

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047742**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.03

(21) Номер заявки
202291968

(22) Дата подачи заявки
2020.12.18

(51) Int. Cl. *A61K 31/198* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНЫХ И ХРЯЩЕВЫХ ТКАНЕЙ

(31) 102019000025126

(32) 2019.12.20

(33) IT

(43) 2022.10.10

(86) PCT/IB2020/062186

(87) WO 2021/124249 2021.06.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТРЪ ЧИМЕДИКА ИНТЕРНЭШНЛ
СА (СН)**

(72) Изобретатель:
**Маненти Деметрио, Аббьяти
Джулиана (СН)**

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) ADRIANA DI BENEDETTO ET AL: "Osteogenic and Chondrogenic Potential of the Supramolecular Aggregate T-LysYal", FRONTIERS IN ENDOCRINOLOGY, vol. 11, 5 May 2020 (2020-05-05), XP055726171, DOI: 10.3389/fendo.2020.00285 M GELARDI ET AL: "Intranasal T-LysYal as adjunctive therapy for patients after functional endoscopic sinus surgery", J BIOL REGUL HOMEOST AGENTS, vol. 30, no. 1, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 277-284, XP055726177, abstract

STEFANO BARABINO ET AL: "Efficacy of a New Ocular Surface Modulator in Restoring Epithelial Changes in an In Vitro Model of Dry Eye Syndrome", CURRENT EYE RESEARCH, vol. 42, no. 3, 4 March 2017 (2017-03-04), pages 358-363, XP055726183, US ISSN: 0271-3683, DOI: 10.1080/02713683.2016.1184282 abstract
US-B1-6761887

PALMER G D ET AL: "Gene-Induced Chondrogenesis of Primary Mesenchymal Stem Cells in vitro", MOLECULAR THERAPY, CELL PRESS, US, vol. 12, no. 2, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 219-228, XP004991967, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/J.YMTHE.2005.03.024 abstract
EP-A1-1525224

(57) Настоящее изобретение относится к применению производных гиалуроновой кислоты, гетероциклических соединений и природных аминокислот в одиночной, олигомерной или полимерной форме для лечения заболеваний скелета, в частности, при регенерации костной и хрящевой тканей.

B1

047742

047742

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к применению производных гиалуроновой кислоты, гетероциклических соединений и природных аминокислот в одиночной, олигомерной или полимерной форме для лечения заболеваний скелета, в частности, для регенерации костной и хрящевой тканей.

Предшествующий уровень техники

В области биологии ткань определяется как совокупность клеток, сходных по строению и связанным функциям. Следовательно, она представляет собой более высокий уровень клеточной организации, играющий особую роль в организме.

Что касается животного мира, включая человека, можно выделить четыре основных типа тканей: эпителиальная, соединительная, мышечная и нервная ткани, которые, в свою очередь, подразделяются на более специализированные подтипы. У высших животных различные ткани объединяются, образуя более организованные структуры, органы.

Соединительные ткани, такие как костная, жировая, фиброзная и трофическая ткань, представляют собой ткани, состоящие из отдельных клеток, между которыми расположен неживой материал, называемый внеклеточным матриксом (ВКМ). Этот матрикс может быть жидким или твердым; двумя крайними примерами являются кровь, в которой матриксом является плазма, и кости, в которых присутствует минерализованная ткань и чрезвычайно жесткий матрикс. Именно из-за этой своеобразной характеристики костную ткань иногда называют "твердой тканью"; в отличие от "мягких тканей", которые обычно относятся к другим соединительным тканям.

Хрящ, ткань-предшественник кости, также является частью соединительной ткани. Он состоит в основном из клеток, называемых хондроцитами, которые способны продуцировать большое количество внеклеточного матрикса, в основном состоящего из коллагена, эластина и протеогликанов.

Регенерация тканей, которая должна происходить после травм или заболеваний для обеспечения полного заживления, представляет собой процесс, основанный на обновлении и дифференцировке клеток вовлеченной ткани (тканей).

Регенеративная медицина - это новая область исследований, которая в последние годы привлекла интерес; она сочетает в себе различные аспекты медицины, клеточной биологии и биоинженерии с конечной целью регенерации, восстановления или замены поврежденных или отсутствующих тканей. Различные направления исследований, включающие как дифференцированные клетки, так и стволовые клетки, нацелены на оптимизацию регенерации, заживления и/или замены поврежденных тканей.

Один из наиболее широко используемых подходов в области регенерации костной и хрящевой тканей на сегодняшний день основан на использовании мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Что касается хряща, то, несмотря на то что была продемонстрирована дифференцировка хряща из МСК, клиническое использование этого подхода все еще ограничено и не является полностью успешным. Регенерация хряща также может быть достигнута такими методами, как трансплантация тканей (ауто-трансплантатов или алло-трансплантатов), или методами, известными в литературе, адаптированными для стимуляции естественного процесса восстановления. Таким образом, методики, признанные на сегодняшний день наиболее надежными в случае хрящевых тканей, направлены либо на улучшение регенеративных свойств тканей, либо на трансплантацию хондроцитов с целью увеличения или заживления остаточной ткани.

Что касается костной ткани, костный мозг по-прежнему является предпочтительным источником для выделения МСК, из которых можно получить дифференцированные костные клетки, но известны и другие источники получения МСК, такие как зубная ткань.

Наконец, известно, что внеклеточный матрикс играет важную роль в клеточной дифференцировке соединительной ткани; в частности, взаимодействие МСК с ВКМ позволяет улучшить остеогенную дифференцировку этих клеток. Фактически, внеклеточный матрикс содержит множество макромолекул, в том числе коллаген, адгезивные гликопротеины и гликозаминогликаны (ГАГ), которые не только играют роль в поддержании клеток и определяют структуру ткани, но также способствуют распространению факторов роста и взаимодействиям клеток с микроокружением, тем самым влияя на поведение клеток.

Несмотря на многочисленные исследования и прогресс, достигнутый в последние годы в области использования стволовых клеток, реконструкция дефектов костной и хрящевой тканей по-прежнему остается сложной задачей для регенеративной медицины, так как известные на сегодняшний день методы лечения лишь частично эффективны и не всегда осуществимы.

Поэтому возникает необходимость поиска новых путей и подходов для более простого и эффективного решения проблемы регенерации и заживления костной и хрящевой тканей организма.

Описание изобретения

Класс производных гиалуроновой кислоты, в которых эта молекула связана по меньшей мере с одним гетероциклическим соединением, полученным из пуринового или пиримидинового основания, и по меньшей мере с другим органическим соединением, состоящим из природной аминокислоты в одиночной, олигомерной или полимерной форме, и методики их получения описаны в EP 1525224.

Вышеупомянутые производные гиалуроновой кислоты, гликозаминогликана (ГАГ), естественным образом присутствующие во внеклеточном матриксе (ВКМ), представляют собой более стабильную

форму, чем нативная, поскольку связанные с ней соединения находятся в участках-мишенях литического фермента гиалуронидазы, обычно ответственного за деградацию гиалуроновой кислоты, что затрудняет действие данного фермента. Кроме того, в зависимости от типа выбранных гетероциклических соединений и аминокислот, эти производные демонстрируют особую трехмерную структуру, обеспечивающую их способность к модификации микроокружения ВКМ.

Таким образом, объектом настоящего изобретения является применение указанных производных гиалуроновой кислоты для регенерации костной и хрящевой тканей благодаря высокому регенеративному потенциалу указанных тканей, отмеченному в экспериментальной части, сопровождающей настоящее описание.

Таким образом, соединения гиалуроновой кислоты и по меньшей мере одного гетероцикла, полученного из пурина и/или пиримидина, связанные по меньшей мере с одним другим органическим соединением, выбранным из природных аминокислот в одиночной, олигомерной или полимерной форме, используются в соответствии с настоящим изобретением при лечении заболеваний скелета, в частности, при регенерации твердых тканей.

Согласно настоящему изобретению, производные гиалуроновой кислоты, применение которых является объектом настоящего изобретения, содержат гиалуроновую кислоту с высокой молекулярной массой в диапазоне от 400000 до 4 миллионов Дальтон, предпочтительно от 800000 до 3,5 миллионов Да, более предпочтительно от 1,5 до 3 миллионов Да.

При необходимости, производные гиалуроновой кислоты, применение которых является объектом настоящего изобретения, содержат гиалуроновую кислоту с низкой молекулярной массой, например, в диапазоне от 80000 до 400000 Да.

Молекулярные массы полимеров в целом и гиалуроновой кислоты в частности представляют собой, например, среднечисленную молекулярную массу M_n , определяемую как среднее значение масс полимерных цепей:

$$M_n = \sum_{(i)} N_i M_i / \sum_{(i)} N_i$$

где M_i представляет собой молекулярную массу, а N_i представляет собой число цепей или средневесовую молекулярную массу M_w , которая определяется как:

$$M_w = \sum_{(i)} N_i M_i^2 / \sum_{(i)} N_i M_i$$

На эту величину больше влияет фракция с более высокой молекулярной массой, и она выше, чем средневесовая молекулярная масса.

Определение средней молекулярной массы полимера имеет большое значение, поскольку она представляет собой основную характеристику полимера, с которой связаны многие его свойства. Молекулярная масса может быть определена различными методами, включая методику центрифугирования (седиментационные весы), методику светорассеяния и осмометрию.

Скорость, с которой молекулы оседают в ультрацентрифуге, пропорциональна их молекулярной массе: фактически, если предположить, что масса молекулы увеличивается с увеличением ее объема, молекулярная масса может быть определена на основе скорости осаждения.

Методика светорассеяния основана на том принципе, что при пересечении лучом света пустого пространства по прямой линии он не теряет энергии на своем пути. С другой стороны, если в пространстве присутствуют частицы любого вида, можно наблюдать, что световой луч рассеивается или подвергается отклонениям во всех направлениях присутствующими частицами. Таким образом, первичный световой луч теряет часть своей энергии и его интенсивность уменьшается.

Можно разработать теорию определения молекулярной массы полимера M путем измерения интенсивности рассеянного света и, таким образом, фотодиффузии самого полимера, помещенного в разбавленный раствор в подходящем растворителе.

Полученная молекулярная масса имеет среднее значение, и можно показать, что в данном случае она является средневесовой.

Из вышеперечисленных методов наиболее важным и распространенным является осмометрия. Измеряют значение π осмотического давления для растворов с различной концентрацией полимера C . При этом учитывают, что:

$$\pi = CRT$$

Когда известна температура T , при которой проводят измерение, рассчитывают значение молекулярной массы, учитывая, что C = масса/молекулярная масса.

Вместо этого наиболее широко используемым стандартным методом определения химико-физических характеристик полимера является ГПХ (гель-проникающая хроматография).

В соответствии с настоящим изобретением выбранные гетероциклические соединения представляют собой производные пуриновых оснований, выбранных, например, из аденина и гуанина, и/или пиримидиновых соединений, выбранных, например, из тимина, цитозина и урацила. Предпочтительным основанием по изобретению является пиримидиновое основание, такое как тимин.

Другие пуриновые или пиримидиновые производные, которые можно использовать для образования соединений, применение которых является целью настоящего изобретения, могут быть выбраны из

5,6-дигидроурацила, 1-метилурацила, 3-метилурацила, 5-гидроксиметилурацила, 2-тиоурацила, N⁴-ацетилцитозина, 3-метилцитозина, 5-метилцитозина, 5-гидроксиметилцитозина, 1-метиладенина, 2-метиладенина, 7-метиладенина, N⁶-метиладенина, N⁶,N⁶-диметиладенина, N⁶-(Δ^2 -изопентенил)аденина, 1-метилгуанина, 7-метилгуанина, N²-метилгуанина, N²,N²-диметилгуанина.

Предпочтительно в производных гиалуроновой кислоты, применение которых является предметом настоящего изобретения, взаимодействие между цепью гиалуроновой кислоты и пуриновыми или пиримидиновыми основаниями происходит благодаря по меньшей мере одной ионной связи между остатком -COOH указанной кислоты и основным центром, в частности, основным азотом указанных гетероциклических оснований.

На практике, согласно настоящему изобретению, гиалуроновую кислоту подвергают взаимодействию по меньшей мере с одним пуриновым и/или пиримидиновым основанием, выбранным из указанных выше, в условиях реакции, обеспечивающих образование по меньшей мере одного типа ионной связи между по меньшей мере одним кислотным центром гиалуроновой кислоты, таким как, например, свободная карбоксильная группа в форме кислоты или карбоксилатной соли, и по меньшей мере одним основным центром пуринового и/или пиримидинового основания, также в форме свободного основания или аммонийной соли.

Согласно настоящему изобретению, производные гиалуроновой кислоты, применение которых является объектом настоящего изобретения, могут содержать более одного типа пуринового и/или пиримидинового основания с переменным обратным соотношением; поэтому указанные производные могут быть представлены "смешанными" солями, состоящими из различного числа пуриновых/пиримидиновых оснований.

Производные гиалуроновой кислоты, применение которых является объектом настоящего изобретения, также включают по меньшей мере одну природную аминокислоту или ее олигомер или полимер, чтобы обеспечить дополнительный продукт солеобразования благодаря группам -COOH, присутствующим и остающимся свободными в структуре гиалуроновой кислоты. Аминокислоты, которые можно использовать для образования этих производных, выбирают, например, из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, цистеина, фенилаланина, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, пролина, серина, тирозина, треонина, триптофана и валина. Предпочтительно указанные аминокислоты выбирают из лизина и аланина.

Характеристики указанных производных отражают характеристики гиалуроновой кислоты, пуриновых и/или пиримидиновых оснований и аминокислот, которые, в свою очередь, связаны по меньшей мере одной легко гидролизуемой связью ионного типа, что делает различные компоненты легко доступными *in situ*.

Особенно предпочтительным является соединение, продаваемое в настоящее время под обозначением T-LysYal® (T-Lys), производное гиалуроновой кислоты, лизина и тимина, полученное путем образования связей ионного типа.

В соответствии с настоящим изобретением указанные соединения гиалуроновой кислоты по меньшей мере одного гетероциклического соединения, выбранного из производных пурина и/или пиримидина, и по меньшей мере одной природной аминокислоты, или ее олигомера или полимера можно успешно использовать для индукции и стимуляции дифференцировки клеток остеогенной и хондрогенной линии МСК.

Следовательно, в соответствии с настоящим изобретением можно использовать производные гиалуроновой кислоты, описанные выше, для лечения заболеваний скелета, в частности, при регенерации костной и хрящевой тканей.

В соответствии с настоящим изобретением, указанные производные гиалуроновой кислоты предпочтительно используют, как уже упоминалось, для индукции и стимуляции клеточной дифференцировки в остеогенной и хондрогенной линии МСК.

Согласно изобретению, также можно интегрировать указанные производные гиалуроновой кислоты в подходящие фармацевтические составы и/или имплантируемые каркасы, которые можно использовать для поддержки регенерации костной и хрящевой тканей.

Указанные производные могут быть дополнительно использованы в терапии для восстановления и регенерации костной и хрящевой тканей.

Объектом настоящего изобретения является применение указанных производных в лечении, связанном с регенерацией костной и хрящевой тканей. В соответствии с настоящим изобретением указанные производные могут быть предпочтительно интегрированы в имплантируемые каркасные системы или другие фармацевтически подходящие составы.

Под другими "фармацевтически подходящими составами" подразумеваются растворы и/или суспензии для парентерального применения, твердые формы (например, таблетки, капсулы, гранулы) или полутвердые формы (например, гели, пасты, кремы, мази), для перорального или местного применения, внутримышечных и/или подкожных имплантатов и других составов, известных специалисту в данной области техники, но не ограничиваясь ими.

Потенциальные возможности изобретения описаны в экспериментальной части ниже, в которой представлены исследования, проведенные с использованием указанных производных гиалуроновой кислоты, в отношении их способности к клеточной регенерации твердых тканей организма. Следующие примеры предназначены только для иллюстративных целей и никоим образом не являются ограничением изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Влияние T-Lys на дифференцировку МСК в сторону остеобластной линии. Секции: (А) количественная ПЦР, проведенная на DBSC, выращенных в остеогенной среде и стимулированных 0,3% T-Lys, и контрольных DBSC; (В) анализ посредством иммуноблоттинга экспрессии белков Runx-2 и Col 1; (С) гистохимический анализ фермента ЩФ (пурпурное окрашивание).

Фиг. 2. Влияние T-Lys на отложение минерального матрикса во время остеогенной дифференцировки МСК. Отложение минерального матрикса тестировали с помощью ARS (красное окрашивание) в клетках, обработанных T-Lys, гиалуроновой кислотой, и в контроле.

Фиг. 3. Влияние T-Lys на экспрессию типичных маркеров в культурах хондроцитов. кПЦР проводили на культурах конгломерата хондроцитов, выращенных в хондрогенной среде и стимулированных 0,3% T-Lys, и группе отрицательного контроля (Ctr).

Фиг. 4. Влияние T-Lys на пролиферацию хондроцитов и рост тканей. Секции: (А) изображения и измерения культур конгломератов разделенных хондроцитов, обработанных T-Lys, и контрольных групп; (В) изображения и измерения отложения хрящевого матрикса разделенных хондроцитов, обработанных T-Lys, и контрольных групп; (С) теоретическая реконструкция толщины культур конгломератов хондроцитов, обработанных T-Lys, и контрольных групп.

Экспериментальная часть.

Пример 1.

Влияние T-Lys на дифференцировку МСК в направлении остеобластной линии.

В качестве источника МСК использовали стволовые клетки зубного зачатка (DBSC) и подвергли дифференцировке в течение 12 суток в остеогенной среде. Часть тестируемых клеток обрабатывали 0,3% T-Lys (T-Lys - опытная группа), добавляя его в культуральную среду при каждой замене. Фракцию клеток, не обработанных T-Lys, использовали в качестве контрольной группы (Ctr). Уровни мРНК ранних маркеров типичных остеобластов, Runx-2 и коллагена I (Col 1), определяли в образцах Ctr и T-Lys с помощью ПЦР в режиме реального времени.

На фиг. 1 (А) показано, как экспрессия обоих маркеров значительно увеличилась в клетках, обработанных T-Lys, по сравнению с клетками Ctr, что позволяет предположить, что обработка T-Lys улучшила способность МСК дифференцироваться в линии остеобластов.

Уровни экспрессии белков этих остеобластных маркеров дополнительно оценивали в клетках T-Lys и Ctr с помощью вестерн-блоттинга.

На фиг. 1 (В) показано, как уровень белков Runx-2 и Col 1 увеличивается в клетках, обработанных T-Lys, по сравнению с клетками Ctr, что подтверждает тенденцию экспрессии мРНК.

Затем был проведен гистохимический тест для изучения экспрессии другого маркера остеобластных клеток, фермента щелочной фосфатазы (ЩФ), в ответ на применение T-Lys. Результат этого эксперимента, показанный на фиг. 1(С), продемонстрировал, что стимуляция МСК с помощью T-Lys во время остеогенной дифференцировки значительно увеличивает пурпурное окрашивание, которое идентифицирует экспрессию ЩФ.

Все результаты, описанные выше, продемонстрировали, что соединение T-Lys способно повышать способность МСК дифференцироваться в клетки, подобные остеобластам.

Пример 2.

Влияние T-Lys на отложение минерального матрикса при остеогенной дифференцировке МСК.

Для тщательного исследования влияния этой новой молекулы на остеогенную дифференцировку МСК, культуру DBSC в условиях минерализации отслеживали в течение 21 дня на различных образцах: Ctr (без каких-либо добавок, в качестве отрицательного контроля), HA (с добавлением немодифицированной гиалуроновой кислоты в качестве положительного контроля) и T-Lys (где клетки обрабатывали 0,3% T-Lys в качестве опытной группы).

Влияние T-Lys на отложение минерального матрикса DBSC было проанализировано с использованием гистохимического теста окрашивания ализариновым красным (ARS), количественно оцененного с использованием колориметрического метода. Способность к минерализации клеток, обработанных 0,3% T-Lys, оказалась значительно выше, чем в группах Ctr и HA.

Эти данные показывают, что соединение T-Lys способно увеличивать остеогенную активность МСК, также стимулируя их способность к продукции минерализованного матрикса.

Пример 3.

Влияние T-Lys на эффекты субклеточного распределения интегрин $\alpha\upsilon\beta3$.

Интегрины представляют собой рецепторы для молекул ВКМ, важных для клеточной адгезии, а также для передачи сигналов пролиферации и дифференцировки. В частности, интегрин $\alpha\upsilon\beta3$ является

рецептором костного белка, называемого остеопонтином, который имеет фундаментальное значение для определения дифференцировки МСК в направлении остеогенной линии. Поэтому оценивали влияние обработки T-Lys на внутриклеточное распределение интегрина $\alpha\beta3$.

Субклеточное распределение указанного интегрина анализировали с помощью конфокальной микроскопии в DBSC, обработанных T-Lys и Ctr. Анализы были проведены только после 4 дней остеогенной дифференцировки, чтобы компенсировать тот факт, что клетки проявляют быструю склонность к образованию многослойности, что препятствует их микроскопическому наблюдению. В клетках Ctr оказалось, что интегрин $\alpha\beta3$ распределяется по нескольким участкам, в то время как обработка T-Lys индуцировала другую организацию этого рецептора, более локализованную в участках фокальной адгезии. Таким образом, через 4 дня дифференцировки рецептор в контрольных условиях все еще распределялся по клетке, в то время как в клетках T-Lys он присутствовал в местах фокальной адгезии. Присутствие "нитей" (типичный вид интегринов $\alpha\beta3$, участвующих в фокальной адгезии) было обнаружено в клетках T-Lys, но не в клетках Ctr. Эти результаты предполагают, что влияние T-Lys на дифференцировку DBSC может быть опосредовано перестройкой $\alpha\beta3$.

Пример 4.

Влияние T-Lys на экспрессию типичных маркеров в культурах хондроцитов.

Хондроциты суставов человека, собранные у пациентов, перенесших ортопедическую операцию, были выращены в культурах конгломератов, чтобы имитировать микроархитектуру трехмерной ткани и избежать неправильной де-дифференцировки хондроцитов, которая легко возникает при их выращивании в двумерных культурах. Конгломераты клеток выращивали в течение 28 дней в хондрогенных условиях. Контрольную группу (Ctr) обрабатывали в соответствии с общепринятым протоколом, в то время как в группе T-Lys добавляли 0,3% T-Lys при каждой смене раствора. В конце периода культивирования культуры конгломератов хондроцитов лизировали и оценивали для анализа экспрессии генов. Уровни мРНК типичных хондрогенных маркеров: Sox-9, коллагена II (Col II), коллагена X (Col X) и агрекана определяли в обеих группах образцов ПЦР в режиме реального времени.

На фиг. 3 показаны результаты этих тестов, которые демонстрируют, что для трех из этих четырех учитываемых маркеров их экспрессия определенно увеличилась в группах T-Lys. В частности, экспрессия Sox-9, который является основным фактором транскрипции, участвующим в хондрогенной дифференцировке, значительно повышена в клетках, обработанных T-Lys, по сравнению с клетками Ctr. В соответствии с этим результатом Col II и Col X, количество белков, типичных для внеклеточного матрикса хряща, также увеличивается благодаря обработке T-Lys, что еще раз указывает, что эта молекула поддерживает и улучшает дифференцировку хондроцитов. С другой стороны, экспрессия агрекана, протеогликана хряща, никак не изменилась.

Пример 5.

Влияние T-Lys на пролиферацию хондроцитов и рост тканей.

После 28 дней дифференцировки в условиях, описанных в примере 4, конгломераты хондроцитов фиксировали 4% параформальдегидом, заливали, делали срезы, гистологически окрашивали и исследовали. При морфометрическом исследовании под оптическим микроскопом срезов культивированных конгломератов хондроцитов выявлено, что они были крупнее в группе T-Lys, чем в контрольной группе. Этот результат виден на фиг. 4 (A).

Для количественного определения размера конгломератов образцы были разрезаны на срезы (толщина 5 мкм), и площадь каждого среза, полученного для двух групп клеток, была измерена с помощью программного обеспечения ImageJ. График на фиг. 4(A) показывает, что средняя площадь поверхности была значительно больше в группе, получившей T-Lys, чем в контрольной группе.

Затем конгломераты окрашивали сафранином O, чтобы выделить хондроциты (фиг. 4(B)). Окрашивание выявило наличие хрящевого матрикса (оранжевое окрашивание), демонстрируя, что клетки были способны дифференцироваться и продуцировать компоненты ВКМ в этих условиях культивирования; ядра были контрастно окрашены гематоксилином (фиг. 4(B)). Чтобы проверить, влияет ли обработка T-Lys на количество клеток, клетки в выбранном поле (100×100 мкм) подсчитывали для каждого среза. График на фиг. 4(B) изображает количество клеток для двух культур, и можно видеть, что оно значительно увеличилось в случае опытной группы по сравнению с контрольной группой. Интересно отметить, что в случае образца T-Lys удалось получить большее количество срезов одинаковой толщины (5 мкм), называемых "слоями", по сравнению с контрольной группой.

Это различие показано на графике на фиг. 4(C), где количество "слоев" умножают на толщину среза (5 мкм), таким образом реконструируя теоретическую толщину культурального конгломерата в целом. Эти результаты демонстрируют, что T-Lys стимулирует пролиферацию хондроцитов, их дифференцировку и секрецию матрикса.

Подробное описание чертежей

Фиг. 1. Влияние T-Lys на дифференцировку МСК в сторону остеобластной линии.

(A) Количественная ПЦР, проведенная на DBSC, выращенных в остеогенной среде и стимулированных 0,3% T-Lys, и DBSC контрольной группы. На каждом графике показано среднее \pm стандартная

ошибка от 3 независимых экспериментов, проведенных в трех повторностях. *P<0,02 по сравнению с контрольной группой. Экспрессию нормализовали по бета-2-микроглобулину (B2M). Графики показывают, что обработка T-Lys значительно увеличивала экспрессию двух маркеров остеобластов Runx-2 и Col1.

(B) Иммуноблоттинг для анализа экспрессии белков Runx-2 и Col 1; каждый график изображает среднюю оптическую плотность, рассчитанную по отношению к составляющему белку (ген домашнего хозяйства β-актина) + стандартная ошибка 3 независимых экспериментов, проведенных в трех повторностях. *P <0,001 по сравнению с контрольной группой. Типичные изображения иммуноблоттинга также были приведены на левой стороне фигуры. Графики показывают, насколько измеренный параметр выше в клетках, обработанных T-Lys, чем в контрольной группе.

(C) Гистохимический анализ фермента ЩФ (фиолетовое окрашивание), проведенный на DBSC, выдержанных в остеогенных условиях в течение 7 дней и стимулированных T-Lys, по сравнению с контрольной группой. График изображает количественную оценку положительного окрашивания в процентах по отношению к контрольной группе (*P<0,01) и получен в результате анализа от 3 независимых экспериментов, проведенных в четырех повторностях. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Типичные изображения лунок с культурами также приведены слева на фигуре. На графике показано, что образцы T-Lys имеют более высокую экспрессию фермента щелочной фосфатазы.

Фиг. 2. Влияние T-Lys на отложение минерального матрикса во время остеогенной дифференцировки МСК.

Отложение минерального матрикса тестировали с помощью ARS (красное окрашивание) в клетках, обработанных T-Lys, гиалуроновой кислотой и Стг в остеогенных условиях в течение 21 дня. На графике показано количественное определение оптической плотности красителя, экстрагированного из слоев окрашенных клеток, в виде среднего процента ± стандартная ошибка, представляющего результаты для 3 независимых экспериментов, проведенных в четырех повторностях. *P <0,01, #P <0,001 по сравнению с группой отрицательного контроля (Стг); @P<0,01 по сравнению с группой положительного контроля (НА). Типичные изображения лунок с культурами также приведены слева на фигуре. На графике показано, как образцы T-Lys имеют более высокое отложение минерального матрикса, чем необработанный образец и образец, обработанный нативной гиалуроновой кислотой.

Фиг. 3. Влияние T-Lys на экспрессию типичных маркеров в культурах хондроцитов.

ПНР в реальном времени (qPCR) проводили на культурах конгломератов хондроцитов, выращенных в хондрогенной среде и стимулированных 0,3% T-Lys, и группе отрицательного контроля (Стг). На каждом графике показано среднее значение ± стандартная ошибка от 3 независимых экспериментов, проведенных в трех повторностях. *P<0,04 для Sox-9, *P<0,001 для Col II, *P<0,01 для Col X по сравнению с контрольной группой. Экспрессию нормализовали по бета-2-микроглобулину (B2M). Графики показывают, что обработка T-Lys значительно повышала экспрессию маркеров хондроцитов Sox-9, Col II и Col X, но не влияла на экспрессию агрекана.

Фиг. 4. Влияние T-Lys на пролиферацию хондроцитов и рост тканей.

(A) Конгломераты культур из разделенных хондроцитов фотографировали под оптическим микроскопом с использованием 20-кратного объектива и анализировали с использованием программного обеспечения Image-J для морфометрического исследования областей. Выбранные изображения являются типичными для трех различных экспериментов, масштабная шкала изображена в правом нижнем углу фигур: 75 мкм. На графике показано среднее значение ± стандартная ошибка от 3 независимых экспериментов, проведенных в трех повторностях, *P <0,0003. Конгломераты, обработанные T-Lys, выглядят более крупными, чем в контрольной группе.

(B) Отложение хрящевого матрикса измеряли с помощью окрашивания сафранином O, при этом ядра хондроцитов контрастно окрашивали гематоксилином.

Изображения были получены с 40-кратным объективом, масштабная шкала показана в верхнем левом углу контрольной фигуры: 25 мкм. На графике показано среднее значение ± стандартная ошибка от 3 независимых экспериментов, проведенных в трех повторностях, *P<0,04. Количество клеток в образце T-Lys больше, чем в контрольной группе.

(C) На графике показана теоретическая реконструкция толщины конгломерата культуры хондроцитов, в которой количество полученных срезов умножали на толщину среза и выражали в мкм. Группа, обработанная T-Lys, имеет большую толщину.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения гиалуроновой кислоты и по меньшей мере одного гетероцикла, выбранного из аденина, гуанина, тимина и цитозина, причем указанное соединение связано с указанным гетероциклом по меньшей мере одной связью ионного типа и дополнительно связано по меньшей мере с одной природной аминокислотой в одиночной, олигомерной или полимерной форме, для регенерации костной и хрящевой тканей.

2. Применение по п.1, где указанный по меньшей мере один гетероцикл представляет собой тимин.

3. Применение по п.1 или 2, где указанная по меньшей мере одна природная аминокислота представляет собой лизин.

4. Применение по любому из предшествующих пунктов, где связь между указанной гиалуроновой кислотой и указанной природной аминокислотой представляет собой химическую связь ионного типа.

5. Применение по любому из пп.2-4, где указанное соединение гиалуроновой кислоты представляет собой соединение T-LysYal®, содержащее гиалуроновую кислоту в комбинации с лизином и тимином.

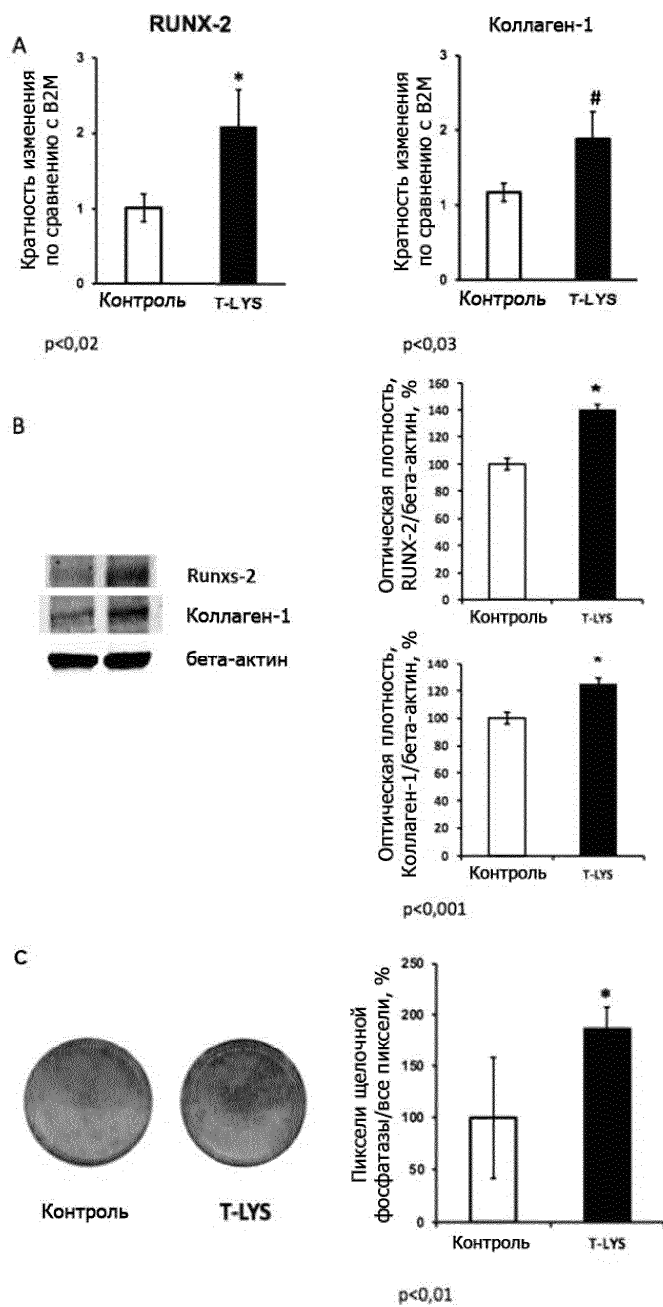
6. Применение по любому из предшествующих пунктов для индукции и стимуляции клеточной дифференцировки в остеогенной и хондрогенной линии мезенхимальных стволовых клеток.

7. Применение по п.6, где указанные мезенхимальные стволовые клетки представляют собой стволовые клетки зубного зачатка.

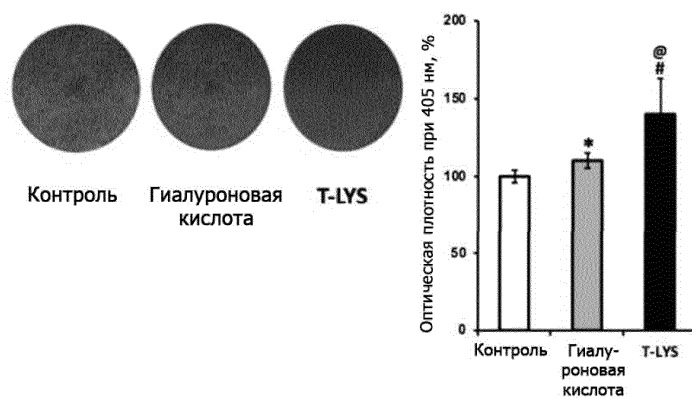
8. Имплантируемый каркас для регенерации костной и хрящевой тканей, содержащий соединение гиалуроновой кислоты и по меньшей мере один гетероцикл, выбранный из аденина, гуанина, тимина и цитозина, причем указанное соединение связано с указанным гетероциклом по меньшей мере одной связью ионного типа и дополнительно связано по меньшей мере с одной природной аминокислотой в одиночной, олигомерной или полимерной форме.

9. Применение имплантируемого каркаса, содержащего соединение гиалуроновой кислоты и по меньшей мере один гетероцикл, выбранный из аденина, гуанина, тимина и цитозина, причем указанное соединение связано с указанным гетероциклом по меньшей мере одной связью ионного типа и дополнительно связано по меньшей мере с одной природной аминокислотой в одиночной, олигомерной или полимерной форме, для регенерации костной и хрящевой тканей.

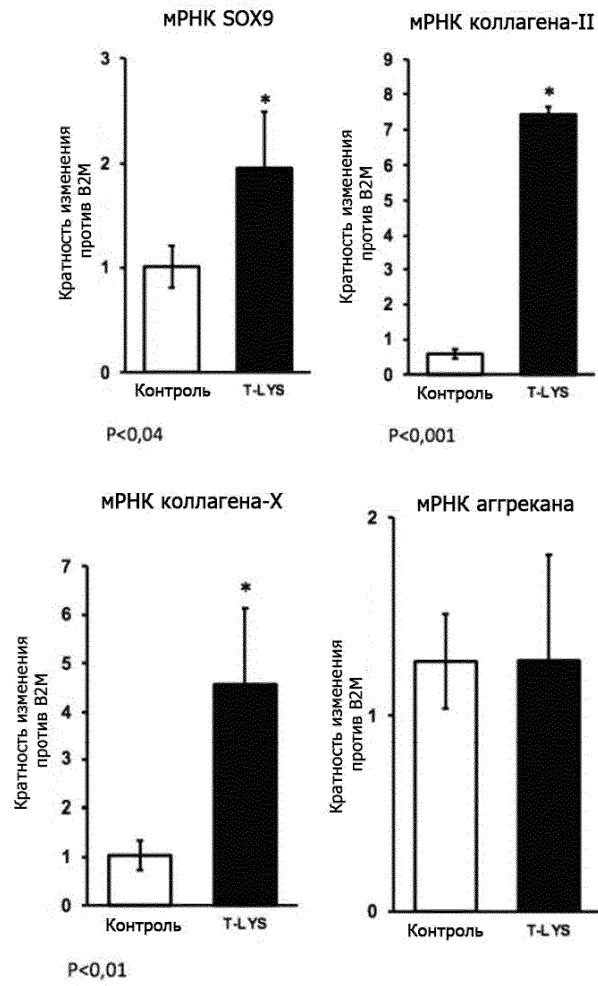
10. Применение фармацевтической композиции, содержащей соединение гиалуроновой кислоты и по меньшей мере один гетероцикл, выбранный из аденина, гуанина, тимина и цитозина, причем указанное соединение связано с указанным гетероциклом по меньшей мере одной связью ионного типа и дополнительно связано по меньшей мере с одной природной аминокислотой в одиночной, олигомерной или полимерной форме, для регенерации костной и хрящевой тканей.



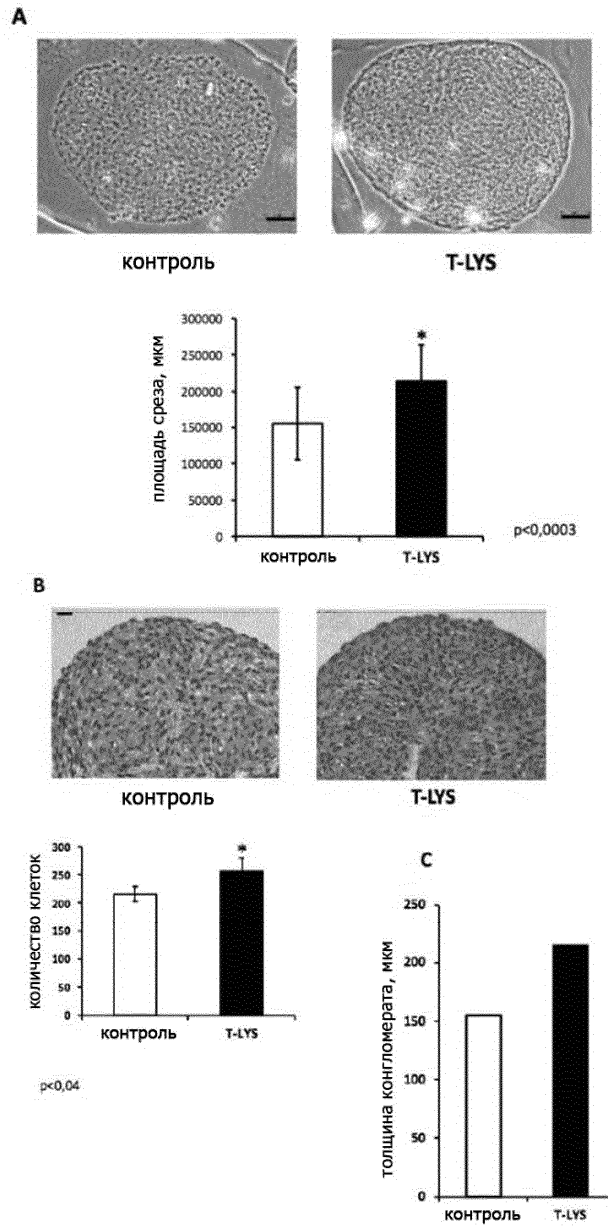
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4