



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
G01N 33/48 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017139919, 16.11.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
16.11.2017

Дата регистрации:  
24.12.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.11.2017

(45) Опубликовано: 24.12.2018 Бюл. № 36

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),  
Тимохина Алена Сергеевна (RU),  
Кесарев Олег Георгиевич (RU),  
Пересыпкина Анна Александровна (RU),  
Мартынов Михаил Алексеевич (RU),  
Костина Дарья Александровна (RU),  
Скачилова София Яковлевна (RU),  
Жилинкова Людмила Анатольевна (RU),  
Бурда Юрий Евгеньевич (RU),  
Линник Марина Сергеевна (RU),  
Якушев Владимир Иванович (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 2288706 C2, 10.12.2006. RU  
2250103 C2, 20.04.2005. WO 2011137587 A1,  
10.11.2011. AHAD A., et al., Ellagic acid, an NF-  
κB inhibitor, ameliorates renal function in  
experimental diabetic nephropathy. Chem Biol  
Interact. 2014 Aug 5;219:64-75. doi: 10.1016/  
j.cbi.2014.05.011. Epub 2014 May 28.

(54) Способ ингибирования нуклеарного фактора каппа В с использованием 5-гидроксиникотината калия в культуре клеток

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и касается способа ингибирования нуклеарного фактора каппа В в культуре клеток, включающего добавление бактериального липополисахарида в концентрации 1 мкг/мл к свежeweделенным по стандартной методике на градиенте плотности фиколла мононуклеарным клеткам крови крыс

Wistar, затем добавление к данной смеси 5-гидроксиникотината калия, растворенного в фосфатно-солевом буфере, в конечной концентрации 35 мкг/мл. Изобретение обеспечивает эффективное ингибирование нуклеарного фактора каппа В. 1 табл., 1 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*G01N 33/48* (2006.01)

(21)(22) Application: **2017139919, 16.11.2017**

(24) Effective date for property rights:  
**16.11.2017**

Registration date:  
**24.12.2018**

Priority:

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

(45) Date of publication: **24.12.2018** Bull. № 36

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),  
Timokhina Alena Sergeevna (RU),  
Kesarev Oleg Georgievich (RU),  
Peresypkina Anna Aleksandrovna (RU),  
Martynov Mikhail Alekseevich (RU),  
Kostina Darya Aleksandrovna (RU),  
Skachilova Sofiya Yakovlevna (RU),  
Zhilinkova Lyudmila Anatolevna (RU),  
Burda Yuriy Evgenevich (RU),  
Linnik Marina Sergeevna (RU),  
Yakushev Vladimir Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD OF INHIBITING KAPPA NUCLEAR FACTOR WITH THE USE OF POTASSIUM 5-HYDROXYNICOTINATE IN A CELL CULTURE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine and relates to a method of inhibiting the nuclear factor kappa B in a cell culture, including the addition of bacterial lipopolysaccharide at a concentration of 1 mcg/ml to the freshly isolated by the standard method on a ficoll density gradient to mononuclear blood cells of Wistar

rats, then adding potassium 5-hydroxynicotinate dissolved in phosphate-buffered saline to a final concentration of 35 mcg/ml to this mixture.

EFFECT: invention provides effective inhibition of the nuclear factor kappa B.

1 cl, 1 tbl, 1 ex

RU 2 675 693 C1

RU 2 675 693 C1

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии.

По известным литературным источникам – нуклеарный фактор каппа В (NF-κB) на 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].

Семейство транскрипционного фактора NF-κB играет важную роль в жизненном цикле клетки, регулируя процессы пролиферации, апоптоза, воспаления, миграции клеток, ангиогенез, иммунного ответа и прочие [NF-κB transcription factor: a key player in the generation of immune response / P. Tripathi, A. Aggarwal // Current Science. – 2006. – 90 (4). – P. 519-531; NF-κB in aging and disease / J.S. Tilstra, C.L. Clauson, L.J. Niedernhofer [et al.] // Aging and Disease. – 2011. – 2(6). – P. 449-465]. С другой стороны, сигнальная система NF-κB при неадекватной стимуляции приводит к формированию порочных кругов и ключевых патогенетических звеньев развития сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе эндотелиальной дисфункции [Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice / R. Kobayasi, E.H. Akamine, A.P. Davel [et al.] // Journal of Hypertension. – 2010 – Vol. 28(10). – P. 2111–2119], заболеваний печени [Muriel, P. NF-κB in liver diseases: a target for drug therapy. / P. Muriel // J. Appl. Toxicol. – 2009. – № 29. – P. 91-100], поджелудочной железы [NF-κB in acute pancreatitis: Mechanisms and therapeutic potential / A. Jakkampudi [et al.] // Pancreatology. – 2016. – Vol. 16, № 4. – P.477-488], онкологических заболеваний [NF-κB, an active player in human cancers / Y. Xia, S. Shen and I.M. Verma // Cancer Immunol Res. – 2014. – 2 (9). – P. 823-830] и коморбидности.

Поэтому ингибирование патологической активации NF-κB и предупреждение формирования порочных кругов – ключевой вопрос современной фармакотерапии. В связи с этим, следует отметить актуальность изучения 5-гидроксиникотината калия в качестве ингибитора NF-κB in vitro с оценкой активности p65 субъединицы в моноклеарных клетках (МНК) крови крыс линии Wistar, 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 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 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 гелеудерживания 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.

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 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.

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 result: pharmacology and clinical pharmacology. – 2017. – Vol. 3, №2. – P. 50-56), включающий добавление бактериального липополисахарида в концентрации 1 мкг/мл к свежесыведенным по стандартной методике на градиенте плотности фикола 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 мексидол, этоксидол, 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-гидрокси-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 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-гидроксиникотината калия в культуре мононуклеарных клеток крови крыс Wistar.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ ингибирования NF-κB с использованием 5-гидроксиникотината калия, подтверждаемый 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-гидроксиникотината калия в культуре

клеток, включающий добавление бактериального липополисахарида в концентрации 1 мкг/мл к свежевыделенным 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, а в качестве фармакологического агента используют 5-гидроксиникотинат калия.

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что введение 5-гидроксиникотината калия, в исследуемой *in vitro* концентрации, 35 мкг/мл, приводит к выраженному ингибированию NF-κB в культуре клеток, что подтверждается результатами оценки активности p65 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 калия и Мексидол<sup>®</sup>, ФАРМАСОФТ НПК, Россия (препарат сравнения), которые добавляли к свежевыделенным 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 1 мл суспензии МНК крови крыс,  $1 \times 10^6$  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 p65 субъединицы NF-κB в строгом соответствии с инструкцией к набору NFκB p65 TotalMultispecies InstantOne™ ELISA Kit (Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, cat. 85-86081-11).

МНК крови крыс в количестве  $1 \times 10^6$  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.

#### ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Результаты оценки ингибирующей NF-κB активности исследуемых препаратов

представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты сравнительного исследования ингибирующей NF-κB активности 5-гидроксинокотината калия и Мексидола® (Медианы – Me и 1, 3 квартили – Q1; Q3)

Группа	Me	Q1; Q3
	ед. опт. пл.	
Интактные	0,17	0,16; 0,18
Контроль, ЛПС	2,22	1,79; 2,46
Мексидол®, 35 мкг/мл	0,78	0,68; 0,93
5-гидроксинокотинат калия, 35 мкг/мл	0,46	0,45; 0,50

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-гидроксинокотинат калия. Ингибирующая активность NF-κB 5-гидроксинокотината калия в исследуемой конечной концентрации 35 мкг/мл выше на 41%, чем у Мексидола® при индуцированной ЛПС активации NF-κB.

#### (57) Формула изобретения

Способ ингибирования нуклеарного фактора каппа В в культуре клеток, включающий добавление бактериального липополисахарида в концентрации 1 мкг/мл к свежесыведенным по стандартной методике на градиенте плотности фикола мононуклеарным клеткам крови крыс Wistar, затем добавление к данной смеси 5-гидроксинокотината калия, растворенного в фосфатно-солевом буфере, в конечной концентрации 35 мкг/мл.