



(51) МПК
C08F 226/10 (2006.01)
C08F 226/06 (2006.01)
A61K 31/79 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C08F 220/10 (2024.01); *C08F 220/06* (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2023131462, 30.11.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 30.11.2023

Дата регистрации:
 01.10.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.11.2023

(45) Опубликовано: 01.10.2024 Бюл. № 28

Адрес для переписки:

119571, Москва, пр-кт Вернадского, 86, БТиПФ,
 Кедику С.А.

(72) Автор(ы):

Кедик Станислав Анатольевич (RU),
 Суслов Василий Викторович (RU),
 Кочкина Юлия Вячеславовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

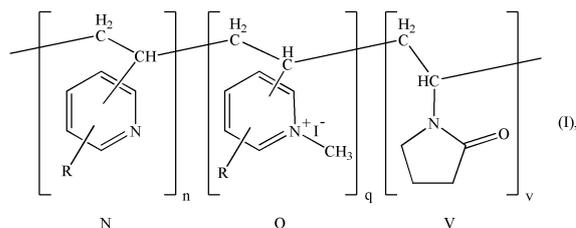
Акционерное общество "Институт
 фармацевтических технологий" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2459838 C1, 27.08.2012. WO
 2015167355 A1, 05.11.2015. M.S. Chernov'yants et
 al. "SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL
 ACTIVITY OF POLY(N-METHYL-4-
 VINILPYRIDINIUM TRIODIDE)",
 Pharmaceutical Chemistry Journal, vol.44,
 number 2, 2010, pp.61-63. Katerina Mavronasou
 et al "Poly(vinyl pyridine) and Its Quaternized
 Derivatives: Understanding Their Solvation (см.
 прод.)

(54) СОПОЛИМЕР, СОДЕРЖАЩИЙ ЗВЕНЬЯ N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА И НЕОБЯЗАТЕЛЬНО С-МЕТИЛИРОВАННОГО ВИНИЛПИРИДИНА, ЧАСТИЧНО МЕТИЛКВАТЕРНИЗИРОВАННОГО МЕТИЛИОДИДОМ, ОБЛАДАЮЩИЕ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ (ВАРИАНТЫ)

(57) Реферат:

Изобретение относится к химии биологически активных полимеров. Описан сополимер N-винилпирролидона и незамещённого или замещённого винилпиридина, в котором пиридиновые фрагменты частично кватернизированы метилиодидом, представленный общей формулой (I):



где R обозначает водород или метил,

содержание n мономерных звеньев N составляет 5 – 85 мол. %, содержание q мономерных звеньев Q составляет 5-85 мол.%, содержание v мономерных звеньев V составляет 10-75 мол.% при условии, что $25 \text{ мол.} \% \leq q+n \leq 90 \text{ мол.} \%$ и $v+n+q=100 \text{ мол.} \%$, и средневязкостная молекулярная масса сополимера $M_{\text{ц}}$ равна 16-302 кДа. Технический результат – придание сополимерам на основе N-винилпирролидона и необязательно метилированных винилпиридинов противовирусных свойств в отношении вируса гриппа типа А, повышение растворимости предлагаемых сополимеров в водных слабокислых и нейтральных средах. 1 з.п. ф-лы, 13 табл., 10 пр.

(56) (продолжение):
and Solid State Properties", Polymers 2022, 14, 804, <https://doi.org/10.3390/polym14040804>.

R U 2 8 2 7 7 0 1 C 1

R U 2 8 2 7 7 0 1 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C08F 226/10 (2006.01)
C08F 226/06 (2006.01)
A61K 31/79 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C08F 220/10 (2024.01); *C08F 220/06* (2024.01)

(21)(22) Application: **2023131462, 30.11.2023**

(24) Effective date for property rights:
30.11.2023

Registration date:
01.10.2024

Priority:

(22) Date of filing: **30.11.2023**

(45) Date of publication: **01.10.2024** Bull. № 28

Mail address:

**119571, Moskva, pr-kt Vernadskogo, 86, BTiPF,
Kediku S.A.**

(72) Inventor(s):

**Kedik Stanislav Anatolevich (RU),
Suslov Vasilii Viktorovich (RU),
Kochkina Iuliia Viacheslavovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

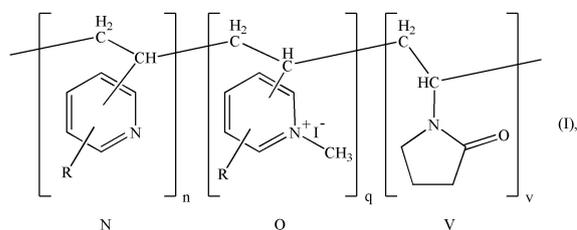
**Aksionernoe obshchestvo "Institut
farmatsevticheskikh tekhnologii" (RU)**

(54) **COPOLYMER CONTAINING UNITS OF N-VINYLPYRROLIDONE AND OPTIONALLY C-METHYLATED VINYLPIRIDINE, PARTIALLY METHYLQUATERNISED WITH METHYL IODIDE, HAVING ANTI-INFLUENZA ACTIVITY (VERSIONS)**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to chemistry of biologically active polymers. Described is a copolymer of N-vinylpyrrolidone and unsubstituted or substituted vinylpyridine, in which pyridine fragments are partially quaternized with methyl iodide, represented by general formula (I):



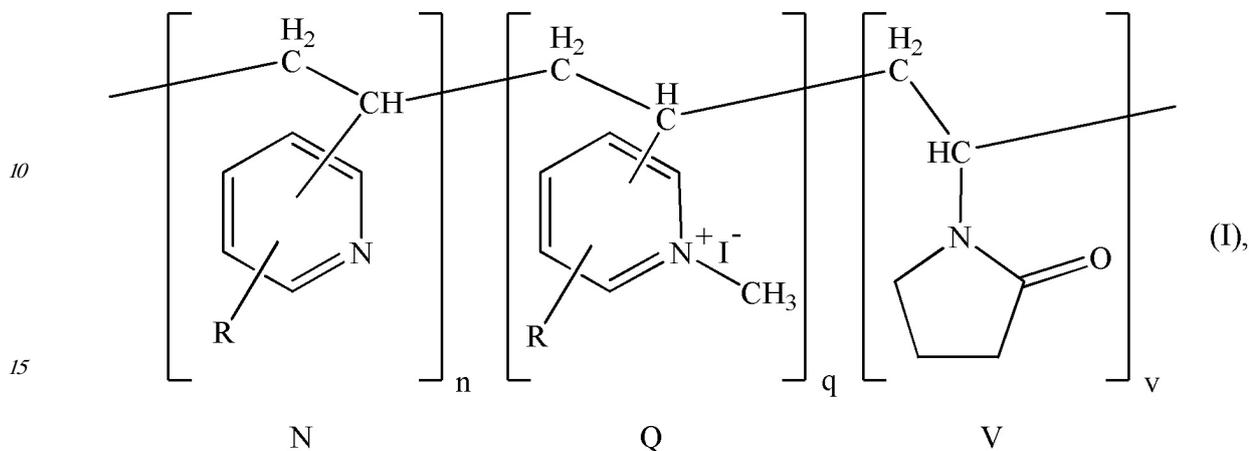
where R denotes hydrogen or methyl, content of n monomer links of N is 5–85 mol.%, content of q monomer links Q is 5–85 mol.%, content v of monomer links V is 10–75 mol.% provided that $25 \text{ mol.}\% \leq q+n \leq 90 \text{ mol.}\%$ and $v+n+q=100 \text{ mol.}\%$, and the viscosity-average molecular weight of the copolymer M_{η} is equal to 16–302 kDa.

EFFECT: imparting antiviral properties to influenza A virus to copolymers based on N-vinylpyrrolidone and optionally methylated vinylpyridines, high solubility of the disclosed copolymers in aqueous weakly acidic and neutral media.

2 cl, 13 tbl, 10 ex

Область техники

Изобретение относится к химии биологически активных полимеров. Более конкретно, изобретение обеспечивает сополимер N-винилпирролидона и незамещённого или C-метилированного винилпиридина, в котором пиридиновые фрагменты частично метилкватернизированы йодистым метилом, представленный общей формулой (I):



где R обозначает водород или метил, содержание n мономерных звеньев N составляет 5 - 85 мол. %, содержание q мономерных звеньев Q составляет 5 - 85 мол. %, содержание v мономерных звеньев V составляет 10 - 75 мол. % при условии, что $25 \text{ мол. \%} \leq q+n < 90 \text{ мол. \%}$ и $v+n+q=100 \text{ мол. \%}$, и средневязкостная молекулярная масса $M_{\text{ц}}$ равна 16 - 302 кДа, и частично метилкватернизированный метилйодидом сополимер формулы (I) обладает противовирусной активностью в отношении вируса гриппа типа А.

Уровень техники

Отличительной особенностью вирусов гриппа А, обуславливающей значительные трудности в профилактике и лечении вызываемых ими заболеваний, является их значительная изменчивость за счёт антигенного дрейфа, антигенного шифта и рекомбинации (Соболев И.А., Курская О.Г., Шаршов К.А., Прокопьева Е.А., Алексеев А.Ю., Гаджиев А.А., Шестопапов А.М. Изменчивость вируса гриппа типа А // *Юг России: экология, развитие*. 2016. Т. 11. N1. С. 170-177). Учитывая то, что заболеваемость гриппом вызывает ряд проблем социального и экономического характера: значительную смертность в группах риска, резкое повышение нагрузки на персонал учреждений системы здравоохранения и снижение трудовых ресурсов, терапия вирусов гриппа А требует разработки лекарственных средств, эффективных против постоянно мутирующего патогена.

Для сополимеров N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина из уровня техники известны различные виды биологической активности. В патенте RU2000004 (опубл. 15.02.1993) раскрыты сополимеры N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина со средневязкостной молекулярной массой в диапазоне 29-45 кДа, содержащие 25-40 мольн.% 2-метил-5-винилпиридиновых звеньев, обладающие иммуностимулирующим действием, а также пролонгирующим действием при введении антибиотиков.

Позднее, в патенте RU2446824 (опубл. 10.04.2012) была предложена вакцина против вируса гриппа, включающая соединение очищенных антигенов вирусов гриппа с полимерным носителем, представляющим собой указанный сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона в соотношении 1:5-30. Как следует из описания изобретения, данный сополимер применяют в качестве иммуностимулирующего адьюванта.

В патенте RU2015993 (опубл. 15.07.1994) раскрыто получение группы сополимеров

со средневязкостной молекулярной массой 40 кДа, аналогичных описанным в публикации RU2000004, в которых среднестатистическое число 2-метил-5-винилпиридиновых (МВП) звеньев n равно 35. На мышиной и крысиной моделях показано их противоопухолевое действие в отношении саркомы Иенсена карциносаркоме Уокера, саркомы М-1, саркомы 35 аденокарциномы толстого кишечника АКАТОЛ.

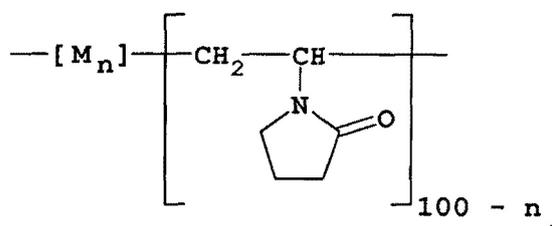
Из описания изобретения к патенту RU2662089 (опубл. 21.06.2017) известны варианты фармацевтической композиции для профилактики вируса гриппа и ОРВИ в виде раствора для местного применения в виде капель назальных или спрея назального, содержащая аминокaproновую кислоту и сополимер 2-метил-5-винилпиридина с N-винилпирролидоном, раскрытый в патенте RU2015993, компоненты фосфатно-буферного раствора, консервант, такой как натрия бензоат и/или бензалкония хлорид загуститель, такой как смесь микрокристаллической целлюлозы и натрия карбоксиметилцеллюлозы, и/или метилцеллюлоза, и/или макрогол 400, и/или твин-80, и/или декстран, и/или пропиленгликоль, и очищенную воду, при следующих соотношениях компонентов, мас. %:

аминокапроновая кислота	0,1-5
сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона	0,1-1
компоненты фосфатно-буферного раствора	0,5-1,5
загуститель	0,5-3
консервант	0,05-1,5
вода очищенная	до 100

В патенте RU2669810 (опубл. 16.10.2018) раскрыта противовирусная и иммуномодулирующая комбинация аминокaproновой кислоты и сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона, взятых в соотношении 1:0,5 масс. %, пригодная для лечения вируса гриппа типа А.

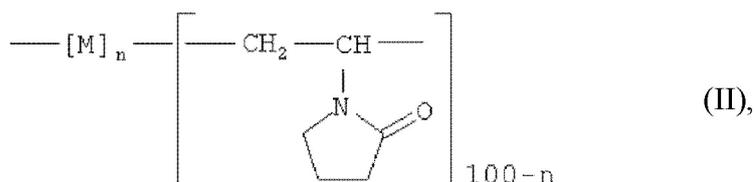
Известно, что аминокaproновая кислота, являющаяся синтетическим аналогом лизина, помимо гемостатического действия, используется для профилактики и лечения гриппа и острых респираторных вирусных инфекций, создавая барьер для вирусов, эффективно блокируя проникновение возбудителей в клетки носоглотки и легких (Serkedjieva J., Nikolova E., Kirilov N. Synergistic inhibition of Influenza A virus replication by a plant polyphenol-rich extract and ϵ -aminocaproic acid in vitro and in vivo // *Acta Virologica*. 2010. Vol. 54(2). Pp. 137-145).

В патенте RU2415876 (опубл. 10.04.2011) раскрыты сополимеры на основе N-винилпирролидона, представленные общей формулой:

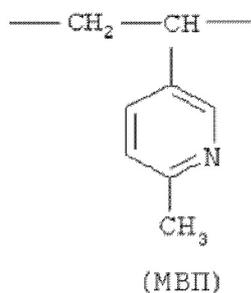


где мономерное звено М представляет, в частности, фрагмент МВП, содержание мономерных звеньев n составляет 25-90 мол. %, а средневязкостная молекулярная масса сополимера $M_{ц}$ равна 46-150 кДа, пригодные для применения в качестве адьювантов при изготовлении вакцин.

В патенте RU2430932 (опубл. 10.10.2011) раскрыто применение сополимера на основе N-винилпирролидона, представленного общей формулой (II):



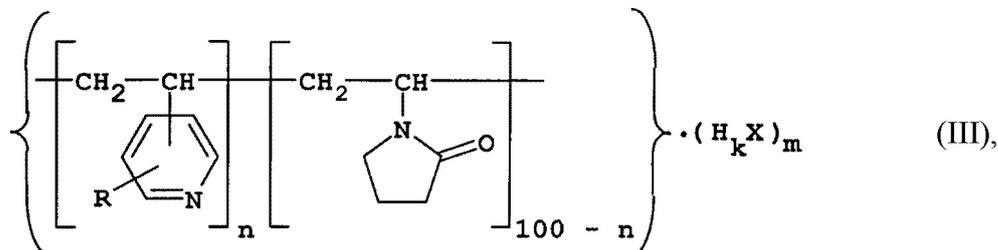
где мономерное звено М представляет, в частности, фрагмент МВП:



и содержание мономерных звеньев n составляет 25-50 мол. %, а средневязкостная молекулярная масса $M_{\text{ц}}$ равна 15-28 кДа в качестве активатора продуцирования интерлейкина-1 α (IL-1 α) и интерейкина-1 β (IL-1 β) или в качестве противоракового агента против рака печени, почек, мочевого пузыря, костного мозга и молочной железы.

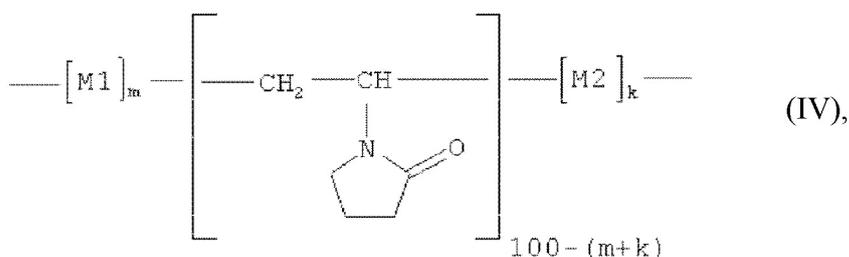
В патенте RU2430933 (опубл. 10.10.2011) предложено применение того же сополимера на основе N-винилпирролидона (II) в качестве активатора фагоцитоза, подтверждённое на модели перитонеальных макрофагов в присутствии суспензии коллоидной туши.

В ходе дальнейших разработок, представленных в патенте RU2533113 (опубл. 20.11.2014) было показано, что сополимер на основе N-винилпирролидона в форме фармацевтически приемлемых аддитивных солей кислот, представленный общей формулой (III):



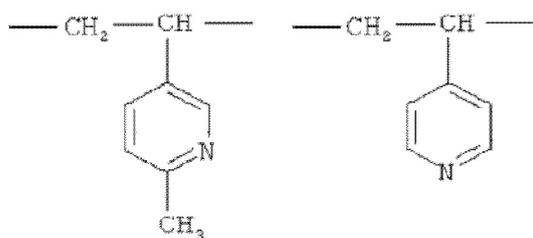
отличающийся тем, что R обозначает водород или метил; содержание мономерных звеньев n составляет 25-90 мол. %; X обозначает анион фармацевтически приемлемой неорганической или органической кислоты, такой как гидрохлорид, ацетат, сукцинат или цитрат; k равно 1 или 2; m принимает значения от 0,1 до 1,0; и средневязкостная молекулярная масса сополимера $M_{\text{ц}}$ равна 15-150 кДа полезен в качестве активаторов продуцирования IL-1 α и IL-1 β , а также активаторов фагоцитоза, при этом указанные соли на 20-35 % эффективнее соединений, раскрытых в публикации RU 2430932.

В патенте RU2459838 (опубл. 05.10.2011) раскрыт сополимер на основе N-винилпирролидона, представленный общей формулой (IV):



где мономерное звено M1 представляет фрагмент МВП, а мономерное звено M2

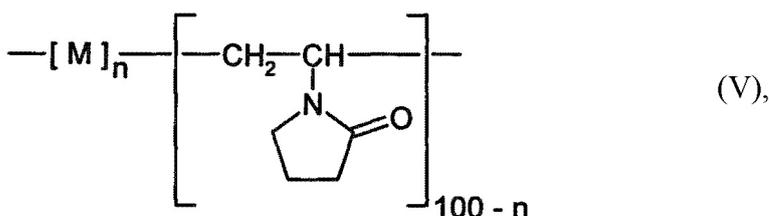
представляет фрагмент 4-винилпиридина (ВП):



M1, (МВП) M2, (ВП)

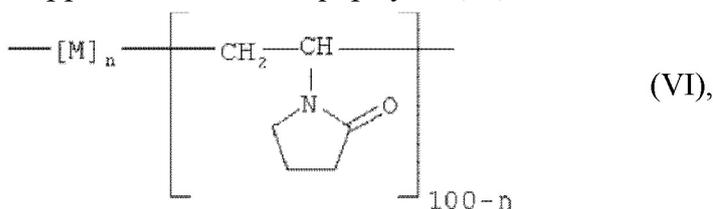
содержание мономерных звеньев M1 и M2 (m+k) составляет 20-90 мол.%, при этом доля мономерных звеньев M2 (k) составляет 0,05(m+k)-0,30(m+k), а средневязкостная молекулярная масса $M_{\text{ц}}$ сополимера $M_{\text{ц}}$ равна 15-250 кДа. Указанные тройные сополимеры предложены для применения в качестве активатора продуцирования интерлейкина-1 α и интерейкина-1 β , агента против рака печени, почек, мочевого пузыря, костного мозга и молочной железы, активатора фагоцитоза и адьюванта при изготовлении вакцины против гриппа.

В патенте RU2727935 (опубл. 20.07.2020) раскрыто лекарственное средство в твёрдой лекарственной форме, предназначенное для лечения тканевых гельминтозов, выбранных из эхинококкоза и альвеококкоза, содержащее в качестве действующего вещества 35-65 мас.% сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина формулы (V)



где мономерное звено M представляет фрагмент МВП с содержанием мономерных звеньев n в пределах 30-38 мол. % и средневязкостной молекулярной массой $M_{\text{ц}}$ в пределах 15-28 кДа, а также фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества: а) 55-33,5 мас. % наполнителя и связующего, такого как лактозы моногидрат, микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ), двухосновного кальция фосфата дигидрат, изомальт, маннит, сахароза, крахмал, декстраны, циклодекстраны и б) 10-1,5 мас. % скользящего, такого как кремния диоксид коллоидный, натрия стеарилфумарат, тальк, кислота стеариновая.

В патенте RU2471491 (опубл. 10.01.2013) указано, что сополимер на основе N-винилпирролидона общей формулы (VI):



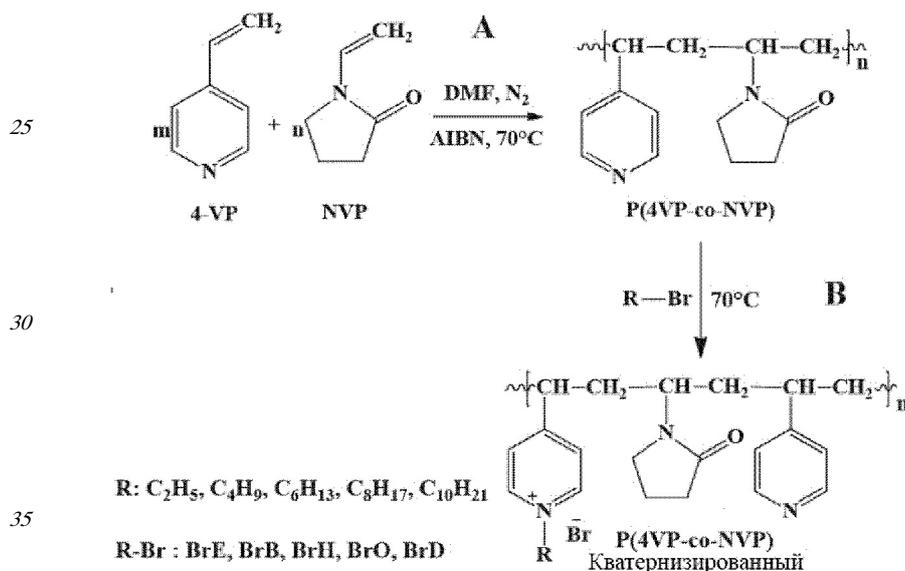
где мономерное звено M представляет фрагмент МВП и содержание мономерных звеньев n составляет 25-90 мол.%, а средневязкостная молекулярная масса $M_{\text{ц}}$ сополимера равна 46-150 кДа, применяемый в дозе от 200 до 2000 мкг/кг может быть полезен в качестве средства, потенцирующего анальгетический эффект морфина гидрохлорида, что, по результатам исследований на модели погружения хвоста крыс в горячую воду, позволяет двукратно снизить дозу лекарственного средства при

сохранении уровня анальгезии.

Все перечисленные сополимеры на основе N-винилпирролидона, содержащие фрагменты 2-метил-5-винилпиридина, рассматриваются авторами данного изобретения как его ближайшие аналоги. Однако, по мнению авторов изобретения, средний специалист в области фармакологии и/или вирусологии на основании уровня техники, раскрытого в настоящем описании, в рамках доступного ему общего уровня знаний не способен предположить наличие противовирусных свойств у известных сополимеров, а, тем более, у их химических производных.

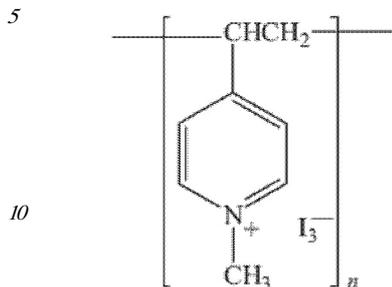
Кроме того, главным недостатком перечисленных сополимеров является малая растворимость в слабокислых и нейтральных водных средах (рН 6-7), что затрудняет их эффективное применение при изготовлении инъекционных лекарственных форм. При этом растворимость сополимеров в таких средах при постоянстве их средневязкостной молекулярной массы довольно резко уменьшается с увеличением доли 2-метил-5-винилпиридиновых фрагментов. В результате в слабокислых и нейтральных водных растворах для сополимеров, содержащих свыше 55 мольн. % фрагментов МВП, не достигаются эффективные концентрации.

В публикации Gokkaya D., Topuzogullari M., Arasoglu T., Trabzon K., Ozmen M.M., Abdurrahmanoğlu S. Antibacterial properties of cationic copolymers as a function of pendant alkyl chain length and degree of quaternization // *Polym. Int.* Vol. 70(6). (2021) Pp. 829-836 приведена схема получения поли(N-алкил-4-винилпиридиний) бромидов, в которых алкильный заместитель содержит 2, 4, 6, 8 или 10 атомов углерода (k):



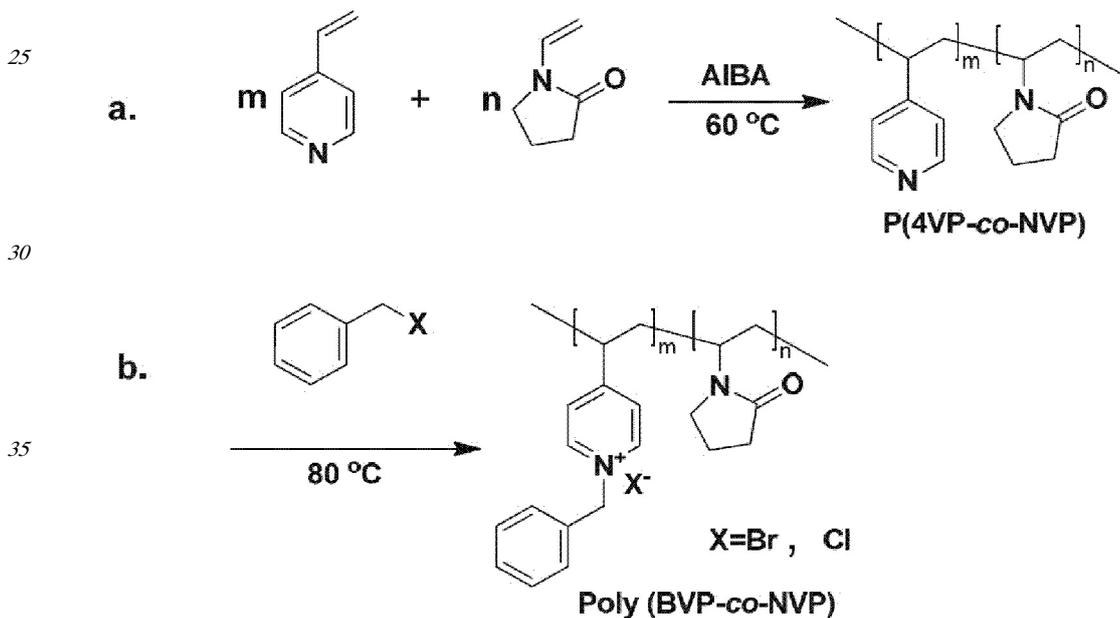
В случае поли(N-этил-4-винилпиридиний) бромиды, степень кватернизации (Q) зависит от мольного соотношения n_{AA}/n_{4VP} алкилирующего агента (AA) и звеньев 4-винилпиридина (4VP) и возрастает от 20 до 60 % при увеличении значения n_{AA}/n_{4VP} от 0,1 до 5,0. Также рассмотрено влияние Q и числа атомов углерода в алкильной цепи на минимальную концентрацию (МИС), ингибирующую рост колоний *E.coli*, оцененную методом серийных разбавлений на микропланшетах. Установлено, что для k=2, 4 и 6 зависимость МИС от Q имеет явно выраженный симметричный экстремальный характер с минимумом в центре. Так, для поли(N-этил-4-винилпиридиний) бромиды наименьшее значение МИС, равное 384 мкг/мл, достигается при Q, равной 40 %, а при 20 и 60 % составляет 1024 мкг/мл. Сведений о противовирусном действии таких сополимеров публикация не содержит.

В результате исследований, представленных в публикации Chernov'yants M.S., Burykin I.V., Pisanov R.V., Shalu O.A. Synthesis and Antimicrobial Activity of Poly(N-methyl-4-vinylpyridiniumtriiodide) // *Pharm. Chem. J.* Vol. 44. No. 2 (2010). Pp. 61-63, было установлено, что комплекс гомополимера со структурой элементарного звена следующего строения



проявляет антибактериальное действие, главным образом, за счёт присутствием в нём активного иода, который, образуя иодамины, инактивирует бактериальные ферменты, разрушает бактериальные стенки, что приводит к гибели микроорганизмов. Минимальная ингибирующая концентрация находится на уровне 0,25 мг/мл для *E.coli* и *S.aureus* и 1 мг/мл для *V.cholerae*. Оценок молекулярной массы полимера в публикации не приведено, однако, указание на его нерастворимость в водных средах позволяет предположить, что масса имеет порядок сотен килодальтон.

В публикации Xue Y., Xiao H. Antibacterial/antiviral property and mechanism of dual-functional quaternized pyridinium-type copolymer // *Polymers*.2015. Vol. 7(11). Pp. 2290-2303 дана схема получения поли(N-бензил-4-винилпиридиний)галогенидов, а именно хлоридов и бромидов:



В соответствии с заданными мольными содержаниями N-винилпиридина (4VP), равными 10, 30 и 50 мол. %, по данным ^1H ЯМР-спектроскопии в CDCl_3 и УФ-спектроскопии при 255 нм в этаноле были получены сополимеры, по существу, с теми же стехиометрическими содержаниями звеньев 4VP.

Вне зависимости от мольного содержания звеньев 4VP эффективность кватернизации (Q) поли(N-бензил-4-винилпиридиний)галогенидов, вычисленная по результатам титрования

$$Q(\%) = \frac{cV}{m} \times \frac{nM_{4VP} + (1-n)M_{NVP}}{n},$$

где c - концентрация раствора поливинилсульфата калия (анионный полиэлектролит-титрант), мг/мл;

V - объём раствора титранта в конечной точке титрования, мл;

m - масса катионного сополимера, г;

n - содержание звеньев 4VP, мол. %;

M_{4VP} и M_{NVP} - молярные массы 4VP и NVP, г/моль,

составляет 90-97 мол. % для бензилхлорида и 80-95 мол. % для бензилбромидов. В обоих случаях молекулярные массы, определённые методом гель-проникающей хроматографии, находятся в пределах 93-98 кДа.

Антибактериальная эффективность, оцениваемая минимальной концентрацией (МИС), ингибирующей рост *E.coli* и *S.aureus*, для поли(N-бензил-4-винилпиридиний)бромидов практически линейно убывает с ростом плотности заряда (CD):

$$CD(\text{моль экв./г}) = \frac{cV}{m}$$

от 200 до 20 и от 60 до 10 мкг/мл соответственно. Для поли(N-бензил-4-винилпиридиний)хлоридов соответствующие интервалы ограничены значениями от 200 до 60 и от 80 до 20 мкг/мл.

В публикации отмечено, что получаемые поливинилпирролидон-ко-пиридиниевые соединения обладают высокой противовирусной активностью в отношении вируса гриппа. Опираясь на результаты анализа структуры оболочечного вируса, был сделан вывод, что противовирусный механизм полученных полимеров подобен механизму их антибактериального действия: за счёт сильной адсорбции поликатионы закрепляются на поверхности липидной оболочки вируса, дезорганизуют и серьезно повреждают её, что приводит к потере вирусного генома и последующей инактивации вируса.

Противовирусная эффективность поли(N-бензил-4-винилпиридиний)галогенидов не зависит от природы аниона и для концентраций 10, 25 и 50 мкг/мл оценивается значениями 30, 50 и 90 %, однако оценок токсичности вводимых соединений в публикации не приведено.

Совокупность рассмотренных публикаций не даёт оснований среднему специалисту в области вирусологии предположить сохранение противовирусной активности в отношении вирусов гриппа А при переходе от жирно-ароматического (бензил) к алифатическому (метил) кватернизирующему заместителю.

Таким образом, в связи со способностью вирусов гриппа типа А постоянно мутировать, что обуславливает их резистентность ко многим противовирусным препаратам, существует потребность в эффективных средствах лечения указанной инфекции, обладающих малой токсичностью и хорошей растворимостью в водных средах, близких к нейтральным.

Описание изобретения

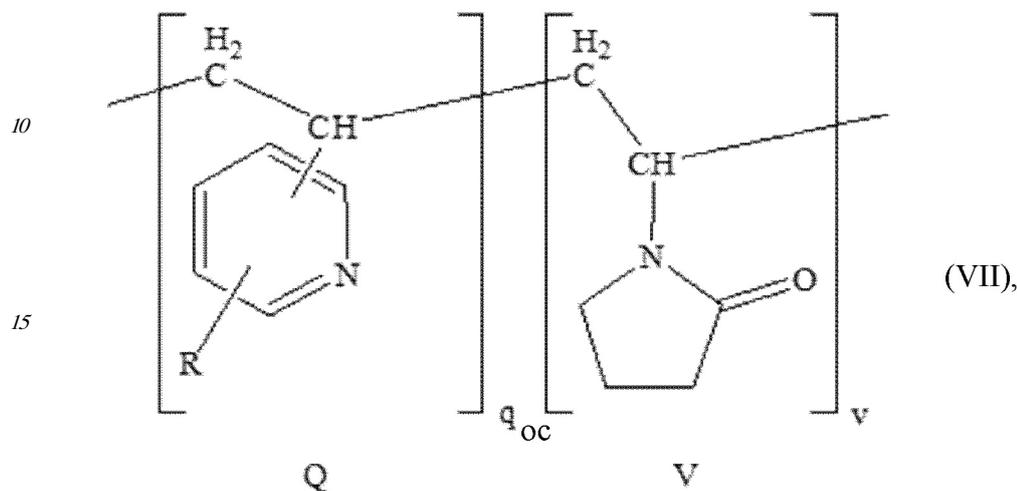
Целью данного изобретения является расширение арсенала средств, обладающих противовирусным действием против различных штаммов вируса гриппа типа А.

Первым техническим результатом изобретения является придание сополимерам на основе N-винилпирролидона и необязательно метилированных винилпиридинов противовирусных свойств в отношении вируса гриппа типа А.

Вторым техническим результатом изобретения является повышение растворимости предлагаемых сополимеров в водных слабокислых и нейтральных средах по сравнению

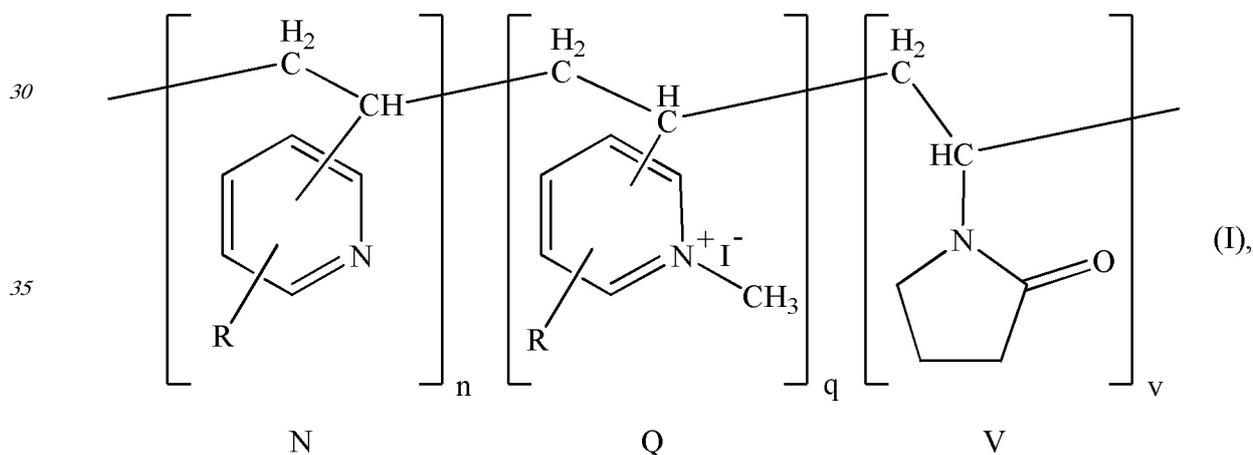
со структурно аналогичными сополимерами, известными из уровня техники.

В результате проведённых исследований авторы изобретения установили, что недостаток известного уровня техники, заключающийся в отсутствии противовирусной активности и малой растворимости в практически нейтральных водных средах, может
5 быть преодолён частичной метилкватернизацией метилиодидом пиридиновых заместителей в исходном основании сополимера общей формулы (VII):



20 для которого средневязкостная молекулярная масса M_{μ} равна 15 - 150 кДа, содержание q_{oc} мономерных звеньев Q составляет 25 - 90 мол. %, содержание v мономерных звеньев V составляет 75 - 10 мол. % при условии, что $q_{oc}+v=100$ мол. %, а R обозначает водород или метил.

25 Таким образом, в соответствии с изобретением предложен сополимер N-винилпирролдона и необязательно С-метилированного винилпиридина, представленный общей формулой (I):



40 в котором пиридиновые фрагменты частично метилкватернизированы метилиодидом, R обозначает водород или метил, содержание n мономерных звеньев N составляет 5 - 85 мол. %, содержание q мономерных звеньев Q составляет 5 - 85 мол. %, содержание v мономерных звеньев V составляет 10 - 75 мол. % при условии, что $25 \text{ моль. \%} \leq q+n \leq 90 \text{ мол. \%}$ и $v+n+q=100$ мол. %, и средневязкостная молекулярная масса M_{μ} равна 16-302 кДа: и сополимер общей формулы (I) обладает противовирусной активностью против штамма H3N2 вируса гриппа типа А.

Специалисту в области полимеров очевидно, что общие формулы (I) и (VII) являются условными и отражают исключительно структуру и вид связей звеньев, но не порядок их чередования.

5 Сомомеры, соответствующими звеньям Q, выбраны из незамещённых винилпиридинов, таких как 2-винилпиридин или 4-винилпиридин, или C-метилированных винилпиридинов, таких как 2-метил-5-винилпиридин, 3-метил-5-винилпиридин, 4-метил-2-винилпиридин, 6-метил-2-винилпиридина или 4-метил-3-винилпиридин.

10 Неожиданно было обнаружено, что, в отличие от известного из уровня техники исходного основания сополимера формулы (VII), структурно соответствующий ему предлагаемый частично метилкватернизированный метилиодидом сополимер общей формулы (I) обладает противовирусной активностью в отношении вируса гриппа типа А, в частности - штамма H3N2, не связанной с активацией иммунной системы организма человека или животного. Поэтому любой частично метилкватернизированный метилиодидом сополимер в соответствии с изобретением можно рассматривать в качестве потенциально фармацевтически активного вещества для изготовления противовирусных препаратов медицинского или ветеринарного назначения.

Предлагаемый частично метилкватернизированный метилиодидом сополимер формулы (I) получают радикальной сополимеризацией N-винилпирролидона (N-ВП) 20 и любого из незамещённых (НВП) или замещённых (ЗВП) коммерчески доступных винилпиридинов, который выбран из 2-винилпиридина (CAS 100-69-6), 4-винилпиридина (CAS 100-43-6), 2-метил-5-винилпиридина (CAS 140-76-1), 3-метил-5-винилпиридина (CAS 51961-51-4), 4-метил-2-винилпиридина (CAS 13959-34-7), 6-метил-2-винилпиридина (CAS 1122-70-9), а также 4-метил-3-винилпиридина в присутствии инициатора 25 полимеризации, например, динитрила азобис-изомасляной кислоты (ДАК), и агента обрыва цепи, выбранного из пероксида водорода и циклогексана, с получением основания сополимера формулы (VII), которое выделяют и вводят в реакцию с метилиодидом, взятым в виде раствора или в виде индивидуального вещества.

Ввиду большого различия в константах скоростей сополимеризации N-ВП и НВП 30 или ЗВП, последние сомомеры быстро расходуются в ходе реакции. Поэтому заданный состав сополимера обеспечивается поддержанием постоянного соотношения сомономеров путем компенсации расхода более реакционноспособных мономеров добавлением смеси, содержащей такие мономеры и агенты обрыва цепи. Состав и объем указанной смеси вычисляют каждые 20 минут по результатам определения соотношения 35 концентраций N-ВП и НВП (N-ВП и ЗВП) в реакционной смеси, например, методом ВЭЖХ. Реакцию сополимеризации проводят при температуре 60-70 °С. По достижении степени конверсии по мономерам в интервале 0,15-0,30 реакционную массу охлаждают до 20 °С.

40 Перед взаимодействием с метилиодидом основание сополимера формулы (VII) предпочтительно выделяют осаждением диэтиловым эфиром (ДЭ), отфильтровывают и удаляют растворитель предпочтительно при пониженном давлении и температуре 20-80 °С.

Полученное основание сополимера формулы (VII) характеризуют содержанием пиридиновых звеньев, которое определяют неводным титрованием раствором хлорной 45 кислотой в ледяной уксусной кислоте. Это необходимо для расчёта количества метилиодида, которое следует прибавить для N-метилирования звеньев НВП или ЗВП основания сополимера. Общая методика такого титрования известна среднему специалисту в области аналитической химии и может быть адаптирована им для каждого

варианта осуществления изобретения.

Полученное основание сополимера формулы (VII) также характеризуют средневязкостной молекулярной массой M_{μ} , которую вычисляют по его характеристической вязкости μ . Выбор методики, оборудования и подбор условий измерения вязкости является рутинной процедурой, доступной среднему специалисту в данной области. В предпочтительном варианте осуществления характеристическую вязкость определяют в растворителе, состоящем из 85 об. % ДМФА и 15 об. % 0,1 М водного раствора LiBr.

Было установлено, что атомы азота пиридиновых фрагментов любого из оснований сополимеров формулы (VII) обладают достаточной реакционной способностью для образования частично метилкватернизованного метилиодидом сополимера формулы (I).

Метилкватернизацию основания сополимера формулы (VII) можно осуществлять введением метилиодида в водный, органический или водно-органический раствор основания сополимера формулы (VII). Органический растворитель является безводным и может быть выбран из метанола, этанола, 2-пропанола, 1-пропанола, ацетона, хлороформа, метилхлорида или их смеси. Водно-органический растворитель может содержать метанол, этанол, изопропанол или их смесь в сопоставимой с водой объёмной доле.

Расчет необходимого количества n_{MeI} метилиодида (моль) осуществляют на основании массы $m_{(VII)}$ основания сополимера (г) формулы (VII), взятого для метилкватернизации, и его мономерного состава, определенного по результатам титрования, и целевого содержания метилкватернизованных метилиодидом звеньев q в сополимере формулы (I) по формуле:

$$n_{MeI} = k \cdot \left[\frac{m_{(VII)}}{(x/100 \cdot M_Q + (100 - x)/100 \cdot M_V)} \right] =$$

$$= q/q_{oc} \cdot \left[\frac{m_{(VII)}}{[(q_{oc} \cdot M_Q / (q_{oc} \cdot M_Q + v \cdot M_V)) / 100 \cdot M_Q + (100 - q_{oc} \cdot M_Q / (q_{oc} \cdot M_Q + v \cdot M_V)) / 100 \cdot M_V]} \right],$$

где q_{oc} - содержание винилпиридиновых звеньев Q (мол. %) в сополимере (VII), M_Q - молярная масса винилпиридинового звена, равная 105,16 г/моль или метилвинилпиридинового звена, равная 119,16 г/моль, v - содержание винилпирролидоновых звеньев V (мол. %), M_V - молярная масса N-винилпирролидинового звена, равная 111,14 г/моль, k - доля кватернизации метилиодидом (выбирается в зависимости от целевого содержания в сополимере метилкватернизованных метилиодидом звеньев НВП или ЗВП в сополимере формулы (I) и определяется по формуле $k = q/q_{oc}$,

x -массовое содержание винилпиридиновых звеньев Q (масс. %) в сополимере формулы (VII), определяемое по формуле: $x = q_{oc} \cdot M_Q / (q_{oc} \cdot M_Q + v \cdot M_V)$

Число q метилкватернизованных метилиодидом звеньев НВП или ЗВП в сополимере формулы (I) предпочтительно вычисляют по результатам аргентометрического титрования иодид-аниона. Альтернативно, число q может быть вычислено по данным элементного анализа с учетом стехиометрии сополимера. В каждом случае расчётные зависимости могут быть выведены средним специалистом в

области аналитической химии исходя из общего уровня знаний.

Полученный частично кватернизированный сополимер метилиодидом также характеризуют средневязкостной молекулярной массой M_v .

Строение полученного продукта может быть определено по данным ЯМР-

5 спектроскопии, например, ^1H -, ^{13}C - или ^{15}N -ЯМР, по соотношениям интегральных интенсивностей сигналов определенных типов ядер, в частности - ядер атомов углерода циклоалифатических CH_2 -групп пирролидинового цикла и ароматических CH -групп пиридинового цикла и CH_3 -группы при атоме азота. Решение поставленной задачи доступно среднему специалисту в данной области также исходя из общего уровня

10 знаний.
Предлагаемые метилкватернизированные сополимеры формулы (I) обладают противовирусным действием в отношении вируса гриппа типа А, что подтверждают результатами исследований *in vitro* на примере его штамма H3N2

15 **Осуществление изобретения**

Достижение технического результата при осуществлении изобретения будет далее проиллюстрировано примерами, способствующими точному и полному пониманию его сути. Специалисту в каждой конкретной области очевидны возможные модификации и замены, например, относящиеся к протоколам исследований, которые не выходят за

20 рамки объема изобретения, определяемые его формулой.
Пример 1. Получение сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина (2-М-5-ВП) с частично метилкватернизированными метилиодидом 2-метилпиридиновыми звеньями.

1.1. Синтез основания сополимера формулы (VII).

25 В реактор загружают исходную реакционную смесь, содержащую 0,50 кг (480 мл) N-ВП, 134,4 г (140,8 мл) 2-М-5-ВП, 1,6 г (5,7 мл) 30 % водного раствора пероксида водорода, 109,2 г (140 мл) циклогексана и 35 г динитрила азо-бис-изомаляной кислоты (ДАК). Реакционную массу нагревают до 65-70 °С и в течение 5 часов ведут синтез при данной температуре, отбирая пробы для хроматографического анализа (ВЭЖХ,

30 Сферисорб С-18, 5 мкм, 4,6×250 мм, EtOH/H₂O 6:94, 2,5 мл/мин, 50 °С, 254 нм) с периодичностью 10-20 минут.
Расход сомономеров компенсируют подачей смеси, содержащей 75 г (72 мл) N-ВП, 57,3 г (55 мл) 2-М-5-ВП, 0,51 г (2,5 мл) 30 % водного раствора пероксида водорода и 7,5 г ДАК. По достижении степени конверсии по сомономерам от 20 до 25 мол. % реакционную массу охлаждают до 20 °С и выливают при перемешивании в 30 л

35 диэтилового эфира, оставляют при перемешивании на ночь, образовавшийся осадок выделяют фильтрацией и сушат сначала при атмосферном давлении при 40-60 °С, а затем - в вакуумном сушильном шкафу при 80-90 °С и остаточном давлении 1,3 кПа. Получают 167,4 г продукта со средневязкостной молекулярной массой 15 кДа и, по

40 данным неводного титрования 0,1 М раствором хлорной кислоты, с содержанием звеньев, соответствующих 2-М-5-ВП, равным 25 мольн. %.

1.2. Титрование основания сополимера формулы (II) в неводной среде.

Навеску порядка 2,0 г основания сополимера, взятую с точностью 0,0001 г, растворяют в 100 мл пропионового ангидрида и титруют потенциометрически 0,1 н.

45

раствором хлорной кислоты в ледяной уксусной кислоте. Объем титранта в точке эквивалентности определяют численным дифференцированием со сглаживанием зависимости $E(V)$.

Массовую долю (X) звеньев, соответствующих 2-М-5-ВП, вычисляют по формуле:

$$X=K \cdot 0,1 \cdot (V-V_0) \cdot M_Q / 1000 \cdot m,$$

где K - поправочный коэффициент к нормальности раствора хлорной кислоты,
 V - объём раствора хлорной кислоты (мл) в точке эквивалентности,
 V_0 - объём раствора хлорной кислоты (мл), израсходованный в холостом опыте,
 M_Q - молярная масса 2-метил-5-винилпиридина, равная 119,16 г/моль,
 m - масса навески (г) сополимера формулы (II).

Содержание звеньев, соответствующих 2-М-5-ВП, (q , мол. %) вычисляют по формуле:
 $q = M_Q \cdot X \cdot 100 / [M_V \cdot (1-X) + M_Q \cdot X]$,

где M_V - молярная масса N-винилпирролидона, равная 111,14 г/моль.

Объём V_{MeI} метилиодида (мл), необходимый для полной кватернизации основания сополимера, вычисляют по формуле:

$$V_{MeI} = M_{MeI} \cdot M / [M_V \cdot (1-q) + M_Q \cdot q] / d,$$

где M_{MeI} - молярная масса метилиодида, равная 141,94 г/моль,

M - масса (г) загрузки основания сополимера, формулы (II)

d - плотность метилиодида, равная 2,279 г/мл.

1.3. Частичная метилкватернизация основания сополимера (VII) в водном растворе

В 2,0 л дистиллированной воды при перемешивании растворяют 100,0 г полученного сополимера, содержащего 25 мол. % звеньев, соответствующих 2-М-5-ВП, добавляют рассчитанный объём (2,75 мл) метилиодида (CH_3I) и перемешивают в течение 24 часов.

Частично метилкватернизированный метилиодидом сополимер выделяют выпариванием при пониженном давлении (2 кПа), после чего высушивают до постоянной массы в вакуумном сушильном шкафу при 80-90 °С и остаточном давлении 1 кПа.

Получают 106,3 г частично метилкватернизированного сополимера общей формулы (I), в которой, по данным аргентометрического титрования, q имеет значение 5 мольн. %, и имеющего средневязкостную молекулярную массу 16,5 кДа.

1.4. Частичная метилкватернизация основания сополимера формулы (VII)

в неводном растворителе

В 500 мл безводного хлороформа растворяют 50,0 г полученного основания сополимера (VII), содержащего 25 мол. % звеньев, соответствующих 2-М-5-ВП, добавляют рассчитанный объём (1,4 мл) метилиодида (CH_3I) и перемешивают в течение 15 часов.

Полученный раствор выпаривают при пониженном давлении, твёрдое вещество высушивают как описано выше. Получают частично метилкватернизированный сополимер (53,1 г.) общей формулы (I), в которой, по данным аргентометрического титрования, q имеет значение 5 мольн. %, и имеющего средневязкостную молекулярную массу 16,5 кДа.

Примеры 2-6. Получение частично метилкватернизированных кватернизированных сополимеров N-винилпирролидона и других НВП или ЗВП (I).

Аналогично методике, раскрытой в примере 1 и используя указанные в таблице 1 количества веществ, получают следующие сополимеры на основе N-винилпирролидона в форме оснований (VII), которые далее подвергают частичной метилкватернизации метилиодидом.

Таблица 1

Пример	Исходная смесь					Подаваемая смесь			
	N-ВП, г	НВП (ЗВП), г	30% H_2O_2 , мл	ЦГ, мл	ДАК, г	N-ВП, г	НВП (ЗВП), г	30% H_2O_2 , мл	ДАК, г

			мл						
2	134,5	3-М-5-ВП 17,5	5,2	105	4,1	15,3	3-М-5-ВП 71,7	2,1	1,0
3	48,7	3-М-5-ВП 13,4	5,9	15	3,5	7,2	3-М-5-ВП 99,0	2,6	7,8
4	52,1	4-М-3-ВП 18,1	6,3	75	2,5	5,2	4-М-3-ВП 149,3	1,5	0,6
5	135,9	4-ВП 16,2	5,0	66,2	2,2	15,4	4-ВП 131,7	1,3	0,5
6	135,9	2-М-5-ВП 42	5,1	33,0	2,2	15,4	2-М-5-ВП 125	0,5	0,5
7	140	2-М-5-ВП 45	5,0	37,0	2,5	13,5	2-М-5-ВП 135,0	2,1	0,7
8	50,0	2-ВП 13,4	6,0	15	3,5	7,4	2-ВП 99,0	2,6	7,7
9	50,0	4-М-2-ВП 13,4	6,0	15	3,5	7,4	4-М-2-ВП 99,0	2,6	7,7
10	50,0	6-М-2-ВП 13,4	6,0	15	3,5	7,4	6-М-2-ВП 99,0	2,6	7,7

Выходы и характеристики сополимеров в форме оснований (VII) и полностью метилкватернизированных метилйодидом сополимеров (I), полученных в соответствии с изобретением, представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Пример	Выход основания сополимера, г	q _{ос} , %мол	v, %мол	M _ц , кДа
2	57,4	37	63	46
3	38,7	90	10	16
4	53,9	74	26	89
5	62,8	39	61	86
6	76,4	25	75	150
7	66,7	90	10	150
8	39,1	90	10	20
9	41,2	90	10	23
10	43,1	90	10	22

Таблица 3

Пример	Загрузка основания сополимера, г	Загрузка метилйодида, мл	Выход метилкватернизированного сополимера (МКС), г	q, %мол	M _ц , кДа
2	46,4	4,7	57,1	18,5	56,5
3	27,7	4,8	38,7	33	22,3
4	42,9	4,2	52,5	18,5	109
5	51,8	3,8	60,5	13	102
6	65,4	7,2	81,9	20	192
7	55,7	25,6	114,1	85	302
8	28,1	3,4	35,8	20	26
9	30,2	11,2	55,7	70	46
10	32,1	4,3	41,8	25	30

Пример 7. Оценка противовирусной активности частично метилкватернизированных метилйодидом сополимеров (I), полученных в соответствии с изобретением

7.1. Материалы и методы

Исследуемые образцы: частично метилкватернизированные метилйодидом сополимеры (МКС), полученный в соответствие с примерами 1-10.

Культура клеток: клетки почки собаки Madin-Darby Canine Kidney (MDCK, перевиваемые эпителиальные клетки).

Среда культивирования: среда Игла-МЕМ («ПанЭко», РФ) с добавлением 10 об. % ТЭС (HyClone, Thermo Scientific, США);

Конфлюэнтный монослой перевиваемой клеточной линии выращивают с добавлением ТЭС, L-глутамина и антибиотиков пенициллина и стрептомицина (по 100 ед/мл).

Штамм вируса гриппа типа А:Н3N2/Aichi/2/68, адаптированный к размножению на клеточных линиях MDCK (GenBank KC895864).

5 7.2. Оценка противовирусных свойств метилкватернизированных сополимеров

Образец полностью метилкватернизированного сополимера в исследуемых концентрациях инкубируют в течение 20 минут при температуре 25 °С с вирусом гриппа типа А с гемагглютинирующим титром 1:64 и инфекционным титром 4,0 lg TCID₅₀ после чего оценивают активность вируса в реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами по стандартной методике.

Противовирусное действие исследуемых образцов *in vitro* оценивают уровнем снижения накопления вируса (ΔА)

$$\Delta A = A_K - A_0,$$

15 где A_К и A₀ - логарифмические уровни (lg TCID₅₀) в контрольной и опытных группах, а также коэффициентом ингибирования (КИ, %):

$$КИ = \frac{A_K - A_0}{A_K} \cdot 100.$$

20 Результаты определения коэффициента ингибирования метилкватернизированными сополимерами, полученных в соответствии с примерами 1-10, представлены в таблицах 4.1-4.10

Таблица 4.1

МКС по примеру 1					
q, %моль	Мц, кДа	с(МКС), мг/мл	A	ΔA	КИ, %
5	16	2,47	0	4	100
		1,24	1	3	75
		0,49	2	2	50
		0,30	3	1	25
		Контроль, 0,00	4	0	0

30 Таблица 4.2

МКС по примеру 2					
q, %моль	Мц, кДа	с(МКС), мг/мл	A	ΔA	КИ, %
18,5	56,5	0,78	0	4	100
		0,39	1	3	75
		0,16	2	2	50
		0,09	3	1	25
		Контроль, 0,00	4	0	0

35 Таблица 4.3

МКС по примеру 3					
q, %моль	Мц, кДа	с(МКС), мг/мл	A	ΔA	КИ, %
33	22,3	0,51	0	4	100
		0,25	1	3	75
		0,10	2	2	50
		0,06	3	1	25
		Контроль, 0,00	4	0	0

40 Таблица 4.4

МКС по примеру 4					
------------------	--	--	--	--	--

q, %моль	Мц, кДа	с(МКС), мг/мл	А	ΔА	КИ, %
18,5	109	0,78	0	4	100
		0,39	1	3	75
		0,16	2	2	50
		0,09	3	1	25
		Контроль, 0,00	4	0	0

Таблица 4.5

МКС по примеру 5					
q, %моль	Мц, кДа	с(МКС), мг/мл	А	ΔА	КИ, %
13	102	1,05	0	4	100
		0,52	1	3	75
		0,21	2	2	50
		0,13	3	1	25
		Контроль, 0,00	4	0	0

Таблица 4.6

МКС по примеру 6					
q, %моль	Мц, кДа	с(МКС), мг/мл	А	ΔА	КИ, %
20	192	0,73	0	4	100
		0,37	1	3	75
		0,15	2	2	50
		0,09	3	1	25
		Контроль, 0,00	4	0	0

Таблица 4.7

МКС по примеру 7					
q, %моль	Мц, кДа	с(МКС), мг/мл	А	ΔА	КИ, %
85	337	0,29	0	4	100
		0,15	1	3	75
		0,06	2	2	50
		0,03	3	1	25
		Контроль, 0,00	4	0	0

Таблица 4.8

МКС по примеру 8					
q, %моль	Мц, кДа	с(МКС), мг/мл	А	ΔА	КИ, %
20	26	0,73	0	4	100
		0,37	1	3	75
		0,15	2	2	50
		0,09	3	1	25
		Контроль, 0,00	4	0	0

Таблица 4.9

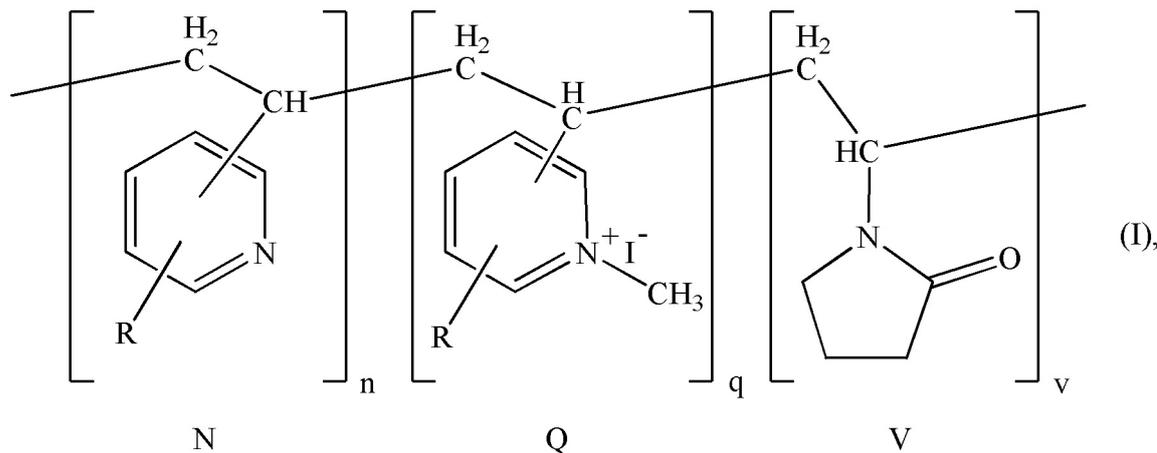
МКС по примеру 9					
q, %моль	Мц, кДа	с(МКС), мг/мл	А	ΔА	КИ, %
70	46	0,32	0	4	100
		0,16	1	3	75
		0,06	2	2	50
		0,04	3	1	25
		Контроль, 0,00	4	0	0

Таблица 4.10

МКС по примеру 10					
q, %моль	Мц, кДа	с(МКС), мг/мл	A	ΔA	КИ, %
25	30	0,62	0	4	100
		0,31	1	3	75
		0,12	2	2	50
		0,07	3	1	25
		Контроль, 0,00	4	0	0

(57) Формула изобретения

1. Сополимер N-винилпирролидона и незамещённого или замещённого винилпиридина, в котором пиридиновые фрагменты частично кватернизированы метилиодидом, представленный общей формулой (I):



где R обозначает водород или метил, содержание n мономерных звеньев N составляет 5-85 мол.%, содержание q мономерных звеньев Q составляет 5-85 мол.%, содержание v мономерных звеньев V составляет 10-75 мол.% при условии, что 25 мол.% ≤ q+n ≤ 90 мол.% и v + n + q = 100 мол.%, и средневязкостная молекулярная масса сополимера Мц равна 16-302 кДа.

2. Сополимер по п. 1, отличающийся тем, что мономерами, соответствующими звеньям N и Q, являются незамещённые винилпиридины, выбранные из 2-винилпиридина и 4-винилпиридина, или замещённые винилпиридины, выбранные из 2-метил-5-винилпиридина, 3-метил-5-винилпиридина, 4-метил-2-винилпиридина, 6-метил-2-винилпиридина и 4-метил-3-винилпиридина.