



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 7/06 (2021.05); A61K 38/08 (2021.05); A61P 9/00 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2021104157, 18.02.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.02.2021Дата регистрации:
13.07.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.02.2021

(45) Опубликовано: 13.07.2021 Бюл. № 20

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: Ivan V. Golubev et al "Endothelial
protective properties of short-chain peptides that
mimic-helix B of of erythropoietin in
experimental preeclampsia", Archivos
Venezolanos de Farmacologia y Terapeutica,
09.07.2020, 39(5):573-577. Ivan V. Golubev et al
"Preclinical study of innovative peptides
mimicking the space structure of the α -helix B
of (см. прод.)

(54) Способ увеличения выживаемости клеток человеческого эндотелия

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к экспериментальной фармакологии,

и может быть использовано для повышения выживаемости клеточных культур. Предложен способ увеличения выживаемости клеток человеческого эндотелия, включающий моделирование оксидативного стресса, путем добавления пептида с аминокислотной последовательностью UEHLERALNSS или пептида с аминокислотной последовательностью UEQLERALNTS. Моделирование окислительного стресса в первичной культуре клеток эндотелиоцитов человека (HUVEC) путем

добавления перекиси водорода H_2O_2 (200 мкМ) приводило к значительной гибели клеток. Предварительное добавление в культуральную среду пептида с аминокислотной последовательностью UEHLERALNSS (образец EP-11-1) или пептида с аминокислотной последовательностью UEQLERALNTS (образец EP-11-3) значительно увеличивало количество выживших клеток в условии оксидативного стресса. 1 ил., 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

erythropoietin" *Research Results in Pharmacology*, 30.06.2020, 6(2):85-96.

R U 2 7 5 1 3 3 2 C 1

R U 2 7 5 1 3 3 2 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 7/06 (2021.05); A61K 38/08 (2021.05); A61P 9/00 (2021.05)(21)(22) Application: **2021104157, 18.02.2021**(24) Effective date for property rights:
18.02.2021Registration date:
13.07.2021

Priority:

(22) Date of filing: **18.02.2021**(45) Date of publication: **13.07.2021** Bull. № 20

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Tsurikovoj 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 INCREASING THE SURVIVAL OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, in particular to experimental pharmacology, and can be used to increase the survival rate of cell cultures. A method for increasing the survival of human endothelial cells is proposed, including modeling oxidative stress by adding a peptide with the amino acid sequence UEHLERALNSS or a peptide with the amino acid sequence UEQLERALNTS.

EFFECT: modeling oxidative stress in primary

culture of human endothelial cells (HUVEC) by adding hydrogen peroxide H₂O₂ (200 mcM) led to significant cell death. Preliminary addition to the culture medium of a peptide with the amino acid sequence UEHLERALNSS (sample EP-11-1) or a peptide with the amino acid sequence UEQLERALNTS (sample EP-11-3) significantly increased the number of surviving cells under conditions of oxidative stress.

1 cl, 1 dwg, 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 рНВSP (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., Thiernemann 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 возможных областей применения дополнительным положительным свойством у подобных производных эритропоэтина является наличие у них антиагрегантной активности. Путем присоединения к исходному 11-членному пептиду рНВSP (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 B 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/rpharmacology.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 derivative 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. Кроме этого, возрастает стоимость производства, так как увеличивается количество стадий.

Другим путем получения пептидов с выраженной антиагрегантной активностью и сохранением цитопротективных свойств может быть модификация аминокислотного состава без изменения общего числа аминокислот. После скрининга полипептидных соединений были получены полипептидные соединения с аминокислотной последовательностью UEHLERALNSS (EP-11-1) и UEQLERALNTS (EP-11-3) обладающие антиагрегантной активностью. У последних полипептидная цепочка содержит такое же количество аминокислотных остатков, как и у исходного пептида, что является преимуществом. Однако, изменения аминокислотного состава приводит к изменению пространственного строения полипептида, что обуславливает как появление новых свойств, так и потерю старых. Поэтому полученные ранее данные позволяют сделать предположение о наличии у представленных полипептидных соединений цитопротективной активности, но не делают наличие ее для специалиста очевидной в явном виде.

Прототипом заявленного решения является способ увеличения выживаемости клеток человеческого эндотелия с помощью производных пептида рНВSP (QEQLERALNSS) с лабораторными шифрами 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 [Preclinical study of innovative peptides mimicking the tertiary structure of the α -helix B 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/rpharmacology.6.55385>]. В данном способе увеличение выживаемости клеток

человеческого эндотелия производится полипептидами с более длинной полипептидной цепочкой по отношению к исходному пептиду, а значит результаты не удовлетворительные.

Задачей изобретения является способ увеличения выживаемости клеток человеческого эндотелия, включающий использование полипептидов производных рНВSP с 11-членной аминокислотной последовательностью обладающих антиагрегантным действием.

Техническим результатом изобретения является эффективный способ увеличения выживаемости клеток человеческого эндотелия, включающий использование полипептидных соединений с аминокислотной последовательностью UEHLERALNSS и UEQLERALNTS.

Задача достигается тем, что перед внесением в культуральную среду перекиси водорода (H₂O₂), производили ее предварительную инкубацию с исследуемыми полипептидами с аминокислотной последовательностью: UEHLERALNSS и UEQLERALNTS в концентрациях 5 мкг/мл, 30 мкг/мл и 50 мкг/мл.

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

Исследование выполнено с применением первичной культуры клеток эндотелиоцитов человека (HUVEC) (Sigma-Aldrich (Merck)). Эндотелиальные клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 20мМ буфера HEPES, 5 ЕД/мл гепарина, 200 мкг/мл E CG F (Sigma-Aldrich), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ [Антипова Т.А., Николаев С.В., Крыжановский С.А., Пекельдина Е.С. Research of neuroprotective properties of TrkA-receptor agonist GK-2 on model of oxidative stress in human vascular endothelial cells (HUVEC) // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2019. – No 1. – С. 18–21. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10035].

Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты, покрытые желатином, с плотностью 5 тыс. клеток на лунку. Через 24 ч инкубации вносили исследуемые пептиды (EP-11-1, EP-11-3) в концентрациях 5 мкг/мл, 30 мкг/мл и 50 мкг/мл.

Через 3 часа после внесения пептидов в лунки планшета добавляли перекись водорода (H₂O₂) в конечной концентрации 200 мкМ. Спустя 24 ч культуральную среду, содержащую H₂O₂, заменяли на нормальную.

Жизнеспособность клеток измеряли с использованием МТТ-теста. Принцип метода основан на способности сукцинатдегидрогеназы, фермента мембраны митохондрий, восстанавливать желтую соль 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) до кристаллов формазана фиолетового цвета, накапливающихся в результате этой реакции в цитоплазме живых клеток. Таким образом, по интенсивности накопления кристаллов формазана в цитоплазме судили об уровне митохондриального дыхания клетки, что является показателем ее жизнеспособности. Количество образуемого формазана в клеточном монослое пропорционально соотносится с количеством живых клеток в исследуемом образце.

По окончании эксперимента среду отбирали, в лунки планшета добавляли раствор 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида (МТТ, Sigma) в PBS (Sigma), содержащем 0,9 мМ CaCl₂ и 0,5 мМ MgCl₂, из расчета 10 мг МТТ на лунку. После 4-часовой инкубации при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ планшет откручивали при 600g на центрифуге R4810 (Eppendorf, Германия). Супернатант аккуратно отсасывали.

Для растворения образовавшихся кристаллов формазана использовали ДМСО, 250

мкл/лунку. После полного растворения кристаллов 150 мкл, не затрагивая слой клеток на желатине, переносили в новый планшет. Оптическую плотность раствора формазана в ДМСО измеряли на спектрофотометре Multiscan EX при длине волны 570 нм. По изменению оптической плотности судили о цитопротекторной активности пептидов.

5 Оценку результатов теста МТТ проводили путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Количество жизнеспособных клеток высчитывали по формуле

$$N_{\text{ж}} = \text{AU опыт} / \text{AU контроль} * 100\%$$

10 Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные представлены в виде $m \pm s.d.$ Данные считались достоверными при $p \leq 0,05$.

ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

15 Для моделирования окислительного стресса использовали перекись водорода H₂O₂ (200 мкМ), которая согласно литературным данным стимулирует программируемую гибель клеток – апоптоз, сопровождающуюся рядом биохимических и морфологических изменений в клетке: конденсация хроматина, фрагментация ДНК, повышение проницаемости мембран, сжатие клетки [Mu P, Liu Q, Zheng R. Biphasic regulation of H₂O₂ on angiogenesis implicated NADPH oxidase. Cell Biology International. 2010;34(10):1013–1020].

20 При анализе оптической плотности среды, с культурой клеток HUVEC, на фоне оксидативного стресса и внесения изучаемых пептидов обнаружено, что оба исследуемые соединения обладают выраженным цитопротективным действием, статистически значимо увеличивая митохондриальную активность и выживаемость клеток в клеточной культуре (таблица 1).

Таблица 1

25 Значения оптической плотности раствора формазана в ДМСО в экспериментальных группах (единицы оптической плотности, AU, $M \pm m$, n=8)

Концентрация пептидов в культуре	5 мкг/мл	30 мкг/мл	50 мкг/мл
Наименование эксперимента			
HUVEC (контроль)	0,9251±0,061	0,8935±0,056	0,9063±0,072
HUVEC+H ₂ O ₂	0,3422±0,069	0,3205±0,044	0,3927±0,051
EP-11-1+ HUVEC+H ₂ O ₂	0,5472±0,39 [#]	0,6160±0,089 [#]	0,6452±0,025 [#]
EP-11-3+ HUVEC+H ₂ O ₂	0,6943±0,035 [#]	0,7264±0,038 [#]	0,7436±0,040 [#]

35 Примечание: # - при $p < 0,05$ при сравнении с HUVEC+H₂O₂.

На Фигуре представлено количество жизнеспособных клеток ($N_{\text{ж}}$) в экспериментальных группах с внесением инновационных пептидов в концентрациях 5, 30 и 50 мкг/мл.

40 Таким образом, предварительное добавление в культуральную среду пептида с аминокислотной последовательностью UEHLERALNSS (образец EP-11-1) или пептида с аминокислотной последовательностью UEQLERALNTS (образец EP-11-3) значительно увеличивало количество выживших клеток в условии оксидативного стресса.

(57) Формула изобретения

45 Способ увеличения выживаемости клеток человеческого эндотелия, включающий моделирование оксидативного стресса, отличающийся тем, что в культуральную среду добавляют пептид с аминокислотной последовательностью UEHLERALNSS или пептид с аминокислотной последовательностью UEQLERALNTS.

