

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043130**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.04.26

(21) Номер заявки

202190543

(22) Дата подачи заявки

2019.08.22

(51) Int. Cl. *C07K 5/037* (2006.01)*C07F 3/06* (2006.01)*A61K 38/05* (2006.01)*A61K 31/315* (2006.01)*A61P 17/00* (2006.01)*A61P 37/08* (2006.01)

---

**(54) ЦИНКОВЫЙ КОМПЛЕКС, ЕГО ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ТЕРАПИИ  
ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**


---

(31) 2018130491

(32) 2018.08.22

(33) RU

(43) 2021.05.12

(86) PCT/RU2019/050135

(87) WO 2020/040670 2020.02.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ  
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ЗЕТ  
ТЕРАПЕВТИКС" (RU)**

(72) Изобретатель:

**Небольсин Владимир Евгеньевич  
(RU)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

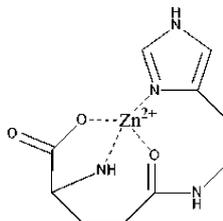
(56) RU-C1-2233152

MAAROUF M. et al. Topical micronutrients  
in atopic dermatitis-An evidence-based review,  
Dermatologic Therapy, 17.07.2018, e12659, doi:  
10.1111/dth. 12659, the abstract, section 4.3 Zinc

SCHILLING S. et al. Identification of Human  
Glutaminyl Cyclase as a Metalloenzyme. J. Biol.  
Chem., 2003, v. 278, no. 50, p. 49773-49779

RU-C2-2180842

(57) Изобретение относится к новому цинковому комплексу гамма-L-глутамилгистамина с соотношением цинк/гамма-L-глутамилгистамин 1/1 формулы



Комплекс по изобретению способствует восстановлению барьерных функций эпителиальной ткани и подавляет aberrантную активность клеток иммунной системы. Изобретение также относится к получению комплекса и применению указанного цинкового комплекса для терапии атопического дерматита и других заболеваний, ассоциированных с нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и развитием aberrантного воспалительного ответа. Изобретение также относится к применению полученного комплекса для ингибирования глутаминилциклазы. Данное изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим терапевтически эффективное количество соединения по изобретению.

**B1****043130****043130****B1**

### Область техники

Данное изобретение относится к новому цинковому комплексу гамма-L-глутамилгистамина, восстанавливающему барьерные функции эпителиальной ткани и подавляющему аберрантную активность клеток иммунной системы. Настоящее изобретение также относится к получению и применению указанного цинкового комплекса для терапии атопического дерматита и других заболеваний, ассоциированных с нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и развитием аберрантного воспалительного ответа.

### Уровень техники

Эпителиальный барьер играет важнейшую роль в организме человека и животных. Эпителиальный барьер предотвращает проникновение различных субстанций, аллергенов и бактерий во внутреннюю среду организма. Нарушение барьерных функций эпителиальной ткани вносит существенный вклад в патогенез целого ряда заболеваний, таких как воспалительные заболевания полости рта (стоматит, гингивит, фарингит т.д.), заболевания желудочно-кишечного тракта (колиты, энтериты, кишечная аутоинтоксикация, синдром раздраженного кишечника, синдром нарушенного всасывания, рецидивирующая диарея и др.), аллергические заболевания (аллергический ринит, бронхиальная астма, атопический дерматит и др.) [Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2015; 10(2):84-97; Current Pediatrics. 2013; 12(2):12-19; Bulletin of Siberian Medicine. 2017; 16(2):32-46]. Учитывая ключевую роль барьерных функций эпителиальной ткани в развитии воспалительных и аллергических заболеваний, стратегия, направленная на восстановления барьерных функций эпителиальной ткани, является первой линией терапии многих патологических состояний человека. В частности, ведущее значение в терапии атопического дерматита занимает наружная терапия, целью которой является восстановление поврежденного эпителия, улучшение барьерных функций кожи, гидратация кожных покровов, а также профилактика и устранение вторичного инфицирования [Pediatrics. 2014 Dec; 134(6):e1735-44].

Цинк является одним из ключевых микроэлементов, обеспечивающих сохранение барьерных функций кожи, а его противовоспалительные, антиоксидантные и антибактериальные свойства делают его одним из самых применяемых микроэлементов в дерматологии [FEMS Microbiol Lett. 2008 Feb; 279(1):71-76]. Цинк является неотъемлемым компонентом матриксных металлопротеиназ, контролируемых ремоделирование эпителия и играет ключевую роль в росте эпителиальных клеток, заживлении ран и сохранении барьерных функций кожи [Front Biosci (Landmark Ed). 2017 Mar 1; 22:1469-1492]. В недавних исследованиях было показано, что выраженность симптомов атопического дерматита отрицательно коррелирует с концентрацией цинка в эритроцитах пациентов [Postepy Dermatol Alergol. 2016 Oct; 33(5):349-352]. Более того, использование соединений цинка приводит к снижению выраженности симптоматики атопического дерматита в доклинических и клинических исследованиях [Biol. Trace Elem. Res. 2017 Sep; 179(1):110-116; Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. 2013 May 6; 6:115-21; Acta Derm Venereol. 2014 Sep; 94(5):558-62]. В моделях атопического дерматита на животных было показано, что применение соединений цинка восстанавливает толщину эпителиальных тканей и снижает выраженность локального воспаления кожных покровов [Dermatol. Ther. 2018 Jul 17; e12659].

Необходимо отметить, что нарушение барьерных функций эпителиальной ткани во многих случаях ассоциировано с развитием аберрантного воспалительного ответа, который, в свою очередь, индуцирует дальнейшее разрушение клеток и деградацию барьерных функций эпителия. Так, например, у пациентов с атопическим дерматитом нарушение барьерных функций кожи приводит к ее колонизации условно-патогенными бактериями, в том числе *S. Aureus* [Br. J. Dermatol. 1998 Dec; 139 Suppl. 53:13-6]. Бактериальное обсеменение кожи условно-патогенными микроорганизмами приводит к развитию избыточной воспалительной реакции и аберрантного хемотаксиса клеток иммунной системы (преимущественно лимфоцитов, эозинофилов, дендритных и тучных клеток), продуцирующих провоспалительные цитокины. Провоспалительные цитокины и активные формы кислорода, секретируемые клетками иммунной системы, индуцируют дальнейшую деградацию барьерных функций кожи и образование самоподдерживающейся положительной обратной связи, обеспечивающей переход заболевания в хроническую фазу [J. Clin. Diagn. Res. 2013 Dec; 7(12):2683-2685]. Таким образом, подавление аберрантной активности клеток иммунной системы за счет ингибирования их хемотаксиса может быть крайне востребовано для терапии атопического дерматита, а также других заболеваний человека и животных.

Хемокины семейства CCL (CCL2, CCL7, CCL8, CCL13) являются мощными факторами хемотаксиса моноцитов, макрофагов, эозинофилов, Т-лимфоцитов и дендритных клеток в организме млекопитающих [Biochem. J. 2012 Mar 1; 442(2):403-12; Postepy Dermatol. Alergol. 2014 May; 31(2):84-91]. Члены семейства CCL (CCL2, CCL7, CCL8, CCL13), фракталкин, а также ряд других гормонов и секретируемых белков содержат остаток пироглутаминовой кислоты (pE), роль которого заключается в защите от деградации аминопептидазами [Chem. Immunol. 1999; 72:42-56; Biochemistry. 1999 Oct 5; 38(40):13013-25]. Пироглутаминование N-концевого остатка катализируется ферментом глутаминилциклазой (QPCT или QC) [J. Biol. Chem. 2003 Dec 12; 278(50):49773-9; J. Mol. Biol. 2008 Jun 20; 379(5):966-80]. В ходе экспериментальных исследований было показано, что ингибирование глутаминилциклазы приводит к резкому снижению хемотаксиса и хемотаксисной активности непирироглутаминированных форм хемокинов CCL2, CCL7, CCL8 и CCL13 [Biochem. J. (2012), 442, 403-412] и фракталкина (Biosci. Rep. 2017 Aug 23; 37(4)). Таким

образом, пироглутаминирование хемокинов семейства CCL является необходимым этапом CCL-опосредованного хемотаксиса клеток иммунной системы, а стратегия, направленная на ингибирование глутаминилциклазы, является возможной стратегией модулирования aberrантного воспалительного ответа и снижения активности клеток иммунной системы.

К настоящему времени в литературе не описаны цинковые комплексы ингибиторов глутаминилциклазы, а также их получение и терапевтическое применение. В то же время известны ингибиторы глутаминилциклазы, включающие сульфолипиды [WO 2017/046256, опубл. 23.03.2017, HOCHSCHULE ANHALT, DE], производные флаваноидов [Bioorg. Med. Chem. 2016 May 15; 24(10):2280-6], производные, пиридина [US 2015/0291632, опубл. 15.10.2015, Dow AgroSciences LLC, US] и некоторые малые молекулы, описанные в недавних работах [J. Med. Chem. 2017 Mar 23; 60(6):2573-2590; WO 2014/193974, US 2015/0291557]. Также ингибиторы глутаминилциклазы описаны в публикациях компании Probiodrug Aktiengesellschaft [J. Biol. Chem. 2003 Dec 12; 278(50):49773-9]. В данной работе описаны ингибиторы глутаминилциклазы на основе производных имидазола. Однако в работах компании Probiodrug Aktiengesellschaft не описаны цинковые комплексы ингибиторов глутаминилциклазы, а в структурах соединений, опубликованных компанией Probiodrug Aktiengesellschaft, имидазол содержит алифатический заместитель по одному из атомов азота. Введение алифатического заместителя снижает метаболическую стабильность соединений. Кроме того, введение алифатического заместителя увеличивает гидрофобность соединений и повышает системную биодоступность соединений, что, по-видимому, излишне для терапии atopического дерматита и других заболеваний, ассоциированных с нарушением барьерных функций эпителиальной ткани.

На сегодняшний день неизвестно ни одного лекарственного средства на основе цинкового комплекса ингибитора глутаминилциклазы, который бы применяли в терапии atopического дерматита или других заболеваний, связанных с нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и/или aberrантной активностью клеток иммунной системы, поэтому сохраняется потребность в создании и внедрении для терапевтического применения новых эффективных лекарственных средств на основе цинковых комплексов ингибиторов глутаминилциклазы.

Задачей настоящего изобретения является разработка нового эффективного химического соединения, обладающего эффективностью в восстановлении барьерных функций эпителиальной ткани и ингибировании фермента глутаминилциклазы в терапии atopического дерматита или других заболеваний связанных с нарушением барьерных функций эпителия и aberrантной активностью клеток иммунной системы.

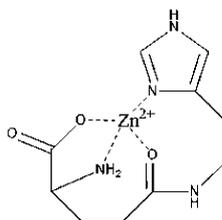
### Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является разработка нового лекарственного средства, эффективно для лечения заболеваний, связанных с нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и aberrантной активностью клеток иммунной системы, в особенности atopического дерматита, а также прочих заболеваний.

Техническим результатом данного изобретения является предоставление нового химического соединения, эффективно для лечения atopического дерматита, а также других заболеваний, связанных с нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и/или aberrантной активностью клеток иммунной системы.

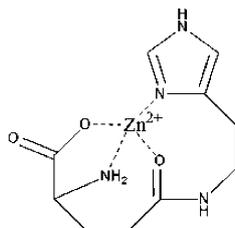
Указанный технический результат достигается путем предоставления соединения цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина (соотношение металл:лиганд = 1:1).

Основываясь на проведенных исследованиях, которые подробно описаны в настоящем документе, Заявитель предполагает, что структуру полученного комплекса можно описать следующей структурной формулой:



Указанный цинковый комплекс (соединение 1), или его гидрат, сольват, или фармацевтически приемлемая соль, является эффективным для лечения atopического дерматита, а также других заболеваний, связанных с нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и aberrантной активностью клеток иммунной системы.

В частности, в настоящем изобретении заявлен цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина формулы



или его фармацевтически приемлемая соль, в котором мольное соотношение цинк/гамма-L-глутамилгистамин составляет 1/1.

Также в настоящем изобретении заявлен способ получения цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина, включающий перемешивание смеси ацетата цинка и гамма-L-глутамилгистамина в полярном растворителе, выделение осадка продукта и сушку полученного продукта, который представляет собой цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина с соотношением цинк/гамма-L-глутамилгистами 1/1, где растворителем является метанол или вода, или их комбинации, где перемешивание смеси осуществляют при температуре от 15 до 50°C в случае использования метанола в качестве растворителя и при температуре от 15 до 90°C при использовании воды в качестве растворителя.

При этом в способе предпочтительно используют водный ацетат цинка, в частности двуводный ацетат цинка. Предпочтительно в способе перемешивание смеси осуществляют при температуре от 15 до 40°C в случае использования метанола в качестве растворителя.

Также объектом изобретения является цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина, который получают способом по изобретению.

Также объектом изобретения является цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина, в котором мольное соотношение цинк/гамма-L-глутамилгистамина составляет 1/1 и в котором в ИК-спектре твердого образца комплекса присутствуют полосы 1616, 1646 и 3276  $\text{cm}^{-1}$ , который предпочтительно получен перемешиванием эквимольной смеси ацетата цинка и гамма-L-глутамилгистамина в растворителе с последующим выделением комплекса в виде продукта.

Еще одним техническим результатом настоящего изобретения является применения полученного цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина (соединения 1) или его гидрата/сольвата для предупреждения и/или лечения атопического дерматита, а также других заболеваний, связанных с нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и aberrантной активностью клеток иммунной системы.

Еще одним техническим результатом настоящего изобретения является применение нового цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина, или его гидрата, сольвата, или фармацевтически приемлемой соли для получения фармацевтической композиции для предупреждения и/или лечения расстройства, связанного с aberrантной активностью клеток иммунной системы, в частности с aberrантным хемотаксисом клеток иммунной системы.

Кроме того, изобретение предусматривает фармацевтические композиции для предупреждения и/или лечения атопического дерматита, а также других заболеваний, связанных с нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и aberrантной активностью клеток иммунной системы и характеризующихся тем, что они содержат эффективное количество соединения по изобретению и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах воплощения изобретения вспомогательное вещество представляет собой фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

Изобретение также включает способ предупреждения и/или лечения атопического дерматита, а также других расстройств, связанных с нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и aberrантной активностью клеток иммунной системы в организме, включающий введение в указанный организм фармацевтической композиции по изобретению. В частных случаях воплощения изобретения организм представляет собой человека или животного.

Цинковые комплексы гамма-L-глутамилгистамина не описаны в уровне техники, однако известен псевдопептид гамма-L-глутамилгистамина, который был впервые выделен в следовых количествах из нервных тканей крысы и моллюска [J. Neurochem. 1976, vol. 27, p. 1461-1463; J. Neurochemistry. 1977, vol. 29, p. 633-638.]. Получение самого гамма-L-глутамилгистамина описано в патенте на изобретение RU 2141968, опубл. 27.11.1999. Использование крема на основе гамма-L-глутамилгистамина описано в патенте на изобретение RU 2233152, опубл. 27.07.2004.

#### Краткое описание фигур.

Фиг. 1. ИК-спектр образца псевдопептида гамма-L-глутамилгистамина (лиганда).

Фиг. 2. ИК-спектр образца продукта, полученного в результате смешивания раствора хлорида цинка и гамма-L-глутамилгистамина по примеру 1.

Фиг. 3. ИК-спектр образца цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина по примеру 2.

Фиг. 4. ИК-спектр образца цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина по примеру 3, синтез "А".

Фиг. 5. ИК-спектр образца цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина по примеру 3,

синтез "В".

Фиг. 6. Спектр ядерного магнитного резонанса  $^1\text{H}$  образца цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина по примеру 2.

Фиг. 7. Фармакологическое действие крема, содержащего соединение 1 (0.01%) на поражение кожи в модели атопического дерматита у мышей по данным гистологического анализа.

Фиг. 8. Гистологические срезы кожи пораженного уха мышей в модели атопического дерматита.

#### Подробное раскрытие изобретения

Как указано выше, цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина не был ранее описан в литературе, однако известен псевдопептид гамма-L-глутамилгистамин, который был впервые выделен в следовых количествах из нервных тканей крысы и моллюска [J. Neurochem. 1976, vol. 27, p. 1461-1463; J. Neurochemistry. 1977, vol. 29, p. 633-638]. Получение гамма-L-глутамилгистамина также описано в патенте на изобретение RU 2141968. В указанных работах описан гамма-L-глутамилгистамин, который представляет собой псевдопептид, обладающий антиоксидантным, антирадикальным, липидрегулирующим, гипогликемическим, антиастматическим, противовирусным, антибактериальным, противоопухолевым, противовоспалительным, антиметастатическим, адаптогенным действием, а также обладает способностью модулировать метаболизм арахидоновой кислоты, предупреждать проявления сахарного диабета, ожирения, ишемической болезни, стрессовых состояний, гепатита, цирроза, токсических поражений печени, алкоголизма, радиационных поражений, геронтологических изменений.

В то же время в указанных работах не приведены какие-либо данные о цинковых комплексах гамма-L-глутамилгистамина, методах их получения и исследования их биологической активности. При этом необходимо отметить, что цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина не может быть получен путем простого смешения солей цинка и гамма-L-глутамилгистамина, поскольку в данных условиях образуется смесь солей цинка и свободного гамма-L-глутамилгистамина.

Заявитель в ходе создания настоящего изобретения разработал способ получения устойчивого цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина с соотношением металл/лиганд 1/1 (соединения 1).

В ходе исследований специфической фармакологической активности полученного заявителем цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина (соединения 1) в модели атопического дерматита было показано, что соединение 1 обладает существенно большей терапевтической активностью, в сравнении со свободным лигандом гамма-L-глутамилгистамина. Нанесение на кожу соединения 1 (крем 0,01 мас.%) снижало до уровня интактных животных приток клеток воспаления (моноцитов, дендритных клеток, эозинофилов и нейтрофилов) в эпидермис и дерму кожи, а также уменьшало другие микроскопические проявления атопического дерматита. Таким образом, показано, что соединение 1 влияет на хемотаксис клеток иммунной системы. Снижение притока клеток иммунной системы может применяться в терапии целого ряда заболеваний, связанных с aberrантной активностью клеток иммунной системы.

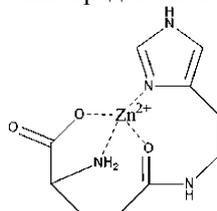
Исследования Заявителя показали, что наблюдаемый терапевтический эффект соединения 1 связан со способностью данного соединения ингибировать активность глутаминилциклазы.

Таким образом, соединение 1 (цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина с соотношением металл/лиганд 1/1) является новым химическим соединением, применимым для терапии атопического дерматита и других заболеваний, обусловленных нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и aberrантной активностью клеток иммунной системы.

#### Термины и определения

Термин "соединение I" относится к цинковому комплексу гамма-L-глутамилгистамина в соотношении металл:лиганд 1:1.

В частности, данный комплекс может быть представлен структурной формулой



или его фармацевтически приемлемой солью.

Термин "С", когда он используется со ссылкой на температуру, означает 100-градусную шкалу или температурную шкалу Цельсия.

Термин "IC<sub>50</sub>" означает концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование фермента.

Термин "сольват" используется для описания молекулярного комплекса, содержащего соединение по изобретению и одну или более молекул фармацевтически приемлемого растворителя, например этанола.

Термин "гидрат" используется, когда указанным растворителем является вода.

Термин "aberrантная активность" клеток иммунной системы в настоящем документе означает активность, существенно отличающуюся от базового уровня активности клеток иммунной системы в орга-

низме при отсутствии патологии. Аберрантная активность может быть вызвана избыточным притоком клеток иммунной системы к органу или ткани, нарушением процессов, приводящих к активации клеток иммунной системы, дерегулированием процессов связанных с гибелью клеток иммунной системы, а также другими факторами.

Термин "вспомогательное вещество" означает любое фармацевтически приемлемое вещество неорганического или органического происхождения, входящее в состав лекарственного препарата или используемое в процессе производства, изготовления лекарственного препарата для придания ему необходимых физико-химических свойств.

Термин "глутаминилциклаза" означает фермент аминоксилтрансферазу, участвующую в преобразовании N-концевого глутамин в пироглутамин в различных пептидных субстратах. Образование N-концевого пироглутамата защищает биологически активные пептиды, гормоны и хемокины (например, тиреотропин-высвобождающий гормон,  $\beta$ -хемокиновый лиганд-2) от деградации экзопептидазами и в некоторых случаях может увеличивать аффинность лигандов к их рецепторам.

Термин "хемотаксис" означает направленное движение клеток в ответ на химический раздражитель. В основе хемотаксиса лежит способность клетки отвечать на градиент концентрации хемотаксического медиатора. Хемотаксис является тем процессом, благодаря которому клетки иммунной системы покидают сосудистое русло и мигрируют в поврежденную ткань. Ведущую роль в хемотаксисе играют хемотаксические вещества (хемоаттрактанты. Одним из наиболее мощных хемоаттрактантов для моноцитов и макрофагов является хемокин CCL2.

Термины "лечение", "терапия" охватывают лечение патологических состояний у млекопитающих, предпочтительно у человека, и включают а) снижение, б) блокирование (приостановку) течения заболевания, в) облегчение тяжести заболевания, т.е. индукцию регрессии заболевания, г) реверсирование заболевания или состояния, к которому данный термин применяется, или одного или более симптомов данного заболевания или состояния.

Термин "профилактика", "предотвращение" охватывает устранение факторов риска, а также профилактическое лечение субклинических стадий заболевания у млекопитающих, предпочтительно у человека, направленное на уменьшение вероятности возникновения клинических стадий заболевания. Пациенты для профилактической терапии отбираются на основе факторов, которые на основании известных данных влекут увеличение риска возникновения клинических стадий заболевания по сравнению с общим населением. К профилактической терапии относится а) первичная профилактика и б) вторичная профилактика. Первичная профилактика определяется как профилактическое лечение у пациентов, клиническая стадия заболевания у которых еще не наступила. Вторичная профилактика - это предотвращение повторного наступления того же или близкого клинического состояния заболевания.

Соединение I, являющееся предметом данного изобретения, перспективно для лечения заболеваний, связанных с нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и аберрантной активностью клеток иммунной системы, в особенности заболеваний, связанных с аберрантным хемотаксисом клеток иммунной системы, предпочтительно терапии атопического дерматита. В некоторых частных вариантах соединение по изобретению может быть использовано для лечения других заболеваний, обусловленных нарушением барьерных функций эпителиальной ткани и аберрантной активностью клеток иммунной системы.

Способ терапевтического применения соединения.

Предмет данного изобретения также включает введение субъекту, нуждающемуся в соответствующем лечении, терапевтически эффективного количества соединения по изобретению. Под терапевтически эффективным количеством подразумевается такое количество соединения, вводимого или доставляемого пациенту, при котором у пациента с наибольшей вероятностью проявится желаемая реакция на лечение (профилактику). Точное требуемое количество может меняться от субъекта к субъекту в зависимости от возраста, массы тела и общего состояния пациента, тяжести заболевания, методики введения препарата, комбинированного лечения с другими препаратами и т.п.

Соединение по изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая соединение, может быть введено в организм пациента в любом количестве и любым путем введения (предпочтителен топический путь введения), эффективным для лечения или профилактики заболевания.

После смешения лекарственного препарата с конкретным подходящим фармацевтически допустимым носителем в желаемой дозировке композиции, составляющие суть изобретения, могут быть введены в организм человека или других животных местно и т.п.

Введение может осуществляться как разово, так и несколько раз в день, неделю (или любой другой временной интервал) или время от времени. Кроме того, соединение может вводиться в организм пациента ежедневно в течение определенного периода дней (например, 2-10 дней), а затем следует период без приема вещества (например, 1-30 дней).

В том случае, когда соединение по изобретению используется как часть режима комбинированной терапии, дозу каждого из компонентов комбинированной терапии вводят в течение требуемого периода лечения. Активные ингредиенты, составляющие комбинированную терапию, могут вводиться в организм пациента как одновременно, в виде дозировки, содержащей все компоненты, так и в виде индивидуаль-

ных дозировок компонентов.

Фармацевтические композиции.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат соединение по изобретению (или пролекарственную форму или другое фармацевтически приемлемое производное) и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, адъювантов, растворителей и/или наполнителей, таких, которые могут быть введены в организм пациента совместно с соединением, составляющим суть данного изобретения, и которые не влияют на фармакологическую активность этого соединения и являются нетоксичными при введении в дозах, достаточных для доставки терапевтического количества соединения.

Изобретение относится также к способу получения цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина, включающему перемешивание смеси ацетата цинка и гамма-L-глутамилгистамина в полярном растворителе, предпочтительно в полярном растворителе, выделение осадка продукта и сушку полученного продукта, который представляет собой цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина с соотношением металл/лиганд 1/1. Предпочтительными растворителями являются метанол или вода, или их комбинации. В рамках способа предпочтительно используют водный ацетат цинка, в частности диводный ацетат цинка. Перемешивание смеси осуществляют при температуре от 15 до 50°C, предпочтительно от 15 до 40°C, в случае использования метанола в качестве растворителя и при температуре от 15 до 90°C при использовании воды в качестве растворителя.

Соединение по изобретению может быть использовано в качестве фармацевтически приемлемой соли. В частности, могут быть получены хорошо известные специалисту в данной области аддитивные соли органических и неорганических кислот, например хлоргидрат или ацетат.

Фармацевтические композиции согласно данному изобретению содержат соединение данного изобретения совместно с фармацевтически приемлемыми носителями, которые могут включать в себя любые известные специалисту в данной области растворители, разбавители, дисперсии или суспензии, поверхностно-активные вещества, изотонические агенты, загустители и эмульгаторы, консерванты, вяжущие вещества, скользящие материалы и т.д., подходящие для конкретной формы дозирования. Приемлемые материалы, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают, моно- и олигосахаридами, а также их производными; желатин; тальк; эксципиенты, такие как какао-масло и воск для суппозитория; масла, такие как арахисовое, хлопковое, сафроловое, кунжутное, оливковое, кукурузное и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; сложные эфиры, такие как этиллаурат и этиллаурат; агар; буферные вещества, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический раствор, раствор Рингера; этиловый спирт и фосфатные буферные растворы. Также в составе композиции могут быть другие нетоксичные совместимые скользящие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, пленкообразователи, подсластители, вкусовые добавки и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты.

Предметом данного изобретения являются также лекарственные формы - класс фармацевтических композиций, состав которых оптимизирован для определенного пути введения в организм в терапевтически эффективной дозе, например для введения в организм местно.

Лекарственные формы данного изобретения могут содержать составы, полученные методами использования липосом, методами микрокапсулирования, методами приготовления наночастиц препарата или другими методами, известными в фармацевтике.

Для обеспечения топического введения могут использоваться известные специалисту формы, такие как мази, крема и суспензии, которые содержат фармакологически совместимые агенты, например пропиленгликоль или бутиленгликоль.

Примеры фармацевтических композиций.

Вещество, описанное в данном изобретении, может быть использовано для профилактики и/или лечения болезней человека или животных в виде следующих составов.

Мазь, мл:

активный ингредиент - 40 мг;

этанол - 300 мкл;

вода - 300 мкл;

1-додecilазациклопептанон - 50 мкл;

пропиленгликоль до 1 мл.

Крем I, мас. %:

активный ингредиент - 0,005-0,5;

масляный компонент - 10,0-15,0;

стеарин косметический - 2,0-3,0;

эмульгатор - 1,0-3,0;

эмульсионный воск - 1,0-3,0;

триэтаноламин - 0,1-0,6;

витамин А - 0,003-0,05;

глицерин дистиллированный - 2,0-3,0;

антиоксидант - 0,05-0,075;  
 консервант - 0,15-0,25;  
 масло чайного дерева - 0,3-0,5;  
 вода очищенная питьевая - до 100%.

Крем II, мас. %:

активный ингредиент - 0,01;  
 масло растительное - 15,0;  
 стеарин косметический - 0,75;  
 эмульгатор ПГ-3 - 2,25;  
 эмульсионный воск - 2,25;  
 триэтаноламин - 0,1;  
 витамин А - 0,028;  
 сорбитол - 2,0-3,0;  
 витамин Е - 1,5;  
 мономульс 90-018 - 0,75;  
 нипазол - 0,2;  
 нипагин - 0,3;  
 масло чайного дерева - 0,3-0,5;  
 вода очищенная питьевая - до 100%.

Крем III, мас. %:

активный ингредиент - 0,1;  
 масло растительное - 15,0;  
 стеарин косметический - 0,75;  
 эмульгатор ПГ-3 - 2,25;  
 эмульсионный воск - 2,25;  
 триэтаноламин - 0,1;  
 витамин А - 0,028;  
 сорбитол - 2,0-3,0;  
 витамин Е - 1,5;  
 мономульс 90-018 - 0,75;  
 нипазол - 0,2;  
 нипагин - 0,3;  
 масло чайного дерева - 0,3-0,5;  
 вода очищенная питьевая до 100%.

Крем IV, мас. %:

активный ингредиент - 0,3;  
 масло растительное - 15,0;  
 стеарин косметический - 0,75;  
 эмульгатор ПГ-3 - 2,25;  
 эмульсионный воск - 2,25;  
 триэтаноламин - 0,1;  
 витамин А - 0,028;  
 сорбитол - 2,0-3,0;  
 витамин Е - 1,5;  
 мономульс 90-018 - 0,75;  
 нипазол - 0,2;  
 нипагин - 0,3;  
 масло чайного дерева - 0,3-0,5;  
 вода очищенная питьевая - до 100%.

В случае использования крема предпочтительным масляным компонентом является масло растительное, минеральное или их смесь. Растительным маслом может быть оливковое, подсолнечное масло или их смесь. Минеральным маслом может быть вазелиновое масло. В качестве эмульгатора могут использоваться полиэферы ненасыщенных жирных кислот с глицерином (эмульгатор ПГ-3). Витамин А может присутствовать в виде ретинола пальмитата. Предпочтительным антиоксидантом является токоферола ацетат, а консервантом - по меньшей мере один низший алкиловый эфир параоксibenзойной кислоты, например метиловый или пропиловый эфиры.

Данные составы могут быть приготовлены в соответствии со стандартными фармацевтическими методиками.

Применение соединения I в комбинированной терапии.

Несмотря на то что соединение I по данному изобретению может вводиться в качестве индивидуального активного ингредиента, его также можно использовать в сочетании с одним или несколькими другими агентами, в частности другой агент может представлять собой антибиотик, НПВС (нестероид-

ное противовоспалительное средство) или другое противовоспалительное средство, глюкокортикостероид, ингибитор кальциневрина, антигистаминный препарат, мембраностабилизирующий препарат, иммуностропное средство и т.д. При совместном приеме терапевтические агенты могут представлять собой разные лекарственные формы, которые вводятся одновременно или последовательно в разное время, либо терапевтические агенты могут быть объединены в одну лекарственную форму.

Фраза "комбинированная терапия" в отношении соединения данного изобретения в сочетании с другими фармацевтическими агентами означает одновременный или последовательный прием всех агентов, который так или иначе обеспечит благоприятное воздействие сочетания лекарств. Совместное введение подразумевает, в частности, совместную доставку, например, в одной мази, креме, таблетке, капсуле, инъекции или в другой форме, имеющей фиксированное соотношение активных веществ, так же как и одновременную доставку в нескольких, отдельных лекарственных формах для каждого соединения соответственно.

Таким образом, введение соединения по данному изобретению может быть осуществлено в сочетании с дополнительными методами лечения, известными специалистам в области профилактики и лечения соответствующих заболеваний, включающими применение антибактериальных, цитостатических и цитотоксических препаратов, препаратов для подавления симптомов или побочных эффектов одного из лекарственных средств.

Если лекарственная форма представляет собой дозированную форму, такая комбинация использует соединение данного изобретения в приемлемом дозовом диапазоне. Соединение I по данному изобретению также может быть введено в организм пациента последовательно с другими агентами в том случае, когда комбинация этих препаратов невозможна. Изобретение не ограничено последовательностью введения; соединение данного изобретения может быть введено в организм пациента совместно, до или после введения другого препарата.

#### Примеры осуществления изобретения

Элементный анализ образцов.

Исследования элементного состава образцов были проведены с использованием элементного анализатора multi EA 5000, Analytik Jena. Для проведения анализа навеску образца массой около 20 мг (точная навеска) помещали в ячейку автосамплера. После заполнения прибора инертным газом (гелием) вводили 10 см<sup>3</sup> кислорода, очищенного от азота, углерода и влаги, и сжигали исследуемый образец при температуре ~1000°C. Для удаления избытка кислорода продукты сгорания пропускали над металлической медью при температуре 750°C. Далее смесь газов (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O) пропускали через адсорбционную ловушку для сбора влаги и определения количества водорода. Затем смесь азота и оксида углерода подавалась в газохроматографическую колонку и разделялась на компоненты, которые потоком газа-носителя переносились на хемилюминесцентный детектор CLD (для анализа содержания азота, в газовой смеси) и ИК-детектор NDIR (для анализа содержания оксида углерода в газовой смеси). Расчет содержания каждого из определяемых элементов в исследуемом образце проводился с помощью автономного программного обеспечения multiWin.

ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре IFS-113v Bruker в интервале 4000-400 см<sup>-1</sup> с разрешением 1 см<sup>-1</sup>. Для приготовления образцов цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина растирали с KBr (5 мг вещества на 100 мг KBr), прессовали в таблетки и использовали для записи спектра.

Пример 1 (не по изобретению). Смешивание хлорида цинка с гамма-L-глутамилгистамином.

Данный пример доказывает, что цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина не может быть получен путем простого смешения солей цинка и гамма-L-глутамилгистамина, поскольку в данных условиях образуется смесь солей цинка и свободного гамма-L-глутамилгистамина. Так, например, смешение водного раствора хлорида цинка с гамма-L-глутамилгистамином в соотношении 1:2 и высаживание образовавшегося продукта добавлением водного аммиака (до слабощелочной реакции среды) приводят к образованию белого кристаллического вещества. Данные элементного анализа (см. табл. 1), хоть и близки к расчетным значениям для комплексного соединения, однако не могут рассматриваться в качестве свидетельства образования комплексов. Заниженное содержание углерода и азота в образцах свидетельствует о вероятном образовании гидроксида цинка, который частично теряет воду в процессе проведения анализа, что и приводит к заниженным значениям прочих элементов. Повторный элементный анализ комплексов после дополнительной промывки холодной водой приводит к еще большему завышению количества водорода в образцах.

Таблица 1  
Данные элементного анализа образца выделенного из реакции хлорида цинка с гамма-L-глутамилгистамином

	C	H	N
Найдено (до обработки водой)	40.12	5.81	18.61
Найдено (после обработки водой)	39.62	5.99	18.03
Вычислено	44.17	5.56	20.60

Далее, согласно данным ИК-спектроскопии ИК-спектры исходного гамма-L-глутамилгистамина и

продукта смешивания совпадают (см. фиг. 1 и 2). Отсутствие сдвигов и совпадение относительной интенсивности полос поглощения C=O, -OH и -NH групп свидетельствуют о том, что при смешивании хлорида цинка и гамма-L-глутамилгистамина был выделен исходный гамма-L-глутамилгистамин, а цинк выделяется в форме неорганического соединения.

Пример 2. Получение цинкового комплекса по изобретению (метод № 1).

Заявителем в ходе дальнейших исследований была разработана методика получения цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина, включающая использование водного ацетата цинка.

2,20 г (0,01 моль)  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  растворяют в 20 мл метанола и приливают по каплям при интенсивном перемешивании к раствору 2,40 г (0,01 моль) гамма-L-глутамилгистамина и 1,08 г (0,02 моль) свежеприготовленного метилата натрия в 50 мл метанола при комнатной температуре. После того как приблизительно половина объема раствора ацетата цинка добавлена, наблюдают образование белого осадка. После прибавления всего раствора ацетата цинка перемешивание продолжают около 4 ч, продукт отфильтровывают, промывают водой (4×10 мл) и сушат в вакууме при 65°C до постоянной массы. Выход 2.67 г (88%).

Были выполнены два повторения данной методики осуществления способа и из каждого повторения получили образец для элементного анализа. Согласно анализу данных элементного анализа указанных двух образцов в результате осуществления способа образуется цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина с мольным соотношением гамма-L-глутамилгистамин/цинк - 1/1 (см. табл. 2).

Таблица 2

Данные элементного анализа образца, выделенного из реакционной смеси ацетата цинка с гамма-L-глутамилгистамином

	C	H	N
Найдено1	39.17	4.73	18.02
Найдено2	37.26	4.80	18.110
Вычислено	39.56	4.65	18.45

Также для подтверждения состава комплекса и полученного соотношения металл/лиганд проводили комплексонометрическое титрование цинка. Для определения содержания цинка осуществляли минерализацию продукта: навеску продукта массой ~70 мг нагревали с пятикратным количеством концентрированной серной кислоты до полного обугливания образца. Затем к остатку добавляли ~1,5 мл 30 об.% перекиси водорода и кипятили в течение ~10 мин. Остаток переносили в коническую колбу объемом 25 мл, добавляли ~10 мл аммиачной буферной смеси (pH 10) и небольшое количество сухого индикатора эриохрома черного Т. Содержимое колбы тщательно перемешивали до полного растворения индикатора и образования раствора малинового цвета. Пробу титровали 0,02 М раствором ЭДТА до перехода малиновой окраски через фиолетовую в ярко-синюю. В результате было показано, что содержание цинка в полученном продукте составляет 21,5%, что согласуется с теоретически рассчитанным значением (21,1%), соответствующей цинковому комплексу, имеющему соотношение металл:лиганд 1:1.

В ИК-спектре продукта (см. фиг. 3) наблюдается две сильные полосы карбонильной группы: 1616 и 1646  $cm^{-1}$ . При этом структура и частоты поглощения существенно отличаются от таковых в спектре свободного гамма-L-глутамилгистамина (см. фиг. 1), за счет координации с цинком полоса карбоксильной группы смещается в сторону более высоких частот. Также в ИК-спектре продукта возникает интенсивная полоса поглощения при 3276  $cm^{-1}$ , отсутствующая в спектре гамма-L-глутамилгистамина. Ее можно отнести к колебаниям N-H связи в амидном фрагменте либо N-H связи системы имидазола. Кроме того, в ИК-спектрах продукта по сравнению со спектром гамма-L-глутамилгистамина имеются множественные изменения в областях "отпечатков пальцев" и колебаний C-H связей, указывающие на отсутствие свободного гамма-L-глутамилгистамина в образце.

Полученный продукт нерастворим в растворителях, используемых для регистрации спектров ЯМР.

В качестве примера на фиг. 6 приведен ЯМР-спектр в  $D_2O$ , зарегистрированный на приборе Bruker DRX500, 13400, с рабочей частотой 500,13 МГц.

Он в основном содержит остаточный сигнал нейдетерированного растворителя и малоинтенсивные сигналы, соответствующие исходному гамма-L-глутамилгистамину.

Это свидетельствует не только об отсутствии примесей, но и о незначительной диссоциации полученного продукта в водных суспензиях.

Пример 3. Получение цинкового комплекса по изобретению (метод № 2).

Задачей настоящей модификации способа по изобретению является улучшение фильтруемости получаемого продукта, а также обеспечение максимально однородного распределения гидроксида цинка в реакционной смеси.

Проблема однородности распределения чрезвычайно важна для масштабируемости методики, так как образование цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина на поверхности гидроксида цинка препятствует прохождению реакции. Для решения указанной проблемы предложено получение гидроксида цинка *in situ* путем одновременного прибавления растворов гидроксида натрия и ацетата цинка.

Синтез "А": к нагретой до 70°C суспензии 12,0 г (0,05 моль) гамма-L-глутамилгистамина в 150 мл воды прибавляли по каплям одновременно из двух воронок 50 мл 2 М водного раствора гидроксида натрия и раствор 11,0 (0,05 моль) дигидрата ацетата цинка в 80 мл воды. Реакционную смесь перемешивали 4 ч при 70°C, охлаждали до комнатной температуры и оставляли на ночь. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой 3×50 мл и сушили в вакууме при 45-50°C до постоянной массы. Выход составил 21,5 г (71% продукта).

Полученный по данной методике полиаморфный комплекс легче отделяется в виде фильтрата по сравнению с комплексом по примеру 2, полученным в метаноле с использованием метилата натрия.

Данная методика была воспроизведена с увеличенной загрузкой согласно синтезу "В".

Синтез "В": к нагретой до 70°C суспензии 24,0 г (0,1 моль) гамма-L-глутамилгистамина в 300 мл воды прибавляли по каплям одновременно из двух воронок 100 мл 2 М водного раствора гидроксида натрия и раствор 22,0 (0,1 моль) дигидрата ацетата цинка в 120 мл воды. Реакционную смесь перемешивали 4 ч при 70°C, охлаждали до комнатной температуры и оставляли на ночь. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой 4×50 мл и сушили в вакууме при 45-50°C до постоянной массы 44,1 г (71% продукта).

Были выполнены два повторения данной методики осуществления способа и из каждого повторения получили образец для элементного анализа. Согласно анализу данных элементного анализа указанных двух образцов в результате реакции образуется цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина с мольным соотношением гамма-L-глутамилгистамин/цинк - 1/1 (см. табл. 3).

Таблица 3

Результаты элементного анализа цинкового комплекса  
гамма-L-глутамилгистамина (метод № 2)

		С	N	H
Найдено1	Метод №2 «А»	39,52	18,26	4,72
Найдено2		39,44	17,96	4,66
Найдено1	Метод №2 «В»	39,54	18,18	4,52
Найдено2		39,49	17,99	4,47
Вычислено		39.56	18.45	4.65

ИК-спектр полученного продукта (см. фиг. 4 и 5) аналогичен спектру цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина, синтерированного по методу № 1, и данные спектры не имеют существенных отличий в области отпечатков пальцев.

Для подтверждения состава комплекса и полученного соотношения металл/лиганд было проведено комплексонометрическое титрование цинка (см. табл. 4). В результате было показано, что содержание цинка в продукте, полученном по методу № 2, составляет ~22,0%, что согласуется с теоретически рассчитанным значением (21,1%), соответствующим цинковому комплексу, имеющему соотношение металл:лиганд 1:1.

Таблица 4

Результаты комплексонометрического титрования цинкового комплекса  
гамма-L-глутамилгистамина

Метод	Результаты титрования №1 (Zn <sup>2+</sup> )	Результаты титрования №2 (Zn <sup>2+</sup> )	Вычислено
Метод №1	21,53%	22,03%	21,87%
Метод №2 «А»	22,18%	21,95%	
Метод №2 «В»	21,55%	22,13%	

Характеристика биологической активности комплекса соединения 1 по изобретению.

Биологическая активность соединения 1, являющегося предметом настоящего изобретения, была изучена в различных *in vitro* и *in vivo* экспериментах. В частности, при изучении активности соединения 1 в *in vivo* модели атопического дерматита было показано ингибирующее действие соединения 1 на хемотаксис клеток иммунной системы. Исследования биологической активности соединения 1 *in vitro* позволили установить, что соединение 1 является ингибитором фермента глутаминилциклазы, и, таким образом, действие соединения 1 на хемотаксис клеток иммунной системы может быть опосредованно ингибированием активности глутаминилциклазы.

Пример 4. Исследование влияния соединения 1 на ферментативную активность глутаминилциклазы человека *in vitro*.

В ходе исследований влияния соединения 1, являющегося предметом настоящего изобретения, на ферментативную активность глутаминилциклазы *in vitro* впервые было обнаружено прямое ингибирующее действие соединения 1 на рекомбинантную внутриклеточную глутаминилциклазу человека.

Активность глутаминилциклазы при различных концентрациях соединения 1 изучалась при 25°C с использованием флуоресцентного субстрата L-глутаминил 2-нафтиламида (Gln-bNA) [Anal. Biochem. 2002 Apr 1; 303(1):49-56]. Реакционная смесь объемом 100 мкл содержала 50 мкмоль флуорогенного субстрата; ~0,2 единицы пироглутамиламинопептидазы человека (1 единица определяется как количест-

во, гидролизующее 1 мкмоль pGlu-bNA в минуту) и аликвоту рекомбинантной внутриклеточной глутаминилциклазы человека (gQC) в 50 мкмоль трисаминометан-HCl и 5% глицерине, pH 8,0. Реакцию инициировали добавлением к реакционной смеси аликвоты глутаминилциклазы, инкубированной с соединением 1 в течение 5 мин.

Дальнейшее протекание реакции отслеживали спектрофотометрически (длина волны возбуждения и эмиссии составляли 320 и 410 нм). Ферментативную активность определяли по количеству выделившегося 2-нафтиламида (bNA), рассчитанному по калибровочной кривой. Значения IC<sub>50</sub> рассчитывали с помощью нелинейной регрессии кривой "концентрация ингибитора"- "ферментативная активность".

В результате эксперимента было установлено, что соединение 1 ингибирует активность глутаминилциклазы с IC<sub>50</sub>=26 мкМ.

Пример 5. Исследование активности соединения 1 на модели атопического дерматита у мышей.

Методика эксперимента. Исследование активности соединения 1 на модели атопического дерматита было проведено с помощью стандартной методики [Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2012. Article ID 545497, 9 pages]. В экспериментальную группу были отобраны животные без признаков отклонений внешнего вида таким образом, чтобы индивидуальное значение массы отклонялось от среднего значения в пределах пола не более чем на ±20%.

На 0 и 12 сутки эксперимента мышам-самцам линии balb/c на предварительно выбритые участки спины наносили 100 мкл 2% раствора 1-хлор-2,4-динитробензола (ДНХБ) в этаноле с целью сенсибилизации организма. На 17 сутки на правое "опытное" ухо животным наносили 20 мкл 2% спиртового раствора ДНХБ дважды с интервалом 1 ч соединения 1 с содержанием действующего вещества 0,01 мас.% наносили накожно, на правое "опытное" ухо, дважды: через 1 и через 13 ч после последнего нанесения ДНХБ на ухо. В качестве препаратов сравнения использовали метилпреднизолон ацепонат (0,1% мазь для наружного применения), пиритион цинка (0,2% крем для наружного применения), пимекролимус (1% крем для наружного применения) и крем для наружного применения с содержанием гамма-L-глутамилгистамина 0,01%. На 18 сутки проводили эвтаназию животных и гистологический анализ пораженного уха. Гистологические срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Оценку микроскопических изменений проявлений дерматита проводили по следующей шкале:

- 1) акантоз - утолщение эпидермиса и эпителия с удлинением межсосочковых отростков:
  - 0 баллов - отсутствие патологии;
  - 0,5 баллов - патология есть, но очень слабо выражена;
  - 1 балл - умеренно выраженная патология;
  - 2 балла - выраженная патология.
- 2) Гиперкератоз - это патологическое состояние кожи невоспалительного характера, характеризующееся значительным утолщением рогового слоя или задержкой его нормального отторжения:
  - 0 баллов - отсутствие патологии;
  - 0,5 баллов - патология есть, но очень слабо выражена;
  - 1 балл - наличие указанной патологии.
- 3) Пустулы (гнойнички) - полостные островоспалительные элементы с гнойным содержимым:
  - 0,5 балла - единичные проявления патологии;
  - 1 балл - слабо выраженная патология;
  - 2 балла - умеренно выраженная патология;
  - 3 балла - сильно выраженная патология;
  - 4 балла - тотальная патология.
- 4) Киста - структура округлой или овальной формы, выстланных изнутри ороговевающим плоским эпителием и заполненных слоистыми роговыми массами, возникают при гиперплазии эпителия (акантоза):
  - 0 баллов - отсутствие патологии;
  - 0,5 баллов - патология есть, но очень слабо выражена;
  - 1 балл - наличие указанной патологии.
- 5) Воспаление:
  - 0 баллов - отсутствие патологии;
  - 0,5 балла - единичные проявления патологии;
  - 1 балл - слабо выраженная патологии;
  - 2 балла - умеренно выраженная патология;
  - 3 балла - сильно выраженная патология;
  - 4 балла - тотальная патология.
- 6) Отек:
  - 0 баллов - отсутствие патологии;
  - 0,5 балла - единичные проявления патологии;
  - 1 балл - слабо выраженная патологии;
  - 2 балла - умеренно выраженная патология;
  - 3 балла - сильно выраженная патология;

4 балла - тотальная патология.

Полученные данные были проверены с использованием теста Граббса на наличие в выборке наибольшего или наименьшего аномального наблюдения (выброса). Значения, определенные как "влетающие" в данном тесте, не использовались для дальнейшего анализа. Для всех данных применялась описательная статистика: подсчитаны среднее значение (M) и стандартная ошибка среднего (m). С помощью критерия Колмогорова-Смирнова была проверена нормальность распределения полученных в ходе эксперимента значений. В случае нормального распределения для оценки межгрупповых различий использовался критерий Стьюдента (t-тест). В случае отличного от нормального распределения для сравнения нескольких групп использовался критерий Краскела-Уоллиса (с пост-анализом Данна). Статистический анализ проводился с использованием программы GraphPad Prism. 5.0. Различия определялись при 5% уровне достоверности.

Результаты проведенных экспериментов приведены на фиг. 7 и 8.

Как видно из приведенных на фиг. 7 данных, исследовано фармакологическое действие крема, содержащего соединение 1 (0,01 мас.%) на поражение кожи в модели атопического дерматита у мышей по данным гистологического анализа: а) акантоз (баллы), б) гиперкератоз (баллы), в) пустулы (баллы), г) кисты (баллы), д) воспаление (баллы), е) отек (баллы). Эксперименты проведены в соответствии с Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2012. Article ID 545497, 9 pages. Примечание: \* Достоверность различия ( $P < 0,05$ ) с интактной группой, & - достоверность различия ( $P < 0,05$ ) с контролем.

На фиг. 8 изображены гистологические срезы кожи пораженного уха мышей в модели атопического дерматита, окрашенные гематоксилин-эозином, с увеличением  $\times 20$ .

А - группа интактных животных; В - контроль патологии; С - адвантан (метилпреднизолона ацепонат, мазь 0,1%); D - пимекролимус (элидел 1% крем); Е - крем соединение 1 0,01%. 1 - эпидермис; 2 - дерма; 3 - воспалительный инфильтрат. Эксперименты проведены в соответствии с Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2012. Article ID 545497, 9 pages.

При этом нанесение на кожу соединения 1 (крем 0,01 мас.%) снижало до уровня интактных животных приток клеток воспаления (моноцитов, дендритных клеток, эозинофилов и нейтрофилов) в эпидермис и дерму кожи, а также другие микроскопические проявления атопического дерматита. Важно отметить, что по выраженности действия соединение 1 (цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина) существенно превосходило действие лиганда гамма-L-глутамилгистамина. Таким образом, терапевтическая активность соединения 1 не может быть объяснена активностью гамма-L-глутамилгистамина. По выраженности действия крем соединения 1 превосходил препараты сравнения метилпреднизолона ацепонат, пиритион цинка и пимекролимус. Полученные результаты позволяют заключить, что соединение 1 оказывает улучшенное терапевтическое действие при атопическом дерматите.

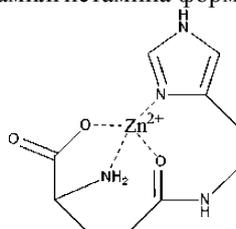
Выводы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что соединение 1 обладает эффективностью в ингибировании фермента глутаминилциклазы. На модели атопического дерматита показано, что соединение 1 ингибирует приток клеток воспаления (моноцитов, дендритных клеток, эозинофилов и нейтрофилов) *in vivo*, а также подавляет другие микроскопические проявления атопического дерматита.

Несмотря на то что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные эксперименты приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### 1. Цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина формулы



или его фармацевтически приемлемая соль,

в котором мольное соотношение цинк/гамма-L-глутамилгистамин составляет 1/1.

2. Способ получения цинкового комплекса гамма-L-глутамилгистамина, включающий: перемешивание смеси ацетата цинка и гамма-L-глутамилгистамина в полярном растворителе; выделение осадка продукта;

сушку полученного продукта, который представляет собой цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина с соотношением цинк/гамма-L-глутамилгистамин 1/1,

где растворителем является метанол или вода или их комбинации, перемешивание смеси осуществляют при температуре от 15 до 50°C в случае использования метанола в качестве растворителя и при температуре от 15 до 90°C при использовании воды в качестве растворителя.

3. Способ по п.2, где используют водный ацетат цинка, в частности двуводный ацетат цинка.

4. Способ по п.3, где перемешивание смеси осуществляют при температуре от 15 до 40°C в случае использования метанола в качестве растворителя.

5. Цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина, который получают способом по любому из пп.2-4.

6. Цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина, в котором мольное соотношение цинк/гамма-L-глутамилгистамин составляет 1/1 и в котором в ИК-спектре твердого образца комплекса присутствуют полосы 1616, 1646 и 3276  $\text{см}^{-1}$ .

7. Цинковый комплекс гамма-L-глутамилгистамина по п.6, который получен перемешиванием эквимолярной смеси ацетата цинка и гамма-L-глутамилгистамина в растворителе с последующим выделением комплекса в виде продукта.

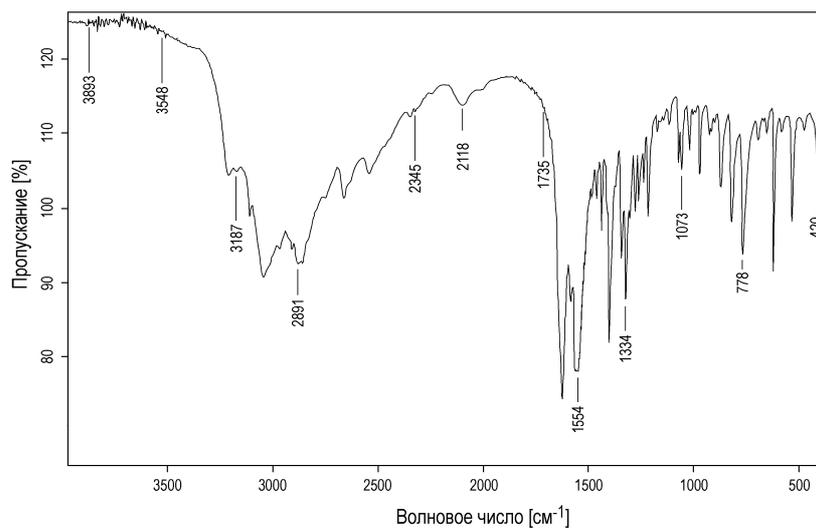
8. Применение комплекса по п.1 или 5-7 для предупреждения и/или лечения расстройства, обусловленного нарушением барьерной функции эпителиальных тканей.

9. Применение комплекса по п.1 или 5-7 для предупреждения и/или лечения расстройства, обусловленного активностью глутаминилциклазы.

10. Применение комплекса по п.1 или 5-7 для предупреждения и/или лечения расстройства, связанного с аберрантной активностью клеток иммунной системы.

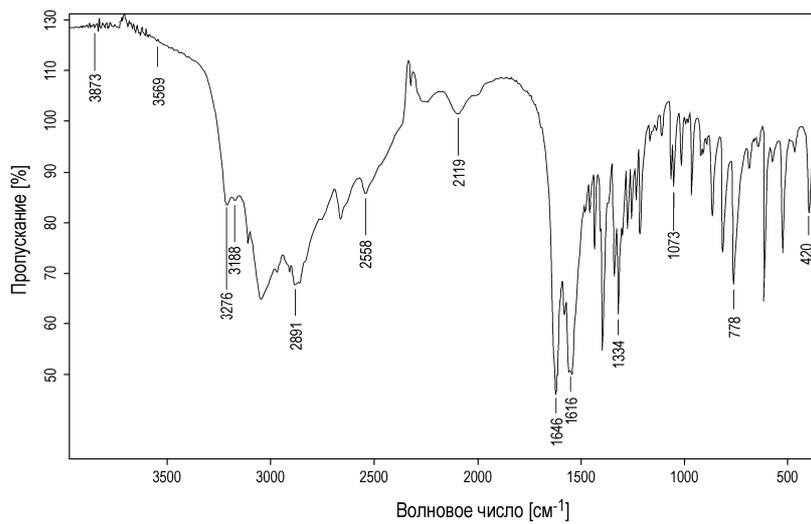
11. Применение комплекса по п.10 для предупреждения и/или лечения расстройства, связанного с аберрантным хемотаксисом клеток иммунной системы.

12. Применение по п.8-11, где расстройство, связанное с нарушением барьерной функции эпителиальных тканей, и/или активностью глутаминилциклазы, и/или аберрантной активностью клеток иммунной системы, представляет собой атопический дерматит.

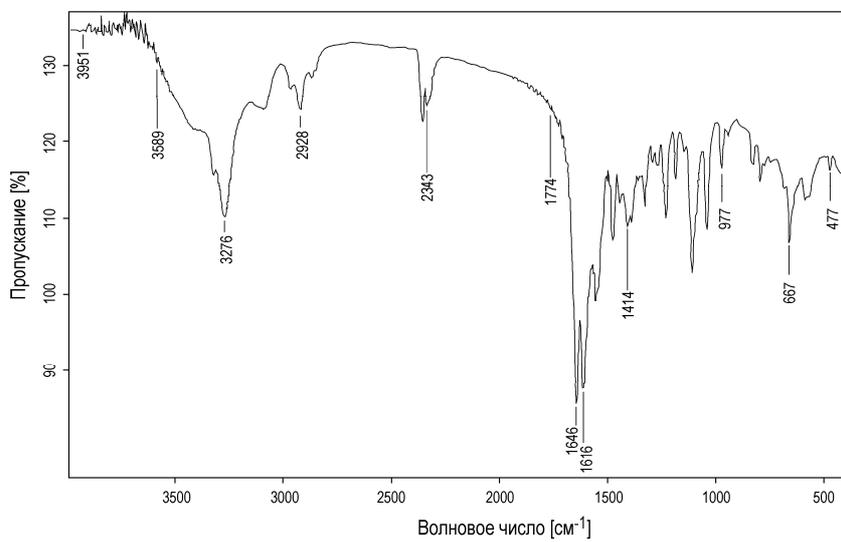


Фиг. 1

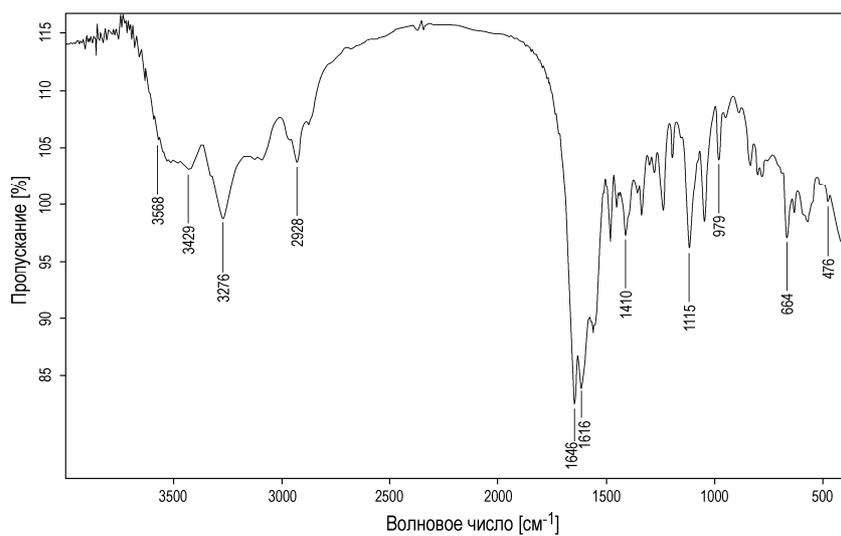
043130



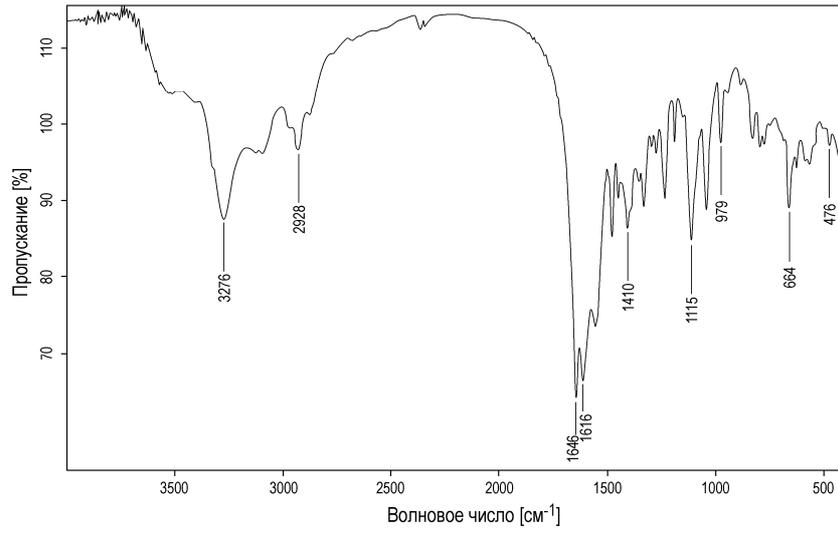
Фиг. 2



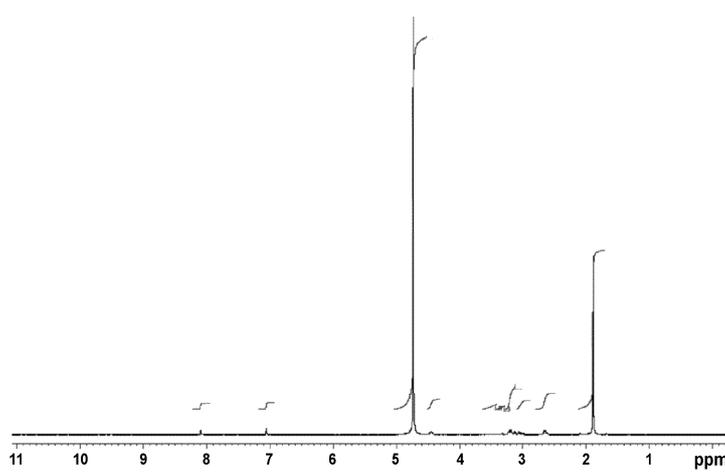
Фиг. 3



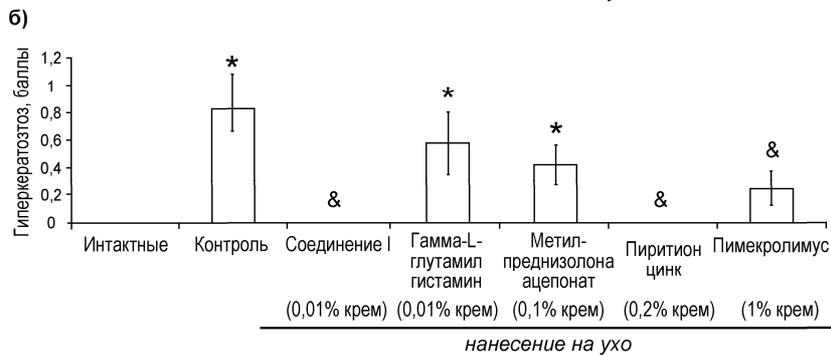
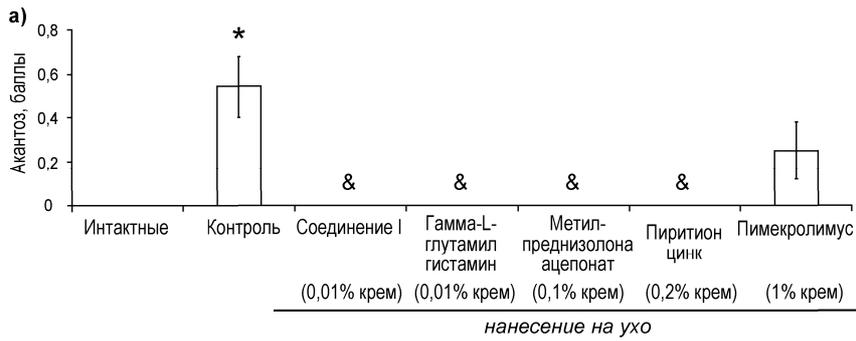
Фиг. 4

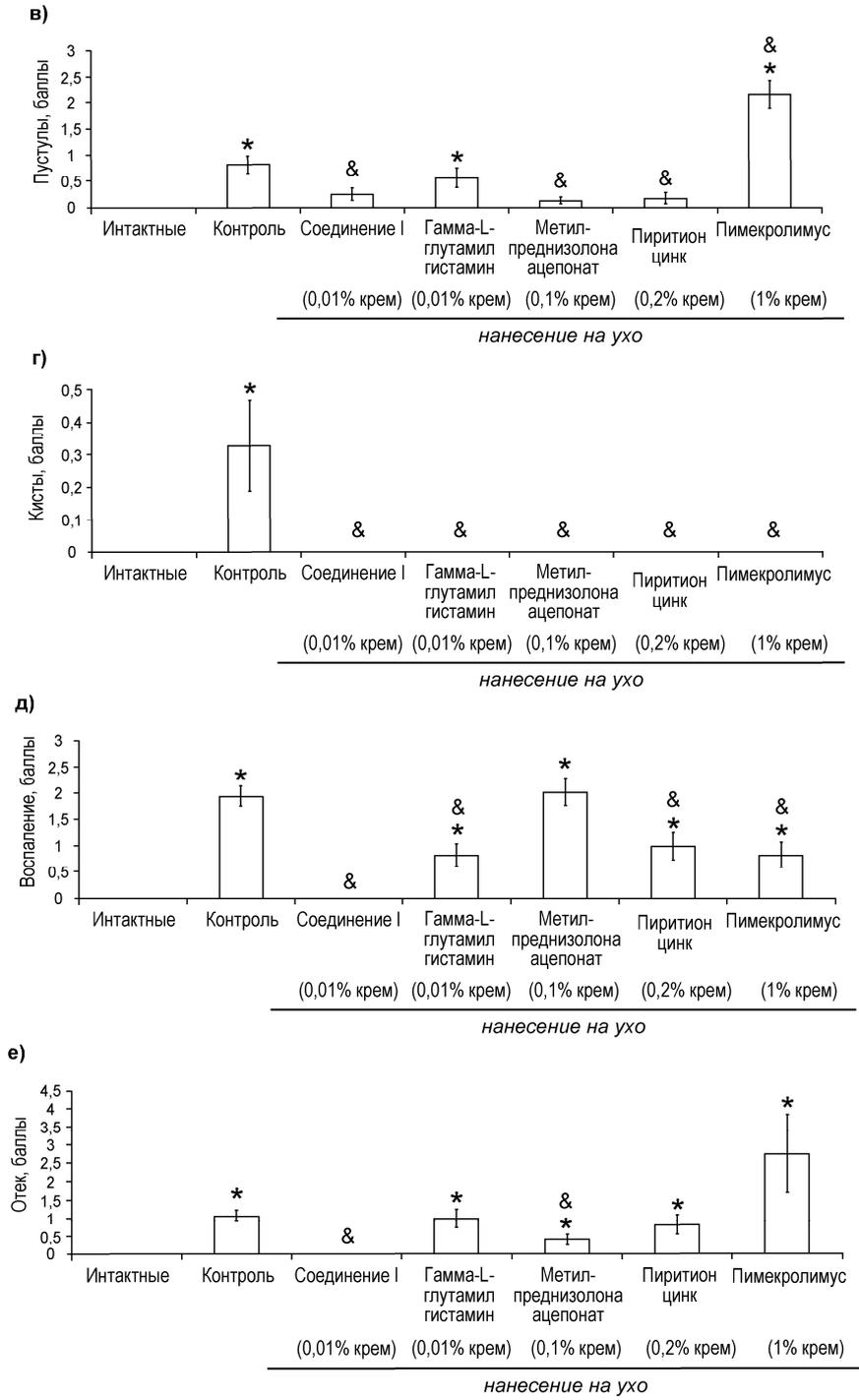


Фиг. 5

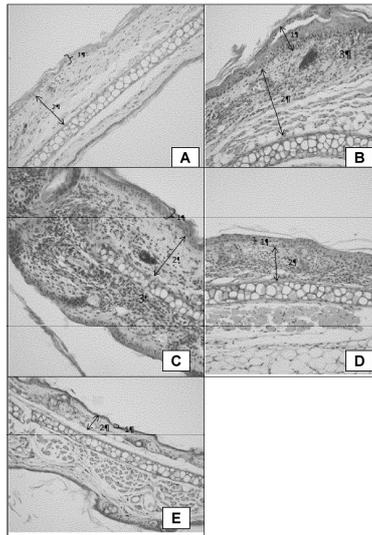


Фиг. 6





Фиг. 7



Фиг. 8