



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009123960/15**, 23.11.2007(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.11.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.11.2006 US 60/867,152(43) Дата публикации заявки: **27.12.2010** Бюл. № 36(45) Опубликовано: **27.02.2014** Бюл. № 6(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 20020009730 A1**, 24.01.2002. **US 20030235813 A1**, 25.12.2003. **DELL'ACCIO F. et al. Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. Arthritis Rheum. 2001 Jul; 44(7):1608-1619 [Найдено 16.05.2011] [онлайн]. Найдено из Интернет: <URL: (см. прод.)**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **24.06.2009**(86) Заявка РСТ:
EP 2007/010285 (23.11.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/061804 (29.05.2008)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517**

(72) Автор(ы):

**ЛЮТЕН Франк (BE),
ДЕ БАРИ Козимо (GB),
ДЕЛЛЬ'АЧЧО Франческо (GB)**

(73) Патентообладатель(и):

ТИЖЕНИ Н.В. (BE)**(54) МАРКЕРНЫЕ ГЕНЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИДЕНТИФИКАЦИИ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ХОНДРОЦИТОВ И В СКРИНИНГЕ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ПРОДУЦИРОВАНИЕ ХРЯЦА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для прогнозирования *in vitro* способности популяции клеток, полученных из сустава, продуцировать стабильный гиалиновый хрящ *in vivo*. В популяции клеток определяют экспрессию ряда маркерных генов,

включающих позитивный маркер **FRZB** (Frizzled-Подобный Белок 1), негативный маркер **ALK1** (Рецептор Активина А, Типу II-Подобная Киназа) и один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из негативного маркера **PEDF** (Фактор, Выделенный из Пигментного Эпителия),

позитивного маркера COL11 (Коллаген, Тип XI A1), позитивного маркера COL2 (Коллаген, Тип II, Альфа 1) и позитивного маркера FGFR3 (Рецептор Фактора Роста Фибробластов 3). Уровни экспрессии каждого индивидуального маркера представляют с помощью числового значения. Числовые значения комбинируют в кумулятивный показатель, где значение

кумулятивного показателя указывает на способность к продукции стабильного хряща. Предлагаемое изобретение обеспечивает эффективное прогнозирование способности популяции клеток, полученных из сустава, продуцировать стабильный гиалиновый хрящ *in vivo*. 5 з.п. ф-лы, 4 ил., 11 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1529-0131\(200107\)44:7%3C1608::AID-ART284%3E3.0.CO;2-T/abstract;jsessionid=6310DFE09AA3EC261079D500B89B91B2.f02t0l](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1529-0131(200107)44:7%3C1608::AID-ART284%3E3.0.CO;2-T/abstract;jsessionid=6310DFE09AA3EC261079D500B89B91B2.f02t0l)>. RU 2209433 C2, 27.07.2003.

RU 2 5 0 8 5 4 8 C 2

RU 2 5 0 8 5 4 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2009123960/15, 23.11.2007**

(24) Effective date for property rights:
23.11.2007

Priority:

(30) Convention priority:
24.11.2006 US 60/867,152

(43) Application published: **27.12.2010 Bull. 36**

(45) Date of publication: **27.02.2014 Bull. 6**

(85) Commencement of national phase: **24.06.2009**

(86) PCT application:
EP 2007/010285 (23.11.2007)

(87) PCT publication:
WO 2008/061804 (29.05.2008)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):

**LJuTEN Frank (BE),
DE BARI Kozimo (GB),
DELL"ACHChO Franchesko (GB)**

(73) Proprietor(s):

TIZhENI N.V. (BE)

(54) **MARKER GENES USED TO IDENTIFY PHENOTYPIC STABILITY OF CHONDROCYTES AND TO SCREEN CARTILAGE PRODUCTION FACTORS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: predicting in vitro an ability of a cartilage cell population to produce a stable hyaline cartilage in vivo of the cell population ensures determining an expression of a number of marker genes comprising a positive marker FRZB (Frizzled-like protein D), a negative marker ALK1 (Activine A Receptor, Type II-Like Kinase) and one or more markers specified in a group consisting of a negative marker PEDF (Pigment epithelium derived factor), a positive marker COL11 (Collagen, Type XI AI), a

positive marker COL2 (Collagen, Type II. Alpha I) and a positive marker FGFR3 (Fibroblast growth factor receptor 3). The expression levels of each specific marker are presented by a numerical value. The numerical values are combined into a cumulative value, wherein the cumulative value shows an ability to produce the stable cartilage.

EFFECT: effective prediction of the ability of the cartilage cell population to produce the stable hyaline cartilage in vivo.

6 cl, 4 dwg, 11 tbl, 5 ex

RU 2 508 548 C2

RU 2 508 548 C2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способам и средствам для определения фенотипической стабильности хондроцитов и к системам скрининга для идентификации соединений, применяющихся в лечении хрящевых дефектов и связанных с хрящевыми дефектами заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Восстановление хрящевых дефектов достигается, главным образом, с помощью хирургических методов, таких как методы стимулирования костного мозга, или с помощью имплантации клеток, образующих хрящ, (хондроцитов, (хондро-) предшественников и их предшественников или стволовых клеток, которые развиваются в хрящ). Принимая это во внимание, представляет интерес идентификация факторов, способных позитивно влиять на образование хряща *in vivo*. Действительно, является целесообразной идентификация хирургических процедур или терапевтических методов или соединений, способных позитивно влиять на образование хряща, опосредованных локальным присутствием клеток внутри или поблизости от дефекта. Кроме того, для терапий на основе клеток представляет интерес идентификация факторов или способов лечения, которые могут позитивно влиять на способность выделенных популяций клеток, которые были размножены или пассированы *in vitro*, продуцировать стабильный хрящ *in vivo*. Описаны различные анализы, где в качестве параметра для скрининга соединений используется экспрессия генов, вовлеченных в образование хряща. В US2002061514 описан способ, где репортерный ген является зависимым от транскрипционного фактора SOX9. SOX9 представляет собой транскрипционный фактор, содержащий домен группы белков с высокой подвижностью (HMG), который экспрессируется в хондроцитах, хондро-предшественниках и в других тканях, и было обнаружено, что он является существенным для дифференцировки хондроцитов и образования хряща. Также описаны другие способы, основанные на уровне экспрессии индивидуальных генов, которые вовлечены в хрящевой метаболизм и остеохондральные дефекты [например, гены, связанные с остеопорозом в WO02081745].

Также описаны методы скрининга, которые основаны на *in vitro*-дифференцировке клеток в хрящ. Однако было обнаружено, что прогностичность результата таких моделей ограничена, и такие анализы требуют больших количеств клеток и являются трудоемкими.

В WO200466723 предлагается *in vivo*-модель, где влияние соединений на образование кости и хряща у Данио рерио (*zebrafish*) оценивается *in vivo*. Одна из наиболее достоверных моделей для оценки способности клеток образовывать стабильный хрящ представляет собой внутримышечную имплантацию клеток голым мышам с последующей гистологической оценкой образованных имплантатов. Использование этой модели голых мышей, которая сама по себе является трудоемкой и непрактичной для высокопроизводительного скрининга, избежали с применением технологии, описанной в WO0124833. В этой патентной заявке описано применение молекулярных маркеров, идентифицированных на основе модели образования хряща у голых мышей, для оценки хондрогенного потенциала размноженных или пассированных клеток в целях трансплантации. Подобным образом, ряд подходящих маркеров фенотипической стабильности хондроцитов описан в патенте US2003235813. Однако в то время как идентификация этих маркеров представляет собой основу для идентификации популяции клеток, способных к продуцированию стабильного гиалинового хряща *in vivo*, остается необходимость дальнейших усовершенствований.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на новой концепции получения маркерного профиля, который является показателем образования хряща в любых данных условиях, т.е., либо в нативных для клеток или индуцированных, профиля, который может рассматриваться в качестве целевого профиля при идентификации факторов, способных влиять на образование хряща.

Соответственно, в настоящем изобретении предлагается ряд маркеров, которые могут достоверно использоваться для прогнозирования потенциала образования хряща популяции клеток. Уровень экспрессии этих маркеров может использоваться для прогнозирования того, способна ли популяция клеток, например, *in vitro* или *in vivo*, продуцировать хрящ *in vivo* при имплантации или при стимулировании. Это представляет интерес с точки зрения определения терапевтического потенциала популяции клеток. Ряд маркеров также представляет собой достоверное средство для определения влияния данного лечения на фенотипическую стабильность хондроцитов популяции клеток перед имплантацией. Более того, настоящее изобретение предлагается для комбинированных режимов лечения, включающих введение стволовых клеток или остеохондральных клеток в сустав, и введение лекарственного средства, влияющего на хондрогенный потенциал вводимой популяции клеток.

Согласно настоящему изобретению, фенотипическая стабильность популяции клеток *in vitro* используется в анализах скрининга для идентификации факторов, способных влиять на фенотипическую стабильность хондроцитов *in vitro* и/или *in vivo*. В изобретении предлагается ряд маркеров, показательных для фенотипической стабильности хондроцитов, экспрессия которых используется для прогнозирования влияния соединений и/или условий *in vitro* или *in vivo* на способность популяции клеток продуцировать хрящ *in vivo*. Использование этих маркеров в анализе скрининга дает возможность осуществления скрининга большого количества соединений и/или условий на хондроцитах без проведения трудоемких и трудно осуществимых экспериментов на животных.

В одном аспекте изобретение относится к способам определения способности популяции клеток продуцировать стабильный гиалиновый хрящ. Более конкретно, предлагаются *in vitro*-способы определения способности популяции клеток продуцировать стабильный гиалиновый хрящ *in vivo*. В частных вариантах осуществления предлагаются способы, которые включают определение экспрессии популяцией клеток ряда маркерных генов, включающих по меньшей мере три маркерных гена, включающих FRZB, ALK1 и один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из PEDF, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 и RASF-PLA.

В частных вариантах осуществления способов, предложенных здесь, популяция клеток контактирует с соединением или условием.

В частных вариантах осуществления предлагаются способы, которые включают стадии контактирования популяции клеток с соединением или условием, и определения уровня экспрессии в популяции клеток ряда маркерных генов, включающих по меньшей мере три маркерных гена, включающих FRZB, ALK1 и один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из PEDF, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 и RASF-PLA. В этих способах уровень экспрессии ряда маркеров, включающих по меньшей мере три маркера, является показателем способности клеток продуцировать стабильный гиалиновый хрящ *in vivo*, например, при имплантации пациенту.

Следующие варианты осуществления способов, описанные здесь, включают, перед контактированием популяции клеток с соединением или условием, стадии определения

в популяции клеток уровня экспрессии ряда маркерных генов, включающих по меньшей мере три маркерных гена, и, после стадии контактирования, включают определение того, влияет ли присутствие соединения или условия на экспрессию в популяции клеток одного или более маркерных генов из ряда маркерных генов, включающих по меньшей мере три маркерных гена. Более конкретно, предлагаются способы, которые включают на основе влияния присутствующего соединения или условия на экспрессию в популяции клеток ряда маркерных генов, включающих по меньшей мере три маркерных гена, определение влияния соединения или условия на способность популяции клеток продуцировать стабильный гиалиновый хрящ *in vivo*. В частных вариантах осуществления способов, описанных здесь, соединения или условия, способные повышать экспрессию одного или более позитивных маркерных генов, выбранных из группы, состоящей из FRZB, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 и RASF-PLA, идентифицируют как позитивно влияющие на образование хряща, и соединения, способные повышать экспрессию или PEDF и/или ALK-1, идентифицируют как негативно влияющие на образование хряща, более конкретно, на способность клеток продуцировать стабильный гиалиновый хрящ *in vivo*.

В следующих частных вариантах осуществления способов, описанных здесь, ряд маркеров представляет собой ряд, включающий по меньшей мере 4, 5 или 6 маркерных генов, включающих FRZB, ALK1 и включающих соответственно 2, 3 и 4 маркерных гена, выбранных из группы, состоящей из PEDF, COL11, COL2 и FGFR3. Более конкретные варианты осуществления способов, описанных здесь, относятся к способам, где маркерные гены представляют собой ряд маркерных генов, включающих по меньшей мере шесть маркерных генов, включающих FRZB, ALK1, PEDF, COL11, COL2 и FGFR3.

В частных вариантах осуществления способов, описанных здесь, способность соединения или условия влиять на образование хряща определяют на основе кумулятивного влияния соединения или условия на экспрессию ряда маркерных генов, включающих по меньшей мере три маркерных гена. Более конкретно, кумулятивное влияние соединения или условия на экспрессию позитивных маркерных генов, выбранных из группы, состоящей из FRZB, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 и RASF-PLA, и кумулятивное влияние соединения или условия на негативные маркерные гены PEDF и/или ALK-1 являются показателем способности соединения или условия влиять на фенотипическую стабильность хондроцитов популяции клеток.

В частных вариантах осуществления способов, описанных здесь, популяцию клеток получают из сустава. Популяцию клеток получают от здорового донора и от индивидуума с остеохондральным дефектом. В конкретных анализах, предусматривается влияние соединения или условия на оба типа клеток. В частных вариантах осуществления способов, описанных здесь, уровень экспрессии одного или более маркеров определяют с помощью количественного метода.

Следующий аспект изобретения относится к применению ряда маркеров для идентификации соединения, которое способно влиять на способность клеток, более конкретно, хондроцитов или клеток-предшественников хондроцитов, продуцировать хрящ *in vivo*. В частных вариантах осуществления, применение характеризуется тем, что ряд маркеров включает ряд, включающий по меньшей мере три маркерных гена, включающих FRZB, ALK1 и один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из PEDF, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 и RASF-PLA. В некоторых вариантах осуществления, применение включает ряд маркерных генов, включающих по меньшей мере шесть маркерных генов, включающих FRZB, ALK1, PEDF, COL11,

COL2 и FGFR3.

В следующем аспекте изобретение относится к наборам реагентов, включающие зонды для детекции экспрессии ряда генов в клетках, образующих хрящ, где ряд генов включает ряд, включающий по меньшей мере три маркерных гена, включающих FRZB, ALK1 и один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из PEDF, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 и RASF-PLA.

В некоторых вариантах осуществления, предлагаются наборы реагентов, где ряд маркерных генов представляет собой ряд, включающий по меньшей мере шесть маркерных генов, включающих FRZB, ALK1, PEDF, COL11, COL2 и FGFR3.

Частные варианты осуществления наборов реагентов, предложенных здесь, представляют собой наборы реагентов, где зонды представляют собой олигонуклеотиды, которые гибридизуются с мРНК, где зонды представляют собой антитела и/или где зонды представляют собой ряд ПЦР-праймеров, специфичных для тестируемых маркеров. Предусмотрены наборы реагентов, которые включают различные типы зондов. В следующих вариантах осуществления наборов реагентов предлагаются меченные зонды.

В следующем аспекте изобретение относится к устройствам для детекции экспрессии ряда генов в клетках, более конкретно, в клетках, обычно способных к образованию хряща. В конкретных вариантах осуществления таких устройств предлагаются один или более из следующих компонентов: средство для детекции экспрессии маркерных генов, и зонды для ряда маркерных генов, включающих по меньшей мере три маркерных гена, включающих FRZB, ALK1 и один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из PEDF, COL11, COL2, FGFR3, OPN, BMP-2 и RASF-PLA.

Специфические варианты осуществления средств, описанных здесь, представляют собой средства, конкретно подходящие для детекции экспрессии ряда маркерных генов популяцией клеток, где ряд маркерных генов представляет собой ряд, включающий по меньшей мере шесть маркерных генов, включающих FRZB, ALK1, PEDF, COL11, COL2 и FGFR3.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Термин "хондрогенный" при применении к клетке или к популяции обозначает наследуемое свойство клетки или популяции продуцировать хрящ или стимулировать рост хряща при подходящих условиях. При использовании здесь термин "хондрогенное соединение" обозначает соединение, которое индуцирует образование стабильного фенотипа хондроцитов и/или стимулирует образование хряща.

Термин "фенотипическая стабильность хондроцитов" или "хондрогенный потенциал", когда он имеет отношение к популяции клеток, обозначает способность популяции клеток продуцировать хрящ *in vivo*. Эту способность можно протестировать с помощью инъекции (эктопически) фракции популяции клеток (по меньшей мере примерно $1-20 \times 10^6$ клеток) млекопитающему (*in vivo*), такому как иммунодефицитные мыши, и с помощью определения (в течение периода времени, составляющего примерно 3 недели) развития хрящевого имплантата без признаков васкулярной инвазии, минерализации или замещения костной или фиброзной тканью. Альтернативно, фракцию популяции клеток (по меньшей мере, примерно, $1-20 \times 10^6$ клеток на см^2) можно поместить на биосовместимый матрикс или инкапсулировать в биосовместимый матрикс и имплантировать подкожно примерно за 6-8 недель до определения развития стабильного хрящевого имплантата без признаков васкулярной инвазии или эндохондрального костного образования. Согласно настоящему

изобретению популяция клеток, которая способна продуцировать стабильный гиалиновый хрящ *in vivo*, характеризуется присутствием специфичной комбинации маркеров фенотипической стабильности, описанных здесь. Фенотипическая стабильность хондроцитов постепенно теряется в зрелых хондроцитах при пассировании. При использовании здесь термин "свежевыделенные клетки" (F1) обозначает популяцию клеток, полученную из биопсийного материала после гидролиза ткани. Таким образом, при использовании здесь, термин "свежевыделенные хрящевые клетки" обозначает популяцию клеток, непосредственно полученную из хондроцит-содержащей ткани, такой как хрящ, путем гидролиза без пассирования. Термин "размноженная", когда он имеет отношение к популяции клеток, полученной из ткани, такой как хрящ, указывает, что популяция клеток была помещена в условия, при которых количество клеток увеличилось с помощью пролиферации. В его простейшей версии, размножение проводят путем получения популяции клеток в реципиенте культивирования в подходящей культуральной среде, необязательно до конфлюэнтного состояния. Популяция, которую получают в результате размножения свежевыделенных клеток, обозначается как P0.

Термин "пассированные" обозначает клетки, которые были размножены, и которые после размножения были собраны из реципиента культивирования с использованием ферментативных, химических и/или физических методов и помещены с более низкой плотностью в другой реципиент культивирования. Пассированные клетки обозначают по количеству их пассажей (P1, P2 и т.д.), их времени в культуре, или, альтернативно, по их количеству удвоений популяции (PD1, PD2 и т.д.).

При использовании здесь термин "хрящевой дефект" обозначает любое состояние, полученное в результате потери или повреждения хряща или любой нездоровой части хряща.

Термин "маркерный показатель", как таковой, используется для обозначения числового значения, которое может характеризовать экспрессию маркера согласно настоящему изобретению. "Кумулятивный маркерный показатель" обозначает комбинацию маркерного показателя различных маркеров из ряда маркеров по настоящему изобретению. Это может быть результатом суммирования индивидуальных маркеров. Альтернативно, кумулятивный маркерный показатель принимает во внимание различия вкладов каждого маркера в способность прогнозировать фенотипическую стабильность хондроцитов, и, соответственно, основывается на более сложной математической формуле.

Термин "гистологический показатель" обозначает качественное или полукачественное значение, характерное для хряща, которое основывается на гистологическом анализе (например, отсутствие хряща, волокнистый хрящ, гиалиновый хрящ).

Обозначения, используемые для генов в контексте настоящей заявки, представляют собой:

FRZB: Frizzled-Подобный Белок 1 [OMIM 605083, Genbank U91903]

ALK1: Рецептор Активина А, Типу II-Подобная Киназа 1 [OMIM 601284, Genbank Z22533]

PEDF: Фактор, Выделенный из Пигментного Эпителия [OMIM 172860, Genbank M76979]

COL11: Коллаген, Типа XI A1 [OMIM 120280, Genbank J04177]

COL2: Коллаген, Типа II, Альфа 1 [OMIM 120140, Genbank L10347]

FGFR3: Рецептор Фактора Роста Фибробластов 3 [OMIM 134934, Genbank M58051]

BMP-2: Костный Морфогенетический Белок 2 [OMIM 112261, Genbank M22489]

RASF-PLA2: Фосфолипаза A2, Группы MA [OMIM 172411, Genbank M22430]

OPN: Остеопонтин [OMIM 166490, Genbank X13694]

5 Настоящее изобретение основывается на идентификации выбранного ряда
маркерных генов, экспрессия которых, как было обнаружено, представляет собой
показатель способности клеток образовывать хрящ *in vivo*. Более конкретно, было
определено, что с помощью придания значения каждому из этих маркеров,
кумулятивное значение, которое может быть выражено как кумулятивный маркерный
10 показатель, отражает способность популяции клеток продуцировать фенотипически
стабильный хрящ *in vivo*. Маркерные гены, идентифицированные в настоящем
изобретении как применимые в оценке способности популяции клеток гарантировать
образование хряща, выбирают из группы, включающей позитивные маркерные
15 гены FRZB, COL11, COL2, FGFR3, BMP-2, RASF-PLA2 и OPN, и негативные маркерные
гены ALK1 и PEDF. В этот ряд могут быть включены дополнительные маркеры,
например, в качестве контролей.

Таким образом, согласно настоящему изобретению, был идентифицирован ряд из 9
маркеров, включающих позитивные и негативные маркеры. Позитивные маркеры
20 интенсивно экспрессируются популяциями, способными продуцировать стабильный
гиалиновый хрящ *in vivo*, в то время как негативные маркеры имеют низкий уровень
экспрессии или не экспрессируются популяциями, способными продуцировать
стабильный гиалиновый хрящ. Согласно настоящему изобретению, отсутствие
экспрессии негативного маркера может служить в качестве позитивного маркера.
25 Однако в контексте настоящего изобретения, такие маркеры, отсутствие экспрессии
которых является показателем способности фенотипической стабильности
хондроцитов, обозначаются здесь как негативные маркеры.

Экспрессия маркерных генов по настоящему изобретению является характерной
30 чертой популяции клеток, обычно состоящей из количества клеток, составляющего
примерно $0,2 \times 10^5$ - 1×10^6 клеток.

Различные методы определения экспрессии генов известны из уровня техники.
Наиболее типично, согласно настоящему изобретению, РНК выделяют из фракции
35 популяции клеток, (типичное количество клеток находится в интервале $0,2 \times 10^5$ - 1×10^6
и предпочтительно в интервале $0,2 \times 10^6$ - 1×10^6) и амплифицируют с использованием
обратной реакции ПЦР. Такую амплификацию можно проводить
полуколичественным способом с помощью электрофореза амплифицированных
фрагментов и измерения их относительной интенсивности по сравнению с
40 интенсивностью гена домашнего хозяйства, такого как бета-актин. Однако с
использованием методов нуклеотидной амплификации могут анализироваться малые
количества клеток и даже индивидуальные клетки. Дополнительно или альтернативно,
количество ДНК измеряют с помощью количественного способа с использованием,
45 например, технологии Taqman. Праймеры, которые являются подходящими для
маркеров, упомянутых в этой заявке, могут быть легко идентифицированы
специалистом на основе известных последовательностей маркерных генов.

Альтернативно или дополнительно, экспрессию маркеров измеряют на уровне
белка. Уровень белка может определяться с помощью иммунологических методов,
50 таких как Western-блоттинг или ELISA.

В определенных вариантах осуществления изобретения экспрессию маркеров
оценивают путем сравнения экспрессии маркеров в контрольной популяции и
экспериментальной популяции, таким способом как с помощью технологии

микрочипа или с помощью анализа после 1D или 2D белкового электрофореза. В этом случае, маркерные белки мигрируют в геле в соответствии с их молекулярной массой Mr (1D) и их изоэлектрической точкой (IEP) (2D). Различия в экспрессии на уровне белка могут измеряться с помощью детектирования количества белка, присутствующего в положении, соответствующем его Mr и/или IEP. Белки можно количественно оценить после окрашивания с помощью красителя Кумасси Бриллиантового Синего или с помощью эквивалентного окрашивания, или белки можно количественно оценить путем введения радиоактивной метаболической метки (например, метионина ³⁵S).

В зависимости от используемой технологии, антитела, олигонуклеотидные зонды или белковые зонды (такие как антитела) могут быть мечены, например, с помощью хромофорных или магнитных или радиоактивных меток, так чтобы была возможность детектирования экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления, предусматривается детекция различных маркеров с помощью различных методов. Например, ряд маркеров детектируют с помощью ELISA, в то время как другие детектируют с помощью ПЦР.

В следующем аспекте изобретение относится к устройству, подходящему для детекции маркеров по изобретению. В частных вариантах осуществления такие устройства включают средство для прямой или косвенной детекции маркеров по настоящему изобретению (на уровне ДНК, РНК или белка). Устройство может основываться на РНК-, ДНК-гибридизации или может основываться на иммунологическом детектировании. Такое устройство может представлять собой (количественный) ПЦР-прибор, устройство для проведения иммунологических анализов или устройство для определения белков (например, HPLC, масс-спектрометр, прибор для электрофореза), а также может представлять (одноразовый) микрочип или чип. При применении такое устройство оборудовано зондами или антителами для детекции маркерных генов или белков по изобретению. Такое устройство может дополнительно включать средство культивирования клеток, где две или более популяции клеток могут выращиваться при идентичных или при различных условиях (таких как, например, плотность, количество пассажей, состав среды). Более того, устройство по изобретению может включать средство для доставки одного или более тестируемых соединений в средство для культивирования клеток (причем доставка может индивидуально варьировать по количественному или по временному профилю). Наконец, устройство может включать средство для сбора клеток и выделения клеточного материала (ДНК, РНК, белков).

Кроме того, предусматриваются одноразовые картриджи, включающие зонды или специфичные реагенты для маркеров, описанных здесь, которые могут использоваться для определения экспрессии этих маркеров для быстрого и эффективного определения статуса популяции клеток. Соответственно, в настоящем изобретении предусматриваются автоматизированные устройства, которые необязательно комбинируются с одноразовыми картриджами, которые дают возможность эффективного качественного контроля клеток для использования в *in vivo* или *in vitro* применениях.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения, предлагаются подгруппы идентифицированных маркерных генов, которые дают возможность достоверной оценки фенотипической стабильности хондроцитов популяции клеток или способности соединения или условия влиять на образование хряща популяцией клеток *in vivo*. Наиболее конкретно, подходящий ряд маркерных

генов включает по меньшей мере 3, более конкретно по меньшей мере 4, еще более конкретно по меньшей мере 5 и наиболее конкретно по меньшей мере 6 из идентифицированных маркерных генов. Согласно одному варианту осуществления, подходящий ряд маркерных генов включает по меньшей мере один позитивный маркерный ген и один негативный маркерный ген.

Вообще, чем меньшее количество маркерных генов принимается во внимание, тем большее влияние оказывают оба фактора - ошибки измерения и потенциальная аберрантная экспрессия одного конкретного маркера. Различные маркеры также отражают различные процессы (например, анаболические процессы, катаболические процессы и т.д.) и пути, вовлеченные в клеточный метаболизм хондроцитов (сигнальные пути, рецепторы и лиганды, компоненты матрикса, ферменты процессинга,...), и каждый из этих процессов может иметь индивидуальное влияние на фенотипическую стабильность хондроцитов. Таким образом, чем больше маркерных генов принимается во внимание, тем более репрезентативным становится анализ области, гарантирующей образование стабильного хряща. С другой стороны, чем больше маркерных генов следует определить, тем более технически затруднительным становится анализ, что идет вразрез с его легкостью в применении в высокопроизводительном скрининге. Также для того, чтобы поддерживать релевантность вклада каждого из маркерных генов в общую оценку, количество маркерных генов должно поддерживаться ниже 10. Действительно, изменение экспрессии единственного маркерного гена внутри большого ряда маркерных генов будет оказывать слабое влияние на общий показатель экспрессии маркерных генов. На основании этих аргументов и на основании относительного вклада различных идентифицированных маркеров, было определено, что любое количество маркеров в количестве от 3 до 9 является подходящим для определения фенотипической стабильности хондроцитов популяции клеток или для оценки влияния соединения или условия на фенотипическую стабильность хондроцитов популяции клеток. Согласно одному варианту осуществления, ряд маркеров, включающий 5, 6 или 7 маркеров, является оптимальным компромиссом между точностью показателя, полученного с помощью такого ряда маркеров, и практической осуществимостью анализа при высокопроизводительном скрининге.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения предлагается ряд маркеров, включающий по меньшей мере три маркера, характеризующих образование хряща, выбранных из группы, состоящей из позитивных маркерных генов FRZB, COL11, COL2, FGFR3, BMP-2, RAS- PLA2 и OPN, и негативных маркерных генов ALK1 и PEDF.

Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения, ряд маркеров, включающий по меньшей мере три маркера, составляющих маркеры хондрогенного потенциала, т.е. характеризующие образование хряща, включает FRZB, ALK1 и маркерный ген, выбранный из группы, состоящей из PEDF, COL11, COL2, FGFR3, BMP-2, RAS-PLA2 и OPN. Более конкретно, ряд маркеров, включающих по меньшей мере три маркера, характеризующих образование хряща, включает FRZB, ALK1 и маркерный ген, выбранный из группы, состоящей из PEDF, COL11, COL2 и FGFR3. Следующие варианты осуществления изобретения относятся к ряду маркерных генов, включающих по меньшей мере 4, 5 или 6 маркерных генов, включающих FRZB, ALK1 и соответственно 2, 3 и 4 маркера, выбранных из группы, состоящей из PEDF, COL11, COL2, FGFR3, BMP-2, RAS- PLA2 и OPN. Более конкретно, ряд маркерных генов, включающих по меньшей мере 4, 5 или 6 маркерных

генов, включает FRZB, ALK1 и соответственно 2, 3 и 4 маркера, выбранных из группы, состоящей из PEDF, COL11, COL2 и FGFR3. Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения, ряд маркерных генов, включающих по меньшей мере шесть маркерных генов, используется для оценки способности

5 продуцирования стабильного хряща *in vivo*, причем ряд маркерных генов состоит из FRZB, ALK1, PEDF, COL11, COL2 и FGFR3. Кумулятивный показатель этого ряда маркерных генов, описанных в Примере 1, обозначенных здесь как "ChondroCelect™ маркеры" (CC-маркеры), также обозначается как "ChondroCelect™ показатель".

10 Альтернативно, ряд маркеров включает вариацию этого ряда маркеров хондрогенного потенциала, где один из маркеров PEDF, COL11, COL2 и FGFR3 заменяется на один маркер, выбранный из группы RASF-PLA2, OPN и BMP-2. Более конкретно, ряд маркеров включает вариацию вышеописанных маркеров хондрогенного потенциала, где один из позитивных маркеров COL11, COL2

15 заменяется или на RASF-PLA, OPN или на BMP-2. Раздел примеров, представленных здесь, демонстрирует, что показатели маркеров, основанные на экспрессии ряда маркеров, описанных здесь, популяцией хондрогенных клеток достоверно прогнозируют природу хряща, продуцируемого популяцией клеток (как определено с

20 помощью гистологического анализа).

Согласно другому аспекту, в настоящем изобретении предлагаются способы определения фенотипической стабильности хондроцитов популяции клеток. Более конкретно, в настоящем изобретении предлагается для применения в качестве

25 средства для оценки фенотипической стабильности хондроцитов популяции клеток ряд маркерных генов, описанных здесь. Это представляется важным, например, с точки зрения качественного контроля популяций клеток, используемых в трансплантации клеток в контексте лечения хрящевых дефектов. Эти способы характеризуются тем, что они включают стадию определения экспрессии популяцией клеток ряда

30 маркерных генов, как описано здесь. Более конкретно, экспрессия ряда маркерных генов согласно настоящему изобретению, необязательно выраженная в виде кумулятивного маркерного показателя, более конкретно, показателя Хондрогенного потенциала, используется в качестве показателя качества популяции клеток для целей имплантации. В типичном случае оценку качества популяции клеток проводят в

35 лаборатории с использованием стандартных методов, таких как методы, описанные здесь, и результат оценки получают в отчете или суммируют в листе контроля качества. Популяция клеток может представлять собой пассаж P0 или любой пассаж популяции клеток, полученных из ткани человека или животного. Согласно одному

40 варианту осуществления, популяция клеток находится между пассажами P2 и P6 популяции, полученной из биопсийного материала хряща человека. Альтернативно, может рассматриваться количество удвоений популяции. Для большинства популяций клеток, рассматриваемых в контексте настоящего изобретения, каждый пассаж включает 2-3 удвоения популяции. Соответственно, в контексте настоящего

45 изобретения популяция клеток оценивается после 1 или двух удвоений популяции (P0). Необязательно, популяция клеток представляет собой комбинацию различных пассажей (необязательно включающих P0) клеток из материала одной или различных биопсий. В случае, где подразумевается использование аутологической

50 трансплантации клеток, клетки, полученные из материала одной или более биопсий от определенного пациента, необязательно объединяют и проверяют на предмет фенотипической стабильности хондроцитов (перед и/или после их комбинации). В типичном случае оценку качества проводят в определенные моменты времени, т.е.

перед имплантацией (как, например, клеток, или 2D- или 3D-тканей на подложке или матриксе), перед хранением (например, заморозкой) и/или при восстановлении после хранения, перед и/или после того, как популяцию клеток подвергают определенным обработкам и/или помещают в определенные условия.

5 Действительно, целью одного аспекта изобретения является определение способности популяции клеток продуцировать стабильный гиалиновый хрящ *in vivo* перед имплантацией или непосредственно во время имплантации, или при высаживании на биосовместимый матрикс или при инкапсулировании в биосовместимый матрикс и с последующей имплантацией. Маркерный показатель является показателем способности популяции клеток или клеток гарантировать образование хрящевого имплантата без признаков васкулярной инвазии или эндохондрального костного образования.

15 В типичном случае согласно настоящему изобретению для определения маркерного показателя экспрессию маркеров проводят на популяции клеток в целом с помощью методов, описанных здесь, в соответствии с чем берут характерный образец для определения того, экспрессирует популяция клеток маркеры или нет согласно условиям исследования. Альтернативно, индивидуальные клетки могут быть проверены на предмет экспрессии определенных генов с использованием клеточных методов, известных из уровня техники.

25 Согласно другому аспекту, в изобретении предлагаются способы определения влияния соединения или условия на способность хондрогенных клеток продуцировать стабильный гиалиновый хрящ *in vivo*, способы, которые применяют для средств скрининга. Эти способы включают стадию контактирования популяции хондрогенных клеток с соединением или условием, и определение экспрессии популяцией клеток ряда маркерных генов согласно настоящему изобретению.

30 Соответственно, в изобретении предлагаются способы и анализы для идентификации соединений или условий, которые влияют на хондрогенную способность популяции клеток. Согласно одному варианту осуществления, способ применяется для идентификации адекватных условий культивирования, хранения и/или введения популяции клеток для трансплантации в контексте лечения хрящевых дефектов. В таких способах популяция хондрогенных клеток подвергается воздействию определенных условий, и определяется экспрессия маркерных генов. Типичные условия представляют собой определенную культуральную среду, температуры культивирования, время культивирования, плотность культивирования и т.д., а также комбинирование с другими типами клеток. Дополнительно или 40 альтернативно, способы и анализы применяются для идентификации молекулярных факторов, способных влиять на фенотипическую стабильность хондроцитов у хондрогенных клеток. Такие факторы могут включать факторы роста, митогены, добавки, химические низкомолекулярные соединения и т.д. Целью скрининга может являться идентификация факторов, применяемых для культивирования, хранения или 45 введения популяции клеток для трансплантации в контексте лечения хрящевых дефектов. В типичном случае факторы, представляющие интерес, представляют собой факторы, которые способны позитивно влиять на фенотипическую стабильность хондроцитов популяции клеток, и/или факторы, которые позитивно влияют на другие черты клеток (например, количество клеток, стабильность и т.д.), и/или на параметры 50 условий культивирования (например, время хранения, количество пассажей, которое может использоваться и т.д.) без негативного влияния на фенотипическую стабильность хондроцитов популяции клеток. Дополнительно или альтернативно,

анализы и способы по настоящему изобретению применяются в скрининге и идентификации соединений, имеющих потенциальное влияние *in vivo* на образование хряща хондрогенными клетками. Применение способов скрининга по настоящему изобретению предусмотрено для идентификации соединений, которые влияют на образование хряща локальными клетками в теле пациента, подвергнутого лечению, и/или на образование хряща клетками, используемыми в контексте трансплантации клеток. Способы скрининга могут применяться для идентификации и/или оценки соединений, которые могут противодействовать факторам или условиям, имеющим место в патологических состояниях. Например, клетки могут стимулироваться, например, с помощью IL-1 (для стимулирования воспалительных состояний, для усиления катаболических путей и для даунрегуляции анаболических процессов) перед добавлением соединений, которые потенциально противодействуют такому влиянию. Также предусмотрено в рамках настоящего изобретения применение маркерных генов для оценки потенциальных побочных влияний терапевтических соединений, включающих те, что используются вне контекста восстановления хряща, на способность хондрогенных клеток продуцировать хрящ *in vivo*. Способы по настоящему изобретению потенциально дают возможность прямой идентификации влияния соединений на образование кости, которое, при тестировании непосредственно *in vivo*, может быть замечено только после продолжительного срока.

Способы по изобретению, которые относятся к скринингу соединений, типично включают стадию контактирования популяции хондрогенных клеток с одним или более соединений, представляющих интерес, и определение экспрессии популяцией хондрогенных клеток ряда маркерных генов, как описано здесь. Способы по настоящему изобретению дают возможность проведения высокопроизводительного скрининга, например, библиотек химических соединений, пептидных библиотек, экспрессирующих библиотек и т.д.

Согласно одному варианту осуществления, способы по настоящему изобретению включают стадию сравнения экспрессии ряда маркерных генов согласно настоящему изобретению в популяции клеток, в которую добавили одно или более соединений/которая была подвергнута воздействию конкретного условия, с экспрессией ряда маркерных генов в отсутствие соединения или условия в той же или другой популяции клеток. В типичном варианте осуществления, (a) различные фракции, происходящие от одной и той же популяции клеток, подвергаются воздействию различных условий и/или соединений для сравнения с позитивным и/или негативным контролем. Негативный контроль может быть пустым или представлять собой соединение, о котором известно, что оно не влияет на фенотипическую стабильность хондроцитов. Позитивный контроль может представлять собой соединение или условие, о котором известно, что оно влияет (позитивно или негативно) на фенотипическую стабильность популяции клеток. В способах скрининга по настоящему изобретению могут оцениваться различные параметры. Клетки могут быть пересажены индивидуальным реципиентам или в мультисуточные планшеты с различной плотностью. Клетки могут инкубироваться в течение различных периодов времени перед добавлением соединения/фактора или перед применением условия или в обоих случаях. Различные режимы и комбинирования соединений и условий культивирования могут комбинироваться. Соединения/факторы могут добавляться в различных концентрациях и оставаться в контакте с клетками в течение различных периодов времени. То же самое применимо к условиям культивирования.

Настоящее изобретение основывается на наблюдении того, что способность

популяции клеток продуцировать гиалиновый хрящ *in vivo* после имплантации может прогнозироваться на основании экспрессии определенных генов (маркерных генов) популяцией клеток *in vitro*, перед имплантацией. Таким образом, экспрессия маркерных генов используется для мониторинга хондрогенного "качества" клеток перед имплантацией, и для мониторинга влияния на него соединений и условий. Как подробно описано ниже, экспрессия генов может выражаться в виде маркерного показателя, в соответствии с которым согласуется уровень экспрессии (относительный) различных маркерных генов с получением значения, которое может сравниваться с оптимальным значением (т.е., высокий уровень экспрессии всех рассматриваемых позитивных маркеров, низкий уровень экспрессии всех рассматриваемых негативных маркеров). Дополнительно или альтернативно, при скрининге может приниматься во внимание способность соединений или условий влиять на любой маркер в этом ряду генов.

Экспрессия маркерных генов по настоящему изобретению может оцениваться на основании абсолютного или относительного значения. Типичным образом, используется сравнение экспрессии маркерного гена с экспрессией гена домашнего хозяйства. Здесь приведен пример сравнения с экспрессией актина. Поскольку уровень экспрессии различных генов домашнего хозяйства может быть различным, специалисту будет понятно, что прежде для каждого используемого гена домашнего хозяйства необходимо установить относительный уровень экспрессии маркерных генов по сравнению с выбранным геном домашнего хозяйства в популяции, имеющей фенотипическую стабильность хондроцитов. Согласно настоящему изобретению объединенная информация об экспрессии выбранных маркеров является показателем того, способны клетки или нет образовывать хрящ *in vivo*.

Настоящее изобретение предусматривает применение комбинаций маркеров, описанных здесь, одновременно в контексте оценки качества данной популяции клеток и для оценки влияния факторов/условий на способность клеток продуцировать хрящ после имплантации *in vivo*. В случае, где используется ряд маркеров для определения влияния соединения, клетки или условия на способность популяции клеток продуцировать гиалиновый хрящ *in vivo*, влияние может основываться на определении 'повышенной' или 'пониженной' экспрессии маркерных генов по изобретению относительно уровня экспрессии перед контактированием популяции клеток с соединением или условием. В этом смысле, соединения, клетки или условия, которые повышают экспрессию одного или более позитивных маркерных генов и/или понижают экспрессию одного или более негативных маркерных генов согласно изобретению, могут рассматриваться, как способные позитивно влиять на образование хряща. Соединения, клетки или условия, которые понижают экспрессию одного или более позитивных маркерных генов и/или повышают экспрессию одного или более негативных маркерных генов согласно изобретению, могут рассматриваться, как способные негативно влиять на образование хряща.

Согласно одному аспекту изобретения, экспрессия клеточной популяцией различных маркерных генов из ряда маркерных генов характеризуется с помощью 'кумулятивного маркерного показателя', который коррелирует с фенотипической стабильностью хондроцитов популяции клеток и является ее показателем. Кумулятивный маркерный показатель используется для качественной и/или количественной интерпретации результатов в способах и анализах по настоящему изобретению. Различные типы маркерных показателей рассматриваются в контексте настоящего изобретения. Уровень экспрессии ряда маркеров может характеризоваться

числовым значением, которое представляет собой/соответствует сумме абсолютного уровня экспрессии каждого из генных продуктов в ряду маркеров. Такой метод расчета может использоваться, когда проводят количественную детекцию экспрессии маркерных генов, например, с помощью количественного ПЦР или ELISA.

Альтернативно, уровень экспрессии каждого из генов в ряду маркеров может характеризоваться соотношением, т.е. уровень экспрессии гена сравнивается с уровнем экспрессии другого гена, такого как ген домашнего хозяйства, который, как предполагается, имеет равный уровень экспрессии независимо от обработки клетки, или который, как предполагается, является относительно стабильным независимо от способности клетки продуцировать стабильный гиалиновый хрящ. Это приводит в результате к получению значений уровня экспрессии для различных маркеров, которые являются более сопоставимыми (и наиболее сопоставимы значения в интервале 0,001-10). Соответственно, кумулятивный маркерный показатель может представлять собой сумму соотношений для каждого маркерного гена.

Однако согласно конкретному варианту осуществления изобретения, кумулятивный маркерный показатель основывается не на абсолютном или относительном значениях экспрессии для каждого из маркерных генов, а на качественной оценке этой экспрессии.

Согласно определенному варианту осуществления настоящего изобретения, качественная оценка маркерных генов произвольно обозначается числовым значением, например, '1'. Более конкретно, согласно настоящему изобретению, повышенная/высокая экспрессия позитивных маркеров обозначается значением '1', и отсутствие экспрессии негативного маркера также обозначается значением '1'.

Наиболее конкретно, согласно настоящему изобретению, интервалы уровней экспрессии (или соотношений экспрессии) определяются одновременно для уровня экспрессии позитивных маркерных генов и для уровня экспрессии негативных маркеров фенотипической стабильности хондроцитов, в соответствии с чем уровням экспрессии, попадающим в определенные интервалы, присваивается значение.

Согласно следующему варианту осуществления, значениям экспрессии, попадающим за рамки определенных интервалов уровня экспрессии позитивных и/или негативных маркерных генов (например, когда наблюдается очень низкий уровень экспрессии позитивного маркерного гена или очень высокий уровень экспрессии негативного маркерного гена), также присваивается значение. При определении относительного влияния каждого из маркерных генов в кумулятивном маркерном показателе, экспрессия каждого гена может иметь одинаковое значение. Альтернативно, уровень экспрессии одного или более генов может рассматриваться, как имеющий более сильное влияние на фенотипическую стабильность хондроцитов, чем у других генов, который может быть учтен в относительном влиянии маркерных генов при расчете кумулятивного маркерного показателя.

Согласно определенному варианту осуществления изобретения, относительное влияние различных маркеров является одинаковым и обозначается значением '1' при попадании в определенные интервалы экспрессии (или интервалы соотношений экспрессии), обозначается значением '-1' при попадании вне рамок интервалов (ниже или выше, чем определенные интервалы для позитивных и негативных маркеров, соответственно). Необязательно, может предполагаться, что уровни экспрессии внутри определенного интервала соответствуют значению '0', которое соответствует уровню экспрессии позитивного или негативного маркерного гена, который не оказывает позитивного или негативного влияния на фенотипическую стабильность хондроцитов в клетке.

В разделе примеров, описанных здесь, описан следующий конкретный вариант осуществления изобретения. Кумулятивный маркерный показатель, характеризующий стабильный хрящевой фенотип, определяется с помощью ряда маркеров, включающего до шести маркеров, каждый из которых имеет равную важность.

5 Экспрессия каждого из маркеров оценивается количественно, и применяется способ подсчета на основе экспрессии по отношению к маркерному гену. В этом определенном варианте осуществления, показатель, рассчитанный с помощью этих маркеров, обозначается как "показатель хондрогенного потенциала", т.е.,

10 кумулятивный маркерный показатель, который отражает общую экспрессию определенного ряда из шести маркеров хрящевой фенотипической стабильности. Согласно этому варианту осуществления изобретения, уровень экспрессии каждого гена определяется с помощью полуколичественного метода, и полученные значения нормализуются путем сравнения с эталонным геном (например, с бета-актином).

15 Таким образом, уровень экспрессии 1 обозначает экспрессию, которая является такой же как у актина, уровень экспрессии ниже, чем 1, обозначает экспрессию, которая ниже, чем у актина (0,1 соответствует уровню экспрессии, который 10x ниже, чем у бета-актина), и уровень экспрессии выше 1, обозначает уровень экспрессии, который

20 выше, чем у актина. В этом определенном варианте осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии каждого из маркерных генов соответствует одному из трех возможных показателей. В случае позитивного маркера (FRZ, COL11, COL2, FGFR3) очень низкий уровень экспрессии (0-0,1) характеризуется показателем -1, низкий уровень экспрессии (0,1-1) характеризуется показателем 0, и высокая

25 экспрессия (>1) характеризуется показателем +1. Наоборот, для негативного маркера (ALK1, PEDF) очень низкий уровень экспрессии (0-0,1) характеризуется показателем +1, низкий уровень экспрессии (0,1-1) характеризуется показателем 0 и высокий уровень экспрессии (>1) характеризуется показателем -1. Сумма всех этих

30 индивидуальных показателей характеризует уровень экспрессии всего ряда маркеров в целом. Для ряда из 6 маркеров, показатель, таким образом, может находиться в интервале от -6 (все позитивные маркеры экспрессируются на уровне, который ниже, чем у эталона, и все негативные маркеры экспрессируются на уровне, который выше, чем у эталонного гена) до +6 (все позитивные маркеры экспрессируются на уровне, который выше, чем у эталона, и все негативные маркеры экспрессируются на уровне, который ниже, чем у эталонного гена). В случае, где этот показатель основывается на

35 экспрессии популяцией клеток маркеров FRZB, COL11, COL2, FGFR3, ALK1 и PEDF, этот показатель обозначается здесь как показатель Chondroselect™.

40 Как показано в примерах настоящего изобретения, возможна корреляция уровней экспрессии ряда маркеров, а также кумулятивного маркерного показателя, полученного на их основе, с фенотипической стабильностью хондроцитов популяции хондроцитных клеток. Соответственно, оценка уровней экспрессии определенного

45 ряда маркеров или (кумулятивного) маркерного показателя популяции хондрогенных клеток при введении им определенных соединений, может использоваться для оценки способности соединения влиять на фенотипическую стабильность хондроцитов для

50 клеток и/или на способность клеток образовывать хрящ *in vivo*. Более конкретно, демонстрируется, что добавление конкретных соединений к популяции размноженных хондроцитных клеток улучшает показатель хондрогенного потенциала и фенотип этой популяции клеток. Негативные контроли, например, добавление соединений, которые стимулируют образование кости, понижают показатель хондрогенного потенциала.

Соответственно, в настоящем изобретении предлагаются кумулятивные маркерные показатели, которые могут использоваться в анализах клеточных скринингов для оценки влияния любого фактора или условия на способность хондрогенной популяции продуцировать стабильный хрящ. Принимая во внимание тот факт, что хрящевая фенотипическая стабильность популяции клеток, как идентифицировано *in vitro*, характеризуется активностью клеток *in vivo*, анализ может быть достоверно использован для идентификации соединений, способных влиять на образование хряща локальными хондрогенными клетками при введении в место хрящевого дефекта.

Является важным, что анализ и маркерный анализ, как описано в настоящем изобретении, не требуют последовательного или параллельного проведения анализа с образованием хряща *in vitro* или *in vivo* для подтверждения достоверности результатов, что существенно сокращает и упрощает крупномасштабный скрининг соединений.

Согласно настоящему изобретению, применение кумулятивного маркерного показателя является достоверным и эффективным средством для оценки фенотипической стабильности хондроцитов популяции клеток и/или для оценки влияния условий или соединений на фенотипическую стабильности хондроцитов хондрогенных клеток. Достоверность показателя определяется с одной стороны путем корреляции между позитивными показателями и способностью генерировать фенотипически стабильный хрящ *in vivo*, и путем корреляции между негативными показателями и тем фактом, что клетки не способны генерировать фенотипически стабильный хрящ *in vivo*. Дополнительное целесообразное требование достоверного кумулятивного маркерного показателя заключается в его эффективности, т.е., его способности эффективно различать популяции, которые способны и не способны генерировать фенотипически стабильный хрящ *in vivo*. Например, в случае, где количество маркеров составляет шесть, и система расчета варьирует в интервале между +6 и -6, как описано выше, типично существование "серой области" (популяции, которые характеризуются кумулятивным маркерным показателем в интервале, который находится между +6 и -6), для которой кумулятивный маркерный показатель не является однозначным, и для которого при тестировании обнаружено, что он включает обе популяции, которые способны и не способны к образованию стабильного гиалинового хряща. Идеально, когда маркерный показатель приводит в результате к получению минимального количества популяций в этой серой области, но при этом дает возможность максимально эффективной классификации популяций или в виде "позитивных" или в виде "негативных".

Более конкретно, в контексте определения фенотипической стабильности хондроцитов популяции клеток, используемых для трансплантации, оба фактора, и достоверность и эффективность кумулятивного маркерного показателя могут быть критическими для допущения прямого и корректного определения развития популяции клеток. Действительно, использование кумулятивного маркерного показателя с относительно низкой прогностичностью результата для характеристики популяции клеток, предназначенных для трансплантации, ограничивается значением, поскольку он не позволяет принимать или нет решение по трансплантации. Для таких применений использование показателя хондрогенного потенциала по настоящему изобретению в качестве средства расчета рассматривается как предпочтительно подходящее, принимая во внимание его высокую достоверность и эффективность. Однако предусмотрено, что для использования в скрининге эффективность прогностичности результата может быть менее критической. Как указано выше, потенциальная цель анализов скрининга по настоящему изобретению представляет

собой идентификацию фармацевтических соединений, которые влияют на фенотипическую стабильность хондроцитов популяции клеток, более конкретно, улучшают ее. Таким образом, в таких методах скрининга относительное улучшение фенотипической стабильности хондроцитов скорее может предусматриваться как критическое требование, чем способность соединений индуцировать или поддерживать совершенную фенотипическую стабильность хондроцитов. Например, предусмотрено, что при проведении анализа скрининга, соединения, способные превращать клетки низкого качества (не образующие хрящ после имплантации) в хрящ среднего качества (клетки, имеющие показатель, который не может использоваться для прогнозирования однозначного результата после имплантации), также будут рассматриваться как представляющие интерес.

Популяции клеток, которые используются в способах и анализах по настоящему изобретению, включают любые клетки, которые, как считается, способны продуцировать хрящ или которые могут развиваться в клетки, продуцирующие хрящ. Типично, когда клетки представляют собой остеохондральные клетки, такие как хондроциты и их предшественники или клетки-предшественники, полученные из суставного хряща, мениска или синовиальной жидкости. Согласно одному варианту осуществления, клетки, используемые в контексте настоящего изобретения, представляют собой клетки-предшественники, описанные в WO01/25402. В некоторых вариантах осуществления, популяция клеток представляет собой клетки-предшественники или стволовые клетки, которые выделены из других тканей, таких как кровь, костный мозг или жир, и которые могут быть индуцированы в остеохондральную клеточную линию. Анализы по настоящему изобретению могут использоваться для определения того, коммитируют ли эти клетки в остеохондральную клеточную линию.

Клетки, используемые в методах скрининга и анализах по изобретению, могут быть свежевыделенными, размноженными или пассированными с помощью одного или более пассажей. Клетки могут быть представлены в виде клеточных культур или в культуральных флаконах или могут быть представлены на матриксе или подложке. Экспрессия ряда маркеров клетками на матриксе может определяться с помощью растворения матрикса и определения экспрессии клетками. Клетки могут иметь человеческое или животное происхождение. Примеры животных, которые могут использоваться для исследования хряща, представляют собой лягушку шпорцевую, данио рерио, курицу, мышь, крысу, кролика, овцу и козу.

Способы и анализы по настоящему изобретению могут проводиться с клетками, которые имеют стабильный фенотип хондроцитов как результат их происхождения и/или условий культивирования. Такие клетки конкретно используют для анализа отрицательных воздействий данного соединения, обработки или условия.

Согласно альтернативному варианту осуществления, способы и анализы по настоящему изобретению проводят с использованием клеток, которые не имеют стабильного фенотипа хондроцитов, или у которых утерян стабильный фенотип хондроцитов в результате их происхождения и/или условий культивирования. Примеры этого представляют собой хондроциты, которые были подвергнуты интенсивному пассированию, и стволовые клетки. Также являются подходящими хондроциты, выделенные от индивидуумов, имеющих остеохондральный дефект, такой как (происходящий из) остеоартрит или ревматоидный артрит, или от индивидуумов, которые предрасположены к приобретению остеохондральных нарушений на основе их генетических данных. Также являются подходящими

хрящевые опухолевые клетки или клетки хондросаркомы.

Клетки, не имеющие фенотипической стабильности хондроцитов конкретно используют в способах по настоящему изобретению для скрининга соединений или условий, которые улучшают или восстанавливают стабильный хрящевой фенотип клеток, или которые превращают определенные популяции клеток, таких как стволовые клетки, в стабильный хрящевой фенотип.

Настоящее изобретение предусматривает применение способов и анализов по настоящему изобретению в многообразии различных применений. Как подробно описано выше, способы и анализы по настоящему изобретению делают возможным тестирование условий культивирования клеток, предназначенных для использования в АСТ, таких условий, как плотность клеток, количество пассажей, состав среды, рост в или на двух- или трехмерных субстратах, концентрация кислорода, давление, напряжение сдвига. Конкретно, анализ дает возможность тестирования влияния состава среды на фенотипическую стабильность хондроцитов. Факторы, представленные здесь, которые потенциально имеют влияние на фенотипическую стабильность хондроцитов, включают, но не ограничены этим, тип и лот сыворотки, различные составы синтетической бессывороточной среды и многообразие гормонов, факторов роста, витаминов, белков и органических соединений, предположительно влияющих на фенотипическую стабильность хондроцитов.

Одно применение способов и анализов по настоящему изобретению представляет собой скрининг соединений или условий, которые приводят к дифференцировке предшественников или стволовых клеток в остеохондральные или, более конкретно, в хондрогенные линии. Другое применение представляет собой скрининг соединений или условий, которые могут восстанавливать или поддерживать фенотипическую стабильность хондроцитов здоровых клеток, которые были пассированы или пассируются много раз, соответственно для того, чтобы получить достаточное количество клеток. Еще одно применение представляет собой скрининг соединений или условий, которые могут индуцировать включать фенотипическую стабильность хондроцитов в клетках, которые получают от индивидуумов, имеющих предрасположенность к остеохондральному дефекту. В другом применении, анализ используется для оценки влияния матриксов, подложек, гелей или их составляющих, которые часто используются в процедурах трансплантации клеток.

Способы и анализы по настоящему изобретению также являются подходящими для классических скринингов пептидных библиотек, библиотек бессмысловых последовательностей или библиотек соединений. Соединения, составляющие эти библиотеки, включают, но не ограничены этим, биологические вещества и органические или неорганические соединения, которые получают синтетически или получают из натуральных источников. Примеры этого, которые могут использоваться, представляют собой библиотеки соединений, такие как библиотеки фрагментов антител, пептидные библиотеки фанового дисплея, пептидные библиотеки (например, LOPAP #, Sigma Aldrich), липидные библиотеки (BioMol), библиотеки синтетических соединений (например, LOPAC@, Sigma Aldrich) или библиотеки природных соединений (Specs, TimTec).

Способы скрининга и анализы, описанные здесь, имеют конкретное использование в идентификации соединений-прототипов для лекарственных средств, предназначенных для лечения остеохондральных нарушений. Предусматривается, что остеохондральный дефект, представляющий интерес в контексте способов скрининга по настоящему изобретению, включает, но не ограничен этим, дефекты,

встречающиеся в суставах, таких как, но не ограничиваясь этим, суставов шеи, локтя, лодыжки, обычно обозначаемые как дефекты суставного хряща. Хрящевые дефекты также называют в честь проксимальной кости, такие как дефекты мышелка бедра, плечевой кости и т.д. Часто встречающиеся хрящевые нарушения, для которых

5 предусматривается, что скрининг соединений, способных влиять на фенотипическую стабильность хондроцитов, представляет интерес, представляют собой остеоартрит, ревматоидный артрит, повреждения суставного хряща, хондромалицию, спондилоартропатии.

10 Краткое описание Фигур

Подразумевается, что следующие примеры иллюстрируют изобретение, что не подразумевает никаких ограничений изобретения определенными варианты осуществления, описанными здесь. Эти примеры иллюстрируются с помощью

15 следующих Фигур, в которых.

На Фигуре 1 показана диаграмма разброса гистологического показателя против показателя хондрогенного потенциала (каждая точка передвигалась с помощью

20 небольшого случайного количества и направления для того, чтобы избежать наложений точек).

На Фигуре 2 показано влияние соединения А на кумулятивный маркерный показатель (СС-показатель, как определено в Примере 1), как определено с помощью

25 количественной реакции ПЦР в режиме реального времени (Real-Time) на хондроцитах, культивированных от состояния P0 до P3 в монослое. Результаты представляют значение кумулятивного маркерного показателя по отношению к контролю (DMSO). *p<0,05 при сравнении с DMSO-контролем (n=4).

На Фигуре 3 показано влияние соединения А на экспрессию молекулярных маркеров COL2 (A), COLH(B), FRZB (C) и FGFR3 (D), позитивно коррелирующих с

30 хондрогенным потенциалом хондроцитов человека P3, культивированных в монослое, как определено с помощью количественной реакции ПЦР в режиме реального времени.

Результаты представляют экспрессию гена-мишени по отношению к DMSO-контролю, как определено с помощью $2^{-\Delta\Delta CT}$ *p<0,05 при сравнении с DMSO-контролем (n=4).

35

На Фигуре 4 показано влияние соединения А на экспрессию молекулярных маркеров PEDF (A) и ALK1 (B), негативно коррелирующих с хондрогенным потенциалом хондроцитов человека P3, культивированных в монослое, как определено

40 с помощью количественной реакции ПЦР в режиме реального времени. Результаты представляют экспрессию гена-мишени по отношению к DMSO-контролю, как определено с помощью $2^{-\Delta\Delta CT}$ *p<0,05 при сравнении с DMSO-контролем (n=4).

ПРИМЕРЫ

Методология

45 Культивирование хондроцитов

Хондроциты, выделенные из суставного хряща взрослого человека, выделяли и размножали *in vitro* с использованием стандартных условий, как описано в публикации Dell'Accio et al. (2001), *Arthritis Rheum.* 44, 1608-1619).

In vivo-анализ

50 Маркеры по настоящему изобретению проверяли на достоверность с использованием ряда из 48 образцов хондроцитов, которые были получены от различных субъектов, и были свежевыделенными или пассировались от 1 до 5 пассажей. Часть хондроцитов использовали для маркерного анализа (смотри

пример 3), в то время как другую часть использовали в *in vivo*-анализе для подтверждения способности образовывать хрящ у каждого образца. Самкам NMRI *nu/nu* мышей проводили внутримышечную инъекцию (в задний отдел бедра) с помощью примерно 5 миллионов клеток человека. Имплантаты собирали через 2 недели. [Lipman et al. (1983) *Calcif. Tissue Int.* 35, 767-772; Ostrowski et al. (1975) *Somatic Cell Genet.* 1, 391-395]. Хрящевые имплантаты вырезали из мышцы, и проводили гистологию с использованием окрашивания гематоксилином-эозином, толуидиновым синим и Сафранином О. Показатель окрашивания, который колебался в интервале от 1 до 3, приписывали имплантату после окрашивания. Гистологический показатель, составляющий 3, обозначает гиалин-подобный хрящ, содержащий в высокой степени сульфатированные протеогликаны, сильно окрашенный с помощью толуидинового синего и Сафарина О. Гистологический показатель, составляющий 2, обозначает хорошо дифференцированный гиалин-подобный хрящ, сильно окрашенный с помощью толуидинового синего и слабо окрашенного с помощью Сафарина О. Гистологический показатель, составляющий 1, обозначает "волоknистый хрящ", недифференцированную фиброзную ткань с отсутствием окрашивания или со слабым окрашиванием с помощью толуидинового синего. Гистологический показатель, составляющий 0, обозначает эксперименты, где не был извлечен имплантат. Хрящ с гистологическим показателем, составляющим 2 или 3, характеризует успешные имплантации. Хрящ с гистологическим показателем, составляющим 0 или 1, характеризует неудачные имплантации.

Пример 1: Маркерный анализ

Фракцию инъекцированных клеток использовали для анализа экспрессии генов. Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР проводили с использованием методов, описанных в WO0124832. ПЦР-праймеры для этих маркеров показаны в Таблице 1.

Таблица 1 Праймеры для амплификации маркерных генов			
	Праймер	Последовательность	SEQ ID. NO:
Бета-актин	Прямой	5'-tgacggggtcaccacactgtgccctcta-3'	1
	Обратный	5'-ctagaagcatttgcggtggacgatggagg-3'	2
Коллаген 11	Прямой	5'-gaactccatctctccctgc-3'	3
	Обратный	5'-gagactggattcaaggcaag-3'	4
Коллаген 2	Прямой	5'-ccctgagtggaggagtgag-3'	5
	Обратный	5'-gaggcgtgaggtcttctgtg-3'	6
PEDF	Прямой	5'-ttcaaggggagtggtaac-3'	7
	Обратный	5'-taagtgatagtcagcggg-3'	8
Frzb1	Прямой	5'-tgtaagtctgtgtcgagcg-3'	9
	Обратный	5'-gatttagttgcgtcttccc-3'	10
ALK1	Прямой	5'-cgacggaggcaggagaagcag-3'	11
	Обратный	5'-tgaagtcgctgggcaatgg-3'	12
FGFR3	Прямой	5'-gctgaaagacgatgccactg-3'	13
	Обратный	5'-aggaccccaaggaccagac-3'	14

Уровень экспрессии маркеров определяли с помощью измерения интенсивности ПЦР-продуктов после электрофореза. Все значения затем сравнивали по отношению к 600п.о.-полосе ДНК-маркера, и получали значение. Концентрация индивидуальных маркеров характеризуется численным значением. В случае позитивного маркера (COL11, COL2, FGFR3) очень низкая экспрессия (0-0,1) характеризуется значением -1, низкая экспрессия (0,1-1) характеризуется значением 0, и высокая экспрессия характеризуется значением +1. Напротив, в случае негативного

маркера (ALK1, PEDF) очень низкая экспрессия (0-0,1) характеризуется значением +1, низкая экспрессия (0,1-1) характеризуется значением 0, и высокая экспрессия характеризуется значением -1. Сумма всех этих индивидуальных маркеров (определенная как показатель хондрогенного потенциала) характеризует уровень экспрессии всего ряда маркеров. Это число колеблется в интервале от -6 до +6.

Индивидуальные данные для каждого маркера, его показатель хондрогенного потенциала и гистологический показатель собраны в Таблице 2.

Таблица 2

Обзор гистологических показателей и показателей хондрогенного потенциала, проведенный на основе хрящевых имплантатах и инъецированных хондроцитах, соответственно. Коды образцов обозначают код пациента, количество пассажей и конfluenceность клеток

Образец	Код образца	Гистологический показатель	Показатель ChondroCelec	Позитивные маркеры				Негативные маркеры	
				COL1	COL2	FGFR3	FRZB	ALK1	PEDF
1	cs29p0	3	5	3,94	8,25	3,34	4,17	0,16	0
2	cs49p0 80%	3	5	0,66	1,93	1,90	2,26	0	0
3	Cs141p3	3	4	1,44	6,10	3,22	2,85	0,61	0,41
4	cs22p0	3	4	5,45	10,89	6,38	5,06	0,66	0,58
7	Cs141p0	3	3	4,95	10,95	0,34	4,42	0,39	0,35
8	Cs145p0	3	3	5,51	8,46	4,18	8,28	0,79	2,56
9	Cs148p0	3	3	2,32	11,63	3,90	6,28	0,52	1,14
10	cs28p0	3	3	2,63	9,02	4,00	4,77	0,41	1,12
11	cs49p0100%	3	3	3,63	1,75	3,78	2,49	1,22	0,84
5	Cs126p1	3	2	2,99	3,28	2,29	1,68	1,39	1,39
12	Cs130p0	3	2	11,96	10,77	4,87	10,89	1,23	1,83
13	Cs134p1	3	3	10,8	7,82	1,81	1,291	0,960	1,54
14	Cs141p2	3	2	7,27	13,60	0,02	5,17	0,78	0,54
15	Cs145p3 _	3	2	0,10	2,53	2,35	1,10	0,22	0,31
16	Cs146p0	3	2	0,11	7,25	2,21	2,50	0,61	1,05
17	cs49p1 90%	3	2	0,51	0,18	1,53	1,21	0,20	0,43
6	Cs136p1	3	1	0,81	1,14	0,44	0,48	0,42	0,37
18	Cs137p3	3	1	0,63	3,19	1,64	0,87	1,01	0,81
19	Cs145p2	3	1	3,19	5,08	0,29	3,97	1,73	1,60
20	Cs146p1fbs	3	1	1,47	2,00	0,79	1,61	1,57	3,82
21	Cs130p2	3	0	8,14	0,43	0,90	1,32	1,30	3,18
22	Cs142p1	3	0	0,12	3,50	0,94	1,30	1,03	1,38
23	Cs113p1	2	4	3,00	3,89	3,54	1,02	0,80	0,38
24	cs55p1	2	3	1,24	3,93	1,01	1,70	0,22	3,67
25	Cs134p2	2	2	8,18	14,54	1,99	2,45	3,09	1,33
26	Cs127p1	2	2	6,85	10,48	0,82	3,08	0,84	1,83
27	Cs137p4	2	2	0,34	1,73	0,87	1,04	0,57	0,84
28	Cs141p5	2	2	0,37	4,23	5,22	2,28	1,06	0,30
29	cs28p1	2	2	1,20	0,53	0,90	0,65	0,52	0
30	cs43p1	2	2	1,67	0	1,16	0,74	0,40	0
31	cs43p0	2	1	0,64	0	1,46	0,84	0,13	0
32	cs41p1	2	0	0,44	0,05	1,18	0,55	0,25	0,35
33	Cs148p3	2	-1	0,31	0,87	1,63	0,88	1,36	1,63
34	Cs139p1	2	-2	0,44	0,15	0,02	0,55	0,93	2,33
35	Cs110p3	1	1	1,21	1,08	2,89	0,31	2,37	2,42
36	Cs127p3	1	-1	4,22	1,05	0,01	0,89	1,42	7,72
37	cs22p1	1	-1	0,45	0,33	0,42	2,41	1,23	9,22
38	cs41p2	1	-1	1,26	0	1,72	0,71	1,87	4,42
39	Cs145p5	1	-2	0,15	0,23	0,56	0,50	2,86	2,42
40	Cs41p3	1	-2	0,95	0	1,34	0,23	1,12	4,34
41	Cs125p5	1	-3	3,17	0	0	0,13	3,87	9,02

42	Cs134p5	1	-4	0,07	0,09	0,35	0,34	1,73	1,37
43	Cs146p3	1	-5	0,07	0,01	0,06	0,15	1,65	2,67
44	cs43p2	0	-1	2,56	0	0,13	0,2	1,29	0,41
45	Cs110p5	0	-4	0,54	0,0	0,2	0,0	1,7	7,9
46	Cs41p4	0	-3	0,14	0	0,38	0,11	1,17	1,74
47	Cs146p5	0	-4	0,07	0,14	0,08	0,14	2,13	3,46
48	Cs148p5	0	-4	0,05	0,02	0,16	0,14	1,57	2,34

Пример 2: Анализ данных

Корреляция между показателем хондрогенного потенциала, как определено в Примере 1, и гистологическим показателем изображена в Таблице 3 и на Фигуре 1. Коэффициент корреляции между показателем хондрогенного потенциала и гистологическим показателем составляет 0,78 и является статистически значимой ($p < 0,0001$).

Образцы с показателем хондрогенного потенциала, составляющим -3 или ниже, всегда приводят в результате к получению волокнистого хряща или к полному отсутствию хряща. Образцы с показателем хондрогенного потенциала, составляющим 2 или более, всегда приводят в результате к получению гиалинового хряща. Образцы с показателем хондрогенного потенциала, составляющим 1, приводят в результате к получению гиалинового хряща в 1 случае из 6.

В качестве эталона, образец с показателем хондрогенного потенциала, составляющим 0 или более, рассматривался, как подходящий для имплантации. На основе представленного ряда данных, возможно прогнозирование результата трансплантации в 77% (37/48) случаев с высокой определенностью, и в 64% случаев безошибочно. На основе этого ряда данных, культура хондроцитов разрешается для использования в процедуре АСІ, когда показатель хондрогенного потенциала составляет 0 или более. Итак, стабильный гиалин-подобный хрящ может быть получен только с помощью клеток, имеющих показатель хондрогенного потенциала, составляющий 0 или выше. Клетки, которые не образуют хрящ совсем, имеют отрицательное значение показателя. Следующий анализ индивидуальных генов может дополнительно помочь уточнить модель.

а) связь между показателем хондрогенного потенциала и гистологическим показателем

Связь между показателем хондрогенного потенциала и гистологическим показателем изображена на Фигуре 1 и в Таблице 3.

Показатель ChondroSelect	Гистологический показатель						Вероятность показателя ≥ 2	
	0	1	2	3	Суммарное значение	Среднее значение	Наблюдаемый	Подобранный
-5	0	1	0	0	1	1,0	0/1 (0%)	0,4%
-4	2	1	0	0	3	0,3	0/3 (0%)	1,4%
-3	2	1	1	0	4	0,75	1/4 25%	5,0%
-2	0	2	0	0	2	1,0	0/2 (0%)	16,2%
-1	1	3	1	0	5	1,0	1/5 (20%)	41,5%
0	0	0	1	2	3	2,7	3/3 (100%)	72,4%
1	0	1	1	4	6	2,5	5/6 (83%)	90,6%
2	0	0	6	6	12	2,5	12/12 (100%)	97,3%
3	0	0	1	6	7	2,9	7/7 (100%)	99,2%
4	0	0	1	2	3	2,7	3/3 (100%)	99,8%
5	0	0	0	2	2	3,0	2/2 (100%)	99,9%
Суммарное значение	5	9	12	22	48			

В дополнение к таблице распределения, в Таблице 3 также показано среднее значение гистологического потенциала для каждого значения показателя хондрогенного потенциала. Это среднее значение значительно увеличивается (от 1 до 2,7) в интервале показателей хондрогенного потенциала между -1 и 0. Это предполагает рассматривать образцы с показателем хондрогенного потенциала, составляющим 0 или выше, как подходящие для ACI.

б) Анализ данных с использованием категориальной шкалы

"Упорядоченная категориальная шкала" представляет собой шкалу, в которой категории полностью пронумерованы с тем, чтобы показать их последовательность: истинные присвоенные номера не предоставляют никакой другой информации. Например, гистологический показатель, представленный здесь, принимает значения 0, 1, 2, 3. Интерпретация этого в виде упорядоченной категориальной шкалы подразумевает, что 1 лучше, чем 0, но ничего не говорит о том, насколько лучше. Однако для интервальной шкалы истинные номера рассматриваются как значимые, где 1 лучше, чем 0 настолько же, насколько 2 лучше, чем 1, и т.д. При расчете средних значений, как в Таблице 3, делается подразумеваемое допущение, что гистологический показатель может быть в установленном порядке обработан в виде интервальной шкалы.

Чем больше точек есть на шкале, тем больше принимается, что такая шкала является интервальной шкалой. Показатель хондрогенного потенциала характеризуется данными 13 точек, которые соответственно обработаны в виде интервальной шкалы.

Дополнительный анализ представлен в последнем столбце Таблицы 3, который обрабатывает гистологический показатель в виде упорядоченной категориальной шкалы. Показатели, представленные здесь, помещаются в две категории, 0 или 1 (отсутствие хряща или мало волокнистого хряща), и 2 или 3 (гиалиновый хрящ), данные характеризуют вероятность наблюдения гистологического показателя, составляющего 2 или 3.

В двух последних столбцах Таблицы 3, столбец, озаглавленный 'наблюдаемый', показывает истинные номера образцов в этой категории (и процентные выражения) для каждого показателя хондрогенного потенциала. Это значение также увеличивается в интервале между значениями показателя хондрогенного показателя -1 и 0, что предполагает границу порогового значения. Для этого анализа показатель хондрогенного потенциала рассматривается в виде упорядоченной категориальной шкалы.

с) Анализ данных с использованием интервальной шкалы

Когда показатель хондрогенного потенциала обрабатывают в виде интервальной шкалы, наблюдаемая реакция может быть сглажена с использованием логистического анализа. Этот метод прогнозирует вероятность попадания в целевую категорию (2 или 3). Подобранные значения не попадают за границы вероятного интервала (0-100%). Эти подобранные значения показаны в последнем столбце Таблицы 3, и показан эффект сглаживания. Предполагается, что эти подобранные оценки обеспечивают более достоверный прогноз события получения гистологического показателя со значениями 2 или 3 для любого данного показателя хондрогенного потенциала, чем с помощью других. Следует заметить, что конкретно для показателя хондрогенного потенциала, составляющего -1, модель подбора прогнозирует событие получения показателя 2 или 3 на 41,5%, и, следовательно, это поднимает вопрос о том, следует ли принимать к рассмотрению показатель, составляющий -1.

Пример 3. Влияние индивидуальных маркеров

Влияние индивидуальных маркеров оценивают с помощью пересчета профиля экспрессии 5 маркеров вместо 6 маркеров из ряда маркеров, определяющих показатель хондрогенного потенциала в Примере 1. Применяли ту же систему расчета, в которой показатели теперь находились в интервале от -5 до +5.

Данные представлены в Таблицах 4-9.

10

15

20

Маркерный показатель	Гистологический показатель				Суммарное значение
	0	1	2	3	
-5					0
-4	1	2			3
-3	3	1			4
-2	1	4	1		6
-1		1	1	1	3
0		1	1	3	5
1			5	5	10
2			3	8	11
3			1	3	4
4				1	1
5				1	1
Суммарное значение	5	9	12	22	48

25

30

35

Маркерный показатель	Гистологический показатель				Суммарное значение
	0	1	2	3	
-5					
-4	1	1			2
-3	2	1			3
-2	1	3	1		5
-1		2	1	1	4
0	1	2		5	8
1			6	5	11
2			3	7	10
3			1	2	3
4				2	2
5					
	5	9	12	22	48

40

45

50

Маркерный показатель	Гистологический показатель				Суммарное значение
	0	1	2	3	
-5					
-4		1			1
-3	3	1			4
-2	1	1			2
-1	1	2	1		4
0		3	2		5
1			2	4	6
2		1	3	5	9
3			2	5	7
4			2	8	10

5					
	5	9	12	22	48

5 Таблица 7
Таблица распределения для гистологического показателя в отсутствии маркера FRZB

Маркерный показатель	Гистологический показатель				Суммарное значение
	0	1	2	3	
-5		1			1
-4	2	1			3
10 -3	2	1			3
-2		3	1		4
-1	1	2	1	2	6
0			1	2	3
1		1	5	8	14
15 2			3	6	9
3			1	2	3
4				2	2
5					
	5	9	12	22	48

20 Таблица 8
Таблица распределения для гистологического показателя в отсутствии маркера ALK1

Маркерный показатель	Гистологический показатель				Суммарное значение
	0	1	2	3	
-5					
25 -4		1			1
-3	3	1			4
-2	1	1	1		3
-1		2			2
0	1	3	2		6
30 1			1	3	4
2		1	4	7	12
3			3	7	10
4			1	4	5
5				1	1
35	5	9	12	22	48

40 Таблица 9
Таблица распределения для гистологического показателя в отсутствии маркера FGFR3

Маркерный показатель	Гистологический показатель				Суммарное значение
	0	1	2	3	
-5					
-4	2	2			4
-3	2	1			3
-2		3	1		4
45 -1	1	1	2		4
0		2	1	3	6
1			3	8	11
2			4	5	9
3			1	4	5
4				2	2
50 5					
	5	9	12	22	48

Часть А Таблицы 10, представленной ниже, указывает для каждого из ряда данных,

представленных в Таблицах 4-9 выше, для порогового значения маркерного показателя, насколько много образцов может быть однозначно классифицировано в виде образцов, получающих хрящ низкого качества (гистологический показатель 0 или 1, соответствующий '-' в Таблице 10), или получающих хрящ высокого качества

(гистологический показатель 2 или 3, указанный с помощью '+' в Таблице 10). Образцы, для которых отсутствует корреляция между маркерным показателем и гистологическим показателем, классифицированы как '?' образцы. Эти данные указывают на то, что когда используется ряд из 5 маркеров, где COL11, COL2 или COL11 пропущены, то получают подобные или лучшие результаты (т.е. меньше образцов обозначается как '?').

В части В Таблицы 10 малозначимые значения менее ограничены. Когда для одного маркерного показателя внутри указанного интервала по меньшей мере 5 из 6 образцов показывают корреляцию между маркерным показателем и качеством хряща, то предполагается, что интервал маркерного показателя является прогностическим. При использовании этого способа пропуск COL11 приводит в результате к получению улучшенных результатов, в то время как пропуск любого другого маркера дает худшие результаты, особенно когда из ряда маркеров Примера 1 пропускают Col2 или FGFR3.

Таблица 10 Прогностические значения ряда маркеров, содержащего 5 маркеров							
A	6 маркеров	-COL11	-COL2	-PEDF	-FRZB	-ALK1	-FGFR3
-	7	7	5	7	7	5	7
?	17	14	17	24	27	27	14
+	24	27	26	17	14	16	27
B	6 маркеров	-COL11	-COL2	-PEDF	-FRZB	-ALK1	-FGFR3
-	7	13	10	7	7	5	7
?	8	3	12	9	10	11	14
+	33	32	26	32	27	32	27

На основе представленного ряда данных и их интерпретации, очевидно, что прогностическая способность профиля экспрессии ряда маркеров для генерирования хряща *in vivo* необязательно может быть получена без COL11, несмотря на интерпретацию. С другой стороны, пропуск или ALK1 или FRZB приводит в результате к получению прогностической способности маркеров, несмотря на интерпретацию представленного ряда данных.

Пример 4. Использование маркерного показателя в анализах скрининга
Оценку фенотипической стабильности хондроцитов с использованием кумулятивного маркерного показателя тестировали в анализах скрининга для идентификации соединений, способных влиять на способность клеток продуцировать стабильный хрящ *in vivo* и для определения природы влияния таких соединений на клетки.

Анализы скрининга проводили в 96-луночных планшетах, где были посажены хондроциты в количестве между 10000 и 100000, полученные из биопсийного материала хряща (свежевыделенные из пассажей 0-P5). Тестируемые соединения добавляли в различных концентрациях и на различные периоды времени. После инкубирования хондроциты собирали, выделяли РНК и обрабатывали с помощью обратной транскриптазы. Проводили количественную реакцию ПЦР согласно инструкциям процедуры TaqMan, и определяли показатель хондрогенного потенциала клеток, как описано в Примере 1 (СС-показатель).

1. Тестирование на предмет молекул, которые препятствуют дифференцировке хондроцитов в монослойной культуре

Соединение А являлось кандидатным соединением, которое по прогнозам имело хондрозащитное влияние и имело предполагаемое стабилизирующее влияние на фенотип хондроцитов. Определение кумулятивного маркерного показателя, более конкретно, показателя хондрогенного потенциала Примера, использовали для определения влияния этого соединения на фенотипическую стабильность хондроцитов монослойной культуры хондроцитов.

а) Монослойные культуры хондроцитов

Хондроциты выращивали в монослойной культуре с плотностью 4×10^4 клеток/мл во флаконах T25. Соединение А добавляли к клеткам непосредственно после посева. Добавляли суммарный конечный объем, составляющий 5 мл полной среды (DMEM + 10% FBS). Три флакона использовали для каждого условия (1 или 10 мкМ соединения А, DMSO-контроль). Среду и соединения меняли раз в неделю. По достижении конfluence хондроциты пассажа 0 (P0) трипсинизировали, подсчитывали, и 2×10^5 клеток высевали для получения культуры P1. Оставшиеся клетки помещали в лизирующую среду для РНК-экстракции. Ту же процедуру проводили для культур хондроцитов P1, P2 и P3. TaqMan РВ-ПЦР использовали для определения экспрессии хондрогенных маркеров.

б) Выделение РНК, генерирование кДНК

Хондроциты, полученные из монослойной культуры, промывали с помощью PBS и лизировали с использованием буфера RLT, содержащего 1% меркаптоэтанол (Qiagen). Лизированные клетки сохраняли при -80°C до использования. мРНК очищали с использованием микронабора реагентов RNeasy (Qiagen) согласно инструкциям производителя. кДНК синтезировали с использованием случайных гексамеров следуя инструкциям производителя (Invitrogen).

в) Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени TaqMan (РВ-ПЦР)

Количественная реакция ПЦР в режиме реального времени (РВ-ПЦР) проводили с использованием системы детектирования последовательностей ABI prism 7700. Набор реагентов Мастермикс кПЦР (Eurogentec) использовали для РВ-ПЦР согласно инструкциям производителя. Праймеры и зонды, используемые для TaqMan-анализа, заказывали в фирме Applied Biosystems или Eurogentec. Данные РВ-ПЦР рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (2DDCT), которые определяются как количество гена-мишени, нормализованное к эндогенному эталону (β -актин) и по отношению к калибратору, который в этом случае представляет собой уровни экспрессии выбранных генов при контрольных условиях (DMSO).

г) Результаты

Соединение А имело влияние на экспрессию некоторых молекулярных маркеров, которые показательны для хондрогенной способности, фенотипической стабильности и гомеостаза хондроцитов, и было способно понижать показатель хондрогенного потенциала во время размножения хондроцитов в монослойной культуре (смотри Фигуру 2). Таким образом, при обеих концентрациях 1 мкМ и 10 мкМ, показатели хондрогенного потенциала для хондроцитов в состоянии P0 и P3 были сравнимы или даже повышены по сравнению с хондроцитами, которые выращивали в отсутствие соединения. В последнем случае снижение кумулятивного маркерного показателя наблюдали для P3 против P0 хондроцитов. Соединение А имело позитивное влияние на экспрессию генов некоторых внеклеточных матриксных компонентов хондроцитов. При более низких концентрациях (1 мкМ), но не выше (10 мкМ), соединение А

индуцировало экспрессию транскриптов обоих генов, Col2 и Col1 (Фигура 3).

Соединение также повышало экспрессию маркера FGFR-3, хотя повышение не было статистически значимым. Более того, соединение А сильно ингибировало экспрессию PDEF при обеих тестируемых концентрациях (Фигура 4). При 10 мкМ, добавление соединения также приводило в результате к получению уменьшенной экспрессии ALK1 (Фигура 4). Оба маркера при апрегуляции коррелируют негативно с хондрогенной способностью клеток, указывая на то, что соединение А имеет позитивное и стимулирующее влияние на хондрогенный потенциал клеток хондроцитов, и, таким образом, на хондрогенез.

2. Скрининг молекул на предмет их способности опосредовать ре-дифференцировку дедифференцированных хондроцитов в 3D-культуре.

Четырнадцать соединений скринировали на предмет их способности усиливать ре-дифференцировку дифференцированных хондроцитов в альгинатных культурах.

Определяли влияние молекул на экспрессию различных молекулярных маркеров и на их кумулятивный маркерный показатель (показатель хондрогенного потенциала, как определено в Примере 1) для того, чтобы оценить способность соединений влиять на получение хондрогенного фенотипа клеток в 3D-культурах.

а) Ре-дифференцировка хондроцитов в альгинатной культуре

После размножения в монослойной культуре в полной среде, хондроциты человека пассажа 3 (P3), взятые из шеи пациентов с 5 ОА (возраст 50-65), высвобождали с помощью обработки трипсином, подсчитывали и тестировали на предмет выживаемости с помощью исключающего теста с использованием трипанового синего. Хондроциты суспендировали в 2% альгинате, и добавляли равное количество HBSS. Суспензию клеток засасывали в 10мл-шприц с иглой и переносили капельно с помощью иглы калибра 24 Gauge в раствор хлорида кальция (5 гранул на лунку, суммарное количество клеток 250000/на лунку). Гранулы промывали с помощью NaCl и добавляли новую полную среду (DMEM + 10% FBS). Через 4 дня культивирования супернатант удаляли и добавляли новую среду, содержащую соединения с концентрацией 10 мкМ. Через четыре дня после добавления соединений, супернатант удаляли, и из их гранул клетки высвобождались для лизиса. мРНК и кДНК генерировали, и TaqMan РВ-ПЦР использовали для измерения экспрессии COL2, COL11, FGR3, FRZB, ALK1, PDEF, как описано в Примере 1.

б) Результаты

Относительные влияния соединений на апрегуляцию или даунрегуляцию экспрессии маркерных генов в хондроцитах, выращенных в альгинате, суммированы в Таблице 11. Влияния имеют отношение к хондроцитам, выращенным в отсутствие молекул (но в присутствии носителя DMSO). Результаты характеризуют среднее значение экспрессии (среднее значение для пациентов 5 ОА) по отношению к контролям (хондроциты вместе с DMSO). NS = не значимый результат; - = ингибирует; + = усиливает; # = $p < 0,05$ значимый результат при сравнении с DMSO-контролем.

Соединения использовали с концентрацией 10 мкМ.

Некоторые молекулы были способны влиять на экспрессию различных маркерных генов позитивным или негативным образом. Только два соединения (Cpd 8 и Cpd 14) имели позитивное влияние на кумулятивный маркерный показатель (СС-показатель), что указывает на то, что эти соединения могут усиливать/опосредовать ре-дифференцировку хондроцитов. Однако только Cpd 14 имел целевое влияние на каждый из индивидуальных маркеров при отсутствии влияния на экспрессию генов BMP2 или ALK1. Это соединение может быть использовано при стимулировании

дифференцировку хондроцитов *ex vivo* перед ре-имплантацией и, таким образом, может смещать баланс в сторону образования суставного гиалинового хряща *in vivo*.

Таблица 11.

Соединения	COL2	FGR3	BMP2	COL11	ALK1	PEDF	СС-показатель
Соед. 1	NS	_#	NS	NS	NS	_#	NS
Соед.2	_#	NS	#	NS	NS	_#	NS
Соед.3	_#	_#	NS	_#	NS	_#	NS
Соед. 4	_#	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Соед. 5	_#	_#	_#	NS	NS	_#	_#
Соед. 6	_#	_#	_#	NS	NS	_#	_#
Соед. 7	NS	_#	NS	NS	NS	NS	NS
Соед. 8	NS	NS	NS	_#	_#	NS	+#
Соед. 9	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Соед. 10	_#	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Соед. 11	_#	_#	+#	NS	NS	_#	_#
Соед. 12	_#	NS	+#	NS	_#	_#	NS
Соед. 13	_#	NS	NS	NS	NS	_#	_#
Соед. 14	+#	+#	NS	+#	NS	_#	+#

Пример 5. Тестирование влияния хондрозащитных соединений *in vivo*

Для соединений Примера 4, которые значительно влияли на показатель хондрогенного потенциала, также тестировали их *in vivo* влияние на фенотипическую стабильность хондроцитов для клеток. Для этой цели популяции клеток контактировали или с тестируемым соединением или с буфером, и после инкубирования клетки инъецировали модельным голым мышам (смотри выше). Оценивали способность каждой из популяций клеток продуцировать стабильный гиалиновый хрящ. Установили, что влияние соединения на показатель хондрогенного потенциала коррелирует с влиянием на хондрогенный потенциал популяции клеток.

Формула изобретения

1. *In vitro*-способ прогнозирования способности популяции клеток, полученных из сустава, продуцировать стабильный гиалиновый хрящ *in vivo*, который включает стадии:

- определения экспрессии указанной популяцией ряда маркерных генов, включающих по меньшей мере три маркерных гена, включающих позитивный маркер FRZB (Frizzled-Подобный Белок 1) и негативный маркер ALK1 (Рецептор Активина А, Тип II-Подобная Киназа) и один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из негативного маркера PEDF (Фактор, Выделенный из Пигментного Эпителия), позитивного маркера COL11 (Коллаген, Тип XI A1), COL2 (Коллаген, Тип II, Альфа 1) и позитивного маркера FGFR3 (Рецептор Фактора Роста Фибробластов 3);
- представления уровня экспрессии каждого индивидуального маркера с помощью числового значения;
- комбинации числовых значений для индивидуальных маркеров в кумулятивный показатель;
- предсказания, на основе кумулятивного показателя, способности популяции клеток, полученных из сустава, продуцировать стабильный гиалиновый хрящ *in vivo*;

причем значение кумулятивного показателя указывает на способность к продукции стабильного хряща.

2. Способ по п.1, в котором представление экспрессии на стадии b) основано на сравнении с экспрессией бета-актина.

5 3. Способ по п.1, где ряд маркеров, включающих по меньшей мере три маркера, представляет собой ряд маркерных генов, включающих по меньшей мере 4, 5 или 6 маркерных генов, включающих FRZB, ALK1 и включающих соответственно 2, 3 и 4 маркерных гена, выбранных из группы, состоящей из PEDF, COL11, COL2 и FGFR3.

10 4. Способ по п.1, где ряд маркерных генов, включающих по меньшей мере три маркерных гена, представляет собой ряд, включающий по меньшей мере шесть маркерных генов, включающих FRZB, ALK1, PEDF, COL11, COL2 и FGFR3.

5. Способ по любому из пп.1-4, где популяцию клеток получают от здорового донора.

15 6. Способ по любому из пп.1-4, где популяцию клеток получают от индивидуума с остеохондральным дефектом.

20

25

30

35

40

45

50

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Tigenix N.V.
Luyten, Frank
De Bari, Cosimo
Dell'Accio, Francesco
- <120> Маркерные гены для применения в идентификации фенотипической стабильности хондроцитов и в скрининге факторов, влияющих на продуцирование хряща
- <130> T4503-РСТ
- <150> US 60/867,152
<151> 2006-11-24
- <160> 14
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
- <220>
<223> ПЦР-праймер
- <400> 1
tgacgggggc acccacactg tgcccatcta 30
- <210> 2
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
- <220>
<223> ПЦР-праймер
- <400> 2
ctagaagcat ttgcggtgga cgatggaggg 30
- <210> 3
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
- <220>
<223> ПЦР-праймер
- <400> 3
gaactccatc tctccctgc 19
- <210> 4
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
- <220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 4		
gagactggat ttcaaggcaa g		21
<210> 5		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР-праймер		
<400> 5		
ссctgagtgg aagagtggag		20
<210> 6		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР-праймер		
<400> 6		
gagggcgtgag gtcttctgtg		20
<210> 7		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР-праймер		
<400> 7		
ttcaaggggc agtgggtaac		20
<210> 8		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР-праймер		
<400> 8		
taaggtgata gtccagcggg		20
<210> 9		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР-праймер		
<400> 9		
tgtaagtctg tgtgogagcg		20

<210> 10
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 10
 gatttagttg cgtgcttgcc 20

<210> 11
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 11
 cgaacgagcc aggaagaacg g 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 12
 tgaagtcgscg gtgggcaatg g 21

<210> 13
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

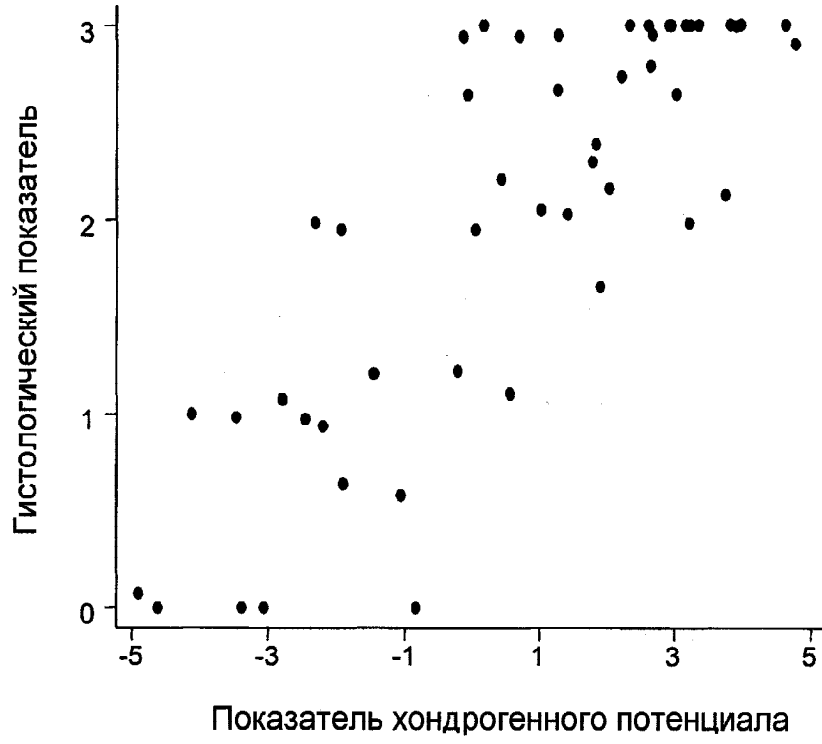
 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 13
 gctgaaagac gatgssactg 20

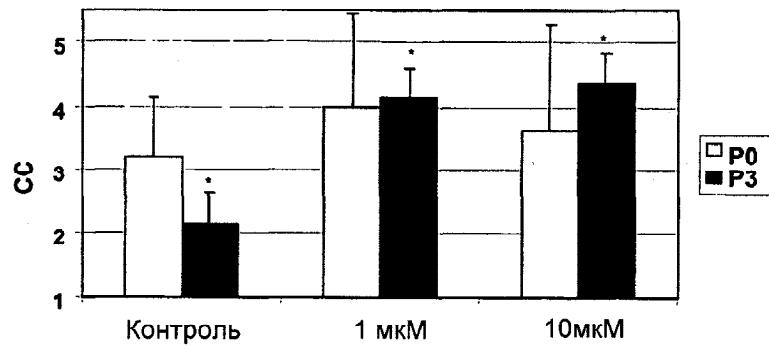
<210> 14
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

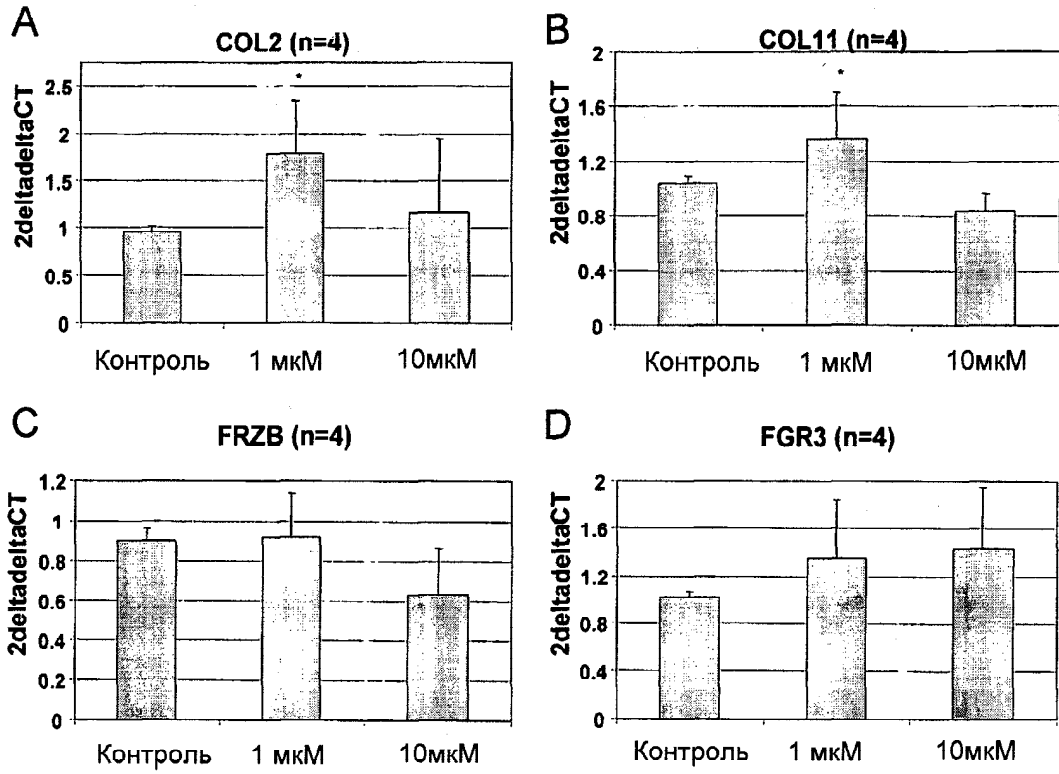
 <400> 14
 aggacssaa aggacagac 20



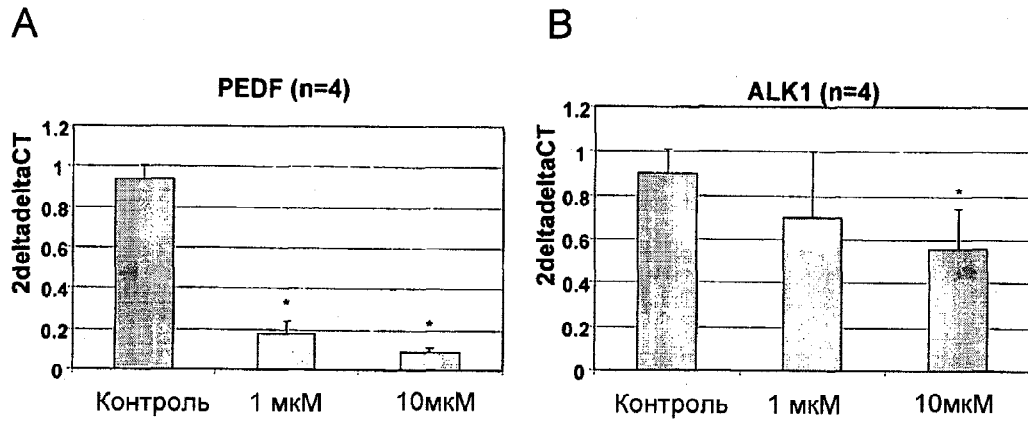
Фиг. 1



Фиг. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4