РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 429 002** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 38/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2010137996/15, 13.09.2010**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.09.2010

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **13.09.2010**

(45) Опубликовано: **20.09.2011** Бюл. № **26**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2195311 C2, 27.12.2002. RU 2193868 C2, 10.12.2002. RU 2295969 C1, 27.03.2007. US 5367053, 22.11.1994. WO 2004106491, 09.12.2004. ЛЕПЕХОВА Н.П. Биохимические показатели в оценке гуморальных влияний на репаративную реакцию кости. Автореф. дисс. канд. биол. наук. - Ташкент, 1979, 18 с. STUTZMANN JM et al. Differential electrographic patterns for** (см. прод.)

Адрес для переписки:
305041, г.Курск, ул. К. Маркса, 3, КГМУ, патентный отдел, З.Н. Куприяновой

(72) Автор(ы):
Чердаков Виктор Юрьевич (RU),
Смахтин Михаил Юрьевич (RU),
Дубровин Григорий Михайлович (RU),
Бобынцев Игорь Иванович (RU),
Дудка Виктор Тарасович (RU),
Долгинцев Максим Евгеньевич (RU),
Крюков Алексей Анатольевич (RU),
Корошвили Вадим Теймуразович (RU),
Соболева Ирина Михайловна (RU),
Кононец Евгений Николаевич (RU),
Белых Андрей Евгеньевич (RU),
Иванова Ольга Игоревна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Курский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию" (RU)

(54) СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к травматологии и хирургии, и может быть использовано для стимуляции сращения переломов костей. Способ включает введение даларгина, отличающийся тем, что используют комбинацию пептидов Gly-His-Lys и даларгина парентерально в эквимолярных разовых дозах 0,5 и 1,2 мкг/кг массы соответственно один раз в сутки, в течение десяти дней. Использование изобретения позволяет улучшить репаративную способность костной ткани и сократить сроки консолидации переломов костей. 4 ил.

(56) (продолжение):
specific mu-and delta-opioid peptides in rats. Eur J Pharmacol, 1986, Apr 9, 123(1), 53-9, реферат, он-лайн [Найдено в Интернет на www.pubmed.com 05.02.2008], PMID: 3011458 [PubMed - indexed for MEDLINE].

RU 2429002 C1

RU 2429002 C1

RUSSIAN FEDERATION

(19) **RU** (11) **2 429 002** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
A61K 38/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010137996/15, 13.09.2010**

(24) Effective date for property rights:
13.09.2010

Priority:
(22) Date of filing: **13.09.2010**

(45) Date of publication: **20.09.2011 Bull. 26**

Mail address:
305041, g.Kursk, ul. K. Marksa, 3, KGMU, patentnyj otdel, Z.N. Kuprijanovoj

(72) Inventor(s):
Cherdakov Viktor Jur'evich (RU),
Smakhtin Mikhail Jur'evich (RU),
Dubrovin Grigorij Mikhajlovich (RU),
Bobyntsev Igor' Ivanovich (RU),
Dudka Viktor Tarasovich (RU),
Dolgintsev Maksim Evgen'evich (RU),
Krjukov Aleksej Anatol'evich (RU),
Koroshvili Vadim Tejmurazovich (RU),
Soboleva Irina Mikhajlovna (RU),
Kononets Evgenij Nikolaevich (RU),
Belykh Andrej Evgen'evich (RU),
Ivanova Ol'ga Igorevna (RU)

(73) Proprietor(s):
Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego professional'nogo obrazovanija "Kurskij gosudarstvennyj meditsinskij universitet Federal'nogo agentstva po zdravookhraneniju i sotsial'nomu razvitiju" (RU)

(54) METHOD OF STIMULATING REPARATIVE OSTEOGENESIS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method includes introduction of dalargin, characterised by the fact that used is combination of peptides Gly-His-Lys and dalargin parenterally in equimolar single doses 0.5-1.2 mcg/kg of weight respectively one time per day, for ten days.

EFFECT: application of invention makes it possible to improve reparative ability of bone tissue and reduce terms of bone fracture consolidation.

4 dwg, 1 ex

RU 2429002 C1

RU 2429002 C1

Изобретение относится к медицине (травматологии, хирургии) и ветеринарии. Способ может быть использован для стимуляции сращения переломов костей.

Наиболее близким является способ стимуляции консолидации переломов с помощью пептидного препарата «Даларгин» (В.А.Дегтярь, М.О.Каминская, А.И.Мохов. Восстановительное лечение детей с замедленной консолидацией переломов костей. // НДІ травматології та ортопедиії Донецького національного медичного університету ім. М.Горького. Том 9, №1, 2008. (Патент Украины 67601 А)).

Даларгин - высокоселективный агонист опиоидных μ- и δ-рецепторов, имеющий формулу Тир-Д-Ала-Гли-Фен-Лей-Арг, отличающийся от нативного энкефалина наличием Д-аланина и аргинина. В настоящее время известны репаративные эффекты этого опиоидного пептида в отношении ряда тканей (Effects of dalargin on reparative processes in skin and muscle wounds of irradiated animals Radiobiologiia. 1992 Nov-Dec; 32(6):873-80. Shekhter AB, Solov'eva AI, Spevak SE, Titov MI. Biull Eksp Biol Med. 1988 Oct; 106(10):487-90. Effects of opioid peptide dalargin on reparative processes in wound healing.)

Недостатком предложенного способа является техническая сложность его исполнения и относительно невысокая эффективность. Требуется, отступив на 1 см от области перелома, проколоть перпендикулярно к оси кости инъекционной иглой мягкие ткани и надкостницу до чувства упора в кость, затем необходимо изменить угол наклона до 45° и продвинуться в направлении к перелому и только после этого с помощью шприца вводят даларгин. Таким образом, процедура введения препарата достаточно сложна и требует определенных навыков и умений. Кроме того, при таком способе повышается риск инфицирования области перелома, введение препарата сопряжено с болевым синдромом и, как отмечают сами авторы, в ряде случаев установлен неудовлетворительный результат (В.А.Дегтярь, М.О.Каминская, А.И.Мохов. Восстановительное лечение детей с замедленной консолидацией переломов костей // НДІ травматології та ортопедії Донецького національного медичного університету ім. М.Горького. Том 9, №1, 2008.).

Задача изобретения - улучшение репаративной способности костной ткани с целью сокращения сроков консолидации переломов костей.

Задача изобретения достигается путем парентерального (внутрибрюшинного) введения даларгина в комбинации с пептидом Gly-His-Lys (имеющего формулу H_2N-Gly-L-His-L-Lys-COOH) для стимуляции репаративного остеогенеза.

Пептидные субстанции, растворенные в физиологическом растворе (NaCl), вводят один раз в сутки, одновременно, но в разных шприцах, парентерально (внутрибрюшинно) сразу после возникновения перелома в эквимолярных разовых дозах (Gly-His-Lys - 0,5 мкг/кг массы тела и даларгин - 1,2 мкг/кг соответственно) в течение 10 дней с интервалом в 24 часа между инъекциями. При этом рентгенологические и гистологические исследования, проведенные на экспериментальных животных (крысы Вистар), свидетельствуют о стимуляции репаративного остеогенеза.

Изобретение поясняется следующими фигурами

На Фиг.1 представлены фотографии рентгенограмм бедренных костей лабораторных крыс через 10 суток после моделирования перелома: 1. Введение физиологического раствора (контроль). 2 - Введение пептида Gly-His-Lys (линия перелома менее выражена по сравнению с контролем). 3. Введение даларгина (линия перелома менее выражена по сравнению с контролем). 4. Введение комбинации пептидов Gly-His-Lys + даларгин (линия перелома практически не прослеживается).

На Фиг.2 представлены фотографии гистологических срезов наружной костной мозоли лабораторных крыс, получавших физиологический раствор (контроль) через 10 суток после перелома бедренной кости (фото).

Слева - крупное скопление хрящевых клеток, кнаружи от которого - слой остеогенных клеток (микрофото, окраска гематоксилин + эозин (Г+Э), х200); справа - новообразованные костные трабекулы, непосредственно связанные с костным отломком (микрофото, Г+Э, х140).

Фиг.3. Гистология наружной костной мозоли у животных, получавших пептид GHL через 10 суток после перелома бедренной кости (фото).

Слева - новообразование костных трабекул, кнаружи - слой из остеогенных клеток (микрофото, Г+Э, х200); справа - новообразованные костные трабекулы, формирование губчатой кости (микрофото, Г+Э, х200).

Фиг.4. Гистологическая картина наружной костной мозоли у животных, получавших комбинацию пептидов Gly-His-Lys+даларгин через 10 суток после перелома бедренной кости (фото).

Слева - над костными отломками в тесной связи с их тканью слой новообразованных остеобластами костных трабекул, кнаружи - слой остеогенных клеток, покрытый фиброзным слоем надкостницы (микрофото, Г+Э, х140); справа - в тесной связи с тканью костного отломка новообразованная костная ткань с надкостницей и с явлениями перестройки в компактную кость (микрофото, Г+Э, х200).

Способ осуществляется следующим образом.

Пептид Gly-His-Lys, имеющий формулу H_2N-Gly-L-His-L-Lys-COOH, может быть куплен у поставщиков реактивов и препаратов для биомедицинских исследований (Sigma, ICN, Merk и др.) или синтезирован в любой лаборатории синтеза пептидов. Нами был использован препарат, синтезированный в НИИ химии Санкт-Петербургского государственного университета. Даларгин (Микроген НПО ФГУП, Россия), имеющий формулу Тир-Д-Ала-Гли-Фен-Лей-Арг, является общедоступным фармацевтическим средством, а также может быть синтезирован в лабораториях синтеза пептидов.

Берутся навески соответствующих пептидов и растворяются в физиологическом растворе хлорида натрия (NaCl). Затем пептиды вводятся один раз в сутки, одновременно, но в разных шприцах, лабораторным животным, сразу после перелома, в эквимолярных разовых дозах (Gly-His-Lys - 0,5 мкг/кг массы тела и даларгин - 1,2 мкг/кг соответственно) парентерально (внутрибрюшинно) в 0,1 мл физиологического раствора (NaCl) в течение 10 дней с интервалом 24 часа между инъекциями.

В результате проведенных рентгенологических и гистологических исследований было выявлено, что по отдельности пептиды Gly-His-Lys и даларгин стимулировали репаративный остеогенез. При комбинированном введении препаратов (Gly-His-Lys+даларгин) наблюдалось существенное усиление репаративного эффекта по сравнению с использованием препаратов по отдельности.

Пример конкретного использования.

Крысы Вистар были разделены на группы по 8-10 крыс в каждой. Животным, наркотизированным хлоралгидратом, моделировали закрытый перелом бедренной кости задней правой лапки с последующей интрамедуллярной фиксацией ее спицей. В течение 10 дней со дня перелома животным один раз в сутки внутрибрюшинно вводили комбинацию пептидов (Gly-His-Lys+даларгин) в эквимолярных разовых

дозах 0,5 мкг и 1,2 мкг на 1 кг массы тела соответственно в 0,1 мл физиологического раствора (NaCl) с интервалом 24 часа между инъекциями. Крысам контрольной группы вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме в течение того же периода времени. Животных выводили из эксперимента через 10 суток после перелома. Лапы крыс фиксировали в 10% нейтральном формалине на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,2. Затем изготовляли парафиновые срезы, окрашивали гематоксилином и эозином (Г+Э), после чего изучали морфологическую картину наружной костной мозоли.

Гистологически костная мозоль над местом перелома у животных, получавших физиологический раствор (контроль), представлена массивной зоной пролиферирующих остеогенных клеток, в толще которой в неваскуляризированных местах обнаруживаются крупные скопления клеток хрящевой ткани (Фиг.2, слева). В дистально расположенных от места перелома отделах костная мозоль образована васкуляризированной тканью из остеогенных клеток, в глубине которой в непосредственной близости с сохранившей жизнеспособность тканью костных отломков обнаруживаются новообразованные остеобластами костные трабекулы (Фиг.2, справа).

У животных, получавших пептид Gly-His-Lys, в области перелома в краях костных отломков наблюдается активная резорбция остеокластами погибшей костной ткани. Над костными отломками располагается широкий слой, представленный множеством мелких сосудистых полостей и интенсивно пролиферирующими остеогенными клетками (имеются многочисленные митозы клеток), среди остеогенных клеток встречаются мелкие очаговые скопления хондроцитов. В костной мозоли, расположенной дистальнее от места перелома, наблюдается интенсивное новообразование костных трабекул, имеющих непосредственную связь с сохранившей жизнеспособность тканью костных отломков, с формированием губчатой костной ткани (Фиг.3.).

В группе животных, получавших даларгин, видимых морфологических различий с крысами, которым вводили пептид Gly-His-Lys, не было выявлено. Наблюдались репаративные изменения, сопоставимые с теми, которые отмечались у животных, получавших пептид Gly-His-Lys.

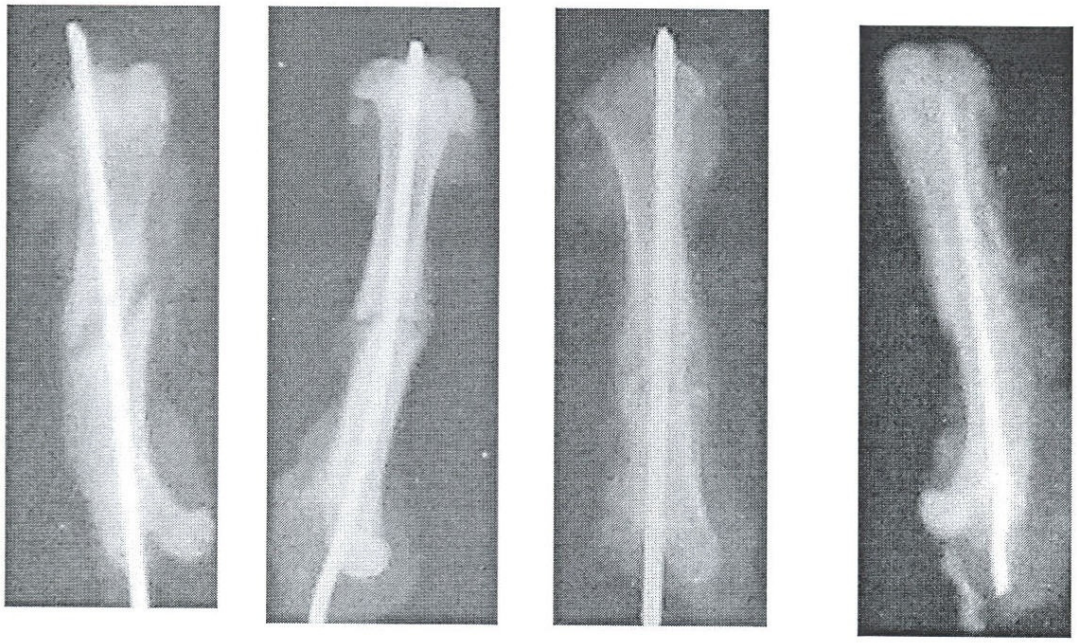
У животных, получавших комбинацию пептидов Gly-His-Lys+даларгин, при морфологическом исследовании наружная костная мозоль в области места перелома представлена двумя слоями: над костными отломками в тесной связи с их тканью слой новообразованных остеобластами костных трабекул, кнаружи - покрытый фиброзным слоем надкостницы слой остеогенных клеток с мелкими очаговыми скоплениями хондроцитов (Фиг.4. слева). В дистальных от линии перелома отделах костной мозоли обнаруживается в тесной связи с тканью костного отломка новообразованная костная ткань с надкостницей и с явлениями перестройки в компактную кость (Фиг.4. справа).

Учитывая вышеперечисленное, можно заключить, что пептиды Gly-His-Lys и даларгин по отдельности, а также их комбинация (Gly-His-Lys+даларгин) стимулировали репаративный остеогенез при переломе бедренной кости. Более выраженные репаративные изменения наблюдались в группе комбинированного введения пептидов (Gly-His-Lys+даларгин).

Таким образом, при переломах костей благодаря синергичному действию пептидов Gly-His-Lys и даларгина происходит существенное усиление репаративного эффекта, что может быть использовано для стимуляции репаративного остеогенеза.

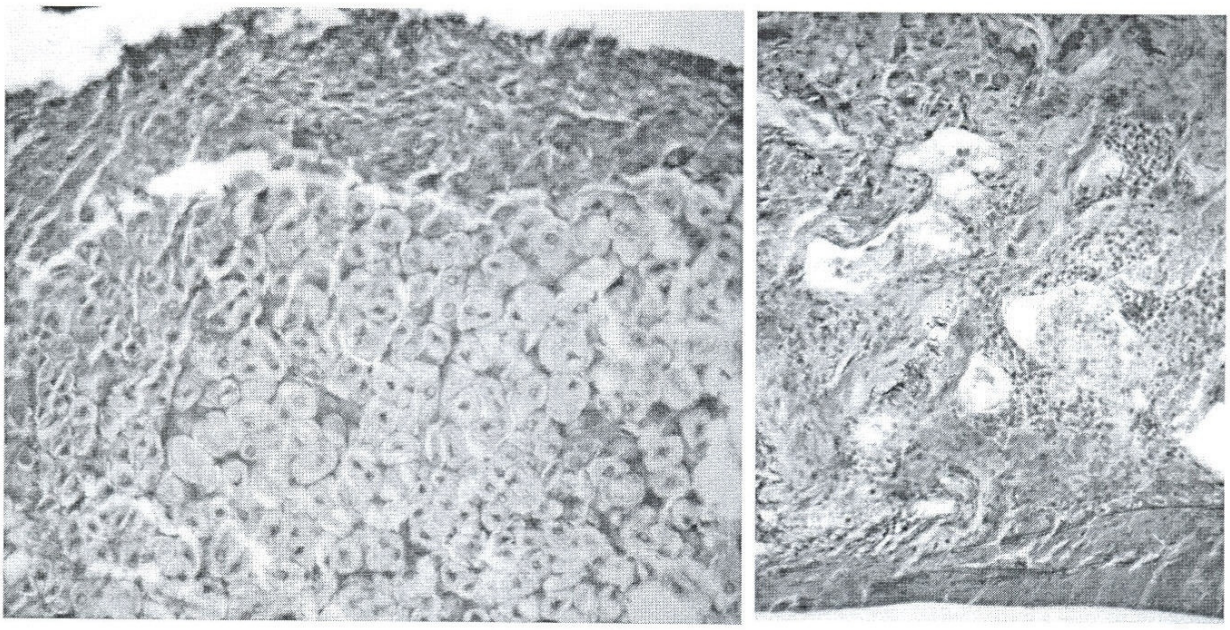
Формула изобретения

Способ стимуляции репаративного остеогенеза, включающий введение даларгина, отличающийся тем, что используют комбинацию пептидов Gly-His-Lys и даларгина парентерально в эквимолярных разовых дозах 0,5 и 1,2 мкг/кг массы соответственно один раз в сутки, в течение десяти дней.

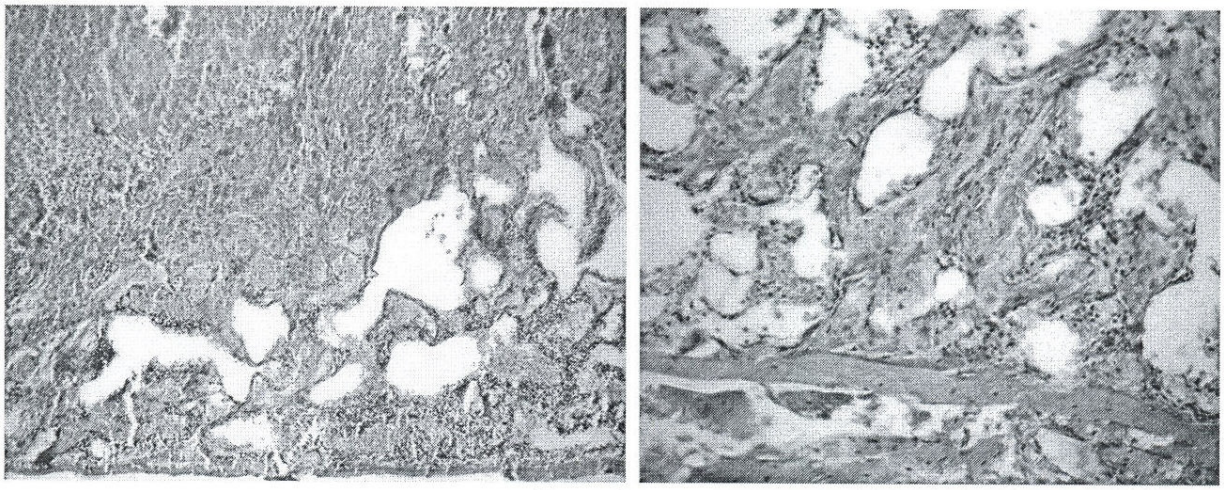


1 2 3 4

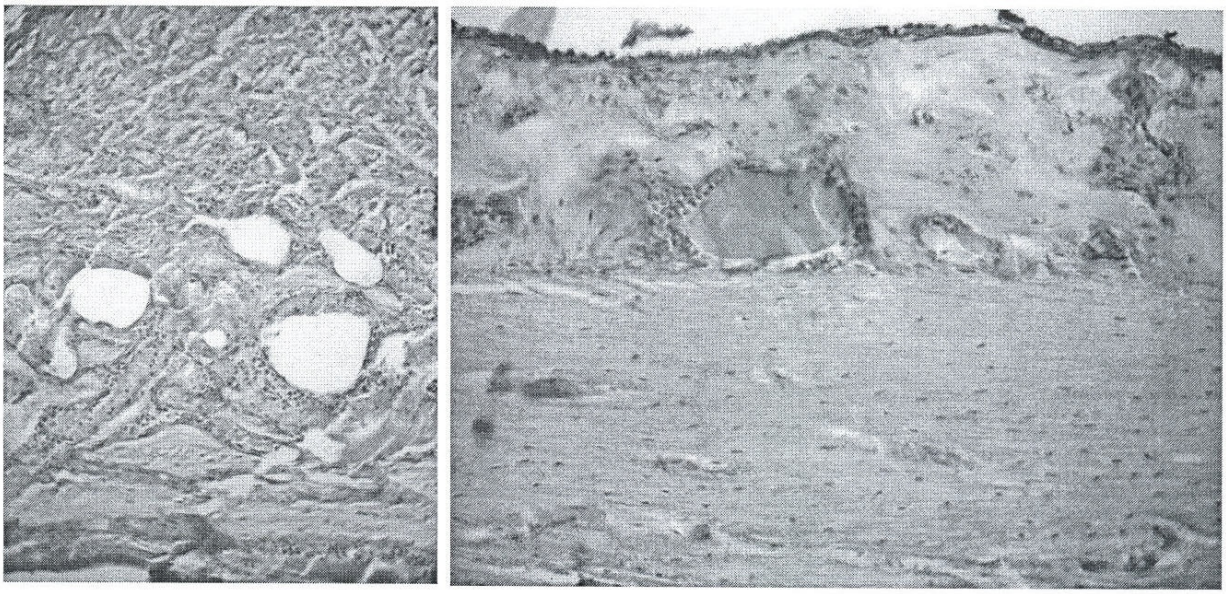
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4