



(51) МПК
G01N 33/15 (2006.01)
A61K 31/4412 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/15 (2018.08); *A61K 31/4412* (2018.08); *G01N 33/535* (2018.08); *G01N 2033/248* (2018.08); *G01N 2001/1031* (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2017139785, 15.11.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.11.2017

Дата регистрации:
10.10.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.11.2017

(45) Опубликовано: 10.10.2018 Бюл. № 28

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),
 Котельникова Алла Сергеевна (RU),
 Покровская Татьяна Григорьевна (RU),
 Пересыпкина Анна Александровна (RU),
 Бесхмельница Евгения Александровна
 (RU),
 Якушев Владимир Иванович (RU),
 Костина Дарья Александровна (RU),
 Скачилова София Яковлевна (RU),
 Шилова Елена Владимировна (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: SCACHILOVA SY. et al. Test
 system for the influence of the biological
 activity of substances on the signal system of
 NF-kB: focus on the derivatives of 3-
 hydroxypyridine. Research results:
 Pharmacology and Clinical Pharmacology.
 2017, том 3, выпуск N2, с.50-56. EA 20033 B1,
 29.08.2014. CN 106467546 A, 01.03.2017. WO
 2002/024679 A1, 28.03.2002. (см. прод.)

(54) Способ ингибирования нуклеарного фактора каппа В с использованием 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноата в культуре клеток

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии. Предложен способ ингибирования нуклеарного фактора каппа В в культуре клеток, включающий добавление бактериального липополисахарида в концентрации 1 мкг/мл к свежeweделенным по

стандартной методике на градиенте плотности фикола мононуклеарным клеткам крови крыс Wistar, отличающийся тем, что к данной смеси затем добавляют 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноат в конечной концентрации 35 мкг/мл. Технический

результат состоит в выраженном ингибировании нуклеарного фактора каппа В в культуре клеток и в благоприятном профиле безопасности. 1 табл.

(56) (продолжение):

MENCK K. et al. Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in teflon-coated culture bags. Journal of visualized experiments. September 2014; 91; e51554 pp.1-5.

R U 2 6 6 9 3 4 8 C 1

R U 2 6 6 9 3 4 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/15 (2006.01)
A61K 31/4412 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/15 (2018.08); *A61K 31/4412* (2018.08); *G01N 33/535* (2018.08); *G01N 2033/248* (2018.08); *G01N 2001/1031* (2018.08)

(21)(22) Application: **2017139785**, 15.11.2017(24) Effective date for property rights:
15.11.2017Registration date:
10.10.2018

Priority:

(22) Date of filing: 15.11.2017

(45) Date of publication: 10.10.2018 Bull. № 28

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

Danilenko Lyudmila Mikhajlovna (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Kotelnikova Alla Sergeevna (RU),
Pokrovskaya Tatyana Grigorevna (RU),
Peresypkina Anna Aleksandrovna (RU),
Beskhmel'nitsina Evgeniya Aleksandrovna (RU),
Yakushev Vladimir Ivanovich (RU),
Kostina Darya Aleksandrovna (RU),
Skachilova Sofiya Yakovlevna (RU),
Shilova Elena Vladimirovna (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 KAPPA B FACTOR WITH USING 2-ETHYL-6-METHYL-3-HYDROXYPYRIDINIUM L-2,6-DIAMINOHEXANOATE IN CULTURE OF CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, in particular to experimental pharmacology. Method is proposed for inhibiting the nuclear factor kappa B in a cell culture comprising adding a bacterial lipopolysaccharide at a concentration of 1 mcg/ml to a freshly isolated standard ficoll density gradient test for mononuclear blood cells of Wistar rats, characterized

in that 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium L-2,6-diaminohexanoate is then added to this mixture at a final concentration of 35 mcg/ml.

EFFECT: technical result consists in the expressed inhibition of the nuclear factor kappa B in the cell culture and in the favorable safety profile.

1 cl, 1 tbl

RU 2 669 348 C1

RU 2 669 348 C1

Способ ингибирования нуклеарного фактора каппа В с использованием 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноата 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
 10 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 вкладу 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
 JJ, 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.
 25 Nadezhdin // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. – 2017. – Vol. 3, №1 –
 P. 114-124. DOI: 10.18413/2500-235X-2017-3-1-114-124].

Потенциальными кандидатами, снижающими активность данного транскрипционного
 фактора являются производные 3-оксипиридина. В связи с вышесказанным следует
 30 отметить актуальность изучения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-
 диаминогексаноата 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
 35 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
 40 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
 45 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.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ ингибирования NF-κB с использованием 2-этил-6-метил-3-гидрокси-4-формил-5-оксиметилпиридиния L-2,6-диаминогексаноата, подтверждаемый результатами оценки активности p65 субъединицы в МНК крови крыс Wistar, стимулированных бактериальным липополисахаридом, обладающий более благоприятным профилем безопасности по сравнению с рассмотренными аналогами и более высокой ингибирующей активностью NF-κB по сравнению с прототипом.

Задачей предлагаемого изобретения является создание эффективного способа ингибирования нуклеарного фактора каппа В с использованием 2-этил-6-метил-3-гидрокси-4-формил-5-оксиметилпиридиния L-2,6-диаминогексаноата в культуре моноклеарных клеток крови крыс Wistar.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ ингибирования нуклеарного фактора каппа В с использованием 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноата в культуре клеток, включающий добавление бактериального липополисахарида в концентрации 1 мкг/мл к свежесыведенным 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 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноат.

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что введение нового производного 3-оксипиридина, 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноата, 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 более благоприятным профилем безопасности по сравнению с рассмотренными аналогами и более высокой ингибирующей активностью NF-κB по сравнению с прототипом.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНИЯ L-2,6-ДИАМИНОГЕКСАНОАТА

В трехгорлую колбу, снабженную мешалкой, термометром и обратным холодильником, загружают 30 мл этилового спирта. При перемешивании добавляют 2,74 г (0,02 м) 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина. После растворения добавляют постепенно 3,92 г (0,02 м) L-2,6-диаминогексановой кислоты. Массу нагревают до 75 °С, выдерживают при этой температуре в течение 1 часа, полученный раствор фильтруют. От фильтрата отгоняют растворитель, приливают к остатку 15 мл ацетонитрила, кристаллизуют при +5 °С в течение 8-10 часов. Кристаллы отделяют фильтрацией, сушат в вакууме при 35-40 °С, получают 5,4 г гигроскопичного мелкокристаллического вещества, растворимого в воде. C₁₄H₂₅N₃O₃

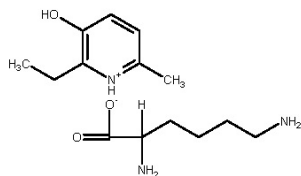
Найдено, % : С 59,21; Н 8,94; N 14,79

Вычислено, % : С 59,34; Н 8,89; N 14,83; O 16,94

ИК-спектр, ν см⁻¹: 3495 (ОН); 3370, 3285 (NH₂); 2560 (N+); 1645, 1610 (C=C); 1287 (CH₂)

УФ-спектр, нм: 231, 296 (0,001% раствор в воде)

ТСХ: система бензол-ацетон (2-3), пластины Merck, R_f – 0,43



2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния
L-2,6-диаминогексаноат

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНИЯ L-2,6-ДИАМИНОГЕКСАНОАТА

При изучении ингибирующей активности в отношении NF-κB были исследованы 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноат и мексидол (препарат сравнения), которые добавляли к свежесыведенным 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- κ B проводили в 2 мл пробирках типа Eppendorf (Gen Follower, Китай), куда вносили 1 мл 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 p65 субъединицы NF- κ B в строгом соответствии с инструкцией к набору NF κ B p65 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- κ B в клетках не являлось нормальным.

ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Результаты оценки ингибирующей NF- κ B активности исследуемых препаратов представлены в табл. 1 (Медианы – Me и 1, 3 квартили – Q1; Q3).

Таблица 1
Результаты сравнительного исследования ингибирующей NF- κ B активности 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноата и мексидола

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
2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноат, 35 мкг/мл	0,51	0,50; 0,53

Как видно из табл. 1, наибольшей ингибирующей способностью на ЛПС-индуцированную экспрессию p65 NF- κ B в МНК крови крыс Wistar в исследуемых концентрациях обладает 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноат. Ингибирующая активность NF- κ B 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноата выше на 34,6%, чем у препарата сравнения мексидола, в конечной

концентрации 35 мкг/мл при индуцированной ЛПС активации NF-κB.

(57) Формула изобретения

Способ ингибирования нуклеарного фактора каппа В в культуре клеток, включающий
5 добавление бактериального липополисахарида в концентрации 1 мкг/мл к
свежевыделенным по стандартной методике на градиенте плотности фиколла
мононуклеарным клеткам крови крыс Wistar, отличающийся тем, что к данной смеси
затем добавляют 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-2,6-диаминогексаноат в
конечной концентрации 35 мкг/мл.

10

15

20

25

30

35

40

45