



(51) МПК
C07K 5/117 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/07 (2022.08); A61P 25/28 (2022.08); C07K 5/1024 (2022.08); C07F 1/08 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022119484, 15.07.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 15.07.2022

Дата регистрации:
 29.11.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.07.2022

(45) Опубликовано: 29.11.2022 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

107061, Москва, ул. Преображенская площадь,
 6, эт. 1, пом. VIз, ООО "Вахнина и Партнеры"

(72) Автор(ы):

Козин Сергей Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
 "ЛАЙФМИССИЯ" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2709539 C1, 18.12.2019. WO
 2012056157 A1, 03.05.2012. RU 2679080 C1,
 05.02.2019. TSVETKOV P. O. et al, Peripherally
 Applied Synthetic Tetrapeptides HАЕЕ and
 RADD Slow Down the Development of Cerebral
 β -Amyloidosis in A β PP/PS1 Transgenic Mice,
 Journal of Alzheimer's Disease, 2015, v. 46, no. 4,
 p. 849-853.

(54) МЕДНЫЙ КОМПЛЕКС ПЕПТИДА НАЕЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ
 ЗАБОЛЕВАНИЙ

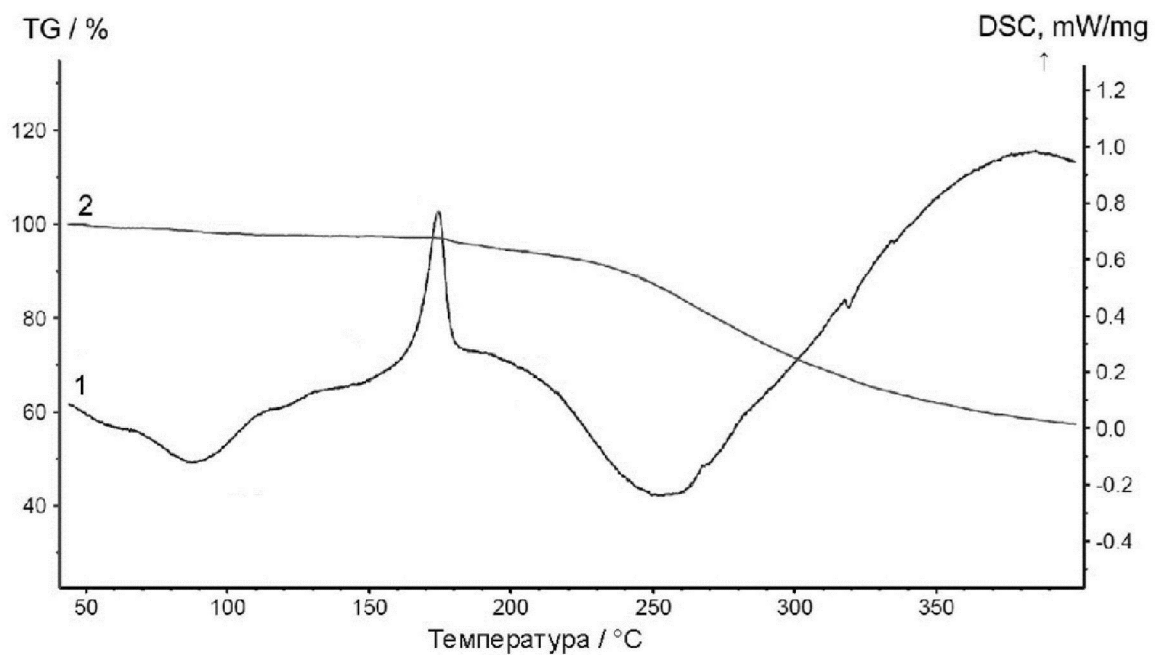
(57) Реферат:

Изобретение относится к медному комплексу формулы $[Cu(NAEE)]_m X_n$, где Cu представляет собой двухзарядный катион меди (II), m=1 для однозарядных и двухзарядных анионов, m=3 для трехзарядных анионов, НАЕЕ представляет собой синтетический пептид, ацелированный по N-концу и амидированный по C-концу, с аминокислотной последовательностью His-Ala-

Glu-Glu, X – фармацевтически приемлемый анион, n=1 для двухзарядных анионов, n=2 для однозарядных и трехзарядных анионов. Также предложены способ получения медного комплекса пептида НАЕЕ, фармацевтическая композиция на его основе и его применение. Предложенный медный комплекс применяется для лечения нейродегенеративных заболеваний. 4 н. и 24 з.п. ф-лы, 7 ил., 5 табл., 4 пр.

С 1
 2 7 8 4 7 3 2
 R U

R U
 2 7 8 4 7 3 2
 C 1



ДСК-ТГА кривая медного комплекса $[Cu(NAEE)]Cl_2$;
 1 – ДСК-кривая; 2 – ТГ-кривая.

Фиг. 3

RU 2784732 C1

RU 2784732 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 5/117 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 38/07 (2022.08); A61P 25/28 (2022.08); C07K 5/1024 (2022.08); C07F 1/08 (2022.08)

(21)(22) Application: **2022119484, 15.07.2022**(24) Effective date for property rights:
15.07.2022Registration date:
29.11.2022

Priority:

(22) Date of filing: **15.07.2022**(45) Date of publication: **29.11.2022 Bull. № 34**

Mail address:

**107061, Moskva, ul. Preobrazhenskaya ploshchad,
6, et. 1, pom. VIz, OOO "Vakhnina i Partnery"**

(72) Inventor(s):

Kozin Sergej Aleksandrovich (RU)

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"LAJFMISIIYA" (RU)**

(54) **HAEE PEPTIDE COPPER COMPLEX FOR THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: copper complexes.

SUBSTANCE: invention relates to a copper complex of the formula $[Cu(HAEE)]_m X_n$, where Cu is a doubly charged copper (II) cation, $m=1$ for singly and doubly charged anions, $m=3$ for triply charged anions, HAEE is a synthetic peptide acetylated at N-terminus and amidated at the C-terminus, with the amino acid sequence His-Ala-Glu-Glu, X is a pharmaceutically

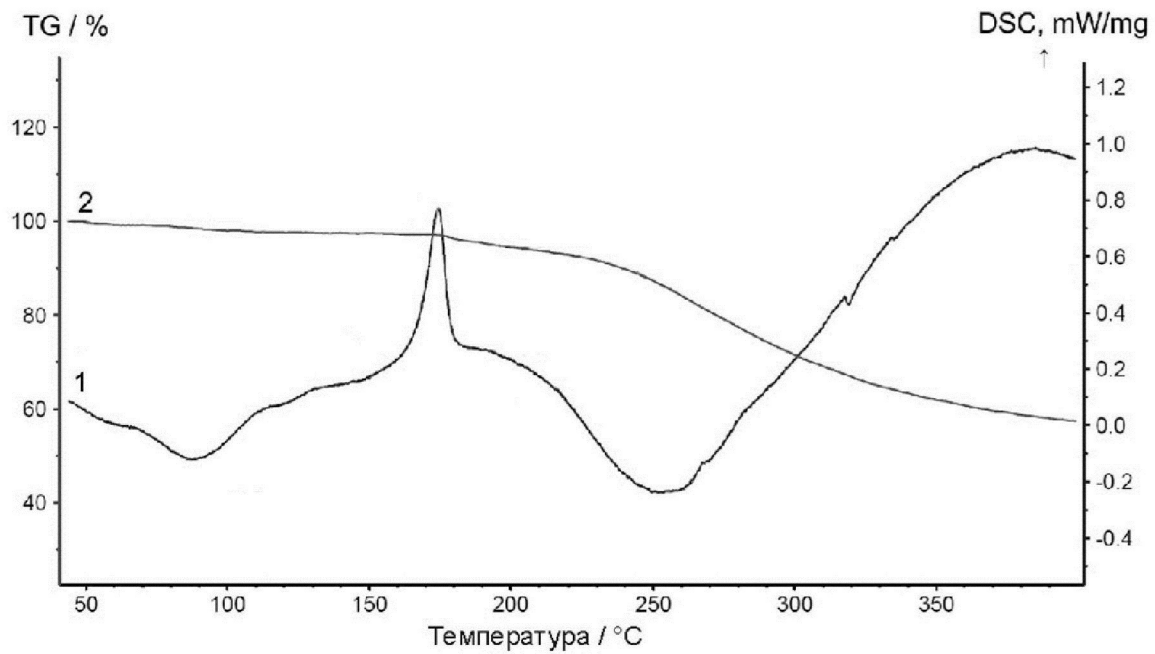
acceptable anion, $n=1$ for doubly charged anions, $n=2$ for singly and triply charged anions. Also proposed is a method for obtaining a copper complex of the HAEE peptide, a pharmaceutical composition based on it and its use.

EFFECT: proposed copper complex is used to treat neurodegenerative diseases.

28 cl, 7 dwg, 5 tbl, 4 ex

C 1
2 7 8 4 7 3 2
R U

R U
2 7 8 4 7 3 2
C 1



ДСК-ТГА кривая медного комплекса $[Cu(NAEE)]Cl_2$;
 1 – ДСК-кривая; 2 – ТГ-кривая.

Фиг. 3

RU 2784732 C1

RU 2784732 C1

Изобретение относится к медному комплексу пептида НАЕЕ, который описывается формулой $[Cu(НАЕЕ)]_m X_n$, где Cu представляет собой двухзарядный катион меди (II), $m = 1$ для однозарядных и двухзарядных анионов, $m = 3$ для трехзарядных анионов, НАЕЕ представляет собой синтетический пептид, ацетилованный по N-концу и амидированный по C-концу, с аминокислотной последовательностью His-Ala-Glu-Glu, X – фармацевтически приемлемый анион, $n = 1$ для двухзарядных анионов, $n = 2$ для однозарядных и трехзарядных анионов. Настоящее изобретение также относится к способу получения медного комплекса пептида НАЕЕ, к фармацевтическим композициям на его основе и применению медного комплекса для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Предшествующий уровень техники

Нейродегенеративные заболевания имеют ряд общих факторов развития и целый ряд других обобщающих механизмов (Litvinenko I.V., Krasakov I.V., Bisaga G.N. et al. Modern conception of the pathogenesis of neurodegenerative diseases and therapeutic strategy. Zhurnal Nevrologii i Psikhatrii imeni S.S. Korsakova. 2017;117(6-2):3-10. (In Russ.). doi: 10.17116/jnevro2017117623-10), что может связывать болезнь Альцгеймера (БА), сосудистую деменцию, нейродегенерацию при рассеянном склерозе (РС), болезнь Паркинсона, а также болезнь Альцгеймера в условиях активации системного воспаления (Williams-Gray C.H., Wijeyekoon R., Yarnall A.J. et al. ICICLE-PD study group. Serum immune markers and disease progression in an incident Parkinson's disease cohort (ICICLE-PD). Movement Disorders. 2016;31(7):995-1003. <https://doi.org/10.1002/mds.26563>). Воспаление относится к типовым патологическим процессам организма человека. Типовой патологический процесс проявляется определенным набором характерных признаков. В настоящее время считается, что нейродегенеративный процесс является вторичным по отношению к воспалительному (Mostafa A., Jalilvand S., Shoja Z. Et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus, Epstein-barr virus, and vitamin D status in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. Journal of Medical Virology. 2017. doi: 10.1002/jmv.24774; Litvinenko I.V., Krasakov I.V., Bisaga G.N. et al. Modern conception of the pathogenesis of neurodegenerative diseases and therapeutic strategy. Zhurnal Nevrologii i Psikhatrii imeni S.S. Korsakova. 2017;117(6-2):3-10. (In Russ.). doi: 10.17116/jnevro2017117623-10).

Болезнь Альцгеймера является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний среди людей пожилого возраста и характеризуется нейритными бляшками, основным компонентом которых является пептид бета-амилоид (A β). N-концевая область 1-16 бета-амилоида является металл-связывающим доменом, где цинк (Zn) и медь (Cu) присоединяются к пептиду A β (Guilloreau L., Damian L., Coppel Y., et al. (2006). Structural and thermodynamical properties of CuII amyloid- β 16/28 complexes associated with Alzheimer's disease. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 11(8), 1024-1038, doi: 10.1007/s00775-006-0154-1). Снижение уровня ионов цинка в крови за счет связывания ионов цинка специфическими хелатирующими агентами и/или блокирование взаимодействий пептида A β с ионами цинка может предотвратить патологии, связанные с этими взаимодействиями (Ayton S., Lei P., Bush A. Biometals and Their Therapeutic Implications in Alzheimer's Disease. Neurotherapeutics. 2015. 12(1): p. 109-120). Высокие концентрации цинка вызывают преципитацию пептида A β и влияют на образование в специфических отделах мозга (гиппокамп, кортекс, таламические ядра) внеклеточных агрегатов A β (амилоидных бляшек), которые ассоциированы с развитием болезни Альцгеймера ((Frederickson C.J., Bush A.I. (2001). Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects. Biometals, 14(3), 353-366, doi: 10.1023/A:1012934207456). Поэтому применение цинка и других катионов в фармацевтических

препаратах, которые могут взаимодействовать с таргетными мишенями в организме и лечить нейродегенеративные заболевания, в частности болезнь Альцгеймера, является нетривиальным решением.

На сегодняшний день нет действующих эффективных препаратов, которые бы излечивали нейродегенеративные заболевания. Из научной и патентной литературы известны ряд пептидов, которые могли бы применяться при лечении таких заболеваний.

Из WO 2012/056157 и патента РФ № 2679080 известно соединение, представляющее собой Ас-НАЕЕ-NH₂ (далее – НАЕЕ). В аббревиатуре НАЕЕ буквы означают: Н – гистидин, А – аланин, Е – глутаминовая кислота. НАЕЕ способно ингибировать взаимодействие пептидов Аβ с ионами Zn (II), вызывая уменьшение или предотвращение агрегации пептида Аβ в присутствии ионов Zn (II) при физиологических концентрациях ионов Zn (II) 100-400 мкМ. Более высокие концентрации ионов Zn (II), порядка 1 ммоль (мМ), подавляют взаимодействия между НАЕЕ и 1-16 областью Аβ. Было показано, что инкубация агрегатов Аβ с НАЕЕ в течение минимум 1 часа при 20, 40, 80, 100 и 150 мкМ НАЕЕ приводит к дезагрегации таких агрегатов.

Из патента РФ № 2679059 известно, что несмотря на ингибирование образования амилоидных бляшек, влияние известных препаратов, в частности НАЕЕ, на улучшение когнитивных функций при болезни Альцгеймера в среднем является очень ограниченным и существует необходимость получения альтернативных эффективных средств для лечения болезни Альцгеймера, в том числе за счет снижения или предотвращения связывания ионов Zn(II) с пептидом Аβ. В качестве альтернативного средства для лечения болезни Альцгеймера было предложено использовать пептид с аминокислотной последовательностью (в стандартных однобуквенных кодах) H[isoD][pS]GYEVNH (где isoD обозначает изомеризованный остаток аспарагиновой кислоты, а pS относится к фосфорилированному остатку серина) с открытыми или защищенными концами основной полипептидной цепи.

Из патента РФ № 2709539 известно, что короткие заряженные пептиды типа НАЕЕ имеют очень короткое время жизни в плазме крови (от нескольких секунд до нескольких минут) и с трудом проходят через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), что существенно ослабляет эффективность их терапевтического воздействия. С целью преодоления этих недостатков авторы патента РФ № 2709539 разработали фармацевтическую композицию для доставки НАЕЕ через ГЭБ для лечения нейродегенеративных заболеваний, включая деменцию Альцгеймеровского типа (болезнь Альцгеймера), которая позволяет улучшить фармакокинетические характеристики и увеличить биодоступность НАЕЕ.

Данная композиция содержит эффективное количество субстанции в виде комплекса НАЕЕ с цинком и человеческим сывороточным альбумином (НАЕЕ-Zn-HSA) в форме раствора для введения с фармацевтически приемлемым носителем, выбранным из круга нейтральных носителей и разбавителей, например, в физиологическом растворе. Полученная фармацевтическая композиция позволяет увеличить в пять раз биодоступность субстанции в мозге, увеличить время полувыведения из организма в два раза; улучшить когнитивные функции экспериментальных животных на 20%.

Изобретение по патенту РФ № 2709539 было выбрано в качестве ближайшего аналога, поскольку только оно представляет собой единственный известный для НАЕЕ комплекс. Из патента РФ № 2709539 известно, что с человеческим альбумином (HSA) пептид НАЕЕ в присутствии ионов цинка образует специфический тройной комплекс (НАЕЕ-Zn-HSA). При этом в отсутствие ионов цинка взаимодействий между НАЕЕ и HSA не наблюдалось. Данный комплекс характеризуется тем, что с помощью иона цинка удалось получить межмолекулярное связывание между молекулами НАЕЕ и HSA.

Катион цинка является координирующим катионом между этими двумя молекулами. В твердом виде данный комплекс получен не был.

Из патента РФ № 2709539 известно, что фармацевтическая композиция НАЕЕ-Zn-HSA является стабильной в подходящей водной буферной системе, в диапазоне значений рН от 4 до 8, в присутствии или в отсутствии различных солей.

Известно, что заряд альбумина в нейтральной среде равен -1, в щелочной среде равен -2, а в слабокислой среде равен 0 (изоэлектрическое состояние) и альбумин выпадает в осадок (Биохимия с упражнениями и задачами. Под ред. А.И. Глухова, Е.С. Северина. ГЭОТАР-Медиа, Москва. 2019. С.19), поэтому данный комплекс не должен существовать в слабокислой среде при рН 4-5,5.

Из патента РФ № 2709539 известно, что для приготовления фармацевтической композиции НАЕЕ-Zn-HSA, пригодной для проведения доклинических исследований, 5 мг НАЕЕ, 600 мг человеческого альбумина и 0,5 мг хлорида цинка (ZnCl₂) растворяли в 20 миллилитрах физиологического раствора. В качестве источника НАЕЕ использовался лиофилизированный препарат синтетического пептида НАЕЕ (чистота более 98%). При известной молекулярной массе НАЕЕ равной 525,52 г/моль соотношение компонентов в комплексе НАЕЕ-Zn-HSA составляет примерно НАЕЕ : Zn : HSA ~ 1 : 2,6 : 1 по молям.

Недостатком данного изобретения является высокое содержание человеческого альбумина, которое превышает в 120 раз по массе содержание активного вещества НАЕЕ, а также высокое содержание цинка, которое в 2,6 раза превышает по массе содержание активного вещества НАЕЕ и может привести к образованию комплекса с нестехиометрическим соотношением входящих в него компонентов. Цинк является значительно более токсичным элементом, по сравнению с элементами, присутствующими в значительных количествах в организме, например, натрием и кальцием.

Высокие концентрации человеческого альбумина могут оказывать различные негативные эффекты на организм как экспериментальных животных, так и человека (Gales B.J., Erstad B.L. (1993). Adverse reactions to human serum albumin. *Annals of Pharmacotherapy*, 27(1), 87-94, doi: 10.1177/106002809302700119; Kremer H., Baron-Menguy C., Tesse A. et al. (2011). Human serum albumin improves endothelial dysfunction and survival during experimental endotoxemia: concentration-dependent properties. *Critical care medicine*, 39(6), 1414-1422, doi: 10.1097/CCM.0b013e318211ff6e). Некоторые образцы HSA, в отличие от бычьего сывороточного альбумина (BSA), при культивировании мышечных эмбрионов не доводили их до стадии бластоцисты (Léveillé M.C., Carnegie J., Tanphaichitr N. (1992). Effects of human sera and human serum albumin on mouse embryo culture. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 9(1), 45-52, doi: 10.1007/BF01204114). HSA может вызывать иммунный ответ у мышей после его введения (Favoretto B.C., Ricardi R., Silva, S.R. et al. (2011). Immunomodulatory effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. *Toxicon*, 57(4), 600-607, doi: 10.1016/j.toxicon.2010.12.023).

Известно, что HSA может быть использован для улучшения когнитивных функций при лечении болезни Альцгеймера, однако только при интрацеребровентрикулярном (внутричерепном) введении. Введение HSA в плазму крови может снижать его эффективность (Ezra, A., Rabinovich-Nikitin, I., Rabinovich-Toidman, P., & Solomon, B. (2016). Multifunctional effect of human serum albumin reduces Alzheimer's disease related pathologies in the 3xTg mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease*, 50(1), 175-188, doi: 10.3233/JAD-150694).

Поэтому уменьшение количества человеческого альбумина или возможность

полностью отказаться от него в лекарственном препарате, замена сложного и травмоопасного интрацеребровентрикулярного введения на внутривенное, при одновременном усилении терапевтического эффекта является важной медицинской задачей при лечении нейродегенеративных заболеваний.

5 Ранее НАЕЕ и комплекс НАЕЕ-Zn-HSA не характеризовались в твердой фазе и их свойства в твердой фазе неизвестны.

Таким образом, задачи, на решение которых направлено изобретение, заключаются в получении эффективного средства для лечения нейродегенеративных заболеваний в виде неизвестного ранее медного комплекса пептида НАЕЕ, в том числе в твердой
10 форме, разработке фармацевтических композиций на его основе и его применении для лечения нейродегенеративных заболеваний.

В соответствии с настоящим изобретением описывается медный комплекс пептида НАЕЕ для лечения нейродегенеративных заболеваний формулы $[Cu(НАЕЕ)]_m X_n$, где Cu представляет собой двухзарядный катион меди (II), $m = 1$ для однозарядных и
15 двухзарядных анионов, $m = 2$ для трехзарядных анионов, НАЕЕ представляет собой синтетический пептид, ацетилированный по N-концу и амидированный по C-концу, с аминокислотной последовательностью His-Ala-Glu-Glu, X – фармацевтически приемлемый анион, $n = 1$ для двухзарядных анионов, $n = 2$ для однозарядных и трехзарядных анионов.

20 В описываемом комплексе молярное содержание катиона меди (II) и пептида НАЕЕ является эквимольным (1:1). Таким образом, если X является однозарядным анионом, то заявляемый медный комплекс пептида НАЕЕ описывается формулой $[Cu(НАЕЕ)]X_2$.

Если X является двухзарядным анионом, то заявляемый медный комплекс пептида
25 НАЕЕ описывается формулой $[Cu(НАЕЕ)]X$. Если X является трёхзарядным анионом, то заявляемый медный комплекс пептида НАЕЕ описывается формулой $[Cu(НАЕЕ)]_3 X_2$.

Взаимодействие пептида НАЕЕ с ионом меди наблюдалось и при других молярных соотношениях НАЕЕ: Cu, а именно, в диапазоне от 1:0,1 до 1:10, что связано с наличием
30 множества донорно-акцепторных центров (азот, кислород) в молекуле НАЕЕ и взаимодействие между НАЕЕ и Cu может быть нестехиометрическим. Использование более высокого содержания меди (>1:10) приводило к получению в твердой форме смеси из медного комплекса пептида НАЕЕ и соответствующей соли меди, при использовании малого количества меди (<1:0,1) его взаимодействие с пептидом НАЕЕ не фиксировали физико-химическими методами.

35 В настоящем изобретении было обнаружено, что для усиления терапевтического действия пептида НАЕЕ для лечения нейродегенеративных заболеваний, в частности опосредованно вызываемых воспалительными причинами, нет необходимости использования цинка и человеческого альбумина. Для улучшения когнитивных функций, нарушенных вследствие нейродегенеративных заболеваний, достаточным является
40 использование только пептида НАЕЕ и меди в одном комплексе без необходимости использования высоких количеств человеческого альбумина. Также, если использование НАЕЕ-Zn-HSA улучшает фармакокинетические параметры пептида НАЕЕ, то в настоящем изобретении использование медного комплекса пептида НАЕЕ для лечения нейродегенеративных заболеваний изменяет механизм действия пептида НАЕЕ,
45 связанный с конформационной структурой пептида НАЕЕ, что приводит к неожиданно высокому терапевтическому эффекту.

Это подтверждается экспериментальным введением нативного пептида НАЕЕ и полученного по данному изобретению медного комплекса пептида НАЕЕ в организм

экспериментальных животных. Было обнаружено, что 3D-структура нативного пептида НАЕЕ, который в виде водного раствора был помещён на 2 минуты в плазму крови мышей дикого типа, отличается от 3D-структуры нативного НАЕЕ в исходном водном растворе, что подтверждается методом ВЭЖХ по изменению времени выхода с хроматографической колонки пробы НАЕЕ, экстрагированной из плазмы крови, относительно времени выхода пробы НАЕЕ, экстрагированной из исходного водного раствора. В то же время 3D-структура медного комплекса пептида НАЕЕ оставалась неизменной в аналогичных экспериментальных условиях (то есть после экстрагирования из исходного водного раствора медного комплекса пептида НАЕЕ и после экстрагирования данного комплекса из плазмы крови мышей дикого типа после 2-х минутной экспозиции) и соответствовала 3D-структуре нативного пептида НАЕЕ, экстрагированного из исходного водного раствора. По данным масс-спектрометрии химическая структура пептида НАЕЕ во всех экспериментальных пробах сохранялась неизменной как для нативного пептида, так и для пептида в составе медного комплекса. Изменение времени выхода нативного пептида НАЕЕ или медного комплекса пептида НАЕЕ с хроматографической колонки связано в основном с различиями в гидрофобных взаимодействиях пептида НАЕЕ с материалом колонки, а эти взаимодействия в свою очередь определяются превалирующей 3D-структурой пептида НАЕЕ в конкретной пробе. Таким образом, из полученных экспериментальных данных следует, что 3D-структура пептида НАЕЕ, которая соответствует «развёрнутой» конформации пептида и является превалирующей для нативного пептида НАЕЕ в исходном водном растворе, соответствует 3D-структуре медного комплекса пептида НАЕЕ в водном растворе и остаётся неизменной в случае экспозиции медного комплекса пептида НАЕЕ в плазме крови, в то время как нативный пептид НАЕЕ в плазме крови утрачивает «развёрнутую» конформацию.

В данном случае термин 3D-структура используется как синоним пространственной структуры или взаимного расположения атомов в молекуле НАЕЕ в трехмерном пространстве. Метод ВЭЖХ основан на преимущественно межмолекулярных взаимодействиях на границе раздела фаз. Изменение времени выхода НАЕЕ с хроматографической колонки отражает изменение межмолекулярных взаимодействий НАЕЕ с сорбентом, что является следствием различий пространственной структуры молекул НАЕЕ в нативном состоянии и в виде медного комплекса.

Известно, что нарушение 3D-структуры олигопептидов может приводить к снижению их функций и уменьшению терапевтического действия (Sikora, K., Jaśkiewicz, M., Neubauer, D., Migoń, D., & Kamysz, W. (2020). The role of counter-ions in peptides—an overview. *Pharmaceuticals*, 13(12), 442.). Ранее было показано, что для оптимального взаимодействия с партнёрами белковой природы пептид НАЕЕ должен находиться в «развёрнутой» конформации (Barykin E. P., Garifulina A. I., Tolstova A. P., Anashkina A. A., Adzhubei A. A., Mezentsev Y. V., Shelukhina I. V., Kozin S. A., Tsetlin V. I., Makarov A. A. Tetrapeptide Ac-NAEE-NH(2) Protects $\alpha\beta 2$ nAChR from Inhibition by A β // *International journal of molecular sciences*. © 2020. © Т. 21, № 17. © С. 6272; Zolotarev YA, Mitkevich VA, Shram SI, Adzhubei AA, Tolstova AP, Talibov OB, Dadayan AK, Myasoyedov NF, Makarov AA, Kozin SA. Pharmacokinetics and Molecular Modeling Indicate nAChR $\alpha 4$ -Derived Peptide NAEE Goes through the Blood-Brain Barrier. *Biomolecules*. 2021 Jun 18;11(6):909). В нативном пептиде НАЕЕ имидазольная группа аминокислотного остатка гистидина может образовывать стабильные полярные связи с карбоксильными группами боковых цепей аминокислотных остатков глутаминовой кислоты, что не способствует поддержанию биологически значимой «развёрнутой» конформации данного пептида и, как следствие,

снижает полезные терапевтические эффекты НАЕЕ.

Таким образом, одним из преимуществ данного изобретения является повышение терапевтической эффективности медного комплекса пептида НАЕЕ вследствие сохранения 3D-структуры данного комплекса в «развернутой» конформации.

5 Также было обнаружено, что введение в плазму крови мышей комплекса НАЕЕ-Zn-HSA, полученного по описанному в патенте РФ № 2709539 способу, приводит к их стрессу, изменению внешнего вида и даже гибели, что может быть связано с высокой массовой концентрацией HSA в этом комплексе. Напротив, введение в плазму крови здоровых мышей медного комплекса пептида НАЕЕ не приводило к каким-либо
10 нарушениям в поведении и в физическом состоянии животных по сравнению с животными контрольной группы, которым вводился физиологический раствор, что указывает на отсутствие побочных эффектов медного комплекса пептида НАЕЕ и является дополнительным преимуществом настоящего изобретения.

Таким образом, отличием настоящего изобретения от ближайшего аналога, патента
15 РФ № 2709539, состоит в том, что заявляемый медный комплекс не содержит HSA и цинка, который имеет сниженную молярную концентрацию ионов по сравнению с комплексом НАЕЕ-Zn-HSA с 2,6, как описано в примере патента РФ № 2709539, до 1 (эквимольное количество), как описано в настоящем изобретении.

Изобретение также имеет отношение к применению медного комплекса для лечения
20 нейродегенеративных заболеваний, а также патологий, сопровождающихся нейровоспалительными процессами. Заявляемый медный комплекс может эффективно влиять на нейродегенеративные заболевания, в частности, вызванные воспалительными причинами, восстанавливая нарушенные когнитивные функции.

Медный комплекс может быть использован как в твердой, так и в жидкой форме,
25 сохраняя свою стабильность в течение по меньшей мере 2 лет.

Техническим результатом изобретения является:

- возможность использования заявляемого медного комплекса при лечении
нейродегенеративных заболеваний, в частности вызванных опосредованно
воспалительными причинами, которое приводит к эффективному восстановлению
30 когнитивных функций;
- повышенная стабильность заявляемого медного комплекса по сравнению с НАЕЕ;
- устойчивость «развернутой» конформации 3D-структуры заявляемого медного
комплекса в плазме крови по сравнению с НАЕЕ;
- отсутствие побочных эффектов у заявляемого медного комплекса по сравнению с
35 НАЕЕ-Zn-HSA.

Заявляемый в настоящем изобретении медный комплекс в соответствии с используемым способом получения может быть получен в аморфной форме, что подтверждается рентгенофазовым анализом (Фиг. 1).

Сравнение данных рентгенофазового анализа комплекса НАЕЕ-Zn-HSA
40 нецелесообразно, поскольку при соотношении масс HSA:НАЕЕ ~ 120 на дифрактограмме будет представлен только HSA, а вещество НАЕЕ будет представлено в виде минорной примеси, не проявляющейся на дифрактограмме.

Медный комплекс характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с термогравиметрией (ТГ) (ДСК-ТГА). Молекула НАЕЕ на
45 ДСК-кривой характеризуется: широким пиком с началом при 62 °С и максимумом при 89 °С; двойным пиком плавления при температуре 203 и 227,5 °С с началом при 188 °С (Фиг. 2). Погрешность при многократном измерении оценивается в ± 3 °С. Заявляемый медный комплекс на ДСК-кривой характеризуется тремя максимумами: первый широкий

эндотермический максимум начинается от 70 °С и имеет максимум при 88 °С; второй экзотермический максимум наблюдается при температуре 174 °С, третий эндотермический широкий максимум – при 250-255 °С (Фиг. 3).

5 ДСК-кривые показывают, что термическое поведение медного комплекса (Фиг. 3) существенно отличается от поведения НАЕЕ (Фиг. 2), температура плавления комплекса выше по сравнению с температурой плавления НАЕЕ, что обеспечивает более высокую стабильность комплекса, что подтверждается результатами теста ускоренного хранения.

Сравнение данных ДСК-анализа комплекса НАЕЕ-Zn-HSA нецелесообразно, поскольку при соотношении масс HSA:НАЕЕ > 120 на ДСК-кривой будет представлен 10 только HSA, а вещество НАЕЕ представлено в виде минорной примеси, не проявляющейся на ДСК-кривой.

ИК-спектр с Фурье преобразованием заявляемого медного комплекса представлен на Фиг. 4. ИК-спектр комплекса повторяет все основные линии ИК-спектра НАЕЕ. Присутствует ряд отличий в полосах колебаний комплекса по сравнению с НАЕЕ. В 15 комплексе наблюдается смещение максимумов при 1395 в 1410 см⁻¹ (CH₃ деф.), при 825 в 815 см⁻¹ (область неплоских деформаций NH₂ группы), при 1130 в 1115 см⁻¹ (C-N вал.), исчезновение боковой моды у максимума при 1645 см⁻¹ (C=O).

20 Таким образом после образования комплекса в ИК-спектре произошли изменения колебаний связи в молекуле НАЕЕ, указывающие на взаимодействие с ионом меди.

Сравнение ИК-спектра комплекса НАЕЕ-Zn-HSA нецелесообразно, поскольку при соотношении масс HSA:НАЕЕ > 120 на ИК-спектре будет представлен только HSA, а 25 вещество НАЕЕ представлено в виде минорной примеси, не проявляющейся на ИК-спектре.

Заявляемый медный комплекс может быть получен в виде лиофилизата методом стандартной сублимационной (лиофильной) сушки.

Получение медного комплекса заключается в смешивании водных растворов НАЕЕ и водорастворимой соли меди в эквимольных соотношениях при комнатной 30 температуре, перемешивании в течение 10-60 мин, замораживании раствора и лиофильном высушивании.

Водорастворимые медные соли (до нескольких % масс.) представляют собой нитрат, ацетат, хлорид, салицилат, лактат, глюконат. Для получения медного комплекса с другим фармацевтически приемлемым анионом, после перемешивания раствора и перед 35 замораживанием проводится анионно-обменная хроматография или диализ, для удаления первичного аниона. После чего в раствор добавляется другой соответствующий фармацевтически приемлемый анион, раствор замораживается и лиофильно высушивается.

Анионы могут быть одно-, дву- или трехзарядными и выбираться из группы 40 глицината, тартрата, цитрата, и т.п. Необходимость удаления анионов из раствора обусловлена заменой одного аниона на другой анион из-за слабой растворимости этих солей меди. Наличие анионов разной природы в составе комплекса в жидкой или в твердой фазе не влияет на терапевтическую эффективность медного комплекса. Предполагается, что только внутренняя сфера медного комплекса проявляет 45 терапевтическую эффективность независимо от природы аниона.

Также анионы для медного комплекса выбираются из группы, трифторацетата, пирувата, галактуроната, бромида, глутарата, сукцината, малеата, fumarата, бензолсульфоната, тозилата и других фармацевтически приемлемых анионов.

Использование каждого из вышеперечисленных анионов для получения медного

комплекса в твердой фазе методом сублимационной сушки показало, что в таком комплексе может частично оставаться гидратированная или связанная вода, однако, данный комплекс не набирает дополнительную воду при хранении и стабилен в течение длительного времени.

5 Еще одним объектом изобретения является фармацевтические композиции с эффективным количеством медного комплекса и наличием вспомогательных веществ. В качестве лекарственного средства медный комплекс может быть использован без вспомогательных веществ в виде лиофилизированной субстанции.

10 Эффективное количество медного комплекса зависит от типа нейродегенеративного заболевания, веса тела, способа введения, поэтому может варьироваться в широких пределах от 0,1 до 100 мг, более желательно от 5 до 50 мг.

15 Фармацевтическая композиция медного комплекса может быть в твердом виде или в виде водного раствора. Твердые композиции медного комплекса содержат его эффективное количество и необязательно вспомогательные вещества. Твердая фармацевтическая композиция может быть получена лиофилизацией медного комплекса и набором вспомогательных компонентов или добавлением вспомогательных веществ к лиофилизированному медному комплексу.

Лиофилизированный медный комплекс может быть в аморфной форме, которая соответствует дифрактограмме на Фиг. 1.

20 Вспомогательные вещества выбираются из фармацевтически приемлемых добавок. Такими веществами могут быть маннитол, повидон К 17, трометамол, динатрия эдетат, натрия хлорид, сахароза, гистидин, полоксамер 407, и другие фармацевтически приемлемые добавки.

25 Фармацевтическая композиция медного комплекса в виде водного раствора содержат эффективное количество медного комплекса, воду, а также набор фармацевтически приемлемых добавок и солей. Такими веществами могут быть маннитол, повидон К 17, трометамол, динатрия эдетат, натрия хлорид, сахароза, гистидин, полоксамер 407, и другие фармацевтически приемлемые добавки.

30 Еще одним объектом изобретения является применение медного комплекса для лечения нейродегенеративных заболеваний, которое заключается во введении медного комплекса в составе описанных фармацевтических композиций пациенту в эффективном количестве. Эффективное количество медного комплекса зависит от типа нейродегенеративного заболевания, веса тела, способа введения, поэтому может варьироваться в широких пределах от 0,1 до 100 мг, предпочтительно от 5 до 50 мг.

35 Введение медного комплекса пациенту может осуществляться с помощью всех возможных видов наружного, энтерального, ингаляционного и парентерального способов применения (включая внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, подкожное, подкожное, трансдермальное, внутримышечное, интратекальное, субарахноидальное, пероральное, интраназальное, сублингвальное, буккальное, ректальное введение). При введении медного комплекса в твердой форме 40 предпочтительным способом введения является сублингвальный. При введении медного комплекса в форме раствора предпочтительными способами введения являются внутривенный и интраназальный.

45 Возможность терапевтического лечения нейродегенеративных заболеваний была показана на примере болезни Альцгеймера, смоделированной на трансгенных мышах линии APP^{swE}/PSEN1^{dE9} (APP/PS1) (Jankowsky, J. L., Slunt, H. H., Ratovitski, T., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., & Borchelt, D. R. (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomolecular engineering*, 17(6), 157-165, doi: 10.1016/S1389-

0344(01)00067-3), которые проявляют характерные когнитивные признаки патологии. Данная модель может считаться моделью опосредованного воспалительного действия при нарушении когнитивных функций.

В настоящем изобретении медный комплекс $[Cu(НАЕЕ)]Cl_2$, вводили шестикратно
 5 внутривенно в дозе 0,05 мг/кг, после чего проводили валидный тест на когнитивные способности «Закапывание шариков» (англ. Marble Burying Test) [Santana-Santana M., Bayascas J.R., Giménez-Llort L. (2021). Sex-Dependent Signatures, Time Frames and Longitudinal Fine-Tuning of the Marble Burying Test in Normal and AD-Pathological Aging Mice. Biomedicines, 9(8), 994, doi: 10.3390/biomedicines9080994), определяя количество более
 10 чем на 2/3 закопанных шариков в процентах от общего количества шариков. Чем больше количество закопанных шариков (КЗШ), тем выше когнитивные способности у мышей.

По результатам тестирования у контрольной группы мышей дикого типа, которым вводили физиологический раствор, значение КЗШ равнялось $50,6 \pm 13,3$ %. Это значение
 15 принималось в качестве референсного. У контрольной группы трансгенных мышей линии APP/PS1, которым вводили физиологический раствор, значение КЗШ = $12,6 \pm 4,2$ %, что указывает на сильное ухудшение поведенческих рефлексов трансгенных мышей линии APP/PS1 по сравнению с животными дикого типа и отражает инвалидизирующее
 20 влияние оверэкспрессии человеческого бета-амилоида, ассоциированное с нейроваоспалением и образования амилоидных бляшек, на процессы нервной деятельности. Трансгенные мыши линии APP/PS1, инъецированные препаратами НАЕЕ или медного комплекса, показали значения КЗШ = $20,6 \pm 7,3$ (%) или КЗШ = $43,2 \pm 10,5$ (%), соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что использование медного
 25 комплекса существенно улучшает поведенческие рефлексивные трансгенных мышей APP/PS1, а эффект от этого использования значительно превышает таковой, наблюдаемый для НАЕЕ.

Таким образом, заявляемый медный комплекс может эффективно применяться при лечении нейродегенеративных заболеваний, в частности вызванными воспалительными
 30 осложнениями, восстанавливая когнитивные функции до нормального состояния.

Гистохимический анализ области гиппокампа головного мозга экспериментальных мышей показал, что число бляшек (ЧБ) на один срез мозга у контрольной группы диких
 35 мышей равно нулю, у контрольной группы трансгенных мышей APP/PS1 значение ЧБ оказалось равным $31,7 \pm 4,9$, в группе получавших НАЕЕ значение ЧБ составило $24,7 \pm 3,4$, в группе получавших медный комплекс значение ЧБ составило $9,5 \pm 3,2$.

Таким образом, результаты гистохимического анализа показали, что внутривенные
 40 инъекции медного комплекса приводили к почти 4-кратному уменьшению амилоидной нагрузки в гиппокампе трансгенных мышей APP/PS1, и по этому показателю эффективность медного комплекса примерно в три раза выше таковой, выявленной для НАЕЕ. Для ближайшего аналога НАЕЕ-Zn-BSA данный тест не проводился из-за
 гибели мышей в группе и нарушения их функционального состояния на ранних этапах исследования.

В качестве одного из механизмов действия медного комплекса на возможность
 45 лечения нейродегенеративных заболеваний может являться его связывание с бета-амилоидом. Были рассчитаны кинетические характеристики взаимодействия медного комплекса и иммобилизованного человеческого бета-амилоида, которые оказались равны $k_{on} = (1,41 \pm 0,06) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{off} = (5,95 \pm 0,06) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $K_D = (4,2 \pm 0,3) \times 10^{-6} \text{ M}$. Поскольку значение $K_D \leq 10^{-4} \text{ M}$, то такое взаимодействие является биологически

значимым. В отличие от медного комплекса, пептид НАЕЕ не связывался с бета-амилоидом в аналогичных экспериментальных условиях.

Это различие между нативным НАЕЕ и медным комплексом может влиять на фармакологические свойства, что подтвердили различающиеся тесты восстановления когнитивных функций – эффективность НАЕЕ была значительно ниже эффективности заявляемого медного комплекса. Этот эффект можно связать с вышеупомянутыми данными ВЭЖХ-МС, которые показали изменения в 3D-структуре нативного НАЕЕ после его введения в плазму крови, тогда как медный комплекс до и после его введения в плазму крови имеет одно и то же время удерживания на хроматограмме ВЭЖХ и, соответственно, устойчивую 3D структуру. Это означает, что ион меди в медном комплексе играет защитную роль для сохранения «развёрнутой» конформации пептида НАЕЕ в данном комплексе, что, возможно, также предотвращает взаимодействия медного комплекса с элементами плазмы крови, поскольку известно, что введение нативного НАЕЕ в периферическую кровеносную систему мышей, крыс и кроликов приводит к образованию стабильных комплексов НАЕЕ с транспортными и рецепторными белками (Zolotarev Y.A., Mitkevich V.A., Shram S.I. et al. Pharmacokinetics and Molecular Modeling Indicate nAChR α 4-Derived Peptide НАЕЕ Goes through the Blood–Brain Barrier. *Biomolecules*. 2021. 11(6): p. 909, doi: 10.3390/biom11060909).

В совокупности можно сделать вывод о том, что медный комплекс имеет намного большую терапевтическую эффективность по сравнению с НАЕЕ и эти вещества между собой бионезквивалентны, поскольку медный комплекс существует в растворе плазмы крови в «развернутой» конформации и имеет отличный от НАЕЕ механизм действия.

Описание фигур.

Фиг. 1. Дифрактограмма медного комплекса $[Cu(НАЕЕ)]Cl_2$.

Фиг. 2. ДСК-ТГА кривая НАЕЕ. 1 – ДСК-кривая; 2 – ТГ-кривая.

Фиг. 3. ДСК-ТГА кривая медного комплекса $[Cu(НАЕЕ)]Cl_2$; 1 – ДСК-кривая; 2 – ТГ-кривая.

Фиг. 4. ИК-спектр с Фурье преобразованием НАЕЕ (1) и медного комплекса $[Cu(НАЕЕ)]Cl_2$ (2).

Фиг. 5. Расположение атомов в молекуле НАЕЕ для 1H -ЯМР-анализа.

Фиг. 6. Фиг. 1H -ЯМР спектр НАЕЕ.

Фиг. 7. 1H -ЯМР спектр $[Cu(НАЕЕ)]Cl_2$.

Описание приборов.

Порошковый рентгенофазовый анализ (РФА) выполнялся на дифрактометре Rigaku Ultima IV (Япония), напряжение на трубке – 40 кВ, ток трубки – 30 мА, материал анода трубки – Cu. Гониометр: Θ/Θ вертикального типа, образец неподвижен. Радиус гониометра – 185 мм / 285 мм. Максимумы на дифрактограмме накапливались в течение 1 ч. Угол 2Θ составил от 3 до 70 градусов.

Исследование температуры плавления, термического поведения и потери массы выполняли методом дифференциальной сканирующей калориметрии и термогравиметрии (ДСК-ТГА) на приборе NETZSCH STA 449 C (Германия) в инертной атмосфере при скорости нагрева 10 град/мин.

Элементный анализ выполнен методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии с приставкой EDXA на микроскопе TESCAN MIRA3 (Чехия). Площадь измеряемого участка 0,04 мм², количество измерений – 3.

Спектры инфракрасного излучения (ИК-спектры) получали на ИК-Фурье

спектрометре Spectrum Two (Perkin Elmer, США) с приставкой диффузного отражения в диапазоне 4000-600 см⁻¹ с разрешением 2 см⁻¹, количество сканов – 10.

¹H-спектры ЯМР получали на ЯМР-спектрометре Bruker Avance IIIHD 500, рабочая частота 500,13 Mhz для ядер ¹H.

Характеризация медного комплекса [Cu(НАЕЕ)]Cl₂ в водном растворе проводилась методом масс-спектрометрии высокого разрешения с использованием масс-спектрометра LTQ FT Ultra (Thermo Scientific, Германия), который сочетает в себе технологии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье и ионной ловушки. Ионизацию электрораспылением (ESI) проводили с использованием источника Ion Max (Thermo Scientific, Германия) с металлическим капилляром для распыления. Использовались следующие параметры источника IonMax: скорость потока составляла 3 мкл/мин; температура нагретого капилляра составляла 200°C; распыляемый газ был отключен; напряжение на капилляре электрораспыления составляло +3,8 кВ в положительной моде и -2,5кВ в отрицательно моде. Идентификация молекулярных ионов проводилась с помощью специализированного программного обеспечения Qual Browser (Thermo Corp., Germany). Возможность характеристики катионных комплексов пептидов с помощью метода масс-спектрометрии была ранее описана (Zirah S., Rebuffat S., Kozin, S.A. et al (2003). Zinc binding properties of the amyloid fragment Aβ(1–16) studied by electrospray-ionization mass spectrometry. International Journal of Mass Spectrometry, 228(2-3), 999-101.

Образование комплекса фиксировали биосенсором на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (БППР) в водных буферных системах при физиологических значениях pH. БППР эксперименты были проведены на инструменте «BIAcore 3000» (GE Healthcare, США) с использованием оптического чипа CM4 в соответствии с протоколами компании-производителя. Синтетический аналог 42-членного человеческого бета-амилоида (Aβ42), на C-конце которого добавлен тетраглицилцистеиновый пептидный фрагмент (-Gly-Gly-Gly-Gly-Cys), был использован в качестве лиганда. Лиганд (DAEFRHDSGYEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVVIAGGGGC) иммобилизовали на поверхности оптического чипа через дисульфидную связь тиоловой группы C-концевого остатка цистеина. В качестве аналитов использовали медный комплекс или НАЕЕ.

Высушивание замороженных образцов выполнялось в пенициллиновых пузырьках на сублиматоре Heto FD 2.5 при давлении 0,1-0,2 мбар.

Тест ускоренного хранения проводили в камере Memmert HCP50 при 40 °C и 75% влажности. Образцы отбирали раз в месяц в течение 6 месяцев и определяли содержание действующего вещества методом ВЭЖХ.

Варианты осуществления изобретения

Изобретение иллюстрируется нижеприведенными примерами, но не ограничивается ими.

Пример 1. Получение медного комплекса пептида НАЕЕ.

Для получения комплекса в качестве источника меди использовались ацетат меди, хлорид меди, и др. соли в разных соотношениях. В таблице 1 приведены различные соотношения солей меди для получения комплекса.

Для получения комплекса готовили раствор НАЕЕ с концентрацией 10⁻⁵ М. В него добавляли раствор соли меди с концентрацией 10⁻³ М (Таблица 1). Перемешивание

осуществляли в течение 5-60 мин. Эквимолярные медные комплексы образовывались при молярном соотношении НАЕЕ и соли меди равные 1:1. Раствор медленно замораживали в холодильной установке при -20 или -80 °С и затем осуществляли лиофильную сушку в стандартном режиме. Далее детально изучали свойства

5 полученного лиофилизированного медного комплекса.

При молярном соотношении компонентов менее 0,1 комплекс в растворе не обнаруживался методом ЯМР (сигналы основного вещества не смещались). При увеличении концентрации соли меди более 1:10 образовывались смесь из медного комплекса и соответствующей соли меди.

10 При получении медного комплекса с анионом, который изначально мало или совсем не растворяется в воде (например, тартрат меди, цитрат меди и т.п.) использовали на первой стадии водорастворимую соль меди (нитрат, ацетат, хлорид), анион удаляли известным способом – анион-обменной хроматографией или диализом и добавляли в раствор другое соединение – винную кислоту, лимонную кислоту и т.п в эквимолярных

15 количествах. После чего совершали аналогичные операции по замораживанию и лиофильному высушиванию медного комплекса.

Таким образом, получение медного комплекса $[Cu(НАЕЕ)]_mX_n$, где X - бензоат, салицилат, тартрат, цитрат и т.п. осуществляли в три этапа. Сначала готовили раствор медного комплекса по описанным в Таблице 1 соотношениям, затем хроматографически

20 отделяли неорганические анионы и добавляли для получения бензоата – бензойную кислоту, салицилата – салициловую кислоту, тартрата – винную кислоту, цитрата – лимонную кислоту в эквимолярных количествах.

Для получения медного комплекса в твердой форме полученные растворы замораживали в морозильной камере (-20 °С) в пенициллиновых пузырьках в течение

25 2 ч. Замороженные образцы помещали в сублиматор с предварительно охлажденными полками и высушивали в течение 16-30 ч. Все высушенные образцы имели зеленый цвет. Выход продукта 99%. Высокий выход продукта обусловлен отсутствием потерь при высушивании образцов.

Полученные твердые образцы комплекса характеризуются аморфной формой на дифрактограмме (Фиг. 1). На ДСК кривой в отличие от НАЕЕ (Фиг. 2) комплекс характеризуется тремя максимумами: первый широкий эндотермический максимум начинается от 70 °С и имеет максимум при 88 °С; второй экзотермический максимум наблюдается при температуре 174 °С, третий эндотермический широкий максимум – при 250-255 °С (Фиг. 3). Методом ДСК-ТГА было показано, что медный комплекс в

35 твердой форме может содержать гидратированную или остаточную воду, содержание которой для разных образцов не превышало 5% (потеря массы при нагревании до 100 °С).

Элементный анализ (EDXA) медного комплекса показал содержание меди в образцах (при молекулярном соотношении НАЕЕ : Cu = 1:1), от $6 \pm 0,5$ до 10 ± 1 % масс. в

40 зависимости от природы аниона.

ИК-спектр с Фурье преобразованием комплекса по сравнению с НАЕЕ характеризуется смещением максимумов при 1395 в 1410 см^{-1} (CH_3 деф.), при 825 в 815 см^{-1} (область неплоских деформаций NH_2 группы), при 1130 в 1115 см^{-1} (C-N вал.),

45 практически исчезновением боковой моды у максимума при 1645 см^{-1} (C=O) (Фиг. 4), что отличает заявляемый медный комплекс от НАЕЕ.

Исходный образец НАЕЕ характеризовался ЯМР ^1H [500.13Mhz; D_2O ; 298K; d,

м.д.]: 1.27 (3H, d, $j=7.13\text{Hz}$, $\text{CH}_3(16)$), 1.87 (5H, m, $\text{CH}_3(3)$, $1/2\text{CH}_2(21)$, $1/2\text{CH}_2(33)$), 1.99 (2H, sx, $j=7.45\text{Hz}$ $1/2\text{CH}_2(21)$, $1/2\text{CH}_2(33)$), 2.28 (4H, m, $2\text{CH}_2(22,34)$), 3.13, 3.03 (2H, m, $\text{CH}_2(8)$), 4.19 (3H, m, $3\text{CH}(15,20,29)$), 4.56 (1H, t, $j=6.86\text{Hz}$, $\text{CH}(5)$), 7.19 (1H, s, $\text{CH}(10)$), 8.50 (1H, s, $\text{CH}(12)$) (Фиг. 6).

5 После образования медного комплекса положение химических сдвигов протонов в молекуле НАЕЕ изменялась и представлено на Фиг. 7, что свидетельствует о взаимодействии меди с молекулой НАЕЕ в растворе и, следовательно, о сохранении комплекса, что важно для его фармакологических свойств. Исчезновение части линий
10 и уширение линий в спектре ^1H -ЯМР связано с парамагнитными свойствами меди, входящей в состав комплекса, что затрудняет сравнение с чистым веществом НАЕЕ. Однако сравнение показывает, что не уширенные сигналы от протонов в комплексе также смещены относительно сигналов молекулы НАЕЕ. Смещение сигналов представлены в Таблица 2, значимыми были приняты сигналы отличающиеся на 0,03
15 м.д.

Смещение протонных сигналов от определенных групп в молекуле показывает их вклад в электростатическое взаимодействие с ионом меди при образовании комплекса; чем больше взаимодействие, тем большее смещение наблюдается в ^1H -ЯМР-спектре у
определенных СН-групп молекулы.

20 При наличии в твердой фазе ацетата, бензоата, салицилата, тартрата в ^1H -ЯМР-спектре медного комплекса помимо молекулы НАЕЕ фиксировались сигналы от этих анионов, например от ацетата (CH_3 - 1,92 м.д.).

Характеризация медного комплекса $[\text{Cu}(\text{НАЕЕ})]\text{Cl}_2$ в водном растворе проводилась
25 методом масс-спектрометрии высокого разрешения с использованием технологии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье путем измерения точной массы характерных молекулярных ионов как при положительной, так и при отрицательной модах ионизации. Для проведения измерений образцы медного комплекса $[\text{Cu}(\text{НАЕЕ})]\text{Cl}_2$ в водном растворе с концентрацией 20 мкМ вносили в смесь воды и
30 ацетонитрила в соотношении 1:1 с добавлением муравьиной кислоты (для достижения финальной концентрации 0,1%). Масс-спектрометрический анализ водного раствора медного комплекса $[\text{Cu}(\text{НАЕЕ})]\text{Cl}_2$, проведенный при положительной моде электроспрейного ионизационного источника, показал наличие молекулярного иона
35 $[\text{НАЕЕ}+\text{H}]^{+1}$ с моноизотопной массой 526,2314 m/z и молекулярного иона $[\text{НАЕЕ}-\text{H}+\text{Cu}]^{+1}$ с моноизотопной массой 587,1396 m/z. При использовании отрицательной моды электроспрейного ионизационного источника для анализа медного комплекса $[\text{Cu}(\text{НАЕЕ})]\text{Cl}_2$ в водном растворе были идентифицированы молекулярный ион $[\text{НАЕЕ}-\text{H}]^{-1}$ с моноизотопной массой 524,2168 m/z и молекулярный ион $[\text{НАЕЕ}-3\text{H}+\text{Cu}]^{-1}$ с
40 моноизотопной массой 585,1296 m/z. Таким образом, полученные данные подтверждают специфическое связывание катиона меди (II) с пептидом НАЕЕ, которое характеризует внутреннюю координационную сферу медного комплекса $[\text{Cu}(\text{НАЕЕ})]^{2+}$ в водном растворе.

45 Сравнительный анализ медного комплекса методом ВЭЖХ-МС (2,5 нг/мл, 0,5% FA – муравьиная кислота, 50% MeOH (1:1)) показал, что в водных растворах *in vitro* при физиологических значениях pH его хроматографическая подвижность практически идентична НАЕЕ в тех же хроматографических условиях. Время выхода

хроматографического пика с колонки составляло 2,81 (комплекс) и 2,85 мин (НАЕЕ), соответственно. С учетом известных из литературы данных молекулярного моделирования (Barykin E.P., Garifulina A.I., Tolstova A.P. et al. (2020). Tetrapeptide Ac-НАЕЕ-NH₂ Protects $\alpha 4\beta 2$ nAChR from Inhibition by A β . International journal of molecular sciences, 21(17), 6272, doi: 10.3390/ijms21176272), вышеприведенные результаты указывают на то, что пространственные структуры основной пептидной цепи медного комплекса и пептида НАЕЕ в условиях *in vitro* идентичны и характеризуется «развернутой» конформацией.

После введения медного комплекса и НАЕЕ внутривенно в организм здоровых мышей (n = 5) для определения в ней содержания комплекса было показано, что время выхода хроматографического пика НАЕЕ, экстрагированного из образцов крови мыши, не изменялось и также составляло 2,81 мин. Однако, для НАЕЕ, введенного в организм в нативной форме, экстрагированного из образцов крови, было неожиданно обнаружено, что время выхода хроматографического пика стало 1,27 мин. Только около 8% вещества продолжало выходить из колонки на времени 2,85 мин.

Полученные данные свидетельствует о том, что в образцах крови человека или мыши конформация пептида НАЕЕ резко отличается от конформации, наблюдаемой при тех же условиях для медного комплекса. Лишь 8% НАЕЕ находится в «развернутой» конформации после его взаимодействия с элементами плазмы крови. Таким образом, в образцах крови медный комплекс сохраняет свою конформацию (предположительно, «развёрнутую») неизменной, в то время как НАЕЕ приобретает иную конформацию, которая характеризуется гораздо более компактной структурой, предположительно, «спиральной». Это означает, что медный комплекс устойчив к изменению конформации в плазме крови. Согласно настоящему изобретению, для достижения терапевтического эффекта как от медного комплекса пептида НАЕЕ, так и от НАЕЕ требуется их введение в организм и присутствие в плазме крови, поэтому принципиальные различия в пространственной структуре этих молекул в плазме крови, исходя из общих представлений биохимии и физиологии, свидетельствуют о различном молекулярном механизме действия медного комплекса и НАЕЕ, что исключает их биоэквивалентность.

Была определена стабильность медного комплекса в тесте ускоренного хранения в течение 6 месяцев, что соответствует 2 годам хранения в обычных условиях (Таблица 3). Медный комплекс, как очищенный от анионов, так и в смеси с указанными анионами за время хранения сохранил свой цвет, консистенцию, не набирал воды (масса образца не увеличивалась в пределах 1-2%) и не терял активное вещество. Образец НАЕЕ с течением времени набирал воду (до 7% масс.) и по данным ВЭЖХ деградировал до 67,4% активного вещества за 6 мес. Образец, полученный по патенту РФ № 2709539, представляющий собой комплекс НАЕЕ-Zn-HSA также набирал воду (до 16% масс.) и деградировал до содержания 71,9% от исходного количества. Таким образом, стабильность заявляемого медного комплекса оказалась значительно выше по сравнению с НАЕЕ и НАЕЕ-Zn-HSA.

Пример 2. Фармацевтические композиции на основе медного комплекса пептида НАЕЕ.

Фармацевтические композиции на основе медного комплекса пептида НАЕЕ могут содержать активное вещество в эффективном количестве (Таблица 4). Состав дозы рассчитывается индивидуально и может варьироваться от 0,1 мг до 100 мг на человека в сутки, более предпочтительно от 1 до 50 мг. Составы фармацевтических композиций представлены в Таблице 3. Пересчет выполнен на дозировку активного вещества. Возможны и другие соотношения активного вещества в фармацевтической композиции

в диапазоне от 0,1 до 100 мг. Масса таблеток варьируется от 100 до 400 мг, таблетки могут быть покрыты оболочкой.

Пример 3. Влияние медного комплекса пептида НАЕЕ на поведенческие функции и степень тяжести церебрального амилоидоза у экспериментальных животных.

5 Для моделирования нейродегенеративного заболевания была выбрана модель болезни Альцгеймера, являющейся основным по распространённости нейродегенеративным заболеванием у людей пожилого возраста.

Для проведения экспериментов были использованы самцы трансгенных мышей линии APP^{swe}/PSEN1^{dE9}. Мыши данной линии также известны под названием APP/PS1: 10 у контрольной группы мышей APP/PS1, начиная с 4-6-месячного возраста, проявляются характерные когнитивные признаки патологии, подобной болезни Альцгеймера, и имеется значительное количество конгофильных амилоидных бляшек в специфических отделах мозга, включая гиппокамп и кортекс (Borchelt D.R., Ratovitski T., Van Lare J., et al. (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, 19(4), 939-945, doi: 10.1016/S0896-6273 (00)80974-5).

Для тестирования были использованы 8-месячные животные, сгруппированные в следующие экспериментальные группы (n = 12 в каждой группе):

1. контроль 1. Мыши дикого типа, которым внутривенно вводили физиологический 20 раствор;
2. контроль 2. Трансгенные мыши APP/PS1, которым внутривенно вводили физиологический раствор;
3. трансгенные мыши APP/PS1, которым внутривенно вводили НАЕЕ;
4. трансгенные мыши APP/PS1, которым внутривенно вводили НАЕЕ-Zn-HSA;
- 25 5. трансгенные мыши APP/PS1, которым внутривенно вводили [Cu(НАЕЕ)]Cl₂.

30 Препараты НАЕЕ, НАЕЕ-Zn-HSA и заявляемый медный комплекс вводили в ретроорбитальное венозное сплетение в соответствии с известной процедурой (Yardeni T., Eckhaus M., Morris H.D. et al. (2011). Retro-orbital injections in mice. *Lab animal*, 40(5), 155-160, doi: 10.1038/labon0511-155). Инъекции в дозе 0,05 мг/кг проводили ежемесячно, в возрасте от 2 до 7 месяцев (включительно), всего было сделано 6 инъекций препаратами НАЕЕ и медного комплекса, однако, препаратом НАЕЕ-Zn-HSA было сделано только две инъекции, а далее эксперименты с этим препаратом были прекращены из-за 35 появления признаков ухудшения внешнего вида экспериментальных животных после первой инъекции и гибели 5 трансгенных мышей непосредственно после второй инъекции. Скорее всего, это связано с влиянием высоких концентраций HSA, который отличается по структуре от эндогенного мышинового альбумина (MSA).

40 В возрасте 8 месяцев проводили тестирование поведенческих функций, затем животные подвергались эвтаназии с последующим забором мозга и гистохимическим анализом числа конгофильных бляшек в областях CA1, CA2, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа согласно известной процедуре (Kozin S.A., Barykin E.P., Telegin G.B., et al. Intravenously Injected Amyloid-β Peptide With Isomerized Asp7 and Phosphorylated Ser8 Residues Inhibits Cerebral β-Amyloidosis in AβPP/PS1 Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 2018, 12, 518-518, doi: 10.3389/fnins.2018.00518).

45 **3.1 Анализ улучшения поведенческих функций** у 8-месячных самцов трансгенных мышей APP/PS1 под действием НАЕЕ и медного комплекса пептида НАЕЕ был проведён с помощью теста «Закапывание шариков». В качестве контроля использовались трансгенные мыши APP/PS1 и мыши дикого типа. Для проведения теста мышей помещали в клетки со свежим подстилом с размещёнными на нем восемнадцатью

шариками, расположенными в виде матрицы 3x6. Мышей оставляли в клетке на 30 минут, после чего определяли количество более чем на 2/3 закопанных шариков (КЗШ) в процентах от общего количества шариков. Поведение закапывания является признаком 5
 5 характера закапывания такое поведение может представлять нейропсихиатрические симптомы, такие как персеверативное поведение и/или стереотипное поведение. Оба являются нейропсихиатрическими симптомами, обычно присутствующими у пациентов с болезнью Альцгеймера и другими видами деменции.

По результатам тестирования, уровень поведения контрольной группы мышей 10
 10 дикого типа характеризовался значением КЗШ = 50,6±13,3 %. Это значение рассматривается в качестве референсного. У контрольной группы трансгенных мышей APP/PS1 значение КЗШ = 12,6±4,2 %, что указывает на сильное ухудшение поведенческих рефлексов мышей APP/PS1 по сравнению с животными дикого типа и отражает 15
 15 инвадизирующее влияние оверпродукции человеческого бета-амилоида на процессы нервной деятельности. Мыши, инъецированные НАЕЕ и медным комплексом пептида НАЕЕ, показали значения КЗШ = 20,6±7,3 % и КЗШ = 43,2±10,5 %, соответственно (Таблица 5).

Эти данные свидетельствуют о том, что использование медного комплекса пептида НАЕЕ существенно улучшает поведенческие рефлексы трансгенных мышей APP/PS1, 20
 20 а эффект от этого использования значительно превышает таковой, наблюдаемый для НАЕЕ. Сравнительные эксперименты медного комплекса с другими анионами не выявили статистически значимых различий в биологическом эффекте. Введение ближайшего аналога НАЕЕ-Zn-HSA приводило к нарушению физического состояния у мышей и к их гибели, что, по-видимому, связано с высокой дозировкой HSA.

3.2. Гистохимический анализ конгофильных амилоидных бляшек в областях CA1, CA2, 25
 25 CA3 и зубчатой извилине гиппокампа был проведен согласно ранее описанным процедурам (Kozin S.A., Barykin E.P., Telegin G.B., et al. Intravenously Injected Amyloid- β Peptide With Isomerized Asp7 and Phosphorylated Ser8 Residues Inhibits Cerebral β -Amyloidosis in A β PP/PS1 Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 2018, 30
 30 12, 518-518, doi: 10.3389/fnins.2018.00518). Мозг мышей извлекали и фиксировали в 10% формалине. Процесс заливки образца в парафин проводили следующим образом: заливали 75% этанолом и оставляли на ночь, далее сменяли на 96% этанол и выдерживали 5 мин, 96% этанол – 10 мин, 100% этанол – 10 мин (две замены), этанол-хороформ (1:1) – 30 мин, и оставляли в чистом хороформе на ночь. Заливку парафином 35
 35 проводили при 60°C в течение 3 ч (три смены). Заливку тканей в парафиновые блоки осуществляли на приборе Leica EG1160. Серийные срезы головного мозга (8 мкм) вырезали с помощью микротомы Leica RM2265 и помещали на предметные стекла. Для депарафинизации, гидратации и окрашивания срезов проводили следующие этапы: предметные стекла последовательно помещали в ксилол три смены (по 10 минут), 96% 40
 40 этанол – 5 мин, 90% этанол – 2 мин, 75% этанол – 2 мин, вода – 5 мин (три смены), раствор конго красного – 5 мин, далее добавлялся раствор гидроксида калия и вода. Для монтирования использовали среду ImMu-Mount (Thermo Scientific). Срезы, охватывающие область мозга от 0,48 до 1,92 мм относительно средней линии в латеральных стереотаксических координатах (Franklin K., Paxinos, G. (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York, NY: Academic Press), использовали для 45
 45 количественного определения конгофильных амилоидных бляшек в гиппокампе. Анализировали каждый 15-й срез, что давало 10 срезов на животное. Амилоидные бляшки идентифицировали окрашиванием конго красным и подсчитывали вручную.

Для каждой группы мышей рассчитывали средние значения и стандартное отклонение количества бляшек на 1 срез. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. Для попарного сравнения исследуемых групп использовали критерий Манна-Уитни. Применяемый уровень значимости составлял 99,9% ($P < 0,001$).

У контрольной группы мышей дикого типа (группа 1) никаких амилоидных бляшек обнаружено не было (Таблица 4). Конгофильные амилоидные бляшки, визуализированные в областях СА1, СА2, СА3 и зубчатой извилине гиппокампа головного мозга трансгенных животных были сходны по локализации и распределению размеров в паренхиме головного мозга. Однако, количественная оценка амилоидных бляшек выявила существенные различия между группами. В контрольной группе 2 (трансгенные мыши APP/PS1) среднее число бляшек в областях на один срез мозга (ЧБ) составляло ЧБ = $31,7 \pm 4,9$. В группе 3, где трансгенным мышам APP/PS1 вводили НАЕЕ, ЧБ = $24,7 \pm 3,4$. В группе 4, в которой трансгенным мышам APP/PS1 вводили заявляемый медный комплекс, ЧБ = $9,5 \pm 3,2$. Таким образом, результаты гистохимического анализа показали, что внутривенные инъекции медного комплекса приводили к почти 4-кратному уменьшению амилоидной нагрузки в гиппокампе трансгенных мышей APP/PS1, и по этому показателю эффективность медного комплекса примерно в три раза выше таковой, выявленной для НАЕЕ.

Пример 4. Специфическое связывание медного комплекса пептида НАЕЕ с человеческим бета-амилоидом (A β 42).

Дополнительно была проведена оценка связывания заявляемого медного комплекса с бета-амилоидом как одного из механизмов действия данного комплекса при нейродегенеративных поражениях, связанных с бета-амилоидом. Образование комплексов между находящимся в растворе аналитом (заявляемый медный комплекс или НАЕЕ) и иммобилизованным 42-членным человеческим бета-амилоидом (лигандом) было исследовано с помощью БППР. По результатам таких экспериментов рассчитывали кинетические параметры взаимодействий и значение константы диссоциации (K_D) взаимодействия медного и иммобилизованного лиганда. Если значение $K_D \leq 10^{-4}$ М, то взаимодействие между медным комплексом и бета-амилоидом является биологически значимым.

Взаимодействий между НАЕЕ и лигандом обнаружено не было. Напротив, при введении медного комплекса пептида НАЕЕ было обнаружено его взаимодействие с иммобилизованным A β 42 при его различных концентрациях 150, 300, 500, 1000, 1500 мкМ. На основании полученных данных были рассчитаны кинетические характеристики взаимодействия медного комплекса пептида НАЕЕ с иммобилизованным бета-амилоидом A β 42: $k_{on} = (1,41 \pm 0,06) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{off} = (5,95 \pm 0,06) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $K_D = (4,2 \pm 0,3) \times 10^{-6} \text{ M}$. Кинетические характеристики оставались в этих же значениях пределах погрешности при использовании медного комплекса с разным набором анионов – нитрат, ацетат, хлорид, глюконат, лактат, салицилат и др.

Таким образом, на основании вышеприведенных результатов доказано образование стабильных межмолекулярных комплексов между 42-членным человеческим бета-амилоидом (A β 42) и медным комплексом пептида НАЕЕ. В отличие от медного комплекса пептида НАЕЕ, нативный пептид НАЕЕ в идентичных экспериментальных условиях не взаимодействует с A β 42.

Полученные в данном Примере настоящего изобретения результаты указывают на отсутствие способности НАЕЕ связываться с A β 42. Напротив, медный комплекс пептида НАЕЕ связывается с A β 42. Несмотря на то, что и НАЕЕ и заявляемый медный комплекс

при введении в кровеносную систему трансгенных мышей APP/PS1 улучшают когнитивные функции и снижают количество амилоидных бляшек у экспериментальных животных (Примеры 3.1 и 3.2 настоящего изобретения), полученные результаты свидетельствуют о различных молекулярных механизмах терапевтического воздействия НАЕЕ и заявляемого медного комплекса, что, в свою очередь, исключает биоэквивалентность НАЕЕ и заявляемого медного комплекса при их использовании для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Таблица 1. Объемы реагентов для приготовления медных комплексов НАЕЕ с различными анионами.

Молярное соотношение веществ	Объем раствора НАЕЕ с концентрацией 10^{-5} М в мл	Объем раствора соли с концентрацией 10^{-3} М в мкл
НАЕЕ + $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (1:1)	0,5	5
НАЕЕ + $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (1:10)	0,4	40
НАЕЕ + $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (1:0,1)	0,5	0,5
НАЕЕ + CuCl_2 (1:1)	0,4	4
НАЕЕ + CuSO_4 (1:1)	0,5	0,5
НАЕЕ + $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (1:1)	0,4	4
НАЕЕ + лактат меди (1:1)	0,4	4
НАЕЕ + глюконат меди (1:1)	0,4	4
НАЕЕ + салицилат меди (1:1)	0,4	4
1 стадия: НАЕЕ + CuCl_2 (1:1) 2 стадия: анион-обменная хроматография. 3 стадия: добавление лимонной кислоты	0,5	5 мкл - CuCl_2 ; 15 мкл - лимонная кислота ($c = 10^{-3}$ М)

Таблица 2. Смещение сигналов протонов в ^1H -ЯМР-спектре заявляемого медного комплекса по сравнению с НАЕЕ.

Номер СН-группы в молекуле НАЕЕ (Фиг. 6)/ принадлежность аминокислоте	Сигнал в молекуле НАЕЕ, м.д. (Фиг. 7)	Сигнал в медном комплексе, м.д. (Фиг. 8)	Разница сигнала, Δ
His1			
8	3.03/3.13	2.54	0.49/0.59
10	7.19	-	-
12	8.5	-	-
Glu3/Glu4			
22, 34	2.28	2.07	0.21
Ala2			
16	1.27	1.30	0.03
$\text{C}\alpha\text{H}$: 15(Ala) 20(Glu) 29(Glu)	4.19	4.23	0.04
$\text{C}\beta\text{H}_2$: 21(Glu), 33(Glu)	1.99	1.97	0.02
3 (Ac)	1.87	1.86	0,01

Таблица 3. Данные по стабильности медного комплекса пептида НАЕЕ в тесте ускоренного хранения (40°C , 75% влажности).

Образец	Срок хранения, мес					
	0	1	2	3	5	6
	Содержание действующего вещества в % (метод ВЭЖХ), погрешность 1%					
$[\text{Cu}(\text{НАЕЕ})](\text{Ac})_2$	100,0	100,6	99,2	99,3	99,2	99,1
$[\text{Cu}(\text{НАЕЕ})]\text{SO}_4$	100,0	99,3	99,4	100,6	99,9	99,9
$[\text{Cu}(\text{НАЕЕ})](\text{NO}_3)_2$	100,0	99,5	99,9	99,4	99,1	99,8
$[\text{Cu}(\text{НАЕЕ})]\text{Cl}_2$	100,0	99,4	99,2	99,2	99,8	99,2

	[Cu(НАЕЕ)](глюконат)	100,0	99,7	99,9	100,1	99,9	99,5
	[Cu(НАЕЕ)](бензоат) ₂	100,0	99,4	100,2	99,8	99,8	100,1
	[Cu(НАЕЕ)](лактат) ₂	100,0	99,5	100,2	99,3	99,2	100,0
	[Cu(НАЕЕ)](салицилат) ₂	100,0	99,7	100,7	99,2	99,9	99,8
5	[Cu(НАЕЕ)](сукцинат)	100,0	99,6	99,4	100,1	100,1	99,4
	[Cu(НАЕЕ)] ₃ (цитрат) ₂	100,0	100,1	99,2	99,4	100,0	99,5
	НАЕЕ	100,0	94,6	85,2	77,1	72,7	67,4
	НАЕЕ-Zn-HSA (1:2:6)	100,0	92,1	83,5	77,3	72,1	71,9

Таблица 4. Состав фармацевтических композиций с медным комплексом пептида НАЕЕ. В/м – внутримышечное введение, в/в – внутривенное введение.

№	Кол-во комплекса (в пересчете на НАЕЕ), мг	Форма	Вспомогательные вещества
	0,1	лиофилизат	–
	0,5	лиофилизат	–
15	1	лиофилизат	–
	5	лиофилизат	–
	10	лиофилизат	–
	25	лиофилизат	–
	50	лиофилизат	–
	100	лиофилизат	–
20	0,1	лиофилизат	маннитол – 0,1 мг повидон К 17 – 0,1 мг
	10	лиофилизат	маннитол – 1 мг повидон К 17 – 1 мг
	50	лиофилизат	маннитол – 10 мг повидон К 17 – 17 мг
25	100	лиофилизат	маннитол – 100 мг повидон К 17 – 104 мг
	5	таблетка	лактозы моногидрат - 71 мг, целлюлоза микрокристаллическая – 100 мг, магния стеарат – 0,5 мг
	10	таблетка	лактозы моногидрат - 95 мг, целлюлоза микрокристаллическая – 140 мг, магния стеарат – 0,5 мг
	25	таблетка	лактозы моногидрат - 105 мг, целлюлоза микрокристаллическая – 180 мг, магния стеарат – 0,5 мг
30	0,1	жидкая, для в/в	набор солей для поддержания осмотического давления 290-310 мОсм/л, вода до 100%
	0,5	жидкая, для в/в	0,9% - хлорид натрия 0,1 М раствор натрия гидроксида - до pH 5,0 - 7,5 вода – до 100%
35	1	жидкая, р-р для в/м	0,9% - хлорид натрия 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты - до pH 5,0-7,5 вода – до 100%
	5	жидкая, р-р для в/в	Аналогично примеру 17
	10	жидкая, р-р для в/м	Аналогично примеру 18
	25	жидкая, р-р для в/м	Аналогично примеру 17
	50	жидкая, р-р для в/м	Аналогично примеру 18
40	100	жидкая, р-р для в/в	– Аналогично примеру 18
	1	жидкая, ингаляционная	0,9% - хлорид натрия, регулятор pH до 5,5-7 сахароза – до 5%, гистидин, полоксамер 407 – до 1% вода – до 100%
	5	жидкая, интраназальная	Аналогично примеру 24
	10	жидкая, р-р для в/в	Аналогично примеру 24
45	25	Жидкая, р-р для в/в	Аналогично примеру 24
	10	жидкая ингаляционная	0,9% - хлорид натрия, регулятор pH до 5,5-7,5 вода – до 100%
	100	жидкая, интраназальная	Аналогично примеру 28

	1	Жидкая, в/в или в/м	маннитол – 0,5 мг; триметамол – 12 мг; динатрия эдетат - 1 мг вода – до 100%
--	---	---------------------	---

5 Таблица 5. Влияние медного комплекса пептида НАЕЕ на когнитивные функции у мышей в тесте «закапывание шариков» и на количество амилоидных бляшек. Применяемый уровень значимости составлял 99,9% ($P < 0,001$).

№	Группа животных	Количество закопанных шариков более чем на 2/3 (КЗШ), %	Количество амилоидных бляшек на 1 срез мозга, гистологический анализ
10 1.	Группа 1. Контроль 1. Мыши дикого типа, физиологический раствор	50,6 ± 13,3	отсутствуют
2.	Группа 2. Контроль 2. Трансгенные мыши APP/PS1, физиологический раствор	12,6 ± 4,2	31,7 ± 4,9
3.	Группа 3. Трансгенные мыши APP/PS1, в/в НАЕЕ 0,05 мг/кг	20,6 ± 7,3	24,7 ± 3,4
15 4.	Группа 4. трансгенные мыши APP/PS1, в/в [Cu(НАЕЕ)]Cl ₂ , 0,05 мг/кг	43,2 ± 10,5	9,5 ± 3,2
5.	Группа 5. Трансгенные мыши APP/PS1, в/в НАЕЕ-Zn-HSA (1:2,6), 0,05 мг/кг	(побочные действия, гибель животных)	–

(57) Формула изобретения

20 1. Медный комплекс формулы $[Cu(НАЕЕ)]_m X_n$, где Cu представляет собой двухзарядный катион меди (II), $m=1$ для однозарядных и двухзарядных анионов, $m=3$ для трехзарядных анионов, НАЕЕ представляет собой синтетический пептид, ацелированный по N-концу и амидированный по C-концу, с аминокислотной последовательностью His-Ala-Glu-Glu, X – фармацевтически приемлемый анион, $n=1$ для двухзарядных анионов, $n=2$ для однозарядных и трехзарядных анионов.

25 2. Медный комплекс по п. 1, в котором фармацевтически приемлемый анион выбирается из группы ацетата ($C_2H_3O_2$), сульфата (SO_4), хлорида (Cl), нитрата (NO_3), бензоата ($C_7H_5O_2$), салицилата ($C_7H_5O_3$), тартрата ($C_4H_4O_6$), цитрата ($C_6H_5O_7$), сукцината ($C_4H_4O_4$).

30 3. Медный комплекс по п. 1, который представляет собой $[Cu(НАЕЕ)](C_2H_3O_2)_2$, $[Cu(НАЕЕ)](SO_4)$, $[Cu(НАЕЕ)](Cl)_2$, $[Cu(НАЕЕ)](NO_3)_2$, $[Cu(НАЕЕ)](C_7H_5O_2)_2$, $[Cu(НАЕЕ)](C_7H_5O_3)_2$, $[Cu(НАЕЕ)](C_4H_4O_6)$, $[Cu(НАЕЕ)]_2(C_6H_5O_7)_3$, $[Cu(НАЕЕ)](C_4H_4O_4)$.

35 4. Медный комплекс по п. 1, который представляет собой в твердом виде аморфную фазу.

5. Медный комплекс по п. 1, который характеризуется дифрактограммой, представленной на фиг. 1.

6. Медный комплекс по п. 1, который характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, представленной на фиг. 3.

40 7. Фармацевтическая композиция для лечения нейродегенеративных заболеваний, содержащая в качестве активного вещества медный комплекс формулы $[Cu(НАЕЕ)]_m X_n$, где Cu представляет собой двухзарядный катион меди (II), $m=1$ для однозарядных и двухзарядных анионов, $m=3$ для трехзарядных анионов, НАЕЕ представляет собой синтетический пептид, ацелированный по N-концу и амидированный по C-концу, с аминокислотной последовательностью His-Ala-Glu-Glu, X – фармацевтически приемлемый анион, $n=1$ для двухзарядных анионов, $n=2$ для однозарядных и трехзарядных анионов, в эффективном количестве и фармацевтически приемлемые добавки.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, которая представлена твердой или жидкой формой.

9. Фармацевтическая композиция по п. 7, в которой медный комплекс находится в виде аморфной формы.

5 10. Фармацевтическая композиция по п. 9, в которой аморфная форма медного комплекса характеризуется дифрактограммой на фиг. 1.

11. Фармацевтическая композиция по п. 7, в которой эффективное количество медного комплекса составляет от 0,1 до 100 мг.

10 12. Фармацевтическая композиция по п. 7, в которой эффективное количество медного комплекса составляет от 5 до 50 мг.

13. Фармацевтическая композиция по п. 7 для лечения болезни Альцгеймера.

14. Фармацевтическая композиция по п. 7, предназначенная для восстановления когнитивных функций, нарушенных вследствие нейродегенеративных заболеваний.

15 15. Фармацевтическая композиция по п. 14, применяющаяся при воспалительных причинах нейродегенеративных заболеваний.

16. Фармацевтическая композиция по п. 7, в которой вспомогательные фармацевтически приемлемые добавки представляют собой маннитол, повидон К 17, трометамол, динатрия эдетат, натрия хлорид, сахароза, гистидин, полоксамер 407.

17. Фармацевтическая композиция по п. 7, которая представляет собой лиофилизат.

20 18. Фармацевтическая композиция по п. 7, предназначенная для введения внутривенным, внутриартериальным, внутривентральным, подкожным, накожным, трансдермальным, внутримышечным, интратекальным, субарахноидальным, пероральным, интраназальным, сублингвальным, буккальным, ректальным способами.

25 19. Способ получения медного комплекса формулы $[Cu(НАЕЕ)]_m X_n$, где Cu представляет собой двухзарядный катион цинка (II), $m=1$ для однозарядных и двухзарядных анионов, $m=3$ для трехзарядных анионов, НАЕЕ представляет собой синтетический тетрапептид, ацелированный по N-концу и амидированный по C-концу, с аминокислотной последовательностью His-Ala-Glu-Glu, X – фармацевтически приемлемый анион, $n=1$ для двухзарядных анионов, $n=2$ для однозарядных и
30 трехзарядных анионов, заключающийся в том, что пептид НАЕЕ смешивают с солью меди в эквимольном соотношении в водном растворе или буферном растворе при комнатной температуре, замораживают и высушивают.

20. Способ получения по п. 19, в котором соль меди представляет собой ацетат, сульфат, хлорид, нитрат.

35 21. Способ получения по п. 19, в котором при необходимости замещают анион другим фармацевтически приемлемым анионом.

22. Способ получения по п. 21, в котором фармацевтически приемлемый анион представляет собой одно-, дву- или три- зарядные органические соединения, содержащие -COOH группу.

40 23. Применение медного комплекса $[Cu(НАЕЕ)]_m X_n$, где Cu представляет собой двухзарядный катион меди (II), $m=1$ для однозарядных и двухзарядных анионов, $m=3$ для трехзарядных анионов, НАЕЕ представляет собой синтетический пептид, ацелированный по N-концу и амидированный по C-концу, с аминокислотной последовательностью His-Ala-Glu-Glu, X – фармацевтически приемлемый анион, $n=1$
45 для двухзарядных анионов, $n=2$ для однозарядных и трехзарядных анионов, для лечения нейродегенеративных заболеваний.

24. Применение соединения по п. 23 для лечения болезни Альцгеймера.

25. Применение соединения по п. 23 для восстановления когнитивных функций,

нарушенных вследствие нейродегенеративных заболеваний.

26. Применение соединения по п. 23 для восстановления когнитивных функций при воспалительных причинах нейродегенеративных заболеваний.

27. Применение соединения по п. 23 при его введении внутривенным,
5 внутриартериальным, внутрибрюшинным, подкожным, накожным, трансдермальным, внутримышечным, интратекальным, субарахноидальным, пероральным, интраназальным, сублингвальным, буккальным, ректальным способами.

28. Применение соединения по п. 23, которое терапевтически бионезквивалентно применению НАЕЕ в нативной форме.

10

15

20

25

30

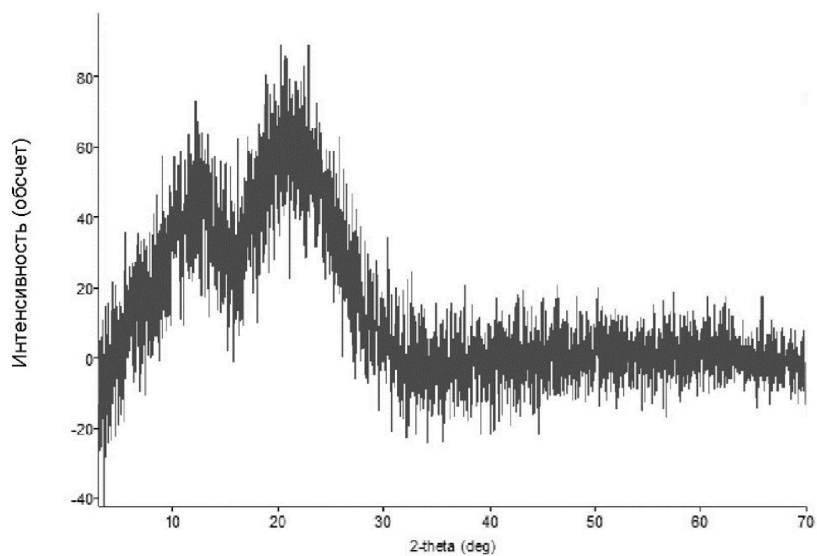
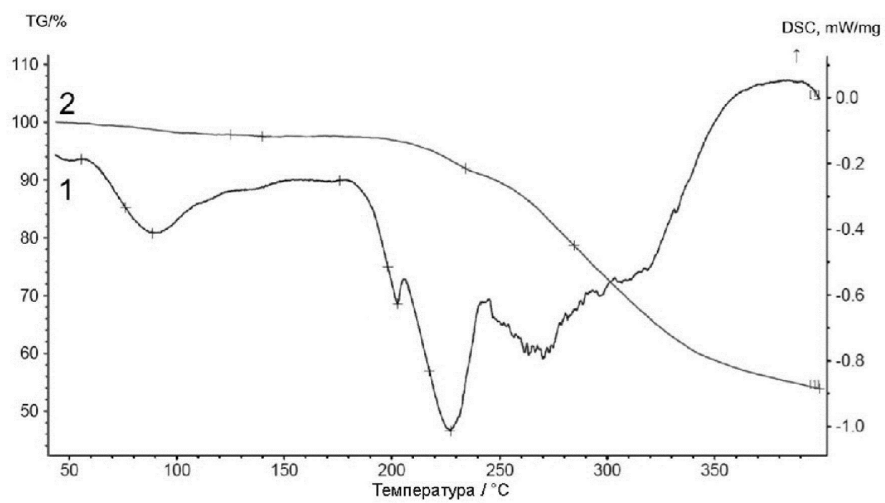
35

40

45

1

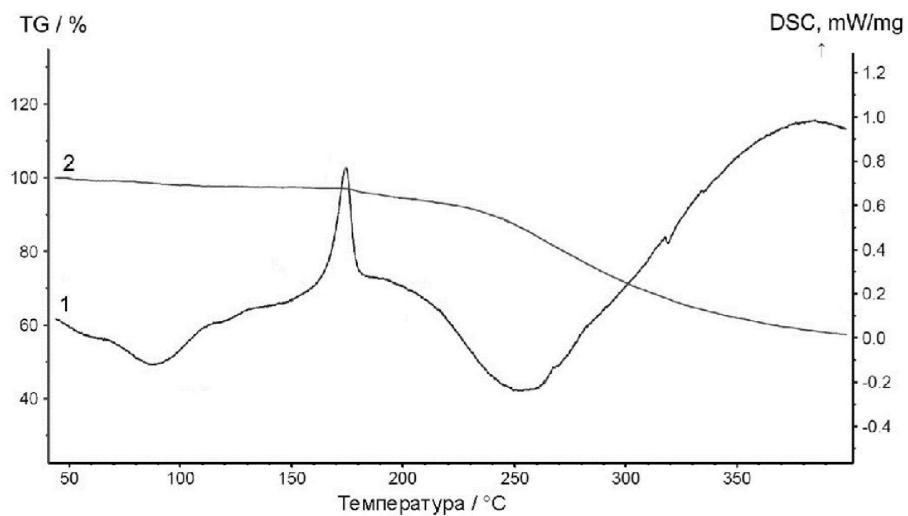
1/4

Фиг. 1. Дифрактограмма медного комплекса $[\text{Cu}(\text{NAEE})]\text{Cl}_2$.

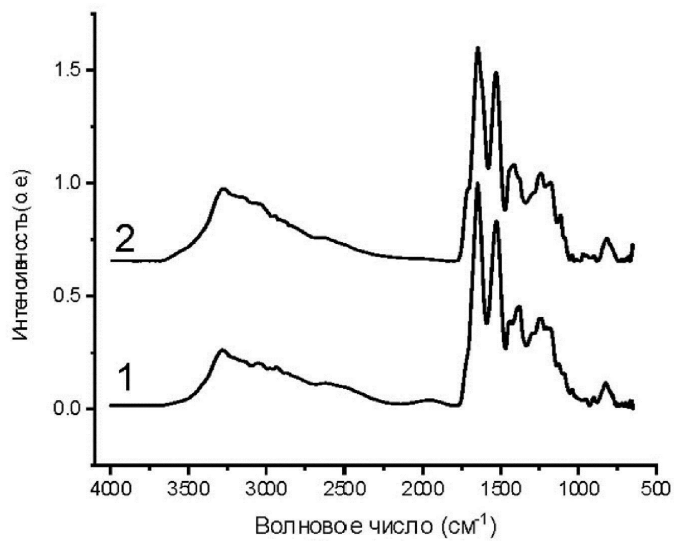
Фиг. 2. ДСК-ТГА кривая НАЕЕ. 1 – ДСК-кривая; 2 – ТГ-кривая.

2

2/4

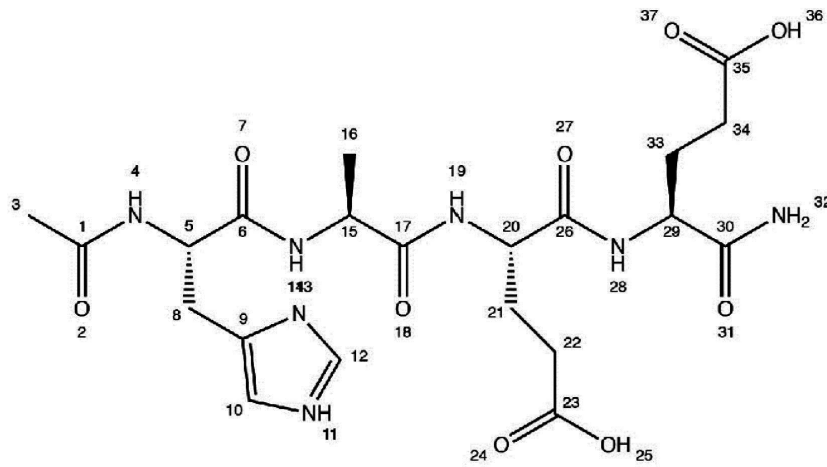


Фиг. 3. ДСК-ТГА кривая медного комплекса $[\text{Cu}(\text{NAEE})]\text{Cl}_2$;
1 – ДСК-кривая; 2 – ТГ-кривая.

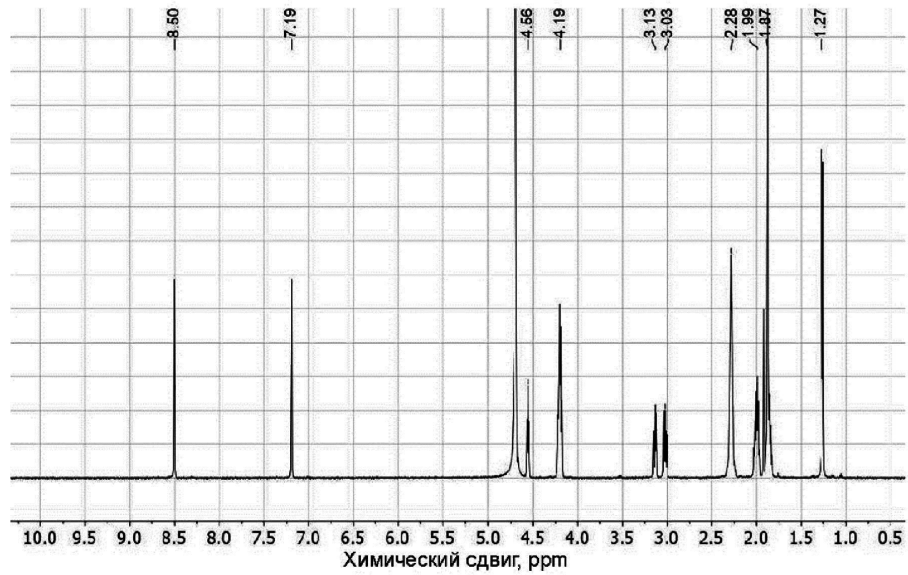


Фиг. 4. ИК-спектр с Фурье преобразованием НАЕЕ (1)
и медного комплекса $[\text{Cu}(\text{NAEE})]\text{Cl}_2$ (2).

3/4

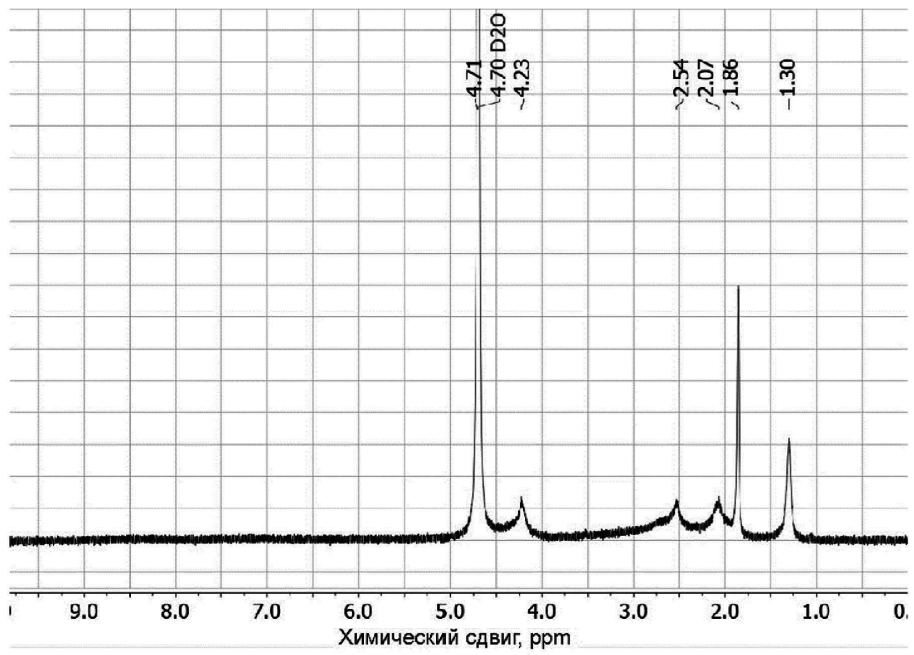


Фиг. 5. Расположение атомов в молекуле НАЕЕ для ^1H -ЯМР-анализа.



Фиг. 6. ^1H -ЯМР спектр НАЕЕ.

4/4



Фиг. 7. ¹H-ЯМР спектр [Cu(HAEE)]Cl₂.