



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА

ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

A61K 31/787 (2006.01)*C08G 73/02* (2006.01)*C08F 8/06* (2006.01)*A61K 39/44* (2006.01)*A61K 47/48* (2006.01)*A61P 39/04* (2006.01)*A61P 39/06* (2006.01)*A61P 7/02* (2006.01)

(12) СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(21)(22) Заявка: 2010125861/15, 24.06.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.06.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.06.2010

(45) Опубликовано: 20.09.2011

(15) Информация о коррекции:

Версия коррекции № 1 (W1 C1)

(48) Коррекция опубликована:

27.12.2011 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: ПЛАТЭ Н.А., ВАСИЛЬЕВ А.Е.Физиологически активные полимеры. - М.:
Химия, 1986, с.12-204. RU 2073031 C1,
10.02.1997. SU 523908 A, 05.08.1976.

Адрес для переписки:

115478, Москва, Каширское ш., 24, корп.2,
ФГБУ ГНЦ "Институт Иммунологии"
ФМБА России, Т.П.Ивановой

(72) Автор(ы):

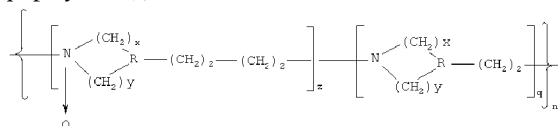
Некрасов Аркадий Васильевич (RU),
Пучкова Наталья Григорьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной
ответственностью "НПО ПЕТРОВАКС
ФАРМ" (RU)(54) СОПОЛИМЕРЫ ГЕТЕРОЦЕПНЫХ АЛИФАТИЧЕСКИХ ПОЛИ-N-ОКСИДОВ,
ВАКЦИНИРУЮЩИЕ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА НА ИХ ОСНОВЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к новым высокомолекулярным соединениям, обладающим биологической активностью. Сополимеры гетероцепных алифатических поли-N-оксидов описываются общей формулой (I):



где R=N, CH; x=2-4; y=0, 2; n=10-1000; q=(0,1-0,9)n; z=(0,1-0,9)n. Сополимеры обладают антиоксидантным действием, терапевтическим действием в качестве детоксиканта и

иммуномодулирующего агента. Сополимеры формулы (I) могут быть использованы в качестве иммуномодулирующего носителя для получения вакцинирующего средства и в качестве носителя лекарственных веществ для получения лекарственных средств. Сополимеры гетероцепных алифатических поли-N-оксидов представляют собой новый класс соединений, обладающих широким спектром фармакологического и вакцинирующего действия, направленных на повышение безопасности в применении, а также на повышение технологичности, экономичности и экологической безопасности производства лекарственных препаратов. 5 н. и 15 з.п. ф-лы, 2 ил., 13 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/787 (2006.01)
C08G 73/02 (2006.01)
C08F 8/06 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 39/04 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

Note: Bibliography reflects the latest situation

(21)(22) Application: 2010125861/15, 24.06.2010

(24) Effective date for property rights:
24.06.2010

Priority:

(22) Date of filing: 24.06.2010

(45) Date of publication: 20.09.2011

(15) Correction information:
Corrected version no 1 (W1 C1)

(48) Corrigendum issued on:
27.12.2011 Bull. 36

Mail address:

115478, Moskva, Kashirskoe sh., 24, korp.2,
FGBU GNTs "Institut Immunologii" FMBA Rossii,
T.P.Ivanovoj

(72) Inventor(s):

Nekrasov Arkadij Vasil'evich (RU),
Puchkova Natal'ja Grigor'evna (RU)

(73) Proprietor(s):

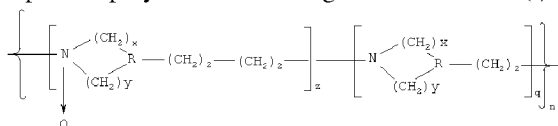
Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"NPO PETROVAKS FARM" (RU)

(54) **COPOLYMERS OF HETERO-CHAIN ALIPHATIC POLY-N-OXIDES, BASED ON THEM VACCINATING AND MEDICINAL PREPARATIONS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: copolymers of hetero-chain aliphatic poly-N-oxides of general formula (I)



, where R=N, CH; x=2-4; y=0, 2; n=10-1000; q=(0.1-0.9)n; z=(0.1-0.9)n. Copolymers possess anti-oxidant action, therapeutic action as detoxicant and

immunomodelling agent. Copolymers of formula (I) can be used as immunomodulating carrier for obtaining vaccinating medication and as carrier of medications for obtaining medications.

EFFECT: copolymers of hetero-chain aliphatic poly-N-oxides represent novel class of compounds possessing wide spectrum of pharmacological and vaccinating action, aimed at increase of safety in application, increase of technological and economical effectiveness and ecological safety of production of medications.

20 cl, 2 dwg, 13 tbl, 22 ex

RU 2 428 991 C9

RU 2 428 991 C9

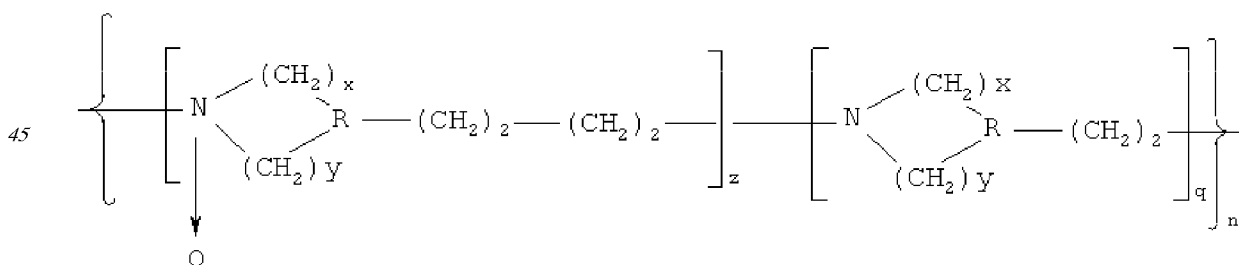
Изобретение относится к области синтеза новых высокомолекулярных химических соединений, обладающих биологической активностью, и может быть использовано при производстве высокоэффективных фармакологических препаратов и вакцин.

Известны синтетические полимеры, обладающие физиологической активностью, например, гомо- и сополимеры акриловой и метакриловой кислот, сополимеры N-винилпирролидона с акриловой и кротоновой кислотами, акролеином, виниламином, малеиновым ангидридом и другими виниловыми мономерами (Полимеры в медицине, перевод с англ. под ред. Платэ Н.А., М., 1969, стр.38-76). Известны также некоторые водорастворимые производные карбоцепных полимеров (Платэ Н.А., Васильев А.Е., «Физиологически активные полимеры», М., Химия, 1986, стр.12-204; «Полимеры медицинского назначения», под ред. Сэноо Маноу, пер. с яп., М., 1981, 248 стр.), содержащие азот в боковой цепи макромолекулы, такие, как поливинилпиридины или поливинилтриазолы. Все вышеупомянутые соединения токсичны и не находят широкого применения в качестве фармакологических препаратов. Кроме того, карбоцепные полимеры не распадаются в организме на низкомолекулярные соединения, накапливаются и вызывают нежелательные побочные эффекты.

Наиболее близкими соединениями по биологическому действию и химической сущности к описываемому изобретению являются производные поли 1,4-этиленпиперазина (патент РФ №2073031, МКИ C08G 73/02, опублик. 1997 г.). Известные соединения характеризуются широким спектром фармакологического действия и успешно находят применение в качестве носителей вакцинных антигенов или лекарственных препаратов, а также в комплексной терапии заболеваний, сопровождающихся иммунодефицитными состояниями. В то же время наличие ионогенных групп в этих соединениях уменьшают скорость деструкции и выведения их из организма, что ограничивает их применение для внутривенного введения в качестве детоксиканта при необходимости быстрого выведения высокотоксичных соединений. Кроме того, технология получения известных соединений предполагает многоэтапный процесс, связанный с высоким расходом дорогостоящих химических реактивов, требующий значительных энергетических мощностей и трудовых затрат.

Технический результат настоящего изобретения состоит в создании нового класса соединений, обладающих широким спектром фармакологического и вакцинирующего действия, обладающих выраженными антиоксидантными и детоксикационными свойствами и безопасных в применении, а также в повышении технологичности, экономичности и экологической безопасности производства лекарственных препаратов.

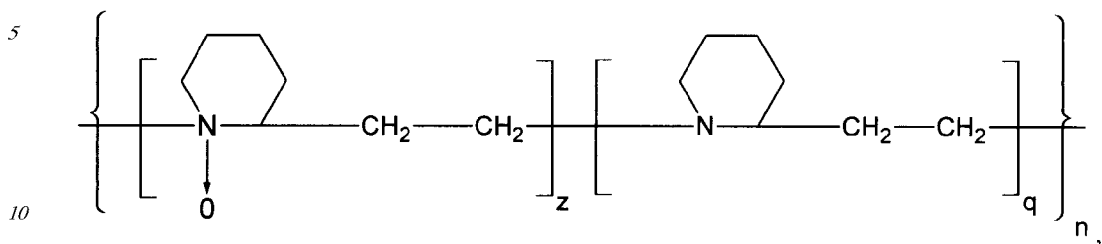
Указанный технический результат достигается соединениями, представляющими собой сополимеры гетероцепных алифатических поли-N-оксидов общей формулы (I):



где R=N, CH;
 $x=2-4$; $y=0, 2$; $n=10-1000$; $q=(0,1-0,9)n$; $z=(0,1-0,9)n$,
 обладающими фармакологической активностью.

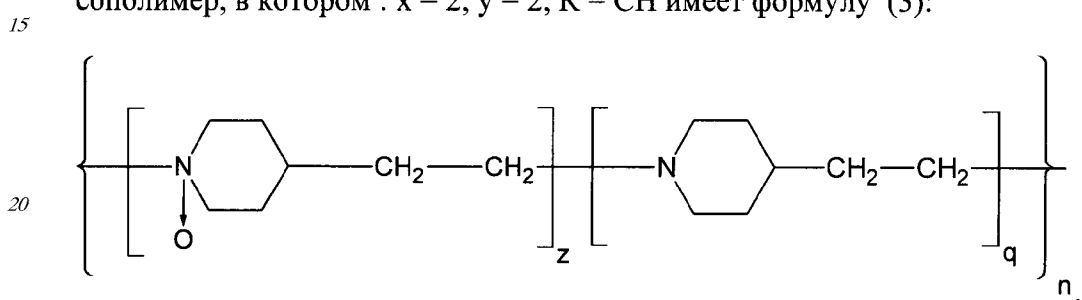
При этом:

сополимер, в котором $x = 4, y = 0, R = CH$ имеет формулу (2)



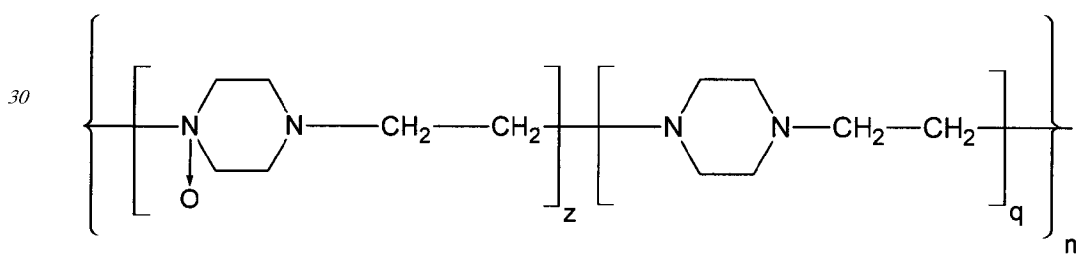
является сополимером конидина и N-оксида конидина.

сополимер, в котором $x = 2, y = 2, R = CH$ имеет формулу (3):



является сополимером хинуклидина и N-оксида хинуклидина.

сополимер, в котором $x = 2, y = 2, R = N$ имеет формулу (4)



является сополимером триэтилендиамина и N-оксида триэтилендиамина.

Сополимер формулы 1 обладает антиоксидантным действием.

Сополимер формулы 1 обладает терапевтическим действием и может представлять собой детоксикант.

Сополимер формулы 1 обладает терапевтическим действием и может представлять собой иммуномодулирующий агент.

Сополимер формулы 1 может быть иммуноадьювантом.

Сополимер формулы 1 может быть иммуномодулирующим носителем антигена или носителем лекарственного вещества.

Указанный технический результат достигается также тем, что вакцинирующее средство, включающее антиген и иммуномодулирующий носитель, содержит в качестве иммуномодулирующего носителя сополимер формулы 1.

При этом вакцинирующее средство может представлять собой конъюгат антигена с сополимером по п. 1 при наличии в структуре антигена реакционноспособных функциональных групп.

Вакцинирующее средство может представлять собой соединение, полученное в результате реакции комплексообразования антигена с сополимером формулы 1.

Вакцинирующее средство может представлять собой композицию, полученную в результате смешивания антигена с сополимером формулы 1.

Указанный технический результат достигается также тем, что вакцина против гепатита «А» и гепатита «В» характеризуется тем, что она содержит вакцинный препарат, включающий одновременно АГ ВГА и НВsAg или вакцинные препараты против гепатита А и против гепатита В и сополимер гетероцепных алифатических поли-N-оксидов по п.1.

При этом вакцина против гепатита «А» и гепатита «В» может содержать в качестве АГ ВГА антигены, полученные из штамма ЛБА-86 вируса гепатита А в культуре перевиваемых клеток 4647, а содержание компонентов в дозе составляет

АГ ВГА	40-60 ИФА ед.
НbsAg	2,5-20 мкг
СП-МО	0,1-10 мг

Указанный технический результат достигается также тем, что вакцинная композиция, включающая вакцинный препарат и иммуноадьювант, содержит в качестве иммуноадьюванта сополимер по п.1.

Указанный технический результат достигается также тем, что лекарственное средство, включающее лекарственное вещество и носитель, содержит в качестве носителя сополимер формулы 1.

Лекарственное средство может представлять собой конъюгат лекарственного вещества с сополимером формулы 1 при наличии в структуре лекарственного вещества реакционноспособных функциональных групп.

Лекарственное средство может представлять собой соединение, полученное в результате реакции комплексообразования лекарственного вещества с сополимером формулы 1.

Лекарственное средство может представлять собой фармацевтическую композицию, полученную в результате смешивания лекарственного вещества с сополимером формулы 1.

Сополимеры гетероцепных алифатических поли-N-оксидов в соответствии с формулой 1 (СП-НО) обладают фармакологическим действием и, прежде всего, проявляют выраженные антиоксидантные и детоксикационные свойства, иммуномодулирующую, антивирусную и антибактериальную активности, биогенны, поскольку являются аналогами продуктов естественного окислительного метаболизма природных гетероцепных полиаминов и применимы для создания безопасных для живого организма лекарственных препаратов.

СП-НО биодеструктируют в организме на олигомерные и низкомолекулярные соединения и полностью выводятся из организма. Благодаря собственной физиологической активности на основе соединений в соответствии с изобретением могут быть созданы высокоэффективные безбалластные фармакологические системы. Наличие свободных реакционноспособных третичных атомов азота в описываемом соединении открывает широкие возможности их модификации для введения новых реакционноспособных групп в боковую цепь СП-НО с последующим использованием их в качестве носителей для конъюгированных вакцин, ферментов, различных лекарственных препаратов. Получение конъюгированных соединений на основе СП-НО возможно только при наличии реакционноспособных групп у вакцинных антигенов, ферментов, лекарственных препаратов.

Описываемые сополимеры характеризуются уникальной адсорбционной

способностью, которая обусловлена совокупностью физико-химических свойств этих соединений, а именно:

- широкий диапазон молекулярных масс, включая высокие молекулярные массы;
- наличие множества слабо заряженных N-оксидных групп в основной цепи
- макромолекулы и, как следствие, способность образования равновесных электростатических комплексов с другими молекулами;
- высокая полярность (дипольный момент N-O-связи составляет около 5 Д, что почти на порядок превышает дипольный момент других связей), обеспечивающая образование стабильных электростатических макромолекулярных комплексов;
- образование хелатных комплексов с металлами и, как следствие, эффективная защита клеточных мембран.

СП-НО имеют в структуре N-оксидные группы. С химической точки зрения N-оксидные соединения отличаются от других соединений самой высокой полярностью (дипольный момент N-оксида около 5 Д, в то время как дипольный момент исходного полиамина 0,65 Д). Этим обусловлена их уникальная способность сорбировать различные токсические соединения, металлы и др., а затем выводить их из организма. Именно высокой адсорбционной способностью и полимерной природой обусловлены выраженные детоксикационные свойства этих соединений.

Благодаря этим свойствам описываемые соединения адсорбируют различные токсические вещества, в том числе металлы, продукты метаболизма и др., а затем выводят их из организма. Именно адсорбционной способностью и полимерной природой обусловлены выраженные детоксикационные и мембранопротекторные свойства этих соединений.

По своим детоксикационным свойствам сополимеры в соответствии с изобретением в сотни раз превосходят детоксикационные свойства известных соединений того же назначения, таких как гемодез, альбумин, декстран и др. Вместе с тем описываемые сополимеры обладают заметными иммуномодулирующими свойствами - коэффициент стимуляции варьирует в пределах 3÷7.

При создании вакцинирующих и лечебных препаратов нового поколения высокомолекулярный иммуностимулятор - носитель антигенов и аллергенов СП-НО обеспечивает большую стабильность антигенов, усиление иммуногенности при снижении прививочной дозы антигенов, более эффективное формирование иммунологической памяти к антигенам и повышение профилактической эффективности вакцины, а также высокий уровень безопасности вакцины. Модификация антигенов различной природы высокомолекулярным иммуностимулятором СП-НО позволяет усилить иммуногенную активность. Присоединение СП-НО к аллергенам приводит к снижению аллергенной активности, повышению безопасности препарата и уменьшению риска возникновения осложнений при введении их в сенсibilизированный организм. Связывание аллергенов с СП-НО дает возможность значительно усилить иммунный ответ, стимулировать высокий уровень выработки аллерген-специфических IgG-антител, обеспечивающих защиту больных аллергией при попадании аллергенсодержащих веществ в его организм.

В качестве носителей других фармакологически активных соединений СП-НО могут быть использованы путем их ковалентного связывания, при этом ковалентное связывание достигается введением химически высокорреакционных групп.

Оценка иммуногенных и протективных свойств полученных конъюгатов СП-НО с различными антигенами и в том числе с гемагглютинином вируса гриппа (ГА), проводилась изучением реакций иммунной системы и организма в целом на

экспериментальных животных.

Обнаружено, что при введении конъюгата ГА-СП-НО в организм животного у него индуцируется заметный антительный ответ при однократном введении конъюгата. В ответ на повторное введение развивается вторичный, более интенсивный ответ, максимум достигается через 10-15 дней, он более продолжительный, удерживается на очень высоких значениях даже через 3 месяца после иммунизации. В опытах на животных показана высокая иммуногенность конъюгата в реакции торможения гемагглютинации РТГА. В тесте блокирования размножения живого вируса в куриных эмбрионах выявлена прямая вируснейтрализующая активность образующихся антител. По этим тестам конъюгат не уступает цельновирионной референс-вакцине. При проведении анализа изотипов антител установлено, что образуются антитела IgM, IgA, главным образом IgG, но не IgE. Иницируется формирование иммунной памяти, что говорит о вовлечении Т-клеток в ответ на введение конъюгата, идет накопление Т-хелперов. Что очень важно, индуцируется интенсивное формирование вирус-специфических Т-киллеров.

Производные СП-НО обладают широким спектром фармакологической активности, высокой биодоступностью, способностью к выведению из организма, безопасностью применения.

СП-НО в широком диапазоне доз активизирует макрофагальное звено, гуморальный иммунный ответ, обладает антиинфекционной и противоопухолевой активностью, повышает резистентность клеточных мембран к цитотоксическому действию и снижает токсичность лекарственных препаратов при совместном введении.

СП-НО получают в результате химического синтеза путем частичного окисления третичного азота основной цепи макромолекулы исходного алифатического полиамина, содержащего азот в основной цепи в слабокислых водных, водно-спиртовых или спиртовых растворах. В качестве окислителя могут быть использованы перекись водорода и другие органические или неорганические перекиси или гидроперекиси, соли кислородсодержащих галогенокислот, озон, или кислород, полученный электролизом воды.

Синтез проводят при температуре 20 ÷ 40°С. Растворитель и избыток перекиси удаляют методом ультрафильтрации, затем проводят лиофильное высушивание.

Идентификацию и анализ структуры полученных СП-НО и его производных проводят с помощью методов физико-химического анализа: ЯМР-, ПМР-, ИК-спектроскопии, УФ-спектроскопии. Молекулярно-массовые характеристики получают с использованием хроматографического комплекса, в состав которого входит высокоэффективный жидкостный хроматограф с 4 детекторами - УФ-спектрофотометрия, рефрактометрия, малоугловое лазерное светорассеяние, флуоресцентная спектроскопия.

При получении конъюгатов и комплексов СП-НО с белками и гликопротеидами различной природы, имеющими первичную аминогруппу или карбоксильную группу, в качестве белкового компонента данной реакции могут быть использованы:

- при получении вакцинирующих препаратов - антигенные комплексы, выделяемые из возбудителя гепатита А, В, С, туберкулеза, сибирской язвы, холеры, брюшного тифа, коклюша, дифтерии, столбняка, пиогенных инфекций;
- при получении лекарственных препаратов пролонгированного действия с повышенным уровнем безопасности и эффективности - эритропоэтины, цитокины, интерфероны, ферменты, цитостатики, антибиотики, гормоны, витамины;
- при получении средств специфической иммунотерапии - аллергены и аллергоиды,

выделяемые из пыльцы растений и трав, домашней пыли, пищевых продуктов и др.

В каждом конкретном случае варьируются условия проведения реакции - соотношение компонентов, рН, температура проведения реакции, продолжительность процесса, концентрация реагентов в реакционной смеси, что влияет на выход и состав получаемого препарата.

Для использования СП-НО как носителя различных фармакологически активных соединений могут быть применены методы связывания комплексообразованием за счет многоточечных электростатических взаимодействий компонентов или ковалентное связывание.

Если антигены - индивидуальные соединения с известным химическим строением и структурой - Ви-антиген, гемагглютинин, ферменты и т.д., целесообразно выбирать ковалентное связывание. Если это смесь различных веществ, предпочтительно осуществлять связывание комплексообразованием, в том числе с использованием полимер-антиген-металлических комплексов.

В случае разноименно заряженных соединений комплексообразование в определенных условиях происходит с высокими скоростью и выходом. В случае одноименно заряженных компонентов предпочтительны методы получения с образованием полимер-антиген-металлических комплексов. Например, в конкретном случае с использованием в качестве аллергоида пыльцы тимофеевки или березы, которые не является индивидуальным соединением. При связывании аллергоида с СП-НО оба соединения имеют слабый отрицательный заряд, т.е. заряжены одноименно. В этом случае выбирают реакцию комплексообразования с использованием полимер-металлических комплексов.

Основными критериями при этом являются безопасность, эффективность и технологичность процессов синтеза соединений и получения фармакологических препаратов.

Сравнение различных методов связывания выявило преимущества именно образования тройных полимер-антиген-металлических комплексов. Технологичность исключительно высокая - на фоне предварительного комплексообразования двух соединений добавляют расчетное количество соли меди с образованием «скрепок» между молекулами, что обуславливает устойчивость комплекса при физиологических условиях.

Образование тройных полимер-металлических комплексов на основе СП-НО и ионов переходных металлов и антигенов или аллергенов оказалось одним из оптимальных способов, при котором достаточно прочное связывание антигена и полимерного носителя не сопровождается изменением их химической структуры и, как следствие этого, спектра биологического действия компонентов, не приводит к появлению токсичных побочных продуктов реакции и имеет ряд технологических преимуществ, т.к. способ получения тройных полимер-металлических комплексов прост, технологичен, протекает в одну стадию в мягких условиях и со 100% выходом.

В создаваемых вакцинных или фармацевтических композициях иммуномодулирующее, антиинфекционное и противовоспалительное действие обусловлено сочетанием физиологической активности СП-НО с активностью компонентов.

Представленные ниже примеры иллюстрируют возможность получения сополимеров в соответствии с настоящим изобретением и результаты изучения их свойств

В нижеследующих примерах 1-5 приведены примеры синтеза конкретных СП-НО;

примеры 6-13 иллюстрируют изучение фармакологических свойств СП-НО; в примерах 14-20 представлена возможность получения конъюгатов и комплексов производных СП-НО с различными физиологически активными компонентами, приводящие к образованию вакцинных и фармацевтических композиций на их основе.

В примерах 1-3 показаны варианты синтеза СП-НО при использовании трех исходных гетероцепных алифатических полиаминов, соответственно поли-1,2-конидина СП-НО-1, поли-1,4-хинуклидин СП-НО-2, поли-1,4-триэтилендиамин СП-НО-3.

Пример 1. Синтез сополимера конидина и N-оксида конидина (СП-НО-1-1).

Для синтеза сополимера используют гетероцепный алифатический полиамин поли-1,2-конидин.

10 г исходного полиамина с ММ 70000 Д растворяют в 300 мл 96%-ного этилового спирта. Раствор охлаждают до температуры $4\pm 6^\circ\text{C}$ и при одновременном перемешивании добавляют 20 мл 30%-ной перекиси водорода. Реакцию окисления полиамина проводят в течение 10 часов, после чего часть растворителя удаляют в вакууме и добавляют 300 мл воды. Удаление непрореагировавшей перекиси водорода проводят с помощью ультрафильтрационной установки «Пеликон». Полученный раствор сополимера конидина и N-оксида конидина концентрируют и высушивают на лиофилизационной установке. После высушивания выход целевого продукта составляет 99%, $n=620$, $q=0,35n$, $z=0,65n$.

Данные элементного анализа:

Вычислено, %: С 66,3; Н 10,24; N11,20.

Получено, %: С 66,4; Н 10,31; N 11,22.

Характеристическая полоса соединения, полученная в результате анализа методом ИК-спектрометрии, составляет 960 см^{-1} и 1130 см^{-1} .

Пример 2. Синтез сополимера 1,4-хинуклидин и N-оксида 1,4-хинуклидина (СП-НО-2-1).

Поли-1,4-хинуклидин с ММ 75000 Д 10 г растворяют в 150 мл 0,1N уксусной кислоты. При охлаждении (4°C) и размешивании добавляют 10 мл 30%-ной перекиси водорода. Раствор выдерживают в этих условиях 24 часа. Затем раствор подвергают ультрафильтрации для удаления избытка перекиси водорода и уксусной кислоты. Водный раствор сополимера высушивают лиофилизацией.

Характеристическая полоса соединения, полученная в результате анализа методом ИК-спектрометрии, составляет 960 см^{-1} и 1130 см^{-1} .

Выход продукта 100%: $n=650$, $q=0,2n$, $z=0,8n$.

Пример 3. Синтез сополимера 1,4-триэтилендиамина и N-оксида триэтилендиамина (СП-НО-3-1).

10 г исходного полиамина поли-1,4-триэтилендиамина с ММ 80000 Д растворяют в 400 мл уксусной кислоты при рН 5. После растворения полиамина при перемешивании и охлаждении ($4-6^\circ\text{C}$) добавляют 20 мл 30%-ной перекиси водорода. Реакцию проводят в течение 35 часов. После завершения реакции полученный раствор очищают от избытка непрореагировавших компонентов с использованием метода ультрафильтрационной очистки, затем подвергают лиофильному высушиванию. После высушивания выход целевого продукта с характеристиками: $n=700$, $q=0,25n$, $z=0,75n$ составляет 100%.

В таблице 1 приведены характеристики (n , q , z и ММ) сополимеров конидина и N-оксида конидина (СП-НО-1-1, СП-НО-1-2, СП-НО-1-3), сополимеров 1,4-хинуклидин и N-оксида 1,4-хинуклидина (СП-НО-2-1, СП-НО-2-2, СП-НО-2-3) и сополимеров 1,4-

триэтилендиамина и N-оксида триэтилендиамина (СП-NO-3-1, СП-NO-3-2, СП-NO-3-3), полученных по методикам, описанным в примерах, соответственно, 1, 2, и 3 с варьирующимися соотношениями исходных компонентов и параметров реакции.

5 Пример 4. Изучение фармакокинетики различных видов СП-NO, имеющих радиоактивную метку C^{13} .

Исследование фармакокинетики меченого СП-МО проводят по стандартным методикам при внутримышечном введении лекарственной формы с СП-NO в дозе 20 мг/кг (0,75 МБк/кг) крысам.

10 Наблюдения за животными показали отсутствие тканевой кумуляции препарата. Обнаружена гетерогенность в распределении СП-NO в органах и тканях у самцов и самок. Выведение СП-NO происходит преимущественно в две фазы. Период полувыведения быстрой фазы - 1,5 часа, медленной - 84 часа.

15 Результаты исследования фармакокинетики СП-NO-1-1, СП-NO-2-1 и Сn-NO-3-1, представленные в таблице 2, показывают, что СП-NO быстро всасывается в системный кровоток и достигает максимальной концентрации уже через 30-50 мин. Период полураспределения составляет около 0,5 часа, период полуэлиминации - 20-46 часов, а среднее время пребывания препарата в организме - порядка 40 часов.

20 Пример 5. Изучение антиоксидантных свойств СП-NO.

Способность СП-NO подавлять образование активных форм кислорода (АФК) оценивают в системе взаимодействия перекиси водорода с пероксидазой хрена (Reanal). При этом регистрацию образования супероксидных анион-радикалов осуществляют с помощью хемилюминесценции по интенсивности окисления люминола продуктами 25 указанной реакции. Анализ хемилюминесценции проводят на 36-канальной установке «Люфицер-Б» при температуре 37°C.

Предварительно приготавливают среду взаимодействия в составе: физиологический раствор, забуференный фосфатами (рН 7.2÷7.4), люминол (Sigma Chemical Co. в 30 конечной концентрации 0.6×10^{-1} М) и взаимодействующие реагенты - перекись водорода (в концентрации до 0,005% и пероксидаза хрена (в конечной концентрации 1 мкг/мл).

Указанное соотношение реагентов обеспечивает сохранение интенсивной хемилюминесценции на уровне 300000 имп/сек на протяжении 40 минут. Готовую 35 смесь размещают в объеме по 500 мкл в пробирках хемилюминографа и регистрируют уровень свечения в течение 5 мин. Затем в соответствующую пробирку добавляют исследуемые вещества (СП-NO-1-1, СП-NO-2-1, СП-NO-3-1, СП-NO-3-2) в объеме 10 мкл. Диапазон исследуемых концентраций составляет от 25 до 250 мкг/мл. При такой 40 процедуре имело место дозозависимое гашение сигнала на 10-90% от исходного уровня. Измерения прекращают по перемещении кривой хемилюминесценции на плато (через 15-20 минут). Для каждой концентрации внесенного вещества высчитывают площадь под кривой и соотносили ее с таковой для контрольных 45 пробирок с физраствором.

Результаты выражают в процентах подавления свободно-радикальной реакции для каждой концентрации исследуемых веществ. Для сравнения антирадикальной активности различных образцов вычисляют концентрацию, при которой происходит подавление активности 50% свободных радикалов.

50 Данные, представленные на графиках фиг.1, свидетельствуют о том, что добавление в систему радикальной реакции всех исследуемых образцов СП-NO в концентрации 15 мкг/мл приводит к подавлению уровня радикальной реакции в значительно большей степени (на 50%) по сравнению с известным соединением

(референс препаратом) в той же дозе (на 30%), что подтверждает высокие антиоксидантные свойства описываемого соединения.

Пример 6. Изучение детоксикационных свойств СП-NO.

Оценку защитных свойств СП-NO проводят на модели острой токсичности.

В исследованиях используют белых мышей - гибридов (модель СВА×С57BL/6F1) массой 18-20 г.

Готовят 0,04%-ные растворы применяемого в экспериментальных исследованиях токсичного для мышей вещества природного происхождения - МРМ с добавлением и без СП-NO в соотношении 1:1 и 1:5. Исследуемые соединения вводят животным однократно, внутривенно в объеме 0,25 и 0,5 мл соответственно дозам. Животным контрольной группы вводят по 0,5 мл физиологического раствора. Наблюдения за животными проводят в течение 21 суток.

Данные, представленные в таблице 3, иллюстрируют защитные свойства СП-NO.

Пример 7. Изучение антидотных свойств СП-NO.

Исследования проводят *in vivo* при остром отравлении CuSO_4 . Препараты вводят 7-ми группам животных, из которых животным первой группы вводят физраствор, животным 2-4 групп только CuSO_4 в смертельных для животных дозах (мг/кг): 12,5; 25,0 и 50,0, а животным 5-7 групп вводят аналогичные дозы CuSO_4 в сочетании с аналогичными дозами СП-NO-3-1.

Результаты исследований, представленные в таблице 4, свидетельствуют о выраженном антидотном действии СП-NO.

При этом установлено, что одновременное введение СП-NO-3-1 в дозе 12,5 мг/кг и выше с тремя смертельными дозами CuSO_4 не только защищает животных от гибели, но и предотвращает развитие симптомов интоксикации.

Пример 8. Оценка защитных свойств СП-NO на модели гемолиза эритроцитов.

Исследования проводили на модели кварцевого (SiO_2) гемолиза эритроцитов с использованием международного стандарта кварцевой пыли DQ-12 дисперсностью меньше 3 мкм по методу A.David (1976). Кровь человека брали с гепарином, эритроциты трижды промывали в 10-кратном объеме бесцветного раствора Хенкса с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин.

Эритроцитарную взвесь ресуспендировали до 4%-ной концентрации (10 эритроцитов в 1 мл). Все исследования проводили в 3-5 параллельных пробах. Образцы SiO_2 и эритроцитов отбирали при постоянном перемешивании на магнитной мешалке.

1 мл 4%-ной взвеси эритроцитов смешивали с 1 мл исследуемого препарата, добавляли 1 мл 0,3% (3 мг/мл) взвеси SiO_2 и инкубировали в течение одного часа при температуре 37°C, осторожно встряхивая пробы через каждые 5 минут. После инкубации во все пробы добавляли по 7 мл буфера, центрифугировали и надосадочную жидкость фотометрировали на СФ-26 при 540 нм. Результаты гемолиза выражали в процентах, принимая за 100% содержание гемоглобина в пробах 1 мл 4%-ной суспензии эритроцитов с 9 мл дистиллированной воды. Защитный эффект исследуемых препаратов рассчитывали по формуле и выражали в процентах:

$$100 - \frac{E_{540 \text{ ОПЫТ}}}{E_{540 \text{ K SiO}_2}} \times 100,$$

где

$E_{540 \text{ K SiO}_2}$ - экстинкция контрольных образцов - в пробирке «вода-кремний-эритроциты»;

$E_{540 \text{ ОПЫТ}}$ - экстинкция опытных образцов - в пробирке «препарат в буфере»

кремний-эритроциты».

Представленные в таблице 5 данные показывают, что двуокись кремния обладает выраженными гемолитическими свойствами. 3 мг SiO₂ в течение часа инкубации вызывает гемолиз 87,4% эритроцитов. Инкубация эритроцитов с SiO₂ в присутствии 50 мкг СП-NO-3-2 практически полностью защищает эритроциты от гемолиза.

Свойство СП-NO защищать эритроциты от гемолиза сравнивали с высокомолекулярными плазмозамещающими растворами поливинилпирролидона (гемодез), декстрана (полиглюкин) и альбумина. В качестве буфера использовали бесцветный раствор Хенкса.

Поливинилпирролидон и альбумин также обладают защитившими свойствами, но выраженный эффект достигается только в высоких дозах. При этом препарат не разрушает, может накапливаться в организме и вызывать нежелательные побочные эффекты.

Данные, представленные в таблице 5, убедительно свидетельствуют о выраженных свойствах СП-NO как детоксиканта и об их преимуществах по сравнению с признанными детоксикантами.

Пример 9. Изучение иммуномодулирующей активности СП-NO.

Имуномодулирующую активность СП-NO оценивали по их способности стимулировать антителообразование к эритроцитам барана или антигенам белковой природы (В-субъединица холерного токсина, столбнячный анатоксин) у экспериментальных мышей-гибридов первого поколения, полученных при скрещивании мышей линий СВА и С57BL (модель СВА×С57BL/6F1) путем определения числа антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей через 4-7 дней после совместного их введения. Постановка опыта согласно общепринятому методу Ерне. Количество АОК в селезенке мышей определяют методом локального гемолиза в агаре. Титры антител, образующихся в ответ на введение белковых антигенов, определяют методом иммуноферментного анализа.

Имуномодулирующую эффективность СП-NO оценивают по отношению числа АОК, образующихся при совместном введении антигенов и СП-NO к числу АОК в группе контрольных животных. Доз варьируется от 1 до 1000 мг/кг на мышь при внутрибрюшинном и подкожном введении.

В таблице 6 приведены значения коэффициента стимуляции в зависимости от конкретного соединения и дозы введения (доза варьировалась от 1 до 1000 мг/мышь при внутрибрюшинном и подкожном введении). Индекс стимуляции иммунного ответа составляет величину от 3 до 7, т.е. сопоставим с известным стандартным токсическим стимулятором - полиакриловой кислотой (ПАК). Эксперименты показали, что существует зависимость величины коэффициента стимуляции от дозы и от состава СП-NO.

Результаты исследования свидетельствуют о высокой иммуномодулирующей активности СП-NO, которая проявляется в широком интервале доз при различных способах введения.

Пример 10. Получение противотуберкулезной вакцины посредством комплексообразования антигенного комплекса, выделяемого из тритонового экстракта микобактерий БЦЖ с СП-NO. Оценка протективных свойств полученного препарата в эксперименте на животных.

Получен и изучен ряд образцов противотуберкулезного вакцинирующего препарата с оптимизированным соотношением антигена и СП-NO-3-1.

В качестве антигена был выбран антигенный комплекс (АК), состоящий из

гликопептидов, выделяемых из тритонового экстракта клеточных стенок микобактерий БЦЖ.

Согласно паспортным данным на антиген содержание белка в 1 мг сухого вещества АК составляет 50,2 мкг. Определение белка проводят по Бредфорду.

5 При получении образцов вакцинирующего препарата исходили из ориентировочных доз по антигену - 100 мкг и 50 мкг АК на мышь, доза по белку соответственно составляла 5 мкг и 2,5 мкг на мышь. Доза СП-НО-3-1 была выбрана на основе ранее полученных результатов и составляла 1000 мкг на мышь. Для
10 получения вакцинирующих препаратов использовали соединение СП-НО-3-1. При определении соотношения компонентов в составе препарата расчеты производились на содержание основного вещества СП-НО-3-1.

Реакцию комплексообразования осуществляют следующим образом.

15 500 мг СП-НО-3-1 растворяют в 10 мл 0,05 М фосфатного буфера pH 5,8. При температуре 2-4°C добавляют 100 мг раствора АК в 2 мл того же буфера. При данном значении pH макромолекулы полимерного носителя и антигенов заряжены противоположно.

Реакцию комплексообразования проводят медленным введением раствора
20 антигенов в раствор СП-НО-3-1, не допуская выпадения осадка. Повышение растворимости антигенного комплекса в воде осуществляют за счет его комплексообразования с СП-НО. В одном из вариантов (Препарат 1) добавляют раствор фармацевтической композиции СП-НО к антигенному комплексу при постоянном перемешивании и контроле pH. В другом варианте (Препарат 2) проводят
25 объединение растворов антигена и СП-НО при постоянном перемешивании, охлаждении и контроле pH.

После проведения синтеза растворы препаратов подвергают лиофильному высушиванию и контролю.

30 Определение содержания белка и анализ проводят методами флуоресцентной спектроскопии и электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Характеристики двух препаратов, полученных по описываемой методике, приведены в таблице 7.

Протективную активность синтезированных препаратов 1 и 2 оценивают по двум
35 показателям - по высеваемости микобактерий из легких и селезенки зараженных мышей, а также по срокам выживания животных после заражения.

Для иммунизации мышей использованы 3 препарата:

Препарат 1 содержит на 1 дозу 5 мкг антигена и 500 мкг СП-НО;

Препарат 2 содержит на 1 дозу 2,5 мкг антигена и 500 мкг СП-НО;

40 Препарат 3 содержит на 1 дозу 500 мкг СП-НО.

Мышей иммунизируют препаратами 1, 2 и 3 подкожно в 1 точку в объеме 0,2 мл дважды с интервалом в 2 недели. В качестве положительного контроля используют животных, получивших 1 инъекцию БЦЖ (Prague 10⁶). В качестве негативного
45 контроля используют невакцинированных животных.

Через 5 недель после второй иммунизации подопытных животных всех групп заражают летальной дозой *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (5×10⁶ КОЕ).

Высеваемость микобактерий из органов определяют через 3 недели после введения летальной дозы микобактерий. По результатам, приведенным в таблице 8,
50 наблюдается снижение числа КОЕ в легких и селезенке мышей, вакцинированных препаратами, по сравнению с числом КОЕ в 4 контрольной группе животных, получивших инъекцию летальной дозы микобактерий.

По выживаемости экспериментальных животных наиболее эффективным

представляется Препарат 2. Этот препарат оказывает защитное действие от летальной дозы микобактерий у 57% животных к 70 дню наблюдения, однако препарат был несколько менее эффективен, чем БЦЖ. Двукратное введение животным Препаратов 1 и 2 на 16 дней удлинит время жизни летально зараженных мышей.

Данные, представленные в таблице 9, показывают эффективность полученных вакцин по выживаемости.

Таким образом, по полученным данным наибольшим протективным эффектом обладал препарат, в котором содержание белка (в составе АК) и СП-НО составляет соответственно 5 мкг и 500 мкг. Его эффект был достоверно выше, чем в случае других использованных препаратов.

Пример 11. Получение конъюгатов СП-НО с белками и гликопротеидами различной природы, имеющими первичную аминогруппу в боковой цепи.

При получении конъюгатов и комплексов СП-НО с белками и гликопротеидами различной природы, имеющими первичную аминогруппу или карбоксильную группу, в качестве белкового компонента данной реакции могут быть использованы:

- при получении вакцинирующих препаратов - антигенные комплексы, выделяемые из возбудителя гепатита А, В, С, туберкулеза, сибирской язвы, холеры, брюшного тифа, коклюша, дифтерии, столбняка, пиогенных инфекций;

- при получении лекарственных препаратов пролонгированного действия с повышенным уровнем безопасности и эффективности - эритропоэтины, цитокины, интерфероны, ферменты, цитостатики, антибиотики, гормоны, витамины;

- при получении средств специфической иммунотерапии - аллергены и аллергоиды, выделяемые из пыльцы растений и трав, домашней пыли, пищевых продуктов и др.

В каждом конкретном случае варьируются условия проведения реакции - соотношение компонентов, рН, температура проведения реакции, продолжительность процесса, концентрация реагентов в реакционной смеси, что влияет на выход и состав получаемого препарата.

Метод получения конъюгатов СП-НО с белками в общем виде имеет следующую последовательность действий: 10 мг СП-НО, полученного согласно описанным выше примерам, растворяют в 1 мл воды. К раствору добавляют 5 мг бромацетилгидразида и смесь перемешивают в течение 3 часов при температуре 30°C. Затем в реакционную смесь добавляют раствор 3 мг белка в 0,01М фосфатном буфере рН 8,2. Реакцию конъюгации проводят при температуре 2-4°C в течение 20 час. После завершения реакции реакционную смесь подвергают очистке методом ультрафильтрации, целевой продукт выделяют лиофильным высушиванием.

Пример 12. Получение конъюгатов СП-НО с антигенами полисахаридной природы (ПС-АГ) с целью получения вакцинирующих соединений, обладающих повышенной иммуногенностью и защитным эффектом против инфекций.

Получение конъюгатов СП-НО с антигенами полисахаридной природы (ПС-АГ) показано на примере капсульного Ви-полисахарида, обладающего протективной активностью против инфекции, вызываемой *Salmonella typhi*.

Конъюгаты ПС-АГ с СП-НО получают по методу, описанному в примере 11, путем образования ковалентной связи между карбоксильной группой остатков N,O-ацетилгалактуроновой кислоты ПС-АГ и гидразидной группой активированных производных СП-НО, с использованием конденсирующего агента 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (ЭДК). Реакцию конденсации ПС-АГ с гидразидным производным полиоксидония СП-НО проводят в водно-солевых растворах (0,2-0,35 М NaCl) при весовом соотношении между компонентами,

равными 1:0,25-1:10, взятых в концентрации 0,1-0,3% для ПС-АГ и 0,07-1% для СП-НО в течение 3-20 часов при температуре 4-20°C и рН 5,6-5,8; количество ЭДК составляло 0,2-0,5 весовых %.

5 Процедуру выделения конъюгата из реакционной смеси проводят на колонке (2,6×70 см) с носителем Сефакрил S-1000 (Фармация, Швеция) в 0,2 М растворе NaCl. Фракции с конъюгатом, выходящие со свободным объемом колонки, объединяют, концентрируют в вакууме до небольшого объема, диализуют против физиологического раствора, содержащего 0,01% тимеросаля в качестве консерванта, и
10 хранят при 3-8°C.

Выход конъюгатов, рассчитанный по ПС-АГ, составляет 60=10% от исходного весового количества ПС-АГ.

15 Обработка раствора конъюгата 0,5 М раствором NaCl или 0,25% раствором детергента дезоксихолата натрия не приводит к уменьшению молекулярной массы получаемого продукта по данным гель-хроматографии на Сефакриле S-1000 и Сефарозе 4В, что свидетельствует о наличии ковалентной связи между ПС-АГ и СП-НО.

20 Присутствие ПС-АГ в полученных конъюгатах подтверждают серологическим анализом. Конъюгаты тормозят реакцию пассивной гемагглютинации с монорецепторной антисывороткой в концентрации 0,12-250 мкг/мл. Конъюгаты ПС-АГ при одноразовой внутрибрюшинной иммунизации лабораторных животных (мыши линии F1) в дозе 5-100 мкг/мышь продуцируют специфические сывороточные антитела в количестве, в 2-4 раза большем, чем исходные ПС-АГ.

25 Пример получения образца №1 - конъюгированного Ви-полисахарид (Ви-ПС) с молекулярной массой 3-5 МД, представляющего собой линейный гомополимер, состоящий из остатков 3-О-ацетил-2-ацетамидо-2-дезоксид-галактуроновой кислоты, связанной (1-4)-гликозидными связями, с гидразидным производным СП-НО,
30 синтезированным по методу примера 5. Получение конъюгированного капсульного Ви-полисахарида при массовом соотношении Ви-ПС:СП-НО 1:0,25.

К 10 мг Ви-ПС в 1,7 мл 0,2 М раствора NaCl при рН 5,6 при перемешивании добавляют 2,5 мг СП-НО в 1,7 мл 0,2 М раствора NaCl при рН 5,6. Полученный
35 раствор перемешивают в течение 30 минут при 20°C, добавляют 8 мг сухого ЭДК. рН раствора, равное 5,6-5,8, поддерживают 0,1 н. раствором HCl в течение 3 часов при 20°C и 17 часов при 4°C.

40 Реакционную смесь диализуют в течение суток в диализных трубках (6000-8000, Спектрапор, США) против 0,2 М раствора NaCl. Диализат наносят на колонку с носителем Сефакрил S-1000 (2,6×70 см). Элюцию проводят 0,2 М раствором NaCl со скоростью 60 мл/час. Регистрацию осуществляют спектрофотометрически при 206 нм и рефрактометрически.

45 Фракции, соответствующие свободному объему колонки, $k=0,1-0,36$, объединяют, упаривают до небольшого объема на роторном пленочном испарителе, диализуют против физиологического раствора с 0,01% тимеросалем рН 7,0 и хранят при 3-8°C. Выход конъюгата по Ви-ПС составляет 70%, массовое соотношение между компонентами Ви-ПС:СП-НО в конъюгате составляет 1:0,3.

50 Пример получения образца №2 - конъюгированного с гидразидным производным СП-НО, синтезированного по примеру 6 капсульного Ви-полисахарида при массовом соотношении Ви-ПС:СП-НО 1:0,5.

В отличие от получения образца № 1 к 10 мг Ви-ПС в 3 мл 0,2 М раствора NaCl при перемешивании и рН 5,6 добавляют 5 мг СП-НО в 3 мл 0,2 М раствора NaCl при рН 5,6.

Сухой ЭДК прибавляют в количестве 12 мг.

Выход конъюгата по Ви-ПС составляет 70%, массовое соотношение между компонентами Ви-ПС:СП-НО в конъюгате составляет 1:0,3.

5 Пример 13. Изучение защитных свойств конъюгатов СП-НО с ПС-АГ в качестве вакцинирующих соединений, обладающих повышенной иммуногенностью и защитным эффектом против инфекций, вызываемых возбудителями *Salmonella*.

10 Исследования проводят на вакцинных образцах №1 и №2, полученных в соответствии с технологией, описанной в примере 15, в сравнении с нативным Ви-полисахаридом (Ви-ПС).

15 Препараты испытывают на лабораторных животных мышах линии СВАхС57В1/6)F1 в тестах активной защиты мышей от заражения животных контрольно-производственным вирулентным штаммом брюшного тифа *Salmonella typhi* Ty2 №4446. Тест активной защиты мышей является основным методом лабораторной оценки эффективности брюшнотифозных вакцин. Требование к вакцинному препарату, изучаемому в этом тесте, - защита мышей при заражении культурой в дозе 3-6 ЛД₅₀. Ви-ПС и иммунохимически активные его конъюгаты с СП-НО образцы №1 и №2 вводят только однократно. Используют внутрибрюшинную 20 иммунизацию и заражение, так как именно такой способ введения предъявляет наиболее жесткие требования к иммуногенности вакцины. Заражение проводят через месяц и более после введения опытной вакцины.

25 Проведено сравнение защитных свойств серий конъюгатов образцов №1 и №2 и коммерческой брюшнотифозной вакцины. Используют вакцину брюшнотифозную химическую сорбированную жидкую. Препараты вводят в равной по Ви-антигену дозе.

30 Сравнение защитных свойств также проводят на модели с заражением вирулентным штаммом. Используют брюшнотифозную химическую сорбированную жидкую вакцину, рекомендованную для массовой иммунизации в РФ. Препараты вводят в равной по Ви-антигену дозе.

35 Данные по выживаемости животных, представленные в таблице 10, для образцов №1 и №2 и их сравнение с коммерческой вакциной показывают, что конъюгация Ви-ПС антигена с СП-НО позволяет существенно повысить его вакцинирующие свойства и обеспечивать 100% защиту экспериментальных животных при заражении дозой штамма не ниже 3 ЛД₅₀.

40 Связывание ПС-АГ с синтетическим полимерным иммуномодулятором СП-НО позволяет получить препарат с повышенной иммуногенностью.

45 Пример 14. Изучение пирогенности серий образца №1 и коммерческой вакцины.

Эксперименты проводят на 9 кроликах породы шиншилла, которым вводят образец №1 в дозе 1000 мкг и 200 мкг и коммерческую вакцину в дозе 40 мкг. Результаты термометрии, представленные в таблице 11, свидетельствуют о том, что 50 пирогенная доза (1000 мкг) вакцины Ви-ПС с СП-НО значительно превышает прирогенную дозу коммерческой брюшнотифозной вакцины (40 мкг).

Результаты исследований, приведенные в примерах 16-18, показывают, что конъюгаты полисахаридного Ви-антигена и СП-НО в использовании против брюшного тифа позволяют значительно повысить протективный иммунитет, 50 одновременно обеспечив снижение пирогенности препарата.

Связывание СП-АГ с синтетическим полимерным иммуномодулятором СП-НО позволяет получить иммунохимически активный препарат с повышенной иммуногенностью, сниженной пирогенностью и может быть рекомендован для

разработки вакцинного препарата против брюшнотифозной инфекции.

Пример 15. Использование СП-НО для получения конъюгата с лекарственным веществом.

5 Показано на примере получения конъюгата СП-НО с лидазой (фермент гиалуронидаза).

Получение конъюгата СП-НО с лекарственным веществом может быть осуществлено, например, по реакции конденсации:

10 100 мг гидразида СП-НО растворяют в 4 мл 1 н. HCl. Раствор охлаждают до 2-5°C. Затем при перемешивании и охлаждении добавляют 1,15 мл 3% раствора нитрита натрия. Через 15 минут доводят pH раствора до 8,5 добавлением 2 н. NaOH.

15 Раствор 20 мг фермента в 10 мл 0,05 М фосфатного буфера pH 8,5 добавляют к раствору гидразида СП-НО. Поддерживают pH реакционной смеси равным 8,5 добавлением 2 н. NaOH. Реакцию проводят в течение 12 часов при перемешивании и охлаждении (0-2°C). Для выделения и очистки конъюгата реакционную смесь наносят на колонку (2,6x90 см), заполненную биогелем Р-100, в качестве элюента используют фосфатный буфер 0,05М pH 7,5, содержащий 0,05М NaCl.

20 Выход конъюгата контролируют с помощью проточного спектрофотометра при 226 нм. Определение содержания белка и анализ конъюгата проводят методами флуоресцентной спектроскопии, электрофореза в ПААГ. В 1 мг препарата содержится 0,2 мг фермента.

Пример 16. Изучение противофиброзных свойств препарата на основе конъюгата СП-НО и лидазы (Препарат Л), полученного согласно примеру 15.

25 Изучение проводят на крысах-самцах линии Вистар с исходным весом 180-200 г на модели пневмофиброза, вызванного однократным интратрахеальным введением 20 мг кварцевой пыли. Эффективность Препарата Л оценивали по содержанию основных компонентов соединительной ткани, которые адекватно отражают степень фиброза. В легких определяли содержание липидов, коллагеновых белков, гликопротеинов,
30 глюкозаминогликанов, изучались также гистоморфологические изменения и ультраструктура легких.

Одной группе животных Препарат Л вводили через 4 дня после запыления (профилактическое применение). Другой группе - через 1 месяц, т.е. на фоне развитого
35 фиброзного процесса в легких. Препарат Л вводили внутривентриально в дозе 1500 МЕ 1 раз в неделю в течение 1 месяца. Третья группа животных получала нативную гиалуронидазу, имеющую суммарно ту же активность.

40 Животных забивали через 1, 2 и 3 месяца. Установлено, что нативная гиалуронидаза не оказывает влияния на фиброзный процесс в легких. В то же время Препарат Л не только задерживает развитие пневмофиброзного процесса, но и обладает выраженной способностью рассасывать имеющуюся в легких фиброзную ткань.

45 Экспериментальными исследованиями на модели пневмокониоза (силикоза) показана возможность эффективного воздействия на фиброзный процесс с помощью Препарата Л. Найдена оптимальная фармакологическая доза и схема применения Препарата Л, при которой препарат не только задерживает дальнейшее развитие пневмофиброза, но и вызывает обратное развитие гранулем в легких, что
50 подтверждено биохимическими, гистологическими и электронно-микроскопическими исследованиями. Для крыс лучших результатов сдерживания роста соединительной ткани при деструкции фиброза удается достичь при введении Препарата Л 1 раз в неделю в дозе 500 МЕ/кг, что равно 7 УЕ/кг в пересчете на активность Лидазы. Лидаза

в этой дозе и схеме применения не оказывала сколько-нибудь заметного положительного действия на течение фиброза в легких.

В реализации терапевтического действия Препарата Л решающую роль играют физико-химические и, как следствие этого, фармакологические свойства, присущие носителю СП-НО. Обратное развитие фиброзной ткани под влиянием Препарата Л свидетельствует о том, что препарат обладает способностью не только вызывать деструкцию соединительной ткани, но и препятствовать продуктам деструкции и освободившимся из силикотических узелков частицам двуокиси кремния вновь стимулировать фиброзный процесс.

Описываемый пример иллюстрирует возможность создания лекарственных средств с новыми лечебными свойствами путем конъюгации СП-НО с известным лекарственным веществом.

Пример 17. Использование СП-НО как иммуностимулирующего компонента при получении препаратов для специфической иммунотерапии.

Специфическая иммунотерапия или гипосенсибилизация является главным этиологическим методом лечения больных аллергическими заболеваниями.

Этот метод, дающий у 70-80% больных хорошие устойчивые результаты, не лишен ряда недостатков, которые ограничивают возможность его применения. К числу недостатков относятся: 1) опасность возникновения аллергических реакций при проведении курса иммунотерапии как местных, так и системных; 2) недостаточно высокая иммуногенная активность небольших доз специфических аллергенных препаратов для инициации биосинтеза блокирующих IgG-АТ. Поэтому одной из основных задач аллергологии является разработка методов модификации аллергенных препаратов с целью снижения их аллергенной активности и увеличения иммуногенности.

Одним из приемов модификации аллергена является связывание аллергенных и аллергоидных препаратов с высокомолекулярными иммуностимуляторами, что может усилить их иммуногенность, стимулировать высокий уровень выработки аллерген-специфических IgG-антител и снизить возможность осложнений при гипосенсибилизирующей терапии.

Модифицированные производные СП-НО обладают реакционной способностью, позволяющей ковалентно или комплексно связывать молекулы различной природы, имеющие любые функциональные группы.

Выбор тактики связывания зависит от природы антигенного компонента. Если антигены - индивидуальные соединения с известным химическим строением и структурой - Ви-антиген, гемагглютинин, ферменты и т.д., возможно проведение ковалентного связывания. Если это смесь различных веществ - комплексообразование в случае разноименно заряженных соединений и тройные полимер-антиген-металлические комплексы в случае одноименно заряженных молекул.

Возможность получения аллерговакцин, антигенный компонент в которых представляет собой смесь различных веществ, показана на примере получения образцов - прототипов аллерговакцин на основе аллергоида пыльцы тимофеевки или березы и СП-НО.

Для получения прототипов аллерговакцин на основе аллергоида пыльцы тимофеевки или березы и СП-НО был выбран способ образования тройных полимер-металлических комплексов.

Безопасность обеспечивается наличием лишь 5 ионов меди на 600 слабозаряженных N-оксидных групп. Технологичность исключительно высокая - на

фоне предварительного комплексообразования двух соединений добавляется расчетное количество соли меди с образованием "скрепок" между молекулами, что обуславливает устойчивость комплекса при физиологических условиях.

5 Пример 18. Получение аллерговакцин на основе аллергоида (Алд) пыльцы тимофеевки или березы и СП-НО (на примере СП-НО-3-1).

5 мг СП-НО растворяют в 10 мл 0,1 N фосфатного буфера pH 7,2, добавляют 5,0 мкг CuSO_4 .

10 Затем при энергичном перемешивании добавляют 5,0 мкг аллергоида пыльцы тимофеевки (или березы), растворенного в 5 мл фосфатного буфера. Смесь выдерживают в течение 8 часов при температуре $4\pm 2^\circ\text{C}$. Раствор высушивают лиофильно. В полученном препарате соотношение Алд:СП-НО составляет 1:100.

15 При изменении соотношения компонентов в реакционной смеси получают препараты с различным количеством белка и различным соотношением Аллергоида и СП-НО в составе препаратов. Для оценки аллергенной активности отобраны три образца, полученные по описанной методике, с содержанием аллергоида (по определению белка методом Кьельдаля) в составе конъюгатов:

- 20 - в образце №1 Алд:СП-НО 1:100, белок 10 мкг/мг препарата;
- в образце №2 Алд:СП-НО 1:20, белок 50 мкг/мг;
- в образце №3 Алд:СП-НО 1:10, белок 41 мкг/мг.

Пример 19. Оценка аллергенной активности комплексных препаратов *in vivo*.
Определение иммуногенной активности различных форм аллергенных препаратов.

25 Оценка аллергенной активности комплексных препаратов *in vivo* проводилась с использованием методов активной кожной анафилаксии (АКА) и пассивной кожной анафилаксии (ПКА) у сенсibilизированных морских свинок, а также при изучении способности конъюгированных форм препаратов инициировать образование IgE-АТ у мышей. Указанные методы позволяют адекватно оценить аллергенные свойства
30 препаратов.

Тест ингибции при проведении иммуноферментного анализа (ИФА) показал, что конъюгированные препараты снижают аллергенную активность нативного препарата на 60%.

35 Изучение аллергенной активности нативного аллергена, аллергоида и образцов №1, №2, №3 в реакции АКА сенсibilизированных морских свинок.

Сенсibilизация морских свинок аллергеном березы формировала устойчивую гиперчувствительность как немедленного, так и позднего типов.

40 Интенсивность аллергических реакций на специфический аллерген практически не меняется, начиная с 3-х недель после начала сенсibilизации на протяжении последующих трех месяцев.

Сенсibilизация выражается в наличии положительных реакций АКА, интенсивность которой зависит от количества введенного внутрикожного нативного аллергена. Дозовая зависимость интенсивности реакции АКА хорошо прослеживается
45 как при регистрации диаметра окрашенных пятен на месте введения аллергена, так и при определении количества экстрагированной краски.

50 При дозе введенного аллергена 5 мкг реакция АКА развивалась лишь у отдельных животных. С другой стороны, увеличение количества внутрикожно введенного аллергена свыше 100 мкг вызывало прокрашивание не только кожи, но и подлежащих тканей, что затрудняет оценку реакции. Исходя из этого, в основном числе опытов использованы дозы аллергена 5-100 мкг.

При введении аллергоида и образца №2 в таких дозах была значительно слабее, чем

на соответствующие дозы нативного аллергена, образцов №1 и №3. Интенсивность АКА, определяемая по количеству вышедшей краски в месте аллергической реакции, при введении алергоида и образца №2 уменьшалась по сравнению с нативным контролем, образцов №1 и №3, при использовании 100 мкг аллергена на 25%, при введении 50 мкг - на 30% и при введении 25 мкг - на 10%. При введении 12,5 мкг у большинства животных немедленная аллергическая реакция не развивалась.

Аллергенная активность комплексных препаратов в реакции ПКА

Сенсибилизация мышей аллергеном, алергоидом и вакцинирующими препаратами образцов №1, №2 и №3 вызывает у них образование IgG-АТ, которые определяют при постановке ПКА на крысах в разведениях 2/2-1/32 при введении разрешающей дозы нативного аллергена с синим Эванса.

Предельный титр сыворотки, полученной при сенсибилизации мышей нативным аллергеном и образцом №1, равнялся 1/16. В вариантах с алергоидом и образцами №2 и №3 полученный титр сыворотки был значительно снижен. Таким образом, с помощью реакций АКА и ПКА показано, что конъюгированные Алд с СП-НО в соотношении 1:20 и 1:10 снижают образование IgG-АТ в крови сенсибилизированных животных.

Влияние иммунизации аллергеном березы, алергоидом и комплексными препаратами Алд с СП-НО на образование IgG-АТ

В результате иммунизации мышей нативным аллергеном, алергоидом и вакцинирующими препаратами образцов №1, №2 и №3 через 3, 5, 6, 7 недель после начала иммунизации у животных в крови определялись IgG-АТ в титрах 1/8-1/32.

Уровень IgG-АТ у иммунизированных мышей во всех вариантах опыта изменялся с течением времени. Так, титр сыворотки к 21 дню в вариантах с алергоидом, аллергеном, образцом №1 равнялся 1/32, а при иммунизации образцами №2 и №3 он достигал максимальной величины только на 42 день после начала иммунизации и оставался у них на достаточно высоком уровне до 49 дня. Титр сыворотки, в которой определялся уровень IgG-АТ в варианте с алергоидом, снижался вплоть до 42 дня и незначительно повышался к 49 дню от начала иммунизации.

Из полученных данных следует, что аллергены в форме комплексов с СП-НО вызывают более интенсивный иммунный ответ.

Проведено изучение эффективности конъюгации Алд с СП-НО методом специфической гипосенсибилизации сенсибилизированных морских свинок.

После завершения курса специфической гиперсенсибилизации интенсивность АКА была наибольшей у контрольных животных, ее принимают за 100%.

Гиперсенсибилизация нативным аллергеном и образцом №1 уменьшила интенсивность АКА, по сравнению с контролем, при введении 200 мкг аллергена на 35% и при введении 25 мкг аллергена на 50%. Значительно более эффективна была гиперсенсибилизация образцом №2. По сравнению с контролем интенсивность АКА снижается в этом случае при введении 200 мкг аллергена на 65%, а при введении 25 мкг аллергена практически на 100%.

Интенсивность реакции для алергоида снижалась при введении 200 мкг аллергена березы на 50%.

Аналогичные результаты получают при гиперсенсибилизации морских свинок различными формами аллергенов в реакциях ПКА.

Максимальный титр сыворотки 1/32 получен во всех вариантах исследований.

Однако количество вышедшей краски из кожи животных, что соответствует интенсивности реакции, в опытах с образцом №1 наблюдалось (50%) по сравнению с

реакцией у животных, которым вводили образец №2 и аллергоид.

С помощью ИФА в сыворотке крови гипосенсибилизированных морских свинок различными формами аллергенов из пыльцы березы определяют уровень аллерген-специфических IgG-АТ.

5 Результаты исследований показывают, что титры IgG-АТ у животных, гипосенсибилизированных аллергоидом и образцом №1, равны 1/8, что выше контроля, тогда как при гипосенсибилизации образцом №2 титр IgG-АТ равен 1/6. Таким образом, из всех исследованных препаратов самой высокой иммуногенной
10 активностью обладает образец №2 в инъекции 5,0 мкг.

В результате проведенных исследований было доказано:

1. При комплексообразовании аллергенов снижается риск получения реакций анафилактического типа.

15 2. Введение аллергенов в комплексе с СП-НО в организм животного не сопровождается увеличением IgE-антител в крови.

3. Аллергены в комплексе с СП-НО при введении в организм животного стимулируют увеличение IgG-антител.

4. Препараты аллергена, аллергоида и Алд: СП-НО в испытуемых дозах (250 мкг
20 белка / кг веса жив.) нетоксичны.

5. Комплекс аллергоид - СП-НО (образец №1) обладает (в сравнении с другими препаратами) более выраженной (в 1,5-2 раза) гипосенсибилизирующей активностью.

6. Комплексообразование аллергенов можно рассматривать как общий
25 методический принцип, позволяющий достигнуть снижения риска анафилаксии на введение аллергенов в организм.

В примере 20 описано получение вакцинных композиций на основе СП-НО как веществ, обладающих иммуноадьювантным действием. Использование патентуемых соединений СП-НО-1-1, СП-НО-2-1, СП-НО-3-1 для получения вакцинных композиций
30 обусловлено их выраженными иммуноадьювантными свойствами.

Пример 20. Получение вакцинных композиций на примере комбинированной адьювантной дивакцины против гепатита А и В.

35 Комбинированная гепатитная ди-(А+В)-вакцина с использованием патентуемых соединений СП-НО может быть предназначена для профилактической вакцинации различных групп населения против вирусных гепатитов. Применение комбинированной вакцины с уменьшенной антигенной нагрузкой позволит снизить частоту регистрации общих и местных реакций, а также значительно снизит стоимость
40 вакцинопрофилактики против гепатитов А и В. При этом перспективным является применение комбинированных адьювантных вакцин с уменьшенной антигенной нагрузкой для лиц со сниженными показателями иммунитета, а также для лиц, проживающих в экологически неблагоприятных регионах.

45 Внедрение в практику дивакцины с СП-НО позволит значительно повысить охват населения прививками против вирусных гепатитов по сравнению с использованием монопрепаратов, значительно удешевит процедуру вакцинации и стоимость защиты населения одновременно против двух инфекций.

Приготовление образца дивакцины против гепатита А и гепатита В (А плюс В).

50 Дивакцина может производиться на основе субстанции вакцины гепатита А и вакцины гепатита В путем смешивания полуфабрикатов с последующим добавлением концентрированного раствора СП-НО.

Для производства дивакцины используют: 1) суспензию инактивированных вирионов гепатита А (штамм ЛБА-86 или ВБА-07), выращенных на культуре

перевиваемых клеток 4647, с активностью 80 ИФА ед./мл и 2) антиген гепатита В - белок HBsAg, синтезированный рекомбинантным штаммом дрожжей, содержащий антигенные детерминанты поверхностного антигена вируса гепатита В (подтип ауw) в концентрации 20 мкг/мл, сорбированный на гидроокиси алюминия; 3) СП-НО (вариант СП-НО-3-1). Для получения 100 мл дивакцины с СП-НО в асептических условиях в защищенной от света посуде указанные выше полуфабрикаты вакцин гепатита А и В смешивают в соотношении 1:1, затем при постоянном перемешивании порциями добавляют 20 мг СП-НО и оставляют перемешивать в течение не менее 15 минут.

Для исследования отобраны 3 образца дивакцины «А+В» (Г-1, Г-2, Г-3) с содержанием компонента вируса гепатита В 10 мкг, компонента вируса гепатита А 40 - ИФА ед. и 200 мкг СП-НО, отличающиеся технологией смешивания компонентов.

Пример 21. Изучение поствакцинального иммунитета против гепатита А и гепатита В.

Изучение поствакцинального иммунитета против гепатита А и гепатита В проводят по оценке специфичности иммунного ответа на различные варианты вакцины против гепатита А и гепатита В.

Выбраны варианты кандидатной вакцины образцы ГП-1, ГП-2, ГП-3, имеющие одинаковое количество антигенов и иммуномодулятора СП-НО, но различающиеся по содержанию гидроокиси алюминия и способу приготовления кандидатного вакцинного препарата. В качестве препаратов сравнения используют коммерческие вакцины, содержащие разрешенные к применению дозировки вирусных компонентов, рекомендованные для медицинского применения:

- «вакцина против гепатита В» с содержанием вирусного компонента 20 мкг (ГП-4);
- смесь антигенов гепатита В в количестве 20 мкг и антигена гепатита А в количестве 80 ИФА без СП-НО (ГП-5).

Для иммунизации используют мышей линии balb/c, самцов, возраст 6-8 недель, вес 18-20 г.

Препараты вводят подкожно в 2 точки в объеме 1 мл. Из каждой группы по 6 животных иммунизируют однократно (с забором сыворотки на 14 день), по 6 животных - двукратно (с забором сыворотки на 28 день) и оставшиеся по 6 животных каждой групп - трехкратно с забором сыворотки на 42 день после первой иммунизации. Для выявления анти HBs антител используют коммерческие диагностикумы «ДС-ИФА-АНТИ-HBs» (НПО «Диагностические системы»).

Результаты оценки иммунного ответа, приведенные в таблице 12, показывают, что иммунизация различными вариантами кандидатных вакцин против вирусов гепатита А и В вызывает образование анти-HBs-антител у всех животных уже после первого введения препарата, при этом оптическая плотность (ОП) всех сывороток превышала ОП критическую. Оценка иммунного ответа на инактивированный вирус гепатита А показала, что в группе кандидатных вакцин антитела выявлялись у всех животных после каждого введения вакцин так же, как и в группах коммерческих препаратов.

Титры антител, вызванные различными вариантами кандидатных вакцин и контрольными препаратами, содержащими вдвое большие дозировки вирусных компонентов (монопрепарат HBs антигена с гидроокисью алюминия и дивакцины, содержащей HBs-антиген, инактивированный вирус гепатита А и гидроокись алюминия), сопоставимы.

Пример 22. Оценка иммуногенности конъюгатов и комплексов СП-НО с гемагглютинином (ГА) и нейраминидазой (НА) у животных с различными генотипами.

Получение вакцинирующих соединений на примере конъюгатов и комплексов СП-НО с поверхностными протективными антигенами вируса гриппа осуществляют по описанным выше известным методикам с использованием азидного метода конъюгации или реакции комплексообразования.

Одной из задач адьюванта является усиление иммунного ответа генетически слабо реагирующих особей. Другими словами, адьювант, обладая иммуностимулирующими свойствами, резко усиливает иммуногенные свойства антигенов и индуцирует высокий иммунный ответ у генетически низко реагирующих особей до уровня сильно реагирующих. В данной работе проведена оценка возможности фенотипической коррекции иммуноадьювантом СП-НО (500 мкг) гуморального ответа мышей разных линий на одно- и двукратную иммунизацию

- 1) гемагглютинином вируса гриппа в дозе 1 мкг;
- 2) гемагглютинином в той же дозе в комплексе с СП-НО;
- 3) конъюгатом 1 мкг гемагглютинина с СП-НО. В экспериментах использовали половозрелых мышей линий A/Sn, B10CW, CC57W, CBA.

На графиках фиг.2 представлены результаты сравнительных исследований выработки противогриппозных антител после первичной и вторичной иммунизации, где по оси ординат показан уровень противогриппозных антител в сыворотке крови мышей разных линий в единицах оптической плотности сывороток крови при однократном и повторном (1-2 по оси абсцисс) введении препарата:

- а) гемагглютинина вируса гриппа;
- б) гемагглютинина с Полиоксидонием;
- в) конъюгата гемагглютинина с СП-НО.

При иммунизации чистым гемагглютинином наибольшая выработка антител зарегистрирована у мышей линии B10CW, наименьшая - у мышей линий CBA и CC57W после повторной иммунизации. Мыши линии A/Sn занимали промежуточное положение. При введении антигена в комплексе с СП-НО отмечено усиление иммунного ответа у мышей всех линий в разной степени выраженности: продукция антител резко возросла у A/Sn, выражено - у мышей линии CBA и в меньшей степени - у сильно реагирующей на антиген линии - B10CW.

В случае иммунизации мышей конъюгатом с СП-НО титр антител у мышей всех исследованных линий заметно увеличился фактически до одних и тех же величин (данные представлены в таблице 13).

Данные, представленные в таблице 13, подтверждают, что включение иммуноадьюванта СП-НО в состав вакцинного препарата (как в виде комплекса, так и в виде конъюгата) приводит к коррекции генетически детерминированного гуморального иммунного ответа: уровень антителообразования у особей с низкой реактивностью на антиген значительно возрастает, в то время как иммунный ответ у высоко реагирующих особей увеличивается в меньшей степени по сравнению с ответом на «чистый» антиген.

Таким образом, сополимеры гетероцепных алифатических аминов и гетероцепных алифатических N-оксидов (СП-НО) являются водорастворимыми, нетоксичными высокомолекулярными синтетическими соединениями с большой степенью полярности и адсорбционной способности, способные деструктурировать на низкомолекулярные фракции и легко выводиться из организма, в широком диапазоне доз активирует макрофагальное звено, гуморальный иммунный ответ, повышает резистентность клеточных мембран к цитотоксическому действию обладают широким спектром фармакологических свойств, принципиально важных для создания на их

основе препаратов и вакцин, высокой биодоступностью, способностью к выведению из организма, безопасностью применения.

Таблица 1

Характеристики сополимеров, полученных по методикам с варьирующимися соотношениями исходных компонентов и параметров реакции

Образец	Растворитель	Концентрация исх. ПА	Кол-во H ₂ O ₂ 30%	Температура (°C)	Продолжи- тельность	ММ исх., ПА	q треб. своб.	z окисл.	n
СП-NO-1-1	96% этил. спирт	10 г в 300 мл	20 мл	4-6	10 час	70000 Д	0,35	0,65	620
СП-NO-1-2	96% этил. спирт	10 г в 500 мл	3 мл	4	3 час	1500 Д	0,9	0,1	10
СП-NO-1-3	96% этил. спирт	10 г в 300 мл	30 мл	4	20 час	100000 Д	0,2	0,8	800
СП-NO-2-1	0,1 N уксусная кислота	10 г в 150 мл	20 мл	4	24 час	75000 Д	0,2	0,8	650
СП-NO-2-2	0,1 N уксусная кислота	10 г в 300 мл	10 мл	4	20 час	10000 Д	0,6	0,4	600
СП-NO-2-3	0,1 N уксусная кислота	10 г в 200 мл	15 мл	4	25 час	50000 Д	0,5	0,5	850
СП-NO-3-1	0,1 N уксусная кислота	10 г в 400 мл	20 мл	4-6	35 час	80000 Д	0,25	0,75	700
СП-NO-3-2	0,1 N уксусная кислота	10 г в 150 мл	30 мл	4-6	45 час	30000 Д	0,1	0,9	200
СП-NO-3-3	0,1 N уксусная кислота	10 г в 200 мл	15 мл	4	25 час	15000 Д	0,5	0,5	900

Таблица 2

Фармакокинетические параметры СП-NO

Фармакокинетические параметры	Обозначение	Единицы измерения	СП-NO-3-1	СП-NO-2-1	СП-NO-1-1
Максимальная концентрация в плазме крови	C _{max}	Мкг/мл	17,5±0,20	21,4±0,6	19,8±0,3
Время достижения максимальной концентрации в плазме крови	T _{max}	час	0,65±0,1	0,83±0,15	0,43±0,1
Период полураспределения быстрая α-фаза	T _{1/2α}	час	0,44±0,06	0,56±0,07	0,31±0,05
Период полураспределения медленная β-фаза	T _{1/2β}	час	36,2±7,78	43,2±8,3	24,6±6,17
Среднее время пребывания препарата в организме	MRT	час	38,7±6,75	57±8,5	27,1±5,3
Относительная биодоступность	f	%	89,4±5,77	81,6±7,2	95,4±3,1

Таблица 3

Детоксикационные свойства СП-NO

Группа	Доза (мг/кг МРМ СП-NO)		Введенный объем, мл/20 г	Количество мышей в группе	Смертность мертвых/живых
Контроль	-	-	0,5	6	0/6
МРМ	5	-	0,25	6	3/3
МРМ	10	-	0,5	6	6/0
МРМ+СП-NO-3-1	10	10	0,5	6	2/4
МРМ+СП-NO-3-2	10	50	0,5	6	1/5
МРМ+СП-NO-1-2	10	30	0,5	6	1/5
МРМ+СП-NO-2-1	10	20	0,5	6	2/4

Таблица 4

Антидотные свойства СП-NO-3-1 при воздействии летальных доз солей меди

Группы животных	Дозы препаратов, мг/кг		% гибели животных на 1-2 сутки	Выживаемость животных на 30 сутки (%)
	CuSO ₄	СП-NO-3-1		
1	-	-	0	100
2	12,5	-	100	0
3	25,0	-	100	0
4	50,0	-	100	0
5	12,5	12,5	0	100
6	25,0	25,0	0	100
7	50,0	50,0	0	100

Таблица 5

Детоксикационные и мембраностабилизирующие свойства СП-NO (на модели гемолиза эритроцитов под действием кремнезема)

№ групп	Исследуемое соединение		Гемолиз, %	Защита от гемолиза, %
	Наименование препарата	Доза, Мкг/мл		

1	Раствор Хенкса	3 мл	100,0	0
2	СП-NO-3-2	5	33,3*	66,7*
3		10	19,7*	80,3*
4		50	5,4*	94,6*
5	Гемодез	1000	66,6	33,4
6		15000	17,9*	82,1*
7	Полиглокин	15000	82,8	17,2
8	Альбумин	100	82,0	18,0
9		1000	13,5*	86,5*

* указаны статистически достоверные различия с группой 1 при наименьшем значении уровня значимости $p < 0,01$

Таблица 6

Иммуностимулирующая активность СП-NO

Препарат	Параметры препарата	Доза препарата, мг/мышь	Коэффициент стимуляции	Способ введения
СП-NO-1-1	$n=620, q=0,35n, z=0,65n$	100,0	6,2	подкожно (п/к)
СП-NO-1-2	$n=10, q=0,9n, z=0,1n$	1000,0	3,2	внутрибрюшинно (в/б)
СП-NO-1-3	$n=800, q=0,2n, z=0,8n$	1,0	6,3	п/к
СП-NO-2-1	$n=650, q=0,2n, z=0,8n$	10,0	6,1	п/к
СП-NO-2-2	$n=600, q=0,6n, z=0,4n$	500,0	4,4	в/б
СП-NO-2-3	$n=850, q=0,5n, z=0,5n$	200,0	5,3	п/к
СП-NO-3-1	$n=700, q=0,25n, z=0,75n$	50,0	6,5	п/к
СП-NO-3-2	$n=200, q=0,1n, z=0,9n$	100,0	3,8	в/б
СП-NO-3-3	$n=900, q=0,5n, z=0,5n$	20,0	6,8	п/к

Таблица 7

Характеристики полученных вариантов противотуберкулезной вакцины

Серия	Доза АК, мкг/мышь	Доза по белку, мкг/мышь	Доза СП-NO, мкг/мышь	Соотношение АК/СП-NO	Соотношение белок/СП-NO
Препарат 1	100	5,0	500	1:5	1:100
Препарат 2	50	2,5	500	1:10	1:200

Таблица 8

Высеваемость микобактерий из легких и селезенки зараженных мышей после введения препаратов

№ группы	Обозначение группы	Количество КОЕ в легких	Количество КОЕ в селезенке
1	Препарат 1	$(3,2 \pm 0,7) \times 10^7$	$(3,2 \pm 0,7) \times 10^6$
2	Препарат 2	$(4,2 \pm 1,2) \times 10^7$	$(2,6 \pm 0,5) \times 10^6$
3	Препарат 3	$(6,2 \pm 0,4) \times 10^7$	$(5,2 \pm 1,1) \times 10^6$
4	Контроль	$(5,6 \pm 1,6) \times 10^7$	$(8,1 \pm 2,6) \times 10^6$

Таблица 9

Выживаемость вакцинированных животных

№ группы	Количество животных в группе	Обозначение группы	Среднее время жизни (дни)
1	9	Препарат 1	$44 \pm 4,8$
2	7	Препарат 2	>64
3	9	Препарат 3	$32 \pm 5,3$
4	11	БЦЖ (Prague) 10^6	$53 \pm 7,7$
5	9	Контроль	$28 \pm 1,6$

Таблица 10

Защитные свойства серий конъюгатов Ви-антигена с СП-NO

Препарат	Доза иммунизации, мкг Ви-ПС/мышь	Доза заражения (Ту №4446) через месяц	Процент выживших животных
Образец 1	5	1,2	100
		3,6	100
		10,8	100
Образец 2	5	1,2	100
		3,6	100
		10,8	25
Ви-ПС	5	1,2	40
		3,6	25
		10,8	0
Коммерческая вакцина	5	1,2	100
		3,6	40
		10,8	0

Таблица 11

Температурная реакция у кроликов после введения коммерческой вакцины и вакцины Ви-ПС с СИ-НО

№ крол	Препарат	Доза, мкг	Измерение (°C)				
			исходн.	1 час	2 часа	3 часа	сутки
1.	Образец №1	1000	39,4	39,1	39,25	39,45	39,1
			38,8	39,1	39,7	39,55	38,9
			38,6	39,6	39,45	39,55	38,6
4.	Образец №2	200	38,85	38,6	38,7	39,05	38,7
			39,05	39,0	38,9	39,0	38,6
			38,4	38,8	38,95	38,3	38,4
7.	Вакцина химическая сорбирован.	40	39,1	40,55	39,7	39,95	38,1
			39,0	39,8	39,75	39,2	39,8
			38,2	40,1	39,4	39,25	39,1

Таблица 12

Титры антител, вызванные различными вариантами кандидатных вакцин

Группа	ГП-1		ГП-2		ГП-3		ГП-4		ГП-5	
	ОП	ОП/ОПкрит	ОП	ОП/ОПкрит	ОП	ОП/ОПкрит	ОП	ОП/ОПкрит	ОП	ОП/ОПкрит
После первой иммунизации										
Ср. знач.	1,1	7,8	0,7	4,5	1,0	7,2	1,1	7,7	0,9	6,5
Откл	0,90	6,1	0,2	1,2	0,8	5,4	1,0	6,7	0,3	2,0
После второй иммунизации										
Ср. знач.	2,4	16,6	2,7	18,9	2,7	18,6	2,4	16,4	2,8	19,1
Откл	0,6	4,0	0,3	2,2	0,4	2,4	0,3	2,2	0,3	1,8
После третьей иммунизации										
Ср. знач.	3,0	20,6	2,9	19,8	2,8	19,6	3,0	20,7	2,6	17,7
Откл	0,0	0,3	0,2	1,2	0,3	2,0	0,0	0,0	0,5	3,4

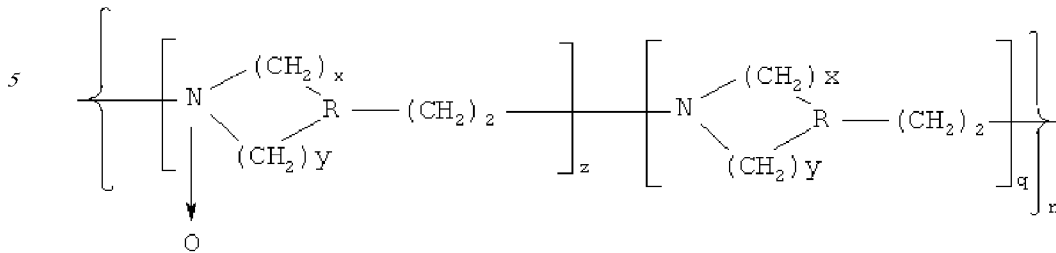
Таблица 13

Выработка антител мышами разных линий через 2 недели после повторной иммунизации препаратами, содержащими гемагглютинин вируса гриппа (титр антител в ИФА)

Линия мышей	Средний титр антител к гемагглютнину при иммунизации мышей		
	Гемагглютинин (ГА)	Комплекс ГА с иммуноадывантом СИ-НО	Конъюгат ГА с иммуноадывантом СИ-НО
СС57W	57052	99334	2408995
В10СW	489178	561918	2767209
СВА	57052	262144	1290948
A/Sp	161369	741455	3913424

Формула изобретения

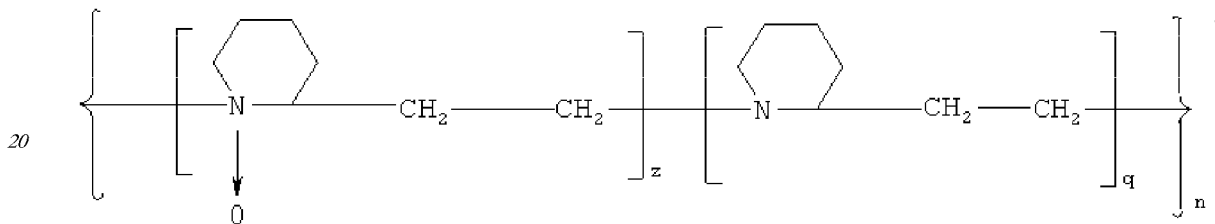
1. Сополимеры гетероцепных алифатических поли-N-оксидов общей формулы (I):



где R=N, CH;

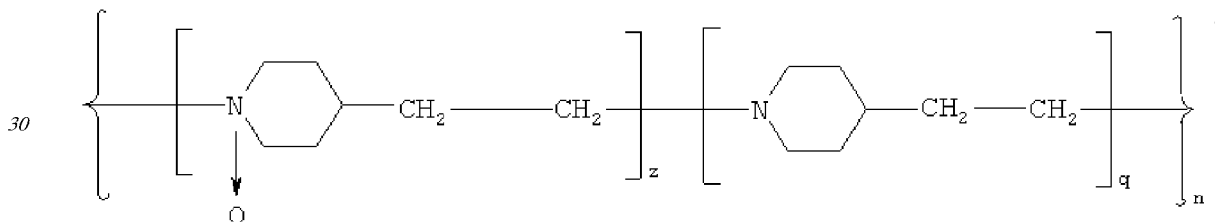
x=2-4; y=0, 2; n=10-1000; q=(0,1-0,9)n; z=(0,1-0,9)n, обладающие фармакологической активностью.

15 2. Сополимер по п.1, характеризующийся тем, что R=CH; x=4, y=0, имеет формулу (2):



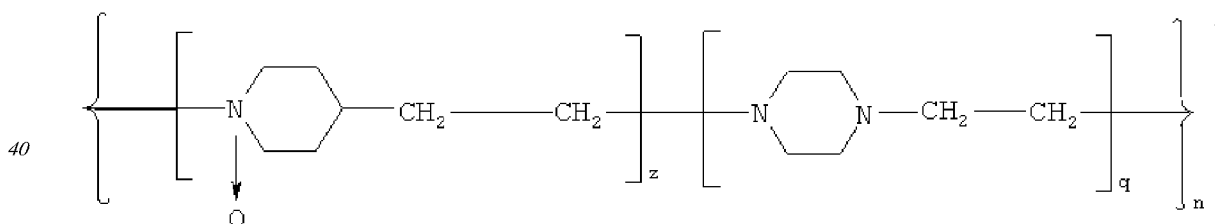
является сополимером конидина и N-оксида конидина.

25 3. Сополимер по п.1, характеризующийся тем, что R=CH; x=2, y=2, имеет формулу (3):



является сополимером хинуклидина и N-оксида хинуклидина.

35 4. Сополимер по п.1, характеризующийся тем, что R=N; x=2, y=2, имеет формулу (4):



является сополимером триэтилендиамина и N-оксида триэтилендиамина.

45 5. Сополимер по п.1, обладающий антиоксидантным действием.

6. Сополимер по п.1, или 2, или 3, или 4, обладающий терапевтическим действием в качестве детоксиканта.

7. Сополимер по п.1, обладающий терапевтическим действием в качестве иммуномодулирующего агента.

50 8. Сополимер по п.1, представляющий собой иммуноадъювант.

9. Сополимер по п.1, представляющий собой иммуномодулирующий носитель антигена или лекарственного вещества.

10. Вакцинирующее средство, включающее антиген и иммуномодулирующий

носитель, отличающееся тем, что оно содержит в качестве иммуномодулирующего носителя сополимер по п.1.

11. Вакцинирующее средство по п.10, отличающееся тем, что оно представляет собой конъюгат антигена с сополимером по п.1 при наличии в структуре антигена реакционноспособных функциональных групп.

12. Вакцинирующее средство по п.10, отличающееся тем, что оно представляет собой соединение, полученное в результате реакции комплексообразования антигена с сополимером по п.1.

13. Вакцинирующее средство по п.10, отличающееся тем, что оно представляет собой композицию, полученную в результате смешивания антигена с сополимером по п.1.

14. Вакцина против гепатита А и гепатита В, характеризующаяся тем, что она содержит вакцинный препарат, включающий одновременно АГ ВГА и НВsAg или вакцинные препараты против гепатита А и против гепатита В и сополимер гетероцепных алифатических поли-N-оксидов по п.1.

15. Вакцина по п.14, отличающаяся тем, что она содержит в качестве АГ ВГА антигены, полученные из штамма ЛБА-86 вируса гепатита А в культуре перевиваемых клеток 4647, а содержание компонентов в дозе составляет:

АГ ВГА	40-60	ИФА ед.
НbsAg	2,5-20	мкг
СП-NO	0,1-10	мг

16. Вакцинная композиция, включающая вакцинный препарат и иммуноадъювант, отличающаяся тем, что она содержит в качестве иммуноадъюванта сополимер по п.1.

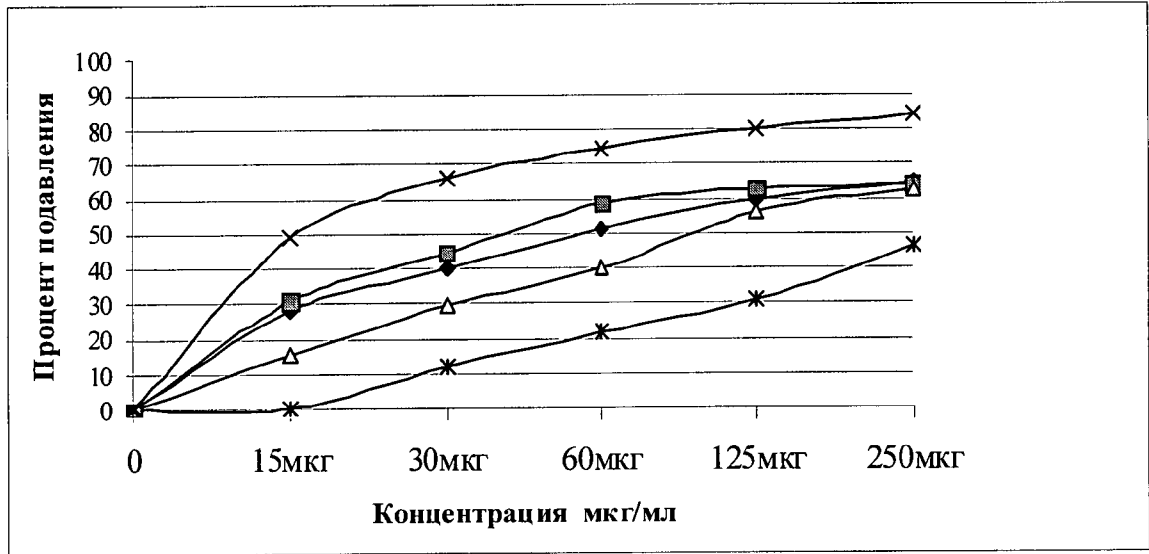
17. Лекарственное средство, включающее лекарственное вещество и носитель, отличающееся тем, что оно содержит в качестве носителя сополимер по п.1.

18. Лекарственное средство по п.17, отличающееся тем, что оно представляет собой конъюгат лекарственного вещества с сополимером по п.1 при наличии в структуре лекарственного вещества реакционноспособных функциональных групп.

19. Лекарственное средство по п.17, отличающееся тем, что оно представляет собой соединение, полученное в результате реакции комплексообразования лекарственного вещества с сополимером по п.1.

20. Лекарственное средство по п.17, отличающееся тем, что оно представляет собой фармацевтическую композицию, полученную в результате смешивания лекарственного вещества с сополимером по п.1.

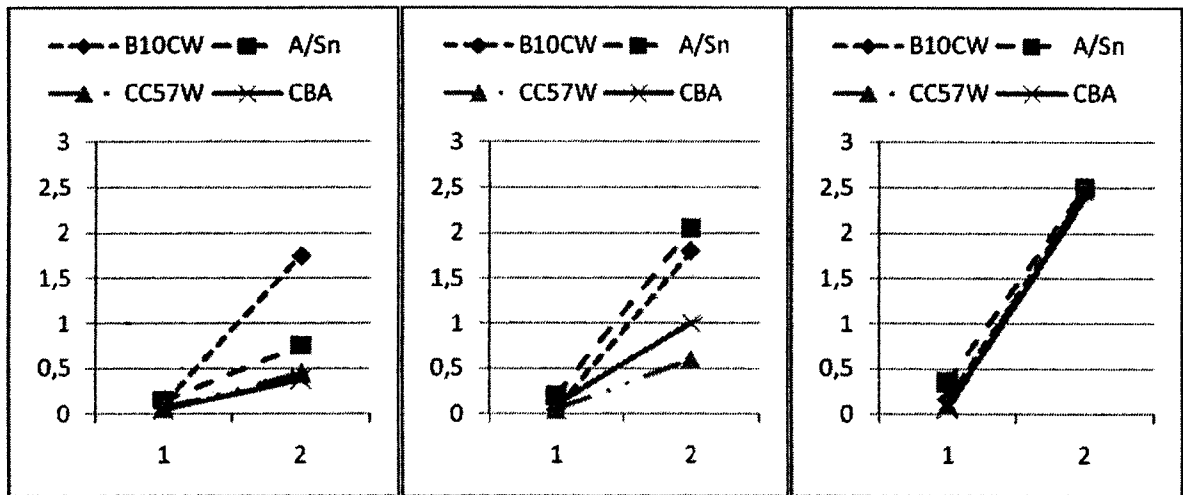
Влияние СП-NO-3 на радикальную реакцию по способности подавлять образование активных форм кислорода.



-x - СП-NO-1-1; -△- СП-NO-3-2; -■- СП-NO-2-1; -◆- СП-NO-3-1; -* - референс препарат

Фиг. 1

Результаты сравнительных исследований выработки противогриппозных антител после первичной и вторичной иммунизации



а)

б)

в)

Фиг. 2