

Корисна модель належить до галузі медицини та біотехнології і полягає в пригніченні внутрішньосудинного тромбоутворення шляхом інгібування полімеризації фібрину, сумішшю синтетичних пептидів структурних аналогів фрагментів суперспіральної області фібрин(оген)у; корисна модель може бути використана при створенні ефективного антитромботичного препарату.

Патологічна активація системи зсідання крові, яка призводить до внутрішньосудинного тромбоутворення шляхом появи фібрину в кров'яному руслі та його подальшої полімеризації з формуванням тривимірного каркасу тромбу, є основною причиною таких смертельно небезпечних захворювань, як гострий інфаркт міокарду, ішемічний інсульт, тромбоемболія легеневої артерії, тощо [1]. Тому пригнічення патологічного тромбоутворення є основною метою всіх існуючих антитромботичних засобів. Однак засобів, які б безпосередньо інгібували саме полімеризацію фібрину та формування тривимірного каркасу тромбу, існує небагато.

Відомо способи, які полягають в інгібуванні полімеризації фібрину низькомолекулярними сполуками [2-3]. Вказані способи мають ряд недоліків, а саме виготовлення сполук-інгібіторів шляхом хімічного синтезу передбачає використання вихідних сполук, а також появи сполук-інтермедіатів, які часто є токсичними та можуть у слідових кількостях знаходитись у кінцевому продукті. Сполуки, використані в таких способах, мають низьку специфічність до молекули фібрину, можуть бути афінними як до цільового протеїну (фібрину), так і до інших протеїнів крові, що буде заважати їх нормальному функціонуванню.

Відомо способи, які полягають в інгібуванні полімеризації фібрину моноклональними антитілами або Fab-фрагментами моноклональних антитіл, епітопи для яких перекриваються із сайтами полімеризації фібрину [4-6]. Основними недоліками таких способів є значна молекулярна маса моноклональних антитіл (150 кДа) та їх Fab-фрагментів (40-45 кДа), що обумовлює їхню потенційну імуногенність. Можливе індукування імунної відповіді суттєво ускладнює застосування Fab-фрагментів як антитромботичних засобів.

Відомо способи інгібування полімеризації фібрину поліпептидами, які мають афінність до тих ділянок молекули фібрину, що містять сайти його полімеризації та сайти міжмолекулярних взаємодій, що обумовлюють самоскладання молекул фібрину. Зокрема існують способи, у яких застосовуються окремі пептиди або нефракціонована суміш таких пептидів чи низькомолекулярних фрагментів, одержаних шляхом плазмінового гідролізу молекули фібрин(оген)у [7-9]. До недоліків таких способів належить, зокрема, використання фібриногену людини як джерела функціонально активних пептидів-інгібіторів, що є небезпечним через можливу контамінацію препаратів вірусами та пріонами. Також до недоліків застосування фрагментів фібрин(оген)у для інгібування полімеризації фібрину належить їхня потенційна імуногенність. Іншим важливим недоліком є складність стандартизації процесу одержання триптичних фрагментів фібриногену через велику кількість факторів, що впливають на процеси протеолізу та хроматографічного розділення сумішей.

Відомо способи, які передбачають використання синтетичних антитромботичних пептидів. Зокрема, застосування пептиду TKPRPGP дозволяє знизити інтенсивність тромбоутворення [10]. До недоліків цього способу належать заявлені ефекти пептиду на компоненти системи фібринолізу та тромбоцити, що утруднює контроль за ефективністю його застосування.

Відомо спосіб застосування пептиду GPRP та його кон'югатів, що дозволяє блокувати центр полімеризації "а", запобігаючи фібриноутворенню [11]. До недоліків такого способу належить здатність пептиду взаємодіяти не тільки з фібрином, але й з фібриногеном, концентрація якого в плазмі крові дуже висока (у нормі - 2-4 г/л), внаслідок чого для досягнення антиполімеризаційного ефекту необхідне застосування високих концентрацій пептиду або його кон'югатів.

Найближчим аналогом способу, що заявляється, є спосіб інгібування полімеризації фібрину пептидами, одержаними з D-фрагмента фібрину людини шляхом його гідролізу та подальшого хроматографічного очищення, зокрема пептидами, що містять амінокислотні послідовності: TRWYSMKKTTMKIIPFNRLTIGEGQQHNLGGAKQAGDV, QAGDV та X-QAGDV, де X є АК або К [12]. Вказаний спосіб має ряд недоліків, зокрема у ньому використовуються пептиди значної молекулярної маси, через що вони можуть бути імуногенними. Відсутні описані умови стандартизації препарату, створеного на основі суміші пептидів. Оскільки пептиди одержують із D-фрагменту людини, залишається ризик контамінації препарату вірусами та пріонами.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення ефективного безпечного способу інгібування полімеризації фібрину з використанням суміші низькомолекулярних неімуногенних пептидів відомого складу, яка ефективно інгібує формування тривимірної сітки фібрину - каркасу тромбу.

Поставлена задача вирішується шляхом застосування суміші пептидів - структурних аналогів окремих областей суперспірального регіону молекули фібриногену, які володіють синергічною інгібувальною дією на процеси полімеризації фібрину.

Приклад 1

Для підтвердження інгібувальної дії суміші пептидів визначають їхній ефект на полімеризацію фібрину в системі фібриноген-тромбін із використанням комбінації методів турбідиметрії та

електронної мікроскопії [13]. Пептиди, структурні аналоги фрагментів суперспіральної області молекули фібрин(оген)у, A α 91-103 MEILRGDFSSANN (1453 Da), B β 126-135 QKRQKQVKDN (1270 Da), γ 69-77 NPDESSKPN (986 Da) синтезують за стандартною методикою [14], характеризують за допомогою MALDI-TOF аналізу [15] та ліофільно висушують. Суміш цих пептидів, що не містять домішок, розчиняють у буферному розчині (pH 7,4) з 0,15 M NaCl. До лунки планшету вносять розчин суміші вказаних пептидів об'ємом 30 мкл (кінцева концентрація кожного становить 0,33 mM), донорську плазму крові людини (70 мкл), АЧТЧ-реагент (70 мкл) та інкубують протягом 3 хв при температурі 25 °C. Потім до лунки вносять 130 мкл розчину 25 mM CaCl₂ у 0,02 M HEPES буферному розчині (pH 7,4) із 0,15 M NaCl. Формування фібринового згустку фіксують за зміною мутності середовища інкубації на автоматичній системі вимірів у мікропланшетах за довжини хвилі 405 нм. Вимірювання проводять протягом 10 хв. Інгібування полімеризації фібрину фіксують за подовженням lag-періоду формування фібринового згустку - часу з моменту внесення до середовища інкубації розчину CaCl₂ до початку фази експоненційного зростання мутності середовища.

Внесення кожного з досліджуваних пептидів окремо призводить до подовження lag-періоду полімеризації в 1,3-1,4 рази (фіг. 1). Водночас синергічна дія трьох пептидів - структурних аналогів суперспіральної області молекули фібрин(оген)у (A α 91-103 MEILRGDFSSANN, B β 126-135 QKRQKQVKDN, γ 69-77 NPDESSKPN) викликає гальмування самоскладання фібрину та подовження lag-періоду полімеризації в 2-2,2 разу (фіг. 1).

Приклад 2

Дію суміші пептидів, структурних аналогів фрагментів суперспіральної області молекули фібрин(оген)у, A α 91-103 MEILRGDFSSANN, B β 126-135 QKRQKQVKDN, γ 69-77 NPDESSKPN на полімеризацію фібрину визначають методом трансмісійної електронної мікроскопії негативно контрастованих зразків [13]. Як негативний контрастер використовують 1 % водний розчин ураніацетату. Сітки для електронного мікроскопу вкривають шаром 0,3 % розчину формвару в дихлоретані та закріплюють розпиленням вуглецю за допомогою вакуумного випарювача. Для приготування зразків до стерильної скляної пробірки послідовно вносять 0,3 мг/мл фібриногену людини, 0,025 M CaCl₂ у 0,05 M амонійформіатному буферному розчині (pH 7,9), загальний об'єм проби 220 мкл. Полімеризацію фібрину ініціюють внесенням тромбіну до кінцевої концентрації 0,25 NIH/мл. Через 90 та 180 с із полімеризаційного середовища відбирають аліквати, які розводять до кінцевої концентрації фібриногену - 7 мкг/мл, розчин якого по 10 мкл переносять на вкриті вуглецем ґратки, які через 2 хв обробляють 1 % розчином ураніацетату. Після інкубації протягом 5 хв сітку промивають спочатку 100 mM амоніацетатним буферним розчином (pH 7,9), потім 10 mM амоніацетатним буферним розчином (pH 8,5). Далі сітку накладають на краплину контрастера, попередньо нанесену на поверхню тefлонового блоку й через 1 хв контрастер видаляють за допомогою водоструминного насосу. За допомогою електронного мікроскопу І-600 при 75 kV при збільшенні 20000-50000 одержують електронно-мікроскопічні зображення середовищ, у яких відбувається полімеризація фібрину: через 60 с після внесення тромбіну в контрольній пробі спостерігають формування протофібрил фібрину та їхню латеральну асоціацію (фіг. 2), через 180 с спостерігають зрілу фібрилу (фіг. 3), за присутності трьох пептидів, структурних аналогів фрагментів суперспіральної області молекули фібрин(оген)у, A α 91-103 MEILRGDFSSANN, B β 126-135 QKRQKQVKDN, γ 69-77 NPDESSKPN через 60 с протофібрил не виявляють (фіг. 4), через 180 с у цьому ж середовищі виявляють поодинокі протофібрили (фіг. 5), що свідчить про ефективне інгібування самоскладання фібрину досліджуваними пептидами за умов їхньої синергічної дії.

Таким чином, спосіб, що заявляється, дозволяє ефективно інгібувати полімеризацію фібрину за допомогою суміші синтетичних пептидів MEILRGDFSSANN, QKRQKQVKDN, NPDESSKPN - структурних аналогів фрагментів суперспірального регіону молекули фібрин(оген)у, які є субстанцією для створення нового ефективного антитромботичного препарату.

Спосіб, що заявляється, розроблено та апробовано в відділі структури і функції білка Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України.

Пояснення до креслень.

Фіг. 1. Подовження lag-періоду полімеризації фібрину в плазмі крові, активованої АЧТЧ-реагентом, за індивідуальної присутності пептидів (0,33 mM), які імітують фрагменти суперспіральної області фібрин(оген)у B β 125-135 (QKRQKQVKDN), A α 91-103 (MEILRGDFSSANN), γ 69-77 (NPDESSKPN), та еквімолярної суміші цих пептидів. К контроль за відсутності пептидів-інгібіторів.

Фіг. 2. Електронно-мікроскопічне зображення середовища, у якому відбувається полімеризація фібрину, за відсутності пептидів-інгібіторів, через 60 секунд після ініціації полімеризації фібрину тромбіном.

Фіг. 3. Електронно-мікроскопічне зображення середовища, у якому відбувається полімеризація фібрину, за відсутності пептидів-інгібіторів, через 180 секунд після ініціації полімеризації фібрину тромбіном.

Фіг. 4. Електронно-мікроскопічне зображення середовища, у якому відбувається полімеризація фібрину за присутності еквімолярної суміші пептидів, які імітують фрагменти суперспіральної області

фібрин(оген)у: B β 125-135 (QKRQKQVKDN), A α 91-103 (MEILRGDFSSANN) та γ 69-77 (NPDESSKPN) через 60 секунд після ініціації полімеризації фібрину тромбіном.

Фіг. 5. Електронно-мікроскопічне зображення середовища, у якому відбувається полімеризація фібрину за присутності еквімолярної суміші пептидів, які імітують фрагменти суперспіральної області фібрин(оген)у: B β 125-135 (QKRQKQVKDN), A α 91-103 (MEILRGDFSSANN) та γ 69-77 (NPDESSKPN) через 180 секунд після ініціації полімеризації фібрину тромбіном.

Джерела інформації:

1. Lugovskoy EV, Makogonenko EM, Komisarenko SV. Molecular mechanisms of formation and destruction of fibrin. Kiev: Naukova Dumka, 2013. 230 p.

2. Pat. US 90494A1. Apr. 11, 2013.

3. Pat. US 8906421 B2. Dec. 9, 2014.

4. Pat. RU 2152801 C2 20.07.2000.

5. Pat. EA 023477 Bl. 2016.06.30.

6. Pat. US 005487892 A. Jan. 30, 1996.

7. Pat. US 006413931 Bl. Jul. 2, 2000.

8. Pat. US9777054B2. 03.10.2017.

9. Pat. US5376631A. 27.12.1994.

10. Pat. RU 2290195 Cl. 27.12.2006.

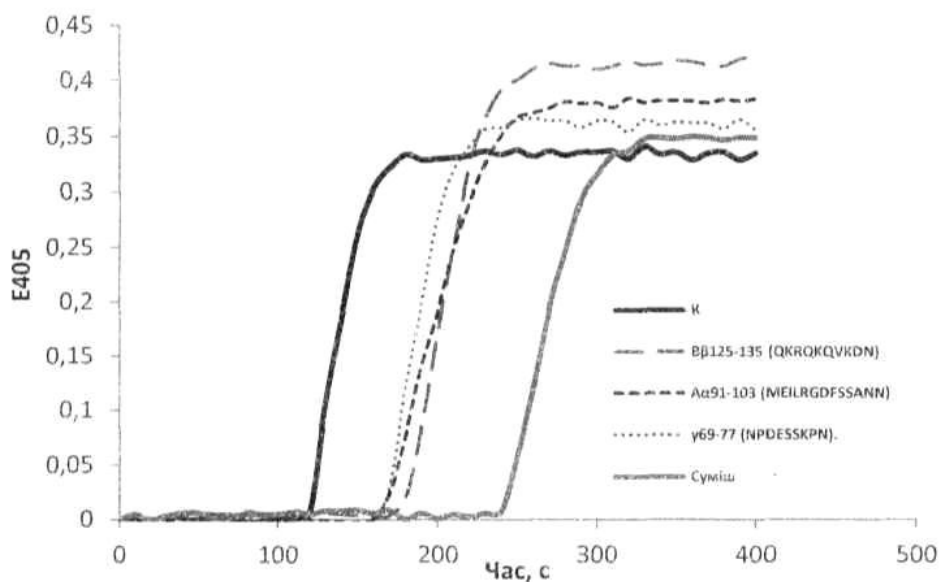
11. Pat. WO 2011/006069. 13.01.2011.

12. Pat. US4455290A. 19.06.1984.

13. Lugovskoy E.V., Gritsenko P.G., Kolesnikova I.N., Lugovskaya N.E., Komisarenko S.V. A neoantigenic determinant in coiled coil region of human fibrin beta-chain. Thromb Res. 2009; 123(5): 765-770.

14. Андреев СМ., Самойлова Н.А., Давидович Ю.А., Рогожин СВ. Полимерные реагенты в синтезе пептидов. Усп. хим., 1987; 56: 629-655.

15. Chapman J.R. Mass Spectrometry of Proteins and Peptides. Humana Press, 2000. 538.



Фіг. 1

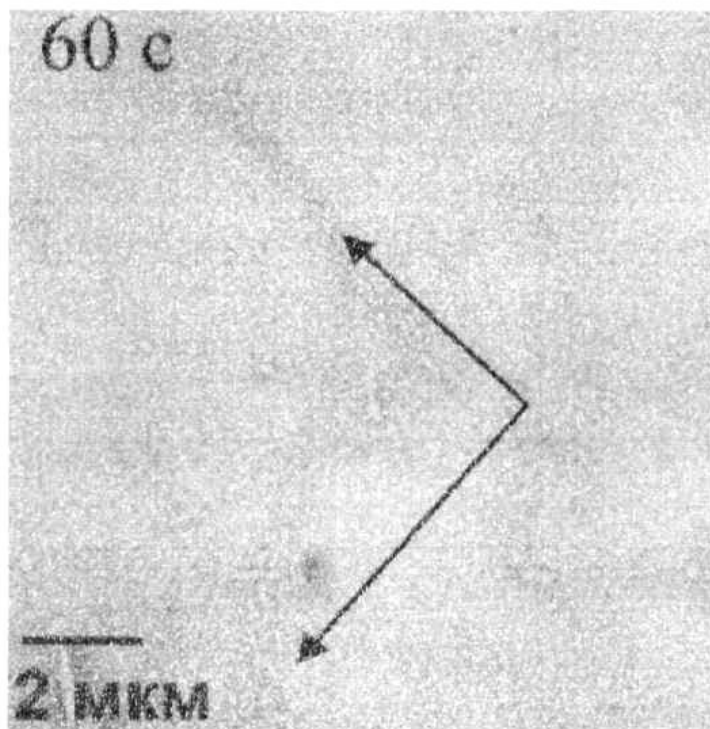


Fig. 2

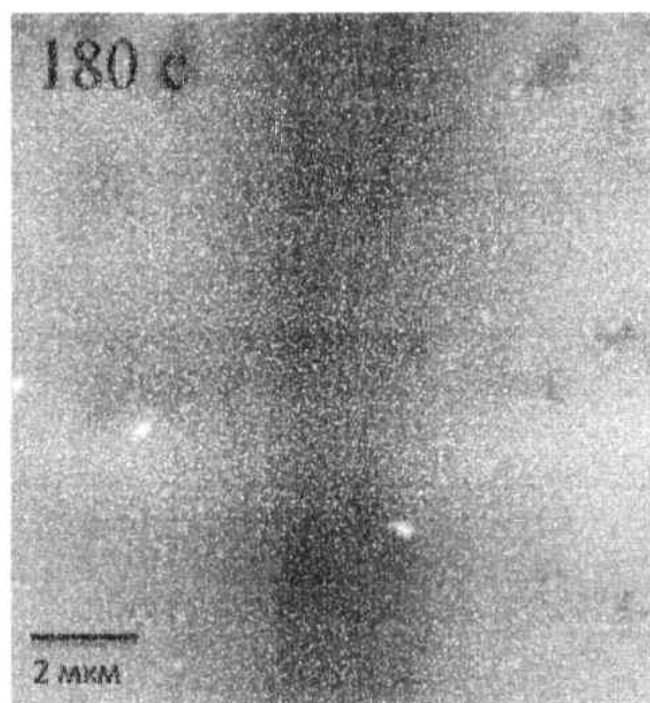


Fig. 3

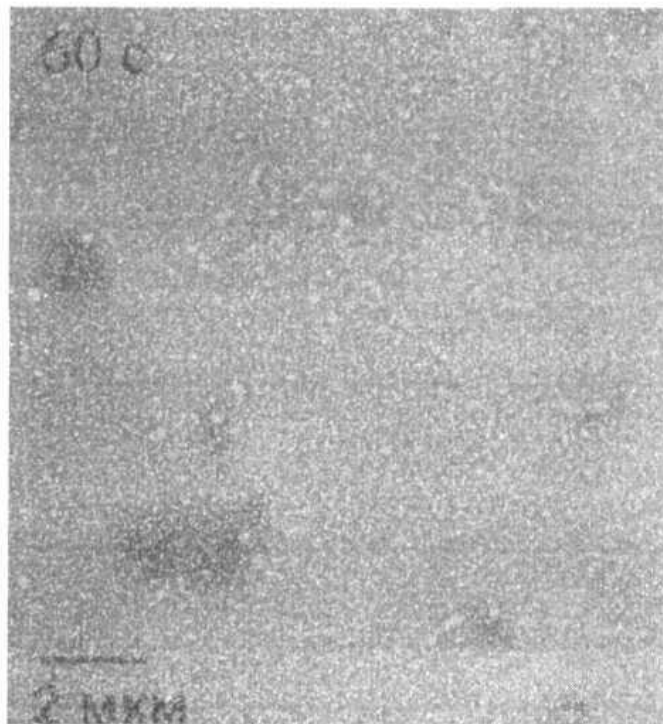


Fig. 4

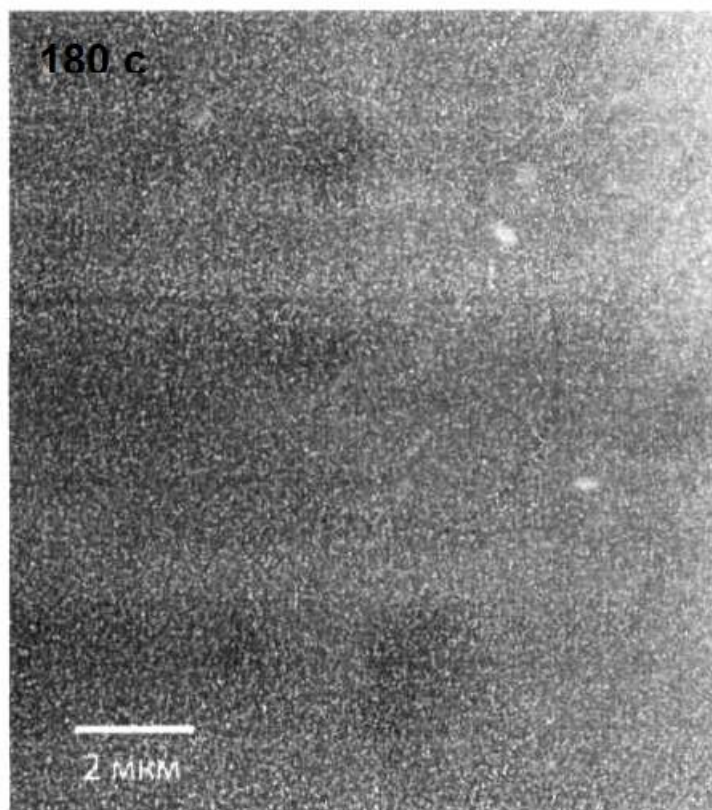


Fig. 5