



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0048888

(51)^{2020.01} C07K 5/037; A61K 38/05; A61P 37/08; (13) B
C07F 3/06; A61K 31/315; A61P 17/00

(21) 1-2021-01505

(22) 22/08/2019

(86) PCT/RU2019/050135 22/08/2019

(87) WO2020/040670 27/02/2020

(30) 2018130491 22/08/2018 RU

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/05/2021 398A

(73) OBSHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTIYU "Z
THERAPEUTICS" (RU)

Skolkovo Innovation Centre, Bolshoj Blvd., d. 42, Bldg. 1, floor 2, part of off. 771,
Moscow, 121205, Russia

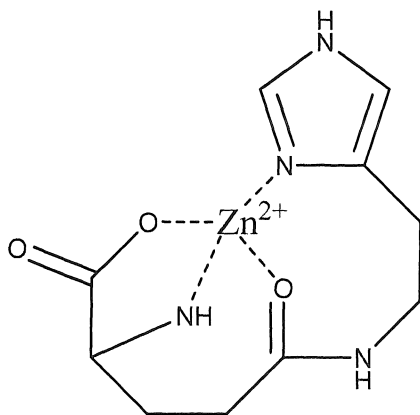
(72) NEBOLSIN, Vladimir Evgenievich (RU).

(74) CÔNG TY TRÁCH NHIỆM HỮU HẠN TƯ VẤN ĐẦU TƯ VÀ SỞ HỮU TRÍ TUỆ
INTERFIVE (INTERFIVE CO., LTD)

(54) PHỨC HỢP KẼM, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHỨC
HỢP KẼM NÀY

(21) 1-2021-01505

(57) Sáng chế đề cập đến phức hợp kẽm gamma-L-glutamylhistamin với tỷ lệ kim loại/phối tử là 1/1. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức:



Phức hợp theo theo sáng chế giúp phục hồi chức năng hàng rào bảo vệ của biểu mô và ngăn chặn hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế phức hợp và sử dụng phức hợp kẽm nói trên cho việc điều trị bệnh viêm da cơ địa và các bệnh khác có liên quan đến chức năng hàng rào của biểu mô bị suy yếu và sự phát triển của các phản ứng viêm bất thường. Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng phức hợp đã được điều chế để ức chế glutaminyl xyclaza. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất được phẩm có chứa một lượng hiệu quả hợp chất theo sáng chế để điều trị bệnh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin giúp phục hồi chức năng hàng rào bảo vệ của biểu mô và ngăn chặn hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến việc điều chế và sử dụng phức hợp kẽm được chỉ định cho việc điều trị viêm da cơ địa và các bệnh khác có liên quan đến chức năng hàng rào biểu mô bị suy yếu và sự phát triển của phản ứng viêm bất thường.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hàng rào biểu mô đóng một vai trò quan trọng trong cơ thể người và động vật. Hàng rào biểu mô ngăn chặn sự thâm nhập của các chất, các dị nguyên, và các vi khuẩn khác nhau vào môi trường bên trong cơ thể. Sự suy yếu chức năng hàng rào bảo vệ của biểu mô góp phần đáng kể vào cơ chế sinh bệnh của một số bệnh như bệnh viêm khoang miệng (viêm miệng, viêm nướu, viêm họng, v.v.), các bệnh về đường tiêu hóa (viêm ruột kết, viêm ruột non, tự nhiễm độc đường ruột, hội chứng ruột kích thích, hội chứng kém hấp thu, tiêu chảy tái diễn, v.v.), các bệnh dị ứng (viêm mũi dị ứng, hen phế quản, viêm da cơ địa, v.v.) [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]. Với vai trò quan trọng của chức năng hàng rào bảo vệ của biểu mô trong sự phát triển các bệnh viêm và dị ứng, giải pháp nhằm phục hồi chức năng hàng rào bảo vệ của biểu mô có tầm quan trọng bậc nhất trong việc điều trị nhiều bệnh lý ở người. Cụ thể là, liệu pháp tại chỗ có tầm quan trọng hàng đầu trong việc điều trị viêm da cơ địa, nhằm phục hồi các biểu mô đã bị tổn thương, cải thiện chức năng hàng rào bảo vệ của da, hydrat hóa da, cũng như ngăn ngừa và loại trừ nhiễm trùng thứ phát [Pediatrics. Tháng 12/2014; 134 (6): e1735-44].

Kẽm là một yếu tố vi lượng quan trọng giúp duy trì chức năng hàng rào bảo vệ của da, vì vậy các đặc tính kháng viêm, chống oxy hóa và kháng khuẩn của nó đã làm cho nó trở thành một trong những yếu tố vi lượng được sử dụng nhiều nhất trong khoa da liễu [FEMS Microbiol Lett. Tháng 02/2008; 279 (1): 71-76]. Kẽm là một thành phần thiết yếu của ma trận proteinaza kim loại, kiểm soát quá trình tái tạo biểu mô và là nhân tố quan trọng trong việc tăng trưởng tế bào biểu mô, chữa lành vết thương và duy trì chức năng của lớp màng bảo vệ da [Front Biosci (Landmark Ed). 01/03/2017; 22: 1469-1492]. Các nghiên cứu gần

đây đã chỉ ra rằng mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng viêm da cơ địa tương quan nghịch với nồng độ kẽm trong hồng cầu của các bệnh nhân [Postepy Dermatol Alergol. Tháng 10/2016; 33 (5): 349-352]. Ngoài ra, việc sử dụng hợp chất kẽm làm giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng viêm da cơ địa theo các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng [Biol Trace Elem Res. Tháng 09/2017; 179 (1): 110-116; Clin Cosmet Investig Dermatol. 06/05/2013; 6: 115-21; Acta Derm Venereol. Tháng 09/2014; 94 (5): 558-62]. Nó đã được chứng minh trên các mẫu động vật bị viêm da cơ địa là việc sử dụng hợp chất kẽm giúp khôi phục độ dày của biểu mô và làm giảm mức độ nghiêm trọng của tình trạng viêm cục bộ của da [Dermatol Ther. 17/07/2018; e12659].

Cần lưu ý rằng việc làm suy yếu chức năng hàng rào bảo vệ của biểu mô trong nhiều trường hợp có liên quan đến sự phát triển của phản ứng viêm bất thường, do vậy, gây ra sự phá hủy hơn nữa các tế bào và sự suy thoái chức năng hàng rào bảo vệ của biểu mô. Ví dụ, ở những bệnh nhân bị viêm da cơ địa, việc làm suy yếu chức năng hàng rào bảo vệ của da dẫn đến sự xâm nhập của các vi khuẩn cơ hội, bao gồm *S. Aureus* [Br J Dermatol. Tháng 12/1998; 139 Suppl 53: 13-6]. Sự nhiễm khuẩn của da do các vi sinh vật cơ hội dẫn đến sự phát triển của phản ứng viêm quá mức và hiện tượng hóa hướng động bất thường của các tế bào miễn dịch (chủ yếu là các tế bào lympho, bạch cầu ái toan, tế bào tua và tế bào mast) sản xuất ra các cytokin gây viêm. Các cytokin gây viêm và các loài ôxy phản ứng tiết ra bởi các tế bào miễn dịch gây ra sự suy giảm hơn nữa chức năng của lớp màng bảo vệ da, vốn có vai trò tự duy trì phản hồi tích cực, do đó đảm bảo tiến trình bệnh chuyển sang giai đoạn mãn tính [J. Clin. Diagn. Res. Tháng 12/2013; 7 (12): 2683-2685]. Vì vậy, việc ngăn chặn hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch bằng cách ức chế hóa hướng động, theo đó có thể là điểm mấu chốt trong việc điều trị bệnh viêm da cơ địa, cũng như các bệnh khác ở người và động vật.

Các chemokin thuộc họ CCL (CCL2, CCL7, CCL8, CCL13) là những yếu tố mạnh đối với hóa hướng động của các bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, bạch cầu ái toan, tế bào lympho T và tế bào tua ở động vật có vú [Biochem. J. 01/03/2012; 442 (2): 403-12; Postepy Dermatol. Alergol. Tháng 05/2014; 31 (2): 84-91]. Các thành viên thuộc họ CCL (CCL2, CCL7, CCL8, CCL13), fractalkin, cũng như một số các hormon khác và các protein bài tiết chứa dư lượng axit pyroglutamic (pE) có vai trò bảo vệ, chống lại sự phân hủy do các aminopeptidaza [Chem Immunol. 1999; 72: 42-56; Biochemistry. 05/10/1999; 38 (40): 13013-25]. Pyroglutamin hóa có dư lượng đầu cuối N được xúc tác bởi enzym glutaminyl

xyclaza (QPCT hoặc QC) [J Biol Chem. 12/12/2003; 278 (50): 49773-9; J Mol Biol. 20/06/2008; 379 (5): 966-80]. Trong quá trình nghiên cứu thử nghiệm, nó đã được chứng minh là sự ức chế glutaminyl xyclaza dẫn đến sự giảm mạnh hoạt tính hóa ứng động của các dạng không pyroglutamin hóa của chemokin CCL2, CCL7, CCL8 và CCL13 [Biochem. J. (2012) 442, 403-412) và fractalkin (Biosci Rep. Tháng 08/2017 23; 37 (4)]. Do đó, pyroglutamin hóa chemokin thuộc họ CCL là một bước cần thiết đối với hóa hướng động qua trung gian CCL của các tế bào miễn dịch, vì thế giải pháp nhằm ức chế glutaminyl xyclaza có thể cho thấy là một giải pháp khả thi để điều chỉnh phản ứng viêm bất thường và làm giảm hoạt tính của các tế bào miễn dịch.

Cho đến nay, các phức hợp kẽm làm chất ức chế glutaminyl xyclaza, cũng như việc điều chế và sử dụng chúng để điều trị bệnh, vẫn chưa từng được nhắc đến. Cùng thời điểm đó, các chất ức chế glutaminyl xyclaza đã được biết đến bao gồm sunfolipit [WO 2017/046256, công bố 23/03/2017, HOCHSCHULE ANHALT, DE], dẫn xuất flavonoid [Bioorg Med Chem. 15/05/2016 15; 24 (10): 2280-6], dẫn xuất pyridin [US 2015/0291632, công bố 15/10/2015, Dow AgroSciences LLC, US] và một vài phân tử nhỏ được nhắc đến gần đây [J. Med. Chem. 23/03/2017; 60 (6): 2573-2590; WO 2014/193974, US 2015/0291557]. Ngoài ra, các chất ức chế glutaminyl xyclaza đã được mô tả trong các công bố của Công ty Probiodrug Aktiengesellschaft [J. Biol. Chem. 23/12/2003; 278 (50): 49773-9]. Những bài viết này mô tả các chất ức chế glutaminyl xyclaza dựa trên các dẫn xuất imidazol. Tuy nhiên, các công bố của Probiodrug Aktiengesellschaft không đề cập đến phức hợp kẽm là chất ức chế glutaminyl xyclaza, cấu trúc của hợp chất được công bố bởi Công ty Probiodrug Aktiengesellschaft bao gồm imidazol có chứa nhóm thế béo ở một trong các nguyên tử nitơ. Việc đưa nhóm thế béo vào làm giảm tính ổn định chuyển hóa của các hợp chất. Ngoài ra, sự hiện diện của nhóm thế béo làm tăng tính không ưa nước của các hợp chất và tăng sinh khả dụng toàn thân của các hợp chất, điều này là hoàn toàn không cần thiết cho việc điều trị bệnh viêm da cơ địa và các bệnh khác có liên quan đến chức năng hàng rào của biểu mô bị suy yếu.

Cho đến nay, chưa có một dược phẩm nào được biết đến dựa trên phức hợp kẽm là chất ức chế glutaminyl xyclaza được sử dụng cho việc điều trị bệnh viêm da cơ địa hoặc các bệnh khác có liên quan đến chức năng hàng rào của biểu mô bị suy yếu và/hoặc hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch, do đó, nhu cầu về việc phát triển dược phẩm mới hiệu quả và sử dụng nó để điều trị bệnh dựa trên phức hợp kẽm làm chất ức chế glutaminyl

xyclaza vẫn chưa được đáp ứng.

Mục đích của sáng chế là đề xuất một hợp chất hóa học mới hiệu quả có tác dụng khôi phục chức năng hàng rào bảo vệ của biểu mô và có khả năng ức chế enzym glutaminyl xyclaza trong việc điều trị viêm da cơ địa hoặc các bệnh khác có liên quan tới chức năng hàng rào bảo vệ của biểu mô bị suy yếu và hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch.

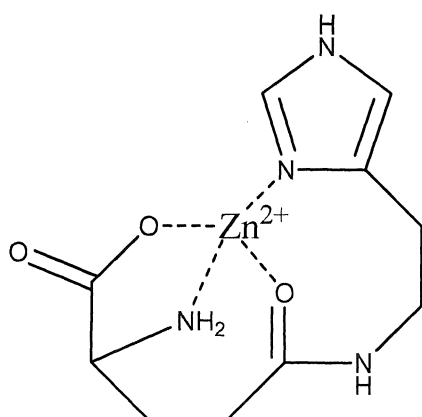
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là phát triển một loại dược phẩm mới có hiệu quả cho việc điều trị bệnh có liên quan đến chức năng hàng rào bảo vệ của biểu mô bị suy yếu và hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch, cụ thể là bệnh viêm da cơ địa, cũng như các bệnh khác.

Giải pháp kỹ thuật của sáng chế là cung cấp một hợp chất hóa học mới có hiệu quả cho việc điều trị bệnh viêm da cơ địa, cũng như các bệnh khác có liên quan đến chức năng hàng rào của biểu mô và/hoặc hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch.

Đạt được giải pháp kỹ thuật cụ thể bằng cách cung cấp hợp chất có chứa phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin (tỷ lệ kim loại:phối tử = 1:1).

Dựa trên các nghiên cứu đã thực hiện, được mô tả chi tiết trong bản mô tả này, chủ đơn đề xuất cấu trúc của phức hợp thu được có thể được mô tả bằng công thức có cấu trúc sau:



Phức hợp kẽm được chỉ định (Hợp chất I) hoặc hydrat, solvat, hoặc muối được dùng của nó, có hiệu quả cho việc điều trị bệnh viêm da cơ địa, cũng như các bệnh khác có liên quan đến chức năng hàng rào của biểu mô bị suy yếu và hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch.

Một giải pháp kỹ thuật khác của sáng chế là việc sử dụng phức hợp kẽm với gamma-

L-glutamylhistamin đã điều chế (Hợp chất I) hoặc hydrat/solvat của nó để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm da cơ địa, cũng như các bệnh khác có liên quan đến chức năng hàng rào của biểu mô bị suy yếu và hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch.

Một giải pháp kỹ thuật khác của sáng chế là việc sử dụng phức hợp kèm với gamma-L-glutamylhistamin hoặc hydrat, solvat, hoặc muối được dùng của nó để bào chế được phẩm ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh rối loạn có liên quan đến hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch, cụ thể là liên quan đến hóa hướng động bất thường của các tế bào miễn dịch.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất được phẩm để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm da cơ địa, cũng như các bệnh khác có liên quan đến chức năng hàng rào của biểu mô bị suy yếu và hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch có chứa một hàm lượng thích hợp hợp chất theo sáng chế và ít nhất một tác nhân/tá dược được dùng. Trong một vài phương án, tác nhân là chất mang và/hoặc tá dược được dùng.

Sáng chế cũng bao gồm phương pháp để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm da cơ địa, cũng như các rối loạn khác có liên quan đến chức năng hàng rào của biểu mô bị suy yếu và hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch trong cơ thể, phương pháp bao gồm việc cho đối tượng dùng được phẩm theo sáng chế. Trong các trường hợp cụ thể theo phương án của sáng chế, đối tượng là người hoặc động vật.

Phức hợp kèm với gamma-L-glutamylhistamin không được nhắc đến trong phần tình trạng kỹ thuật, tuy nhiên, pseudopeptit gamma-L-glutamylhistamin đã được biết đến, lần đầu tiên được tách ra ở dạng vết từ các mô thần kinh của chuột và động vật thân mềm [J. Neurochem. -1976. -vol. 27. -pp. 1461-1463; J. Neurochemistry. -1977. -vol. 29. -pp. 633-638.]. Việc sản xuất gamma-L-glutamylhistamin được mô tả trong Bằng sáng chế RU2141968, công bố ngày 27/11/1999. Việc sử dụng một loại kem dựa trên gamma-L-glutamylhistamin được mô tả trong Bằng sáng chế RU 2233152, công bố ngày 27/07/2004.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1. Phổ hồng ngoại của mẫu pseudopeptit (phối tử) gamma-L-glutamylhistamin.

FIG. 2. Phổ hồng ngoại của mẫu chế phẩm được điều chế bằng cách trộn dung dịch kèm clorua và gamma-L-glutamylhistamin theo Ví dụ 1.

FIG. 3. Phổ hồng ngoại của mẫu phức hợp kèm với gamma-L-glutamylhistamin theo

Ví dụ 2.

FIG. 4. Phổ hồng ngoại của mẫu phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin liên quan đến Ví dụ 3, Tổng hợp "A"

FIG. 5. Phổ hồng ngoại của mẫu phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin liên quan đến Ví dụ 3, Tổng hợp "B"

FIG. 6. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của mẫu 1H chứa phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin theo Ví dụ 2.

FIG. 7. Tác dụng dược lý của kem có chứa Hợp chất I (0,01%) dùng cho các tổn thương da ở mô hình chuột viêm da cơ địa theo dữ liệu phân tích mô học.

FIG. 8. Các phần mô học của da của tai chuột bị ảnh hưởng (mô hình động vật viêm da cơ địa).

Mô tả chi tiết sáng chế

Như đã được chỉ ra trên đây, trong khi không có phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin nào được mô tả trong phần tình trạng kỹ thuật, pseudopeptit gamma-L-glutamylhistamin được biết đến là một chất lần đầu tiên được tách ra từ các mô thần kinh của chuột và động vật thân mềm ở dạng vết [J. Neurochem. -1976. -vol. 27.-pp. 1461-1463; J. Neurochemistry. -1977. -vol. 29. -pp. 633-638]. Việc bào chế gamma-L-glutamylhistamin cũng được mô tả trong Bằng sáng chế RU 2141968. Những tài liệu này mô tả gamma-L-glutamylhistamin là một pseudopeptit có tác dụng chống ôxy hóa, chống nhiễm trùng, điều hòa lipid, giảm glucoza huyết, chống hen suyễn, kháng virus, kháng khuẩn, chống u bướu, kháng viêm, chống di căn, giúp thích ứng, có khả năng điều chỉnh sự chuyển hóa của axit arachidonic, ngăn ngừa các biểu hiện của bệnh đái tháo đường, chứng béo phì, bệnh động mạch vành, tình trạng căng thẳng, bệnh viêm gan, bệnh xơ gan, tổn thương gan nhiễm độc, chứng nghiện rượu, tổn thương do bức xạ, và những thay đổi về tuổi già.

Cùng thời điểm đó, những tài liệu này không cung cấp bất kỳ dữ liệu nào về phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin, phương pháp điều chế nó hoặc dữ liệu nghiên cứu về hoạt tính sinh học của nó. Đồng thời, cũng được lưu ý là phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin không thể thu được bằng cách đơn thuần trộn muối kẽm và gamma-L-glutamylhistamin, từ đó trong điều kiện này, hỗn hợp muối kẽm và gamma-L-glutamylhistamin tự do được tạo thành.

Với sáng chế này, tác giả/chủ đơn đã phát triển phương pháp sản xuất phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin ổn định có tỷ lệ kim loại/phối tử là 1/1.

(Hợp chất I).

Trong quá trình nghiên cứu, dựa trên hoạt tính dược lý cụ thể của phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin (Hợp chất I) điều chế bởi chủ đơn, ở mô hình viêm da cơ địa, nó đã chỉ ra rằng Hợp chất I cho thấy có hoạt tính chữa trị cao hơn đáng kể so với phối tử tự do gamma-L-glutamylhistamin. Việc sử dụng Hợp chất I (0,01% theo trọng lượng kem) cho da làm giảm dòng tế bào viêm (các bạch cầu đơn nhân, các tế bào tua, các bạch cầu ái toan và các bạch cầu trung tính) nhập vào lớp thượng bì và hạ bì của da về mức như ở động vật nguyên vẹn, cũng như làm giảm các biểu hiện vi mô khác của bệnh viêm da cơ địa. Do đó, Hợp chất I đã chứng minh là có ảnh hưởng đến hóa hướng động của các tế bào miễn dịch. Việc làm giảm dòng tế bào miễn dịch có thể được sử dụng trong việc điều trị một số bệnh có liên quan đến hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch.

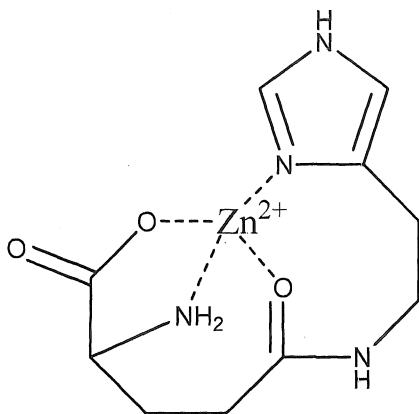
Các nghiên cứu được thực hiện bởi chủ đơn đã chỉ ra rằng hiệu quả điều trị quan sát được của Hợp chất I có liên quan đến khả năng của hợp chất này trong việc ức chế hoạt tính của glutaminyl xyclaza.

Vì vậy, Hợp chất I (phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin có tỷ lệ kim loại/phối tử 1/1) là một hợp chất hóa học mới hữu dụng cho việc điều trị bệnh viêm da cơ địa và các bệnh khác có liên quan đến chức năng hàng rào biểu mô bị suy yếu và hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch.

Các thuật ngữ và định nghĩa

Thuật ngữ "Hợp chất 1" đề cập đến phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin có tỷ lệ kim loại:phối tử 1:1.

Cụ thể là, phức hợp này có thể được thể hiện bởi công thức có cấu trúc sau:



hoặc muối được dùng của nó.

Thuật ngữ "C" khi được sử dụng với tham chiếu đến nhiệt độ có nghĩa là độ bách phân hoặc thang nhiệt độ C.

Thuật ngữ " IC_{50} " là nồng độ hợp chất thử nghiệm đạt đến 1/2 sự ức chế tối đa enzym.

Thuật ngữ "solvat" được sử dụng để mô tả một phức phân tử có chứa hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều phân tử của dung môi được dùng, ví dụ, etanol. Thuật ngữ "hydrat" được sử dụng khi dung môi được chỉ định là nước.

Thuật ngữ "hoạt tính bất thường" của các tế bào miễn dịch trong tài liệu này đề cập đến hoạt tính khác biệt đáng kể so với mức độ bình thường của hoạt tính các tế bào miễn dịch ở đối tượng không có bệnh lý. Hoạt tính bất thường có thể được gây ra bởi dòng chảy quá mức của các tế bào miễn dịch đến một cơ quan hoặc mô, làm gián đoạn các quy trình dẫn đến sự hoạt hóa các tế bào miễn dịch, sự mất kiểm soát của các quy trình có liên quan đến việc chết các tế bào miễn dịch, cũng như các yếu tố khác.

Thuật ngữ "tá dược" dùng để chỉ chất được dùng có nguồn gốc vô cơ hoặc hữu cơ, bao gồm trong thành phần của một chế phẩm dược hoặc được sử dụng trong quá trình sản xuất, bào chế chế phẩm dược để đạt được các đặc tính hóa lý cần thiết.

Thuật ngữ "glutaminyl cyclaza" đề cập đến enzyme aminoacyltransferaza có liên quan đến quá trình chuyển hóa của glutamin ở đầu N thành pyroglutamin trong các chất nền peptit khác nhau. Sự tạo thành pyroglutamin hóa ở đầu N bảo vệ các peptit, hormon, và chemokin có hoạt tính sinh học (ví dụ, giải phóng hormon thyrotropin, β -phối tử chemokin-2) khỏi bị phân hủy bởi các exopeptidaza và có thể làm tăng ái lực của các phối tử đối với các thụ thể của nó trong một vài trường hợp.

Thuật ngữ "hóa hướng động" đề cập đến chuyển động có định hướng của các tế bào để đáp ứng với một kích thích hóa học. Hóa hướng động dựa trên khả năng của tế bào đáp ứng với gradient nồng độ của chất trung gian hóa học. Hóa hướng động là quá trình theo đó các tế bào miễn dịch rời khỏi mạng mạch máu và di chuyển đến mô bị tổn thương. Vai trò hàng đầu trong hóa hướng động được thực hiện bởi các chất hóa hướng động, hoặc chất hóa ứng động. Chemokin CCL2 là một trong những chất hóa ứng động mạnh nhất đối với các bạch cầu đơn nhân và các đại thực bào.

Các thuật ngữ "điều trị", "trị liệu" "chữa bệnh" bao hàm việc xử lý tình trạng bệnh lý ở động vật có vú, tốt hơn là ở người, và bao gồm: a) cải thiện, b) phá vỡ (chấm dứt) tiến trình của bệnh c) giảm bớt tính nghiêm trọng của bệnh, nghĩa là khởi đầu của sự thoái lui của bệnh, d) sự đảo ngược của bệnh hoặc tình trạng mà thuật ngữ áp dụng, hoặc một hay nhiều triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng.

Thuật ngữ "việc phòng bệnh", hoặc "sự phòng ngừa" bao hàm sự loại trừ các yếu tố rủi ro, cũng như điều trị dự phòng các giai đoạn cận lâm sàng của bệnh ở động vật có vú, tốt hơn là ở người, nhằm làm giảm khả năng xuất hiện các giai đoạn lâm sàng của bệnh. Các đối tượng điều trị dự phòng được lựa chọn trên cơ sở các yếu tố được biết là có liên quan đến nguy cơ tăng khả năng mắc bệnh lâm sàng so với dân số chung. Liệu pháp dự phòng bao gồm a) phòng ngừa sơ cấp và b) phòng ngừa thứ cấp. Phòng ngừa sơ cấp đề cập đến việc điều trị dự phòng/biện pháp phòng ngừa đối với các bệnh nhân chưa đến giai đoạn lâm sàng của bệnh. Phòng ngừa thứ cấp là việc phòng ngừa sự tái phát tình trạng lâm sàng giống hoặc tương tự của bệnh.

Hợp chất I, đối tượng của sáng chế, cho thấy triển vọng đối với việc điều trị bệnh có liên quan đến chức năng hàng rào của biểu mô bị suy yếu và hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch, và cụ thể là, để điều trị bệnh có liên quan đến hóa hướng động bất thường của các tế bào miễn dịch, tốt hơn là để điều trị bệnh viêm da cơ địa. Trong một vài phương án cụ thể, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh khác có nguyên nhân do chức năng hàng rào của biểu mô bị suy yếu và hoạt tính bất thường của các tế bào miễn dịch.

Phương pháp sử dụng để điều trị của hợp chất

Đối tượng của sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng một lượng điều trị có hiệu quả hợp chất theo sáng chế cho đối tượng có nhu cầu điều trị phù hợp. Lượng điều trị hiệu quả

là lượng hợp chất được sử dụng hoặc cung cấp cho bệnh nhân theo cách mà bệnh nhân nhiều khả năng cho thấy đáp ứng mong muốn nhất với việc điều trị (phép phòng bệnh). Liều lượng chính xác được yêu cầu có thể thay đổi tùy đối tượng, phụ thuộc vào tuổi tác, trọng lượng cơ thể và tình trạng chung của đối tượng, mức độ nghiêm trọng của bệnh, phương pháp sử dụng thuốc, thuốc có được sử dụng kết hợp với các thuốc khác hay không, và những thứ tương tự.

Hợp chất theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa hợp chất có thể được sử dụng cho đối tượng có nhu cầu với bất kỳ liều lượng nào và theo bất kỳ đường dùng nào có hiệu quả điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh (đường dùng tại chỗ được ưu tiên).

Sau khi trộn hợp chất với chất mang được dụng thích hợp cụ thể với liều dùng mong muốn, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng tại chỗ cho người hoặc các động vật khác và các loài tương tự.

Việc dùng thuốc có thể được thực hiện một hoặc một vài lần mỗi ngày, mỗi tuần (hoặc theo bất kỳ khoảng thời gian nào khác), hoặc thỉnh thoảng khi cần. Ngoài ra, hợp chất có thể được sử dụng cho đối tượng hàng ngày trong một số ngày cụ thể (ví dụ, 2-10 ngày), sau đó là khoảng thời gian mà thuốc không được sử dụng (ví dụ, 1-30 ngày).

Trong trường hợp hợp chất theo sáng chế được sử dụng làm một phần của phác đồ điều trị kết hợp, liều lượng của mỗi thành phần điều trị kết hợp được sử dụng trong thời gian điều trị mong muốn. Các thành phần hoạt chất tạo thành liệu pháp kết hợp có thể được sử dụng cho đối tượng theo kiểu tổng hợp, ở dạng một liều chứa tất cả các thành phần, hoặc ở dạng các liều riêng lẻ của các thành phần.

Dược phẩm

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất theo sáng chế (hoặc tiền chất, hoặc dẫn xuất được dụng khác) và một hoặc nhiều chất mang được dụng, tá chất, chất pha loãng và/hoặc tá dược, những chất này có thể cùng được sử dụng cho đối tượng kết hợp với hợp chất theo sáng chế, với điều kiện là chúng không ảnh hưởng đến hoạt tính dược lý của hợp chất này và không độc khi được sử dụng với liều lượng đủ để cung cấp một lượng trị liệu của hợp chất.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất phức hợp kềm với gamma-L-glutamylhistamin, phương pháp bao gồm khuấy hỗn hợp kềm axetat và gamma-L-

glutamylhistamin trong dung môi, tốt hơn là trong dung môi phân cực, tách chế phẩm kết tủa và sấy khô chế phẩm thu được, là phức hợp kẽm với gamma-L β -glutamylhistamin có tỷ lệ kim loại/phối tử 1/1. Những dung môi được ưu tiên là metanol hoặc nước, hoặc hỗn hợp của chúng. Quy trình tốt hơn là sử dụng kẽm axetat dạng nước, cụ thể là kẽm axetat dihydrat. Việc khuấy hỗn hợp được thực hiện ở nhiệt độ trong khoảng từ 15 đến 50 độ C, tốt hơn là 15 đến 40 độ C nếu metanol được sử dụng làm dung môi hoặc ở nhiệt độ 15 đến 90 độ C nếu nước được sử dụng làm dung môi.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng muối được dụng của nó. Cụ thể là muối cộng axit hữu cơ và vô cơ đã được biết đến rộng rãi đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, ví dụ, hydroclorua hoặc axetat, có thể được điều chế.

Dược phẩm theo sáng chế có chứa hợp chất theo sáng chế cùng với các chất mang được dụng, bao gồm bất kỳ dung môi, chất pha loãng, chất làm phân tán hoặc huyền phù đã được biết đến đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, chất hoạt động bề mặt, chất đẳng trương, chất làm đặc và chất nhũ hóa, chất bảo quản, chất liên kết, chất bôi trơn, v.v., phù hợp với một dạng bào chế cụ thể. Các nguyên liệu thích hợp có thể được dùng làm các chất mang được dụng bao gồm, mono - và oligosaccharit, và dẫn xuất của chúng; gelatin; bột talc; các tá dược như là bơ ca cao và sáp thuốc đạn; các loại dầu như là dầu lạc, dầu hạt bông, dầu safron, dầu vừng, dầu ô liu, dầu ngô, và dầu đậu nành; các glycol như là propylen glycol; các este như là etyl oleat và etyl laurat; thạch; các chất đệm như là magiê hydroxit và nhôm hydroxit; axit anginic; nước không chứa chất gây sốt; dung dịch đẳng trương, dung dịch Ringer; rượu etylic và dung dịch đệm phosphat. Ngoài ra, chế phẩm có thể bao gồm các chất bôi trơn thích hợp không độc khác như là natri lauryl sunfat và magiê stearat, cũng như chất tạo màu, chất tạo màng, chất làm ngọt, hương vị và mùi thơm, chất bảo quản và chất chống oxy hóa.

Đối tượng của sáng chế cũng bao gồm các dạng bào chế, một nhóm dược phẩm, chế phẩm của chúng được tối ưu hóa một đường dùng cụ thể cho một đối tượng cần đến nó với liều điều trị hiệu quả, ví dụ, sử dụng cục bộ cho một đối tượng.

Các dạng bào chế theo sáng chế có thể chứa các chế phẩm được bào chế bởi phương pháp liposome, phương pháp vi bao, phương pháp bào chế dạng nano, hoặc các phương pháp khác đã được biết đến trong lĩnh vực.

Để sử dụng tại chỗ, các dạng đã được biết đến bởi những người có hiểu biết trung

bình trong lĩnh vực có thể được sử dụng là thuốc mỡ, kem và hỗn dịch, có chứa các chất tương thích về mặt dược lý, ví dụ, propylen glycol hoặc butylen glycol.

Các ví dụ về dược phẩm

Hợp chất được mô tả theo sáng chế này có thể được sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ở người hoặc động vật ở dạng chế phẩm dưới đây:

Thuốc mỡ, ml

Thành phần hoạt chất 40 mg

Etanol 300 µl

Nước 300 µl

1-dodecylazacycloheptanon 50 µl

Propylen glycol 1 ml

Kem I % theo trọng lượng

Thành phần hoạt chất 0,005-0,5

Thành phần dầu 10,0-15,0

Stearin mỹ phẩm 2,0-3,0

Chất nhũ hóa 1,0-3,0

Sáp nhũ tương 1,0-3,0

Trietanolamin 0,1-0,6

Vitamin A 0,003-0,05

Glycerin chung cất 2,0-3,0

Chất chống ôxy hóa 0,05-0,075

Chất bảo quản 0,15-0,25

Dầu cây chè 0,3-0,5

Nước uống tinh khiết 100%

Kem II % theo trọng lượng

Thành phần hoạt chất 0,01

Dầu thực vật 15,0

Stearin mỹ phẩm 0,75

Chất nhũ hóa PG-3 2,25

Sáp nhũ tương 2,25

Trietanolamin 0,1

Vitamin A 0,028

Sorbitol 2,0-3,0

Vitamin E 1,5

Monomuls® 90-O 18 0,75

Nipazol 0,2

Nipagin 0,3

Dầu cây chè 0,3-0,5

Nước uống tinh khiết 100%

Kem III % theo trọng lượng

Thành phần hoạt chất 0,1

Dầu thực vật 15,0

Stearin mỹ phẩm 0,75

Chất nhũ hóa PG-3 2,25

Sáp nhũ tương 2,25

Trietanolamin 0,1

Vitamin A 0,028

Sorbitol 2,0-3,0

Vitamin E 1,5

Monomuls® 90-O 18 0,75

Nipazol 0,2

Nipagin 0,3

Dầu cây chè 0,3-0,5

Nước uống tinh khiết 100%

Kem IV % theo trọng lượng

Thành phần hoạt chất 0,3

Dầu thực vật 15,0

Stearin mỹ phẩm 0,75

Chất nhũ hóa PG-3 2,25

Sáp nhũ tương 2,25

Trietanolamin 0,1

Vitamin A 0,028

Sorbitol 2,0-3,0

Vitamin E 1,5

Monomuls® 90-O 18 0,75

Nipazol 0,2

Nipagin 0,3

Dầu cây chè 0,3-0,5

Nước uống tinh khiết 100%

Trường hợp với thuốc mỡ, thành phần dầu được ưu tiên là dầu thực vật, dầu khoáng, hoặc hỗn hợp của chúng. Dầu thực vật có thể là dầu ô liu, dầu hoa hướng dương, hoặc hỗn hợp của chúng. Dầu khoáng có thể là dầu nhớt lỏng. Các polyeste của các axit béo không no trong glycerol (chất nhũ hóa PG-3) có thể được sử dụng làm chất nhũ hóa. Vitamin A có thể có mặt dưới dạng retinol palmitat. Chất chống oxy hóa được ưu tiên là tocopherol axetat, và chất bảo quản là ít nhất một este alkyl thấp hơn của axit paraoxybenzoic, ví dụ, este metyl hoặc propyl.

Các chế phẩm này có thể được bào chế dựa trên các quy trình được tiêu chuẩn.

Sử dụng Hợp chất I trong liệu pháp kết hợp

Trong khi Hợp chất I theo sáng chế có thể được sử dụng như một thành phần hoạt

chất độc lập, nó cũng có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất khác, trong đó cụ thể là, chất khác có thể được đại diện bởi một loại kháng sinh, NSAID (non-steroidal anti-inflammatory agent: chất kháng viêm không steroid) hoặc chất kháng viêm khác, glucocorticosteroid, chất ức chế calcineurin, chất kháng histamin, chất ổn định màng, chất immunotropic, v.v. Khi được sử dụng cùng nhau, các chất điều trị có thể ở các dạng bào chế khác nhau được sử dụng đồng thời hoặc tuần tự tại các thời điểm khác nhau, hoặc các chất điều trị có thể được kết hợp thành một dạng bào chế duy nhất.

Cụm từ "liệu pháp kết hợp" liên quan đến hợp chất theo sáng chế được kết hợp với các dược chất khác, có nghĩa là việc sử dụng đồng thời hoặc tuần tự tất cả các chất mang lại hiệu quả có lợi của việc kết hợp thuốc. Đồng sử dụng có nghĩa cụ thể là sự đồng phân phối của các chất, ví dụ, trong một loại thuốc mỡ, kem, viên nén, viên nang, thuốc tiêm hoặc dạng khác, với một tỷ lệ cố định của các hoạt chất, cũng như sự phân phối đồng thời của mỗi hợp chất ở một vài dạng bào chế riêng biệt, lần lượt tương ứng.

Do đó, việc sử dụng hợp chất theo sáng chế có thể được thực hiện kết hợp với các liệu pháp bổ sung đã được biết đến bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực y tế dự phòng và điều trị các bệnh liên quan, bao gồm việc sử dụng các loại thuốc kháng khuẩn, kìm hãm tế bào và gây độc tế bào, các loại thuốc để ngăn chặn các triệu chứng hoặc tác dụng phụ của một trong những loại thuốc.

Nếu chế phẩm được thể hiện bằng một dạng bào chế, thì sự kết hợp đó phải bao gồm hợp chất theo sáng chế trong phạm vi liều lượng có thể chấp nhận được. Hợp chất 1 theo sáng chế cũng có thể được sử dụng cho bệnh nhân tuần tự với các chất khác, khi việc kết hợp các loại thuốc này là không thể. Sáng chế không giới hạn trình tự của việc sử dụng; hợp chất theo sáng chế có thể được đồng sử dụng cho đối tượng trước hoặc sau khi sử dụng một thuốc khác.

Các ví dụ thực hiện sáng chế

Phân tích nguyên tố của mẫu

Các nghiên cứu về thành phần nguyên tố của mẫu đã được thực hiện bằng thiết bị phân tích nguyên tố Multi EA 5000, Analytik Jena. Để phân tích, một phần đã được cân của mẫu khoảng 20 mg (đã được cân chính xác) được đặt vào ô lấy mẫu tự động. Sau khi nạp khí trơ vào thiết bị (heli), 10 cm³ oxy được tinh chế từ nitơ, cacbon, và hơi ẩm được thêm vào và mẫu nghiên cứu được đốt ở nhiệt độ ~ 1000°C. Để loại bỏ oxy dư thừa, các chế

phẩm đốt cháy được cho qua đồng ánh kim ở nhiệt độ 750°C. Sau đó hỗn hợp khí (CO₂, N₂, và H₂O) được đưa qua bể hấp thụ để thu thập độ ẩm và xác định lượng hydro. Tiếp theo một hỗn hợp của nitơ và cacbon monoxit được đưa vào cột sắc ký khí và tách thành các thành phần, được khí mang chuyển đến máy dò phát quang hóa học CLD (để phân tích hàm lượng nitơ trong hỗn hợp khí) và máy dò hồng ngoại NDIR (để phân tích hàm lượng cacbon monoxit trong hỗn hợp khí). Việc tính toán hàm lượng của từng nguyên tố đã xác định trong mẫu thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng gói phần mềm *multiWin*.

Phổ hồng ngoại được ghi lại trên máy quang phổ IFS-113v Bruker trong khoảng 4000 ... 400 cm⁻¹ với độ phân giải 1 cm⁻¹. Để chuẩn bị các mẫu, phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin đã được nghiền nhỏ với KBr (5 mg chất cho mỗi 100 mg KBr), ép thành các viên nén, và được dùng để đánh giá phổ.

Ví dụ 1 (không bao gồm trong sáng chế này). Trộn Kẽm Clorua với Gamma-L-Glutamylhistamin

Ví dụ này chứng minh là phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin không thể bào chế bằng cách đơn giản là trộn các thành phần như là muối kẽm và gamma-L-glutamylhistamin, vì có sự tạo thành hỗn hợp muối kẽm gamma-L-glutamylhistamin tự do trong những điều kiện này. Ví dụ, trộn dung dịch nước kẽm clorua với gamma-L-glutamylhistamin theo tỷ lệ 1:2 và thêm amoniac dạng nước (cho đến khi môi trường hơi kiềm) sau đó sự kết tủa sản phẩm dẫn đến sự hình thành chất kết tinh màu trắng. Dữ liệu phân tích nguyên tố (xem Bảng 1) cho thấy các giá trị dữ liệu gần với các giá trị đã được tính toán cho phức chất, tuy nhiên thì dữ liệu không được xem là bằng chứng của việc tạo thành phức hợp. Hàm lượng cacbon và nitơ được ước tính thấp trong các mẫu chỉ ra khả năng hình thành kẽm hydroxit, mất nước một phần trong quá trình phân tích, có thể dẫn đến ước tính thấp giá trị của các nguyên tố khác. Việc phân tích nguyên tố lặp đi lặp lại các phức hợp sau khi rửa thêm nước lạnh dẫn đến việc ước tính quá cao lượng hydro trong các mẫu.

Bảng 1 – Dữ liệu phân tích nguyên tố cho một mẫu được phân lập từ phản ứng của kẽm clorua với gamma-L-glutamylhistamin

	C	H	N
Theo thực tế (trước khi xử lý nước)	40,12	5,81	18,61

Theo thực tế (sau khi xử lý nước)	39,62	5,99	18,03
Theo tính toán	44,17	5,56	20,60

Ngoài ra, theo dữ liệu của quang phổ hồng ngoại, phổ hồng ngoại của gamma-L-glutamylhistamin ban đầu và chế phẩm của sự trộn lẫn trùng khớp (xem Fig. 1 và 2). Việc không có những thay đổi và sự trùng khớp về nồng độ tương đối của các dải hấp thụ của các nhóm $C=O$, $-OH$ và $-NH$ chỉ ra rằng trộn kẽm clorua với gamma-L-glutamylhistamin trong Ví dụ 1, gamma-L-glutamylhistamin ban đầu đã được tách, và kẽm được giải phóng dưới dạng một hợp chất vô cơ.

Ví dụ 2. Điều chế phức hợp kẽm theo sáng chế (Phương pháp số 1)

Trong nghiên cứu sâu hơn, tác giả đã phát triển một phương pháp nhằm thu được phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin, bao gồm việc sử dụng kẽm axetat dạng nước.

2,20 g (0,01 mol) $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ được hòa tan trong 20 ml metanol và thêm từng giọt, kết hợp khuấy mạnh, vào dung dịch 2,40 g (0,01 mol) gamma-L-glutamylhistamin và 1,08 g (0,02 mol) natri metoxit được chuẩn bị mới trong 50 ml metanol ở nhiệt độ phòng. Sau khi thêm khoảng một nửa thể tích dung dịch kẽm axetat, quan sát được sự hình thành kết tủa trắng. Sau khi thêm tất cả dung dịch kẽm axetat, việc khuấy được tiếp tục trong khoảng 4 giờ, chế phẩm được lọc bỏ, rửa với nước (4x10 ml) và được sấy khô trong chân không ở $65^\circ C$ đến khi trọng lượng của nó được duy trì ổn định. Hàm lượng 2,67 g (88%).

2 lần chạy thử nghiệm kỹ thuật này của phương án phương pháp đã được thực hiện và mẫu cho việc phân tích nguyên tố đã thu được từ mỗi lần chạy. Theo phân tích dữ liệu phân tích nguyên tố của hai mẫu này dẫn đến sự thực hiện phương pháp, phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin với tỷ lệ mol gamma-L-glutamylhistamin/kẽm được hình thành - 1/1 (xem Bảng 2)

Bảng 2 – Dữ liệu phân tích nguyên tố của mẫu được phân lập từ hỗn hợp phản ứng của kẽm axetat với gamma-L-glutamylhistamin

	C	H	N
Theo thực tế lần 1	39,17	4,73	18,02
Theo thực tế lần 2	37,26	4,80	18,110
Theo tính toán	39,56	4,65	18,45

Tiếp theo, chuẩn độ phức chất của kẽm được thực hiện để xác định thành phần phức hợp và tỷ lệ kim loại/phối tử thu được. Để xác định hàm lượng kẽm, chế phẩm được kháng hóa như sau: mẫu chế phẩm có trọng lượng ~70 mg được đốt nóng với lượng axit sunfuric đậm đặc gấp 5 lần cho đến khi mẫu được đốt thành than hoàn toàn. Sau đó, ~1,5 ml hydro peroxit 30 % theo thể tích được thêm vào cặn và đun sôi trong ~ 10 phút. Phần cặn được chuyển vào bình hình chóp 25 ml, và ~ 10 ml hỗn hợp đệm amoniac (pH = 10) và một lượng nhỏ chất chỉ thị khô eriocrom T đen được thêm vào. Lượng chứa trong bình được trộn kỹ cho đến khi chất chỉ thị được hòa tan hoàn toàn và dung dịch có màu nâu xói. Mẫu được chuẩn độ bởi dung dịch EDTA 0,02 M cho đến khi màu đỏ thẫm chuyển qua tím sang xanh sáng. Cuối cùng, thấy rằng hàm lượng của kẽm trong chế phẩm được bào chế là 21,5%, phù hợp với giá trị đã được tính toán trên lý thuyết (21,1%) tương ứng với phức hợp kẽm có tỷ lệ kim loại:phối tử 1:1.

Trong Phổ hồng ngoại của chế phẩm (xem Fig. 3), hai dải mạnh của nhóm cacbonyl được quan sát thấy: 1616 cm^{-1} và 1646 cm^{-1} . Ở cùng thời điểm đó, cấu trúc và tần số hấp thụ khác biệt đáng kể so với phổ của gamma-L-glutamylhistamin tự do (xem Fig. 1): dải của nhóm cacboxyl dịch chuyển về phía tần số cao hơn do phối hợp với kẽm. Ngoài ra, trong Phổ hồng ngoại của chế phẩm có một dải hấp thụ cường độ cao ở 3276 cm^{-1} , dải này không có trong phổ của gamma-L-glutamylhistamin. Nó có thể là do các dao động của liên kết N-H trong đoạn amit, hoặc liên kết N-H của hệ thống imidazol. Ngoài ra, trong phổ hồng ngoại của chế phẩm, so sánh với phổ của gamma-L-glutamylhistamin, có nhiều thay đổi trong các vùng đầu tay và dao động của liên kết CH, cho thấy sự vắng mặt của gamma-L-glutamylhistamin tự do trong mẫu.

Chế phẩm thu được đã được điều chế không tan trong các dung môi được sử dụng để ghi phổ NMR.

Fig. 6 là một ví dụ mô tả phổ D_2O NMR được ghi trên thiết bị Bruker

DRX500,13400 với tần số hoạt động 500,13 MHz.

Nó chủ yếu chứa các tín hiệu còn lại của dung môi không bị đơteri hóa, và các tín hiệu cường độ thấp tương ứng với gamma-L-glutamylhistamin ban đầu.

Điều này cho thấy sự vắng mặt của các tạp chất và sự phân ly không đáng kể của chế phẩm thu được ở dạng huyền phù nước.

Ví dụ 3. Thu được phức hợp kẽm theo sáng chế (Phương pháp số 2)

Mục đích của việc sửa đổi phương pháp hiện tại theo sáng chế là nhằm cải thiện khả năng lọc của chế phẩm thu được, cũng như đảm bảo sự phân phối đồng đều nhất của kẽm hydroxit trong hỗn hợp phản ứng.

Vấn đề đồng nhất phân phối là cực kỳ quan trọng đối với kỹ thuật này để có cùng tỷ lệ, từ đó tạo thành phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin trên bề mặt kẽm hydroxit ngăn cho phản ứng không tiếp diễn. Để giải quyết vấn đề này, được đề xuất là thu được kẽm hydroxit *in situ* bằng cách bổ sung đồng thời dung dịch natri hydroxit và kẽm axetat.

Tổng hợp "A": Tạo huyền phù được đun nóng đến 70°C, 12,0 g (0,05 mol) gamma-L-glutamylhistamin trong 150 ml nước, 50 ml dung dịch natri hydroxit 2M và dung dịch 11,0 (0,05 mol) kẽm axetat dihydrat trong 80 ml nước được thêm từng giọt một, đồng thời sử dụng hai phễu. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 4 giờ ở 70°C, làm lạnh đến nhiệt độ phòng và để qua đêm. Chất kết tủa được lọc bỏ, rửa trên bộ lọc với 3x50 ml nước và sấy khô trong chân không ở 45-50°C cho đến khi nó đạt được trọng lượng không đổi. Hàm lượng thu được là 21,5 g (71% chế phẩm).

Phức hợp đa hình thu được bằng phương pháp này dễ phân tách hơn ở dạng dịch lọc so với phức hợp theo Ví dụ 2, thu được trong metanol sử dụng natri metoxit.

Kỹ thuật này đã được mở rộng quy mô và tái lập theo Tổng hợp "B".

Tổng hợp "B": Tạo huyền phù được đun nóng đến 70° C, 24,0 g (0,1 mol) gamma-L-glutamylhistamin trong 300 ml nước, 100 ml dung dịch natri hydroxit 2M và dung dịch 22,0 (0,1 mol) kẽm axetat dihydrat trong 120 ml nước được thêm từng giọt một, đồng thời sử dụng hai phễu. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 4 giờ ở 70°C, làm lạnh đến nhiệt độ phòng và để qua đêm. Chất kết tủa được lọc bỏ, rửa trên bộ lọc với 4x50 ml nước và sấy khô trong chân không ở 45-50°C cho đến khi trọng lượng của nó duy trì không đổi, 44,1 g (71% chế phẩm).

Hai lần chạy thử nghiệm theo phương pháp này đã được thực hiện và mẫu cho phân tích nguyên tố đã thu được từ mỗi lần chạy. Theo kết quả phân tích dữ liệu nguyên tố của hai mẫu này, phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin được tạo thành với tỷ lệ mol của gamma-L-glutamylhistamin/kẽm - 1/1 là kết quả của phản ứng (xem Bảng 3).

Bảng 3 – Các kết quả của việc phân tích nguyên tố của phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin (Phương pháp số 2)

		C	N	H
Theo thực tế lần 1	Phương pháp số 2 «A»	39,52	18,26	4,72
Theo thực tế lần 2		39,44	17,96	4,66
Theo thực tế lần 1	Phương pháp số 2 «B»	39,54	18,18	4,52
Theo thực tế lần 2		39,49	17,99	4,47
Theo tính toán		39,56	18,45	4,65

Phổ hồng ngoại của chế phẩm thu được (xem Fig. 4 và 5) tương tự phổ của phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin được tổng hợp bằng Phương pháp số 1 và những quang phổ này không có sự khác biệt đáng kể trong vùng đầu tay.

Chuẩn độ phức chất của kẽm được thực hiện để xác định chế phẩm phức hợp và tỷ lệ kim loại/phối tử thu được, (xem Bảng 4). Kết quả là nó cho thấy hàm lượng kẽm trong chế phẩm thu được bằng Phương pháp số 2 là ~ 22,0%, phù hợp với giá trị đã được tính toán trên lý thuyết (21,1%) của phức hợp kẽm tương ứng có tỷ lệ kim loại:phối tử 1:1.

Bảng 4 - Kết quả chuẩn độ phức chất của phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin

Phương pháp	Kết quả chuẩn độ Số 1 (Zn ²⁺)	Kết quả chuẩn độ Số 2 (Zn ²⁺)	Tính ra
Phương pháp số 1	21,53 %	22,03%	21,87%
Phương pháp số 2 «A»	22,18 %	21,95 %	
Phương pháp số 2 «B»	21,55 %	22,13 %	

Đặc điểm của hoạt tính sinh học của phức hợp hợp chất I

Hoạt tính sinh học của Hợp chất I theo sáng chế đã được nghiên cứu trong các thí nghiệm khác nhau *in vitro* và *in vivo*. Cụ thể là, tác dụng ức chế của Hợp chất I đối với hóa hướng động của các tế bào miễn dịch đã được chứng minh trong các thí nghiệm tập trung vào hoạt tính của Hợp chất I trong một mô hình *in vivo* của bệnh viêm da cơ địa. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của Hợp chất I *in vitro* đã xác định là Hợp chất I là chất ức chế của enzym glutaminyl xyclaza, do đó, tác dụng của Hợp chất I đối với hóa hướng động của các tế bào miễn dịch có thể được dần xếp nhờ sự ức chế hoạt tính của glutaminyl xyclaza.

Ví dụ 4. Nghiên cứu hiệu quả của Hợp chất I đối với hoạt tính enzym của glutaminyl xyclaza ở người *in vitro*.

Trong các nghiên cứu hiệu quả của Hợp chất I (là đối tượng của sáng chế) đối với hoạt tính enzym của glutaminyl xyclaza *in vitro*, hiệu quả ức chế hoàn toàn của Hợp chất I đối với glutaminyl xyclaza nội bào tái tổ hợp của người đã được phát hiện.

Hoạt tính của glutaminyl xyclaza tại các nồng độ khác nhau của Hợp chất I đã được nghiên cứu ở 25°C sử dụng cơ chất huỳnh quang L-glutaminyl 2-naphtylamit (Gln-bNA) [Anal Biochem. 01/04/2002; 303 (1): 49-56]. Hỗn hợp phản ứng với thể tích 100 µl chứa 50 µM cơ chất tạo huỳnh quang; ~ 0.2 đơn vị pyroglutaminyl aminopeptidaza của người (1 đơn vị được định nghĩa là lượng thủy phân 1 micromol pGlu-bNA mỗi phút), và một phân ước của glutaminyl xyclaza nội bào tái tổ hợp của người (gQC) trong 50 micromol trisaminometan HCl và 5% glycerol, pH 8,0. Phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm một phân ước của glutaminyl xyclaza được ủ với Hợp chất I trong 5 phút để tạo hỗn hợp phản ứng.

Sự tiến triển tiếp theo của phản ứng được theo dõi bằng quang phổ (bước sóng kích thích và phát xạ là 320 và 410 nm). Hoạt tính của enzyme được xác định bởi lượng 2-naphtylamit (bNA) được giải phóng, được tính toán dựa trên đường cong hiệu chuẩn. Giá trị IC50 được tính toán bằng cách sử dụng hồi quy không tuyến tính của đường cong "nồng độ chất ức chế" - "hoạt tính enzym".

Thí nghiệm đã chứng minh là Hợp chất I ức chế hoạt tính của glutaminyl xyclaza với IC50 = 26 µM.

Ví dụ 5. Nghiên cứu hoạt tính của Hợp chất I ở mô hình viêm da cơ địa chuột

Kỹ thuật thử nghiệm. Nghiên cứu hoạt tính Hợp chất I ở mô hình viêm da cơ địa đã được thực hiện sử dụng kỹ thuật tiêu chuẩn [Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2012. Article ID 545497, 9 pages]. Đối với nhóm thử nghiệm, chúng tôi đã lựa chọn những con vật có ngoại hình trung bình, không có dấu hiệu sai lệch, với trọng lượng của con vật không quá $\pm 20\%$ so với trọng lượng trung bình của giống đó.

Vào ngày 0 và 12 của thử nghiệm, những con chuột đực thuộc dòng balb/c được xử lý với 100 μ l dung dịch 2% của 1-clo-2,4-dinitrobenzen (DNCB) trong etanol, được áp dụng cho các khu vực đã được cạo trước đó trên lưng để nhạy hóa cơ thể. Vào ngày thứ 17, 20 μ l dung dịch cồn 2% của DNBCB được áp dụng cho tai phải "thử nghiệm" của động vật hai lần với khoảng thời gian khoảng 1 giờ. Kem Hợp chất I với hàm lượng hoạt chất 0,01 % theo trọng lượng được sử dụng tại chỗ cho tai phải "thử nghiệm", hai lần: 1 và 13 giờ sau lần sử dụng DNBCB cuối cùng cho tai. Các thuốc sau đây được sử dụng làm thuốc so sánh/ tham chiếu/ đối chứng: Metylprednisolon aceponat (0,1% thuốc mỡ dùng bôi ngoài), kẽm pyrition (0,2% kem dùng bôi ngoài), pimecrolimus (1% kem dùng bôi ngoài) và kem dùng bôi ngoài có chứa 0,01% gamma-L-glutamylhistamin. Vào ngày thứ 18, các con vật được làm cho chết và phân tích mô học của tai bị ảnh hưởng được thực hiện. Các phần mô học có bề dày 5 μ m được nhuộm bởi hematoxylin-eosin. Đánh giá các thay đổi vi mô chứng tỏ viêm da được thực hiện theo thang điểm sau:

1) Chứng dày lớp gai - sự dày lên của lớp thượng bì và biểu mô với sự kéo dài của các quá trình giữa các mao mạch:

0 điểm – không có bệnh lý;

0,5 điểm – bệnh lý được phát hiện, nhưng biểu hiện rất yếu;

1 điểm – bệnh lý trung bình đến nặng;

2 điểm - bệnh lý nặng.

2) Tăng sừng hóa là đặc tính không viêm của tình trạng da, khác biệt ở sự dày lên đáng kể của lớp sừng hoặc sự chậm trễ trong quá trình đào thải bình thường:

0 điểm – không có bệnh lý;

0,5 điểm - bệnh lý được phát hiện, nhưng biểu hiện rất yếu;

1 điểm - sự hiện diện rõ ràng của bệnh lý được được chỉ định.

3) Mụn mủ (áp xe) – các yếu tố viêm cấp tính có khoang chứa mủ:

0,5 điểm - các biểu hiện đơn lẻ của bệnh lý;

1 điểm - bệnh lý nhẹ;

2 điểm – bệnh lý trung bình đến nặng;

3 điểm - bệnh lý nặng;

4 điểm - bệnh lý tổng thể.

4) U nang là một cấu trúc có hình tròn hoặc hình bầu dục, được lót bởi các biểu mô vảy sừng phân tầng và chứa đầy các lớp sừng, phát triển khi có sự tăng sản của biểu mô (chứng dày lớp gai) được thể hiện:

0 điểm – không có bệnh lý;

0,5 điểm - bệnh lý được phát hiện, nhưng biểu hiện rất yếu;

1 điểm – sự hiện diện rõ ràng của bệnh lý được được chỉ định.

5) Viêm:

0 điểm – không có bệnh lý;

0,5 điểm – các biểu hiện đơn lẻ của bệnh lý;

1 điểm - bệnh lý nhẹ;

2 điểm – bệnh lý trung bình đến nặng;

3 điểm - bệnh lý nặng;

4 điểm - bệnh lý tổng thể.

6) Phù:

0 điểm – không có bệnh lý;

0,5 điểm - các biểu hiện đơn lẻ của bệnh lý;

1 điểm - bệnh lý nhẹ;

2 điểm –bệnh lý trung bình đến nặng;

3 điểm - bệnh lý nặng;

4 điểm - bệnh lý tổng thể.

Dữ liệu thu được đã được xác minh bằng cách sử dụng thử nghiệm Grubbs, cũng được biết đến là thử nghiệm dư bình thường hóa tối đa, một thử nghiệm được sử dụng để phát hiện ra những ngoại lệ trong bộ dữ liệu. Các giá trị được xác định là “ngoại lệ” trong thử nghiệm này không được sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo. Thống kê mô tả được sử dụng cho tất cả các dữ liệu: giá trị trung bình (M) và sai số chuẩn của giá trị trung bình (m) được tính toán. Sự phân phối chuẩn các giá trị thu được trong thí nghiệm được xác minh bằng cách sử dụng thử nghiệm Kolmogorov-Smirnov. Trong trường hợp có phân phối chuẩn, thử nghiệm t Student được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm. Trường hợp không có phân phối chuẩn, thử nghiệm Kruskal-Wallis (với phân tích quá khứ Dunn) được sử dụng để so sánh vài nhóm. Phân tích thống kê được thực hiện sử dụng phần mềm GraphPad Prism. 5.0. Sự khác biệt được xác định ở độ tin cậy 5%.

Kết quả của các thí nghiệm được thể hiện trong Fig. 7 và 8. Có thể thấy từ dữ liệu chỉ ra trong Fig. 7, tác dụng dược lý của kem có chứa Hợp chất I (0,01 % theo trọng lượng) trên các tổn thương da ở mô hình chuột bị viêm da cơ địa dựa trên việc phân tích mô học được đánh giá như sau: a) chứng dày lớp gai (điểm), b) tăng sừng hóa (điểm), c) mụn mủ (điểm), d) u nang (điểm), e) viêm (điểm), f) phù (điểm). Các thí nghiệm được thực hiện dựa theo: Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2012. Article ID 545497, 9 pages. Lưu ý: * - khác biệt đáng kể (Điểm <0,05) với nhóm nguyên vẹn, & - khác biệt đáng kể (Điểm <0,05) với đối chứng.

Fig. 8 cho thấy các mặt cắt mô học của da của tai bị ảnh hưởng trong mô hình viêm da cơ địa chuột, được nhuộm bởi hematoxylin-eosin, với độ phóng đại x20.

A - Nhóm động vật nguyên vẹn; B - Kiểm soát bệnh lý; C - Advantan (Methylprednisolon aceponat, thuốc mỡ 0,1%); D - Pimecrolimus (kem Elidel 1%); E - Kem Hợp chất I 0,01%. 1- lớp thượng bì; 2 - hạ bì; 3-thâm nhiễm viêm. Các thí nghiệm được thực hiện dựa theo: Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2012. Article ID 545497, 9 pages.

Việc sử dụng Hợp chất I (0,01 % theo trọng lượng kem) cho da đã làm giảm dòng tế bào viêm (các bạch cầu đơn nhân, các tế bào tua, các bạch cầu ái toan và các bạch cầu trung tính) nhập vào lớp thượng bì và hạ bì của da về mức như ở động vật nguyên vẹn, cũng như các biểu hiện vi mô khác của bệnh viêm da cơ địa. Quan trọng cần phải chú ý là, về mặt tác dụng, Hợp chất I (phức hợp kẽm của gamma-L-glutamylhistamin) chỉ ra sự cải thiện đáng

kể khi so sánh với tác dụng của phối tử gamma-L-glutamylhistamin. Vì vậy, hoạt tính chữa trị của Hợp chất I không thể giải thích được chỉ bằng hoạt tính của gamma-L-glutamylhistamin. Về mặt tính hiệu quả, kem Hợp chất I cho thấy hiệu quả vượt trội so với các thuốc tham khảo: metylprednisolon aceponat, kẽm pyrition và pimecrolimus. Các kết quả thu được cho phép chúng ta có thể kết luận là Hợp chất I đã chứng minh được hiệu quả điều trị được cải thiện trong việc điều trị bệnh viêm da cơ địa.

Kết luận

Do vậy, các nghiên cứu đã được thực hiện cho thấy Hợp chất I có hiệu quả trong việc ức chế enzym glutaminyl xyclaza. Ở một mô hình viêm da cơ địa, Hợp chất I đã chứng minh là có khả năng ức chế dòng tế bào viêm (các bạch cầu đơn nhân, các tế bào tua, các bạch cầu ái toan và các bạch cầu trung tính) *in vivo*, cũng như các biểu hiện vi mô khác của bệnh viêm da cơ địa.

Mặc dù sáng chế được mô tả có tham chiếu đến các phương án đã được bộc lộ, những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cần hiểu rằng các thí nghiệm cụ thể được mô tả chi tiết chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế và không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ cách nào. Cần được hiểu là các sửa đổi khác nhau có thể thực hiện sẽ không tách rời bản chất của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin, trong đó phổ hồng ngoại của mẫu dạng rắn của phức hợp cho thấy các dải ở 1616 cm^{-1} , 1646 cm^{-1} , và 3276 cm^{-1} .

2. Phương pháp điều chế phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin, bao gồm các bước:

khuấy hỗn hợp kẽm axetat và gamma-L-glutamylhistamin trong dung môi phân cực;

để cho chế phẩm kết tủa; và

sấy khô chế phẩm để thu được phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin có tỷ lệ kim loại:phối tử là 1:1,

trong đó kẽm axetat dạng nước được sử dụng, và

trong đó việc trộn hỗn hợp được thực hiện ở nhiệt độ 15 đến 50 độ C.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó dung môi là metanol hoặc nước, hoặc sự kết hợp của chúng.

4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó kẽm axetat dạng nước được sử dụng, cụ thể là kẽm axetat dihydrat.

5. Phương pháp theo điểm 3, trong đó việc trộn hỗn hợp được thực hiện ở nhiệt độ 15 đến 50 độ C, tốt hơn là 15 đến 40 độ C khi metanol được sử dụng làm dung môi và ở nhiệt độ 15 đến 90 độ C khi nước được sử dụng làm dung môi.

6. Phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin, thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5.

7. Phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin, trong đó tỷ lệ mol của tỷ lệ kim loại/phối tử là 1/1.

8. Phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin theo điểm 7, được điều chế bằng cách khuấy hỗn hợp đẳng mol của kẽm axetat và gamma-L-glutamylhistamin trong một dung môi, sau đó tách phức hợp thành chế phẩm.

9. Phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin, đặc trưng với các kết quả của việc phân tích nguyên tố của phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin dưới đây:

	C	H	N
Theo thực tế lần 1	39,17	4,73	18,02
Theo thực tế lần 2	37,26	4,80	18,110

Theo tính toán	39,56	4,65	18,45
----------------	-------	------	-------

hoặc:

	C	N	H
Theo thực tế lần 1	39,52	18,26	4,72
Theo thực tế lần 2	39,44	17,96	4,66
Theo thực tế lần 1	39,54	18,18	4,52
Theo thực tế lần 2	39,49	17,99	4,47
Theo tính toán	39,56	18,45	4,65

10. Phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin, đặc trưng với các kết quả chuẩn độ phức chất của phức hợp kẽm với gamma-L-glutamylhistamin dưới đây:

Kết quả chuẩn độ Số 1 (Zn ²⁺)	Kết quả chuẩn độ Số 2 (Zn ²⁺)	Tính ra
21,53 %	22,03%	21,87%
22,18 %	21,95 %	
21,55 %	22,13 %	

11. Dược phẩm chứa phức hợp theo điểm 1 hoặc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10.

1/1

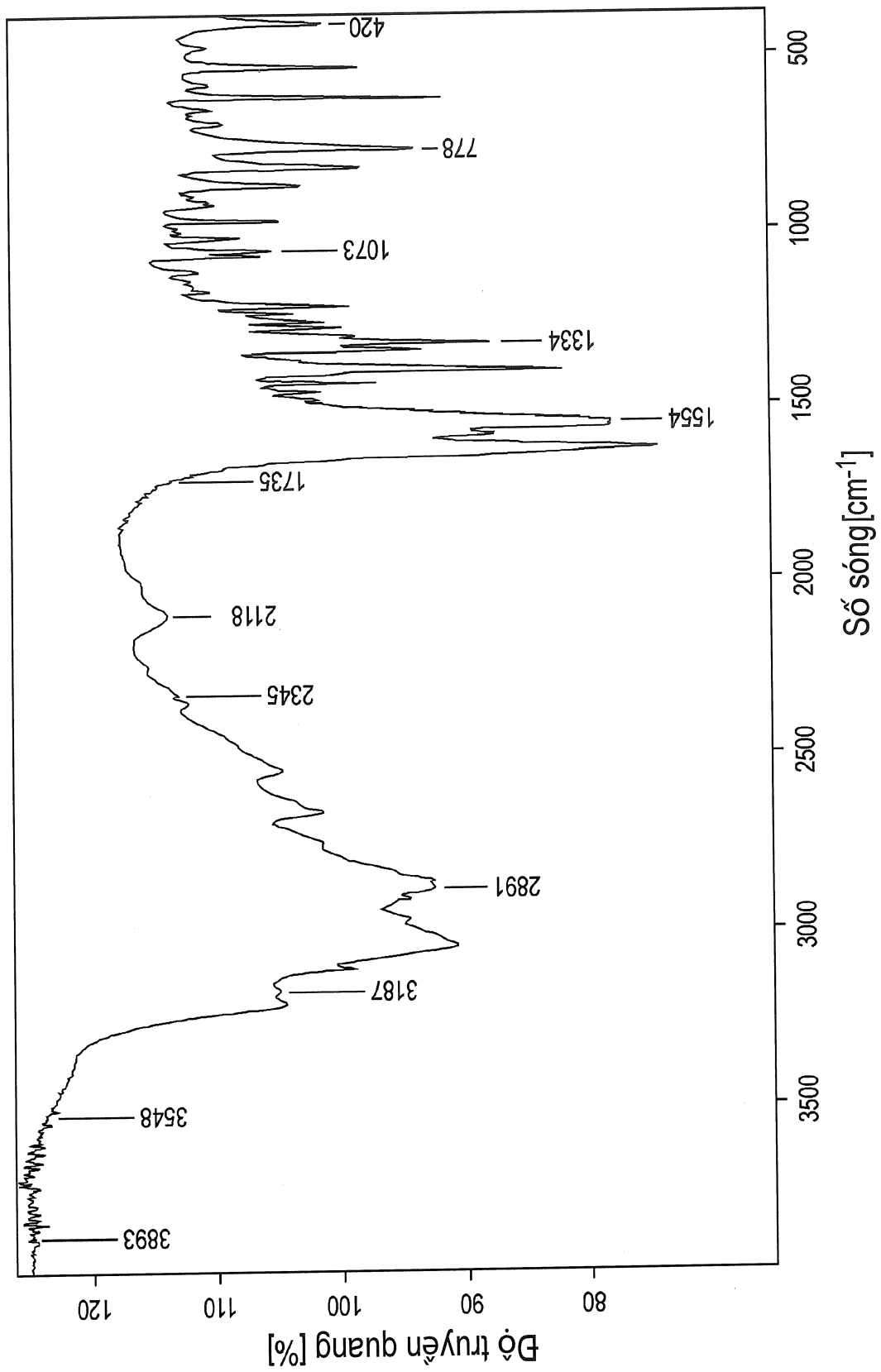
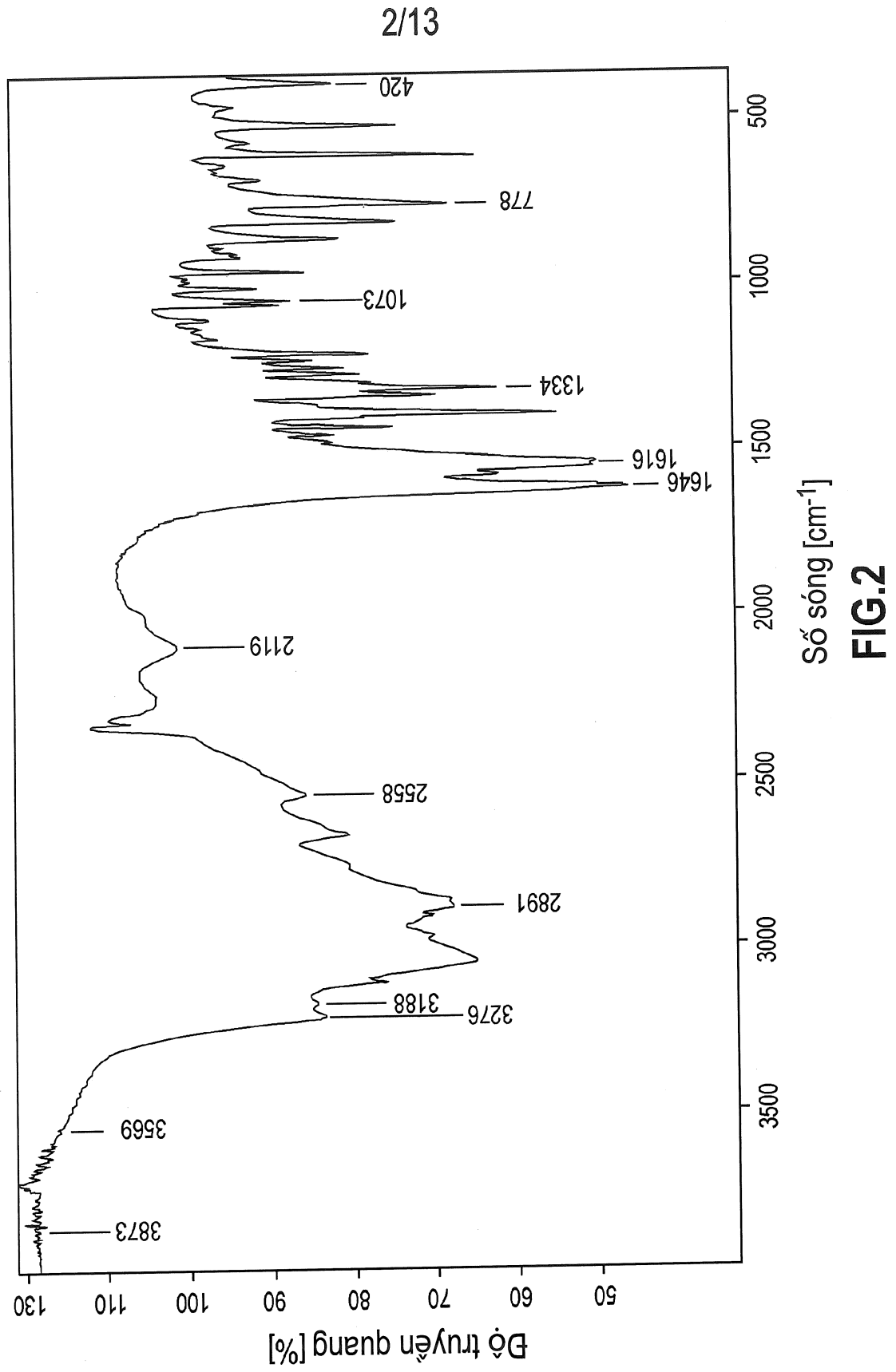


FIG.1



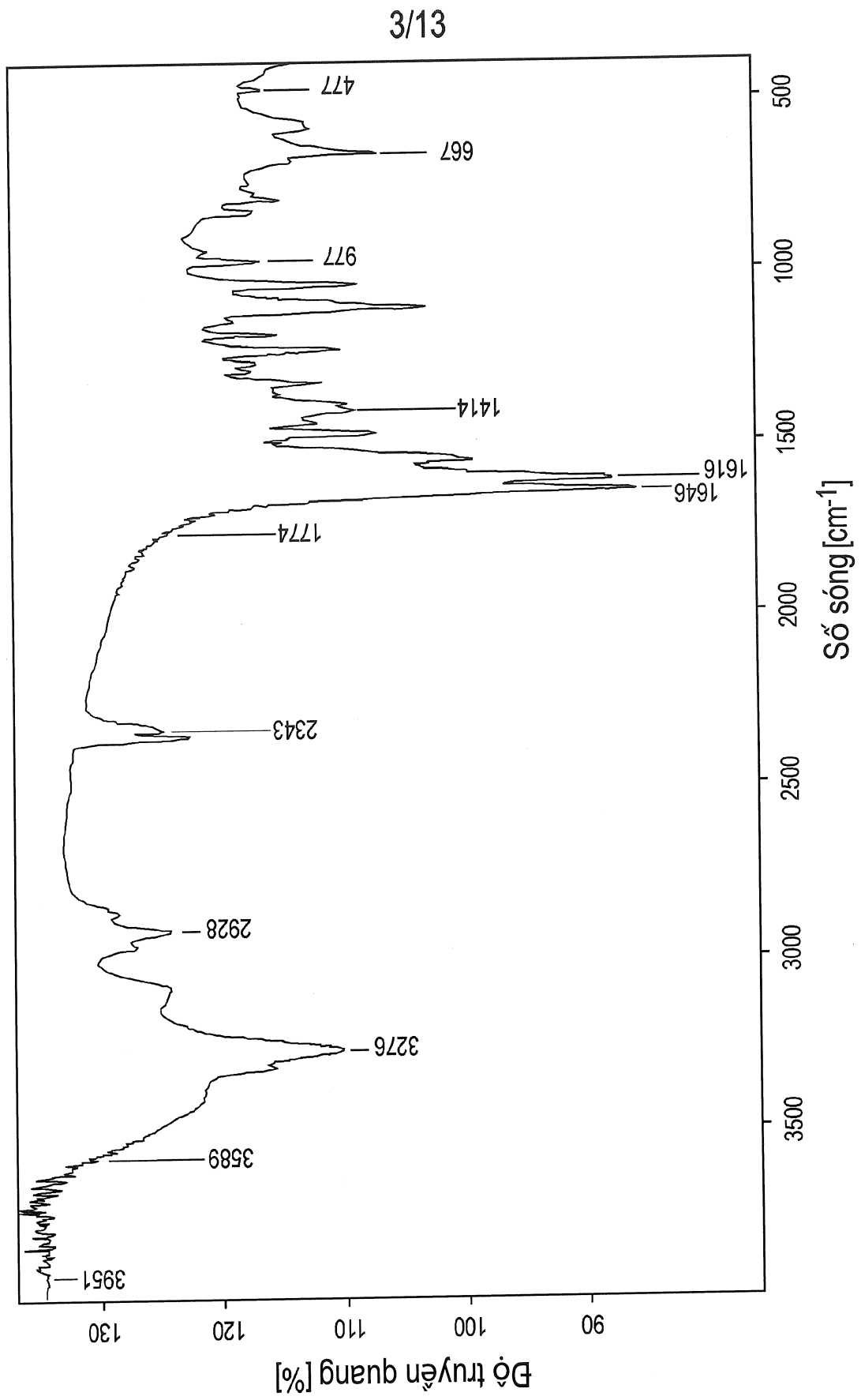


FIG.3

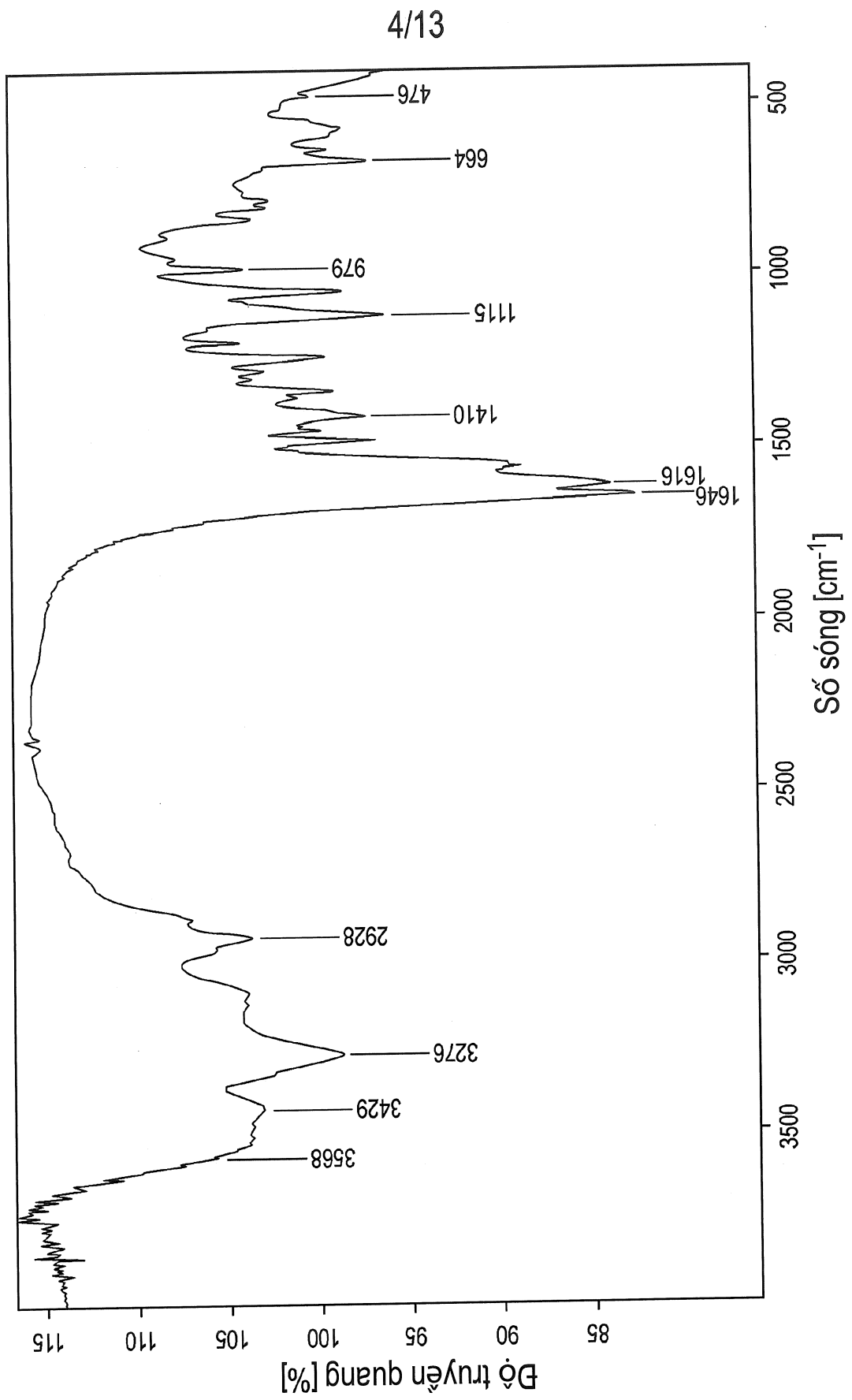


FIG.4

5/13

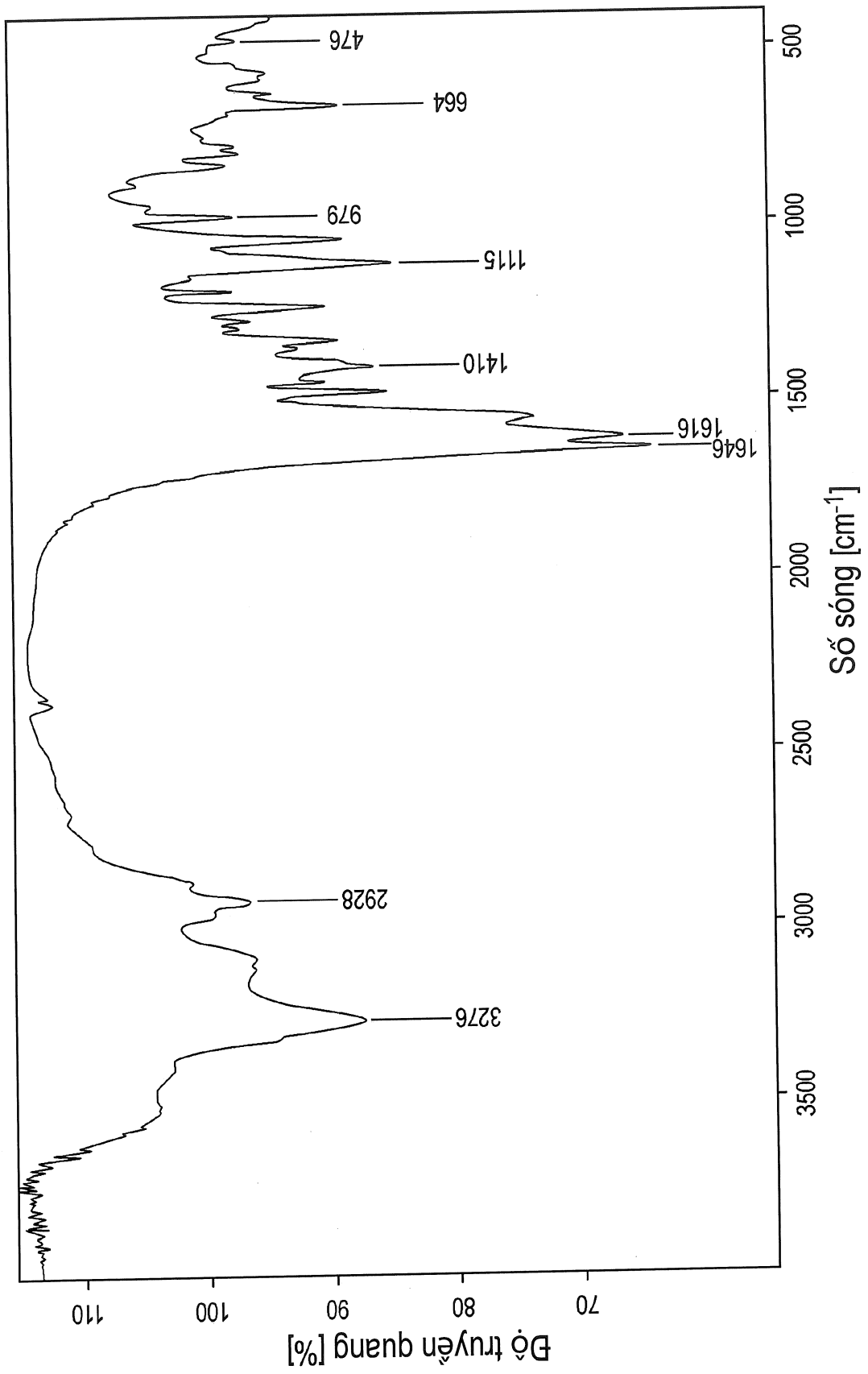


FIG.5

6/13

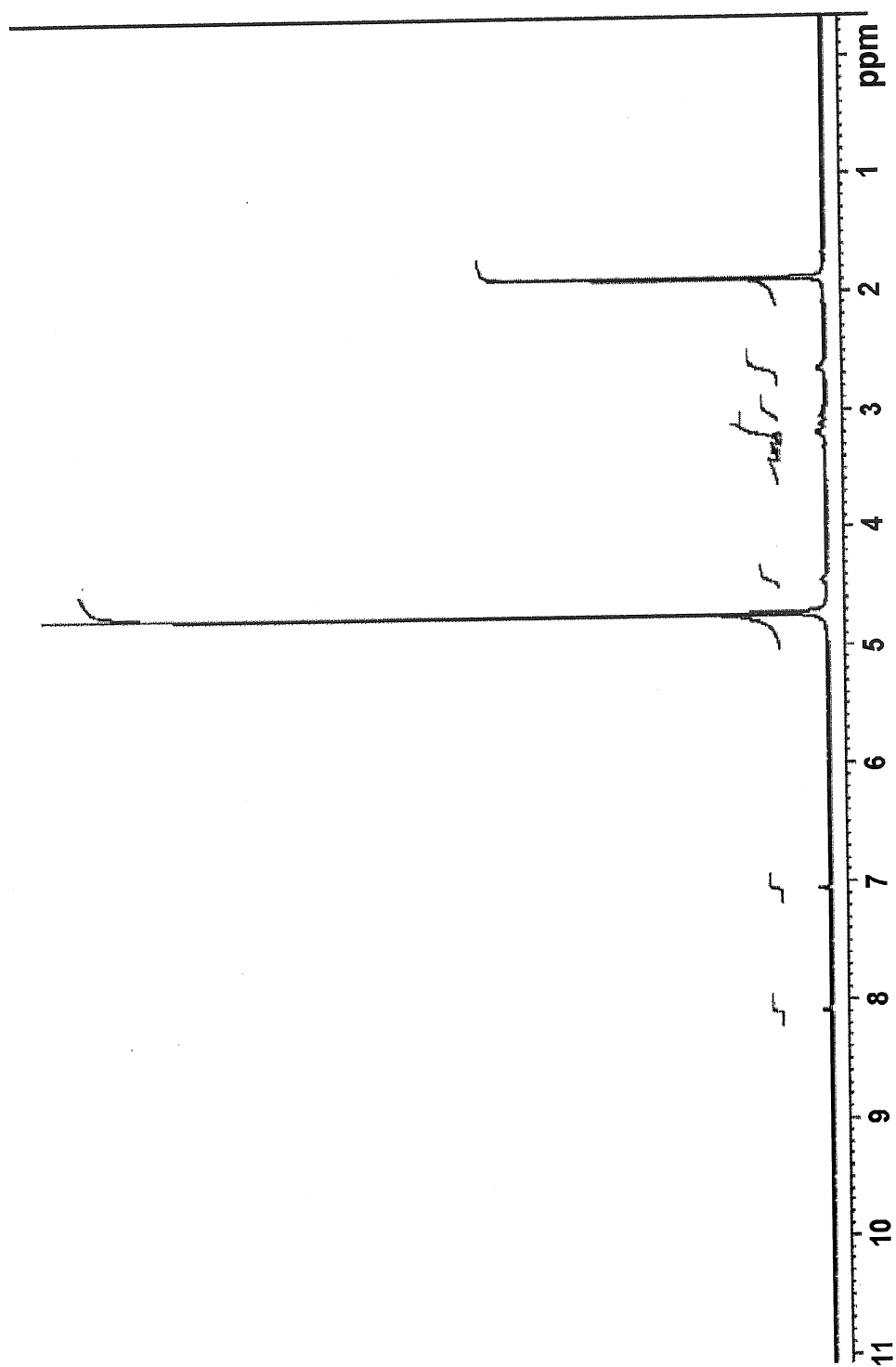


FIG. 6

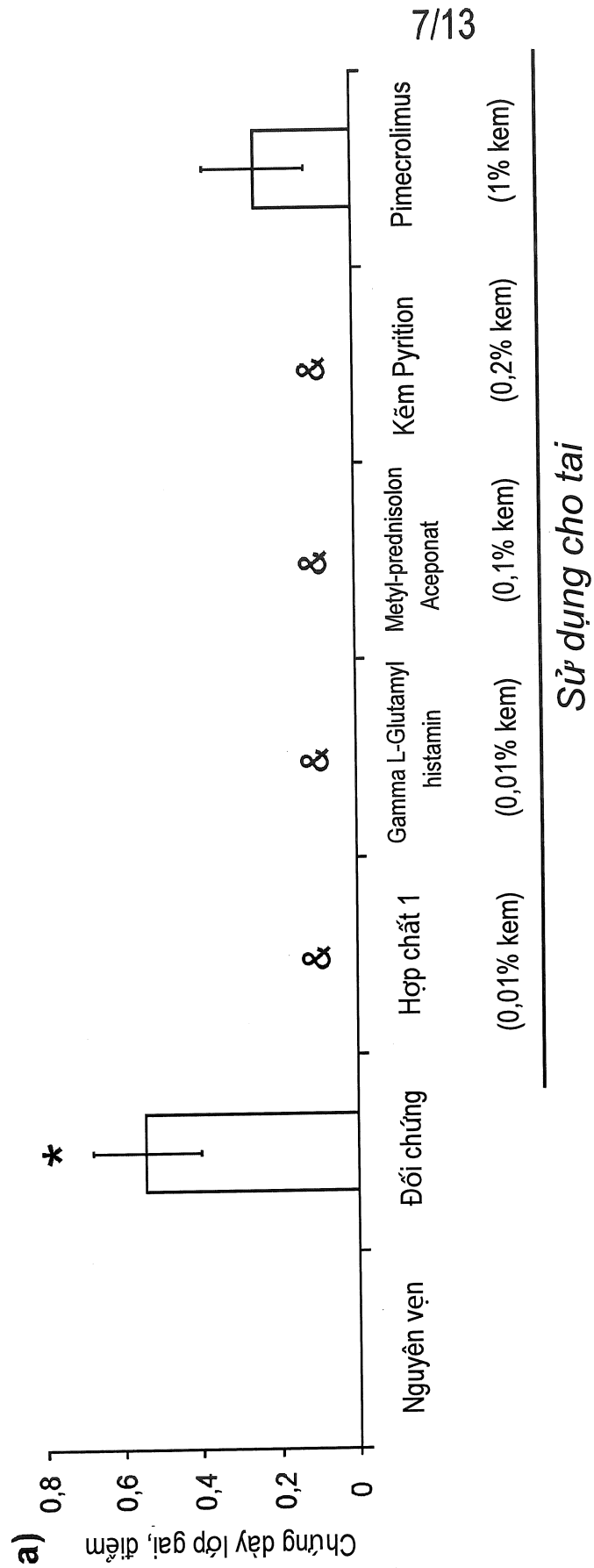


FIG.7

8/13

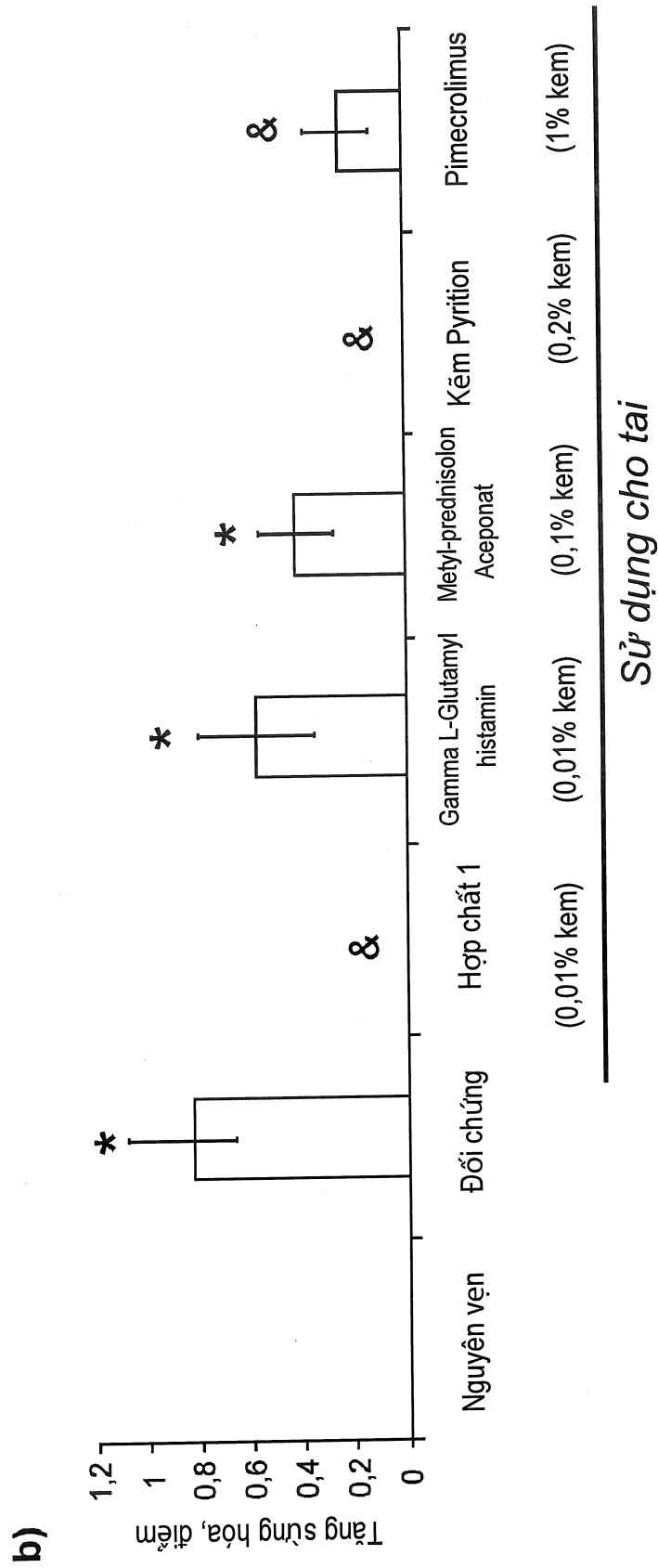


FIG.7 (tiếp)

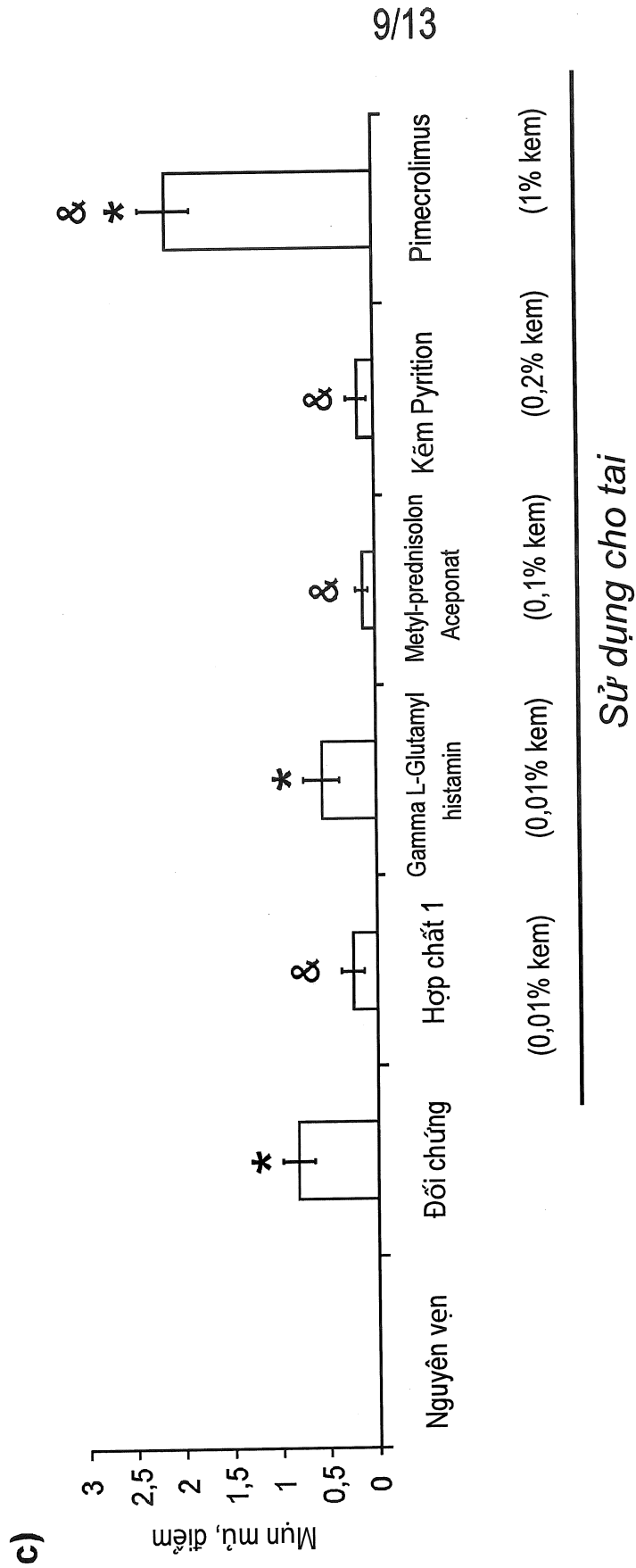


FIG.7 (tiếp)

10/13

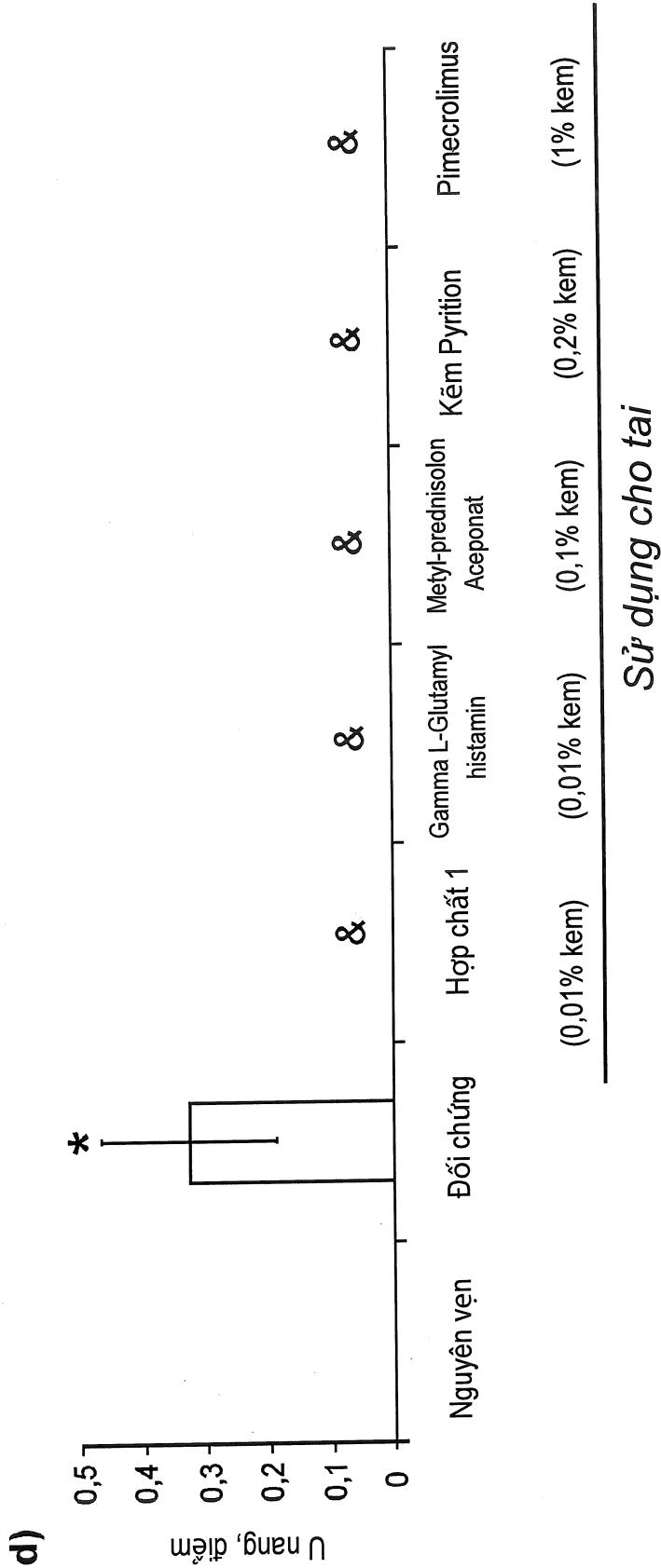


FIG.7 (tiếp)

e)

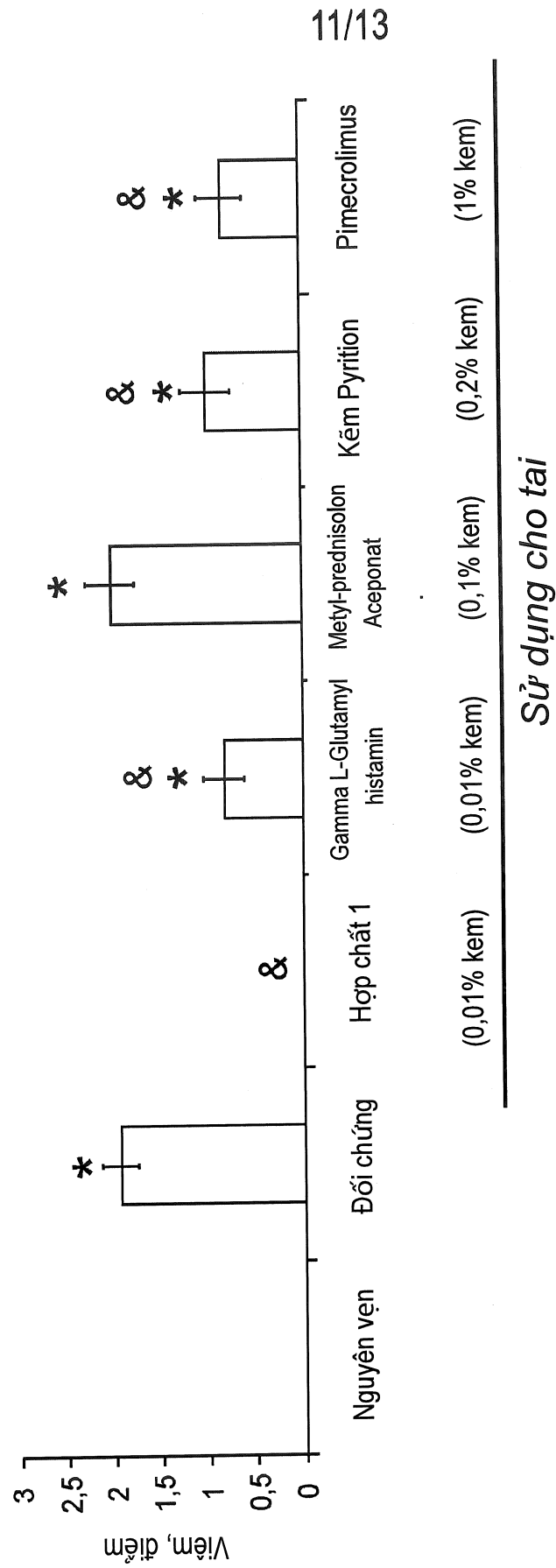
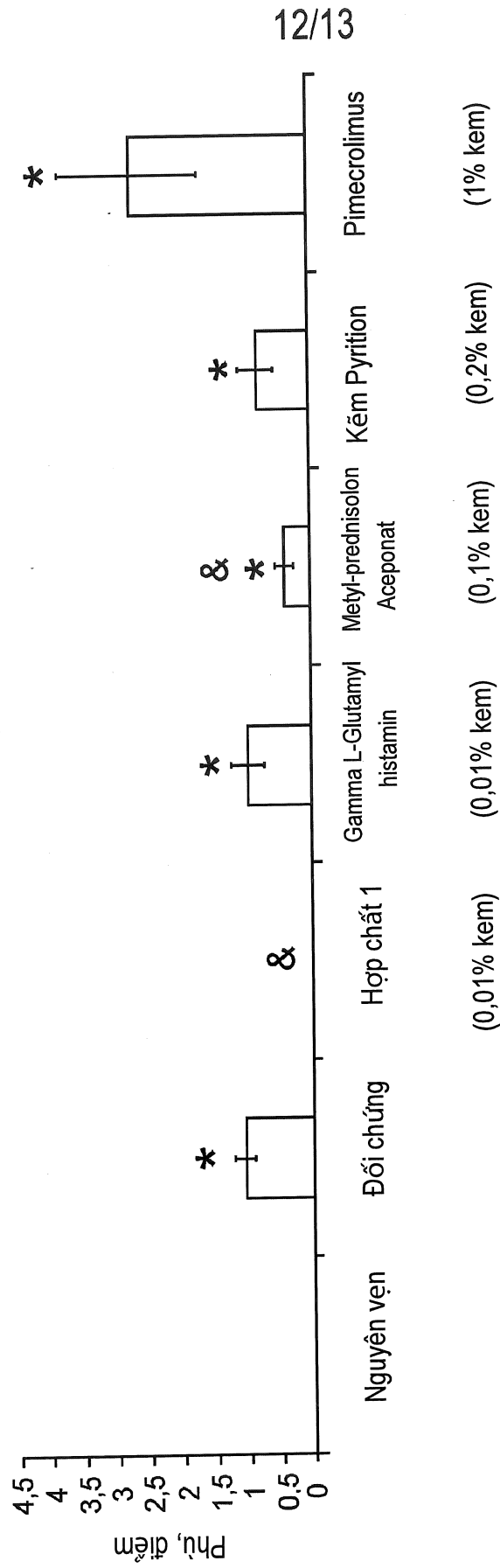


FIG.7 (tiếp)

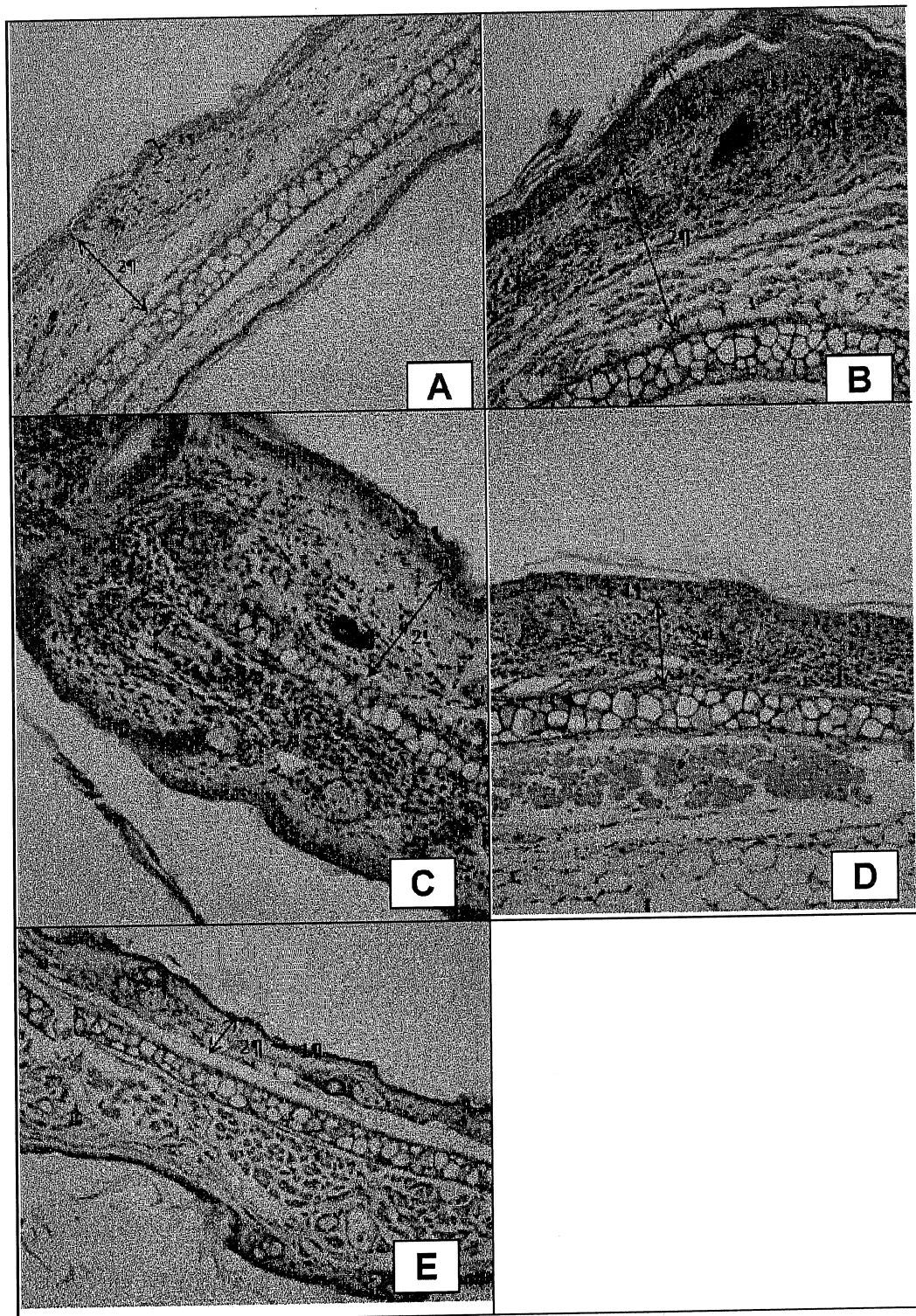
f)



Sử dụng cho tài

FIG.7 (tiếp)

13/13

**FIG.8**