



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010105912/04, 19.02.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.02.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.02.2010

(45) Опубликовано: 10.04.2011 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2000004 C, 15.02.1993. RU 2015993 C1, 15.07.1994. SU 1578143 A1, 15.07.1990. Semchikov Yu.D. et al. «Dependence of copolymer composition upon molecular weight in homogeneous radical copolymerization». Europe Polymer Journal, 1990, vol.26, No.8, pp.883-887. Федоров Е.К., Кедик С.А. «Исследование молекулярно-массовой и композиционной (см. прод.)

Адрес для переписки:

119571, Москва, пр. Вернадского, 86,
БМиФт, С.А. Кедик

(72) Автор(ы):

Кедик Станислав Анатольевич (RU),
Свергун Вячеслав Иванович (RU),
Черта Юлия Вячеславовна (RU),
Ярцев Евгений Иванович (RU),
Панов Алексей Валерьевич (RU)

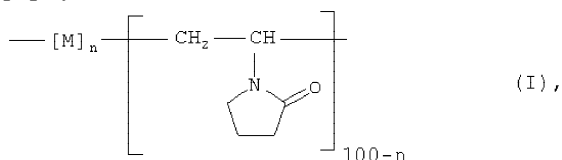
(73) Патентообладатель(и):

Кедик Станислав Анатольевич (RU)

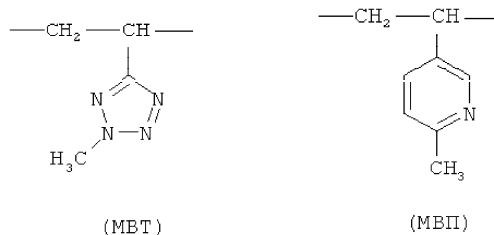
(54) СОПОЛИМЕРЫ НА ОСНОВЕ N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к химии биологически активных полимеров. Предложены сополимеры на основе N-винилпирролидона, представленные общей формулой (I):



где мономерное звено М представляет фрагмент 2-метил-5-винилтетразола (МВТ) или 2-метил-5-винилпиридина (МВП):



и содержание мономерных звеньев n составляет 25-90 мол.%, а средневязкостная молекулярная масса M_w сополимера зависит от природы М (при М=МВТ 100-250 кДа, при М=МВП 46-150 кДа). Сополимеры применимы в качестве адьювантов при производстве вакцин. Технический результат - получение нетоксичных сополимеров, обладающих адьювантной активностью. 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 5 табл.

(56) (продолжение):

неоднородности статистических сополимеров N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина методом жидкостной хроматографии». Высокомолекулярные соединения, серия А, 1994, т.36, №9, с.1548-1552. Калистратов В.Г. и др. «Противолучевые и другие биологические свойства сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона». Медицинская радиология, 1993, т.38, №10, с.21-25. US 4057625 A1, 08.11.1977.

R U 2 4 1 5 8 7 6 C 1

R U 2 4 1 5 8 7 6 C 1

действия [3].

Указанные сополимеры получают радикальной сополимеризацией N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина в присутствии динитрила азобис-изомаасляной кислоты в качестве инициатора сополимеризации, пероксида водорода и циклогексана в качестве регулятора молекулярной массы, а целевой продукт выделяют осаждением в диэтиловый эфир.

Целью данного изобретения является расширение арсенала биологически активных соединений на основе сополимеров N-винилпирролидона, которые могут найти применение в медицине, в частности, в качестве адъювантов при изготовлении вакцин.

Описание изобретения

В соответствии с первым воплощением данного изобретения получают сополимер формулы (I), в котором мономерное звено М представляет МВТ. Для этого проводят радикальную сополимеризацию N-винилпирролидона (N-ВП) и 2-метил-5-винилтетразола (2-М-5-ВТ) в присутствии динитрила азобис-изомаасляной кислоты (ДАК) в качестве инициатора сополимеризации в индифферентном растворителе, таком как диметилформамид (ДМФА), с последующим выделением продукта диэтиловым эфиром (ДЭ) или смесью бутилацетата (БА) и циклогексана (ЦТ).

Ввиду большого различия в константах сополимеризации N-ВП и 2-М-5-ВТ, последний быстро расходуется в процессе сополимеризации, поэтому синтез сополимера заданного состава обеспечивается поддержанием постоянного соотношения N-ВП и 2-М-5-ВТ путем компенсации расхода мономеров подпиточной смесью.

Исходная смесь содержит 30-55 масс.% N-ВП, 1-20 масс.% 2-М-5-ВТ и 45-50 масс.% ДМФА. Подпиточная смесь содержит 0-20 масс.% N-ВП, 8-40 масс.% 2-М-5-ВТ и 60-80 масс.% ДМФА. Объем подпиточной смеси вычисляют каждые 20 минут по результатам анализа соотношения концентраций мономеров в реакционной смеси. Экспрессность анализа достигается за счет применения автоматизированного анализатора (АА), в качестве которого может быть использован, например, высокоэффективный жидкостный хроматограф.

В одном варианте изобретения подпиточную смесь готовит и добавляет оператор (аппаратчик), основываясь на данных анализа и регламента синтеза. В другом варианте добавление подпиточной смеси осуществляется автоматически с помощью системы контроля и управления синтезом. Такая система объединяет АА, управляющее устройство и исполнительные устройства. В качестве управляющего устройства может быть использована ЭВМ, реализующая алгоритм управления синтезом, построенный на основе математической модели процесса. В качестве исполнительных устройств могут быть использованы управляемые запорные устройства, например клапаны с пневматическим или электромеханическим приводом.

Реакцию сополимеризации проводят при температуре 60-70°C. По достижении степени конверсии по мономерам около 20% реакционную массу охлаждают до 20°C и осаждают в диэтиловый эфир.

Строение полученного продукта характеризуется, в частности, числом мономерных звеньев МВТ (n). В одном варианте изобретения его вычисляют по данным элементного анализа с учетом стехиометрии сополимера. Получение необходимых для этого расчетных формул доступно среднему специалисту в данной области. В другом варианте изобретения строение полученного продукта определяют по данным ЯМР-спектromетрии, например ^1H -, ^{13}C - или ^{15}N -ЯМР, по соотношениям интегральных интенсивностей сигналов определенных ядер. Решение данной задачи также доступно

среднему специалисту в данной области.

Полученный продукт также характеризуется средневязкостной молекулярной массой, которую вычисляют по характеристической вязкости сополимеров. Выбор методики и подбор условий измерения вязкости являются рутинной процедурой,
5 доступной среднему специалисту в данной области. В одном варианте изобретения характеристическую вязкость определяют в растворителе, состоящем из 85 об.% ДМФА и 15 об.% 0,1 М водного раствора LiBr.

В соответствии со вторым воплощением данного изобретения получают сополимер
10 формулы (I), в котором мономерное звено М представляет МВП. Для этого проводят радикальную сополимеризацию N-винилпирролидона (N-ВП) и 2-метил-5-винилпиридина (2-М-5-ВТ) в присутствии динитрила азобис-изомасляной кислоты (ДАК) в качестве инициатора сополимеризации, пероксида водорода и циклогексана в качестве регулятора молекулярной массы. Продукт выделяют осаждением в
15 диэтиловый эфир (ДЭ).

Постоянство соотношения N-ВП и 2-М-5-ВП обеспечивают, компенсируя расход мономеров подпиточной смесью. Подпиточная смесь содержит 7-72 масс.% N-ВП и 28-93 масс.% 2-М-5-ВП. Объем подпиточной смеси вычисляют каждые 20 минут по
20 результатам анализа соотношения концентраций мономеров в реакционной смеси. Реакцию сополимеризации проводят при температуре 65-70°C. По достижении степени конверсии по мономерам около 20% реакционную массу охлаждают до 20°C и осаждают в диэтиловый эфир. Для проведения реакции и исследований, необходимых для контроля ее протекания, а также для определения физико-химических
25 характеристик продукта применяют средства и методы, описанные выше для первого воплощения изобретения.

Сополимер в соответствии с любым из воплощений настоящего изобретения является нетоксичным и обладает адьювантной активностью, что может быть
30 подтверждено исследованиями *in vivo*. Специалисту в данной области очевиден выбор вирусов и их серотипов, а также подопытных животных, в качестве которых могут быть использованы млекопитающие и птицы. В одном из вариантов млекопитающими являются беспородные белые мыши. В другом варианте млекопитающими являются морские свинки.

В качестве признаков токсического воздействия сополимера на подопытных животных могут рассматриваться, например, гибель, снижение массы тела, изменения походки и поведения, цвета мочи, консистенции экскрементов, состояния глаз и ушей, выпадение зубов и шерсти, а также раздражение кожи в месте введения препарата.

Далее приведены иллюстративные примеры осуществления изобретения,
40 способствующие более точному и полному пониманию его сути. Специалисту в данной области очевидны возможные модификации и замены, например, относящиеся к протоколам исследований, которые не выходят за рамки объема изобретения, определяемые его формулой.

45 **Пример 1.** Получение сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилтетразола с выделением продукта диэтиловым эфиром

В реактор загружают исходную реакционную смесь, содержащую 13,24 г N-ВП (51%), 0,625 г 2-М-5-ВТ (3%), 12,5 мл ДМФА (46%) и 0,05 г ДАК. Реакционную
50 массу нагревают до 65-70°C и ведут синтез при данной температуре, периодически отбирая пробы для хроматографического анализа (ВЭЖХ, Сферисорб С-18, 5 мкм, 4,6×250 мм, EtOH/H₂O 6:94, 2,5 мл/мин (50°C), 254 нм) и подавая подпиточную смесь, содержащую 1,2 мл N-ВП (12%), 0,8 мл 2-М-5-ВТ (8%), 8,0 мл ДМФА (80%). По

достижении степени конверсии по мономерам 20% реакционную массу охлаждают до 20°C и осаждают в 300 мл диэтилового эфира. Целевой продукт выделяют фильтрацией и сушат: сначала при атмосферном давлении при 40-60°C, а затем - в вакуумном сушильном шкафу при 80-90°C. Получают 1,36 г аморфного порошка белого цвета, растворимого в воде, с содержанием звеньев МВТ 48 мол.%.

Примеры 2-3. Синтез и выделение сополимеров осуществляют в условиях, указанных в Примере 1. Состав исходной и подпиточной смесей, выход сополимера, содержание в нем звеньев МВТ (n, мол.%) и его растворимость в воде (РВ) приведены в Таблице 1.

Пр.	Реакционная смесь			Подпиточная смесь			Выход, г	n, мол.%	РВ
	N-ВП, г	2-М-5-ВТ, г	ДМФА, г	N-ВП, г	2-М-5-ВТ, г	ДМФА, г			
2	12,99	0,688	12,5	2,0	2,0	6,0	2,95	43	Р
3	13,02	0,332	12,5	1,2	0,8	8,0	1,81	29	Р

р - растворимый, мр - малорастворимый, нр - нерастворимый.

Пример 4. Получение сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилтетразола с выделением продукта смесью бутилацетата и циклогексана

В реактор загружают исходную реакционную смесь, содержащую 13,08 г N-ВП (50%), 1,37 г 2-М-5-ВТ (5%), 12,5 мл ДМФА (45%) и 0,05 г ДАК. Реакционную массу нагревают до 65-70°C и ведут синтез при данной температуре, периодически отбирая пробы для хроматографического анализа (ВЭЖХ, Сферисорб С-18, 5 мкм, 4,6×250 мм, EtOH/H₂O 6:94, 2,5 мл/мин (50°C), 254 нм) и подавая подпиточную смесь, содержащую 1,0 мл N-ВП (10%), 3,0 мл 2-М-5-ВТ (30%), 6,0 мл ДМФА (60%). По достижении степени конверсии по мономерам 20% реакционную массу охлаждают до 20°C и осаждают в смесь 200 мл БА и 50 мл ЦТ. Целевой продукт выделяют фильтрацией и сушат: сначала при атмосферном давлении при 40-60°C, а затем - в вакуумном сушильном шкафу при 80-90°C. Получают 3,08 г аморфного порошка белого или кремового цвета, растворимого в воде, с содержанием 2-метил-5-винилтетразольных звеньев 56 мол.%.

Примеры 5-6. Синтез и выделение сополимеров осуществляют в условиях, указанных в Примере 4. В Примере 5 для осаждения продукта используют смесь, содержащую 240 мл БА и 60 мл ЦТ. В Примере 6 для осаждения продукта используют смесь, содержащую 240 мл БА и 80 мл ЦТ. Состав исходной и подпиточной смесей, а также выход сополимера, содержание в нем звеньев МВТ (n, мол.%) и его растворимость в воде (РВ) приведены в Таблице 2.

Пр.	Реакционная смесь			Подпиточная смесь			Выход, г	n, мол.%	РВ
	N-ВП, г	2-М-5-ВТ, г	ДМФА, г	N-ВП, г	2-М-5-ВТ, г	ДМФА, г			
5	10,25	1,37	12,5	1,0	3,0	6,0	2,95	83	мр
6	7,78	5,37	15,0	-	4,0	6,0	1,81	90	нр

р - растворимый, мр - малорастворимый, нр - нерастворимый.

Пример 7. Получение сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина

В реактор загружают исходную реакционную смесь, содержащую 2,50 кг (2,40 л) N-ВП (90,9%), 42 г (44 мл) 2-М-5-ВП (1,5%), 2,8 г (3 мл) 30% водного раствора пероксида водорода (0,1%), 195 г (250 мл) циклогексана (7,1%) и 10 г ДАК (0,4%). Реакционную массу нагревают до 65-70°C и ведут синтез при данной температуре, периодически отбирая пробы для хроматографического анализа (ВЭЖХ, Сферисорб С-18, 5 мкм,

4,6×250 мм, EtOH/H₂O 6:94, 2,5 мл/мин (50°C), 254 нм) и подавая подпиточную смесь, содержащую 450 г (433 мл) N-ВП (72%), 172 г (164 мл) 2-М-5-ВП (27,4%), 1,1 г (1 мл) 30% водного раствора пероксида водорода (0,2%) и 2,5 г ДАК (0,4%). По достижении степени конверсии по мономерам 20% реакционную массу охлаждают до 20°C и осаждают в диэтиловый эфир. Целевой продукт промывают на фильтре 2 л ДЭ, выделяют фильтрацией и сушат: сначала при атмосферном давлении при 40-60°C, а затем - в вакуумном сушильном шкафу при 80-90°C. Получают 560 г аморфного порошка белого цвета, растворимого в воде (10 масс.% водный раствор имеет рН 7,1), с содержанием звеньев МВП 25 мол.%.

Примеры 8-11. Синтез и выделение сополимеров осуществляют в условиях, указанных в Примере 7. Состав исходной и подпиточной смесей, а также выход сополимера (Вых.), содержание в нем звеньев МВП (n, мол.%) и его растворимость в воде (РВ) приведены в Таблице 3.

Пр.	Реакционная смесь				Подпиточная смесь			Вых., г	n, мол.%	РВ
	N-ВП, г	2-М-5-ВП, г	H ₂ O ₂ , г	ЦГ, г	N-ВП, г	2-М-5-ВП, г	H ₂ O ₂ , г			
8	2500	42	3	195	450	172	1	565	25	мр
9	2500	95,8	3	195	352	270	1	558	40	мр
10	2500	185,2	3	195	180	442	1	550	65	нр
11	2500	275,6	3	195	43	579	1	542	90	нр

р - растворимый, мр - малорастворимый, нр - нерастворимый.

Пример 12. Исследование острой токсичности сополимеров *in vivo*

Исследование проводят в группе из 5 здоровых беспородных белых мышей массой 18-20 г. Соединение, полученное в соответствии с каждым из Примеров 1-6, в структуре которого присутствует фрагмент 2-метил-5-винилтетразола, а также в соответствии с каждым из Примеров 7-11, в структуре которого присутствует фрагмент 2-метил-5-винилпирадина, растворяют в стерильном изотоническом растворе NaCl из расчета 10 масс.% и вводят каждому животному 0,4 мл этого раствора. Соединение считают выдержавшим испытание, если через 7 суток наблюдения в группе не погибло ни одно животное. В данном исследовании не было гибели животных.

Пример 13. Исследование *in vivo* аномальной токсичности противогриппозной вакцины, содержащей сополимеры в соответствии с изобретением

Аномальную токсичность исследуют при однократном введении одной прививочной дозы вакцины (0,5 мл) белым беспородным мышам (внутрибрюшинно) или морским свинкам (подкожно). Беспородных белых мышей (самцы и самки) с массой тела 18-22 г разделяют на 5 опытных и 1 контрольную группу по 5 животных в каждой. Морских свинок (самцы и самки) с массой тела 250-300 г разделяют на 5 опытных и 1 контрольную группу по 2 животных в каждой.

Перед началом исследований животные проходят карантин при групповом содержании в клетках, а также подробный клинический осмотр непосредственно перед формированием групп. Критерием отбора является изменение массы тела.

Проявление аномальной токсичности определяют по результатам наблюдений в течение 7 суток, регистрируя следующие события и характеристики (качественные оценки): гибель животного, походка и поведение, цвет мочи, консистенция экскрементов, состояние глаз и ушей, выпадение зубов и шерсти, а также раздражение кожи в месте введения препарата. Количественной оценкой может служить усредненное по группе изменение массы тела животных за 7 суток.

Ни одного факта гибели животного как в контрольной, так и в опытных группах не наблюдалось. Походка, поведение, цвет мочи, консистенция экскрементов, состояние глаз и ушей оставались неизменными в течение всего периода наблюдений. Выпадение зубов и шерсти, а также раздражение кожи в месте введения препарата также не отмечено.

В данных исследованиях были получены следующие данные об изменении массы тела подопытных животных, наблюдаемых в течение 7 суток, которые представлены в Таблице 4.

Таблица 4					
Группа	ИМ, мкг	Изменение массы тела подопытных животных, г (среднее по группе)			
		Серия 1		Серия 2	
		Мыши	Морские свинки	Мыши	Морские свинки
1	125	7,9	36,5	1,1	49
2	250	7,7	33,3	1,3	45
3	500	7,1	32,3	1,8	32
4	1000	6,9	32,0	1,5	15
5	2000	2,2	18,3	0,3	5
Контроль	-	8,0	49,8	1,7	28,0

ИМ - содержание иммуномодулятора (адьюванта).
 Серия 1 - сополимер винилпирролидона с винилпирридином (Примеры 1-6).
 Серия 2 - сополимер винилпирролидона с винилтетразолом (Примеры 7-11).

Пример 14. Исследование адьювантного действия

Метод исследования основан на выявлении прироста специфических антител в сыворотке крови после двукратного, с интервалом 7 суток, внутрибрюшинного введения вакцины беспородным белым мышам.

Вакциной является гриппозная тривалентная субъединичная жидкая вакцина в указанных соотношениях для каждой группы подопытных животных в смеси с иммуномодулятором (адьювантом), который представляет собой соединение, полученное в соответствии с каждым из Примеров 1-6, в структуре которого присутствует фрагмент 2-метил-5-винилтетразола, а также в соответствии с каждым из Примеров 7-11, в структуре которого присутствует фрагмент 2-метил-5-винилпирридина. В 1 дозе (0,5 мл) вакцины содержится по 5 мкг гемагглютинаина вируса гриппа подтипов А (Н1N1) и А (Н3N2), 11 мкг гемагглютинаина вируса гриппа подтипа В и 85-115 мкг/мг консерванта (мертиолят).

Двумя независимыми организациями, аккредитованными в РФ для проведения биологических исследований, были получены следующие данные о приросте специфических антител в сыворотке крови белых мышей (Таблица 5).

Таблица 5							
Группа	ИМ, мкг	Титр антител (среднее по группе)					
		Серия 1*			Серия 2**		
		А(Н3N2)	А(Н1N1)	В	А(Н3N2)	А(Н1N1)	В
		1:160	1:160	1:40	1:65	1:15	1:10
1	125	1:160	1:160	1:40	1:70	1:15	1:10
2	250	1:160	1:160	1:40	1:50	1:20	1:10
3	500	1:160	1:160	1:40	1:60	1:15	1:15
4	1000	1:160	1:160	1:40	1:70	1:20	1:15
5	2000	1:160	1:320	1:40	1:70	1:20	1:10
Контроль	-	1:40	1:40	1:40	1:10	1:10	1:10

* исходный титр - 1:40; ** исходный титр - 1:10

