

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046126**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.08

(21) Номер заявки
202200087

(22) Дата подачи заявки
2020.12.11

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)
A61K 33/30 (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ КОМПЛЕКСЫ
АЛЛОФЕРОНА С ЦИНКОМ**

(31) **2019144881**

(32) **2019.12.29**

(33) **RU**

(43) **2022.11.29**

(86) **PCT/RU2020/000622**

(87) **WO 2021/137722 2021.07.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БЕККЕР ГЕРМАН ПЕТРОВИЧ (RU)

(72) Изобретатель:
**Беккер Герман Петрович, Матусевич
Олег Владимирович, Никонов Борис
Алексеевич (RU)**

(74) Представитель:
Мохов Е.В. (RU)

(56) **WO-A1-2018124933**

WO-A1-2013176563

KIM Yejin et al. The anti-inflammatory effect of alloferon on UVB-induced skin inflammation through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines. *Immunology Letters*, 2013, Vol. 149, No. 1-2, p. 110-118, doi: 10.1016/j.imlet.2012.09.005, c.112, chapter 2.9

WO-A1-2016036273

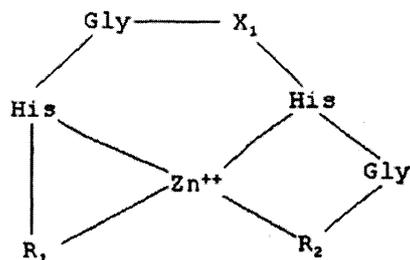
KUCZER Mariola et al. Copper (II) complex formation processes of alloferon I with point mutation H1K; combined spectroscopic and potentiometric studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012, Vol. III, p. 40-49, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.02.018, whole document

(57) Изобретение относится к фармацевтической сфере и касается композиции, содержащей биологически активные комплексы цинка с олигопептидом аллоферон. Заявлена фармацевтическая композиция, обладающая противовирусной и иммуномодулирующей активностью, активным началом которой является смесь биологически активных комплексных соединений, образуемых взаимодействием олигопептида аллоферон с ионами цинка в водной среде, причем цинк и аллоферон в растворе образуют комплексные соединения различного состава, а концентрация растворов аллоферона и соли цинка подобрана таким образом, что молярное соотношение компонентов аллоферона и соли цинка составляет от 1:1 до 1:2. Также заявлен способ получения фармацевтической композиции, в котором соли цинка и аллоферон порознь растворяют в равных объемах 0,9% растворов натрия хлорида или натрия ацетата, смешивают и корректируют pH до величины 6,5-8,0. Техническим эффектом изобретения является композиция, состав и свойства которой позволяют достигнуть в растворе высокой концентрации комплексных соединений, образуемых взаимодействием аллоферона с ионами цинка, которая обладает биологической активностью, причем противовирусная активность композиции превышает противовирусную активность самого аллоферона.

B1**046126****046126 B1**

Изобретение относится к фармацевтической сфере и касается оптимизации состава композиции, содержащей биологически активный комплекс цинка с пептидом аллоферон.

Известен патент RU 2470031 (Киселев О.И., Ершов Ф.И., опублик.: 20.12.2012.) описывающий цинк-содержащие пептидные комплексы вида



обладающие противовирусной и иммуномодулирующую активностью. Данное решение выбрано как прототип.

Комплексные соединения пептидов с цинком данного вида являются основным содержанием патента RU 2470031. Однако предложенная авторами патента структурная формула комплексов, базируется исключительно на общих положениях о свойствах цинка и гистидин-содержащих пептидов, а также данных компьютерного моделирования, являясь по существу сугубо теоретической. Заявленные авторами комплексы относятся к широкому кругу пептидов, молекулы которых содержат несколько (не менее трех) остатков гистидина.

Основным объектом рассмотрения авторов является олигопептид Аллоферон (аллоферон-1 патента RU 2172322 "Аллофероны - иммуномодулирующие пептиды" Черныш С.И., Ким Су Ин, Беккер Г.П. и др.). Однако свои выводы авторы распространили не только на все обширное семейство аллоферонов, но и на другие пептиды, обогащенные гистидином. Авторы патента предположили, что гистидин-содержащие пептиды образуют с цинком комплексы хелатного типа, в которых цинк координационно связан с остатками гистидина. Однако структурную формулу комплексов, являющуюся основным содержанием изобретения, авторы никакими экспериментальными доказательствами не подтвердили. Правомочность структурной формулы без ее обоснования вызывает большие сомнения. Сомнение вызывает и априорное распространение формулы комплексов и выводов об их биологической активности на широкий круг не исследованных пептидов.

Из текста патента следует, что для оценки биологических свойств комплексов использовались водные растворы. Однако известно, что в водной среде поведение комплексных соединений носит сложный характер (О.В. Сергеева. Реакции в водных растворах.

Сложные ионные равновесия. Минск, 2009). Это обстоятельство не позволяет делать однозначных выводов о структуре и составе комплексов на основе лишь теоретических предпосылок. Комплексные соединения являются веществами с в принципе нестабильной структурой (Гринберг А.А., Введение в химию комплексных соединений, 4 изд., Л., 1971). В водных растворах они всегда представляют собой смесь разных форм, равновесие между которыми характеризуется константами устойчивости (нестойкости). Для комплексов пептидов или белков, как слабых лигандов, это выражено в еще большей степени ("Неорганическая биохимия" Мир, М., 1978, т.1, с.152-162, раздел "Комплексы металлов с аминокислотами и пептидами"). Для системы аллоферон - цинк это усугубляется тем что, во-первых, цинк является слабым комплексообразователем, во-вторых, аллоферон обладает, наряду с гистидином, другими функциональными группами способными к координации.

Авторами патента RU 2470031 показано, что биологическая активность комплексов аллоферона с цинком превышает активность исходного пептида. Однако, приведя данные о биологических свойствах комплексов, авторы патента не привели никаких данных о способе их получения. В описании не указано, какие соли цинка были использованы для получения комплексов, не приведена методика их получения и допустимые условия (рН, растворители, ионная сила, дополнительные компоненты), при которых эти комплексы существуют.

Таким образом, патент RU 2470031 носит сугубо теоретический характер, он не может быть воспроизведен и использован в практических целях.

С практической точки зрения необходимо установить, во-первых, факт наличия комплексов аллоферона с цинком в водном растворе, во-вторых, найти условия их существования.

Комплексные соединения являются продуктами взаимодействия веществ, одно из которых обладает свойствами акцептора электронов - комплексообразователь, второе является донором электронов - лиганд. При смешивании двух растворов, содержащих ионы металла (комплексообразователь) и лиганд (в данном случае лигандом является аллоферон), начнется процесс комплексообразования, т.е. присоединение лиганда к иону металла. Присоединение лиганда к металлу происходит ступенчато до тех пор, пока количество лиганда не станет равным координационному числу комплексообразователя (для цинка оно, в основном, равно 4). Устанавливается динамическое равновесие, при котором происходит как образование комплекса, так и его распад. Таким образом, в растворе, как правило, одновременно содержатся все

формы комплексов, образовавшиеся на различных стадиях комплексообразования, а также исходные вещества. Пропорция их зависит от прочности образующихся соединений (Гринберг А.А., Введение в химию комплексных соединений, 4 изд., Л., 1971).

Устойчивость комплексов определяется как фундаментальными факторами (природой комплексообразователя и лигандов), так и внешними условиями (температурой, природой растворителя, ионной силой, составом раствора). Среди фундаментальных факторов, влияющих на устойчивость комплексов, следует выделить природу центрального атома и лиганда, структуру лиганда и стерические факторы. Лиганды имеющие несколько сайтов связывания (полидентантные лиганды) могут образовывать циклические комплексы - хелаты, которые обладают большей устойчивостью.

Пептиды, как лиганды, имеют несколько сайтов связывания с металлами, т.е. являются полидентантными лигандами. Такими сайтами могут быть: концевые amino и карбоксильная группы, амидный атом азота пептидной связи, а также боковые функциональные группы аминокислотных остатков. Поэтому для пептидов характерно образование комплексов хелатного типа.

Аллоферон, наряду с указанными выше активными группами, имеет в своем составе 4 остатка гистидина - аминокислоты, содержащей имидазольное кольцо, которое обладает склонностью к образованию комплексов. Это придает аллоферону свойства активного лиганда. Данное обстоятельство использовано в вышеуказанном патенте RU 2470031. Поскольку координационное число цинка обычно равно 4, а в молекуле аллоферона присутствует 4 остатка гистидина, формула хелатного комплекса, предложенная авторами патента RU 2470031 кажется очевидной. Однако наличие в составе молекулы аллоферона других функциональных групп, способных координироваться с ионами металлов, предполагает возможность существования иных структур. Особенности комплексообразования в водной среде также должны влиять на состав и структуру образующихся соединений.

Комплексные соединения аллоферона и его производных с ионами меди, образующиеся в водных растворах, тщательно изучены группой польских ученых и описаны в ряде статей. В работе T.Kowalik-Jankowska, L. Biega, M. Kuzer, D.Konopinska. Mononuclear Copper (II) complexes of alloferon 1 and 2: A combined potentiometric and spectroscopic studies. J. Inorg. Biochem. 103, 2009, 135-142 авторы проводят детальный анализ равновесия в системе аллоферон - медь (при их эквимолекулярных соотношениях), основывающийся на данных потенциометрического титрования и спектрометрии. Медь и цинк как комплексообразователи обладают схожими свойствами, поэтому данные, полученные для меди, могут быть приняты во внимание при изучении комплексов аллоферона с цинком.

Работы польских исследователей показали, что в системе аллоферон - медь в водных растворах образуется множество соединений хелатного типа, состав и количество которых очень сильно зависит от pH среды. Было показано, что при всех значениях pH ионы меди и аллоферон образуют комплексы, находящиеся в равновесии с исходными компонентами. Установлено, что ион меди образует связь с остатками гистидина и непременно с концевой аминогруппой аллоферона. Число связей меди с азотом гистидина зависит от pH среды и растет с повышением ее величины. Она может быть связана с одним, двумя или тремя остатками гистидина. Важно то, что один из четырех остатков гистидина всегда остается свободным не связанным с ионом металла. Такая структура комплексов отличается от формулы, приведенной в патенте RU 2470031, в которой рассматривается связывание именно по 4 остаткам гистидина. Авторами польской статьи показано, что связывание по 4 гистидинам возможно, но только в случае блокирования концевой аминогруппы, например, путем ее ацетилирования.

Важным обстоятельством, обнаруженным авторами статьи, является то, что в системе аллоферон - медь одновременно присутствуют комплексные соединения разного состава и строения. Так в ней найдены полиядерные комплексы, в которых с одной молекулой аллоферона координировано несколько ионов металла. Таким образом, система аллоферон - медь в водном растворе имеет сложный состав, в ней одновременно присутствуют как комплексные соединения различного состава, так и исходные вещества - аллоферон и соль меди.

Близкие закономерности должны наблюдаться и для водных растворов системы аллоферон - цинк. Однако, важно иметь в виду то, что цинк в ряду Ирвинга-Уильямса по комплексообразующей активности уступает меди (О.В. Сергеева. Реакции в водных растворах. Сложные ионные равновесия. Минск, 2009, 70 с). Поэтому комплексные соединения цинка, как правило, менее устойчивы, чем медные. Однако можно предположить, что природа и закономерности существования комплексных соединений в системе аллоферон - цинк будут близкими к описанным выше для меди.

Задачей данного изобретения является создание фармацевтической композиции обладающей повышенной биологической активностью, содержащей активные комплексы аллоферона с цинком в оптимальном составе, а также условий, которые позволяют получить раствор, содержащий максимальную концентрацию этих соединений.

Техническим результатом изобретения является композиция, состав и свойства которой позволяют достигнуть в растворе высокой концентрации комплексных соединений, образуемых взаимодействием аллоферона с ионами цинка, которая обладает биологической активностью, причем противовирусная активность композиции превышает противовирусную активность самого аллоферона.

Указанный технический результат достигается за счет того, что заявлена фармацевтическая компо-

зия, обладающая противовирусной и иммуномодулирующей активностью, содержащей в качестве активных веществ аллоферон и цинк, отличающаяся тем, что ее активным началом является смесь биологически активных комплексных соединений, образуемых взаимодействием олигопептида аллоферон с ионами цинка в водной среде, причем цинк и аллоферон в растворе образуют комплексные соединения различного состава, а концентрация растворов аллоферона и соли цинка подобрана таким образом, что молярное соотношение компонентов аллоферона и соли цинка составляет от 1:1 до 1:2.

Допустимо, что состав композиции образуют аллоферон, соль цинка, взятая в эквимолекулярном или большем количестве; в качестве среды используется 0,9% раствор натрия хлорида или натрия ацетата, а pH раствора находится в пределах от 6,5 до 8,0 (преимущественно 7,5).

Допустимо, что в качестве соли цинка используют его ацетат или хлорид.

Допустимо, что при приготовлении композиции сначала готовят первый раствор, который получают растворением 100 мг аллоферона в 50 мл 0,9% раствора натрия хлорида или натрия ацетата, параллельно готовят второй раствор, который получают растворением 17,4 мг ацетата цинка дигидрата или 10,8 мг хлорида цинка безводного в 50 мл 0,9% раствора натрия хлорида или натрия ацетата; после чего в первый раствор постепенно при перемешивании вводят второй раствор; через 30 мин контролируют pH раствора и доводят его до величины 6,5-8,0 с помощью 0,1 М раствора гидроксида натрия или кислоты хлористоводородной; полученный раствор стерилизуют фильтрацией через фильтр с порами 0,2 мкм, дозируют в ампулы или флаконы, которые герметизируют.

Допустимо, что обеспечивают конечные концентрации компонентов композиции: аллоферон - 1 мг/мл, соль цинка - от 0,052 до 0,104 мг цинка /мл.

Допустимо, что при приготовлении композиции сначала готовят первый раствор, который получают растворением 100 мг аллоферона в 50 мл 0,9% раствора натрия хлорида или натрия ацетата, параллельно готовят второй раствор, который получают растворением 34,8 мг ацетата цинка дигидрата или 21,6 мг хлорида цинка безводного в 50 мл 0,9% раствора натрия хлорида или натрия ацетата; после чего в первый раствор постепенно при перемешивании вводят второй раствор; через 30 минут контролируют pH раствора и доводят его до величины 6,5-8,0 с помощью 0,1 М раствора гидроксида натрия или кислоты хлористоводородной; полученный раствор стерилизуют фильтрацией через фильтр с порами 0,2 мкм, дозируют в ампулы или флаконы, которые затем герметизируют.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан масс-спектр 0,001 М раствора аллоферона в воде.

На фиг. 2 показан масс-спектр 0,001 М раствора комплекса аллоферона с цинком в воде при молярном соотношении аллоферон - цинк 1:1.

На фиг. 3 показан масс-спектр 0,001 М раствора комплекса аллоферона с цинком в воде при соотношении аллоферон - цинк 1:2.

На фиг. 4 показан фрагмент масс-спектра комплекса аллоферона с цинком. Трехзарядный ион m/z 443,1721. Экспериментальные данные.

На фиг. 5 показан фрагмент теоретически рассчитанного масс-спектра комплекса аллоферона с цинком, m/z 443,1721.

На фиг. 6 показан масс-спектр системы аллоферон + цинк в 0,9% растворе натрия хлорида.

На фиг. 7 показан масс-спектр 0,001 М раствора комплекса аллоферона с цинком при pH 4,0.

На фиг. 8 показан масс-спектр 0,001 М раствора комплекса аллоферона с цинком при pH 6,0.

На фиг. 9 показан масс-спектр 0,001 М раствора комплекса аллоферона с цинком при pH 8,0.

Осуществление изобретения

При осуществлении разработки в качестве солей цинка были использованы ацетат цинка и хлорид цинка. Только эти соли цинка входят в состав лекарственных препаратов для парентерального введения, прежде всего в различные формы инсулина. В качестве растворителя были использованы 0,9% растворы натрия хлорида и натрия ацетата в воде. Другие изотонические растворы (раствор Рингера и т.д.) в данном случае не применимы, т.к. содержат дополнительно ионы кальция, а также фосфаты и карбонаты, образующие с цинком нерастворимые соединения.

Растворы, содержащие аллоферон и соли цинка, были изучены с помощью потенциометрического титрования и масс-спектрометрии.

Установлено, что в системе аллоферон - соль цинка в водной среде происходит процесс комплексообразования. При этом в растворе всегда присутствует равновесная смесь исходных компонентов - аллоферона и соли цинка, а также образуемых ими комплексных соединений. Найдено, что цинк и аллоферон в растворе образуют комплексные соединения различного состава. Преимущественно образуются комплексы, в которых молекула аллоферона связана с одним ионом цинка. Однако наряду с ними, в растворе присутствуют комплексы, в которых с молекулой аллоферона связаны сразу два иона цинка, а также димеры, в которых один ион цинка связывается с двумя молекулами аллоферона. Таким образом, в системе аллоферон - цинк в водном растворе присутствует сложная смесь веществ, включающая исходные компоненты и комплексы различных структур и составов. При этом очевидно, что состав и структура этих комплексов, существенно отличаются от формулы, данной в патенте RU 2470031.

Найдено, что состав и концентрация образующихся комплексов зависит от pH, соотношения алло-

ферон:цинк и ионной силы раствора. Увеличение величины рН повышает концентрацию комплексов. Такой же эффект дает увеличение количества соли цинка выше эквимолекулярного. Использование в качестве среды 0,9% растворов натрия хлорида или натрия ацетата имеющих рН в пределах от 6,5 до 8,0 позволило получить композицию, в которой степень комплексообразования близка к количественной.

В итоге разработанная композиция включает комплексные соединения аллоферона и цинка различного строения, исходные аллоферон и соль цинка (ацетат или хлорид), 0,9% раствор натрия хлорида или натрия ацетата и имеет рН в диапазоне от 6,5 до 8,0, преимущественно 7,5. При этом для приготовления композиции берут аллоферон и эквивалентное ему или большее количество соли цинка. Композиция получается путем смешения равных объемов растворов ацетата или хлорида цинка и аллоферона в 0,9% растворе натрия хлорида или натрия ацетата, с последующей корректировкой рН до указанной величины 6,5-8,0 (предпочтительно 7,5).

Биологическая активность заявляемых композиций была подтверждена экспериментами. В качестве препаратов сравнения использовали лекарственное средство "Аллокин-альфа, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения", содержащее 1 мг чистого аллоферона без вспомогательных веществ, а также стандартный противогерпетический препарат "Ацикловир". Противовирусная активность разработанной композиции, показанная ранее (патент RU 2470031) на примере вируса гриппа, проверена испытаниями с вирусом герпеса. Результат испытаний подтвердил данные патента RU 2470031, показав более высокую противовирусную активность композиции в сравнении с аллофероном. Иммуномодулирующие свойства разработанной композиции, показанные на примере индукции интерферона-гамма и интерлейкина-18, также выше, чем у чистого пептида аллоферона.

Выводы подтверждены примерами.

Пример 1. Масс-спектрометрические исследования.

В силу методических требований к оборудованию, в растворах для масс-спектрометрии ESI-MS нежелательно присутствие неорганических солей, поэтому большая часть растворов готовилась на воде дистиллированной. Растворы с различными значениями рН готовили, используя формиатный буфер (рН 4 и 6) и трисбуфер (рН 8,0). Концентрация растворов аллоферона и соли цинка составляла 0,001 М, мольное соотношение компонентов составляло 1:1 и 1:2. В качестве соли цинка использовали ацетат цинка.

Для работы использован масс-спектрометрический детектор - LTQ Orbitrap Velos с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении и программным обеспечением для управления и обработки данных "Xcalibur".

Условия работы масс-спектрометрического детектора.

Поток газа-осушителя - 10 у.е.

Поток вспомогательного газа - 5 у.е.

Температура газа-осушителя - 80°C.

Температура вспомогательного потока - 280°C.

Напряжение на капилляре - 3500В.

Прямой ввод образца с помощью шприца объемом 500 мкл и скоростью потока 5 мкл/мин.

Детектирование в режиме сканирования по полному ионному току (SCAN): регистрация ионов в диапазоне m/z от 300 до 1500 (при положительной ионизации).

Моноизотопные массы некоторых возможных ионов аллоферона представлены ниже:

Аллоферон: Брутто формула $C_{52}H_{76}N_{22}O_{16}$, моноизотопная молекулярная масса

M. W.=1264.58096

Однозарядный ион m/z $[M+H]^+$ =1265.58824

Двухзарядный ион m/z $[M+2H]^{2+}$ =633.29776

Двухзарядный ион с натрием m/z $[M+2Na]^{2+}$ =644.28873

Трехзарядный ион m/z $[M+3H]^{3+}$ =422.53426

На фиг. 1 показан масс-спектр 0,001М раствора аллоферона в воде. Хорошо определяются несколько характерных для пептида ионов. Ион с m/z 1265,5896 - однозарядный ион, ион с m/z 633,2992 является двухзарядным ионом $[M+2H]^{2+}$ и трехзарядный ион $[M+3H]^{3+}$ с m/z 422,5351.

На фиг. 2 показан масс-спектр 0,001М раствора содержащего аллоферон и соль цинка при мольном соотношении аллоферон - цинк 1:1. Сравнение спектров фиг. 1 (аллоферон) и фиг. 2 (композиция) показывает, что в системе появились сигналы новых ионов, наличие которых может быть объяснено только образованием комплексных соединений аллоферона с цинком. Малая интенсивности сигналов новых ионов свидетельствует, что содержание в растворе свободного аллоферона значительно выше, чем концентрация комплекса.

Спектр фиг. 2 содержит сигнал с m/z 443,1731, соответствующий трехзарядному иону цинкового комплекса $[M+Zn+H]^{3+}$, а также сигнал с m/z 664,2556, который соответствует двухзарядному иону комплекса $[M+Zn]^{2+}$. Оба сигнала соответствуют комплексу с брутто формулой $C_{52}H_{76}N_{22}O_{16}Zn$.

На фиг. 3 показан масс-спектр 0,001М раствора комплекса аллоферона с цинком в воде при мольном соотношении аллоферон - цинк 1:2. Он показывает, что увеличение содержания цинка ведет к существенному росту концентрации комплекса в растворе. Композиции с отношением аллоферон:цинк боль-

шим, чем 1:2 не исследовались. Представленные на фиг. 4 и фиг. 5 реальный и теоретический масс-спектры трехзарядного иона комплекса практически совпадают, что свидетельствует о правильности интерпретации этого сигнала в масс-спектре как соответствующего комплексу с брутто-формулой $C_{52}H_{76}N_{22}O_{16}Zn$. Такое же совпадение теории и практики было получено и для двухзарядного иона.

Кроме того, в спектрах имеются сигналы с m/z 465,1425 и 697,2097. Они соответствуют комплексу с брутто формулой $C_{52}H_{72}N_{22}O_{16}Zn_2$, в котором аллоферон связан сразу с 2 атомами цинка. Выполненное сравнение реального и теоретически рассчитанного масс-спектра трехзарядного иона с m/z 465,1425 подтверждает это отождествление. Также наблюдается наличие трехзарядного иона с m/z 886,6705, соответствующего димеру аллоферона с цинком $C_{104}H_{152}N_{44}O_{32}Zn$.

Таким образом, масс-спектрометрическое исследование показывает, что в водной среде аллоферон в сочетании с солями цинка образует комплексные соединения различных форм и составов.

Несмотря на имеющиеся технические ограничения, были получены масс-спектр системы аллоферон - цинк в солевых растворах. На фиг. 6 приведен масс-спектр композиции в 0,9% растворе натрия хлорида. Интенсивность двух- и трехзарядного сигналов с m/z 664,2558 и 443,1728 показывает, что в изотоническом растворе достигается высокое содержание комплексов аллоферона с цинком состава $C_{52}H_{76}N_{22}O_{16}Zn$. Интенсивность сигналов двухзарядного иона комплекса с m/z 664,2558 в спектре фиг. 6 существенно выше, чем для иона аллоферона m/z 633,29776, а трехзарядного m/z 443,1721 на его уровне (m/z 422,53426). Масс-спектр композиции в растворе ацетата натрия аналогичен фиг. 6.

Была исследована зависимость содержания комплексных соединений в растворе аллоферона с цинком от величины рН раствора.

Результаты (фиг. 7-9) показывают, что содержание комплексных соединений аллоферона с цинком зависит от величины рН. При увеличении значения рН в интервале от 4 до 8 наблюдается увеличение интенсивности соответствующих сигналов в масс-спектрах водных растворов комплексных соединений цинка и аллоферона, что может свидетельствовать об увеличении их концентрации в растворе вследствие изменения рН.

Максимальная интенсивность двухзарядного цинкового комплекса m/z 664,2558 наблюдается при рН 8. Сигнал трехзарядного иона комплекса при этом рН отсутствует. Приведенные выше результаты масс-спектрометрических исследований с большой вероятностью показали, что:

аллоферон с солями цинка в водном растворе образует комплексные соединения;

в водном растворе одновременно присутствуют комплексы аллоферона с цинком различного состава и строения, а также свободный аллоферон;

концентрация комплексов зависит от рН раствора, с его ростом их концентрация увеличивается с максимумом при рН 8,0;

концентрация комплексов зависит от соотношения аллоферон - цинк и ионной силы раствора.

Вывод: композиция с максимальной концентрацией комплексных соединений включает аллоферон, соль цинка в количестве равном или большем эквимолекулярного в 0,9% растворе натрия хлорида или натрия ацетата с рН от 6,0 до 8,0.

Пример 2. Потенциометрическое титрование.

Исследуемые растворы имели концентрацию 0,001 М по аллоферону и цинку при мольном соотношении 1:1. Растворитель - 0,9% раствор натрия хлорида. Объем титруемых растворов составлял 30 мл. Для приготовления растворов использовали дигидрат ацетата цинка $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ и безводный хлорид цинка $ZnCl_2$.

Для работы использовался титратор потенциометрический автоматический АТП-02, позволяющий получать кривую титрования в интегральной и дифференциальной формах. Были выполнены титрования как композиции аллоферона с солями цинка, так и растворов исходных компонентов - аллоферона, ацетата и хлорида цинка. Титрование проводилось отдельно в кислую и щелочную область отдельно. Каждое титрование проводилось трижды. Усредненные данные титрований приведены в интегральной (фиг. 10) и дифференциальной (фиг. 11) форме.

Кривая титрования аллоферона имеет два четко выраженных скачка при рН 4,75 и 9,4, которые количественно точно соответствуют присутствию 4-х остатков гистидина и одной концевой $COOH$ -группы.

Кривые титрования смесей аллоферон + соль цинка носят существенно иной характер. Во-первых, введение соли цинка в раствор аллоферона существенно (с 7,5 до 6,5) меняет величину рН раствора. Уже это обстоятельство позволяет предположить наличие взаимодействия между компонентами в изучаемой системе.

Во-вторых, скачки титрования растворов композиций в сравнении с кривой для аллоферона сильно размыты (амплитуда скачка dE/dV на дифференциальных кривых резко уменьшена). В-третьих, на кривых присутствуют новые скачки титрования. Данные отличия невозможно описать путем простого сложения кривых титрования чистого аллоферона и чистых растворов солей цинка (фиг. 10). Дифференциальные кривые (фиг. 11 и более подробно фиг. 12) показывают это более четко. Эти обстоятельства однозначно свидетельствуют о наличии взаимодействия между аллофероном и солями цинка. Таким взаимодействием может быть только комплексообразование. Однако малая амплитуда скачков титрования свидетельствует о слабой связанности аллоферона с цинком.

В кислой области наблюдается исчезновение скачка при pH 4,75, характерного для аллоферона, и возникновение скачка при pH 4,25. Имеется также новый, но очень слабый, скачок при pH 6,5, более выраженный в случае ацетата цинка.

Наиболее важные изменения имеют место в щелочной области. Так практически отсутствует скачок при pH 9,4, характерный как для аллоферона, так и для солей цинка. Это свидетельствует о том, что содержание свободных аллоферона и ионов цинка в растворе в щелочной области не велико. Следовательно, они в основном находятся в составе комплексного соединения друг с другом. При этом возникает два новых скачка: один при pH 8,0, второй около 10,0, которые могут быть интерпретированы как скачки титрования различных форм комплекса. В щелочной области при больших значениях pH (выше 8,0) возможно наличие комплексов с депротонированными формами аллоферона.

Наиболее интересной является узкая область между скачками при pH 6,5 и 8,0. В этой области для незаряженной молекулы аллоферона возможно взаимодействие с солями цинка с образованием структуры хелатного типа.

Полученные данные показывают, что:

аллоферон и соль цинка в растворе вступают во взаимодействие друг с другом, взаимодействие аллоферона и солью цинка с образованием комплексных соединений наблюдается во всем диапазоне pH от 4,0 до 10,0,

область pH от 6,5 до 8,0 является предпочтительной для фармацевтических целей, данные потенциметрического титрования подтверждают закономерности, выявленные при масс-спектрометрических исследованиях (пример 1) системы аллоферон - цинк.

Вывод: аллоферон с цинком в 0,9% растворе натрия хлорида с pH от 6,5 до 8,0 образуют композицию, содержащую максимальную концентрацию комплексных соединений

Пример 3. Приготовление композиций. Композиция 1 (мольное соотношение 1:1).

100 мг аллоферона растворяют в 50 мл 0,9% раствора натрия хлорида или натрия ацетата - раствор 1. Параллельно готовят раствор 17,4 мг ацетата цинка дигидрата (или 10,8 мг хлорида цинка безводного) цинка в 50 мл 0,9% раствора натрия хлорида или натрия ацетата - раствор 2. В раствор 1 постепенно при перемешивании вводят раствор 2. Через 30 мин контролируют pH раствора и доводят его до величины 7,5 с помощью 0,1 М раствора гидроксида натрия или кислоты хлористоводородной. Полученный раствор стерилизуют фильтрацией через фильтр с порами 0,2 мкм, дозируют в ампулы, которые затем запаивают или флаконы, которые герметизируют пробками и колпачками.

Солевые растворы для приготовления композиций получают растворением 9,0 г натрия хлорида или 14,75 г натрия ацетата тригидрата в 1 литре воды очищенной. Растворы стерилизуют автоклавированием и до применения хранят при температуре +4 - 8°C. Композиция 2 (мольное соотношение 1:2).

Приготовление аналогично композиции 1, но берут 34,8 мг ацетата цинка дигидрата (или 21,6 мг хлорида цинка безводного).

Пример 4. Индукция интерферона-гамма (IFN- γ) и интерлейкина-18 (IL-18)

С целью оценки иммуномодулирующей активности (ИА) заявляемых композиций, а также выявления вклада содержащихся в них комплексных соединений, проведено определение уровня индукции цитокинов (IFN- γ и IL-18) как композициями, так и исходными компонентами - аллофероном и солью цинка (ацетатом). Кроме того, была определена индукция цитокинов вызываемая при использовании обоих компонентов (аллоферон и соль цинка), введенных в организм отдельно во времени.

Испытанию были подвергнуты 6 образцов.

1. Аллоферон ("Аллокин-альфа, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения") - препарат сравнения.

2. Композиция 1.

3. Композиция 2.

4. Цинка ацетат.

5. Аллоферон и ацетат цинка, введенные отдельно с интервалом 15 мин.

6. 0,9% раствор натрия хлорида - контроль.

Образцы 1, 2, 3, и 5 имели концентрацию аллоферона 1 мг/мл. Раствор аллоферона в образцах 1 и 5 получали растворением содержимого ампулы препарата "Аллокин-альфа" (1 мг аллоферона) в 1 мл раствора натрия хлорида 0,9%. Раствор ацетата цинка в примерах 4 и 5 имел концентрацию 0,17 мг/мл (соответственно концентрации в композиции 1). Для определения фонового количества IFN- γ и IL-18 в сыворотке крови исследуемых животных использовался раствор натрия хлорида 0,9%.

Для экспериментов использовались мыши линии BALB/C, самки, массой 16-22 г, возраста 18 недель, разбитые на 6 групп по 15 особей в каждой. Образцы вводили однократно подкожно в дозе из расчета 1 мг аллоферона на 1 кг тела лабораторного животного. Компоненты образца 5 вводили отдельно с интервалом 15 мин. Количество вводимого ацетата цинка (образцы 4 и 5) соответствовало его количеству в композиции 1.

Уровень интерферона-гамма в сыворотке крови определялся путем твердофазного гетерогенного иммунного анализа с использованием специфических антител через 3 ч после введения образца, когда

наблюдается максимальный уровень индукции IFN- γ . Для определения индукции интерлейкина-18 была использована методика, описанная в патенте RU 2482866, временной точкой определения уровня IL-18 исходя из данных этой работы выбрано 36 ч после введения образца. В случае контрольной группы доверительный интервал рассчитывался по измерениям разведения одного и того же образца. В опытных группах доверительный интервал вычислялся относительно трех образцов от трех животных на каждую измеряемую точку. Результаты тестирования исследуемых образцов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Концентрация интерферона-гамма и интерлейкина-18 в сыворотке крови

№	Образец	Гамма-интерферон через 3 часа (пг/мл сыворотки)	Интерлейкин-18 через 36 часов (пг/мл сыворотки)
1	Аллоферон	95±16	360±20

2	Композиция 1	140±20	402±20
3	Композиция 2	148±20	422±25
4	Аллоферон + цинк (раздельное введение)	120±15	354±15
5	Цинка ацетат	82±8	194±12
6	0,9% раствор натрия хлорида, контроль	32±8	186±12

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы.

Выводы.

1. Изученные композиции обладают специфической способностью к индукции IFN- γ и IL-18.
2. Композиции, содержащие комплексы аллоферона с цинком вызывают индукцию цитокинов, существенно превышающую уровень цитокинов, вызываемый аллофероном.
3. Максимальный уровень индукции цитокинов вызывает композиция 2 с соотношением аллоферон:цинк 1:2.
4. Иммуностимулирующая активность композиций не является результатом сложения активностей исходных компонентов, что свидетельствует о вкладе образующихся комплексных соединений в активацию иммунной системы.

Пример 5. Противовирусная активность композиций на модели герпетической инфекции у мышей

Проведена оценка защитного действия разработанных композиций на модели герпетической инфекции. В качестве препаратов сравнения использованы: 1/ "Аллокин-альфа, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения" - лекарственный препарат, используемый в терапии генитального герпеса, содержащий 1 мг аллоферона на ампулу, 2/ "Ацикловир" - лекарственный препарат, используемый при стандартной терапии герпеса.

Белых беспородных мышей (самки) массой 16-20 г получали из питомника "Рапполово" (Ленинградская обл.) и содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария. Подбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки. Животные были разделены на 5 групп по 20 животных: четыре опытные, в которых животные получали инъекции композиции 1, композиции 2, препарата "Аллокин-альфа", препарата "Ацикловир", соответственно, и одна контрольная, в которой животные получали инъекции 0,9% раствора натрия хлорида.

В исследовании использован вирус простого герпеса 2 типа (HSV-2) штамм G (ATCC VR-734). Инфицирование производилось вагинально. Повреждение вагинального эпителия осуществляли при помощи скарификатора для влагалищных мазков, после чего животных инфицировали вирусом в дозе $1,7 \times 10^5$ TCID₅₀ в объеме 30 мкл.

"Аллокин-альфа" и композиции 1 и 2 вводили животным внутривенно в дозе 1,25 мг/кг один раз в сутки в течение 3 дней после заражения по лечебной схеме: через 1, 2 и 3 суток после заражения. "Ацикловир" вводили по той же схеме в дозе 50 мг/кг. Контрольная группа животных получала инъекцию 0,9% раствора натрия хлорида.

Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней. Ежедневно фиксировали смертность животных в контрольной и опытных группах. На основании полученных данных в каждой группе рассчитывали процент смертности М (отношение числа павших за 14 дней животных к общему числу зара-

женных животных в группе) и индекс защиты IP (отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту летальности в контрольной группе).

$$M = N_{14} / N \times 100\%$$

Где:

N_{14} - число животных, павших в группе на 14 день после заражения,

N - общее число животных в группе;

$$IP = M_c - M_e / M_c \times 100\%$$

где M_c и M_e - летальность, выраженная в процентах в опытной и контрольной группах. Данные, полученные в эксперименте, представлены в табл. 2.

Таблица 2

Протективный эффект изученных препаратов на модели герпетической инфекции у мышей

Препарат	N	Результаты эксперимента		
		N_{14}	M (%)	IP (%)
Композиция 1	20	3	15,0	75,0
Композиция 2	20	2	10,0	83,3
Аллокин-альфа	20	4	20,0	66,7
Ацикловир	20	3	15,0	75,0
Контроль	20	12	60,0	-

Вывод.

1. Заявляемые композиции, содержащие комплексные соединения аллоферона с цинком, где концентрация растворов аллоферона и соли цинка подобрана таким образом, что молярное соотношение компонентов аллоферона и соли цинка составляет от 1:1 до 1:2, демонстрируют высокую противовирусную активность, обеспечивая по отношению к вирусу герпеса защитное действие, превосходящее эффект исходного аллоферона (препарат "Аллокин-альфа").

2. Протективное действие композиций, применяемых в дозе 1,25 мг/кг равно (композиция 1) или превышает (композиция 2) эффективность стандартного противогерпетического препарата "Ацикловир" в дозе 50 мг/кг.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, обладающая противовирусной и иммуномодулирующей активностью, содержащая в качестве активных веществ аллоферон и цинк, отличающаяся тем, что ее активным началом является смесь биологически активных комплексных соединений, образуемых взаимодействием олигопептида аллоферон с ионами цинка в 0,9% растворах натрия хлорида или натрия ацетата с последующей корректировкой pH до величины от 6,5 до 8,0, причем цинк и аллоферон в растворе образуют комплексные соединения различного состава, а концентрация аллоферона и хлорида цинка или ацетата подобрана таким образом, что их молярное соотношение составляет от 1:1 до 1:2.

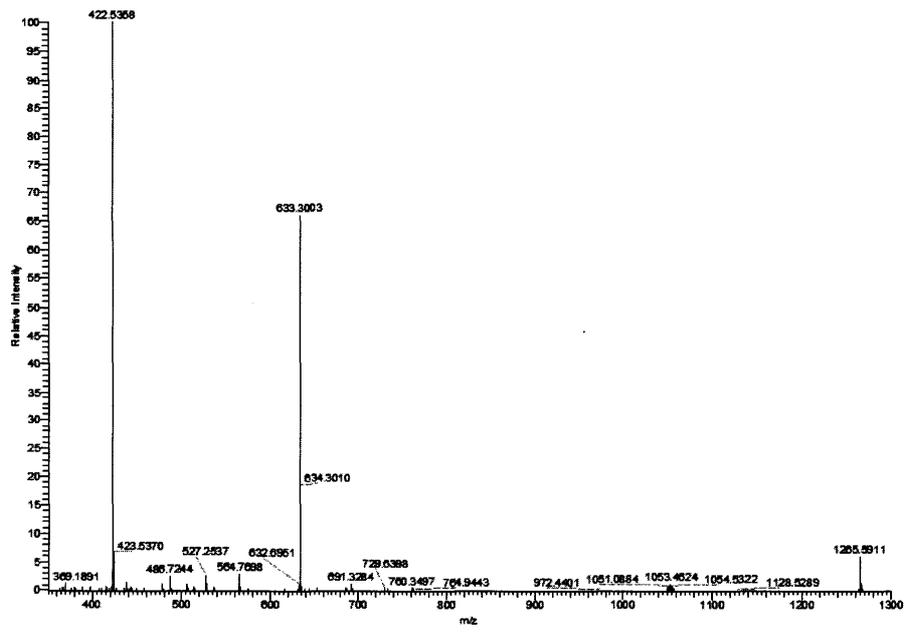
2. Способ получения фармацевтической композиции по п.1, состоящий в том, что при приготовлении композиции сначала готовят первый раствор, который получают растворением аллоферона в растворе натрия хлорида или натрия ацетата, параллельно готовят второй раствор, который получают растворением ацетата цинка или хлорида цинка в растворе натрия хлорида или натрия ацетата; после чего в первый раствор постепенно при перемешивании вводят второй раствор; через 30 мин контролируют pH раствора и доводят его до величины 6,5-8,0 (преимущественно 7,5) с помощью 0,1 М раствора гидроксида натрия или кислоты хлористоводородной; полученный раствор стерилизуют фильтрацией через фильтр с порами 0,2 мкм, дозируют в ампулы или флаконы, которые затем герметизируют.

3. Способ по п.2 отличающийся тем, что обеспечивают конечные концентрации компонентов композиции: аллоферон - 1 мг/мл, соль цинка - от 0,052 до 0,104 мг цинка/мл.

4. Способ по п.2 отличающийся тем, что первый раствор аллоферона готовят с концентрацией 2 мг/мл в 0,9% растворе натрия хлорида или натрия ацетата, а второй раствор готовят в равном объеме раствора ацетата цинка или хлорида цинка с концентрацией 0,104 мг цинка/мл в 0,9% растворе натрия хлорида или натрия ацетата.

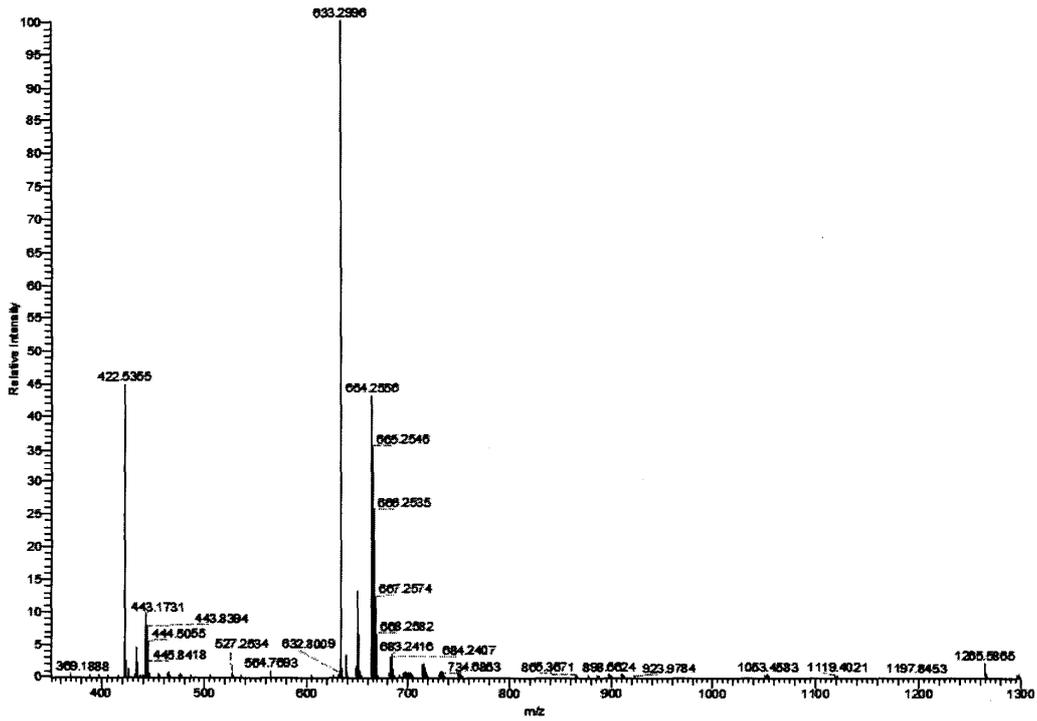
5. Способ по п.2 отличающийся тем, что первый раствор получают растворением 100 мг аллоферона в 50 мл 0,9% раствора натрия хлорида или натрия ацетата, а второй раствор получают растворением 34,8 мг ацетата цинка дигидрата или 21,6 мг хлорида цинка безводного в 50 мл 0,9% раствора натрия хлорида или натрия ацетата.

#19884 AV:10 IT:35.456 ST:1.57 uS:3 CS:3 AMN:1264.58 NL:8.33E7
F: FTMS + cHESI Fullms [360.00-1300.00]



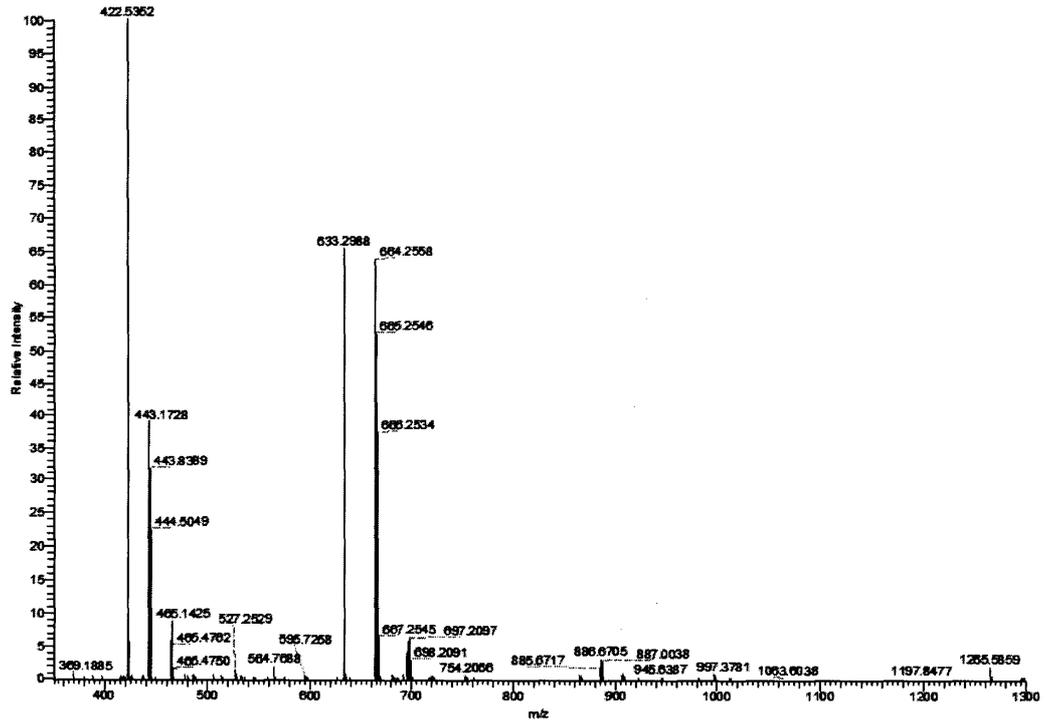
Фиг. 1

#24889 AV:10 IT:5.231 ST:1.47 uS:3 CS:2 AMN:1264.58 NL:4.03E7
F: FTMS + cHESI Fullms [360.00-1300.00]



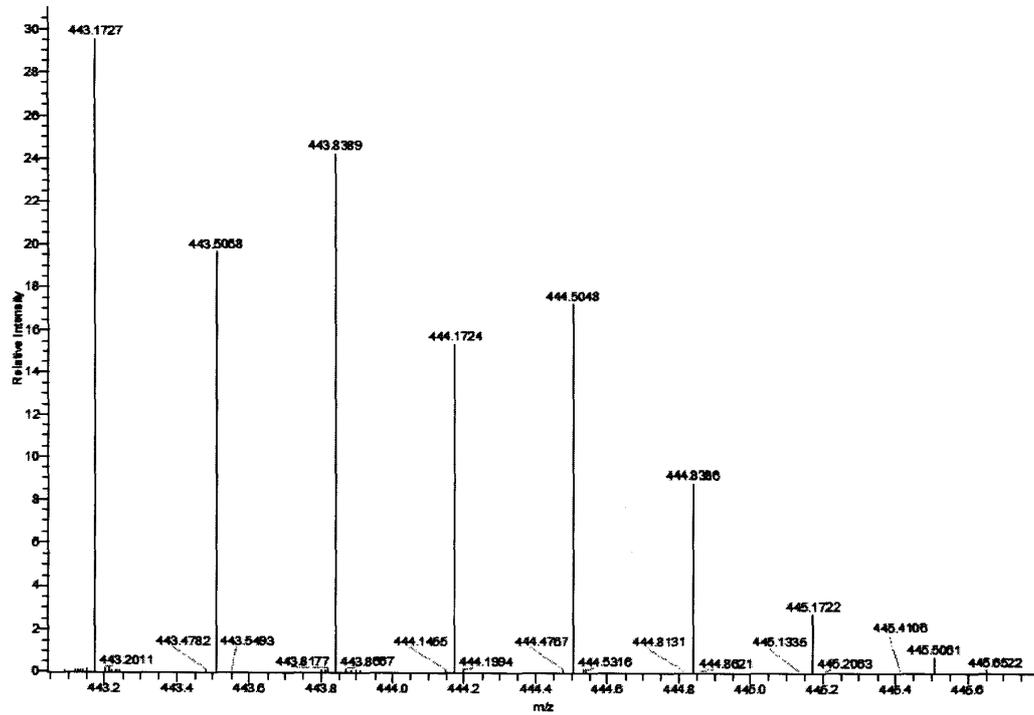
Фиг. 2

#20314 AV:10 IT:0.703 ST:1.45 uS:3 CS:3 AMW:1204.58 NL:1.25E8
F: FTMS + cHESI Full ms [350.00-1300.00]



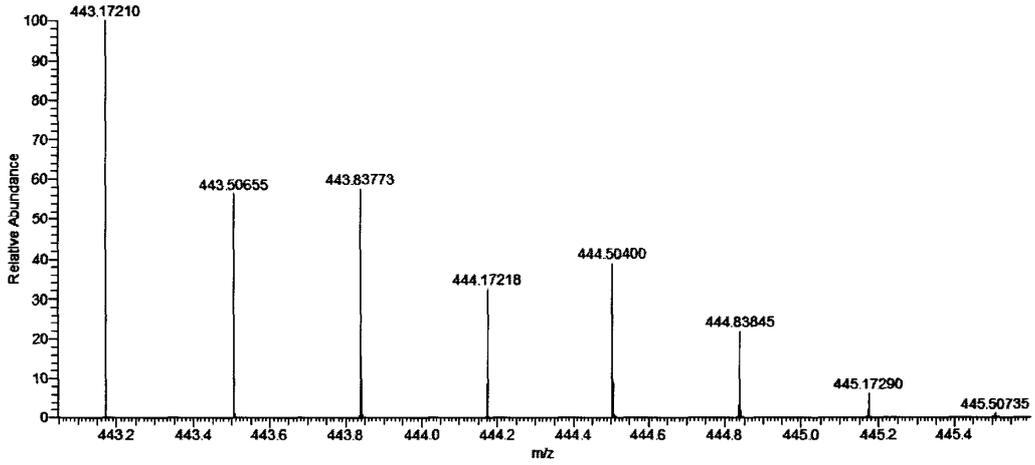
Фиг. 3

#20536 AV:10 IT:0.694 ST:1.46 uS:3 CS:3 AMW:1204.58 NL:1.29E8
F: FTMS + cHESI Full ms [350.00-1300.00]



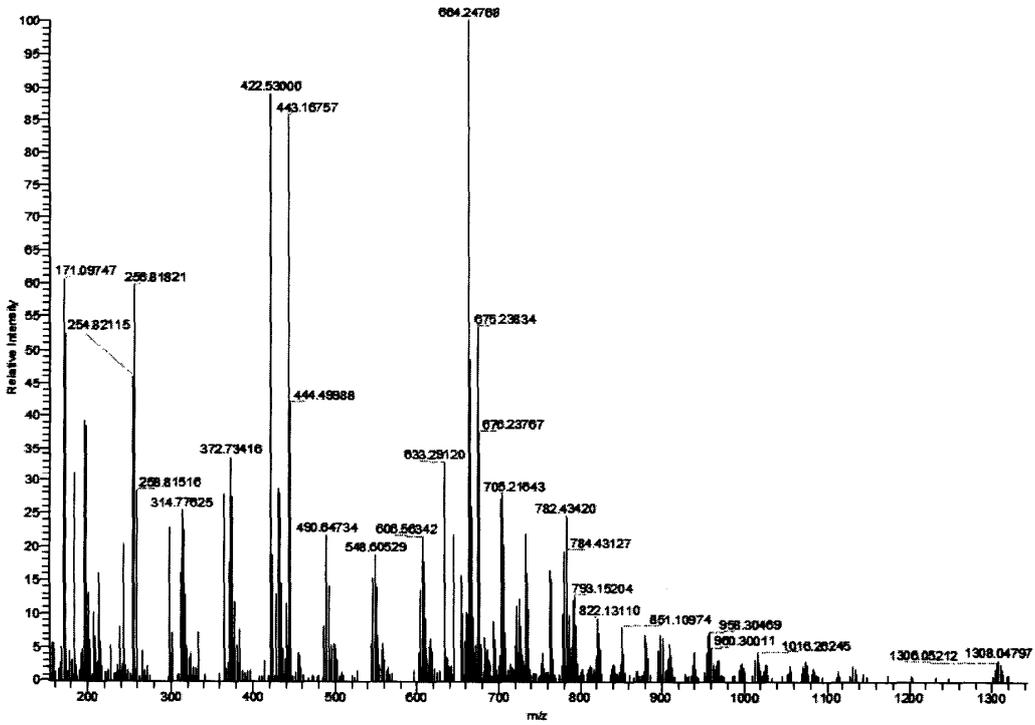
Фиг. 4

C52H74N22O16Zn +H: C52H77N22O16Zn1 pa Chrg 3



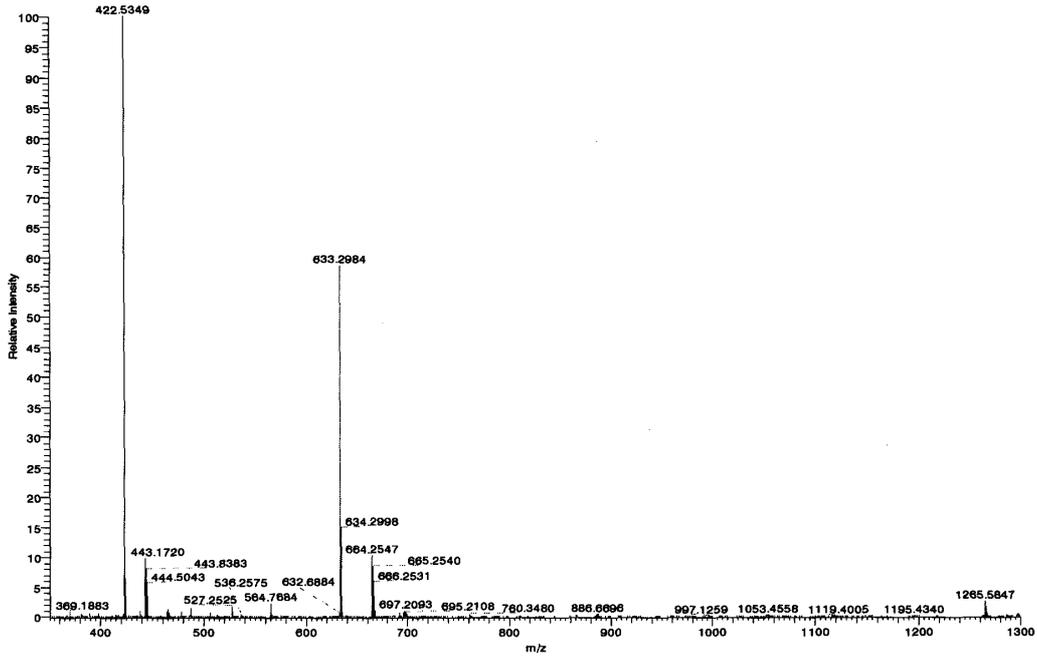
Фиг. 5

#12936 AV:10 IT:30.000 ST:1.55 uS:3 CS:2 AMW:1326.48 NL:2.38E5
F: FTMS + cHESI Fullms [150.00-2000.00]



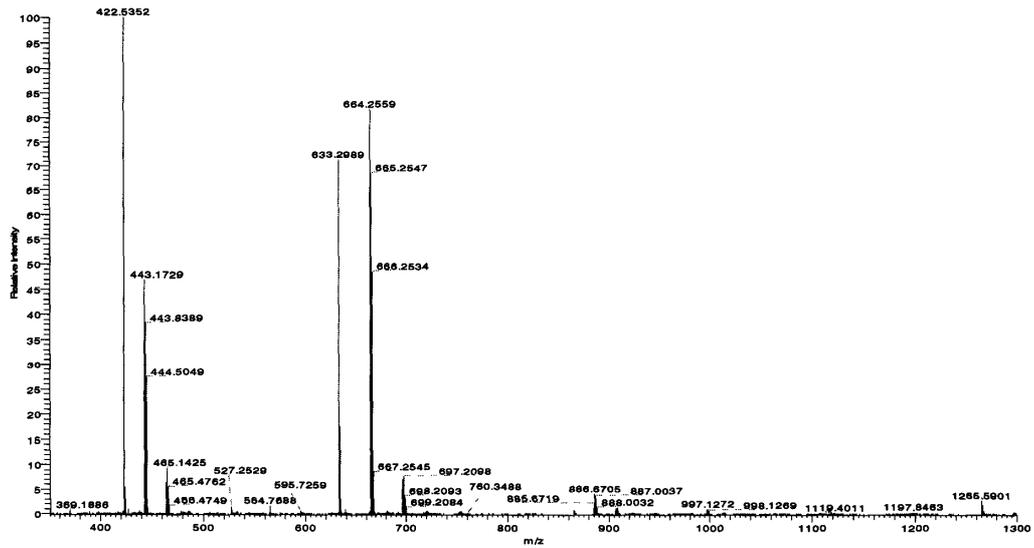
Фиг. 6

#23898 AV: 10 IT: 1.320 ST: 1.45 uS: 3 CS: 3 AMW: 1264.58 NL: 1.05E8
F: FTMS + cHESI Full ms [350.00-1300.00]



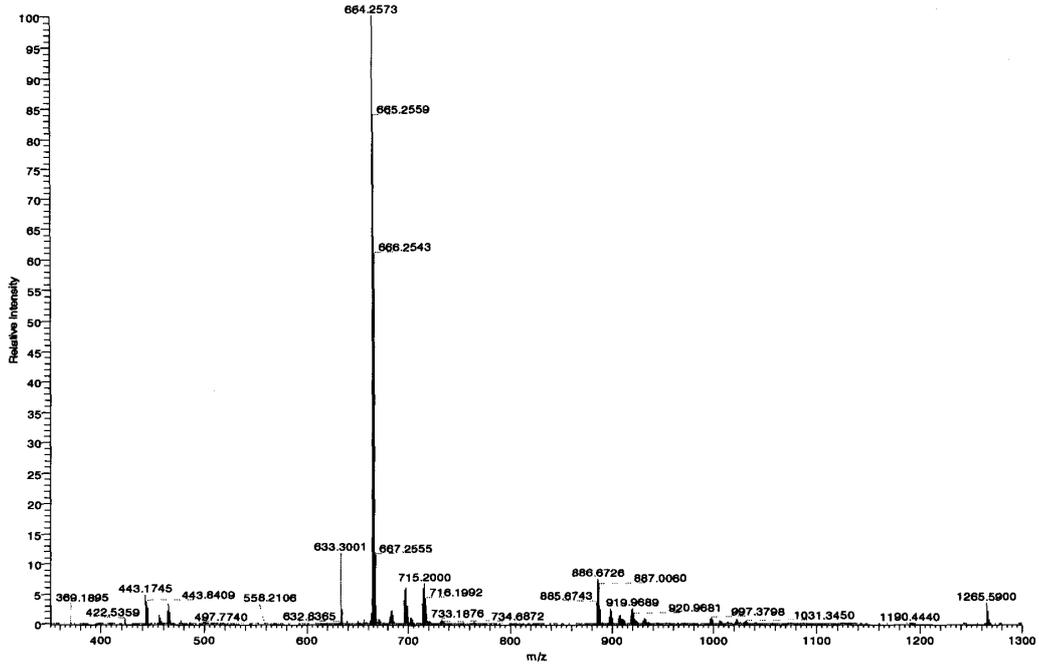
Фиг. 7

#24391 AV: 10 IT: 0.828 ST: 1.46 uS: 3 CS: 3 AMW: 1264.58 NL: 8.50E7
F: FTMS + cHESI Full ms [350.00-1300.00]

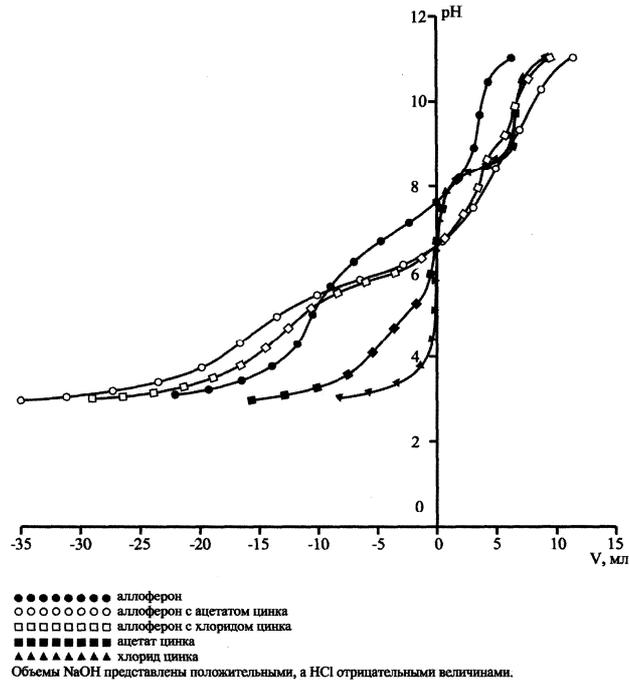


Фиг. 8

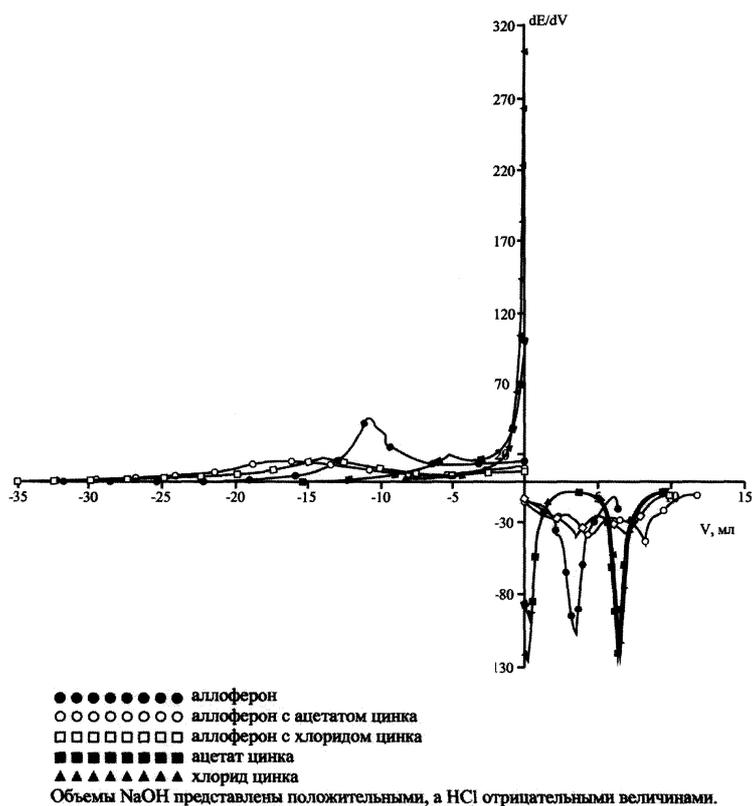
#25143 AV: 10 IT: 11.230 ST: 1.50 uS: 3 CS: 2 AMW: 1326.50 NL: 1.11E7
 F: FTMS + cHESI Full ms [350.00-1300.00]



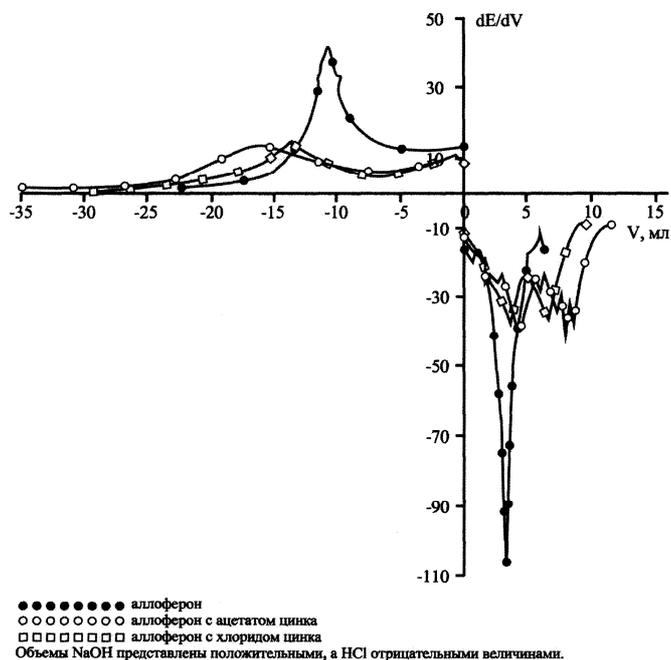
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2