действующие как модуляторы функции клетки. В литературе описано, что ТФР- β 1 является важным фактором в реконструкции кости, так как он синтезируется остеобластами, усиливая их дифференциацию и благоприятствуя синтезу остеоидного матрикса (Riancho et al., 2003). ТФР- β 1 оказывает хемотактическое действие на предшественники остеобластов, стимулируя их пролиферацию и синтез коллагена (Fernandez-Tresguerres et al., 2006).

Таким образом он участвует в регенерации кости, что его используют в качестве прогностического маркера в серологии для определения способности к излечению, которой может обладать индивидуум со сложным переломом (Zimmermann, 2005).

Для определения способности предварительно дифференцированных ВМСК к секреции этого фактора роста с биоматериалом монетитом со структурированной пористостью, или без него, количественно определяли растворимый фактор в культурных средах. Эти среды получают культивированием предварительно дифференцированных клеток по отдельности и предварительно дифференцированных клеток в контакте с биоматериалом. Выполняли следующие операции.

- Размещение клеток с различными концентрациями; 0,5-1-2-3-4-5 миллионов предварительно дифференцированных клеток на 6 см^2 поверхности и в объеме 1,5 мл

среды. Культивирование в течение 7 суток.

- Размещение 2×10^6 предварительно дифференцированных клеток на 6 см^2 поверхности в объеме 1,5 мл культурной среды в течение 1, 4, 7, 10 и 15 суток культивирования.

- Иммуноферментный анализ (ELISA) количества растворимого ТФР- β 1.

Результаты показывают, что во всех случаях наблюдали значительное присутствие фактора в среде (Фиг.35-38). Обнаруженные концентрации изменялись в зависимости от момента клеточного метаболизма и от применения фактора в клетке.

Когда клетки растут без биоматериала со структурированной пористостью, наблюдают постепенное увеличение концентрации ТФР- β 1 при более низких концентрациях клеток, пропорционально количеству клеток на поверхности (Фиг.35). При более высоких концентрациях наблюдают небольшое уменьшение или стабилизацию, что может быть обусловлено тем, что фактор выполняет свою функцию связи с реципиентом, тем, что он уже выполнил свою функцию, тем, что высокая концентрация подавляет его синтез посредством механизма обратной связи.

На Фиг.36 показана секреция фактора роста предварительно дифференцированных клеток с течением времени в культуре. Пик синтеза и секреции в среду наблюдают на 4-е сутки культивирования, затем происходит уменьшение до 10-х суток, после чего начинается новое увеличение секреции.

Это поведение типично для факторов роста, действующих в соответствии с механизмом обратной связи:

- 1: осуществляется синтез и секреция в среду,

- 2: он вступает в связь со своим конкретным реципиентом на поверхности рецепиентной клетки для выполнения своих функций, в это время можно наблюдать уменьшение его присутствие в культурной среде,

- 3: если это еще необходимо для активации определенных процессов в клетке, он опять начинает свой синтез и секрецию в среду, чтобы поддержать свое действие до тех пор, пока клетка не определит подавление их синтеза.

Когда клетки расположены в биоматериале, результаты показывают, что они также способны синтезировать и секретировать в культурную среду фактор ТФР- β 1 (Фиг.37).

Присутствие данного фактора в среде коррелирует с увеличением количества клеток в биоматериале до тех пор, пока снова не наступает стабилизация секреции, которая может быть обусловлена тем, что отсутствует необходимость увеличения концентрации для его действия.

Подобным образом, одна и та же концентрация клеток, расположенных на монетите со структурированной пористостью, с течением времени в культуре увеличивает секрецию фактора, что может быть связано с увеличением клеток с течением времени (Фиг.38). Конкретно, результаты показывают, что существует увеличение секреции с первых по десятые сутки в культуре, после чего она начинает стабилизироваться и немного уменьшаться.

Это увеличение также может быть не связано с увеличением количества клеток, а обусловлено индукцией для усиления синтеза внеклеточного матрикса. После 10-х суток ассоциации его синтез уменьшается, или фактор преимущественно связан с реципиентами, выполняя свою функцию, и его не наблюдают в свободной форме в культурной среде.

В этом случае механизм обратной связи фактора регулируется немного отличным образом от того, что наблюдали, когда клетки не растут в матрице из монетита со

структурированной пористостью по изобретению, так что увеличение секреции поддерживается до 10-х суток, уменьшаясь после этого.

В итоге, предварительно дифференцированные клетки, растущие на биоматериале монетите со структурированной пористостью, способны синтезировать и секретировать фактор ТФР- β 1 во внешнюю среду. Как было показано в исследовании генной экспрессии этого фактора, в предварительно дифференцированных клетках, растущих в биоматериале, экспрессия фактора остается постоянной со временем в культуре, за исключением 7-х суток, на которые наблюдали немного более низкую экспрессию. Более того, экспрессия в предварительно дифференцированных клетках, растущих с биоматериалом и без него, является одинаковой. Поэтому можно предположить, что различные количественные измерения фактора в обоих случаях обусловлены различием скорости связывания с рецептором и передачей сигнала во внутреннюю область. Или, возможно, клетки, растущие на биоматериале, имеют больше рецепторов, и фактор преимущественно связывается с ними, что влечет за собой усиление процесса регенерации кости, поэтому обнаружение растворимого фактора является более низким в этих случаях.

Вкратце, предварительно дифференцированные клетки, растущие на биоматериале из монетита со структурированной пористостью по изобретению, синтезируют и секретуют ТФР- β 1 в культурную среду. Этот фактор может благоприятствовать синтезу остеоидного матрикса.

Пример 10. Сравнение *in vivo* матриц из монетита со структурированной пористостью по изобретению с матрицами из брушита со структурированной пористостью

Структурированный биоматериал монетит по настоящему изобретению имеет преимущество по сравнению с брушитом, так как он является более устойчивым и обладает более подходящей скоростью ресорбции, приспособленной к ремоделированию кости.

Выполняли исследование для определения скорости ресорбции биоматериала монетита со структурированной пористостью и биоматериала брушита со структурой пористости, такой же как структура по настоящему изобретению, посредством использования модели критического дефекта в кости свода черепа кролика. Шесть кроликов новозеландской породы были включены в исследование, причем по 3 животных использовали для анализа способности к реабсорбции каждого материала. С этой целью воздействие на череп кролика выполняли посредством сагиттального надрезания шкуры с головы животного. Затем аккуратно вскрывали надкостницу, создавали бикортикальные дефекты 1 см в диаметре. В каждом животном биоматериалы располагали в одном из дефектов, оставляя один контрлатеральный в качестве контрольного. Область хирургического вмешательства обильно промывали и надкостницу, подкожные ткани и шкуру с головы животного сшивали, используя подходящие хирургические технологии.

Спустя 4, 8 и 12 недель после имплантации, животных умерщвляли и имплантированные части собирали для гистоморфометрического анализа. Наиболее подходящим временем полной ресорбции биоматериала, использованного для индуцирования регенерации кости у людей, по оценке составляет от 6 до 18 месяцев. Эта скорость ресорбции является важной, так как если биоматериал является слишком растворимым и его деградация слишком быстрая, остеообласты теряют подложку, которая позволяет им удерживаться и производить и размещать новый

костный матрикс, однако, если используемый биоматериал слишком устойчив, остеокласты не способны обеспечивать деградацию, синхронизированную с образованием новой кости остеобластами. По этой причине необходимо применять биоматериал, деградация которого допускает реконструкцию кости и, более того, не вызывает значительных изменений рН окружающей среды и в остеогенных клетках из-за ионов и продуктов распада. В этом случае результаты показывают, что область имплантации не показывает признаков воспаления с любым использованным биоматериалом. Для обоих биоматериалов гистологическое исследование уже показало образование новой кости за 4 недели, так же как и первые признаки резорбции (перфорации в биоматериалах, области образования скоплений остеокластов). Однако, в то время как наблюдали, что брушит в основном резорбировался за 12 недель имплантации, присутствие материала монетита еще можно было наблюдать, что обеспечивает большую устойчивость процесса регенерации кости и большее взаимодействие с фазой ремоделирования кости. Увеличение времени резорбции биоматериала монетита по изобретению приводит к образованию большего количества костной массы, так как остеобласты имеют больше времени для образования и осаждения нового минерализованного костного матрикса.

Таким образом, можно сделать вывод, что скорость резорбции монетита более подходит для ремоделирования кости, поддерживая в течение большего времени подходящую подложку для заселения остеобластов и для синтеза нового костного матрикса, без опасности преобразования в гидроксиапатит из-за слишком высокой скорости резорбции, что может происходить в случае брушита.

Пример 11. Сравнение конкретного воплощения матрицы из монетита с структурированной пористостью по изобретению с матрицей из монетита с различной пористой структурой

Биоматериал, разработанный в настоящем изобретении, обладает характеристиками, которые особенно существенны для достижения эффективной регенерации кости, включающими однородно распределенную микропористость и макропористость, и для применения его в сборной форме, которая допускают лучшую адаптацию к дефекту кости, однородное поступление питательных веществ, газов и клеток во всю область восстановления, так что не образуются некротических областей.

Для исследования преимущества биоматериала по изобретению и его формы применения сравнивали способность к регенерации гранул по изобретению 5 мм в диаметре, 3 мм в высоту и с 12 макропорами 0,5 мм в диаметре, отстоящих друг от друга на 0,5 мм, с биоматериалом монетитом, имеющим пористую структуру по примеру 1 заявки на патент US 6905516. Указанная матрица соответствует цилиндру 10 мм в диаметре и 10 мм в высоту, имеющему центральный канал 2 мм в диаметре и гексагональную сеть из 60 цилиндрических пор 0,5 мм в диаметре, параллельных центральной макропоре 2 мм и отстоящих друг от друга на расстояние 1 мм. Таким образом, в указанной матрице отсутствует регулирование однородного диаметра пор, и ее необходимо применять в виде единственной детали, так что весь ее размер полностью подбирают по дефекту кости.

Проводили анализ образования новой кости и васкуляризации в области имплантации двух типов биоматериала. Для экспериментов *in vivo* использовали 6 овец, которым выполняли критический дефект большой берцовой кости и стабилизацию путем технологий остеосинтеза. В созданном дефекте применяли

комплект деталей из биоматериала монетита со структурированной пористостью по изобретению для трех из этих овец и единственную деталь из биоматериала, подобранную по размеру дефекта, применяли для других трех овец, оставляя у всех этих овец соседнюю ногу в качестве контрольной (с образованием критического дефекта и стабилизацией перелома, однако без наполнения биоматериалом). Перед имплантацией биоматериалов их заседали одинаковым количеством мезенхимальных стволовых клеток, полученных из адипозной ткани овцы.

Выполняли анализ новой образованной костной ткани и ресорбции обоих типов биоматериала посредством непрерывного радиографического контроля и гистологического изучения на 3 и 6 месяцы имплантации. Последовательность рентгеновских снимков позволяет наблюдать полную интеграцию биоматериала со структурированной пористостью по изобретению в области имплантации, а также активную ресорбцию указанного биоматериала, который все еще продолжает существовать на 6 месяцев, поскольку в этом конструктивном исполнении скорость его деградации подбирают по ремоделированию кости. На радиографическом уровне не наблюдают изменений в биоматериале, расположенном в виде единственного блока в области имплантации. Гистоморфометрический анализ позволяет подтвердить на 3-й месяц имплантации заселение кости остеобластами и остеокластами по всей структуре биоматериала монетита со структурированной пористостью по изобретению и однородное образование новой кости с полной ее интеграцией на 6-й месяц с зарождающейся сетью сосудов, которая позволяет выживать новой ткани, формирующейся без образования некротических областей. Однако внутри единственного блока практически вся новая образованная ткань ограничена периферийной областью имплантата, его внутренняя область значительно меньше заселена клетками прилегающей ткани, без признаков образования новых кровеносных сосудов. Однородное распределение пор с диаметром 500 мкм и отстоящих друг от друга также на 500 мкм в биоматериале приводит к большей поверхности контакта как в области поверхности, так и внутри биоматериала по изобретению, что улучшает способность взаимодействия с тканью в поврежденной области, причем области активности, в показателях производства новой кости, получают одновременно во всех областях биоматериала.

Эти результаты позволяют сделать вывод, что реципиентная ткань имплантации взаимодействует значительно более подходящим образом с биоматериалом по изобретению, что приводит к однородному образованию новой васкуляризованной костной ткани. Однако использование единственного блока из монетита по примеру 1 заявки на патент US 6905516 затрудняет взаимосвязь и интеграцию в области дефекта кости. Образование новой кости и заселение клетками значительно более низкие, даже на 6-й месяц имплантации.

Помимо того, в большинстве случаев дефекты кости у пациентов не принимают правильные формы, как это происходит, когда эти дефекты вызывают у овец, как часть экспериментального исследования. Дефекты кости очень различны и края перелома очень нерегулярны в большинстве случаев. В некоторых случаях пространство, образованное дефектом кости, очень ограничено, как случается, например, в гипертрофированном псевдоартрозе, поэтому введение выполненного в виде одной детали блока, который соединяют с областью дефекта, является очень сложным и не обеспечивает подгонку по форме деформированной области. Использование конструктивного исполнения по изобретению, сборки из деталей небольших размеров из биоматериала монетита с однородно структурированными

макропорами позволяет приспособить этот материал для сложных дефектов кости различных форм и размеров, так что пораженная область полностью подвергается воздействию биоматериала и поставляемых им клеток для активации лечебного процесса.

5

ЛИТЕРАТУРА

10

- Chow L.C., Markovic M., Takagi S. 2003. A dual constant composition titration system as an in vivo resorption model for comparing dissolution rates of calcium phosphate biomaterials. J. Biomed Mater Res. B: Appl Biomater 65: 245 - 251.

15

- Constanz B. R., Barr B. M., Ison I. C., Fulmer M. T., Baker J., McKinney L., Goodman S. B., Gunasekaren S., Delaney D. C., Ross J., Poser R. D. 1998. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater. 43: 451 -461.

20

- De Boever A. L. & De Boever J. A. 2005. Guided bone regeneration around nonsubmerged implants in narrow alveolar ridges: a prospective long-term clinical study. Clinical Oral Implants Research 16: 549 - 556.

25

- Eggli P. S., Muller W., Schenk R. K. 1988. Porous Hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the

30

35

40

45

50

cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bone ingrowth and implant substitution. Clin. Orthop. 232: 127 - 138.

5 - Fernandez-Tresguerres I., Alobera M. A., del Canto M., Blanco L. Bases fisiologicas de la regeneracion osea II. El proceso de remodelado. Med. oral patol. oral. cir. bucal (Internet). v. 11, n. 2, Madrid, mar. -5, abr. 2006.

10 - Tamimi F. M., Torres J., Tresguerres I., Clemente C., Lopez Cabarcos E., Blanco L. J. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and novel β -TCP/DCPD granulate. J. Clin. Periodontol 2006, 33: 922 - 928. 2006.

15 - Franco J., Souto A., Rey P., Uitian F., Martinez Insua A. 2006. Procesamiento ceramico de B-TCP para la fabricacion de piezas implantables. Bol. Soc. Esp. Ceram., v. 45 (4), 265 - 270.

20 - Gimeno M. D. Sustitutivos oseos en fracturas del radio distal. Patalogia del Aparato Locomotor, 2007, 5 Supl. II: 82 - 90. Frayssinel P., Vidalain J. P., Rauz X., Cartillier J. C., Rouquet N. 1999. Hydroxyapatite particle migration. European journal of Orthopaedic surgery & traumatology. (9), 2: 95 - 98.

25 - Gbureck U., Holzel T., Klammert U., Wurzler K., Muller F. A., Barralet J. E. Resorbable dicalcium phosphate bone substitutes made by 3D powder printing. Adv. Funct. Mater. 2007, 17: 3940 - 5. Herron S., Thordarson D. B., Winet H., Luk A., Bao J. Y. 2003. Ingrowth of bone into absorbable bone cement: An in vivo microscopic evaluation. Am. J. Orthop., 12: 581 - 584.

30 - Riancho J. A., Gutierrez G. E. Factores reguladores de la resorcion osea. Rev. Metab. Oseo Min., 2003, 1 (2): 51 - 66. Schnettler R., Stahl P. J., Alt V., Pavlidid T., Dingledein E., Wenish S. 2004. Calcium Phosphate-Based bone Substitutes. Eur. J. Trauma, 30: 219 - 229.

40 - Schwarz K. Significance and functions of silicon in warm-blooded animals. Review and Outlook. Biochemistry of silicon and Related Problems. Plenum. New York, 1977: 207 - 230. Carlisle E. M. Silicon. Handbook of nutritionally essential mineral elements. Dekker. New York. 1997: 603 - 618.

45 - Suba Z., Takacs D., Guylai-Gaal S., Kovacs K. 2004. Facilitation of beta-tricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study. International Journal of oral and Maxillofacial implants, 19: 832 - 838.

50

- Sugawara A., Fujikawwa K., Takagi S., Chow L. C., Nishiyama M., Murai S. Histopathological and cell enzyme studies of calcium phosphate cements. Dent. Mater. J. 2004, 23: 613 - 620. Stubbs D., Deakin p., Chapman-5 Sheath P., Bruce J., Debes W., Gillies R. M., Walha W. R. 2004. In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in rabbit tibial defect model. Biomaterials, 25: 5037 - 5044.

- Takahashi Y., Tabata Y. 2004. Effect of the fiber diameter and porosity of nonwoven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. J. Biomater. Sci. Polym. , Ed. 15 (1): 41 - 57.

- Tamini F. M., Torres J., Tresguerres I., Blanco L., Lopez-Cabarcos E. 2006. Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid. Int. J. Biomed. Mater. Res., 80a: 1 - 10.

- Tamini F. M., Torres J., Tresguerres I., Clemente C., Lopez-Cabarcos E., Blanco L. J. 2006. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-OssR and a novel B-TCP/DCPD granulate. J. Clin. Periodontol., 33: 922 - 928.

- Tas C. & Bhaduri S. B. 2004. Chemical processing of $\text{CaPO}_2\text{H}_2\text{O}$: its conversion of hydroxyapatite. Journal of American Ceramic Society, 87: 2195 - 2200.

- Taylor J. C., Cuff S. E., Leger J. P., Morra A., Anderson G. I. 2002. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, 17: 321 - 330.

- Trisi P., Rao W., Rebaudi A., Fiore P. 2003. Histologic effect of pure-phase betatricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. International Journal of periodontics restorative Dentistry, 23: 69 - 77.

- Wiltfang J., Schlegel K. A., Schultze S., Nkenke E., Zimmermann R., Kessler P. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseus integration and degradation? Clin. Oral Implants, 2003 Apr., 14 (2): 213 - 8. 64.

- G. Zimmermann, P. Henle, M. Kusswetter, A. Moghaddam, A. Wentzensen, W. Richter, S. Weiss. TGF- β 1 as a marker of delayed fracture healing. Bone, 2005 (36): 779 - 785.

Формула изобретения

1. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью для регенерации структуры кости, имеющая в своей структуре вертикальные цилиндрические макропоры диаметром от 350 мкм до 650 мкм, которые пересекают в продольном направлении матрицу с одного конца до другого, причем эти

макропоры находятся на расстоянии друг от друга от 0,4 мм до 0,6 мм.

2. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.1, где указанные макропоры имеют диаметр предпочтительно 500 мкм ± 60 мкм.

3. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.2, где расстояние между макропорами составляет предпочтительно 0,5 мм ± 60 мкм.

4. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.1, где содержание монетита в матрице составляет по меньшей мере 90%.

5. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.4, где содержание монетита в матрице составляет предпочтительно 95%.

6. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.4, где содержание монетита в матрице более предпочтительно составляет 100%.

7. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.1, где она получена путем термического превращения материала-предшественника.

8. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.7, где материал-предшественник, который термически превращают в монетит, состоит из смеси твердой фазы, образованной основными фосфатами кальция, кислыми фосфатами кальция, порообразующим агентом и замедлителем схватывания, которую отверждают путем добавления дистиллированной воды.

9. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.8, где молярное отношение основного фосфата к кислому фосфату составляет 1,6-1,8, концентрация порообразующего агента составляет 1-20 мас.%, концентрация замедлителя схватывания составляет 0,4-0,6 мас.% и отношение П/Ж (порошок/жидкость) равно 3.

10. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.9, где молярное отношение основного фосфата к кислому фосфату составляет 1,785, концентрация порообразующего агента составляет 3-10 мас.% и концентрация замедлителя схватывания составляет 0,54 мас.%.

11. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.7, где кислый фосфат кальция представляет собой монокальцийфосфат, основной фосфат кальция представляет собой бета-трикальцийфосфат, порообразующий агент представляет собой карбонат кальция и замедлитель схватывания представляет собой пирофосфат натрия.

12. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.7, где материал-предшественник представляет собой брушит.

13. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.1, которой можно придать любую форму, требуемую для восстановления конкретного дефекта кости или ткани.

14. Матрица по п.13, которая представляет собой цилиндр с диаметром основания от 2 мм до 50 мм и высотой от 1 мм до 50 мм.

15. Матрица по п.14, где указанный цилиндр имеет диаметр основания от 2 мм до 15 мм и высоту от 1 мм до 5 мм.

16. Матрица по п.14, которая имеет минимальную периметрическую область 0,5 мм, не содержащую макропор.

17. Матрица по п.16, где указанный цилиндр имеет диаметр основания 10 мм, высоту 5 мм и 64 цилиндрических макропор диаметром 500 мкм ± 60 мкм, равномерно расположенных на расстоянии друг от друга 0,5 мм ± 60 мкм, которые пересекают матрицу в продольном направлении, относительно периметрической области 0,5 мм от края указанного цилиндра к его центру, не содержащей макропор.

18. Матрица по п.16, где указанный цилиндр имеет диаметр основания 10 мм, высоту 3 мм и 64 цилиндрических макропор диаметром $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно расположенных на расстоянии друг от друга $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$, которые пересекают матрицу в продольном направлении, относительно периметрической области $0,5 \text{ мм}$ от края указанного цилиндра к его центру, не содержащей макропор.

19. Матрица по п.16, где указанный цилиндр имеет диаметр основания 8 мм, высоту 5 мм и 39 цилиндрических макропор диаметром $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно расположенных на расстоянии друг от друга $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$, которые пересекают матрицу в продольном направлении, относительно периметрической области $0,5 \text{ мм}$ от края указанного цилиндра к его центру, не содержащей макропор.

20. Матрица по п.16, где указанный цилиндр имеет диаметр основания 8 мм, высоту 3 мм и 39 цилиндрических макропор диаметром $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно расположенных на расстоянии друг от друга $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$, которые пересекают матрицу в продольном направлении, относительно периметрической области $0,5 \text{ мм}$ от края указанного цилиндра к его центру, не содержащей макропор.

21. Матрица по п.16, где указанный цилиндр имеет диаметр основания 7 мм, высоту 5 мм и 28 цилиндрических макропор диаметром $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно расположенных на расстоянии друг от друга $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$, которые пересекают матрицу в продольном направлении, относительно периметрической области $0,5 \text{ мм}$ от края указанного цилиндра к его центру, не содержащей макропор.

22. Матрица по п.16, где указанный цилиндр имеет диаметр основания 7 мм, высоту 3 мм и 28 цилиндрических макропор диаметром $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно расположенных на расстоянии друг от друга $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$, которые пересекают матрицу в продольном направлении, относительно периметрической области $0,5 \text{ мм}$ от края указанного цилиндра к его центру, не содержащей макропор.

23. Матрица по п.16, где указанный цилиндр имеет диаметр основания 5 мм, высоту 3 мм и 12 цилиндрических макропор диаметром $500 \text{ мкм} \pm 60 \text{ мкм}$, равномерно расположенных на расстоянии друг от друга $0,5 \text{ мм} \pm 60 \text{ мкм}$, которые пересекают матрицу в продольном направлении, относительно периметрической области $0,5 \text{ мм}$ от края указанного цилиндра к его центру, не содержащей макропор.

24. Форма для получения трехмерной матрицы по любому из пп.1-23, которая снабжена однородно распределенными зубцами диаметром $350\text{-}650 \text{ мкм}$, равномерно расположенными на расстоянии друг от друга $0,4\text{-}0,6 \text{ мм}$.

25. Форма по п.24, которая выполнена из кремнийорганического полимера, металла, стойкой пластмассы или любого другого материала.

26. Форма по пп.24 и 25, которой можно придать любую конфигурацию, требуемую для восстановления конкретных дефектов кости или ткани.

27. Форма по п.26, которая имеет конфигурацию цилиндра с диаметром основания от 2 мм до 50 мм и высотой от 1 мм до 50 мм.

28. Форма по п.27, которая имеет конфигурацию цилиндра с диаметром основания от 2 мм до 15 мм и высотой от 1 мм до 5 мм.

29. Способ синтеза трехмерной матрицы из монетита со структурированной пористостью по п.1, который включает следующие стадии:

1) смешивание твердой фазы, образованной основными фосфатами кальция, кислыми фосфатами кальция, порообразующим агентом и замедлителем схватывания, которую отверждают посредством добавления дистиллированной воды, с образованием жидкой фазы;

2) заполнение по меньшей мере одной формы цементом в течение твердения для

получения вертикальных цилиндрических макропор диаметром от 350 мкм до 650 мкм, равномерно расположенных на расстоянии от 0,4 мкм до 0,6 мм;

3) стерилизация образованного материала-предшественника и его термическое превращение в монетит.

5 30. Способ синтеза по п.29, где на стадии (1) молярное отношение основного фосфата к кислому фосфату составляет 1,6-1,8, концентрация порообразующего агента составляет 1-20 мас.%, концентрация замедлителя схватывания составляет 0,4-0,6 мас.% и отношение П/Ж (порошок/жидкость) равно 3.

10 31. Способ синтеза по п.30, где на стадии (1) молярное отношение основного фосфата к кислому фосфату составляет 1,785, концентрация порообразующего агента составляет 3-10 мас.% и концентрация замедлителя схватывания составляет 0,54 мас.%.

15 32. Способ синтеза по любому из пп.29-31, где на стадии (1) кислый фосфат кальция представляет собой монокальцийфосфат, основной фосфат кальция представляет собой бета-трикальцийфосфат, порообразующий агент представляет собой карбонат кальция и замедлитель схватывания представляет собой пирофосфат натрия.

20 33. Способ синтеза по п.29, где продукт стадии (1) представляет собой брушит.

34. Способ синтеза по п.29, где на стадии (3) термическую стерилизацию выполняют обработкой в автоклаве.

35. Способ синтеза по п.34, где указанную обработку в автоклаве выполняют при 120-130°C в течение 24-25 мин.

25 36. Способ по п.29, где используемая на стадии (2) форма представляет собой форму по любому из пп.24-26.

37. Способ по п.36, где перед использованием форм по пп.24-26, используют форму из кремнийорганического полимера, которая имеет конфигурацию цилиндра с 30 диаметром основания от 2 мм до 50 мм и высотой от 1 мм до 50 мм.

38. Способ по п.37, где указанная форма из кремнийорганического полимера имеет конфигурацию цилиндра с диаметром основания от 2 мм до 15 мм и высотой от 1 мм до 5 мм.

35 39. Применение формы по любому из пп.24-26 для получения фосфата кальция, принимающего конфигурацию этой формы.

40. Применение формы по п.39, где фосфат кальция является монетитом.

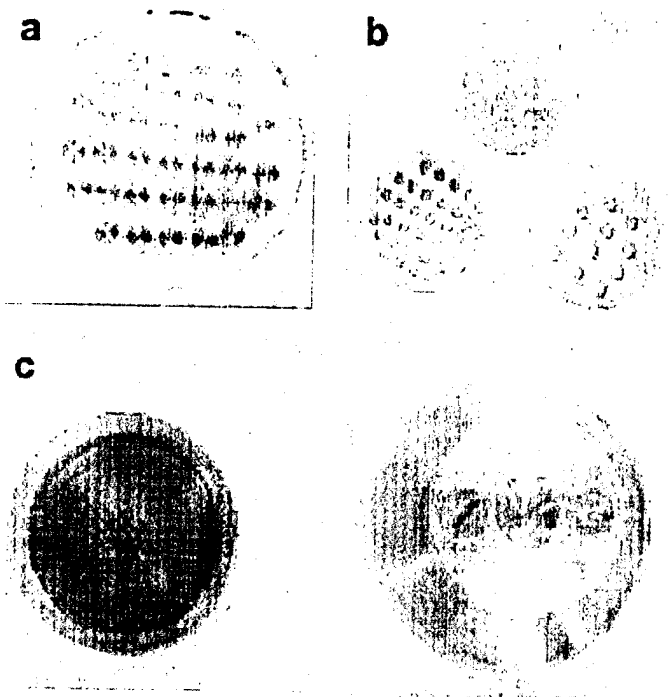
41. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по любому из пп.1-23, которая дополнительно включает клетки.

40 42. Трехмерная матрица из монетита со структурированной пористостью по п.41, где указанные клетки представляют собой мезенхимальные клетки, остеобласты, остеокласты, остециты, эндотелиальные клетки или их сочетания.

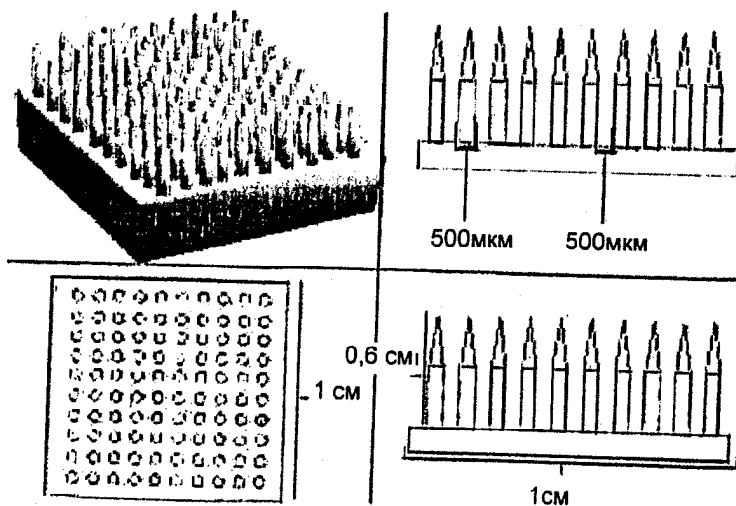
45 43. Применение трехмерной матрицы из монетита со структурированной пористостью по любому из пп.1-23, 41 или 42 для приготовления терапевтического агента для регенерации структуры кости.

44. Применение трехмерной матрицы по п.43, где указанную регенерацию структуры кости выполняют для оказания противодействия остеопорозу.

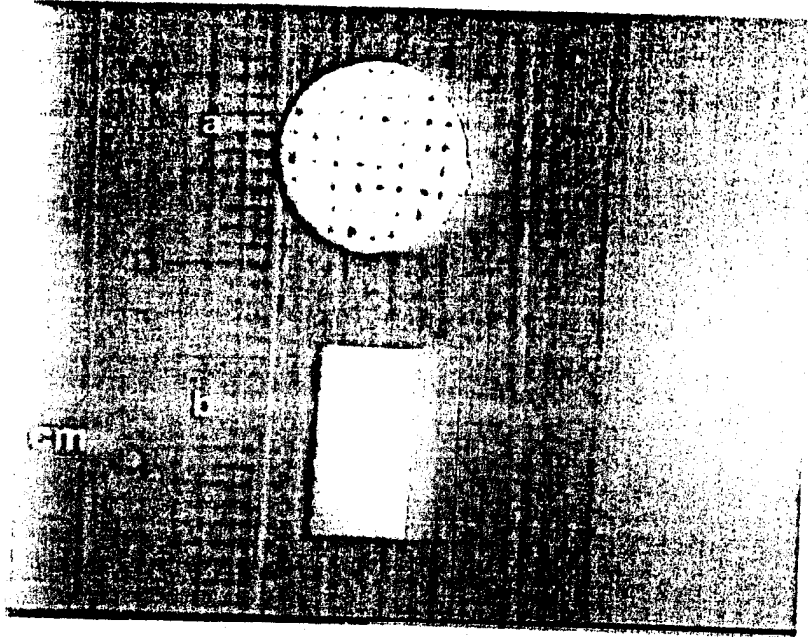
50



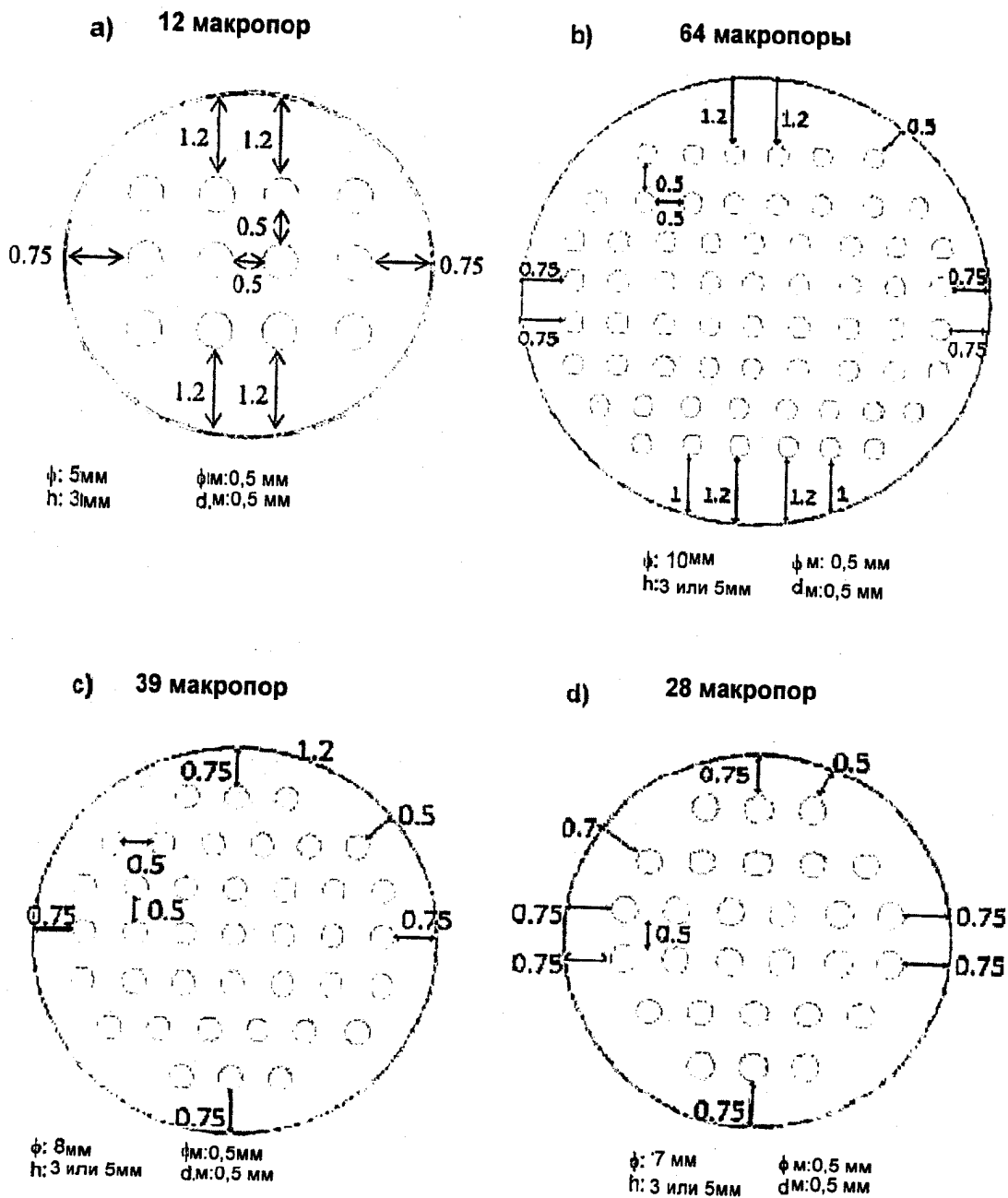
Фиг. 1



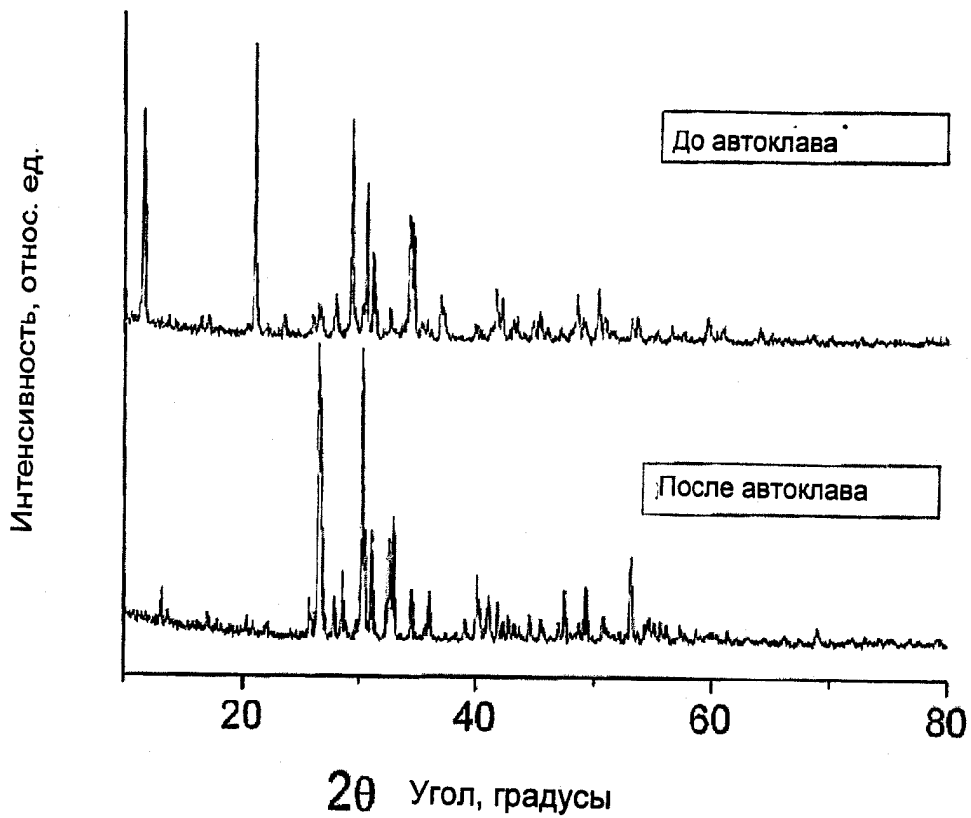
Фиг. 2



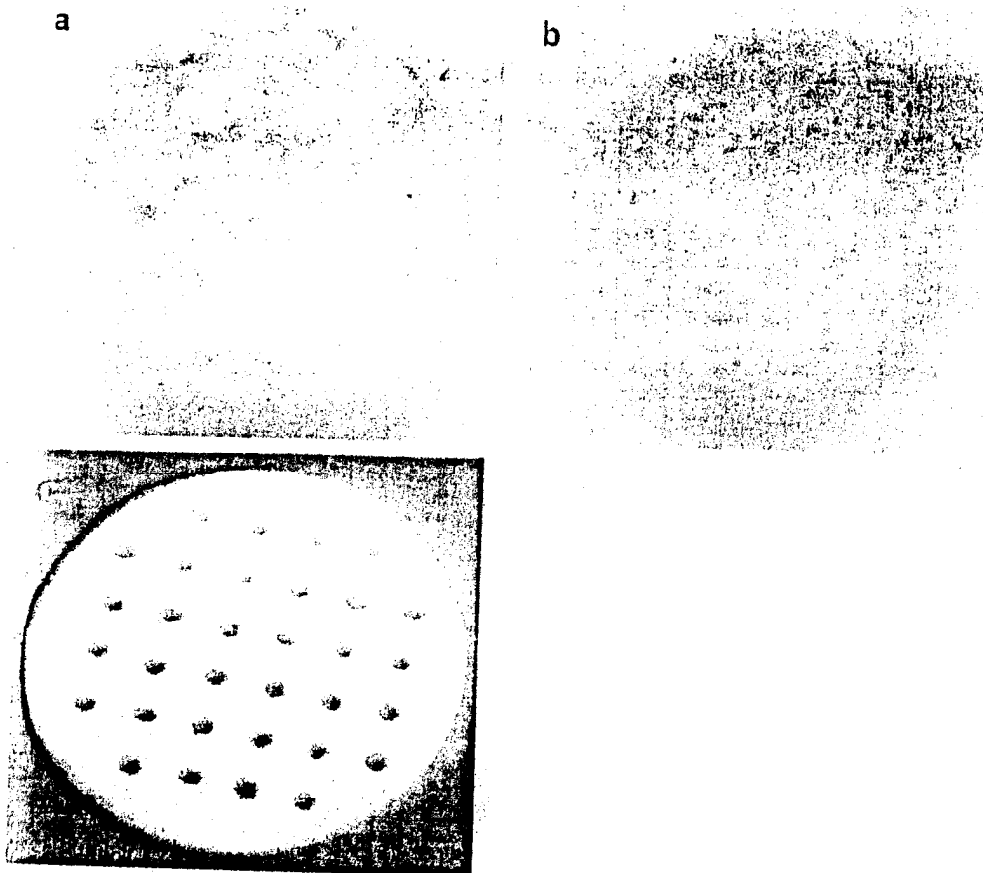
Фиг. 3



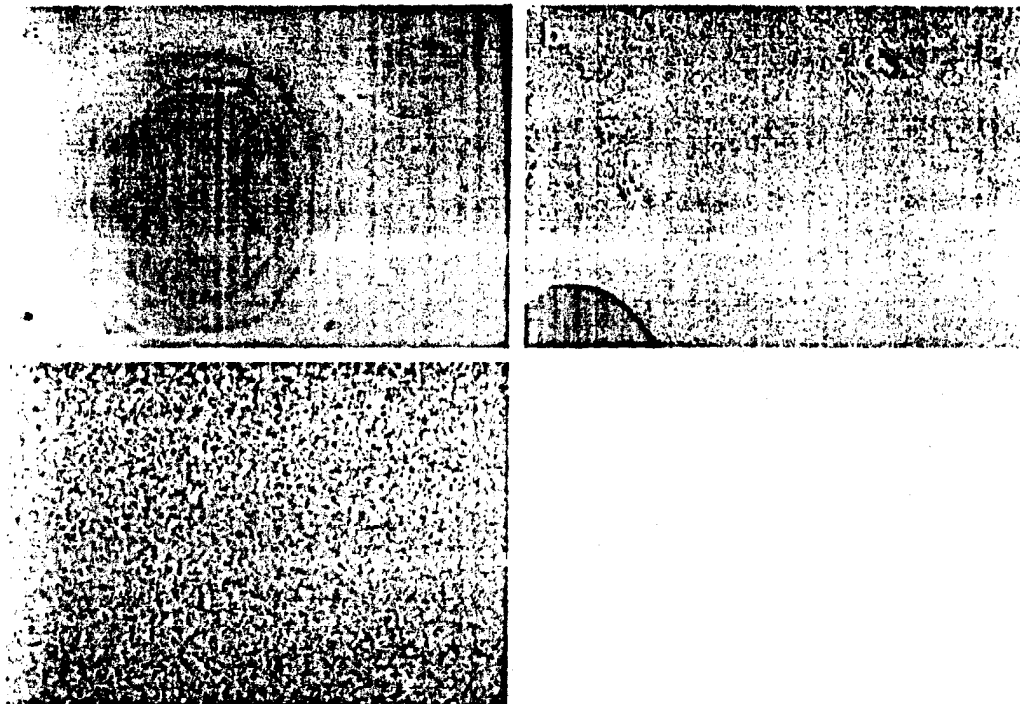
Фиг. 4



Фиг. 5



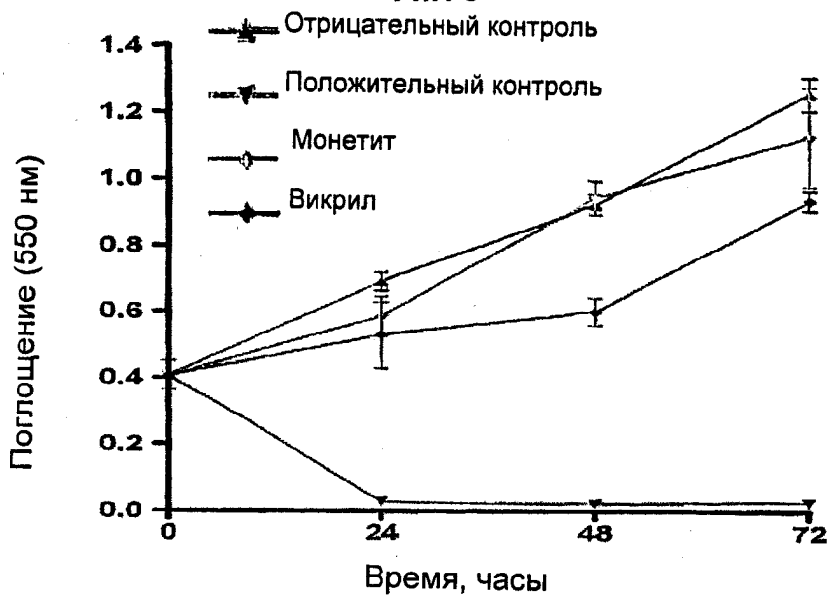
Фиг. 6



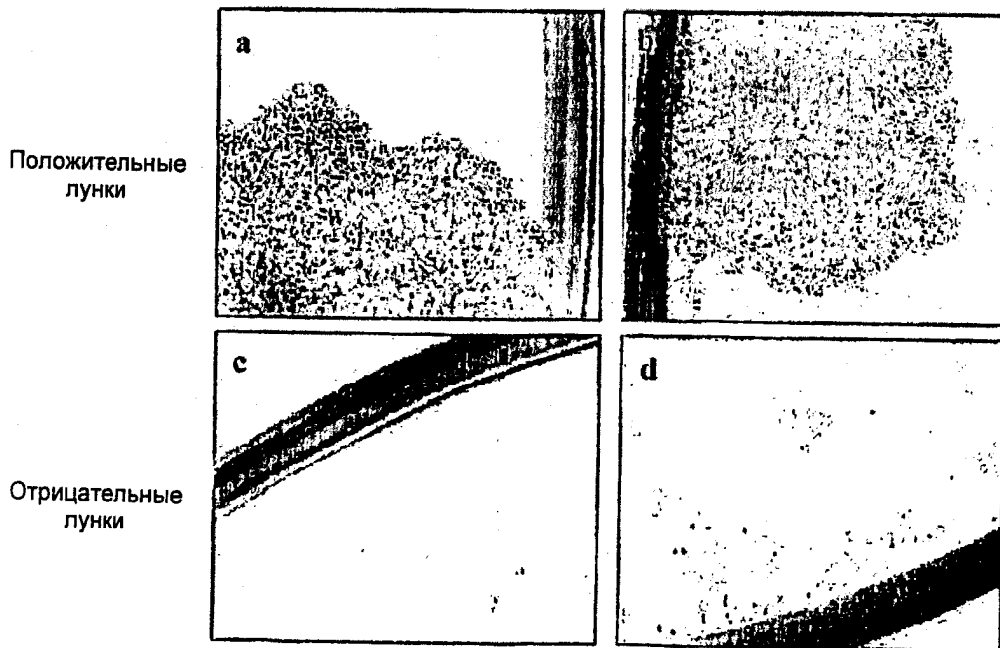
Фиг. 7



Фиг. 8

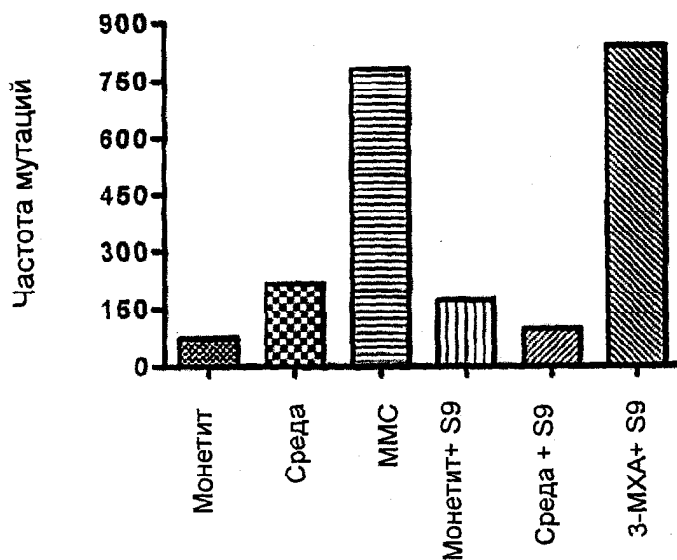


Фиг. 9



Фиг. 10

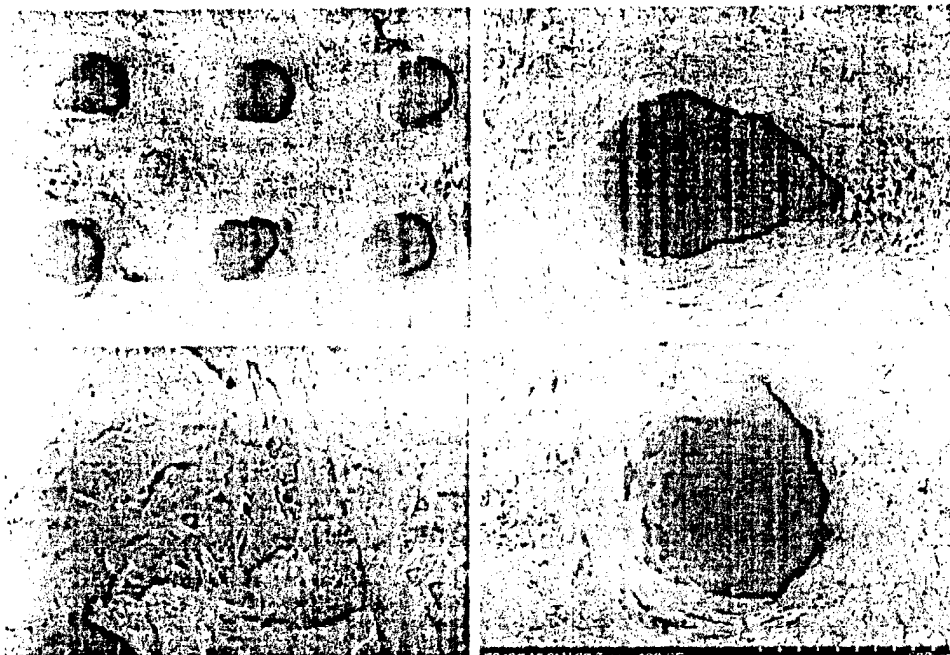
Анализ мутагенности



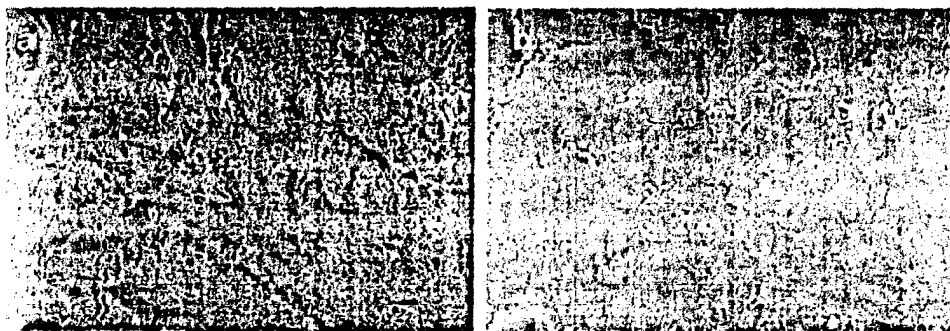
Фиг. 11



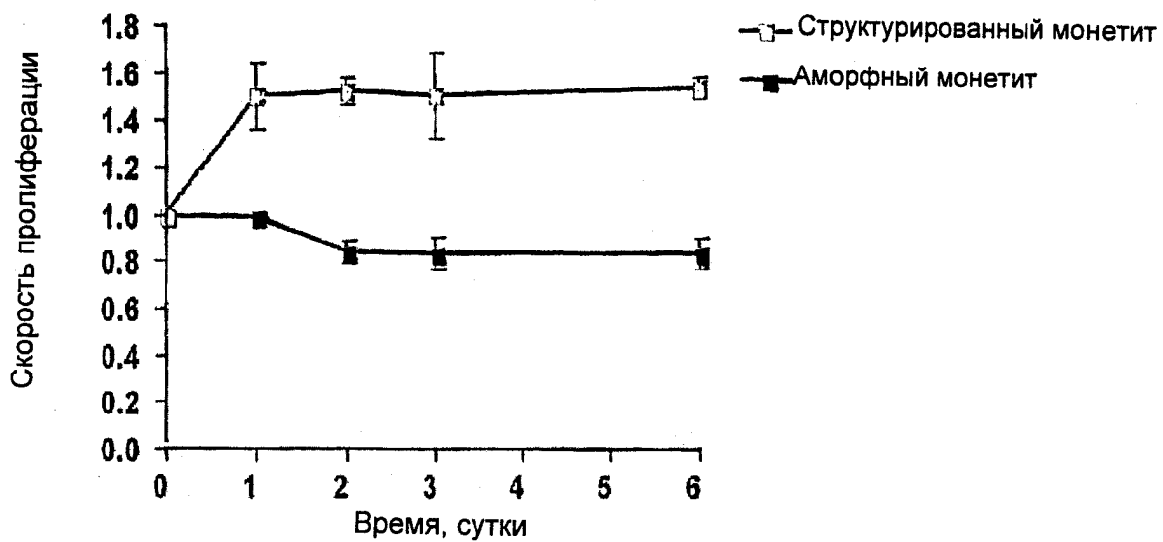
Фиг. 12



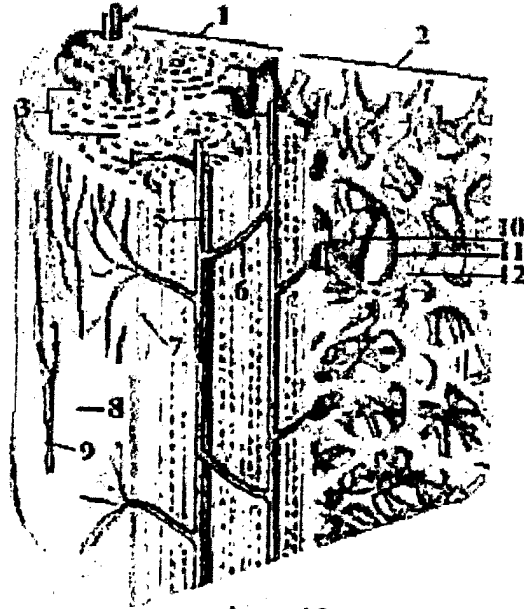
Фиг. 13



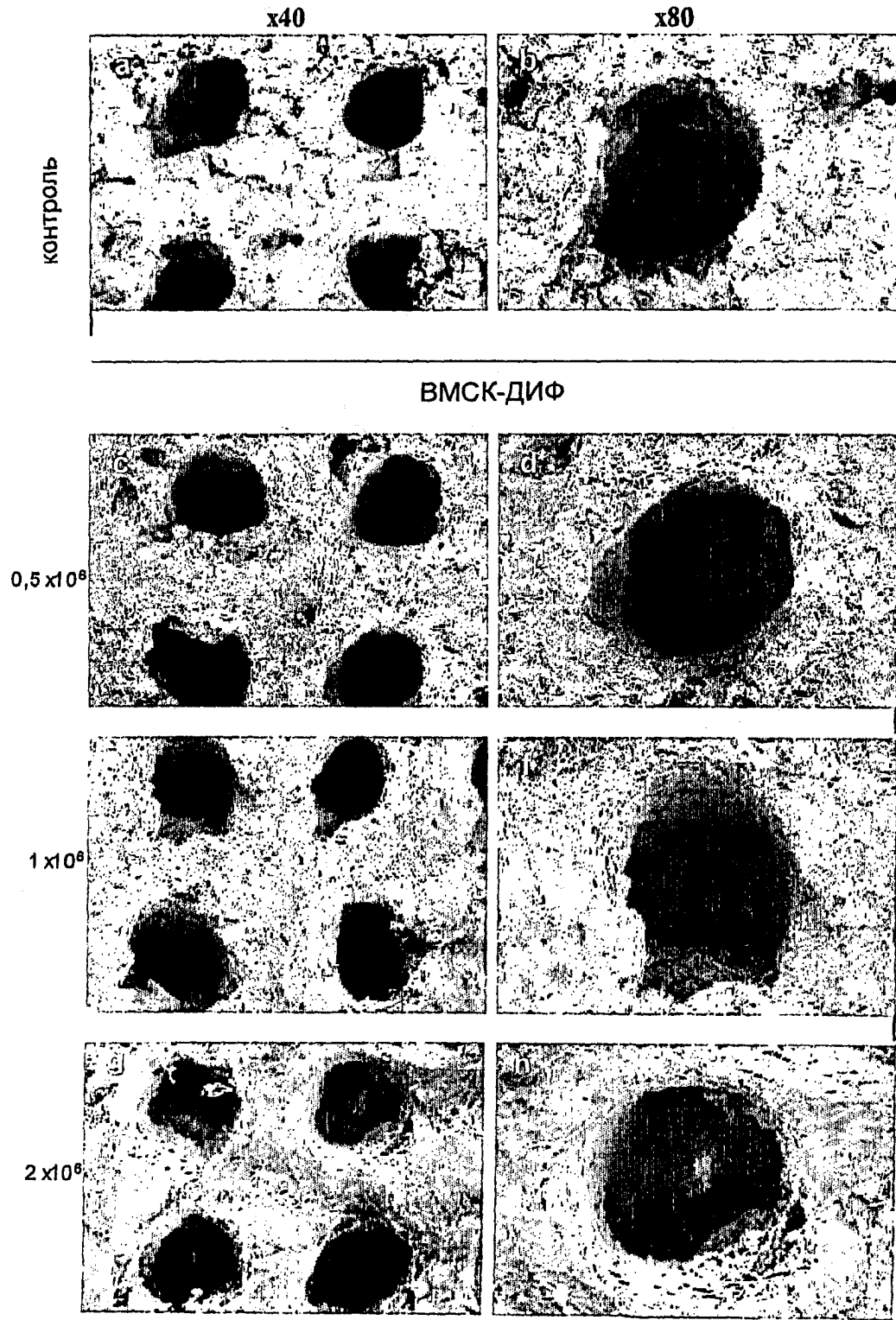
Фиг. 14



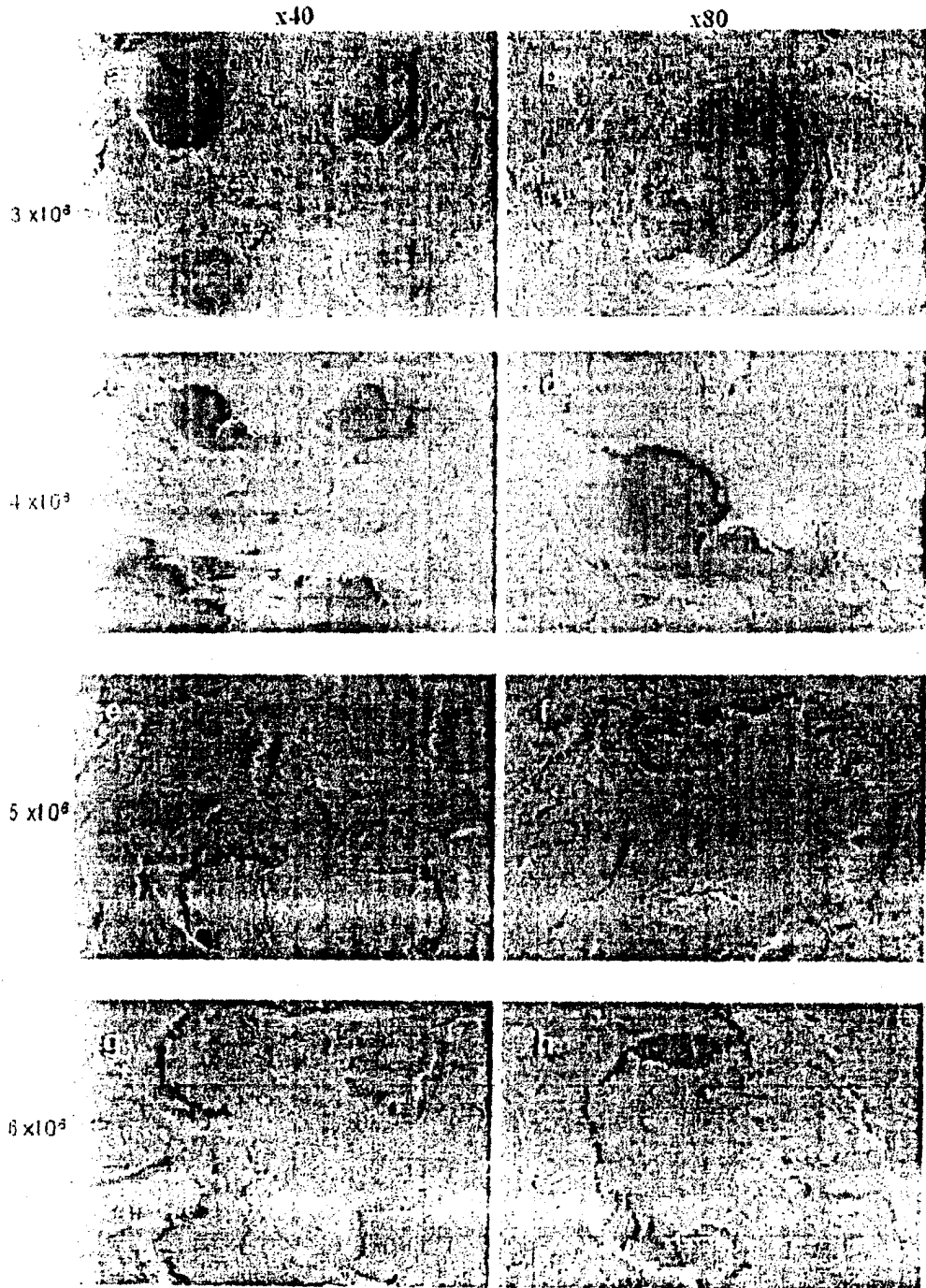
Фиг. 15



Фиг. 16

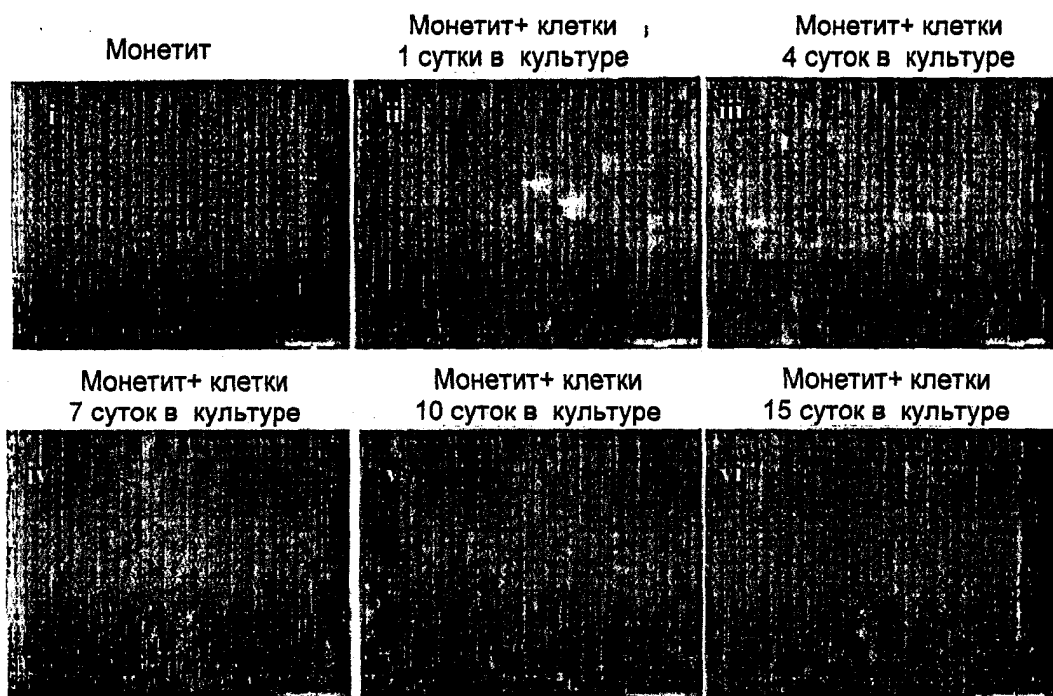


Фиг.17

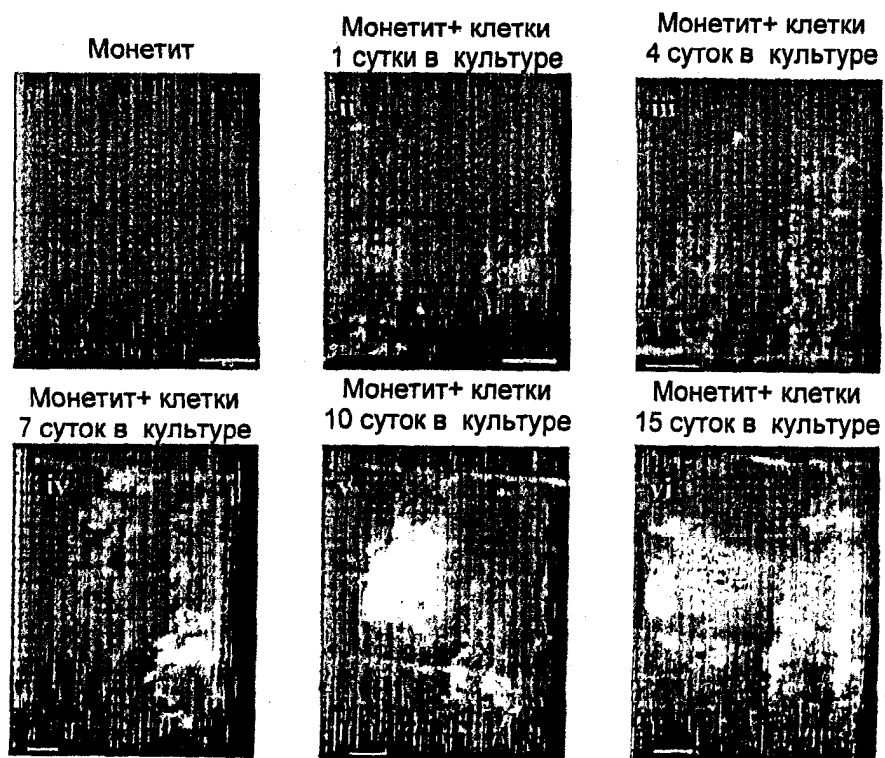


Фиг. 18

а) Вид сверху

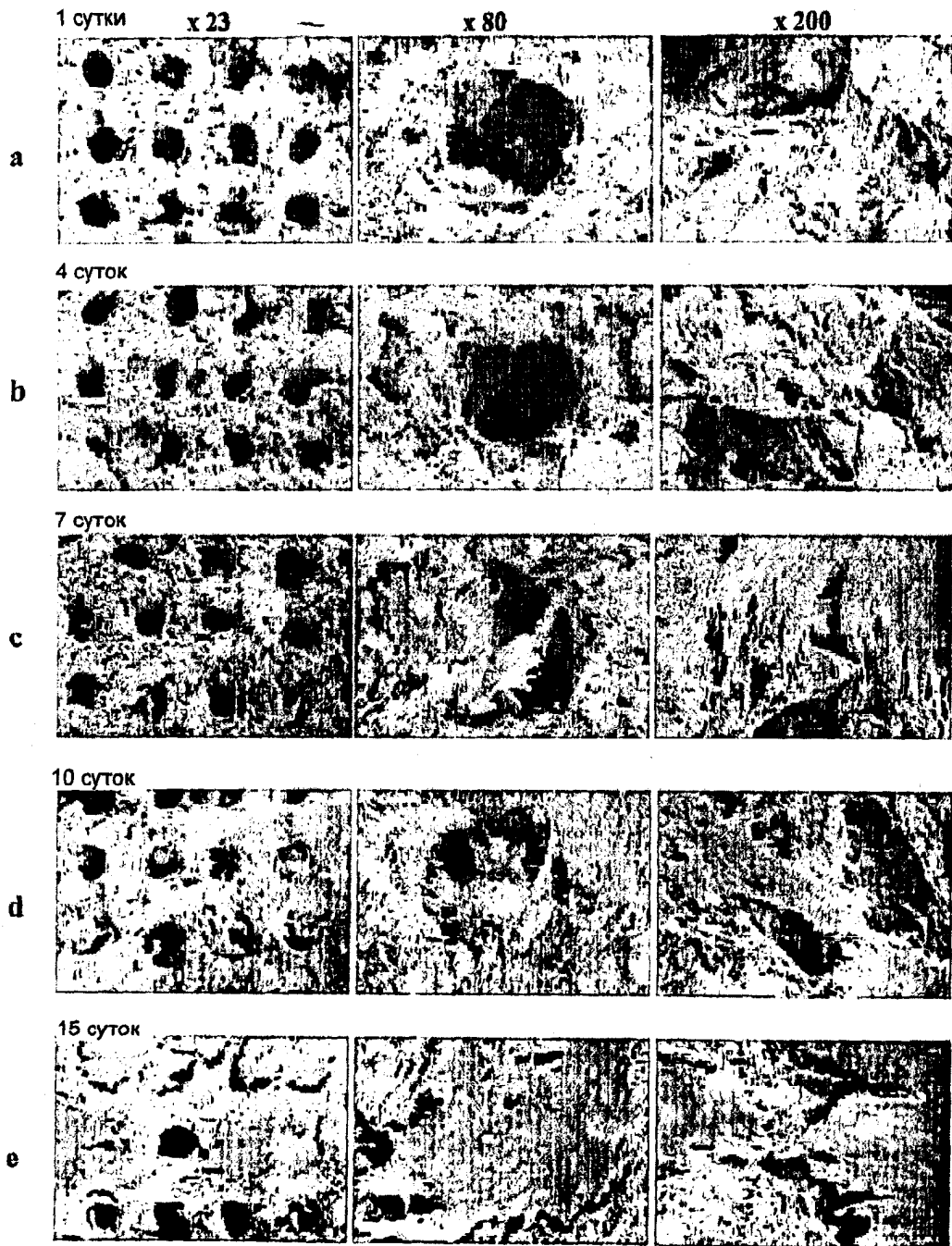


б) Вид сбоку



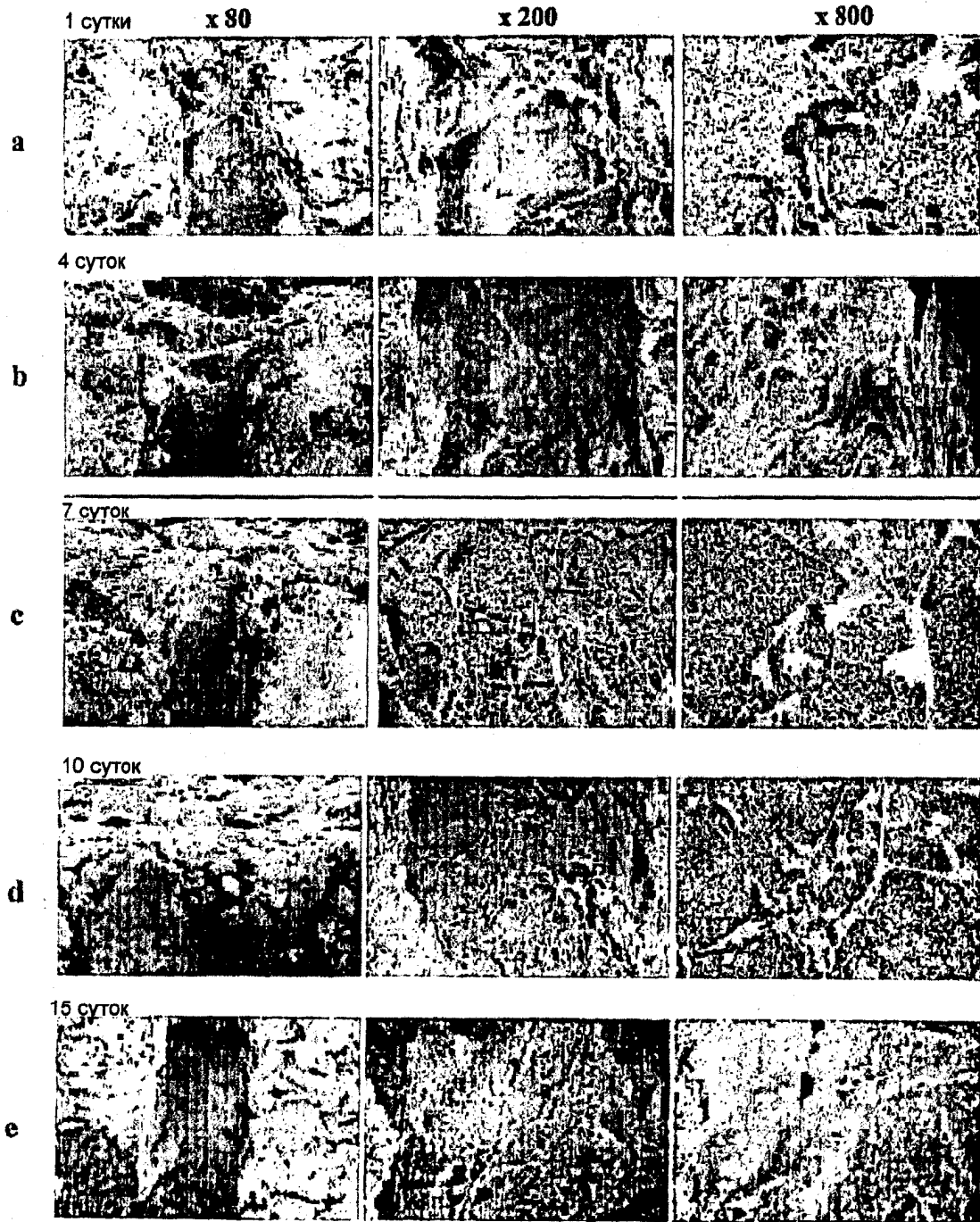
Фиг. 19

Вид сверху

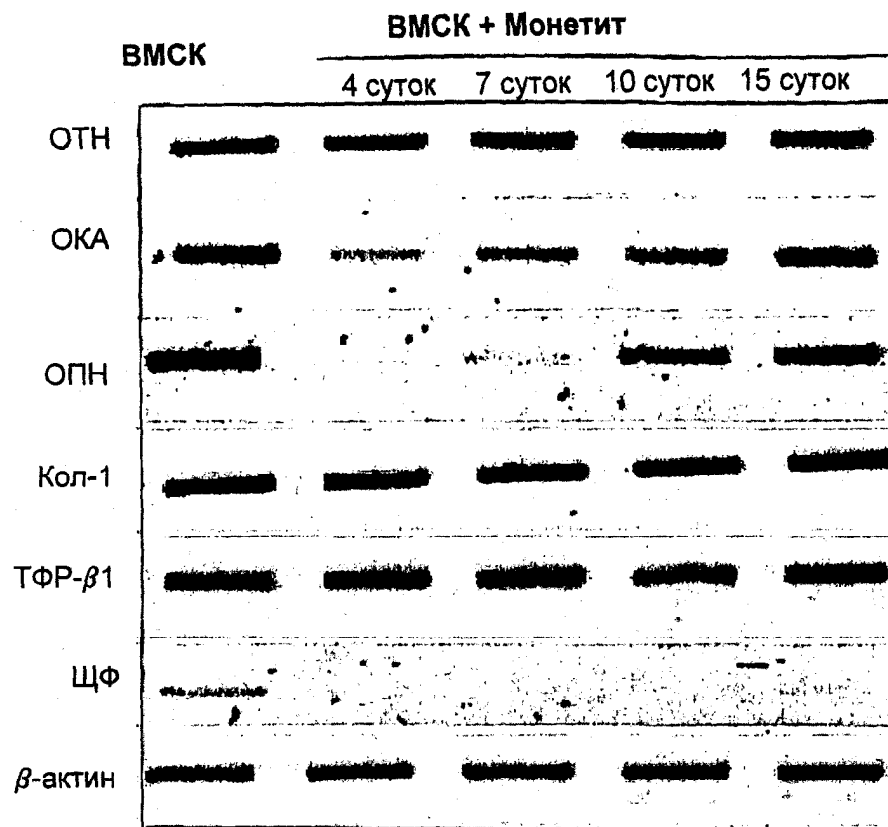


Фиг. 20

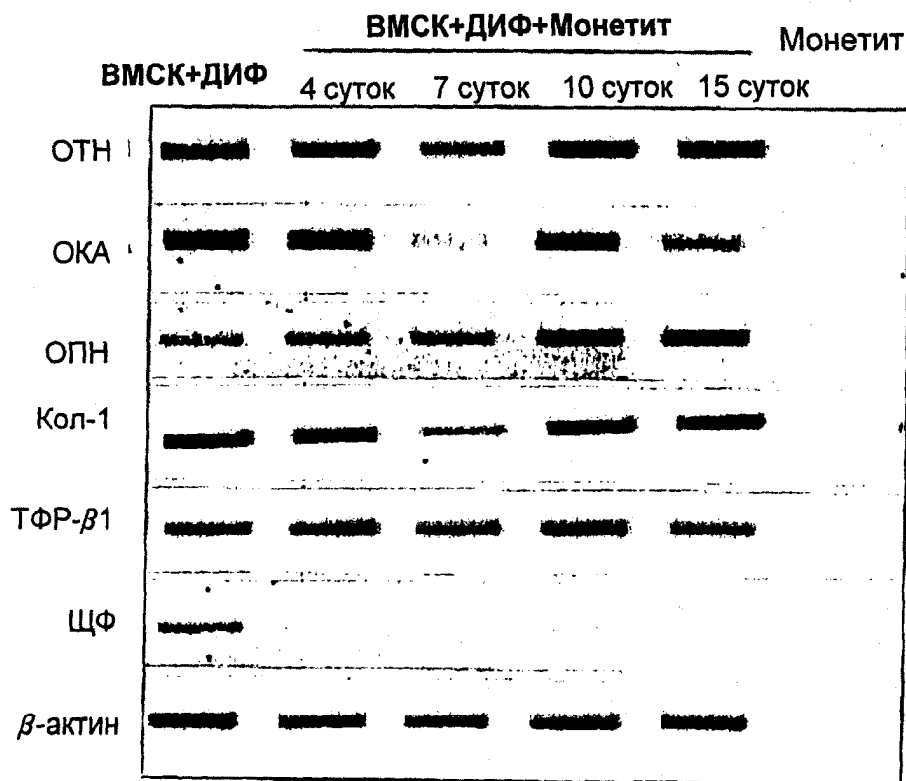
Вид сбоку



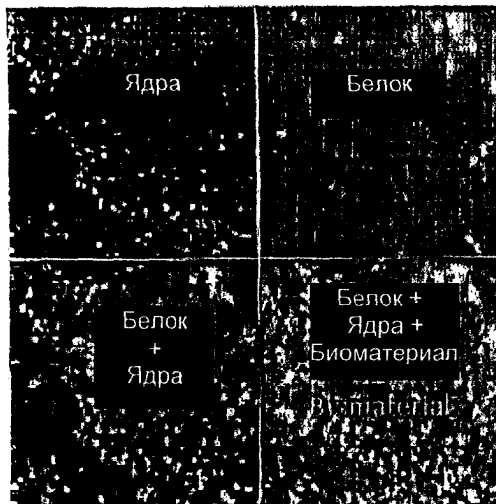
Фиг. 21



Фиг. 22

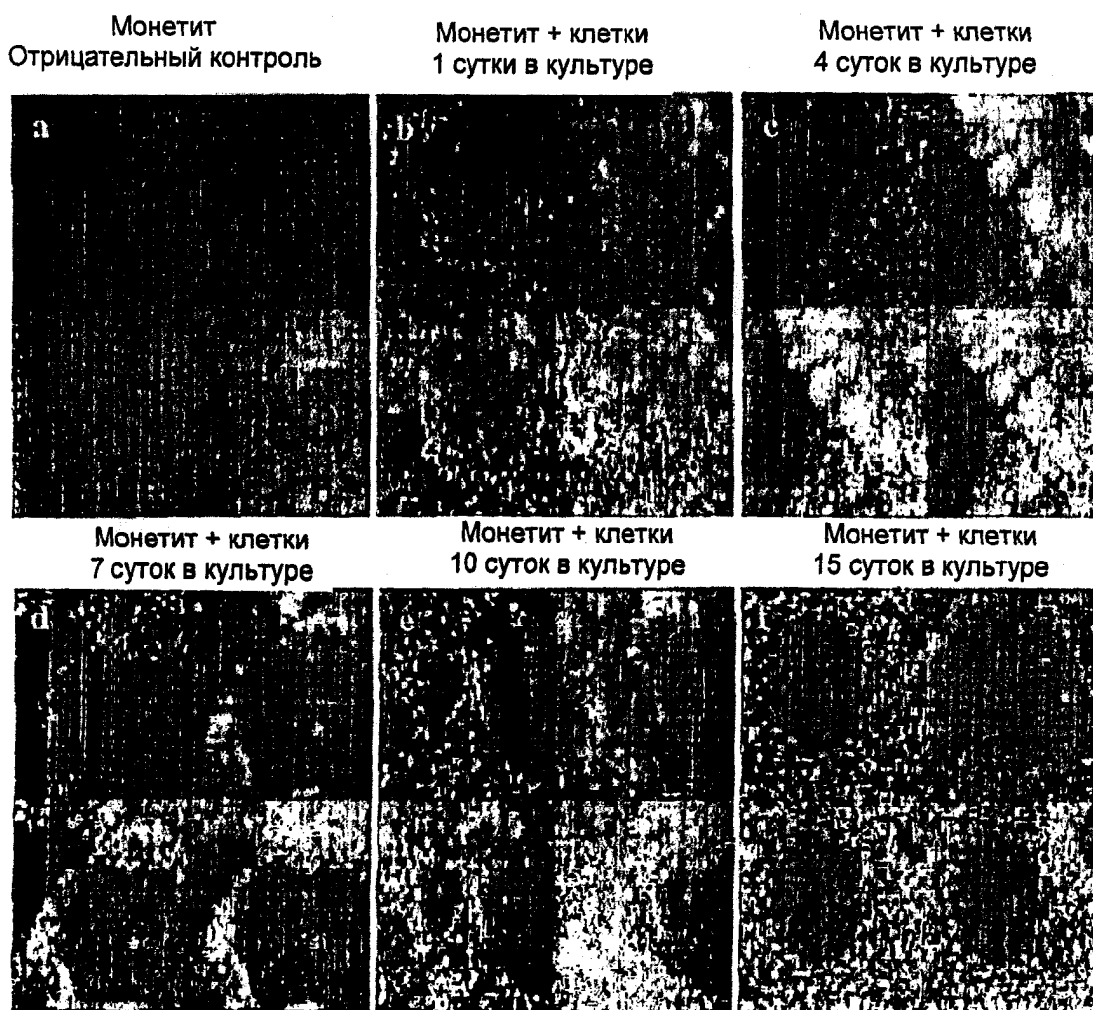


Фиг. 23



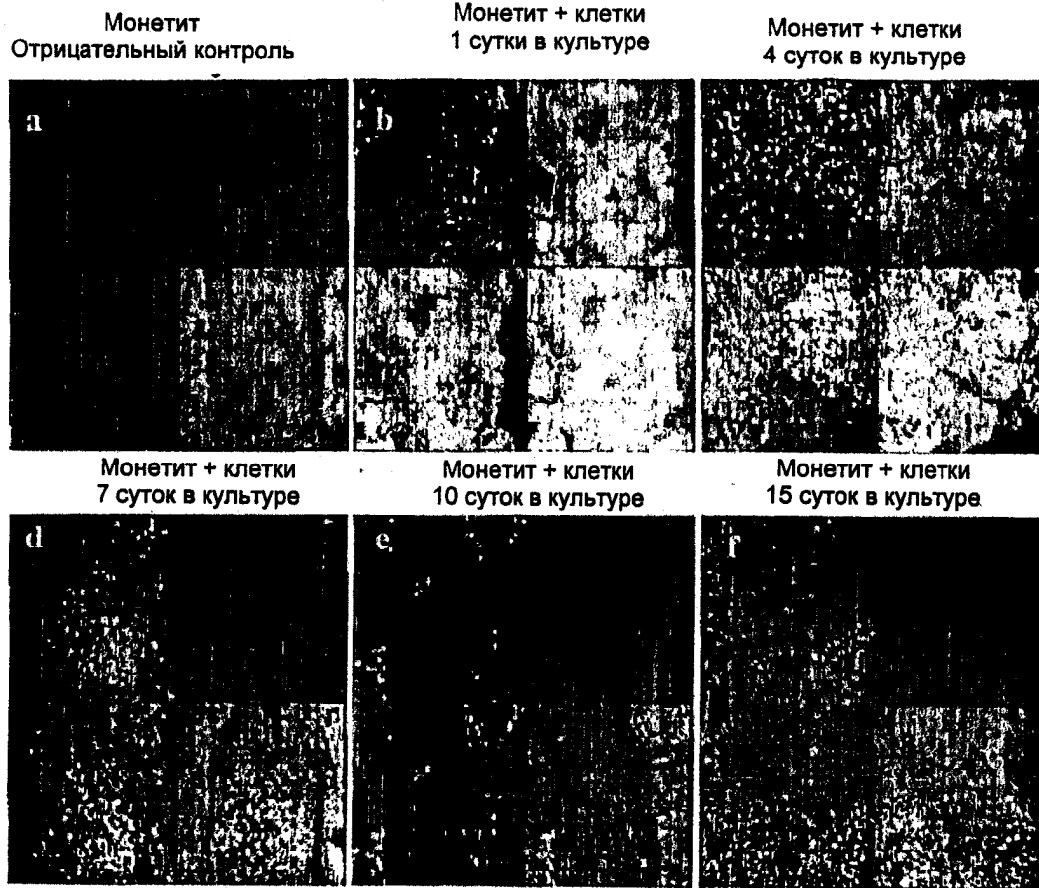
Фиг.24

Коллаген Тип-1 (вид сверху)



Фиг.25

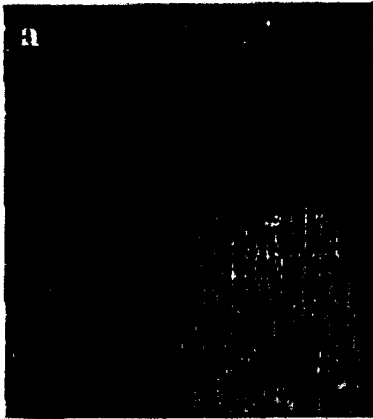
Коллаген Тип-1 (вид сбоку)



Фиг.26

ОКА (вид сверху)

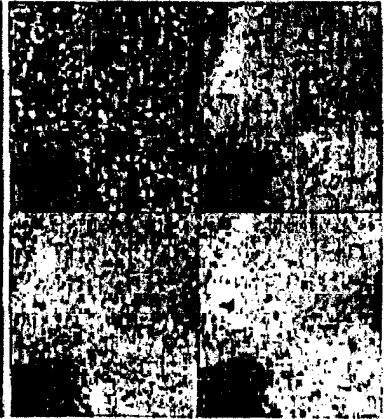
Монетит
Отрицательный контроль



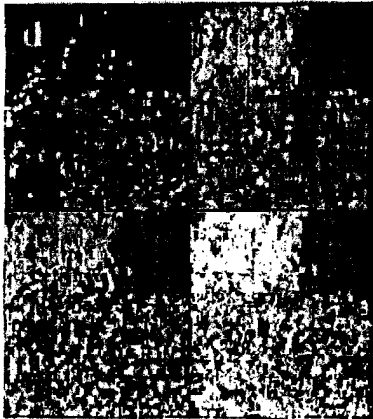
Монетит + клетки
1 сутки в культуре



Монетит + клетки
4 суток в культуре



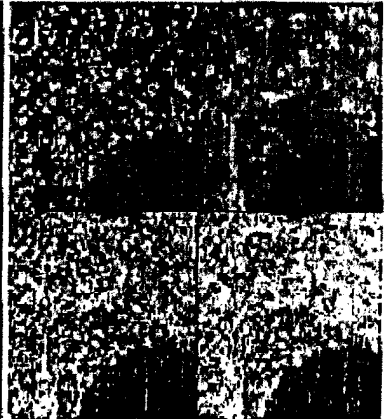
Монетит + клетки
7 суток в культуре



Монетит + клетки
10 суток в культуре

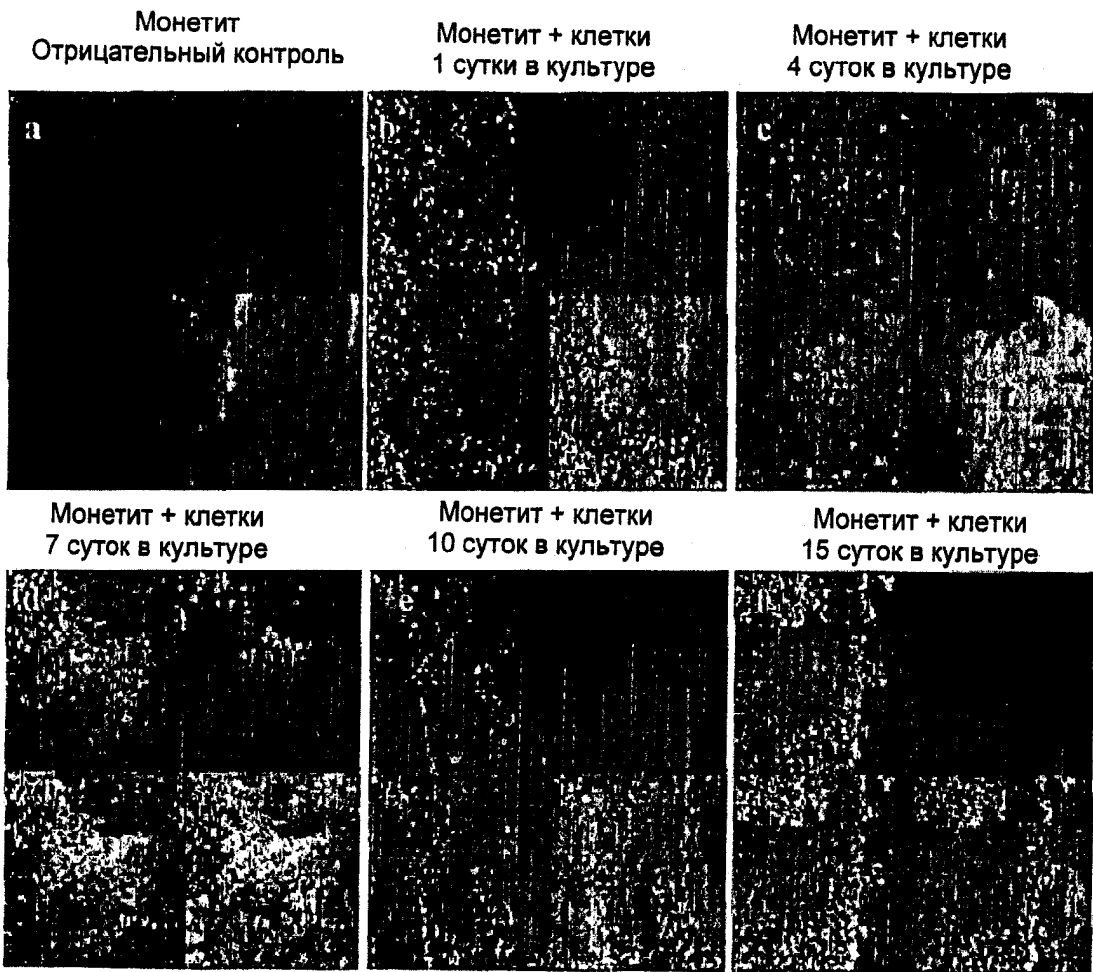


Монетит + клетки
15 суток в культуре



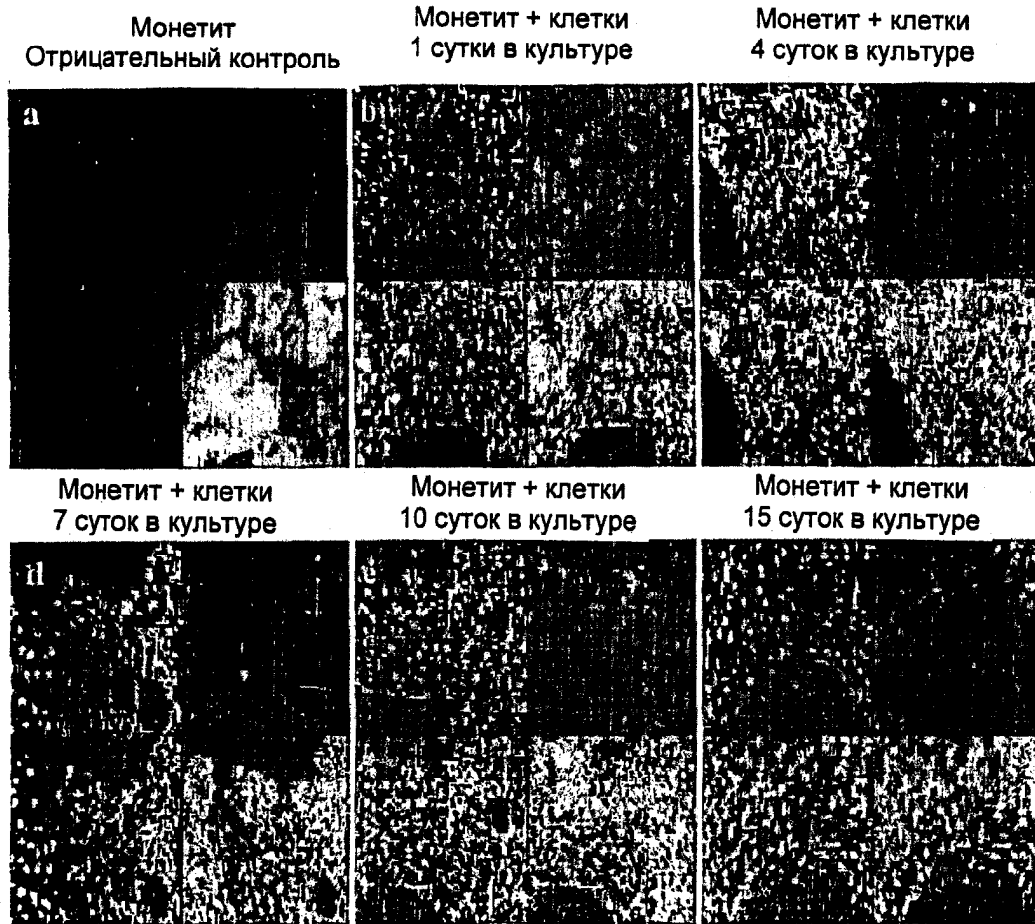
Фиг.27

ОКА (вид сбоку)



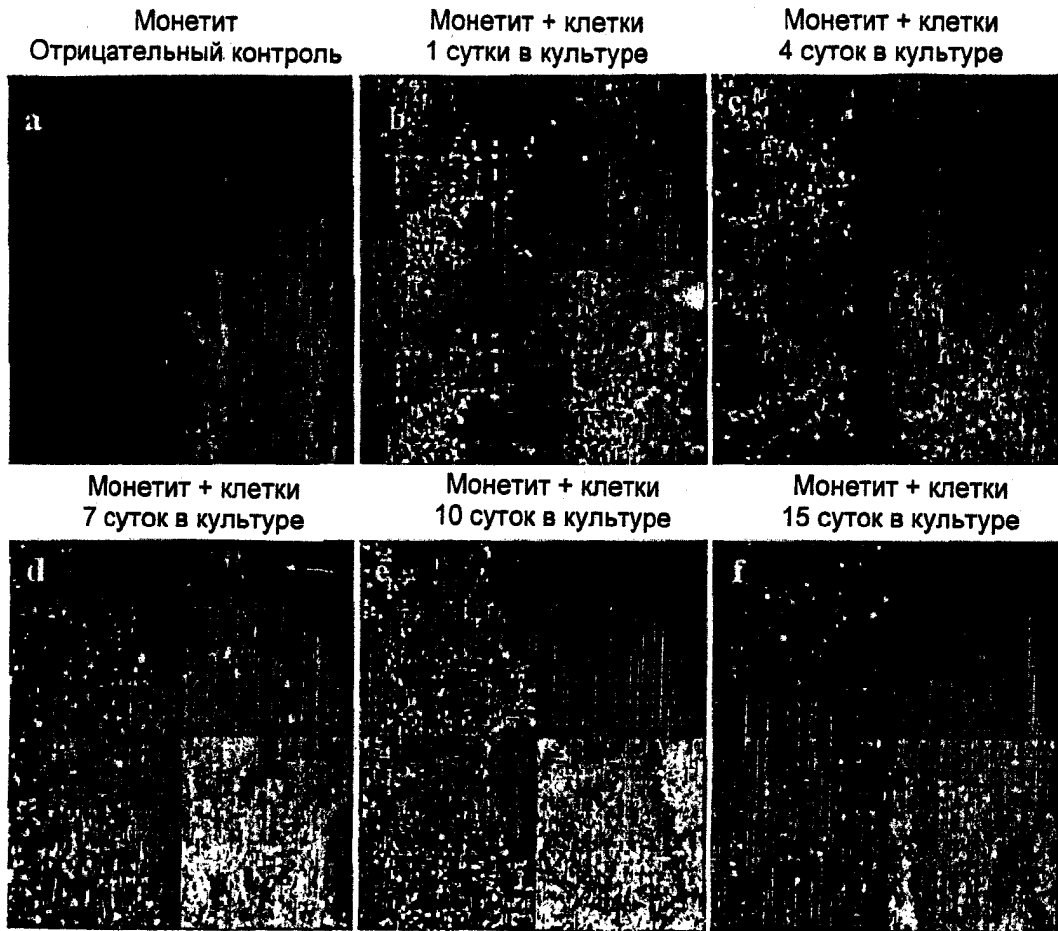
Фиг.28

ОПН (вид сверху)



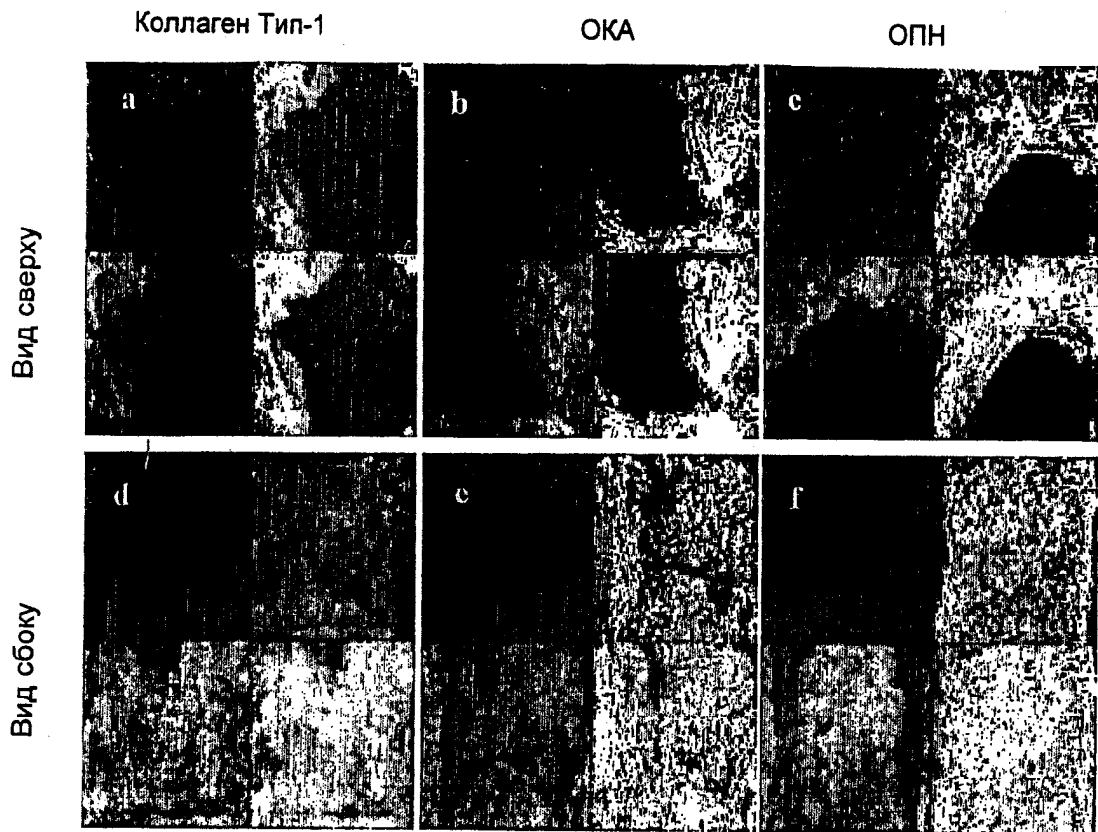
Фиг.29

ОПН (вид сбоку)

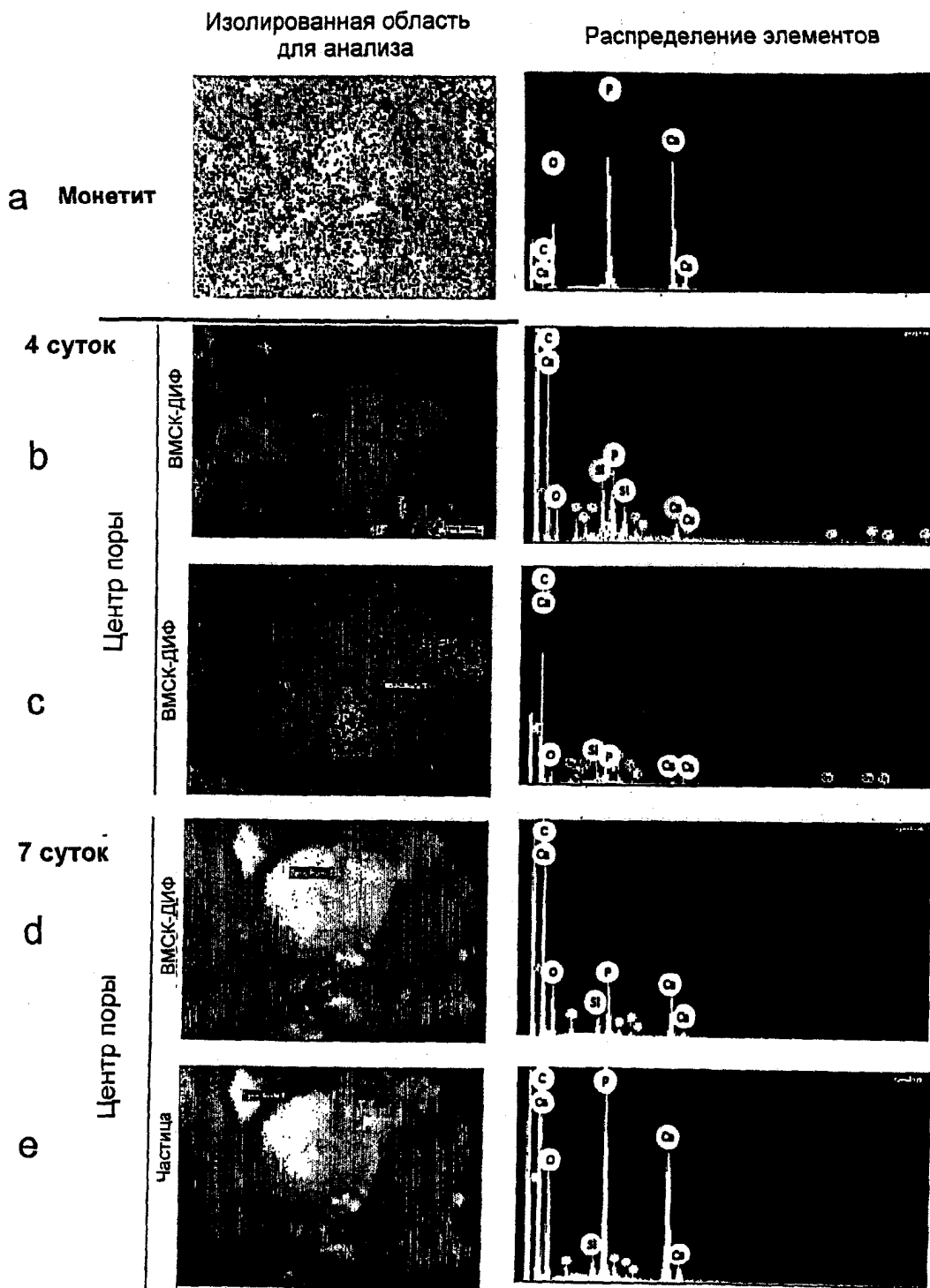


Фиг.30

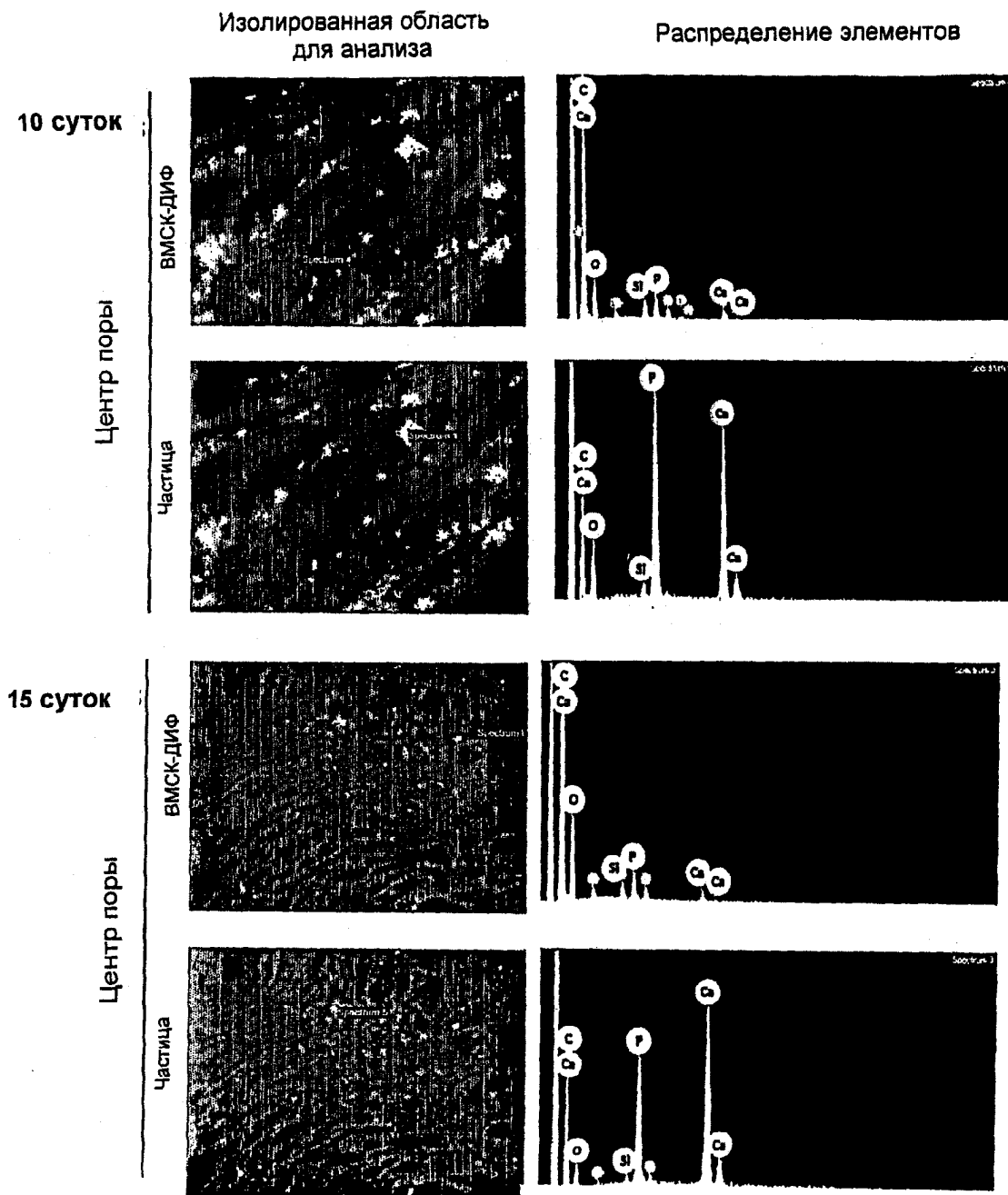
Монетит + ВМСК-ДИФ 4 суток в культуре



Фиг. 31

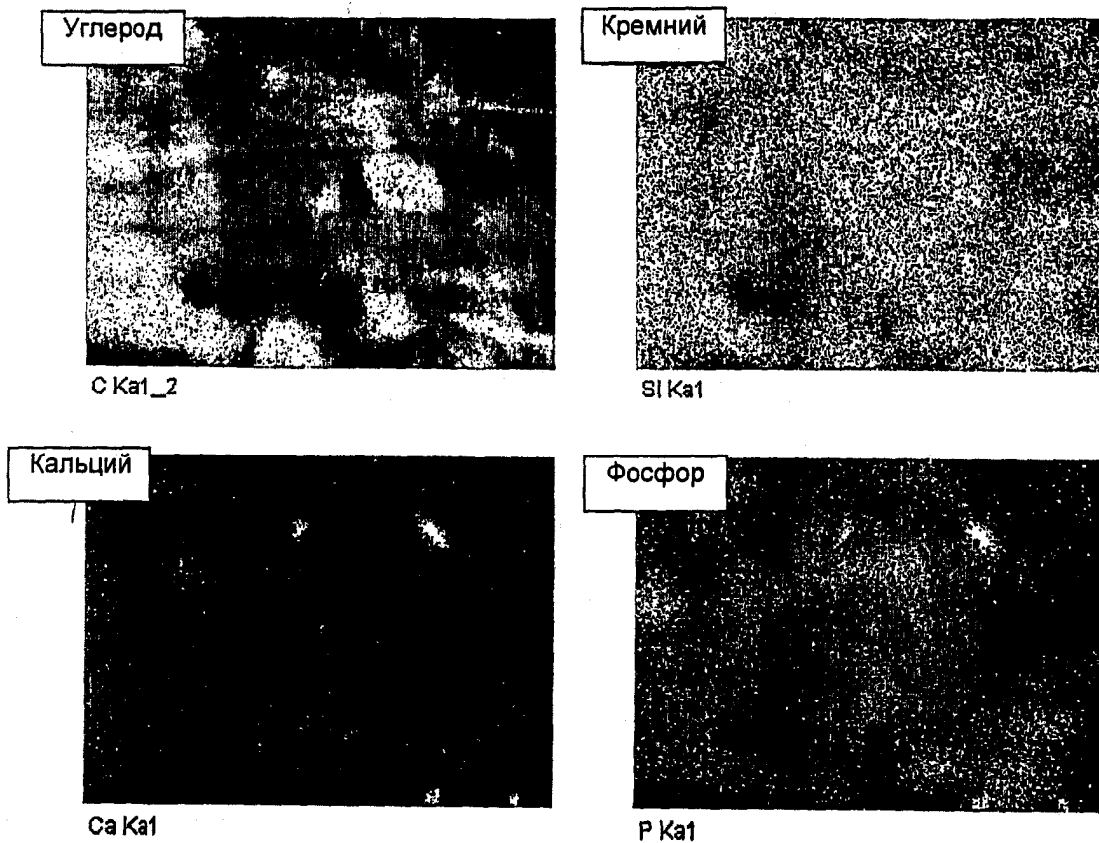


Фиг. 32

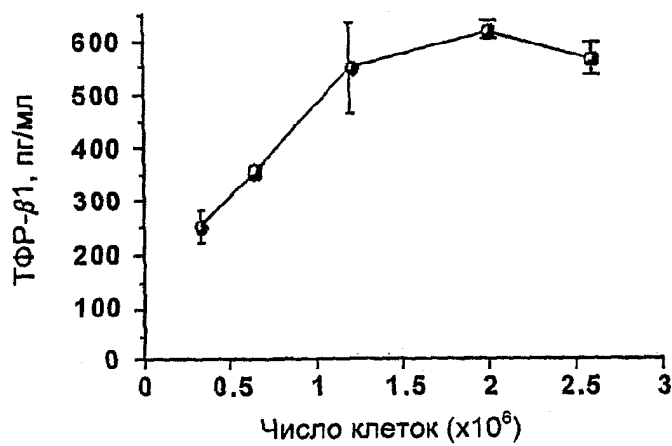


Фиг. 33

Распределение элементов ВМСК-ДИФ в центре одной из пор монетита

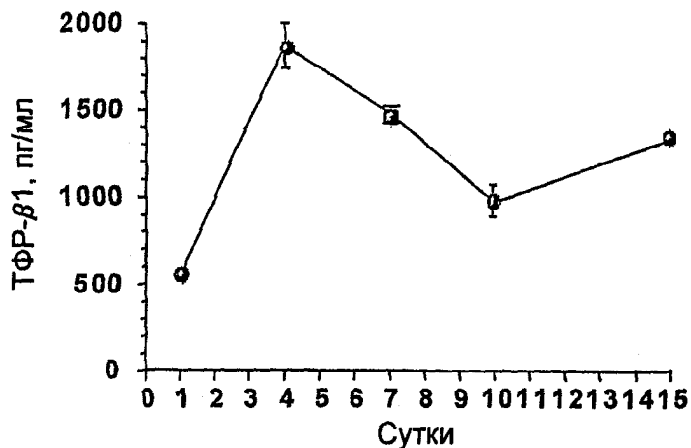


Фиг.34



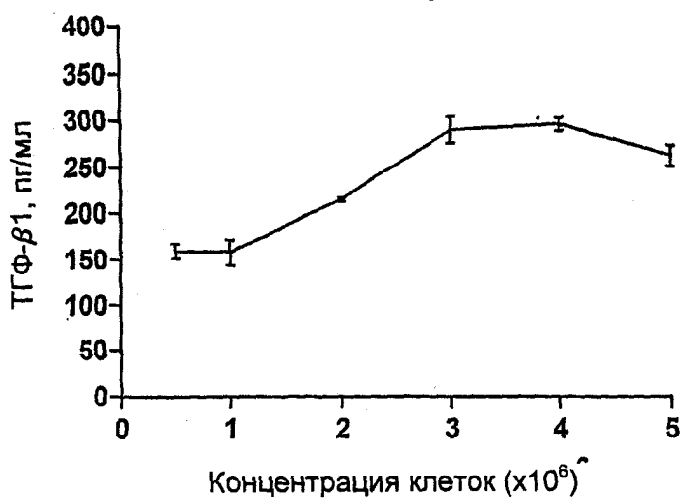
Число клеток	0.5×10^6	1×10^6	2×10^6	3×10^6	4×10^6
ТФР- $\beta 1$, пг/мл	252 ± 30	365 ± 3	616 ± 7	616 ± 7	563 ± 13

Фиг.35



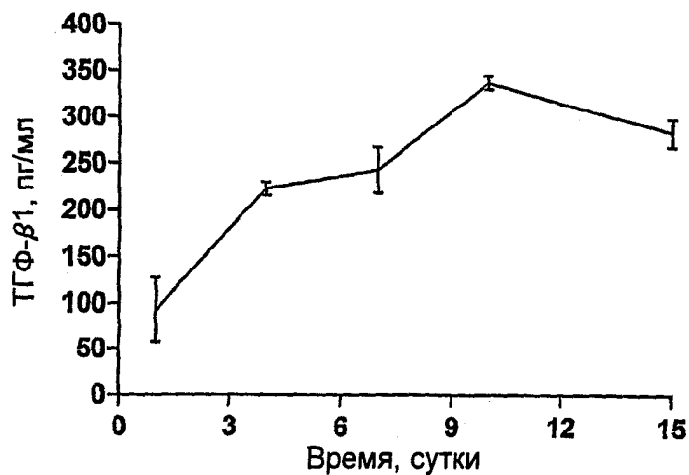
Время в культуре, сутки	1	4	7	10	15
ТФР-β1, пг/мл	550±8	1862±131	1474±31	969±30	1327±15

Фиг.36



Число клеток	0.5x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	3x10 ⁶	4x10 ⁶	5x10 ⁶
ТГФ-β1, пг/мл	159±8	158±14	214±2	289±14	295±7	260±8

Фиг.37



Время в культуре, сутки	1	4	7	10	15
ТГФ-β1, пг/мл	92±35	223±7	243±24	336±7	281±20

Фиг.38