



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 38/00 (2021.05); *A61K 38/08* (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2021104025, 17.02.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 17.02.2021

Дата регистрации:
 21.07.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.02.2021

(45) Опубликовано: 21.07.2021 Бюл. № 21

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
 Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Цуриковой
 Н.Д.

(72) Автор(ы):

Анциферов Олег Владимирович (RU),
 Корокин Михаил Викторович (RU),
 Гуреев Владимир Владимирович (RU),
 Нетребенко Александр Сергеевич (RU),
 Солдатов Владислав Олегович (RU),
 Покровский Михаил Владимирович (RU),
 Покровская Татьяна Григорьевна (RU),
 Пересыпкина Анна Александровна (RU),
 Гудырев Олег Сергеевич (RU),
 Затолокина Мария Алексеевна (RU),
 Победа Анна Сергеевна (RU),
 Покровский Владимир Михайлович (RU),
 Якушев Владимир Иванович (RU),
 Корокина Лилия Викторовна (RU),
 Гуреева Анастасия Владимировна (RU),
 Кочкарова Индира Султановна (RU),
 Колесник Инга Михайловна (RU),
 Бурда Юрий Евгеньевич (RU),
 Алехин Сергей Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Белгородский государственный
 национальный исследовательский
 университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2512788 C2, 10.04.2014. RU
 2410104 C1, 27.01.2011. RU 2318552 C1,
 10.03.2008. GOLUBEV I.V. et al. The anti-
 aggregation activity of new 11-amino acid of
 erythropoietin derivatе containing tripeptide
 motifs / Archivos Venezolanos de Farmacologia
 y Terapeutica, 2020, vol. 39, N 5, 4 pages.
 GOLUBEV I.V. et al. Preclinical study of
 innovative (см. прод.)

(54) Способ снижения агрегационной способности тромбоцитов

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии,

и может быть использовано для коррекции агрегационной способности тромбоцитов. Способ снижения агрегационной способности тромбоцитов включает индукцию агрегации тромбоцитов с помощью аденозиндифосфата. Инкубацию крови проводят с пептидом с

аминокислотной последовательностью UEHLERALNSS или с пептидом с аминокислотной последовательностью UEQLERALNTS в конечной концентрации 30 мкг/мл. Изобретение обеспечивает снижение агрегационной способности тромбоцитов. 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

peptides mimicking the space structure of the α -helix B of erythropoietin / Research Results in Pharmacology, 2020, 6(2), pages 85-96.

R U 2 7 5 1 9 6 4 C 1

R U 2 7 5 1 9 6 4 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A61K 38/00 (2021.05); A61K 38/08 (2021.05)

(21)(22) Application: **2021104025, 17.02.2021**

(24) Effective date for property rights:
17.02.2021

Registration date:
21.07.2021

Priority:

(22) Date of filing: **17.02.2021**

(45) Date of publication: **21.07.2021** Bull. № 21

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Tsurikovej N.D.**

(72) Inventor(s):

**Antsiferov Oleg Vladimirovich (RU),
Korokin Mikhail Viktorovich (RU),
Gureev Vladimir Vladimirovich (RU),
Ntrebenko Aleksandr Sergeevich (RU),
Soldatov Vladislav Olegovich (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Pokrovskaya Tatyana Grigorevna (RU),
Peresyapkina Anna Aleksandrovna (RU),
Gudyrev Oleg Sergeevich (RU),
Zatolokina Mariya Alekseevna (RU),
Pobeda Anna Sergeevna (RU),
Pokrovskij Vladimir Mikhajlovich (RU),
Yakushev Vladimir Ivanovich (RU),
Korokina Liliya Viktorovna (RU),
Gureeva Anastasiya Vladimirovna (RU),
Kochkarova Indira Sultanovna (RU),
Kolesnik Inga Mikhajlovna (RU),
Burda Yuriy Evgenevich (RU),
Alekhin Sergej Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR REDUCING AGGREGATION ABILITY OF PLATELETS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, in particular to experimental pharmacology, and can be used to correct the aggregation ability of platelets. A method for reducing the aggregation capacity of platelets includes the induction of platelet aggregation using adenosine diphosphate. Blood incubation is

carried out with a peptide with the amino acid sequence UEHLERALNSS or with a peptide with the amino acid sequence UEQLERALNTS at a final concentration of 30 mcg/ml.

EFFECT: reduction of platelet aggregation ability.
1 cl, 1 tbl, 1 ex

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии.

Появление информации о том, что эритропоэтическое действие и цитопротективные эффекты эритропоэтина реализуются через разные рецепторы (гомодимерный и гетеродимерный), привело исследователей к идее поиска коротких молекул, имитирующих спираль В эритропоэтина для получения пептидов с цито- и эндотелиопротективными свойствами. В исследовании, опубликованном Michael Brines et al. показано, что 11-членный пептид рНВСП (QEQLERALNSS (Pyr-Glu-Gln-Leu-Glu-Arg-Ala-Leu-Asn-Ser-Ser)) имитирует особенности трехмерной структуры спирали В эритропоэтина и оказывает тканезащитные эффекты без гемопоэтической активности [Brines M., Patel N.S., Villa P., Brines C., Mennini T., De Paola M., Erbayraktar Z., Erbayraktar S., Sepodes B., Thiemermann C., Ghezzi P., Yamin M., Carla C. Hand, Qiao-wen Xie, Coleman T., Cerami F. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin // Proc Natl Acad Sci USA. 2008. №105(31). P. 10925-10930.].

С учетом предполагаемых областей применения дополнительным положительным свойством у подобных производных эритропоэтина является антиагрегантная активность. Путем присоединения к исходному 11-членному пептиду рНВСП (QEQLERALNSS) трипептидов с заданными свойствами RGD (Arg-Gly-Asp) и KGD (Lys-Gly-Asp) [Preclinical study of innovative peptides mimicking the tertiary structure of the α -helix В of erythropoietin / I.V. Golubev, V.V. Gureev, M.V. Korokin [et al.] // Research Results in Pharmacology. – 2020. – Vol. 6, Iss. 2. – P. 85-96. <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.6.55385>] были получены пептиды с выраженной антиагрегантной активностью с сохранением цитопротективных свойств [Ivan V. Golubev, Vladimir V. Gureev, Liliya V. Korokina, Oleg S. Gudyrev, Tatiana G. Pokrovskaya, Olga N. Pokopeiko, ... Mikhail V. Korokin. (2020). The anti-aggregation activity of new 11-amino acid of erythropoietin derivate containing tripeptide motifs. <http://doi.org/10.5281/zenodo.4264989>]. Однако такой способ получения приводит к удлинению полипептидной цепи, а значит и размера молекулы. Это может приводить к нарушению их транспорта через тканевые барьеры. Другим путем получения пептидов с выраженной антиагрегантной активностью и сохранением цитопротективных свойств может быть модификация аминокислотного состава без изменения числа аминокислот. После проведения скрининга были отобраны полипептидные соединения с аминокислотной последовательностью EP-11-1 (UEHLERALNSS) и EP-11-3 (UEQLERALNTS) обладающие антиагрегантной активностью. У последних полипептидная цепочка содержит такое же количество аминокислотных остатков, как и у исходного пептида, что является преимуществом.

Прототипом заявленного решения является способ снижения агрегационной способности тромбоцитов с помощью производных пептида рНВСП (QEQLERALNSS) с лабораторным шифром P α -B1 - P α -B4 полученных путем присоединения к последнему трипептидных мотивов RGD (Arg-Gly-Asp) и KGD (Lys-Gly-Asp) с заданными свойствами [Ivan V. Golubev, Vladimir V. Gureev, Liliya V. Korokina, Oleg S. Gudyrev, Tatiana G. Pokrovskaya, Olga N. Pokopeiko, ... Mikhail V. Korokin. (2020). The anti-aggregation activity of new 11-amino acid of erythropoietin derivate containing tripeptide motifs. <http://doi.org/10.5281/zenodo.4264989>]. В данном способе снижение агрегационной способности тромбоцитов производится полипептидами с более длинной полипептидной цепочкой по отношению к исходному пептиду, а значит результаты не удовлетворительные.

Задачей изобретения является снижение агрегационной способности тромбоцитов, включающий использование полипептидов производных рНВСП с 11-членной аминокислотной последовательностью обладающих цитопротективным действием.

Техническим результатом изобретения является способ снижения агрегационной

способности тромбоцитов, включающий использование в качестве антиагрегантов полипептидными соединениями с аминокислотной последовательностью UEHLERALNSS и UEQLERALNTS.

5 Задача достигается тем, что перед индукцией агрегации тромбоцитов с помощью аденозиндифосфата (АДФ) кровь предварительно инкубируется с исследуемыми полипептидами с аминокислотной последовательностью: UEHLERALNSS и UEQLERALNTS в конечной концентрации 30 мкг/мл.

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

10 Экспериментальное исследование проведено на базе НИИ фармакологии живых систем НИУ «БелГУ». Все эксперименты были одобрены Этическим комитетом НИУ «БелГУ». Вивисекцию проводили в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123».

15 До и во время выполнения исследования животные содержались в помещениях с искусственным освещением (режим 12ч/12ч) при температуре 21-23°C, влажности 38-50% и имели свободный доступ к корму и воде.

Исследование антиагрегантной активности *in vitro* производных 11-членного пептида рНВSP (QEQLERALNSS): EP-11-1 (UEHLERALNSS) и EP- 11-3 (UEQLERALNTS) проведено на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов при 20 предварительной инкубации цельной крови с изучаемыми пептидами. Антиагрегантную активность определяли по методу G. Vorn в модификации З.А. Габбасова на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 «Биола» с использованием реактивов производства НПО «Ренам». Кровь забирали из брюшного отдела аорты в пробирку с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 с 25 последующим добавлением исследуемых полипептидов в конечной концентрации 30 мкг/мл. Инкубировали 30 минут. Затем центрифугировали при 1000 оборотов 10 минут. После этого вносили 270 мкл обогащенной тромбоцитами плазмы в кювету агрегометра объемом 0,3 мл. При изучении АДФ индуцированной агрегации в пробирку добавляли 30 мкл динатриевой соли аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) в конечной 30 концентрации 5 мкМ. Регистрацию агрегации тромбоцитов осуществляли на протяжении 5 мин. Получали кривые, отражающие падение оптической плотности плазмы. Степень агрегации тромбоцитов оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы и времени наступления максимальной светопропускной способности и времени наступления уровня 85% от максимальной светопропускной способности.

35 Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую обработку проводили с использованием программной среды вычислений R. Характер распределения признаков в статистической выборке определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка и критерия Шпигельхальтера (библиотека normtest), оценку равенства дисперсий – с помощью критерия Левене (библиотека lawstat). В 40 зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (критерий Краскела-Уоллиса) однофакторного дисперсионного анализа, а в качестве *post-hoc* анализа для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали непарный *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни, 45 соответственно, с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественную проверку гипотез. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Инкубирование крови с исследуемыми пептидами: EP-11-1 или EP-11-3 приводило к

ослаблению агрегационной способности тромбоцитов. Об этом свидетельствует статистически значимое уменьшение максимальной светопропускной способности плазмы с $36,9 \pm 1,79\%$ до $31,5 \pm 0,85\%$ и $30,4 \pm 0,62\%$ соответственно, и отсрочивание во времени ее наступления с $123,4 \pm 3,33$ с до $132,6 \pm 2,73$ с и $137,5 \pm 3,80$ с соответственно.

5 Закономерная тенденция наблюдается и при анализе времени наступления 85% от максимального уровня светопропускания. У образцов EP-11-1 и EP-11-3 время его наступления больше по отношению к группе интактных животных (таблица 1).

Таким образом, на основании проведенного исследования выявлена антиагрегантная способность у образцов EP-11-1 и EP-11-3, о чем свидетельствуют удлинение времени

10 агрегации тромбоцитов и снижение ее степени.

Таблица 1

Влияние инновационных пептидов, имитирующих α -спираль В эритропоэтина, на агрегационную способность тромбоцитов ($M \pm m$, $n=10$)

Группа	Время наступления		Максимальный уровень светопропускания, %
	85% от максимальной, с	Максимальная агрегация, с	
Интактные	$94,0 \pm 3,85$	$123,4 \pm 3,33$	$36,9 \pm 1,79$
EP-11-1	$104,0 \pm 2,29^*$	$132,6 \pm 2,73^*$	$31,5 \pm 0,85^*$
EP-11-3	$108,9 \pm 4,00^*$	$137,5 \pm 3,80^*$	$30,4 \pm 0,62^*$

20 Примечание. * - при $p < 0,05$ по отношению к интактным животным.

(57) Формула изобретения

Способ снижения агрегационной способности тромбоцитов, включающий индукцию агрегации тромбоцитов с помощью аденозиндифосфата, отличающийся тем, что инкубацию крови проводят с пептидом с аминокислотной последовательностью

25 UEHLERALNSS или с пептидом с аминокислотной последовательностью UEQLERALNTS в конечной концентрации 30 мкг/мл.