



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011140410/04, 05.10.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.10.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.10.2011

(45) Опубликовано: 27.08.2012 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2415876 C1, 10.04.2011. SU 1578143
A1, 15.07.1990. RU 2015993 C1, 15.07.1994. US
4057625 A, 08.11.1977.

Адрес для переписки:

119571, Москва, пр. Вернадского, 86,
БМиФТ, С.А. Кедику

(72) Автор(ы):

Кедик Станислав Анатольевич (RU),
Панов Алексей Валерьевич (RU),
Кочкина Юлия Вячеславовна (RU),
Еремин Дмитрий Викторович (RU),
Сакаева Ирина Вячеславовна (RU)

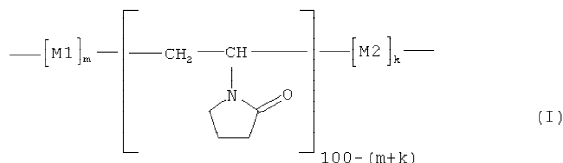
(73) Патентообладатель(и):

Кедик Станислав Анатольевич (RU)

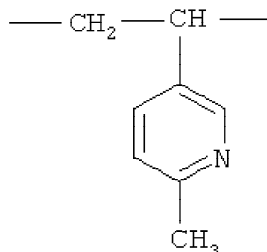
(54) СОПОЛИМЕР, СОДЕРЖАЩИЙ ЗВЕНЬЯ N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА, 2-МЕТИЛ-5-ВИНИЛПИРИДИНА И 4-ВИНИЛПИРИДИНА

(57) Реферат:

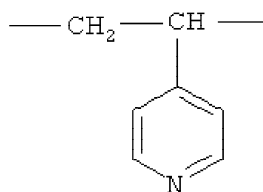
Изобретение относится к области химии биологически активных полимеров. Предложен сополимер на основе N-винилпирролидона общей формулы (I):



где мономерное звено M1 представляет собой фрагмент 2-метил-5-винилпиридина (МВП), а мономерное звено M2 - фрагмент 4-винилпиридина (ВП):



M1, (МВП)



M2, (ВП)

содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 20-90 мольн.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет 0,05-(m+

k)-0,30·(m+k), а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu}=15-250$ кДа. Предложено также применение указанного сополимера в качестве активатора продуцирования интерлейкина-1, агента против рака печени, почек, мочевого пузыря, костного мозга и молочной железы,

активатора фагоцитоза и адьюванта при изготовлении вакцины против гриппа. Технический результат - предложенный сополимер расширяет арсенал биологически активных соединений на основе сополимеров N-винилпирролидона и имеет более широкий спектр действия по сравнению с известными аналогами. 5 н. и 4 з.п. ф-лы, 6 табл., 14 пр.

R U 2 4 5 9 8 3 8 C 1

R U 2 4 5 9 8 3 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C08F 226/10 (2006.01)
A61K 31/79 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011140410/04, 05.10.2011**(24) Effective date for property rights:
05.10.2011

Priority:

(22) Date of filing: **05.10.2011**(45) Date of publication: **27.08.2012 Bull. 24**

Mail address:

**119571, Moskva, pr. Vernadskogo, 86, BMiFT,
S.A. Kediku**

(72) Inventor(s):

**Kedik Stanislav Anatol'evich (RU),
Panov Aleksey Valer'evich (RU),
Kochkina Julija Vjacheslavovna (RU),
Eremin Dmitrij Viktorovich (RU),
Sakaeva Irina Vjacheslavovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

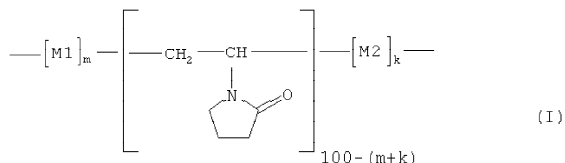
Kedik Stanislav Anatol'evich (RU)

(54) **COPOLYMER CONTAINING N-VINYL PYRROLIDONE, 2-METHYL-5-VINYL PYRIDINE AND 4-VINYL PYRIDINE LINKS**

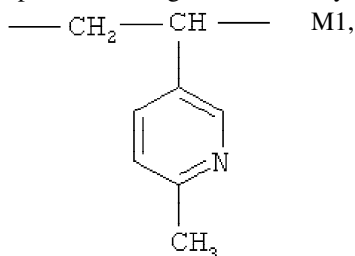
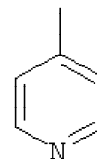
(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: disclosed is a N-vinyl pyrrolidone-based copolymer of general formula (I):



, where the monomer link M1 represents a fragment of 2-methyl-5-vinyl pyridine (MVP), and the monomer link M2 represents a fragment of 4-vinyl pyridine (VP):

(MVP) $\text{---CH}_2\text{---CH---M2, (VP);$ 

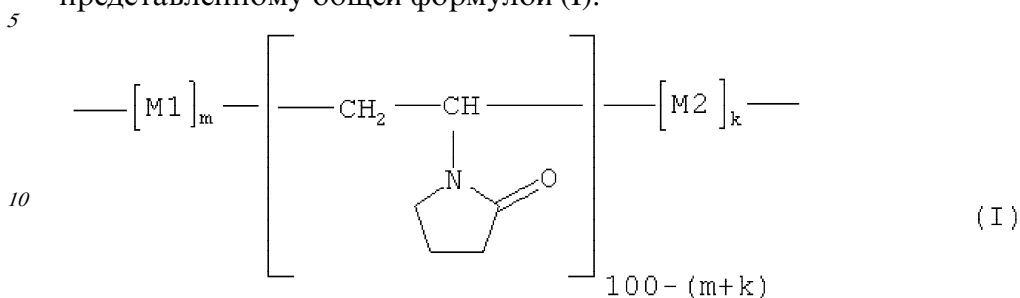
content of monomer links M1 and M2 (m+k) is equal to 20-90 mol %, wherein the content of monomer links M2 (k) is equal to 0.05-(m+k)-0.30-(m+k), and the viscosity-average molecular weight M_v of the copolymer $M_v=15-250$ kDa. Also disclosed is use of said copolymer as an activator for producing interleukin-1, an agent against liver, kidney, urinary bladder, bone marrow and breast cancer, as a phagocytosis activator and as an adjuvant when influenza vaccines.

EFFECT: disclosed copolymer widens the range of biologically active compounds based on copolymers of N-vinyl pyrrolidone and has a wide range of action compared to existing analogues.

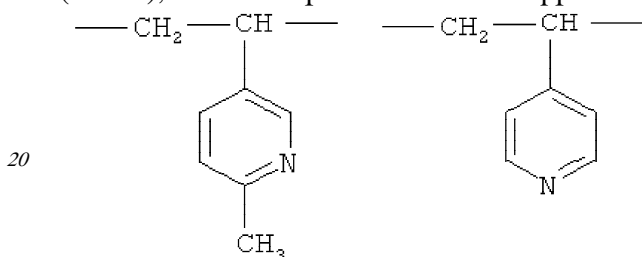
9 cl, 6 tbl, 14 ex

Область техники

Изобретение относится к области химии биологически активных полимеров. Более конкретно изобретение относится к сополимеру на основе N-винилпирролидона, представленному общей формулой (I):



15 где мономерное звено M1 представляет собой фрагмент 2-метил-5-винилпиридина (МВП), а мономерное звено M2 - фрагмент 4-винилпиридина (ВП):



25 M1, (МВП) M2, (ВП)

содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 20-90 мольн.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет $0,05 \cdot (m+k) - 0,30 \cdot (m+k)$, а средневязкостная молекулярная масса M_v сополимера равна $M_v = 15-250$ кДа.

30 Указанные сополимеры обладают противоопухолевой, иммуномодулирующей, фагоцитной и адьювантной активностью.

Уровень техники

35 В авторском свидетельстве SU 1578143 (опубл. 15.07.1990) описан сополимер N-винилпирролидона и 5-изопропенил-тетразола с молекулярной массой, определенной методом светорассеяния, равной 85 кДа, в котором содержание 5-изопропенилтетразольных звеньев составляет 0,40-0,74 мольн. доли, обладающий свойствами иммуноадьюванта поверхностного антигена вирусного гепатита В.

40 Указанный сополимер получают радикальной сополимеризацией 5-изопропенилтетразола и N-винилпирролидона в присутствии динитрила азоизомасляной кислоты в качестве инициатора сополимеризации с одновременной загрузкой всех компонентов реакционной смеси. В одном варианте радикальную сополимеризацию проводят в среде этанола, а целевой продукт выделяют осаждением в диэтиловый эфир. В другом варианте реакцию проводят в водной среде, 45 необязательно, с добавлением водного раствора NaOH для повышения pH до 5,5, а целевой продукт выделяют фильтрованием или центрифугированием. В случае добавления щелочи стадии выделения продукта предшествует его осаждение в 0,1M раствор HCl. Наилучшей адьювантной активностью обладает сополимер, 50 содержащий 0,74 мольн. доли 5-изопропенилтетразольных звеньев. В патенте RU 2000004 (опубл. 15.02.1993) раскрыты сополимеры N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина со средневязкостной молекулярной массой в диапазоне 29-40 кДа, содержащие 25-40 мольн.% 2-метил-5-винилпиридиновых звеньев, обладающие

иммуностимулирующим действием. В патенте RU 2015993 (опубл. 15.07.1994) указано, что эти сополимеры также проявляют противоопухолевое действие.

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

Наиболее близкий аналог настоящего изобретения раскрыт в патенте RU 2415876 (опубл. 10.04.2011), касающемся сополимера N-винилпирролидона, содержащего 25-90 мол.% мономерных звеньев 2-метил-5-винилтетразола (МВТ) или 2-метил-5-винилпиридина со средневязкостной молекулярной массой 46-250 кДа, который может применяться в качестве адъюванта при изготовлении вакцины против гриппа.

Описание изобретения

Целью данного изобретения является расширение арсенала биологически активных соединений на основе сополимеров N-винилпирролидона, которые могут найти применение в медицине. Авторы настоящего изобретения провели исследования и установили, что сополимеры на основе N-винилпирролидона (N-ВП), содержащие не только мономерные звенья 2-метил-5-винилпиридина (МВП), но также и фрагменты 4-винилпиридина (ВП), обладают более широким спектром действия, и в некоторых случаях их активность значительно превышает активность известных аналогов.

Авторы установили, что отношение наблюдаемых констант сополимеризации N-ВП с МВП и N-ВП с ВП практически постоянно во всем диапазоне температур и концентраций реагентов, в которых проводят сополимеризацию. При этом константы полимеризации N-ВП и МВП или ВП различаются более чем на порядок, вследствие чего МВП и ВП расходуются быстрее, чем N-ВП. Поэтому для синтеза сополимера заданного состава необходимо компенсировать расход мономеров подпиточной смесью. Учет выявленных закономерностей позволяет получать сополимеры в соответствии с изобретением, в которых мольные доли звеньев МВП и ВП определяются соотношениями МВП и ВП в подпиточной смеси.

В соответствии с первым вариантом данного изобретения получают сополимер формулы (I), в котором содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 20-50 мольн.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет $0,05 \cdot (m+k) - 0,30 \cdot (m+k)$, а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu} = 15-40$ кДа.

Предпочтительно содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 25-40 мольн.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет $0,05 \cdot (m+k) - 0,15 \cdot (m+k)$, а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu} = 15-30$ кДа.

В соответствии со вторым вариантом данного изобретения получают сополимер формулы (I), в котором содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 25-90 мольн.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет $0,10 \cdot (m+k) - 0,30 \cdot (m+k)$, а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu} = 45-250$ кДа.

Предпочтительно содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 55-90 мольн.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет $0,10 \cdot (m+k) - 0,25 \cdot (m+k)$, а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu} = 50-150$ кДа.

Настоящее изобретение относится к применению сополимера в соответствии с изобретением в качестве активатора продуцирования интерлейкина-1 α и интерлейкина- β .

Среди белков семейства ИЛ-1 главным эндогенным медиатором защитных реакций организма служит интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β). В частности, различные типы клеток

синтезируют и секретируют ИЛ-1 β в ответ на повреждение тканей, например, под воздействием ионизирующих излучений, тогда как ИЛ-1 α существует, в основном, в виде мембранной формы. Одно из главных свойств обоих типов ИЛ-1 заключается в способности стимулировать функциональную активность многих типов лейкоцитов и лимфоцитов в ходе развития иммунного ответа на воспаление и пролиферацию злокачественных клеток. Кроме того, ИЛ-1 стимулирует костномозговое кроветворение и воздействует на функции фибробластов и эндотелиальных клеток.

Благодаря своим свойствам рекомбинантный ИЛ- β человека находит применение в клинической практике. Например, медицинский препарат «Беталейкин» разрешен к медицинскому применению в РФ (Приказ Минздрава РФ №51 от 18.02.1997 г., рег. №97/51/6) в качестве иммуностимулятора и как средство восстановления костномозгового кроветворения у раковых больных после интенсивных курсов химио- и радиотерапии. С этой целью препарат применяется у онкологических больных для восстановления подавленного лейкопоза. Его применение ведет к значительному сокращению сроков нейтропении, снижению частоты суперинфекций и увеличению выживаемости, что подтверждается результатами сравнений с данными медицинской статистики за предшествующие десятилетия. Кроме того, «Беталейкин» используется как гемостимулирующее средство при пересадках костного мозга.

Таким образом, сополимеры настоящего изобретения могут найти применение в качестве агентов, повышающих терапевтическую эффективность обеих форм интерлейкина-1 при лечении онкологических заболеваний, особенно с применением лучевой терапии, а также как средства, улучшающие общее состояние больного, за счет восстановления показателей гемопоэза. К указанным онкологическим заболеваниям относятся, в первую очередь, злокачественные поражения печени, почек, мочевого пузыря, костного мозга и молочной железы.

В связи с вышеописанным настоящее изобретение также относится к применению сополимера в соответствии с изобретением в качестве противоракового агента, где рак выбран из группы, состоящей из рака печени, почек, мочевого пузыря, костного мозга и молочной железы.

Далее настоящее изобретение относится к применению сополимера в соответствии с изобретением в качестве активатора фагоцитоза.

Настоящее изобретение далее относится к применению сополимера в соответствии с изобретением в качестве адьюванта при изготовлении вакцин. Предпочтительно применять сополимер для приготовления вакцины против гриппа.

Для реализации первого и второго вариантов изобретения проводят радикальную сополимеризацию N-ВП и смеси МВП и ВП в присутствии динитрила азобис-изомасляной кислоты (ДАК) в качестве инициатора сополимеризации, пероксида водорода (ПВ) и циклогексана (ЦГ) в качестве регулятора молекулярной массы. Продукт выделяют осаждением в диэтиловый эфир (ДЭ).

Исходная реакционная смесь содержит 83,5-92,0 мас.% N-ВП, 1,5-9,5 мас.% смеси МВП и ВП, 6,5-7,0 мас.% ЦГ, 0,1 мас.% ПВ и 0,4 мас.% ДАК. Подпиточная смесь содержит 7-72 мас.% N-ВП, 27,5-92,5 мас.% смеси МВП и ВП, 0,2 мас.% ПВ и 0,4 мас.% ДАК.

Требуемое содержание 4-винилпиридиновых мономерных звеньев М2 (к) обеспечивается введением соответствующих количеств ВП как в исходную, так и в подпиточную смеси. Например, если требуется получить сополимер, содержащий около 60 мольн.% N-ВП с содержанием мономерных звеньев М1 и М2 (m+k), равным приблизительно 40 мольн.% и долей мономерных звеньев М2 на уровне 0,05·(m+k), то

подпиточная смесь должна содержать 60 мольн.% N-ВП, 38 мольн.% МВП и 2 мольн.% ВП. Учитывая различие в скоростях полимеризации, исходная реакционная смесь должна иметь на порядок меньшее содержание МВП и ВП: 3,8 мольн.% МВП и 0,2 мольн.% ВП, и ее остаток, т.е. 96 мольн.%, должен составлять N-ВП.

5 Применяя проиллюстрированный выше подход, можно заранее оценивать составы исходной реакционной смеси и подпиточной смеси. При необходимости, можно более точно определять содержания каждого из реагентов по данным анализа полученного продукта. Продукт характеризуется, в частности, числом мономерных звеньев
10 МВП (m) и ВП (k). В одном варианте 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 строение полученного продукта определяют по данным ЯМР-спектromетрии, например ^1H -, ^{13}C - или ^{15}N -ЯМР, по соотношениям интегральных интенсивностей
15 сигналов определенных ядер. Решение указанной задачи также доступно среднему специалисту в данной области.

Объем подпиточной смеси вычисляют каждые 10-20 минут по результатам анализа соотношения концентраций мономеров в реакционной смеси. Реакцию
20 сополимеризации проводят при температуре 60-70°C. По достижении степени конверсии по мономерам около 20-25% реакционную массу охлаждают до 20°C и осаждают в диэтиловый эфир.

В одном варианте подпиточную смесь готовит и добавляет оператор (аппаратчик),
25 основываясь на данных анализа и регламенте синтеза. В другом варианте добавление подпиточной смеси осуществляется автоматически с помощью системы контроля и управления синтезом. Такая система объединяет высокоэффективный жидкостный хроматограф, управляющее устройство и исполнительные устройства. В качестве
30 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.

Для контроля протекания реакции, а также для определения физико-химических характеристик продукта, применяют средства анализа и методы, описанные выше.
35 Кроме того, для обеспечения экспрессности анализа применяют ВЭЖХ. Условия хроматографирования и способ детектирования аналитического сигнала могут быть определены средним специалистом в данной области на основании знаний в рамках известного уровня техники. Предпочтительно применение ОФ-ВЭЖХ с элюированием
40 водно-спиртовыми элюентами, в частности - с градиентным элюированием. В качестве детектора может применяться УФ-спектрометр.

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

При необходимости для усиления определенного вида активности сополимера в
50 соответствии с настоящим изобретением продукт реакции с широким молекулярно-массовым распределением может быть дополнительно фракционирован, например, методом гель-хроматографии. Условия выполнения фракционирования известны среднему специалисту в данной области. Кроме того, в соответствии с настоящим

изобретением имеется возможности регулировать диапазон средневязкостной молекулярной массы M_{μ} сополимера на стадии синтеза, изменяя количества ПВ и ЦГ.

В частности, сополимеры по п.1, в которых содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 20-50 мольн.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет $0,05 \cdot (m+k) - 0,30 \cdot (m+k)$, а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu} = 15-40$ кДа, обладают более выраженными свойствами активаторов фагоцитоза и продуцирования интерлейкинов, а также противораковыми свойствами по сравнению с адьювантными свойствами. Сополимеры, в которых содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 25-90 мольн.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет $0,10 \cdot (m+k) - 0,30 \cdot (m+k)$, а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu} = 45-250$ кДа, обладают более выраженными адьювантными свойствами и свойствами активаторов фагоцитоза.

Присутствие у соединений указанных видов активности может быть 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.

Сополимеры в соответствии с любым из вариантов настоящего изобретения являются нетоксичными. 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, 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 формулы изобретения.

Пример 1. Получение сополимера N-винилпирролидона (N-ВП), 2-метил-5-винилпиридина (МВП) и 4-винилпиридина (ВП)

В реактор загружают исходную реакционную смесь, содержащую 2,30 кг (2,21 л) N-ВП (90,5 мас.%), 35,9 г (44 мл) МВП (1,5 мас.%), 1,7 г (1,8 мл) ВП (0,1 мас.%), 2,9 г (3,1 мл) 30% водного раствора пероксида водорода (ПВ) (0,1 мас.%), 190 г (245 мл) циклогексана (ЦГ) (7,5 мас.%) и 10,0 г ДАК (0,4 мас.%). Реакционную массу нагревают до 60-70°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 (77,5 мас.%), 121,3 г (127 мл) МВП (20,9 мас.%), 5,6 г (5,9 мл) ВП (1,0 мас.%), 1,2 г (1,1 мл) 30% водного раствора ПВ (0,2 мас.%) и 2,6 г ДАК (0,4 мас.%). По достижении степени конверсии по мономерам 20-25% 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 550 г аморфного порошка белого цвета, растворимого в воде (10 мас.% водный раствор имеет pH 7,12), с суммарным содержанием звеньев МВП и ВП равным 21 мольн.% и долей звеньев ВП равной 0,048. M_{μ} сополимера: 15-40 кДа.

Примеры 2-7. Синтез и выделение сополимеров осуществляют в условиях, указанных в Примере 1. Состав исходной и подпиточной смесей, а также выход

сополимера (Вых), содержание в нем звеньев МВП и ВП (m+k, молн.%), доля звеньев ВП (k) и интервалы средневязкостной молекулярной массы M_w сополимера приведены в Таблице 1.

5

Пр.	Реакционная смесь					Подпиточная смесь				Вых. г	m+k	k	M_w , кДа
	N-ВП, г	МВП, г	ВП, г	ПВ, г	ЦГ, г	N-ВП, г	МВП, г	ВП, г	ПВ, г				
2	2300	86,7	8,4	1,7	195	350	114,8	11,1	1,3	557	25	0,09	15-30
3	2300	163,0	25,3	1,7	195	180	119,1	18,7	1,3	542	42	0,15	45-90

10

Пр.	Реакционная смесь					Подпиточная смесь				Вых. г	m+k	k	M_w , кДа
	N-ВП, г	МВП, г	ВП, г	ПВ, г	ЦГ, г	N-ВП, г	МВП, г	ВП, г	ПВ, г				
4	2300	183,8	69,5	1,6	195	52	40,3	15,1	1,2	565	51	0,30	75-150
5	2300	194,1	71,8	1,5	195	49	34,1	11,7	1,1	552	50	0,29	135-250
6	2300	92,1	8,9	1,6	195	420	132,4	13,5	1,3	683	25	0,10	15-40
7	2300	174,9	38,7	1,6	195	170	231,9	67,8	1,2	678	63	0,25	55-95
8	2300	201,2	76,2	1,7	200	45	405,8	143,2	1,1	756	92	0,29	80-145
9	2300	214,4	82,3	1,7	200	41	402,6	132,3	1,1	735	91	0,30	140-250

20

Пример 10. Исследование *in vivo* острой токсичности сополимеров в соответствии с изобретением

Исследование проводят в группе из 6 здоровых беспородных белых мышей массой 18-22 г. Соплимер, полученный в соответствии с каждым из Примеров 1-6, растворяют в стерильном изотоническом растворе NaCl из расчета 5 мас.% и вводят каждому животному 1,0 мл этого раствора. Соединение считают выдержавшим испытание, если через 7 суток наблюдения в группе не погибло ни одно животное. В исследовании, проведенном для сополимеров, полученных в Примерах 1-9, гибели животных не отмечено.

Пример 11. Исследование *in vivo* аномальной токсичности противогриппозной вакцины, содержащей сополимеры в соответствии с Примерами 1, 3, 5 и 9

Аномальную токсичность исследуют при однократном внутрибрюшинном введении белым беспородным мышам одной прививочной дозы вакцины (0,5 мл), содержащей соединения Примера 4, 6 или 7 в качестве адъюванта. Самцов и самок мышей с массой тела 18-22 г разделяют на 5 опытных и 1 контрольную группу по 5 животных в каждой. Перед началом исследований животные проходят карантин при групповом содержании в клетках, а также подробный клинический осмотр непосредственно перед формированием групп.

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.

Данные об изменении массы тела подопытных животных, наблюдаемых в течение 7

суток, представлены в Таблице 2.

Группа	СС*, мкг	Изменение массы тела подопытных животных, г (среднее по группе)			
		Пример 1	Пример 3	Пример 5	Пример 9
1	125	5,7	3,1	4,9	2,9
2	250	5,2	3,3	4,3	3,2
3	500	6,1	2,8	4,7	4,0
4	1000	5,4	3,5	5,1	3,6
5	2000	5,6	3,3	4,9	3,1
Контроль	-	6,3	4,4	5,2	3,7

*СС - содержание сополимера.

Анализ данных свидетельствует об отсутствии аномальной токсичности у противогриппозной вакцины, содержащей сополимеры в соответствии с изобретением.

Пример 12. Исследование адьювантного действия сополимеров в соответствии с изобретением

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 1 дозе (0,5 мл) вакцины содержится по 5 мкг гемагглютинаина вируса гриппа подтипов А (H1N1) и А (H3N2), 11 мкг гемагглютинаина вируса гриппа подтипа В и 85-115 мкг/мл консерванта (мертиолят). В качестве иммуномодулятора (адьюванта) применяют сополимеры, полученные в соответствии с Примерами 3 и 8 (Серии 1 и 2 соответственно) или сополимер, раскрытый в Примере 11 патента RU 2415876 (Серия 3). Данные о приросте титра представлены в Таблице 3.

Гр.	СА, мкг	Титр антител (среднее по группе)								
		Серия 1*			Серия 2*			Серия 3*		
		H3N2	H1N1	В	H3N2	H1N1	В	H3N2	H1N1	В
1	125	1:70	1:15	1:15	1:90	1:20	1:20	1:70	1:15	1:10
2	250	1:60	1:2	1:10	1:75	1:15	1:10	1:50	1:20	1:10
3	500	1:70	1:20	1:10	1:90	1:20	1:10	1:60	1:15	1:15
4	1000	1:90	1:20	1:10	1:100	1:20	1:20	1:70	1:20	1:15
5	2000	1:70	1:20	1:15	1:90	1:30	1:15	1:70	1:20	1:10
Контр.	-	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10

СА - содержание адьюванта; * исходный титр - 1:10.

На основании полученных данных можно заключить, что вакцина, содержащая соединение в соответствии с Примером 8 настоящего изобретения, является более эффективной, чем аналогичная вакцина известного уровня техники. Вакцина, содержащая соединение в соответствии с Примером 3 настоящего изобретения, проявляет сопоставимую активность.

Пример 13. Исследование противораковой активности сополимеров в соответствии с изобретением

Самок беспородных белых крыс с массой тела 250-300 г разделили на 6 групп по 50 крыс в каждой группе. Животным первой группы по схеме вводили изотонический раствор (негативный контроль), вторая группа получала внутримышечно по схеме сополимер в соответствии с Примером 2 настоящего изобретения, третья группа получала внутримышечно по схеме сополимер в соответствии с Примером 3

патента RU 2415876. Животным четвертой группы по схеме вводили изотонический раствор после введения дозы нитрата плутония-239, достаточной для индуцирования подострого поражения (405 кБк/кг, позитивный контроль). Крысам пятой группы была введена такая же доза нитрата плутония-239, после чего они получали внутримышечно по схеме сополимер в соответствии с Примером 2 настоящего изобретения. Крысам шестой группы, также получившим нитрат плутония-239 в дозе, соответствующей 405 кБк/кг, внутримышечно по схеме вводили сополимер в соответствии с Примером 3 патента RU 2415876. Схема введения сополимеров: первый месяц - 0,5 мл 1 раз в неделю, второй месяц - 0,5 мл 1 раз в 2 недели, третий месяц - 0,5 мл 1 раз в 4 недели.

Через 420 суток после начала исследования в группе негативного контроля (группа 1) осталось 37 крыс (смертность: 26%). В группах 2 и 3 осталось 27 и 28 крыс соответственно (смертность: 10 и 7%). В группе позитивного контроля выжило 2 крысы (смертность: 93%), тогда как в группах 4 и 5, получавших сополимеры внутримышечно и перорально, выжило по 5 крыс (смертность: 83%).

Показатели периферической крови по группам крыс приведены в таблице 4.

Таблица 4				
№	Тип воздействия	Лейкоциты, тыс./мм ³	Эритроциты, млн./мм ³	Гемоглобин
1	Негативный контроль	8,5±1,1	4,723	180
2	Сополимер Примера 2*	7,2±0,6	4,310	175
3	Сополимеры Примера 3**	7,7±0,7	4,508	174
4	Позитивный контроль	21, 8±3,3	5,170	155
5	²³⁹ Pu+сополимеры Примера 2*	15,2±2,2	4,863	164
6	²³⁹ Pu+сополимеры Примера 3**	15,2±2,2	4, 863	164

* Пример 2 настоящего изобретения.
** Пример 3 патента RU 2415876.

Результаты некропсии крыс, умерших до момента окончания исследования, а также животных, умерщвленных по окончании исследования, показывают, что опухоль в подмышечной впадине в группах 5 и 6, в среднем, имеет объем в 2-3 раза меньший, чем в группе позитивного контроля. Злокачественные изменения печени и/или почек в этих группах также зарегистрированы в 2-3 раза реже по сравнению с группой позитивного контроля.

В результате проведенных исследований констатируется, что введение сополимеров в соответствии с настоящим изобретением оказывает статистически значимое подавляющее действие на развитие злокачественных опухолей в печени и почках подопытных животных, а также улучшает общие показатели анализа крови. При этом, введение сополимера в соответствии с Примером 1 настоящего изобретения по показателям общего анализа крови (снижение выраженности лейкопении, снижение содержания эритроцитов) способствует улучшению состояния подопытных животных в большей степени, чем введение его известного аналога.

Пример 14. Исследование активности перитонеальных макрофагов в присутствии красителя Нейтрофильного красного

Оценку фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов проводили по интенсивности поглощения ими красителя Нейтрофильного красного (Таблица 5) или коллоидной туши (Таблица 6). Сополимеры применяли в дозе 50 мг/кг в объеме 250 мкл. Животным контрольной группы вводили равный объем воды для инъекций.

Краситель вводили мышам внутривентрально в виде 0,05% суспензии в объеме 2 мл. Исследование проводили через 24 часа после завершения курса введения сополимера

или воды. Количество поглощенного красителя определяли по оптической плотности перитонеального лизата при длине волны 620 нм.

Таблица 5

Препарат	Показатели фагоцитарной активности (ФА)			
	3 сутки		5 сутки	
	ФА, %	Изменение ФА, %	ФА, %	Изменение ФА, %
Сополимер Пример 1*	67	163	52	149
Сополимер Пример 4*	58	141	49	138
Сополимер Пример 6*	63	154	53	151
Сополимер Пример 3**	59	144	48	137
Контроль	41	100	35	100

* Примеры 1, 4 и 6 настоящего изобретения.
** Пример 3 патента RU 2415876.

В аналогичных условиях мышам внутрибрюшинно вводили 2 мл 0,05% суспензии коллоидной туши. Исследование проводили через 24 часа после введения сополимера мышам. Через 10 минут после введения туши брюшную полость мышей промывали 5 мл изотонического раствора NaCl. Собранные клетки перитонеального экссудата трижды отмывали и суспендировали в 1 мл изотонического раствора NaCl. Процент фагоцитирующих клеток (%ФК) определяли по результатам микроскопического подсчета. После этого клетки осаждали центрифугированием, удаляли супернатант, и осадок клеток лизировали водой для инъекций. Лизаты помещали в фотометрические планшеты и определяли светопоглощение при длине волны 620 нм, пропорциональное количеству туши, поглощенной перитонеальными фагоцитами. Фагоцитарный индекс (ФИ), вычисляемый как отношение светопоглощения к числу фагоцитирующих клеток, отражает степень активации фагоцитоза. Индекс завершенности фагоцитоза, т.е. отношение среднего числа частиц (ФК), поглощенное одной фагоцитирующей клеткой за 1 ч, к ФК за 2,5 ч, отражает переваривающую способность фагоцитов.

Таблица 6

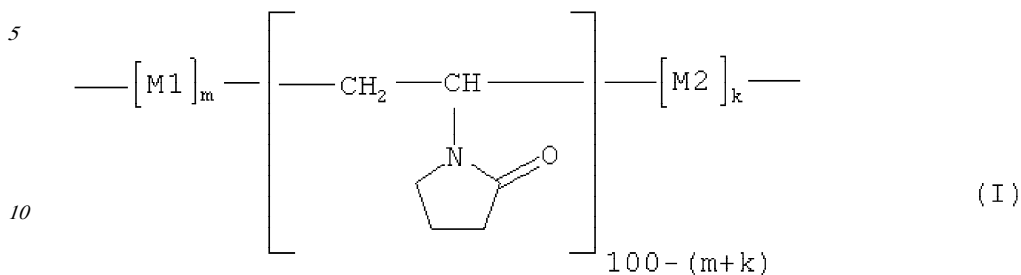
Препарат	%ФК	ФИ	ИЗФ
Сополимер Пример 1*	71,2±1,7	8,9±1,2	34,7±9,4
Сополимер Пример 4*	67,1±2,2	8,2±1,1	30,7±8,3
Сополимер Пример 6*	70,9±1,4	8,5±1,1	32,6±9,7
Сополимер Пример 3**	68,7±1,3	8,3±1,0	31,4±12,8
Контроль	56,0±5,7	7,0±1,0	13,5±5,1

* Пример 2 настоящего изобретения;
** Пример 3 патента RU 2415876;
%ФК - процент фагоцитирующих клеток;
ФИ - фагоцитарный индекс;
ИЗФ - индекс завершенности фагоцитоза.

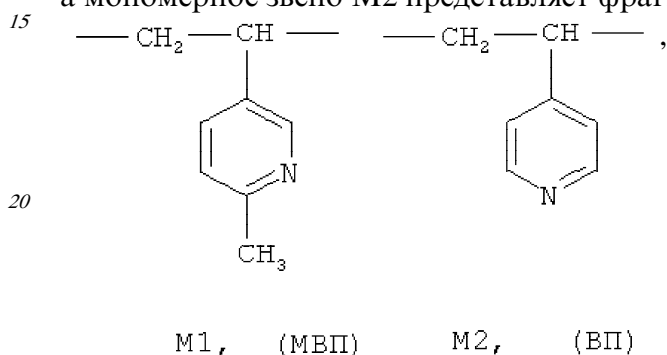
Исследованные соединения, вводимые внутримышечно в дозе 50 мг/кг, статистически достоверно увеличивали фагоцитарную активность на 15-45% по сравнению с контролем в исследованиях с красителем Нейтрофильным красным, а также повышали долю фагоцитирующих клеток на 8-23%, а индекс завершенности фагоцитоза - на 85-138% в исследованиях с частицами коллоидной туши. В последнем случае отмечалось, что введение сополимеров, практически не изменяя числа фагоцитирующих клеток, в 1,5-2 раза увеличивает переваривающую способность макрофагов. Сополимеры, полученные в соответствии с Примерами 1 и 6 настоящего изобретения, обладают несколько более высокой активностью, чем их известный аналог. Активность сополимера Примера 4 сопоставима с активностью аналога.

Формула изобретения

1. Сополимер на основе N-винилпирролидона, представленный общей формулой (I):



где мономерное звено M1 представляет фрагмент 2-метил-5-винилпиридина (МВП),
а мономерное звено M2 представляет фрагмент 4-винилпиридина (ВП):



25 содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 20-90 мол.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет 0,05(m+k)-0,30·(m+k), а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu}=15-250$ кДа.

30 2. Сополимер по п.1, в котором содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 20-50 мол.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет 0,05(m+k)-0,30·(m+k), а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu}=15-40$ кДа.

35 3. Сополимер по п.2, в котором содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 25-40 мол.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет 0,05·(m+k)-0,15·(m+k), а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu}=15-30$ кДа.

40 4. Сополимер по п.1, в котором содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 25-90 мол.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет 0,10·(m+k)-0,30·(m+k), а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu}=45-250$ кДа.

45 5. Сополимер по п.4, в котором содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 55-90 мол.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет 0,10·(m+k)-0,25·(m+k), а средневязкостная молекулярная масса M_{μ} сополимера равна $M_{\mu}=50-150$ кДа.

6. Применение сополимера по любому из пп.1-5 в качестве активатора продуцирования интерлейкина-1 α и интерейкина-1 β .

50 7. Применение сополимера по любому из пп.1-5 в качестве агента против рака печени, почек, мочевого пузыря, костного мозга и молочной железы.

8. Применение сополимера по любому из пп.1-5 в качестве активатора фагоцитоза.

9. Применение сополимера по любому из пп.1-5 в качестве адьюванта при изготовлении вакцины против гриппа.