



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **431237**

(22) Data zgłoszenia: **21.09.2019**

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/515 (2006.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61P 19/02 (2006.01)

(54)

**Nowy peptyd do zastosowania jako stymulator chondrogenyzy
i lek w terapii uszkodzeń chrząstki**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

13.07.2020 BUP 15/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

28.12.2020 WUP 21/20

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL
POLITECHNIKA GDAŃSKA, Gdańsk, PL
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, Gdańsk, PL
INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
IM. MARCELEGO NENCKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL
MEDVENTURES SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ W LIKWIDACJI, Poznań, PL
PRO SCIENCE POLSKA SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

PIOTR MUCHA, Tczew, PL
IZABELA ZAŁUSKA, Elbląg, PL
MICHAŁ PIKUŁA, Gdańsk, PL
ADRIANA SCHUMACHER, Koszalin, PL
MIROŚŁAWA CICHOREK, Gdańsk, PL
ANNA WARDOWSKA, Banino, PL
MILENA DEPTUŁA, Gdańsk, PL
ARKADIUSZ PIOTROWSKI, Różyny, PL
NATALIA FILIPOWICZ, Gdańsk, PL
ALINA MIECZKOWSKA, Gdańsk, PL
PIOTR MADANECKI, Kowale, PL
PAWEŁ SACHADYN, Gdynia, PL
SYLWIA RODZIEWICZ-MOTOWIDŁO, Rotmanka, PL
ŁUKASZ JANUS, Poznań, PL
PIOTR SKOWRON, Gdańsk, PL
ARTUR CZUPRYN, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Justyna Pawłowska

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowy peptyd o działaniu stymulującym chondrogenezę, zwłaszcza poprzez stymulację różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w chondrocyty i stymulator proliferacji, migracji i chemotaksji komórek macierzystych tkanki tłuszczowej. Przedmiotem wynalazku jest również medyczne zastosowanie peptydu jako leku w terapii uszkodzeń chrząstki jako środka pobudzającego chondrogenezę u ludzi i zastosowanie *in vitro* jako stymulator chondrogenazy, zwłaszcza środek stymulujący różnicowanie się mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w chondrocyty. Aplikacja dostawowa tego wynalazku może stanowić nowy rodzaj terapii uszkodzeń chrząstki u ludzi.

Tkanka chrzęstna potocznie nazwana chrząstką jest delikatnym i plastycznym rodzajem tkanki łącznej zbudowanym z komórek chrzęstnych (chondrocytów) oraz amorficznej bogatej w proteoglikany macierzy międzykomórkowej. Chrząstka jest jednym z kluczowych elementów układu kostnego, w tym stawów. Jej prawidłowe funkcjonowanie jest niezbędne dla utrzymania aktywności motorycznej człowieka. Choroby zwyrodnieniowe, zapalne oraz ubytki chrząstki są dużym wyzwaniem dla chirurgii, ortopedii oraz medycyny regeneracyjnej. Ich efektem są zmiany patofizjologiczne stawów upośledzające funkcjonowanie układu kostno-szkieletowego, co opisano szerzej w Mats Brittberg i wsp, Cartilage repair in the degenerative ageing knee, A narrative review and analysis Acta Orthopaedica 2016; 87, 26–38. Ze względu na dużą urazowość i podatność na degenerację, chrząstka jest jednym z głównych celów medycyny regeneracyjnej. Dodatkowo właściwości endogennej regeneracji i odnowy chrząstki są u człowieka bardzo niskie.

Dane literaturowe wskazują, że wciąż brakuje efektywnych metod regeneracji chrząstki (Rai V. i wsp. J Biomed Mater Res A 2017). W celu złagodzenia objawów chorób zwyrodnieniowych chrząstki można stosować metody niefarmakologiczne (dieta, rehabilitacja, odciążenie stawów czy termoterapia). Leczenie farmakologiczne sprowadza się głównie do uśmierzania bólu (leki przeciwbólowe i przeciwzapalne) i ograniczenie procesów zapalnych związanych z degeneracją chrząstki. W uzasadnionych wypadkach leki takie mogą być podawane bezpośrednio do wnętrza stawów. Podejmuje się próby wstrzykiwania dostawowego osocza bogatopłytkowego lub kwasu hialuronowego. Efekty tych zabiegów są jednak wciąż niewystarczające.

Jedynym, choć nie zawsze skutecznym sposobem leczenia stanów patologicznych chrząstki, są zabiegi operacyjne wykorzystujące abrazję i mikrołamania do pobudzenia ograniczonych zdolności proliferacyjnych tej struktury, zaś nowym orężem w arsenale medycznym są implantacje chondrocytów (Dziedzic K. i wsp. Przegl. Lek. 2014; Gille J. i wsp. Cartilage 2016).

Jednakże sama izolacja i hodowla chondrocytów, jak również stopniowa utrata ich fenotypu-odróżnicowanie powodują, że metody te są dalekie od optymalnych. Najnowszą metodą odbudowy chrząstki jest zastosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASC) i ich różnicowanie w chondrocyty (Kyriakidis T. i wsp. Acta Orthop Belg. 2018).

Stymulowanie proliferacji i różnicowania chondrocytów w regeneracji chrząstki stawowej jest obiecującą strategią, jednakże obecnie stosowana metodologia tych procesów jest mało skuteczna.

Mezenchymalne komórki macierzyste tkanki tłuszczowej (ASCs) są doskonałym materiałem do badań nad regeneracją tkanek ze względu na swoje liczne zalety, m.in. potencjał do różnicowania (komórki chrząstki, kości), dostępność czy możliwość pobrania ich z organizmu podczas operacji chirurgicznych lub liposukcji. ASCs nie są obciążone problemami etycznymi związanymi z ich pozyskiwaniem ani zagrożeniem teratogennym.

W ostatnich latach obserwuje się szybki wzrost liczby potencjalnych zastosowań komórek ASCs, w tym do leczenia zdegenerowanej chrząstki. Znany jest sposób różnicowania *in vitro* komórek ASCs w kierunku chondrocytów (chondrogeneza), jednak przy użyciu mało specyficznych i nie zawsze efektywnych stymulatorów jak kwas askorbinowy, TGF- β i dexametazon (Bajpayee AG. i wsp. Nature Reviews Rheumatology 2017; Dziedzic K. i wsp. Przegl. Lek. 2014). Dotychczasowe badania pokazały pozytywny wpływ wielu czynników chemicznych, takich jak rozpuszczalne czynniki wzrostu, chemokiny i morfogeny, na chondrogenezę. W szczególności wykazano, że transformujące czynniki wzrostu (takie jak TGF- β) i białka morfogenetyczne kości (BMP) odgrywają kluczową rolę w indukcji i stymulacji chondrogenazy. Chociaż te czynniki wzrostu mają potencjał terapeutyczny dla regeneracji uszkodzonej chrząstki, oparte na nich terapie wykazują poważne skutki uboczne i powikłania kliniczne. Do towarzyszących im problemów należą m.in. wysokie dawki terapeutyków, niestabilność białka i związany z tym

krótki okres półtrwania (Dziedzic K. i wsp. Przegl. Lek. 2014). Suplementy i leki wspomagające stosowane obecnie, nie przynoszą zadawalających efektów klinicznych w leczeniu uszkodzeń chrząstki (Kornicka K. i wsp. J Clin Med. 2019). Dane literaturowe wskazują, że obecnie nie ma klinicznie w pełni efektywnych metod regeneracji chrząstki i związanego z tym leczenia chorób zwyrodnieniowych chrząstki. Stosowane dotychczas procedury jedynie spowalniają rozwój choroby oraz łagodzą jej skutki. Objawy chorób zwyrodnieniowych chrząstki nasilają się wraz z czasem, doprowadzając do niepełnosprawności i chronicznego przewlekłego bólu oraz pogorszenia się jakości życia pacjenta. Choroby zwyrodnieniowe stawów oraz ubytki chrząstki są dużym wyzwaniem dla chirurgii, ortopedii i medycyny regeneracyjnej.

Celem wynalazku jest opracowanie nowego sposobu regeneracji chrząstki – nowego stymulatora chondrogenazy, a w szczególności jako czynnik działający na różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASCs) w chondrocyty. Innym celem było opracowanie środka do zastosowania *in vitro* jako stymulatora chondrogenazy, np. zastosowania diagnostycznego.

Twórcy opisywanego wynalazku zainteresowali się komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej (ASCs) jako narzędzia do badań nad regeneracją tkanek. Znany jest angiopoetynopodobny czynnik wzrostu (AGF, ARP5, ANGPTL6) czyli białko należące do rodziny białek angiopoetynopodobnych (Angptls) o działaniu pleiotropowym. Znane są liczne właściwości proangiogenne czynnika, bowiem wykazano, że AGF przyspiesza gojenie się ran skóry, stymulując proliferację, remodelowanie i regenerację komórek naskórka, wspomaga adhezję, rozprzestrzenianie się i migrację keratynocytów, fibroblastów i komórek nabłonka oraz angiogenezę oraz bierze udział w regulacji rozwoju układu sercowo-naczyniowego i metabolicznych procesów energetycznych (Zhang Y. i wsp. Biochem Biophys Res Commun, 2006).

Przedmiotem wynalazku jest wybrany w wyniku badań doświadczalnych jedynie fragment dużego białka AGF, dalej oznaczany jako peptyd AGF9, który zawiera w swojej sekwencji konserwatywny element i element biologicznie aktywny czyli sekwencję –Arg-Gly-Asp-(-RGD-). Wynalazek stanowi zatem peptyd oznaczony jako AGF9 o sekwencji Thr-Ser-Arg-Gly-Asp-His-Glu-Leu-Leu-NH₂ lub stosując skróty jednoliterowe TSRGDHELL-amid będący amidem wybranego według wynalazku fragmentu 337-346 fibrynogeno-podobnej domeny ludzkiego białka AGF (ANGPTL6). Peptyd ten został zsyntezowany metodą chemiczną w postaci C-końcowego amidu fragmentu 337-346 białka AGF, jako czynnik stymulujący różnicowanie komórek ASCs w chondrocyty, którego zastosowanie przebadano doświadczalnie. Peptyd AGF9 zawiera między innymi sekwencję RGD. RGD jest obecna w wielu integrinach, białkach będących ligandami białek ECM. Sekwencje RGD mają wiele funkcji m.in. biorą udział w kontroli ścieżek sygnałowych odpowiedzialnych za różnicowanie wielu komórek.

Według wynalazku, peptyd o sekwencji aminokwasowej Thr-Ser-Arg-Gly-Asp-His-Glu-Leu-Leu-NH₂ ma zastosowanie diagnostyczne lub medyczne jako stymulator chondrogenazy, zwłaszcza stymulator *in vitro*, a zwłaszcza stanowi stymulator różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASCs) w chondrocyty. Według wynalazku peptyd można zastosować jako stymulator proliferacji, migracji, chemotaksji komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASCs). Dodatkowo, według wynalazku zaproponowano zastosowanie peptydu jako lek w terapii uszkodzeń chrząstki jako stymulator chondrogenazy. Peptyd zwłaszcza stanowi środek aplikowany lokalnie dostawowo.

Prace doświadczalne dotyczące zastosowania nowego peptydu, które wykazały biologiczne działanie peptydu według wynalazku były prowadzone w dwóch niezależnych modelach.

- 1) Model różnicowania – komórki hodowane w pożywce różnicującej z dodatkiem AGF9 oraz komórki kontrolne hodowane tylko w pożywce różnicującej (standardowej) bez AGF9.
- 2) Modele stymulacji komórek wyłącznie przez AGF9 w pożywce podstawowej (kontrola – tylko pożywka podstawowa).

Ad. 1) Wyniki badań pokazały samodzielne działanie peptydu, który przyspieszał i stymulował *in vitro* różnicowanie komórek ASCs w komórki chrząstki – chondrocyty w porównaniu do hodowli w standardowych warunkach różnicowania komórek – bez dodatku peptydu według wynalazku. Standardowe warunki komórkowe indukowały różnicowanie jedynie w małym stopniu i efektywność tego procesu była znacząco niższa w porównaniu do warunków z dodatkiem AGF9. Na tej podstawie wykazano zatem biologiczne działanie peptydu do zastosowania medycznego lub środka *in vitro* – peptyd ten może stanowić środek stymulujący chondrogenezę, jeden ze składników, służących do przekształcania (różnicowania) komórek ASCs w chondrocyty. W badaniach doświadczalnych na zwierzętach potwierdzono możliwość zastosowania peptydu według wynalazku w terapiach dedykowanych regeneracji chrząstki.

Ad 2) Peptyd ten dodawany do pożywki bazalnej (podstawowej) samodzielnie bez innych związków (stymulatorów) przyspieszał proliferację i migrację komórek macierzystych ASCs. W warunkach *in vivo/in vitro* może on zatem indukować mobilizację komórek mezenchymalnych obecnych w chrząstce, które mają również potencjał do różnicowania w chondrocyty. Peptyd ten jednocześnie charakteryzuje się niską toksycznością i bezpieczeństwem immunologicznym, co świadczy o możliwości jego zastosowania medycznego zwłaszcza u ludzi jako środek leczniczy.

W dalszej części opisu stosuje się termin peptyd AGF9 jako peptyd według wynalazku o sekwencji: Thr-Ser-Arg-Gly-Asp-His-Glu-Leu-Leu-NH₂ lub stosując skróty jednoliterowe TSRGDHELL-amid.

Wyniki badań dotyczących otrzymania peptydu i działania peptydu przedstawiono na rysunku, czyli:

- Fig. 1 – przedstawia chromatogram HPLC peptydu AGF9
- Fig. 2 – przedstawia widmo ESI MS AGF9
- Fig. 3 – przedstawia stabilność peptydu AGF9 w ludzkim osoczu krwi oznaczoną metodą elektroforezy kapilarnej (CE)
- Fig. 4 – przedstawia cytotoksyczność AGF9 wobec ASCs po 48. godzinach inkubacji, oznaczona metodą uwalniania enzymu dehydrogenazy mleczanowej (test LDH). Wykres przedstawia średnią $\pm$ SEM z 4. niezależnych doświadczeń (w każdym po 4. powtórzenia).
* brak statystycznie znaczącej cytotoksyczności ASCs pod wpływem peptydu AGF9 w porównaniu z grupą kontrolną (Kontrola) $p < 0,05$, test U Manna-Whitneya z poprawką na ciągłość.
- Fig. 5 – przedstawia wpływ peptydu AGF9 na proliferację komórek ASCs po 48. i 72. godzinach inkubacji. Wykres przedstawia średnią $\pm$ SEM z 4. niezależnych doświadczeń (każde w 4. powtórzeniach).
* statystycznie znaczący wzrost proliferacji ASCs pod wpływem peptydu AGF9 w porównaniu z grupą kontrolną (Kontrola) $p < 0,05$, test U Manna-Whitneya z poprawką na ciągłość.
- Fig. 6 – przedstawia A. wpływ peptydu AGF9 na migrację ASCs po 24. godzinach inkubacji w teście zarastania rasy. Wykres przedstawia średnią $\pm$ SEM z 4. niezależnych doświadczeń (każde w 4. powtórzeniach). B. ocenę chemotaktycznych właściwości pochodnych AGF9 wobec ASCs. Wykres przedstawia średnią $\pm$ SEM z 4. niezależnych doświadczeń (każde w 4. powtórzeniach).
* statystycznie znaczące różnice w porównaniu z grupą kontrolną (Kontrola) $p < 0,05$, test U Manna-Whitneya z poprawką na ciągłość.
- Fig. 7 – przedstawia ocenę immunogenności peptydu AGF9. Przy użyciu cytometrii przepływowej oceniano ilość (jako procent limfocytów) i poziom aktywacji wybranych komórek immunokompetentnych. Wykresy przedstawiają wartości średnie $\pm$ SEM.
- Fig. 8 – przedstawia ocenę potencjału alergizującego peptydu AGF9 przy pomocy testu BAT (na wykresie % zaktywowanych bazofili).
- Fig. 9 – przedstawia ocenę wpływu AGF9 na różnicowanie komórek ASCs w chondrocyty. Na rysunku przedstawiono reprezentatywne zdjęcia komórek zróżnicowanych (barwienie Alcian blue uwidacznia wydzielane przez chondrocyty GAG).
- Fig. 10 – przedstawia wyniki oceny wpływu peptydu AGF9 na chondrogenezę przeprowadzonej przy pomocy komputerowej analizy zdjęć histologicznych w programie ImageJ v. 1.52.
- Fig. 11 – przedstawia wyniki oznaczania tkankowo specyficznych markerów dla chondrocytów za pomocą układu doświadczalnego qPCR. Graficzne przedstawienie danych uzyskanych z Real-time PCR na podstawie analizy Advanced Relative Quantification (Target/Ref) znormalizowanej do trzech genów referencyjnych: *RPL13A*, *RPLP0* i *HPRT1* dla dwóch pacjentów (A) i (B) „K” próba kontrolna po 6-tygodniowej hodowli, „E” próba eksperymentalna po 6-tygodniowej hodowli po stymulacji związkiem AGF.

Przykład 1

Synteza chemiczna peptydu AGF9

Peptyd AGF9 został zsyntezowany na nośniku stałym, metodą Fmoc za pomocą syntezy automatycznego Quartet Protein Technologies z użyciem żywicy TentaGel S RAM o osadzeniu 0.24 mmol/g. Po syntezie peptydy odszczepiono z peptydylożywicy za pomocą 98% kwasu trifluorooctowego (TFA) i wytrącono zimnym eterem dietylowym. Surowe peptydy oczyszczano za pomocą preparatywnego chromatografu HPLC Spot Prep II 250 firmy Armen z kolumną Maisch C-18 o wymiarach (250 x 40) mm, wielkość ziaren 10 μm stosując liniowy gradient acetonitrylu (ACN) z 0.08% dodatkiem TFA. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 25 ml/min. Poszczególne frakcje analizowano przy pomocy analitycznego chromatografu HPLC firmy Shimadzu z kolumną Phenomenex Kinetex XB-C18, o wymiarach 150 x 4.6, wielkość ziaren 5 μm . Dla wszystkich peptydów stosowano gradient 0–20% ACN (z 0.08% dodatkiem TFA) w 30 min z przepływem 1 ml/min. Po oczyszczaniu peptydy zliofilizowano, a następnie umieszczono je w roztworze 0.01 M HCl w celu wymiany jonów z trifluoroocetanowych na jony chlorkowe. Oczyszczone peptydy scharakteryzowano przy pomocy analitycznego chromatografu HPLC oraz spektrometrii mas ESI wykorzystując spektrometr mas SCIEX QTOF 5600+. Charakterystykę uzyskanych peptydów pokazują Fig. 1–3. Chromatogram HPLC pokazuje czystość peptydu AGF9 (>95%). Natomiast spektrometria mas ESI MS pokazuje prawidłową tożsamość struktury peptydu oraz jego homogenność. Na widmach masowych widać sygnały odpowiadające jonom pseudomolekularnym (M+H)⁺ lub naładowanym w różnym stopniu (+2, +3, +4) danego peptydu.

Przykład 2

Badanie stabilności peptydu AGF9 w ludzkim osoczu

Przy pomocy elektroforezy kapilarnej (CE) oceniono stabilność peptydu AGF9 w ludzkim osoczu. Wyniki wykonanej analizy pokazały, że peptyd AGF9 jest stabilny w ludzkim osoczu krwi. Po 21 godzinach inkubacji ok. 80% peptydu AGF9 pozostało niezhydrolizowane.

Badania biologiczne.

Przykład 3

Ocena cytotoksyczności peptydu AGF9 wobec komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASCs)

Przy pomocy kolorymetrycznego testu LDH, polegającego na ocenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej w medium hodowlanym, sprawdzono cytotoksyczność peptydu AGF9 wobec komórek macierzystych tkanki tłuszczowej. Test ten jest oparty na reakcjach enzymatycznych, w wyniku których powstaje barwny produkt, oznaczany spektrofotometrycznie. Dehydrogenaza mleczanowa jest enzymem cytozolowym, który w warunkach fizjologicznych nie jest uwalniany na zewnątrz komórki. Uszkodzenie (dezintegracja) błony komórkowej oraz śmierć komórki spowodowana działaniem czynników szkodliwych, np. substancji chemicznych czy też czynników fizycznych, powoduje uwolnienie LDH z komórek do środowiska. Oznaczenie aktywności LDH w supernatancie jest miarą toksyczności badanej substancji względem komórek w hodowli.

W teście LDH nie zaobserwowano cytotoksyczności peptydu AGF9 wobec komórek ASCs. Wyniki przedstawiono na Fig. 4.

Przykład 4

Ocena wpływu peptydu AGF9 na proliferację komórek macierzystych tkanki tłuszczowej

Do oceny wpływu peptydu AGF9 na proliferację komórek ASCs wykorzystano kolorymetryczny test XTT. Test ten oparty jest na zdolności enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania soli tetrazolowej (XTT) do formazanu będącego kolorowym produktem reakcji. Zdolność do produkcji formazanu mają tylko żywe komórki, co pozwala na szybkie i dokładne określenie udziału procentowego żywych komórek oraz wpływu badanego czynnika na ich żywotność. Peptyd rozpuszczano w sterylnej, destylowanej wodzie.

AGF9 istotnie statystycznie stymulował proliferację ASCs we wszystkich badanych stężeniach od 0,001 do 150 $\mu\text{g/ml}$. Efekt ten obserwowany był zarówno po 48. jak i po 72. godzinach inkubacji. W porównaniu z grupą kontrolą, największy wzrost liczby komórek (o około 25% względem kontroli) zaobserwowano przy stężeniu 0,01 $\mu\text{g/ml}$ po 48. godzinach inkubacji. Wyniki przedstawiono na Fig. 5.

Przykład 5

Ocena wpływu peptydu AGF9 na migrację i chemotaksję komórek macierzystych tkanki tłuszczowej Ocena migracji

Przy ocenie zdolności do migracji pod wpływem peptydu AGF9 wykonano test zarastania rysy. Wykorzystano szalki Petriego o średnicy 35 mm zawierających dwukomorowe inserty o określonej szerokości szczeliny międzykomorowej, która stanowiły rysę o powierzchni 500 μm^2 . Po wyhodowaniu

ASCs na brzegu rysy, usuwano insert, płukano komórki i inkubowano z inhibitorem proliferacji (mitomycyną C), a następnie płukano i dodawano znaną pożywkę DMEM z wysoką zawartością glukozy (4,5 g/l), zawierającą odpowiednie stężenie peptydu AGF9 (0,1 i 1 $\mu\text{g/ml}$), uprzednio rozpuszczonego w sterylnej wodzie. Po 24. godzinach oceniano zarastanie rysy opierając się wyłącznie na migracji ASCs. DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) zawiera: wapnia chlorek bezwodny, żelaza azotan dziewięciowodny, potasu chlorek, magnezu siarczan bezwodny, sodu chlorek, sodu wodorowęglan, potasu fosforan jednozasadowy jednowodny, D-glukoza, L-argininy chlorowodorek, L-cystyny dichlorowodorek, L-glutamina, glicyna, L-histydyny chlorowodorek jednowodny, L-izoleucyna, L-leucyna, L-lizyny chlorowodorek, L-metionina, L-feniloalanina, L-seryna, L-treonina, L-tryptofan, disodu L-tyrozyna dwuwodna, L-walina, wapnia D-pantotenian, choliny chlorek, kwas foliowy, i-inozytol, niacynamid, ryboflawina, tiaminy chlorowodorek, pirydoksyny chlorowodorek) z solą sodową kwasu 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-etanosulfonowego.

Peptyd AGF9 w obu badanych stężeniach (0,1 oraz 1 $\mu\text{g/ml}$) istotnie statystycznie zmniejszył pole powierzchni rysy w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.05$). Wyniki przedstawiono na Fig. 6A. Na tej podstawie można stwierdzić, że peptyd AGF9 stymuluje migrację komórek macierzystych tkanki tłuszczowej.

Ocena chemotaksji

Przy ocenie właściwości chemotaktycznych peptydu AGF9 wykorzystano test przechodzenia komórek przez membranę. W tym celu komórki wysiewano do insertów, które za pomocą porowatej membrany PET przedzielały, przestrzenie na górną i dolną. Komórki wysiane do insertu (przestrzeń górna) zostały pobudzone do aktywnej migracji przez błonę do przestrzeni dolnej pod wpływem chemoatraktantu – AGF9 w stężeniu ostatecznym 1 $\mu\text{g/ml}$. Oceny liczby komórek, które „przemigrowały” przez insert dokonano fluorymetrycznie (barwienie kalceiną).

Peptyd AGF9 wykazał istotny statystycznie efekt chemotaktyczny w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$). Wyniki przedstawiono na Fig. 6B.

Wyniki badań zaś wskazują na zastosowanie peptydu AGF9 jako stymulatora chondrogenyzy – i sugerują zastosowanie lecznicze jak również użycie jako środek użyty *in vitro* w diagnostyce, badaniach doświadczalnych. Wykazano bowiem stymulacja migracji oraz chemotaksji ludzkich komórek macierzystych tkanki tłuszczowej poprzez peptyd AGF9 w warunkach *in vitro*, z prawdopodobieństwem może świadczyć o możliwości mobilizacji mezenchymalnych komórek macierzystych obecnych w chrząstce *in vivo*.

Przykład 6

Ocena immunogenności peptydu AGF9

Aspekt ten jest istotny z uwagi na możliwe działania niepożądane peptydów, które potencjalnie mogą powodować aktywację układu odpornościowego oraz indukcję zapalenia (limfocyty) i reakcji alergicznej (bazofile/komórki tuczne).

Materiałem do badań były tzw. kożuszki leukocytarne, z których izolowano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) wykorzystując wirowanie w gradiencie gęstości (histopaque, Sigma). Po dwukrotnym płukaniu PBMC w PBS, lizie erytrocytów i zliczeniu (licznik komórek Bio-Rad), komórki wysiewano na płytkę 24-dołkową w ilości 1 mln komórek / 1 ml RPMI 1640 (P/S, 10% FBS)/dołek. Następnie komórki adaptowały się do nowych warunków przez 24 godziny (tzw. resting). Po tym czasie dodawano badanego związku – peptyd AGF9 w stężeniu końcowym: 1,0 $\mu\text{g/ml}$ i inkubowano w cieplarni przez 48 h. Kontrolę ujemną stanowiły komórki niestymulowane, natomiast pozytywną – komórki stymulowane LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) i PHA (2,5 $\mu\text{g/ml}$). Komórki zbierano z dołków po zakończeniu inkubacji, płukano w PBS, zliczano i przygotowywano do analizy cytometrycznej: 100 tys komórek/100 μl wybarwiano przeciwciałami, a po 30 minutowej inkubacji w temp pokojowej w ciemności analizowano z wykorzystaniem cytometru przepływowego – LSRFortessa, BD.

Uzyskane wyniki wskazują na brak właściwości immunogennych peptydu AGF9 w badanym stężeniu. Poziom wybranych subpopulacji komórek układu immunologicznego (CTL – komórki cytotoksyczne, Th, komórki NK) zachowywał wartości zbliżone do kontrolnych Fig. 7). Wyniki te świadczą, iż peptyd AGF9 nie indukuje zapalenia i posiada wysoki profil bezpieczeństwa immunologicznego.

Przykład 7

Ocena potencjału alergizującego peptydu AGF9

Do oceny aktywacji bazoili pod wpływem peptydu AGF9 zastosowano zestaw komercyjny Flow CAST® highsens (Bühlmann Laboratories, Switzerland). Test ten (BAT, Basophil Activation Test) służy

do oceny potencjału alergicznego różnego rodzaju związków chemicznych, w tym leków. Badanie wykonano na próbkach krwi pobranych od zdrowych ochotników i przeprowadzono w ciągu 24 godzin od pobrania, zgodnie z instrukcją producenta. 100 μ L krwi pełnej inkubowano z badanym związkiem – peptyd AGF9 w stężeniu końcowym 1 μ g/ml. Następnie próbki barwiono roztworem przeciwciał (CD63, CD203c, CCR3) i inkubowano przez 15 min w łaźni wodnej w temp 37°C. Po zakończeniu inkubacji, lizie erytrocytów i płukaniu, próby były analizowane cytometrycznie (BD FACSCanto II). Dla każdej próby przygotowano również kontrole: negatywną i pozytywną (anti-FcsRI mAb i fMLP).

Uzyskane wyniki wskazują na brak aktywacji granulocytów w obecności AGF9 (1 μ g/ml) – wartości niższe niż w kontroli negatywnej (Fig. 8). Wyniki wskazują na bardzo niskie prawdopodobieństwo wywołania reakcji alergicznej przez peptyd AGF9, co świadczy o możliwości jego zastosowania u ludzi.

Przykład 8

Ocena wpływu peptydu AGF9 na różnicowanie komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w chondrocyty

Proces różnicowania do chondrocytów przeprowadzono poprzez hodowle *in vitro* za pomocą zestawu różnicującego StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit. Komórki hodowano w postaci zagęszczonej grudki komórek, którą otrzymano po zwirowaniu 500 tys. komórek przy obrotach 1500/min w probówce typu Falcon. W tej postaci zagęszczony osad komórkowy hodowano w pożywce różnicującej z dodatkiem AGF9 w stężeniu ostatecznym 1 μ g/ml przez 6. tygodni, wymieniając pożywkę co 3 dni. Po zróżnicowaniu, powstały osad komórkowy utrwalono 3,7% paraformaldehydem przez 24. godziny, odwodniono w rosnących stężeniach alkoholu etylowego, zatopiono w parafinie. Otrzymane bloczki parafinowe skrawano o grubości 5 μ m i barwiono 1% błękitem alcjańskim przez 30 minut.

Przy pomocy komputerowej analizy obrazu odczytano średnie wartości szarości zdjęć analizowanych przez ImageJ v. 1.52 (US National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Próg odcięcia został ustalony na podstawie obrazów kontrolnych (średnia wartość szarości z obrazów kontrolnych). Ostateczne wartości dla komórek od każdego pacjenta przedstawiono jako średnią z 4 odczytów (4 zdjęcia kontrolne i 4 zdjęcia preparatów po stymulacji AGF). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą sparowanego testu t-Studenta. Zaobserwowano statystycznie istotną różnicę pomiędzy kontrolą i komórkami różnicowanymi w obecności peptydu AGF9, co oznacza, że peptyd AGF9 wykazuje działanie biologiczne i stanowi stymulator chondrogenyzy.

Przykład 9

Oznaczanie tkankowo specyficznych markerów dla chondrocytów

Całkowite RNA (z miRNA) zostało wyizolowane z pelletów ASC zestawem miRNeasy QIAGEN, pomiar stężenia i wartości RIN wykonany został z użyciem 2100 Bioanalyzer AGILENT RNA 6000 Nano Kit. Odwrotna transkrypcja przeprowadzona została z użyciem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Real-time PCR zrealizowany został na LightCycler 480 SW 1.5 (Roche), analizę Advanced Relative Quantification wykonano z normalizacją do trzech genów referencyjnych (*RPL13A*, *RPLP0*, *HPRT1*), wybranych na podstawie wyników RNA-seq, potwierdzających ich stabilność.

Za pomocą układu doświadczalnego qPCR zmierzono ekspresję *Col2A1*, *ACAN*, *COMP* i *SOX9* będącymi tkankowo specyficznymi markerami chondrogenyzy. Otrzymane wyniki przedstawiono na Fig. 11.

W próbach eksperymentalnych 6-tygodniowej hodowli komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w pożywce różnicującej (StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit) z dodatkiem AGF9 (1 μ g/ml) zaobserwowano wzrost transkryptu markera *ACAN* (*Aggrecan*), odpowiadającego za kodowanie białka będącego składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej tkanki chrzęstnej, którego głównym zadaniem jest oporność na ściskanie w chrząstce oraz wzrost ekspresji transkryptu markera *SOX9* zaangażowanego w różnicowanie komórek mezenchymalnych do chondrocytów w każdym z rozwijającym się elementów kostnych. Marker *COMP* (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) odgrywający ważną rolę w integralności chrząstki stawowej poprzez oddziaływanie z innymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej takimi jak kolageny i fibronektyny nie wykazywał spójnej tendencji u przykładowych dwóch pacjentów.

Analiza jakościowa (barwienie błękitem alcjanu – wybarwianie wydzielanych przez chondrocyty GAG) oraz ilościowa analiza transkryptomocna wskazuje na korzystny wpływ związku AGF na różnicowanie ASCs w kierunku chondrocytów.

Wyniki badań wskazują zatem na medyczne i diagnostyczne zastosowanie peptydu jako stymulatora chondrogenyzy *in vitro* lub środka pobudzającego chondrogenezę *in vivo*.

Przykład 10

Ocena profilu transkryptomowego komórek macierzystych tkanki tłuszczowej pod wpływem peptydu AGF9

Sprawdzono wpływ dodatku peptydu AGF9 na profil transkryptomowy mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej (ang. ASCs – Adipose Derived Stem Cells). Podskórną tkankę tłuszczową pozyskano od trzech zdrowych pacjentów Kliniki Chirurgii Plastycznej GUMed (zgoda nr NKBBN/387/2014 Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych GUMed). Izolację komórek ASCs przeprowadzono wg standardowego protokołu (Gerlach i wsp. Tissue Eng. Part C Methods 2012) w pożywce DMEM low glucose (Dulbecco's modified Eagle medium) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej (FBS – Fetal Bovine Serum). Wpływ peptydu AGF9 badano po drugim pasażu, w taki sposób, że po zmianie pożywki komórki były hodowane przez 24 h z dodatkiem 10% FBS, kolejne 24 h z 5% FBS, a następnie przez 48 h wyłącznie z dodatkiem peptydu AGF9 w stężeniu 0.1 µg/ml. Jako kontroli użyto komórek ASCs, które przez ostatnie 48 h były hodowane bez żadnych czynników stymulujących (kontrola bez dodatku FBS). Po etapie stymulacji komórki poddano trypsynizacji, płukaniu, a z zamrożonych pelletów komórkowych izolowano RNA do badań transkryptomowych (dla prób o współczynniku RNA Integrity Number > 7). Dla prób pozyskanych od trzech pacjentów przeprowadzono wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA w celu profilowania całego transkryptomu. Otrzymane fragmenty po sekwencjonowaniu zmapowano do genomu referencyjnego człowieka (edycja hg19, reprezentatywny przykład zestawu genów, Human Genome 19- GRCh37, wydanie z roku 2019) z użyciem oprogramowania TopHat. Analizy porównawcze profili transkryptomowych ASCs traktowanych peptydem AGF przeprowadzono w odniesieniu do kontroli FBS Min (komórki ASCs hodowane bez dodatku czynników stymulujących) z wykorzystaniem pakietu Cufflinks według procedury opisanej przez twórców oprogramowania (workflow for Cufflinks version 2.2.0 and higher – <http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/manual/>). Wyniki badań porównawczych dla poszczególnych prób pojedynczo oraz dla triplikatu w postaci matrycy DGE (ang. Differential Gene Expression) poddawano analizie funkcjonalnej w pakiecie Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

IPA pozwala na analizę zmian transkryptów w badanym zestawie danych i powiązanie ich ze zmianami regulatorów „upstream” oraz zjawiskami biologicznymi zachodzącymi w wyniku tych zmian (tzw. „downstream effects”). Współczynnik, który opisuje dopasowanie tych danych to „consistency score”. Po stymulacji komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASCs) peptydem AGF9 (0,1 µg/ml) zaobserwowano aktywację zjawisk świadczących o mobilizacji tych komórek, m.in. ruchy i migrację komórek, przy jednoczesnym zahamowaniu apoptozy.

T a b e l a 1. Lista zjawisk biologicznych zachodzących w ASCs (linie pierwotne z trzech pacjentów Kliniki Chirurgii Plastycznej) w wyniku stymulacji peptydem AGF (0,1 μ g/ml). Z-score to algorytm w EPA, który pozwala na identyfikację zjawisk i funkcji aktywowanych (> 2) lub hamowanych (< -2) w wyniku zmian ekspresji obserwowanych w badanym zestawie danych. Za istotne statystycznie uznaje się dane w $p < 0,05$.

Zjawisko	P	Kierunek zmiany	z-score	Ilość zaangażowanych transkryptów
ruchy komórek	0,0000155	Aktywacja	3,673	29
waskulogeneza	0,000011	Aktywacja	3,395	13
migracja komórek	0,0000306	Aktywacja	2,939	26
transport molekuł	0,0000154	Aktywacja	2,439	22
ruchy komórek embrionalnych linii komórkowych	0,000153	Aktywacja	2,236	6
transport aminokwasów	0,00000274	Aktywacja	2,228	6
metabolizm eikozanoidu	0,00553	Aktywacja	2,177	5
metabolizm kwasów tłuszczowych	0,000484	Aktywacja	2,139	10
wzrost tkanki nabłonkowej	0,00599	Aktywacja	2,105	8
synteza reaktywnych form tlenu	0,00414	Aktywacja	2,020	7
sekrecja białek	0,00186	Aktywacja	2,000	4
migracja komórek linii emrionalnych	0,00214	Aktywacja	2,000	4
Egzocytoza	0,00306	Aktywacja	2,000	4
Apoptoza	0,0011	Zahamowanie	-2,014	29

Zastrzeżenia patentowe

1. Peptyd o sekwencji aminokwasowej Thr-Ser-Arg-Gly-Asp-His-Glu-Leu-Leu-NH₂.
2. Peptyd o sekwencji aminokwasowej Thr-Ser-Arg-Gly-Asp-His-Glu-Leu-Leu-NH₂ do zastosowania jako stymulator chondrogenyzy.
3. Peptyd do zastosowania według, zastrz. 2, **znamienny tym**, że stanowi stymulator różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASCs) w chondrocyty.
4. Peptyd do zastosowania według, zastrz. 2 lub 3, **znamienny tym**, że stanowi stymulator proliferacji, migracji, chemotaksji komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASCs).

5. Peptyd o sekwencji aminokwasowej Thr-Ser-Arg-Gly-Asp-His-Glu-Leu-Leu-NH₂ do zastosowania jako lek w terapii uszkodzeń chrząstki jako stymulator chondrogenazy.
6. Peptyd do zastosowania według, zastrz. 5, **znamienny tym**, że stanowi środek aplikowany lokalnie dostawowo.

Rysunki

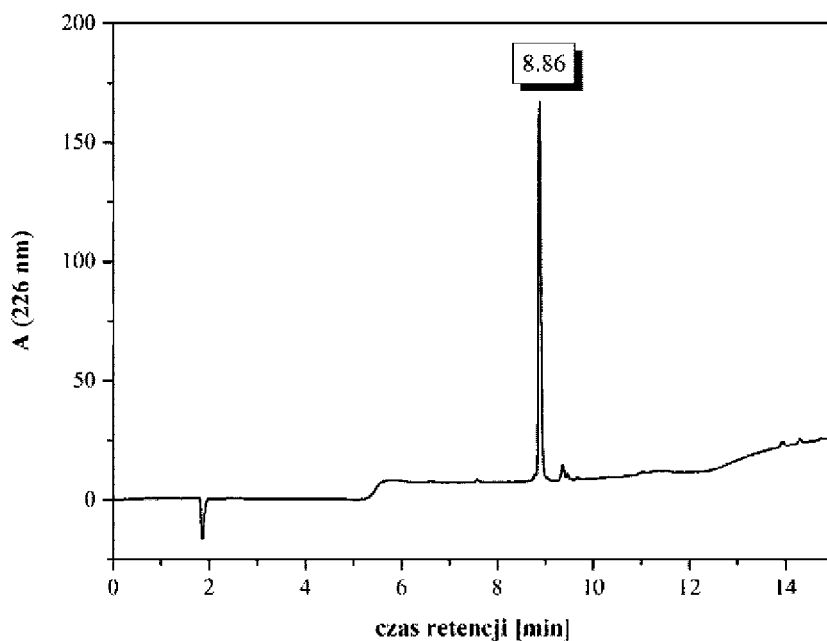


Fig. 1. Chromatogram HPLC peptydu AGF9

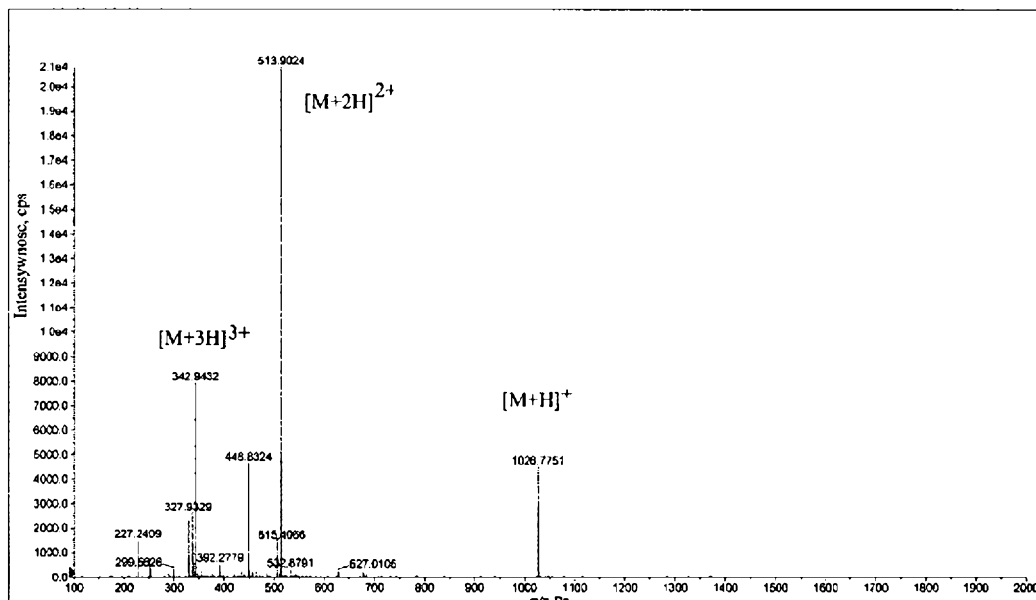


Fig. 2. Widmo masowe ESI MS peptydu AGF9

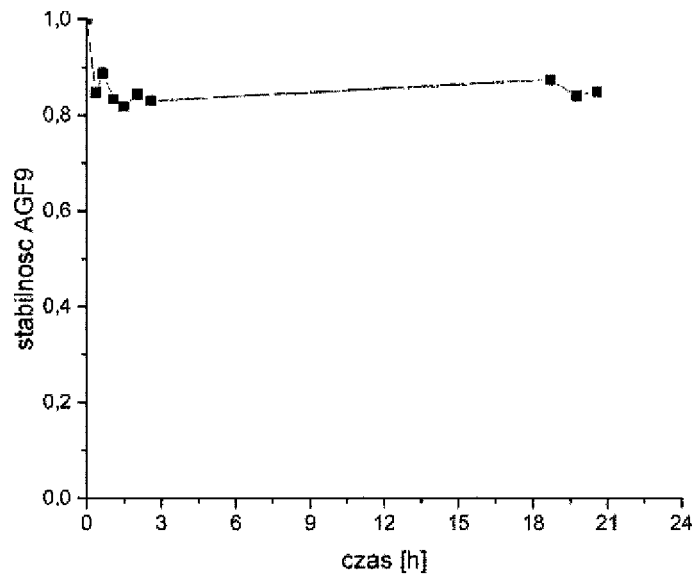


Fig. 3. Stabilność peptydu AGF9 w ludzkim osoczu krwi oznaczona metodą elektroforezy kapilarnej (CE)

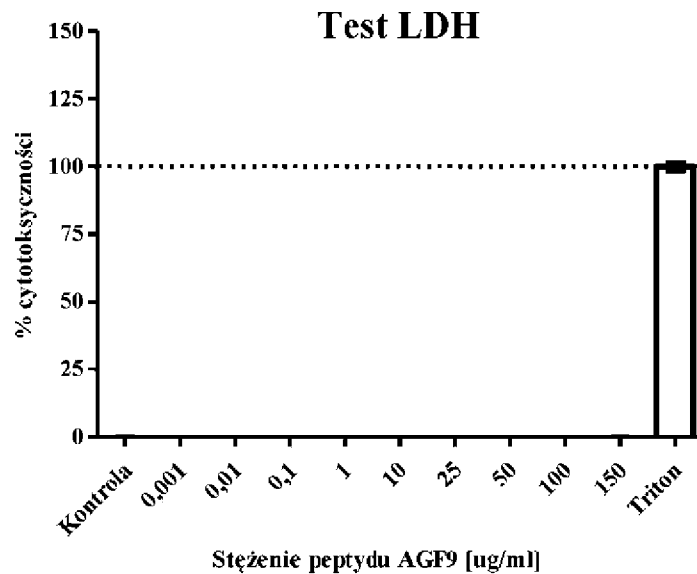


Fig. 4. Cytotoksyczność AGF9 wobec ASCs po 48. godzinach inkubacji, oznaczona metodą uwalniania enzymu dehydrogenazy mleczanowej (test LDH). Wykres przedstawia średnią $\pm$ SEM z 4. niezależnych doświadczeń (w każdym po 4. powtórzenia). * brak statystycznie znaczącej cytotoxyczności ASCs pod wpływem peptydu AGF9 w porównaniu z grupą kontrolną (Kontrola) $p < 0,05$, test U Manna-Whitneya z poprawką na ciągłość.

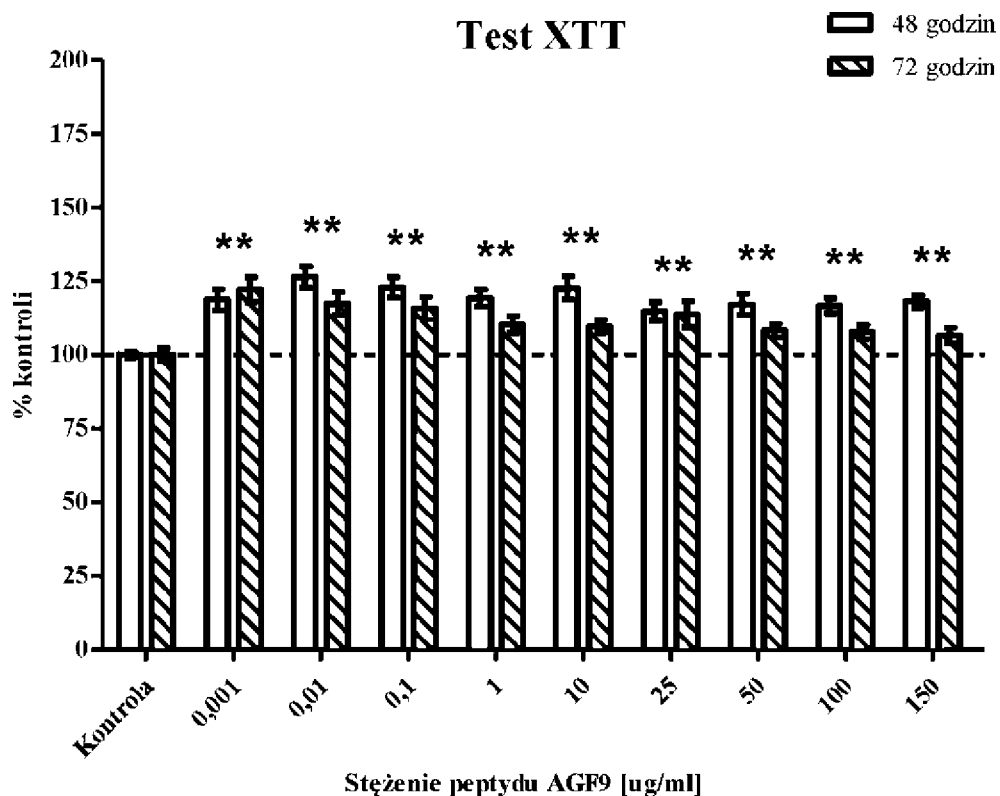


Fig. 5. Wpływ peptydu AGF9 na proliferację komórek ASCs po 48. i 72. Godzinach inkubacji. Wykres przedstawia średnią $\pm$ SEM z 4. niezależnych doświadczeń (każde w 4. powtórzeniach). * statystycznie znamienne wzrost proliferacji ASCs pod wpływem peptydu AGF9 w porównaniu z grupą kontrolną (Kontrola) $p < 0,05$, test U Manna-Whitneya z poprawką na ciągłość.

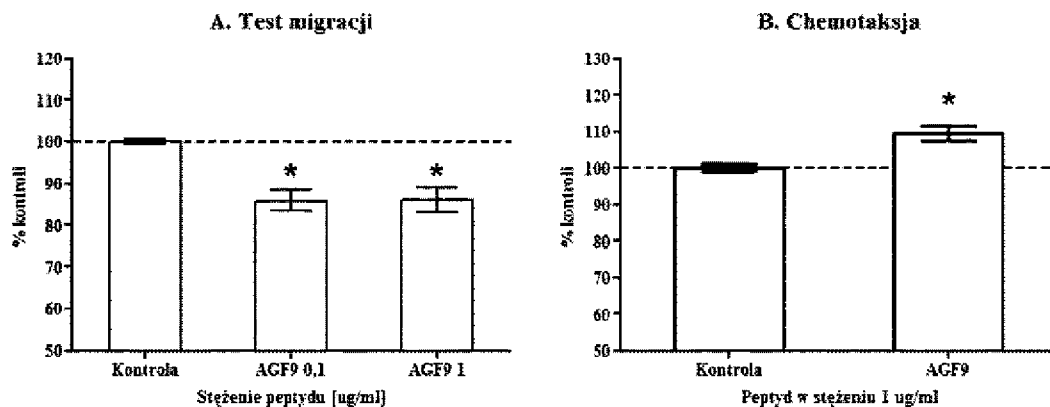


Fig. 6. A. Wpływ peptydu AGF9 na migrację ASCs po 24. godzinach inkubacji w teście zarastania rysy. Wykres przedstawia średnią $\pm$ SEM z 4. niezależnych doświadczeń (każde w 4. powtórzeniach). B. Ocena chemotaktycznych właściwości pochodnych AGF9 wobec ASCs. Wykres przedstawia średnią $\pm$ SEM z 4. niezależnych doświadczeń (każde w 4. powtórzeniach). *statystycznie znamienne różnice w porównaniu z grupą kontrolną (Kontrola) $p < 0,05$, test U Manna-Whitneya z poprawką na ciągłość.

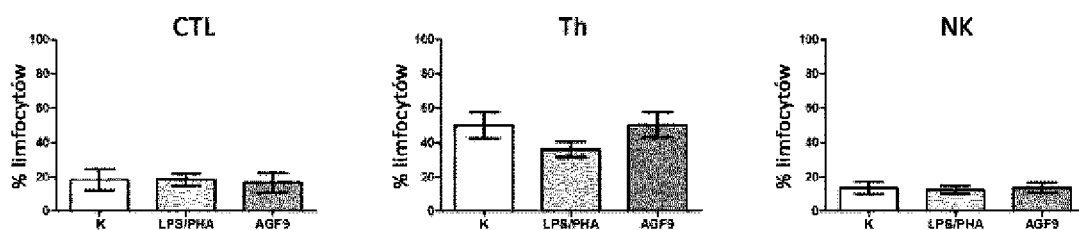


Fig. 7. Ocena immunogenności peptydu AGF9. Przy użyciu cytometrii przepływowej oceniano ilość (jako procent limfocytów) i poziom aktywacji wybranych komórek immunokompetentnych. Wykresy przedstawiają wartości średnie $\pm$ SEM.

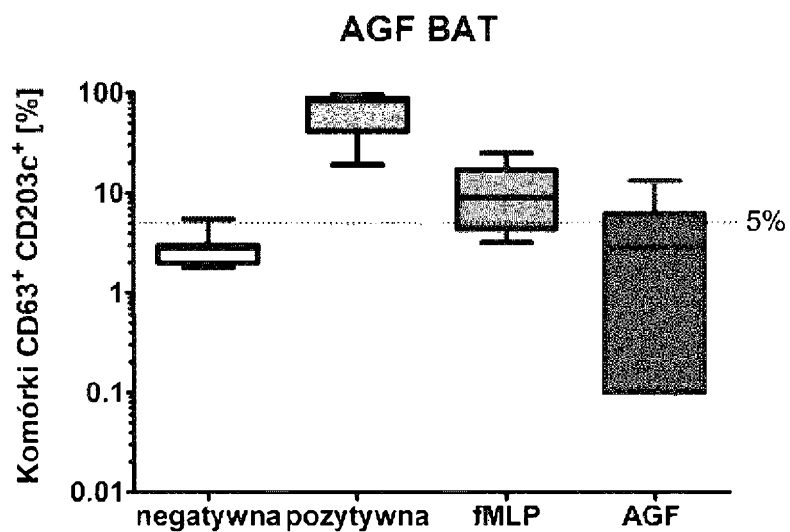


Fig. 8. Ocena potencjału alergizującego peptydu AGF9 przy pomocy testu BAT. Wykres przedstawia procent zaktywowanych granulocytów zasadochłonnych, badanych w warunkach kontrolnych (kontrola: negatywna i dwie pozytywne) oraz obecności AGF9. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ SEM.

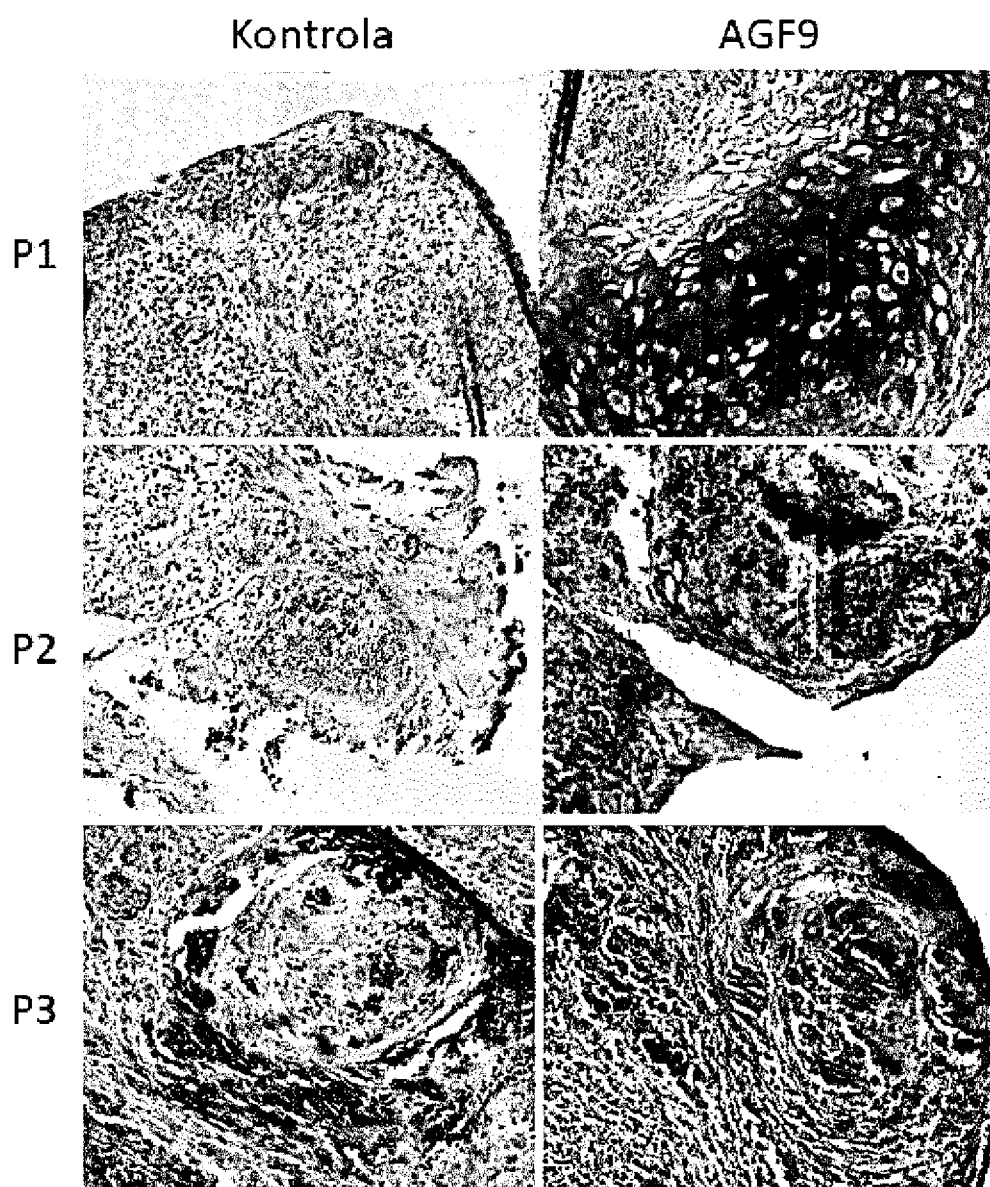


Fig. 9. Ocena wpływu AGF9 na różnicowanie komórek ASCs w chondrocyty. Na rysunku przedstawiono reprezentatywne zdjęcia komórek zróżnicowanych (barwienie Alcian blue uwidacznia wydzielane przez chondrocyty glikozaminoglikany GAG).

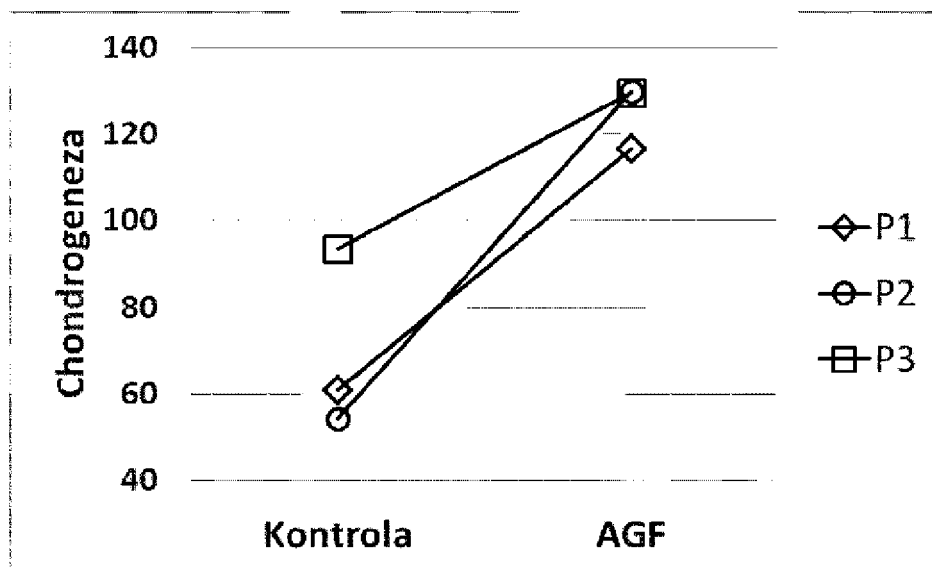


Fig. 10. Ocena wpływu peptydu AGF9 na chondrogenezę przeprowadzona przy pomocy komputerowej analizy zdjęć histologicznych w programie ImageJ v. 1.52

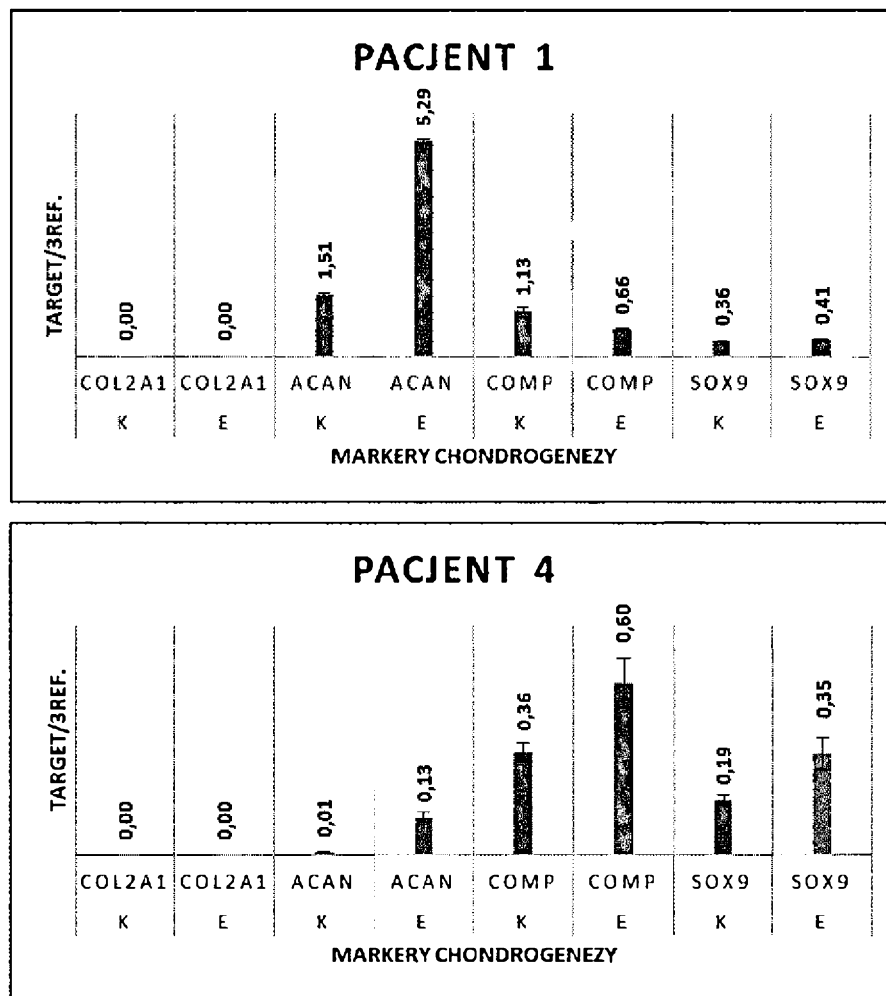


Fig. 11. Oznaczanie tkankowo specyficznych markerów dla chondrocytów za pomocą układu doświadczalnego qPCR. Graficzne przedstawienie danych uzyskanych z Real-time PCR na podstawie analizy Advanced Relative Quantification (Target/Ref) znormalizowanej do trzech genów referencyjnych: *RPL13A*, *RPLP0* i *HPRT1* dla dwóch pacjentów (A) i (B)

„K” próba kontrolna po 6-tygodniowej hodowli

„E” próba eksperymentalna po 6-tygodniowej hodowli po stymulacji związkiem AGF9