



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/15 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017139879, 16.11.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.11.2017

Дата регистрации:
10.12.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.11.2017

(45) Опубликовано: 10.12.2018 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Даниленко Людмила Михайловна (RU),
Покровский Михаил Владимирович (RU),
Хаванский Анатолий Вячеславович (RU),
Кесарев Олег Георгиевич (RU),
Пересыпкина Анна Александровна (RU),
Бесхмельница Евгения Александровна
(RU),
Кочкарова Индира Султановна (RU),
Костина Дарья Александровна (RU),
Скачилова София Яковлевна (RU),
Пасенов Константин Николаевич (RU),
Бурда Юрий Евгеньевич (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 2315594 C1, 27.01.2008. WO
0062778 A1, 26.10.2000. КЛААН Н.К. и др.
Ядерный фактор Каппа В (NF-kB) в
качестве мишени для действия природных
противоопухолевых соединений. Российский
биотерапевтический журнал, N1-2014 с. 3-6.
ГОЛОВАЧ И.Ю. Ядерный фактор kB (NF-
kB) как важный патогенетический фактор
и новая мишень в лечении ревматических
(см. прод.)

(54) Способ ингибирования нуклеарного фактора каппа В с использованием 5-гидрокисиникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия в культуре клеток

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии, и может быть использовано для ингибирования нуклеарного фактора каппа В (NF-kB). Способ включает добавление бактериального липополисахарида в концентрации 1 мкг/мл к

свежевыделенным по стандартной методике на градиенте плотности фиколла мононуклеарным клеткам крови крыс Wistar, затем добавление к данной смеси 5-гидрокисиникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия, растворенного в фосфатно-солевом буфере, в

конечной концентрации 35 мкг/мл. Способ позволяет оценить ингибирующую NF-kB активность 5-гидроксиникотинат 3-(2,2,2-

триметилгидразиний) пропионата калия. 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

заболеваний. **Рациональна фармакотерапия**, 2012, N3 (24), с. 46-51.

R U 2 6 7 4 4 4 3 C 1

R U 2 6 7 4 4 4 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/15 (2006.01)

(21)(22) Application: **2017139879, 16.11.2017**

(24) Effective date for property rights:
16.11.2017

Registration date:
10.12.2018

Priority:

(22) Date of filing: **16.11.2017**

(45) Date of publication: **10.12.2018** Bull. № 34

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Danilenko Lyudmila Mikhajlovna (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Khavanskij Anatolij Vyacheslavovich (RU),
Kesarev Oleg Georgievich (RU),
Peresypkina Anna Aleksandrovna (RU),
Beskhmel'nitsina Evgeniya Aleksandrovna (RU),
Kochkarova Indira Sultanovna (RU),
Kostina Darya Aleksandrovna (RU),
Skachilova Sofiya Yakovlevna (RU),
Pasenov Konstantin Nikolaevich (RU),
Burda Yuriy Evgenevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD FOR INHIBITING NUCLEAR FACTOR KAPPA B WITH USE OF 5-HYDROXYNICOTINATE 3-(2,2,2-TRIMETHYLHYDRAZINIUM) POTASSIUM PROPIONATE IN CELL CULTURE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, in particular to experimental pharmacology, and can be used to inhibit the nuclear factor kappa B (NF-κB). This method involves the addition of bacterial lipopolysaccharide at a concentration of 1 mcg/ml to the mononuclear blood cells of Wistar rats freshly isolated by the standard method of velocity sedimentation on gradient of Ficoll, which is followed

by adding 5-hydroxynicotinate 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) potassium propionate, dissolved in phosphate-buffered saline, at a final concentration of 35 mcg/ml.

EFFECT: method allows to evaluate the inhibitory NF-κB activity of 5-hydroxynicotinate 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) potassium propionate.

1 cl, 1 tbl, 1 ex

C 1
2 6 7 4 4 3
R U

R U
2 6 7 4 4 3
C 1

Способ ингибирования нуклеарного фактора каппа В с использованием 5-гидроксисиникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия в культуре клеток

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии.

По известным литературным источникам – нуклеарный фактор каппа В (NF-κB) на
 5 сегодняшний день является одной из перспективных мишеней для разработки инновационных лекарственных средств в рамках развития современной фармакологии и формирования концепции таргетной терапии [Test system for evaluation of the influence of the biological activity of substances on the signal system of NF-κB: focus on the derivatives of 3 hydroxypyridine / Skachilova S.Y., Ragulina V.A., Kostina D.A., Burda Y.E. // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. – 2017. – Vol. 3, №2. – P. 50-56. doi: 10.18413/2313-8971-2017-3-2-50-56].

NF-κB является одним из факторов транскрипции. Повышенный интерес к изучению биологической роли данной сигнальной системы и вкладе её в развитие сердечно-сосудистых, онкологических и аутоиммунных заболеваний очевиден [Role of nuclear
 15 factor-κB activation in acute ischaemia-reperfusion injury in myocardium / A. Kis, D.M. Yellon, G.F. Baxter // British Journal of Pharmacology. – 2003. – 138(5). – P. 894-900, doi:10.1038/sj.bjp.0705108; Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. Lee JI, Burckart GJ. J Clin Pharmacol. 1998 Nov;38(11):981-93]. Целый ряд стимулов (провоспалительные цитокины: фактор некроза опухоли α, интерлейкин 1β; лиганд
 20 CD40 и др.), запускают канонический и неканонический пути активации сигнального пути NF-κB, что повышает экспрессию генов, регулирующих синтез цитокинов и хемокинов, пролиферацию и дифференцировку клеток, ангиогенез, иммунные реакции и апоптоз [Nuclear factor kappa B as a potential target for pharmacological correction endothelium-associated pathology / V.A. Ragulina, D.A. Kostina, A.P. Dovgan, Y.E. Burda, S.V. Nadezhdin // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. – 2017. – Vol. 3, №1 –
 25 P. 114-124. DOI: 10.18413/2500-235X-2017-3-1-114-124].

Как известно, 5- гидроксисиникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат калия обладает эндотелиопротекторной активностью (патент на изобретение RU 2467744,
 30 публ. 27.11.2012) и противоишемической активностью (патент на изобретение RU 2457202, публ. 27.02.2012).

Следует отметить актуальность изучения известного производного 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата, 5-гидроксисиникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия, в качестве ингибитора NF-κB in vitro с оценкой активности p65 субъединицы в мононуклеарных клетках (МНК) крови крыс линии Wistar,
 35 стимулированных бактериальным липополисахаридом.

Известен способ ингибирования NF-κB композициями тритерпенов (патент на изобретение RU 2288706, публ. 10.12.2006). Сущность его заключается в ингибировании воспаления путем обеспечения клетки монотерпеновыми композициями, которые ингибируют фактор NF-κB. Композиция может включать дополнительные химические
 40 функциональные агенты. Технический результат - повышение эффективности лечения воспалительных состояний, в частности предраковых.

Основным недостатком способа является то, что применяемые терапевтические дозы монотерпеновых/тритерпеновых соединений могут привести к значительным побочным эффектам или к другим неблагоприятным реакциям. У субъектов с далеко зашедшим
 45 заболеванием может наблюдаться определенная степень побочных эффектов при применении терапевтических доз монотерпеновых/тритерпеновых соединений.

Известно зависящее от концентрации влияние (R)- и (S)-флурбипрофена на активацию фактора транскрипции NF-κB в RAW-клетках (патент на изобретение RU 2250103, публ.

20.04.2005). Анализ гелюдерживания показывает, что липополисахарид (ЛПС) (1 мкг/мл) приводит к активации NF-κB (комплекс p50/p65 NF-κB). Микромолярные концентрации (R)-флурбипрофена были в состоянии ингибировать эту индуцированную ЛПС активацию NF-κB.

5 Изобретение относится к области фармации, а именно к применению (R)-энантиомеров арилпропионовых кислот. Сущность изобретения - применение названных кислот для получения лекарственных средств, которые ингибируют каскад активации NF-κB. На основе их создана композиция. Технический результат - использование для
10 лечения заболеваний, на которые может терапевтически положительно воздействовать ингибирование образования NF-κB.

Недостатком данного изобретения является то, что арилпропионовые кислоты и их производные обладают рядом побочных эффектов при их применении, а именно тошнота, анорексия, метеоризм, запор, изжога, диарея, НПВС-гастропатия, вплоть до эрозивно-язвенных поражений ЖКТ.

15 Наиболее близким к заявленному решению является способ ингибирования NF-κB с использованием производных 3-оксипиридина (Test system for evaluation of the influence of the biological activity of substances on the signal system of NF-κB: focus on the derivatives of 3hydroxypyridine / Skachilova S.Y., Ragulina V.A., Kostina D.A., Burda Y.E. // Research
20 result: pharmacology and clinical pharmacology. – 2017. – Vol. 3, №2. – P. 50-56), включающий добавление бактериального липополисахарида в концентрации 1 мкг/мл к свежевыделенным по стандартной методике на градиенте плотности фикола МНК
25 крови крыс Wistar, затем добавление к данной смеси исследуемого фармакологического агента, растворенного в фосфатно-солевом буфере, в соответствующей конечной концентрации, а в качестве фармакологического агента используют мексидол, этоксидол,
30 3-гидрокси-2-этил-6-метилпиридиния глутаминат, 3-гидрокси-2-этил-6-метилпиридиния аспарагинат, 3-гидрокси-2-этил-6-метилпиридиния 4-аминобензоат, 3-гидрокси-2-этил-6-метилпиридиния никотинат, 3-гидрокси-2-этил-6-метилпиридиния N-ацетиламиногексаноат, 3-гидрокси-2-этил-6-метилпиридиния N-ацетиламиноацетат, 3-гидрокси-2-этил-6-метилпиридиния N-ацетиламиноглутаминат, 3-гидрокси-2-этил-6-метилпиридиния ацетилсалицилат, бета-гидроксиникотиноилгидразон 2-метил-3-
35 гидроксид-4-формил-5-оксиметилпиридина дигидрохлорид. Наибольшей ингибирующей способностью на ЛПС-индуцированную экспрессию p65 NF-κB в МНК обладали мексидол, этоксидол и бета-гидроксиникотиноилгидразон 2-метил-3-гидрокси-4-формил-5-оксиметилпиридина дигидрохлорид.

Недостатком данного решения является то, что наблюдаемая ингибирующая
40 активность in vitro в отношении сигнального пути NF-κB мексидола, этоксидола и бета-гидроксиникотиноилгидразон 2-метил-3-гидрокси-4-формил-5-оксиметилпиридина дигидрохлорида не достигает целевых значений и более чем в 3,5 раза отличается от значений интактных крыс.

Задачей предлагаемого изобретения является создание эффективного способа
ингибирования нуклеарного фактора каппа В с использованием 5- гидроксиникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия в культуре мононуклеарных клеток
45 крови крыс Wistar.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ
ингибирования NF-κB с использованием 5- гидроксиникотинат 3-(2,2,2-
45 триметилгидразиний) пропионата калия, подтвержденный результатами оценки активности p65 субъединицы в МНК крови крыс Wistar, стимулированных бактериальным липополисахаридом, обладающий наиболее благоприятным профилем

безопасности по сравнению с рассмотренными аналогами и наиболее высокой ингибирующей активностью NF-κB по сравнению с прототипом.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ ингибирования нуклеарного фактора каппа В с использованием 5- гидроксиникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия в культуре клеток, включающий добавление бактериального липополисахарида в концентрации 1 мкг/мл к свежeweделенным по стандартной методике на градиенте плотности фиколла МНК крови крыс Wistar, затем добавление к данной смеси исследуемого фармакологического агента, растворенного в фосфатно-солевом буфере, в соответствующей конечной концентрации, отличающийся тем, что в качестве фармакологического агента используют 5- гидроксиникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат калия.

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что введение 5- гидроксиникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия, в исследуемой *in vitro* концентрации, 35 мкг/мл, приводит к выраженному ингибированию NF-κB в культуре клеток, что подтверждается результатами оценки активности р65 субъединицы в МНК крови крыс Wistar, стимулированных бактериальным липополисахаридом. Помимо этого, предлагаемый способ обладает наиболее благоприятным профилем безопасности по сравнению с рассмотренными аналогами и наиболее высокой ингибирующей активностью NF-κB по сравнению с прототипом.

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

При изучении ингибирующей активности в отношении NF-κB были исследованы 5- гидроксиникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат калия, Милдронат[®], Гриндекс АО, Латвия (препарат сравнения) и Мексидол[®], ФАРМАСОФТ НПК, Россия (препарат сравнения), которые добавляли к свежeweделенным по стандартной методике на градиенте плотности фиколла ($\rho = 1,077$, «Панэко», Россия) МНК крови крыс линии Wistar. Исследуемая *in vitro* концентрация каждого препарата составляет 35 мкг/мл.

В каждой экспериментальной группе 6 крыс, 3 самца и 3 самки. Для исследования взяты крысы без внешних признаков заболевания, прошедшие карантинный режим, массой 225-275 г.

Исследование активности NF-κB проводили в 2 мл пробирках типа Eppendorf (Gen Follower, Китай), куда вносили 1мл суспензии МНК крови крыс, 1×10^6 клеток в 1 мл среды RPMI-1640 («Панэко», Россия) с 5% сыворотки эмбрионов коров (HiClone, США), затем добавляли бактериальный липополисахарид («Пирогенал», ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия) в концентрации 1 мкг/мл, затем добавляли исследуемый препарат, растворенный в фосфатно-солевом буфере, в соответствующей конечной концентрации. Клетки инкубировали в течение 30 мин при 37°C на шейкере, после чего центрифугировали 5 мин при 200g, надосадочную жидкость удаляли, осадок МНК исследовали на активность р65 субъединицы NF-κB в строгом соответствии с инструкцией к набору NFκB р65 TotalMultispecies InstantOne™ ELISA Kit (Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, cat. 85-86081-11).

МНК крови крыс в количестве 1×10^6 лизировали в 1 мл лизирующего буфера, входящего в состав набора, супернатант вносили в лунки 96-луночного планшета из указанного ИФА набора. После нескольких этапов продукты сэндвич-реакции определяли на микропланшетном ридере Multiskan FC (Thermo Fisher, Германия) при 450 нм.

Для упрощения расчетов относительного влияния исследуемых веществ были выбраны единицы оптической плотности, непосредственно получаемые с микропланшетного ридера, округленные до 2-го знака после запятой. Статистическую

обработку результатов проводили в программе MS Excel 2013 с модулем Attestatv.13 с применением метода непараметрической статистики – критерия Крускала-Уоллиса, т.к. распределение активности p65 субъединицы NF-κB в клетках не являлось нормальным.

5 ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Результаты оценки ингибирующей NF-κB активности исследуемых препаратов представлены в табл. 1.

Таблица 1

10 Результаты сравнительного исследования ингибирующей NF-κB активности 5-гидроксииникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия, Милдроната[®] и Мексидола[®] (Медианы – Me и 1, 3 квартили – Q1; Q3)

Группа	Me	Q1; Q3
	ед. опг. пл.	
Интактные	0,17	0,16; 0,18
Контроль, ЛПС	2,22	1,79; 2,46
Милдронат [®] , 35 мкг/мл	0,51	0,50; 0,53
Мексидол [®] , 35 мкг/мл	0,78	0,68; 0,93
5- гидроксииникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат калия, 35 мкг/мл	0,48	0,47; 0,50

15 Как видно из табл. 1, наибольшей ингибирующей способностью на ЛПС-индуцированную экспрессию p65 NF-κB в МНК крови крыс Wistar в исследуемых концентрациях обладает 5- гидроксииникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионат калия. Ингибирующая активность NF-κB 5- гидроксииникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия в исследуемой конечной концентрации 35 мкг/мл выше на 38,5%, чем у Мексидола[®], 35 мкг/мл, и на 5,9% выше, чем у Милдроната[®], 35 мкг/мл, при индуцированной ЛПС активации NF-κB.

(57) Формула изобретения

30 Способ ингибирования нуклеарного фактора каппа В с использованием 5-гидроксииникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия в культуре клеток, включающий добавление бактериального липополисахарида в концентрации 1 мкг/мл к свежесыведенным по стандартной методике на градиенте плотности фиколла мононуклеарным клеткам крови крыс Wistar, затем добавление к данной смеси 5-гидроксииникотинат 3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата калия, растворенного в фосфатно-солевом буфере, в конечной концентрации 35 мкг/мл.

40

45