

Настоящее изобретение относится к олигомерам, их использованию, а также к способу их получения. Олигомеры настоящего изобретения являются анионными соединениями и обладают значительной активностью против вируса человеческого иммунодефицита, а поэтому указанные олигомеры могут быть использованы для лечения синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа).

В настоящее время множество научных исследований направлено на разработку лекарственных средств для лечения вирусных заболеваний человека и животных. Особый интерес для ученых представляет СПИД и СПИД - ассоциированный комплекс (САК) человека, распространенность которых возрастает с угрожающей скоростью. Продолжительность жизни больных СПИДом составляет примерно 5 лет, и пациенты с этим заболеванием, чья иммунная система подвержена серьезным нарушениям, страдают от различных заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, например, саркомы Капоши, пневмоцидоза (*Pneumocystis carinii* pneumonia). Эффективного средства от СПИДа пока не существует, а имеющиеся средства являются далеко не адекватными при их практическом использовании и вызывают множество неблагоприятных побочных эффектов. Страх перед заболеванием СПИДом у людей приводит к социальному ostracismu и дискриминации против людей с заболеванием СПИДом или подозреваемых в этом заболевании.

Ретровирусы принадлежат к классу вирусов, содержащих рибонуклеиновую кислоту (РНК), которая реплицируется с помощью обратной транскриптазы, образуя нить комплиментарной ДНК (кДНК), из которой продуцируется двухнитевая провирусная ДНК. Эту провирусную ДНК затем методом рандомизации вводят в хромосомную ДНК хозяйской клетки, делая возможной репликацию генома вируса путем поздней трансляции вирусной РНК из интегрированного вирусного генома.

Многие из известных ретровирусов являются онкогенными или вызывают образование опухолей. В самом деле, первые два ретровируса, обнаруженные у человека, так называемые вирусы 1 и 11 лимфолейкоза или HTLV-1 и 11, вызывают редкую форму лейкоза у человека после инфицирования Т-лимфоцитов. Третий вирус, обнаруженный у человека, HTLV -111, называемый в настоящее время ВИЧ, вызывает гибель клеток после инфицирования Т-лимфоцитов и идентифицируется как возбудитель СПИДа и САК.

Белок оболочки вируса ВИЧ представляет собой гликопротеин 160 кД. Этот белок расщепляется протеазой с образованием внешнего белка 120кД, gp120, и трансмембранного гликопротеина, gp41. Белок gp20 содержит аминокислотную последовательность, распознающую антиген CD4 на Т-хелперных (T4) клетках человека.

Некоторые исследования были направлены на попытку, помешать связыванию ВИЧ с его мишенью, T4-клетками человека. Эти T4-клетки имеют специфическую область, CD4-антиген, которая взаимодействует с gp20. Если помешать этому взаимодействию, то инфицирование хозяйской клетки может быть ингибировано.

Интерференция путем образования вирусного оболочечного гликопротеина должна помешать начальному взаимодействию вируса и хозяйской клетки, или последующему слиянию, или должна помешать дупликации вируса путем предупреждения формирования собственного гликопротеина, требуемого для завершения вирусной мембраны. В работе H.A. Blough и др. [Biochem. Biophys. Res. Comm. 141 (1), 33-38 (1986)] указывается, что неспецифические ингибиторы гликозилирования 2-дезоксид-Д-глюкоза и β-гидроксид-норваллин ингибируют экспрессию ВИЧ-гликопротеинов и блокируют образование синтиетив. Вирусное размножение ВИЧ-инфицированных клеток, обработанных указанными агентами, прекращается, вероятно, из-за отсутствия гликопротеина, необходимого для формирования вирусной мембраны. В другой работе [W. McDowell и др. Biochemistry 24(27), 8145-52 (1985)], ингибитор гликозилирования 2-дезоксид-2-фторо - Д-манноза показывает ингибирование противовирусной активности против вируса гриппа инфицированных клеток путем предотвращения гликозилирования белка вирусной мембраны. В этой работе также исследовалась противовирусная активность 2-дезоксиглюкозы и 2-дезоксид-2-фторглюкозы, и в результате этих исследований было обнаружено, что каждое из этих соединений ингибирует гликозилирование вирусного белка различными механизмами. Однако другие известные ингибиторы гликозилирования не обнаруживали противовирусной активности. Поэтому противовирусная активность вообще, и активность против конкретного вируса ингибиторов гликозилирования является абсолютно непредсказуемой.

В Южно-африканском патенте 90/0094, выданном 31 окт. 1990, указывается, что очищенная форма гепарина, сульфатированного полисахарида, связывается посредством взаимодействия с вирусным белком, который является ответственным за распознавание клетки, и способствует ограничению ингибированию инфицирования хозяйской клетки. Однако гепарин оказывает некоторые побочные действия, например, вызывает геморрагию, и ускоряет образование тромбов, а также вызывает тромбоцитопению. Использование гепарина противопоказано пациентам, со склонностью к кровотечениям, или пациентам с гемофилией, пурпурой, тромбоцитопенией, внутричерепным кровотечением, септическим эндокардитом, активным туберкулезом, повышенной проницаемостью капилляров, язвами желудочно-кишечного тракта, осложненной гипертензией, угрожающим абортom или раком внутренних органов. Эти противопоказания особенно касаются больных гемофилией, поскольку они особенно предрасположены к заболеванию, вызываемому ВИЧ.

Уже давно известно, что синтетические водорастворимые полимеры показывают широкий спектр биологической активности [(R.M. Ottenbrite, "Biological Activities of Polymers", Amer. Chem. Soc. Symp. Ser № 182, стр205-220, изд. C.E. Carraher и C.G. Gebelein (1982)]. Сополимер дивинилового эфира и ангидрида малеиновой кислоты обладает активностью против ряда вирусов, и возможность его использования в противораковой химиотерапии многие годы исследовалась Breslow D.S. [Pure and Applied Chem., 46, 103 (1976)]. Полиакриловые, полиметакриловые и ряд других алифатических водо-растворимых полимеров также показывают широкий спектр биологической активности [W. Regefson и др., Nature 186, 778 (1960)]. К сожалению, слишком высокая токсичность этих полимеров не позволяет использовать их в клинических

условиях. Кроме того, эти полимеры имеют большую молекулярную массу и неспособны, проходить через почечные мембраны.

Для решения проблем, связанных с токсичностью полимеров были предприняты попытки, синтезировать низкомолекулярные алифатические полимеры (1000-10000) [R.M.Ottehbrit "Biological Activities Polymers", Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. № 182, стр. 205 - 220, изд. C.E.Carraher и C.G. Gebelein (1982)]. Было обнаружено, что указанные полимеры являются менее токсичными, но при этом имеют более низкую противовирусную активность. Эти низкомолекулярные алифатические полимеры могут быть классифицированы как "статистические клубки". Такие полимеры имеют непредсказуемую конфигурацию вследствие гибкости групп связи основной цепи. Конфигурация статистического клубка в растворе может быть, в основном, охарактеризована как глобулярная. Хотя механизм действия таких водорастворимых полимеров пока неизвестен, однако, в качестве предположения, можно сказать, что полимер связывается с вирусной мембраной, например, вируса энцефаломиокардита, посредством межмолекулярного притяжения, сообщая тем самым вирусу неспособность в инфицированию хозяйской клетки.

Еще один способ с использованием синтетического полимера направлен на то, чтобы поставлять ионные группы в основную цепь полимера, имеющего более определенную геометрию. Существует множество неионных синтетических полимеров, которые имеют более линейную геометрию в безводном растворе, чем алифатические полимеры, описанные выше [J. Macromolecular Sci-Rewiews in Macromol. Chem. Phys. C 26(4), 551 (1986)]. Факторы, способствующие образованию таких структур, нестатистических клубков являются сложными и мало изученными. В основном, указанные полимеры имеют либо очень ограниченное число вращательных связей, которые являются непараллельными полимерной оси, либо в этих структурах имеется связывающий водород или биполярные взаимодействия, которые благоприятствуют линейным структурам. Эти полимеры называют "жесткоцепными полимерами". Полиамид, происходящий от терефталевой кислоты и п-диаминбензола (известный под торговой маркой Кевлар ТМ (Kevlar), поставляемый Du Pont) является хорошо известным примером таких полимеров.

Жесткие, синтетические, водорастворимые полимеры обычно меньше используются, но известно очень мало таких полимеров, имеющих большую молекулярную массу (например, см. патент США 4 824 916 и 4 895 660). Структура нестатического клубка полимеров указанного класса приводит к высокой вязкости раствора для данной молекулярной массы и концентрации.

Очевидно, что было бы желательно найти средство для лечения СПИДа и САК, которое не оказывало бы побочного действия, или обладало минимальным побочным действием, и было бы значительно более эффективным, чем те полимеры, которые использовались до настоящего времени в фармацевтике.

Авторами настоящей заявки было обнаружено, что анионные олигомеры ингибируют репликацию вируса, не оказывая при этом побочного действия, свойственного гепарину и известным полимерам. Указанные олигомеры имеют упорядоченное межанионное расстояние и жесткую цепь и являются водорастворимыми.

Новые олигомеры настоящего изобретения являются анионными, карбонилсодержащими соединениями. Примерами указанных олигомеров являются полимочевины, имеющие среднечисленную молекулярную массу $M_n < 10000$, и упорядоченное межанионное расстояние, и являющиеся жесткоцепными и водорастворимыми. Олигомеры, а также их соли являются фармацевтически приемлемыми и могут быть использованы в качестве лекарственных средств.

Другим применением указанных анионных олигомеров является их использование в качестве эффективных загустителей в водных растворах, или в качестве мягких ионных детергентов. В основном, водорастворимые полимеры, включая олигомеры настоящего изобретения, имеют широкое применение в качестве загустителей, диспергаторов и флокулянтов. Олигомеры настоящего изобретения могут быть использованы в нефтяной промышленности, горном деле, бумажной промышленности, текстильной промышленности, в косметике и технологии приготовления пищевых продуктов. Кроме того, низкомолекулярные полимеры настоящего изобретения, т.е. олигомеры, могут быть использованы в качестве исходных материалов для получения высокомолекулярных полимеров и сополимеров.

Таким образом, настоящее изобретение относится к водорастворимому, жесткоцепному олигомеру с молекулярной массой менее ($<$) 10000, содержащему повторяющиеся звенья, связанные посредством карбонильных связывающих групп; причем указанный олигомер имеет анионные группы и, в основном, линейную геометрию, такую, что расстояния между анионными группами этого олигомера в водной среде, являются регулярными. Предпочтительно, если каждое повторяющееся звено имеет, по крайней мере, две анионных группы.

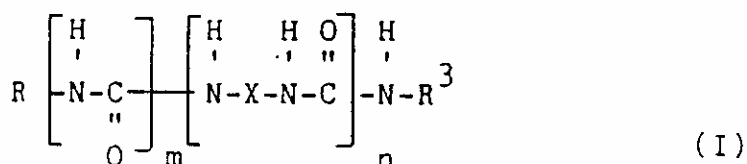
В настоящем изобретении может быть использован любой олигомер, удовлетворяющий вышеуказанным критериям. В частности, предпочтительными олигомерами являются полимочевины. Указанные олигомеры, предположительно, имеют линейную геометрию.

Подробное описание настоящего изобретения

Новые олигомеры настоящего изобретения, которые могут быть представлены полимочевинной, имеют среднечисленную молекулярную массу $M < 10000$, структуру с упорядоченным межанионным расстоянием, в основном, линейную геометрию в водной среде, и являются жесткоцепными и водорастворимыми. Указанные олигомеры являются предпочтительно линейными в своей основной цепи, а также могут быть в виде соли; особенно предпочтительными солями являются фармацевтически приемлемые соли.

Предпочтительными олигомерами настоящего изобретения являются соединения, представленные приведенными ниже формулами:

А) Полимочевина формулы:



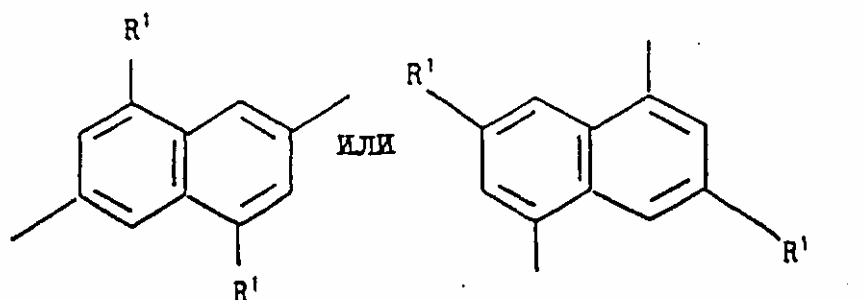
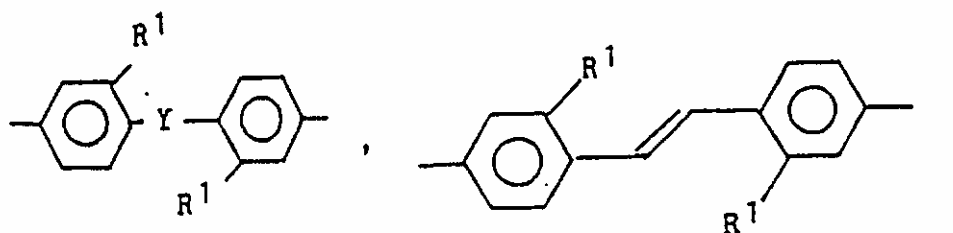
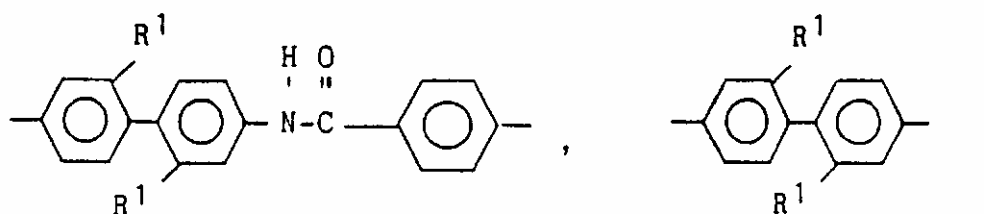
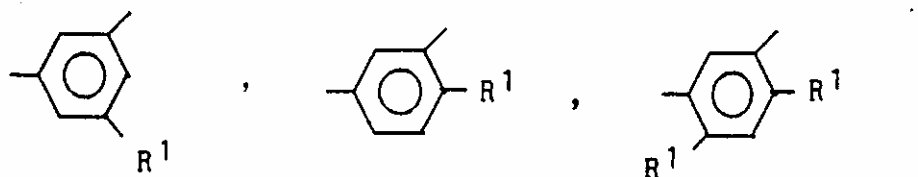
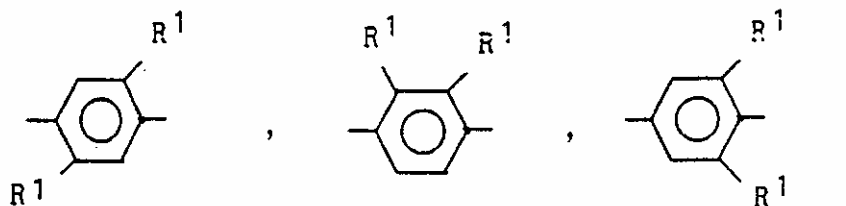
где: R является атомом водорода, C, - C,- алкильной группой, фенильной группой, или фенильной группой, замещенной 1-2R¹-частями и до 3 заместителями, независимо выбранными из атома хлора, атома брома или C₁-C₄ алкильной группы.

R¹ является -SO₃R², -CO₂R², -PO₃(R²)₂, или -OPO₃R²;

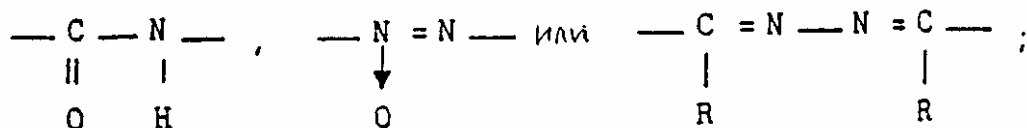
R² является атомом водорода, или фармацевтически приемлемым катионом;

n является целым числом 0 или 1, при условии, что если m является = 0; то R является атомом водорода;

X представляет собой:



Y представляет собой -CO₂-, -C = C-, -N = N-,



n является целым числом от 3 до 30; и

R является -R или -X-NH₂, где R и X определены выше.

Термин фармацевтически приемлемый катион означает катион, который является допустимым для использования в фармацевтических целях. Те катионы, которые являются, в основном, нетоксичными при введении их в дозах, необходимых для достижения желаемого эффекта, сами по себе не обладают значительной фармакологической активностью, также подпадают под определение "фармацевтически приемлемый катион". В качестве примера можно указать соли щелочных металлов, таких, как натрий или калий; щелочноземельных металлов, таких, как калий и магний; соли аммония; соли металлов Группы IIIA, например, алюминия; и органических первичных, вторичных и третичных аминов, таких, как триалкиламин, например, триэтиламин, прокаин, дибензиламин, N,N'-дибензилэтилендиамин, дигидроабетиламин, N-(C₁-C₄)-алкилпиперидин, других подходящих аминов. Предпочтительными являются соли натрия и калия. Термин "фармацевтически приемлемый" означает приемлемый для введения теплокровным животным и человеку, и поскольку, фармацевтически-приемлемое средство является нетоксичным, но не причиняет вреда теплокровным животным, а значит, может быть использовано в фармацевтических целях. Фармацевтически приемлемые катионы олигомеров настоящего изобретения могут быть получены путем стандартной ионообменной обработки или обработки R кислоты соответствующим основанием.

Если лекарственные средства, полученные с использованием олигомеров настоящего изобретения, предназначены для иных применений, то могут быть использованы и неприемлемые в фармацевтическом отношении соли. Например, могут быть использованы аддитивные соли бария, цинка и титана.

Олигомеры настоящего изобретения являются низкомолекулярными, жесткоцепными и водорастворимыми полимерами. Кроме того, указанные олигомеры имеют структуру с упорядоченным межанионным расстоянием. Термин "упорядоченное межанионное расстояние" или "регулярное расстояние между анионными группами" означает, что указанные анионные группы (R) присутствуют в основной цепи полимера на расстоянии, определенном используемым материалом исходного реагента, и местоположение указанных анионных групп контролируется предсказуемым образом. Не претендуя на какую-либо конкретную теорию, можно лишь указать, что, анионные группы олигомеров настоящего изобретения, по всей вероятности, являются той частью, которая связывается с ВИЧ и/или клеточной мембраной, предотвращая тем самым способность вируса к репликации.

Термин "преимущественно линейная геометрия" в водной среде относится к конфигурации раствора олигомера. Для оценки конфигурации полимерных молекул в растворе существует известный специалистам способ, основанный на следующей формуле, называемой уравнением Марка-Хоувинка ["introduction to Physical Polymer Science", изд. L.H. Sperling, пуб. John Wiley & Sons (1985), стр. 81-83]:

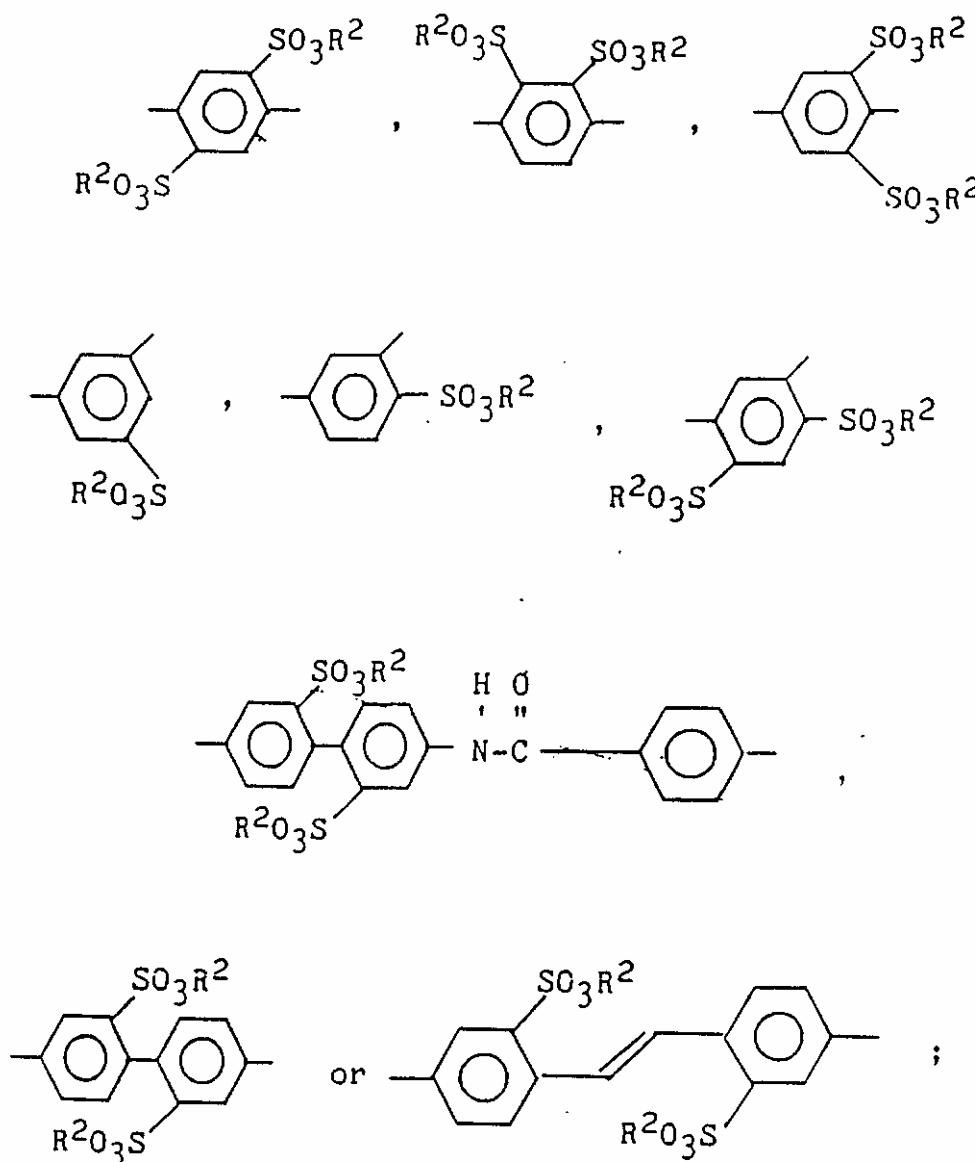
$$[\eta] = KM^{\alpha}$$

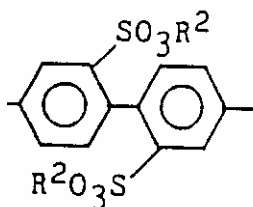
где η - характеристическая вязкость; M - среднечисловая молекулярная масса; K - постоянная, зависящая от размера связей в цепи; и α - постоянная, определяемая конфигурацией полимера. Характеристическая вязкость для полимера типа статистического клубка соответствует $0,5 < \alpha < 0,9$; а для линейного полимера она соответствует $0,9 \leq \alpha < 1,8$. Эта формула выражает соотношение между вязкостью " η " и молекулярной массой "M". В настоящем изобретении, линейные полимеры определяются, как полимеры со значением " α ", превышающим или равным 0,9. Для жестких стержнеобразных полимеров теоретическое значение (верхний предел) составляет 1,8. Для данной молекулярной массы, более высокая вязкость раствора может быть получена с использованием полимеров с линейной конфигурацией, по сравнению с вязкостью, полученной с использованием статистического клубка. Кроме того, следует отметить, что значение " α " зависит от используемого растворителя. Например " α " для данного водорастворимого полимера могут отличаться при различных солевых концентрациях. В настоящем изобретении, солевая концентрация в соответствии с уровнями присутствия солей в сыворотке (около 80 г/л NaCl, 4 г/л KCl).

Термин "олигомер", используемый в настоящем описании изобретения, включает в себя олигомеры со всеми возможными значениями η , например $\eta = 3 - 50$. Предпочтительными являются линейные олигомеры с η равным целому числу от 3 до 50, а более предпочтительно от 3 до 20, а еще более предпочтительно от 3 до 15. Само собой разумеется, что величина η непосредственно связана с молекулярной массой олигомера. Главное, чтобы указанные олигомеры имели достаточно низкую молекулярную массу, такую, чтобы с одной стороны они проходили через почечную выделительную мембрану, а с другой стороны, чтобы они обладали способностью к ингибированию вируса ВИЧ. Среднечисловая молекулярная масса регулируется стехиометрией реагентов. Среднечисловая молекулярная масса (M _{η}) составляет менее 10000, предпочтительно от около 500 до около 10000, а наиболее предпочтительно от около 1000 до около 6000.

В целях настоящего изобретения, описываемые олигомеры и их физиологически приемлемые соли считаются эквивалентными. Понятие "физиологически приемлемые соли" относится к солям, основания которых могут образовывать соль, по крайней мере, с одной кислотной группой R¹-группы, и которые не оказывают неблагоприятного воздействия при введении их в организм. Подходящими основаниями, например, являются гидроксиды щелочных металлов и щелочноземельных металлов, карбонаты и бикарбонаты щелочных и щелочноземельных металлов, такие, как гидроксид натрия, гидроксид калия,

Х представляет собой:





при этом особенно предпочтительно, если X представляет собой:

Анти-ВИЧ анионные олигомеры могут быть использованы для предупреждения образования синцитиев в клетках, инфицированных ВИЧ-1 или другими родственными вирусами, имеющими поверхностный белок gp120. Анти-ВИЧ анионные олигомеры могут быть использованы для лечения СПИДа и САК и других заболеваний, вызванных ретровирусом ВИЧ-1 или другими родственными вирусами, имеющими поверхностный белок gp120. Анионные олигомеры настоящего изобретения могут быть использованы в виде чистых соединений, или в виде смеси, такой, в которой значение соответствует конкретному определению формулы 1, или смесей соединений, или в виде смесей с другими известными агентами, используемыми в тех же целях, что и настоящее изобретение. Однако, для всех полученных олигомеров, η представляет собой среднечисловую длину повторов распределения в олигомерах всех формул.

Количество анти-ВИЧ анионных олигомеров, необходимое для предупреждения образования синцитиев в ВИЧ-инфицированных клетках, может быть любым эффективным количеством. Экспериментально было определено, что анти-ВИЧ анионные олигомеры при использовании их в виде водных препаратов в концентрации 10мкг/мл показывали полное ингибирование образования синцитиев, а также способствовали снижению количества присутствующего антигена p24, который является индикатором репликации вируса, до менее чем 300пг/мл. Количество анти-ВИЧ анионного олигомера, вводимое для лечения СПИДа и САК, вызванных инфицированием ВИЧ, может широко варьироваться в зависимости от конкретно используемой разовой формы, периода лечения, возраста и пола пациента, природы и степени нарушений и других факторов, хорошо известных практикующим врачам. Кроме того, анти-ВИЧ анионные олигомеры могут быть использованы, в сочетании с другими известными средствами, используемыми при лечении ретровирусных заболеваний, а также с известными средствами, используемыми для симптоматического лечения осложнений и состояний, вызванных ретровирусами.

Согласно настоящему изобретению анти-ВИЧ -эффективное количество анти-ВИЧ анионного олигомера, вводимого в организм, в основном, составляет от около 0,1мг/кг до 500мг/кг на вес тела пациента и может быть введено один раз или несколько раз в день. Анти-ВИЧ анионные олигомеры могут быть введены в сочетании с фармацевтическими носителями, которые обычно используются при составлении стандартных разовых форм для перорального или парентерального введения.

Для перорального введения, анти-ВИЧ анионные олигомеры могут быть использованы в виде твердых или жидких препаратов, например, в виде капсул, драже, таблеток, пастилок, расплавов, порошков, растворов, суспензий, или эмульсий. Твердые разовые формы могут быть изготовлены в виде капсул жесткого типа и с мягкой желатиновой оболочкой, содержащих, например, поверхностно-активные вещества, замасливатели и инертные наполнители, такие, как лактоза, сахароза, сорбит, фосфат кальция, и кукурузный крахмал. В другом варианте осуществления изобретения, анионные олигомеры могут быть изготовлены в виде таблеток с использованием лактозы, сахарозы, кукурузного крахмала в сочетании со связующими, такими, как аравийская камедь, кукурузный крахмал, или желатин; дезинтегрирующими агентами для облегчения разложения и растворения таблетки после введения, таких, как картофельный крахмал, альгиновая кислота, кукурузный крахмал, и хьюаровая камедь; замасливателями для улучшения текучести при гранулировании таблеток и предупреждения адгезии таблеточного материала с поверхностями экструзионных головок и пресс-форм, например, таких, как тальк, стеариновая кислота, или стеарат магния, кальция или цинка; красителями и ароматизирующими агентами для улучшения вкусовых качеств и внешнего вида используемых препаратов. Подходящими наполнителями для пероральных жидких лекарственных форм являются разбавители, такие, как вода, спирты, например, этанол, бензиловый спирт, и полиэтиленгликоль, которые могут быть использованы как сами по себе, так и в сочетании с фармацевтически приемлемыми поверхностно-активными веществами, суспендирующими агентами, или эмульгирующими агентами.

Анти-ВИЧ анионные олигомеры настоящего изобретения могут быть также введены парентерально, то есть, подкожно, внутривенно, внутримышечно, или внутривентриально, в виде инъектируемых разовых форм, содержащих анионные олигомеры в физиологически приемлемых разбавителях в сочетании с фармацевтическими носителями, которыми могут быть стерильные жидкости или смеси жидкостей, такие, как вода, солевой раствор, водные растворы декстрозы и родственных Сахаров; спирты, такие, как этанол, изопропанол, или гексадециловый спирт; гликоли, такие, как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, глицериновые кетали, такие, как 2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-метанол; простые эфиры, такие, как поли (этиленгликоль) 400; масла; жирные кислоты; сложные эфиры жирных кислот или глицериды, или ацетилированные глицериды жирных кислот, которые могут быть использованы отдельно или в сочетании с фармацевтически приемлемыми поверхностно-активными веществами (ПАВ), такими, как мыла; детергентами; суспендирующими агентами такими, как пектин, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, или карбоксиметилцеллюлоза; или эмульгирующими агентами и другими фармацевтическими адъювантами.

Примерами масел, которые могут быть использованы в парентеральных препаратах настоящего изобретения, являются нефтяное, животное, растительное или синтетическое масло, например, арахисовое масло, соевое масло, кунжутное масло, масло из семян хлопка, кукурузное масло, оливковое

масло, вазелиновое масло, и минеральное масло. Подходящими для использования в настоящем изобретении жирными кислотами являются олеиновая кислота, стеариновая кислота и изостеариновая кислота. Подходящими сложными эфирами жирных кислот являются, например, этилолеат и изопропилмиристат. Подходящими мылами являются соли жирных кислот, образованные от щелочных металлов, аммония и триэтиламина, а подходящими детергентами являются катионные детергенты, например, галиды диметилдиалкиламмония, галиды алкилпиридиния, ацетаты алкиламинов; анионные детергенты, например, алкил-, арил-, и олефиновые сульфонаты, алкил-сульфаты, олефиновые сульфаты, эфирные сульфаты, и сульфаты моноглицерида, и сульфосукцинаты; неионные детергенты, например, оксиды жирных кислот, алканоламиды жирных кислот, и сополимеры полиоксиэтилена и полипропилена; и амфотерные детергенты, например, алкил-бета-аминопропионаты, и соли 2-алкил-имидазолин-четвертичного аммония, а также их смеси. Парентеральные композиции настоящего изобретения, в основном, содержат от около 0,5 до около 25% масс. анти-ВИЧ анионного олигомера в растворе. Кроме того, могут быть использованы консерванты и буферы. В целях минимизации или устранения раздражений в месте введения инъекции, указанные композиции могут содержать неионогенные ПАВ с гидрофильным-липофильным балансом (HLB) от около 12 до около 17. Количество ПАВ в указанных композициях составляет от около 5 до около 15% масс. ПАВ может быть единственным компонентом, имеющим вышеуказанный HLB, или может быть смесью двух или более компонентами, имеющими нужный HLB. Примерами ПАВ, которые могут быть использованы в парентеральных композициях настоящего изобретения, являются соединения, относящиеся к классу сложных эфиров жирных кислот полиэтиленсорбитана, например, сорбитанмоноолеат.

Олигомеры настоящего изобретения могут быть также использованы с профилактической целью, то есть, в целях предупреждения трансмиссии вируса от инфицированного организма к неинфицированной цели. Распространение вируса пропорционально обмену крови, но его трансмиссия может быть осуществлена также путем обмена других физиологических жидкостей. Таким образом, олигомеры настоящего изобретения могут быть составлены с использованием детергентов для использования при очистке, в частности, при анализах в клинических лабораториях и больницах, где вручную обрабатываются пробы крови инфицированных пациентов. Композиции, содержащие олигомеры настоящего изобретения, могут быть использованы для очистки медицинских/хирургических инструментов и посуды, а также обработки рук и других участков кожи лаборантов в целях профилактики. Олигомеры настоящего изобретения также могут быть использованы в виде жидких и порошковых композиций для наружного применения путем нанесения на поверхность противозачаточных средств, таких, как презервативы, осущающего либо пользователем, либо производителем указанных противозачаточных средств до их продажи. Олигомеры настоящего изобретения могут быть составлены в композиции в виде влагалищных душей для использования женщинами перед половым актом с инфицированным партнером. Олигомеры настоящего изобретения могут быть также изготовлены в сочетании с замасливателями в виде, сперматоцидных желе и лосьонов. И, наконец, Олигомеры настоящего изобретения могут быть также добавлены в виде композиций в горячие ванны, вибрационные ванны и плавательные бассейны в целях инактивации потенциальной вирусной активности.

Определения

Термины, используемые в описании настоящего изобретения, имеют следующие значения:

η - среднечисловая длина повторов в распределении олигомера всех формул.

RPMI - клеточные культуральные среды.

TC ID₅₀ - единица тканевой инфекционной культуры, т.е. количество культуральной жидкости, эффективное для инфицирования 50% клеток.

MTT - бромид 3-(4,5-диметилтиазол -2-ил)-2, 5-дифенилтет-разолин.

MT4 - клеточная линия.

P24 - тест-Аббот- анализ вирусного ядерного антигена с использованием набора для анализа, поставляемого Abbott.

Анализ на ВИЧ Coulter TM - радиоиммунный анализ на определение вирусного антигена P24

rs CD₄ - рекомбинантный растворимый CD₄, содержащий 4 экстрацитоплазматических иммуноглобулина аналогичных вариабельным (V) областям V₁-V₄.

T - 4-метиланилин или толуидин, за исключением тех случаев, когда используются термин "Т4-клетки" или "Т-хелперные клетки".

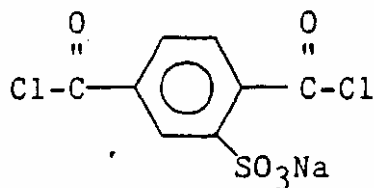
P - фосген,

C - п-крезол,

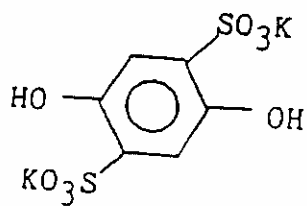
MBC - 4 -метилбензоилхлорид,

TPC - 1,4 - бензолдикарбонилхлорид или терефталойлхлорид,

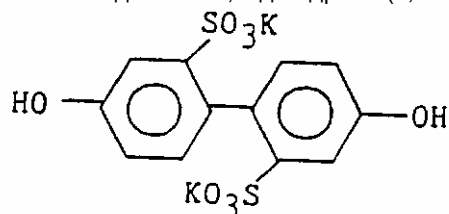
TPCS- 2,5 - бис хлорокарбонил бензолсульфонат натрия, имеющий формулу:



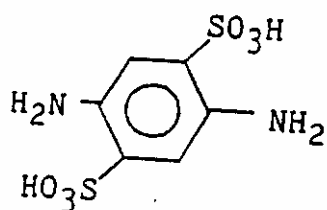
HBDS - дикалий 2,5 - дигидрокси-1,4-бензолдисульфат, имеющий формулу:



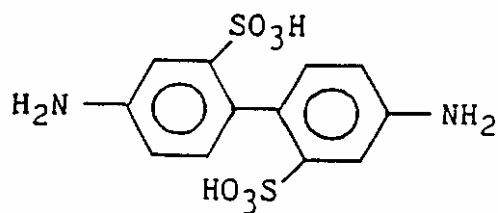
HBPDS - дикалий 4,4'-дигидрокси(1,1' - бифенил)-2,2'-дисульфонат, имеющий формулу:



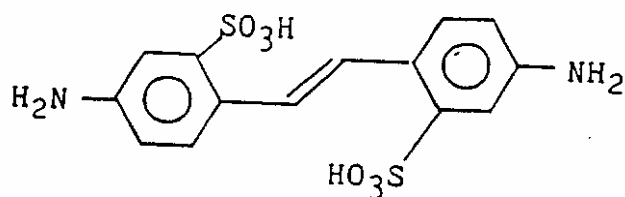
PDS - 2,5- диамино-1,4-бензолдисульфоновая кислота, имеющая формулу:



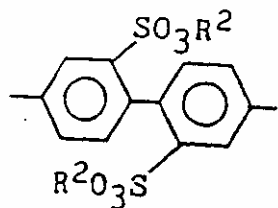
BPDS - 4,4'- диамино (1,1'- бифенил)2,2'-дисульфоновая кислота, имеющая формулу,



StDS - транс-2,2'- (1,2-этендиил) бис(5-аминобензолсульфоновая кислота), имеющая формулу:

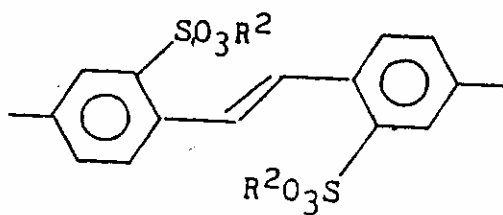


BPDS/P/T - поли {имино [2,2'-дисульфо {1,1'-бифенил)-4,4'-диил] иминокарбонил} - альфа- {[4-метилфенил) amino] карбонил} омега - [(4-метилфенил) amino] - представлены формулой I (см. выше), где R является 4-метилфенилом, R² - водород, X является:



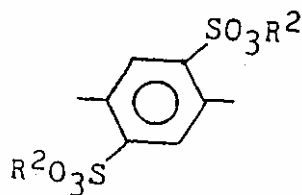
где η определен выше в Формуле I.

StDS/P/T - поли [имино(3-сульфо-1,4-фенилен)-1, 2-этен-диил- (2-сульфо-1,4-фенилен) иминокарбонил], альфа - {[4-метилфенил) -аминокарбонил} -омега - [(4-метилфенил) amino- и представлен формулой 1, если R является 4-метилфенилом, R² является водородом, X является:



где η определен в формуле 1.

PDS/P/T – поли [имино (2,5-дисульфо-1,4-фенилен) иминокарбонил] альфа – {[(4-метилфенил) amino] карбонил} -омега - [(4-метилфенил) amino] - и представлен формулой 1, где R является водородом, X является



и η определено выше в формуле 1.

Олигомеры получали путем модификации процедуры Кершнера (Патент США № 4895660, раскрытие которого вводится в настоящее описание в виде ссылки) путем замещения части одного из бифункциональных мономеров монофункциональным регулятором молекулярной массы и проведения реакции в отсутствие ПАВ. Среднечисловая молекулярная масса (M_n) регулировалась посредством стехиометрии реагентов.

Олигомеры настоящего изобретения получили с помощью различных реакций, описанных ниже.

Поли мочевины (формулы 1)

Ниже подробно описан предпочтительный способ получения поли мочевины формулы 1 раскрытый Kershner в патенте США 4824916, а также описаны различные реагенты и условия проведения этого способа.

Диамины: имеется большое разнообразие алифатических и ароматических диаминов. Гидрокарбиленовыми двухвалентными радикалами, из которых состоят диамины, могут быть метилен, этилен, бутилен, изопропилиден, фенилен, бифенилен и другие бирадикалы. Ряд возможных заместителей также является достаточно широким и включает в себя гидроксил, алкенил, низшие алкильные группы, карбоксилат, сульфонат и галогены. Заместители не обязательно являются анионными при нейтральном pH в воде.

Бифункциональными электрофилами являются: фосген (карбонилдихлорид), карбонилдибромид, $C_{13}COCOC_1$, $C_{13}COCO_2CC_{13}$, первичные кислые галиды алифатических и ароматических двухосновных кислот, таких, как щавелевая кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, глутаровая кислота, адипиновая кислота, себаиновая кислота, фталевая кислота, изофталевая и 2,6-нафталевая кислота.

Акцепторы кислоты: использовались некоторые основания, такие, как карбонат натрия, гидроксид натрия и трибутиламин.

Различные добавки: могут быть добавлены различные ПАВ. Подходящими ПАВ являются неионогенные ПАВ, такие, как сорбитанмонолаурат, сорбитанмоностеарат, этиленгликольдистеарат, полиэтиленокси/полипропиленокси полимер. Указанные ПАВ трудно удаляются из продукта, и поэтому использование ПАВ нежелательно.

Растворители: в качестве растворителя использовались лишь полярные апротонные растворители, такие, как N, N - диметил-ацетамид и N, N - диметилформамид. Приемлемой также является комбинация воды и второго растворителя, такого, как толуол, тетрагидрофуран, бензол, ацетон, этилендиоксид и т.п. Типичное отношение органических и водных растворителей составляет около 0,5-2.

В способах, описанных в литературе, первичные кислые галиды добавляют к размешанному раствору или суспензии других исходных материалов. В некоторых случаях, основание добавляют во время добавления карбонилдигалида. Температуру поддерживают в пределах от 0 до 50 °C, а предпочтительно, от 20 до 30 °C. Отношение реагентов (молярное отношение диамин к первичному кислому галиду) составляет от около 0,9 до 1,2, а предпочтительно использовать эквимольные количества.

Реакцию размешивают со скоростью, достаточной для размешивания реагентов. Скорость реакции частично зависит от межфазной граничной площадки, а поэтому предпочтительно весьма интенсивное размешивание. В этих целях может быть использована существующая в продаже смесь.

Способ, используемый для получения поли мочевины настоящего изобретения, является модификацией способа, описанного выше.

Диамины: диамины настоящего изобретения являются, в основном, ароматическими соединениями с формулами, описанными в предыдущей главе. Указанные диамины являются замещенными, по крайней мере, одной группой, являющейся заряженной при нейтральном pH, предпочтительно сульфонатом. Приемлемыми также являются моновалентные алифатические заместители. Может быть использован небольшой набор связывающих групп, которые связывают вместе ароматические радикалы, например,

таких, как трансзамещенный этилен и ацетилен. Предпочтительными диаминами являются такие диамины, в которых углерод-азотные связи являются параллельными, например, такие, как PDS, BPDS, StDS, и 2,5-диаминобензолсульфоновая кислота.

Бифункциональные электрофилы: для получения полимочевин используют фосген (карбонилдихлорид) и карбонилдибромид и другие предшественники мочевины, такие, как карбонилдиимидазол, гексахлорацетон, $\text{Cl}_3\text{COCO}_2\text{CCl}_3$, $\text{CCl}_3\text{-COCl}$ и $\text{Cl}_3\text{-OCOC}$. Для получения полиамидов используют ароматические двухосновные кислоты, такие, как изофталевая и терефталевая кислота (TPC), и 2,6-нафталиндиионовая кислота. Указанные двухосновные кислоты могут иметь нейтральные и заряженные заместители, такие, как моновалентный алкиловый радикал (метил, этил, бутил) и/или заряженные группы, такие, как сульфонаты, фосфаты и т.п. Примером такого заряженного бифункционального электрофила является 2,5-бис хлорокарбонил бензосульфонат натрия (TPCS).

Акцепторы кислоты: в качестве акцепторов кислоты может быть использован ряд неорганических оснований, таких, как гидроксиды, карбонаты, бикарбонаты и фосфаты щелочных металлов или двухвалентных металлов. Предпочтительными являются акцепторы кислоты с буферным действием, если все основания добавляют перед добавлением бифункционального электрофила. Могут быть также использованы органические основания, такие, как триалкиламины, однако, эти основания не являются предпочтительными.

Монофункциональный регулятор молекулярной массы: для ограничения молекулярной массы может быть использован ряд агентов. Такими агентами могут быть алифатические или ароматические соединения, которые реагируют с динамиками или функциональными электрофилами. Примерами подходящих монофункциональных агентов являются амины, такие, как анилин, метиланилин, метиламин, этиламин, бутиламин, диэтиламин, аммиак, N-метиланилин, фенол и крезол. Примерами монофункциональных амино-реактивных агентов являются бензоилхлорид, метилбензоил-хлорид, ацетилхлорид, и фенилхлороформат. Указанные регуляторы молекулярной массы могут также содержать заряженные заместители, например, калий 2-сульфофенол или калий 4-сульфоанилин.

Различные добавки: добавление поверхностно-активных веществ не является обязательным или предпочтительным, и может осложнить процесс выделения.

Растворители: один растворитель, вода, является предпочтительным, если бифункциональный электрофил является жидкостью при реакционной температуре. Примером такого бифункционального электрофила является фосген. Если указанный электрофил является твердым, то используются водонерастворимые реагенты, и предпочтительным является использование небольшого количества водонесмешивающегося соразтворителя. Например, если используется терефталоилхлорид, то для улучшения взаимодействия между реагентами может быть добавлено небольшое количество метилхлорида. Примерами таких несмешивающихся с водой растворителей являются хлороформом, тетрахлорметан, толуол, и метилхлорид. В основном, отношение органических растворителей к водным растворителям составляет 0 - 1, а предпочтительно, 0 - 0,1.

Способ осуществляют при температуре реакции, в основном, от около 0 до 100°C. Предпочтительной температурой является температура от 0 до 25°C. Если используются низкокипящие исходные материалы, например, фосген (точка кипения 6°C), то реакцию предпочтительно проводить при температуре точки кипения или ниже. Давление не является критическим параметром для данного способа, и, в основном, используется атмосферное давление. Для оптимизации процесса pH реакции должно тщательно поддерживаться. При низком pH (<6) реакция протекает очень медленно, а при высоком pH (>10) бифункциональный электрофил становится нестабильным под воздействием гидроксидов или другого основания. При высоком pH может также происходить деградация полимочевины. Предпочтительное значение pH составляет в пределах от 7 до 9.

Если не используется агент регуляции молекулярной массы, то этот контроль молекулярной массы, может быть, достигнут путем тщательной корректировки стехиометрии реагентов. Как диамин, так и бифункциональный электрофил могут быть использованы в избытке, например, в молярном избытке от 1 до 100%. Указанная стехиометрия должна рассчитываться для любого бифункционального электрофила, который разрушается гидролизом, перед реакцией с диамином. Например, если фосген используется при высоком pH, то большой избыток необходим для компенсации быстрой реакции с гидроксидом, который его разрушает. Поскольку степень этой побочной реакции трудно регулировать, то для контроля молекулярной массы предпочтительно использовать монофункциональный регулятор молекулярной массы. Хотя упомянутая выше техника может быть использована для регулирования молекулярной массы, однако, полученные продукты являются смесями полимеров с несколькими молекулярными массами, характеризующимися определенным распределением.

Порядок добавления реагентов не является решающим. Однако предпочтительно сначала добавлять бифункциональный электрофил. Если используемый акцептор кислоты не является буфером, например, гидроксиды, то наиболее предпочтительно часть его добавлять вначале, для доведения pH до желаемого значения, а оставшееся количество добавлять вместе с бифункциональным электрофилом.

И, наконец, указанные полимеризации желательно проводить при высоких концентрациях. Это позволяет снизить количество растворителя, которое должно быть удалено в целях выделения продукта. Кроме того, в некоторых случаях, продукт осаждают из реакционного раствора незадолго до завершения реакции, и выделяют путем простого декантирования растворителя. Большую часть неорганической соли, образующейся, в результате реакции акцептора кислоты удаляют в процессе осуществления способа. Концентрация не является критической, и может составлять от 0,5 до 50 масс.% по массе диамина - растворителя. Предпочтительный интервал составляет 5-20 масс.%.

Продукт может быть выделен путем осаждения реакционного раствора в растворитель, являющийся водосмешиваемым, но плохим растворителем для продукта. Примерами таких растворителей являются ацетон, метанол, этанол и изопропанол.

Настоящее изобретение более наглядно описывается с помощью приведенных ниже примеров, которые играют чисто иллюстративную роль.

Описание экспериментов

Все растворители и реагенты были получены от коммерческих поставщиков и использовались без дополнительной очистки, за исключением того, что BPDS очищали путем перекристаллизации из диметилсульфоксида в атмосфере азота.

PDS получали способом, описанным в патенте ФРГ 1393557 (раскрытие которого вводится в настоящее описание в виде ссылки), и полученный продукт перекристаллизовывали из 1% (об/об) H_2SO_4 .

Характеристическую вязкость измеряли при 0,5 г/дл в деионизованной воде и уравновешенном солевом растворе Хэнка (HBSS) (поставляемом от Сигма Кемикел) при 25°C, если это не оговорено особо.

Содержание воды в очищенных диаминах определяли путем титрования по способу Карла Фишера.

Протонные и C-ядерные магнитно-резонансные спектры регистрировались на VXP 300 или на спектрометре Varian TM Gemini 300. Образцы растворяли в D_2O , если это не оговорено особо. Там, где это было возможно, среднечисловые молекулярные массы олигомеров подтверждали путем интеграции площади резонансов от метильных групп концевых "шапок" по отношению к ароматическим резонансам повторяющихся звеньев. Во многих случаях, в частности, для полиамидов полученных из BPDS или StDS и TPC, резонансы имели слишком широкий интервал значений.

Анализ с помощью жидкой хроматографии высокого давления (ЖХВД) осуществляли на жидкостном хроматографе HP 1090 с использованием C-18-обращенно-фазовой колонки (200мм x 2,1мм). Колонку аллюировали градиентом раствора, начиная 35% CH_3CN и 65% 5 мМ тетра-н-бутиламмонийбутилсульфата и кончая 55% CH_3CN и 45% тетра-н-бутиламмонийсульфата.

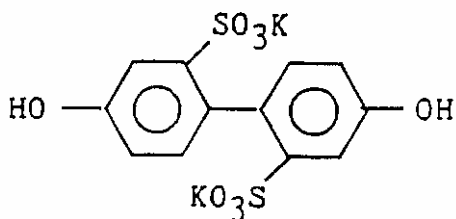
Реакцию фосгенирования осуществляли в специально предназначенном для этой цели стандартном аппарате, имеющем резервуар, для фосгена из нержавеющей стали, соединенный с фосгеновым баком, азотным трубопроводом и трубопроводом для подачи. Резервуар монтировали с таким расчетом, чтобы, при необходимости, подачу можно было бы осуществлять непосредственно из фосгенового бака. Количество поданного фосгена определяли как разницу в весе резервуара до, и после реакции. В течение реакции скорость азотсодержащего потока поддерживалась равной 0,3мл/мин, если это не оговаривается особо. Фосген вводили со скоростью 0,9мл/мин (во время добавления фосгена полный газовый поток составлял 1,2мл/мин). В реакционный сосуд фосген добавляли, в основном в трехкратном избытке. Скорость размешивания составляла 300об/мин, а температура раствора поддерживалась в пределах 10 - 15°C.

Полученные продукты сушили стандартным способом в вакуумной печи при 40 - 50°C в течение 15 часов, часов, как минимум.

Исходные материалы

Пример А

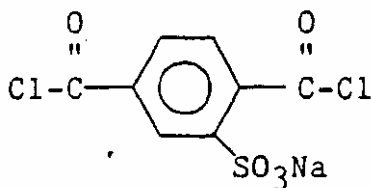
Получение HBPDS формулы:



К 2-х литровой колбе, снабженной воронкой для добавления и стержнем магнитной мешалки, добавляли 49,99г (0,145М) 4,4'-диамино (1,1'- бифенил)-2,2'- дисульфоновой кислоты и 600мл воды. Диамин солибализовали путем добавления 30мл (0,15М) 5М NaOH. К полученному раствору добавляли 20,56г (0,298М) нитрита натрия. Затем реакционную смесь охлаждали до 0°C и в течение 30 минут добавляли концентрированную H_2SO_4 , растворенную в 360мл воды. В результате образовывалось желтое твердое вещество. Затем к смеси добавляли 300мл воды и смесь поддерживали при 0°C в течение 1 часа. Затем реакционную смесь фильтровали. Желтое твердое вещество, растворенное в 800мл воды, помещали в 1-л колбу и нагревали до тех пор, пока не останется 50мл воды. Азот выделялся в течение нагревания. К концентрированному раствору добавляли 20,14 г (0,146 М) K_2CO_3 , после чего раствор кипятили. Затем добавляли абсолютный этанол (1,5л), и полученное коричневое твердое вещество осаждали. Осадок отфильтровывали и сушили в течение ночи в печи при 50°C. Продукт, HBPDS, получали с выходом 32,33г (53%), а затем анализировали с помощью ^1H ЯМР. ^1H ЯМР б 6,70 (дд, 1H), 7,05 (д, 1H), 7,14 (д, 1H).

Пример В

Получение TPCS формулы:



В 500-мл колбу, снабженную механической мешалкой, термометром и дефлегматором, загружали 40,49 (0,143 М) мононатриевой соли 2- сульфотерефталевой кислоты, 160мл хлорбензола, 2,4мл (0,031 М) диметилформамида, и 23мл (0,315М) тионилхлорида. Раствор нагревали до 105°С и размешивали в течение 2 часов в атмосфере азота. В течение этого периода отмечалось выделение газа. Раствор охлаждали до комнатной температуры и твердое вещество осаждали. Осадок фильтровали и осушали в течение ночи в вакуумной печи при комнатной температуре. В результате чего получали твердый бледно-желтый продукт с выходом 20,56г (47%).

Для подтверждения структуры продукта, некоторое количество продукта превращали в его сложный метиловый эфир.

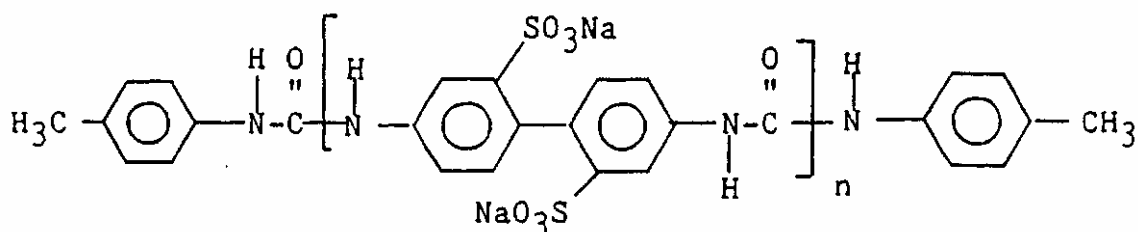
В 25мл колбу, снабженную стержнем магнитной мешалки и барботером для азота, добавляли 0,9509г (3,12мМ) полученного выше продукта, 0,6874г (6,47мМ) Na₂CO₃, и 10мл метанола. Реакционную смесь размешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере азота, после чего твердое вещество отфильтровывали, осушали в вакуумной печи в течение 6 часов при комнатной температуре, и затем определили, что образовавшийся сложный диметиловый эфир продукта имеет следующие данные:

¹H ЯМР (б): 3,34, (с, 6H), 7,39 (д, 1H), 7,97(д, 1H), 8,26(с, 1H); ¹³C ЯМР (б): 58,0; 136,0; 139,8; 140,9; 145,2; 146,8; 150,1; 183,5; 186,4.

Конечные продукты

Пример 1

Получение BPDS /P/T формулы:



Олигомер А (η = 6)

В 1-л колбу, снабженную отверстием для шприца, карманом для термометра, pH- электродом, холодильником с охлаждением сухим льдом, трубой для впуска газообразного фосгена и механической мешалкой, добавляли 10,00г (28,19мМ) BP DS; 1,35г (9,40мМ) толуидингидрохлорида, и 400мл воды. Реакционную смесь размешивали и охлаждали до 12°С. Размешанную суспензию подвергали взаимодействию с 13мл 5М NaOH до тех пор, пока не растворится все твердое вещество. После чего к реакционной смеси добавляли 10,1г (102мМ) фосгена в течение 27 минут. Во время добавления фосгена, добавляли 5М NaOH с помощью шприца, что не обходимо для поддержания pH в пределах от 7 до 8 в крайних (пределах pH 6 - 9). Затем добавляли все 31мл NaOH. Реакционную смесь продолжали размешивать еще 30 минут, а затем pH доводили до значения 9,5 и реакционную смесь размешивали еще 30 минут. После чего реакционную смесь переносили в 2-л колбу, и неочищенный продукт осаждали путем добавления 1000мл ацетона. Неочищенный продукт фильтровали, осушали воздухом и получали 18,6г беловатого порошка, имеющего M_n = 2500. Характеристическая вязкость составляла 0,39 дл/г в H₂O, и 0,15 дл/г в HBSS. Затем продукт анализировали: ¹H ЯМР (б): 2,2 (шир.с); 6,7-7,4 (м); 7,9 - 8,3 (м).

Олигомер В (η = 9)

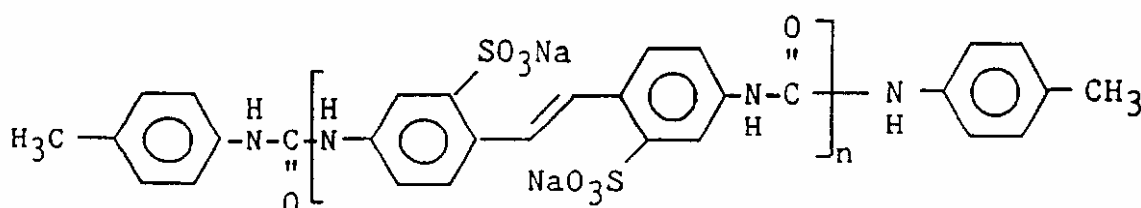
Повторяли процедуру Примера 1А с использованием следующих количеств реагентов:

Реагент	Количество	ММ
BP DS	12,06 г	34,00
T-HC1	1,09 г	7,56
P	11,0 г	111,0
Вода	400 мл	

и получали продукт (12г) в виде беловатого порошка с M_n = 3600. Характеристическая вязкость составляла 0,52 дл/г в H₂O, и 0,21 дл/г в HB^{SS}.

Пример 2

Получение StDS /P/T формулы:



Олигомер А (η - 6)

Повторяли процедуру Примера 1А с использованием следующих количеств реагентов:

Реагент	Количество	ММ
StDS	10,58г	28,00
Т НС1	1,34г	9,33
Р	7,4г	74,8
Вода	400мл	

и получали продукт (7,4г, $M_n = 2600$) в виде желтого твердого вещества. Характеристическая вязкость составляла 0,14 дл/г в H_2O . Анализ продукта показал:

1H ЯМР (б): 2,1 (шир.с); 6,7 - 8,1 (шир.м).

Олигомер В ($\eta = 9$)

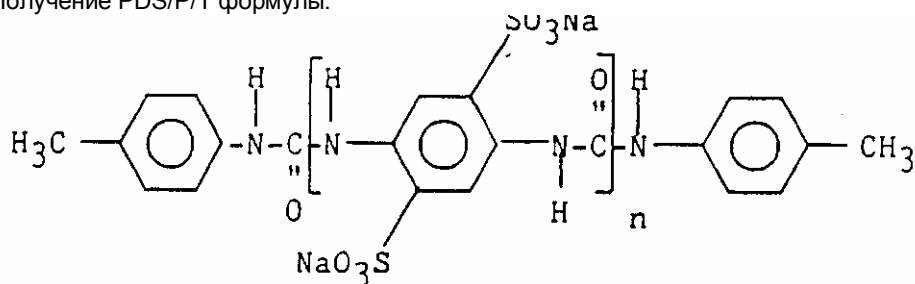
Повторяли процедуру Примера 1А с использованием следующих количеств реагентов

Реагент	Количество	ММ
StDS	10,58г	28,00
Т -НС1	9,89г	6,22
Р	9,0г	91,0
Вода	400мл	

Около половины суспензии, полученной после добавления ацетона, фильтровали во избежание закупорки спекшейся смесью. В результате получения 3,5г ($M_n = 3800$) продукта в виде твердого желтого вещества. Характеристическая вязкость составляла 0,18 дл/г в H_2O .

Пример 3

Получение PDS/P/T формулы:



Олигомер А ($\eta = 9$)

Повторяли процедуру Примера 1А с использованием следующих количеств реагентов:

Реагент	Количество	ММ
PDS	3,50 г	13,05
Т-НС1	0,416 г	2,90
Р	4,3 г	43,5
Вода	225 мл	

и получали 2,95г продукта ($M_n = 2900$) в виде коричневого порошка. Характеристическая вязкость составляла 0,12 дл/г в воде, и 0,07 дл/г в HB SS.

Олигомер В ($\eta = 15$)

:

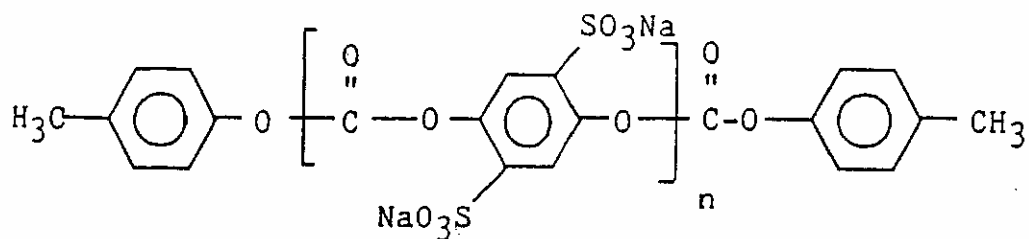
Повторяли процедуру Примера 1А с использованием следующих количеств реагентов:

Реагент	Количество	мМ
PDS	3,50г	13,05
Т-НС1	0,250г	1,74
Р	4,2г	42,0
Вода	225мл	

и получали 3,83г продукта ($M_n = 4650$) в виде коричневого порошка. Характеристическая вязкость составляла 0,12дл/г в воде и 0,14 дл/г в HBSS.

Пример 4

Получение HBDS /P/C формулы:

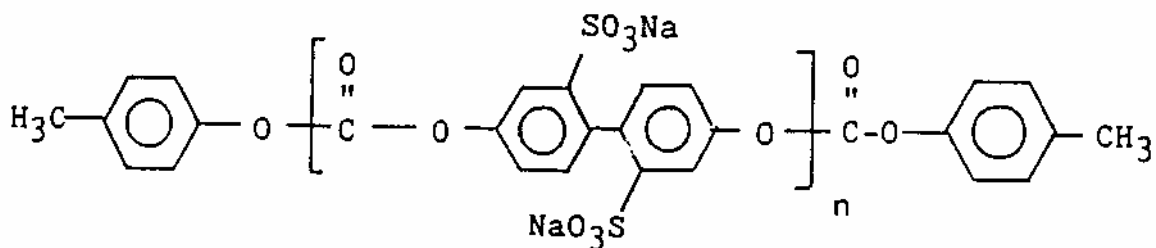


Олигомер A = 6

В 1-л колбод, снабженную отверстием для шприца, карманом для термометра, pH-электродом, холодильником для охлаждения сухим льдом, механической мешалкой и трубой для впуска газообразного фосгена, добавляли 10,16г (29,35мМ) HB DS, 1,06г (9,8 мМ) п-крезола, и 400мл воды. Реакционную смесь охлаждали до 10°C азотом, входящим в колбу через впускное отверстие для фосгена. Размешанную реакционную смесь обрабатывали 5М гидроокиси натрия до тех пор, пока pH раствора не достигнет 8,0. Затем к реакционной смеси добавляли 10,5 г (106,0 мМ) фосгена в течение 35 минут вместе с 42 мл 5М гидроокиси натрия, поскольку необходимо pH раствора поддерживать в пределах 7,0 - 7,5. После завершения добавления фосгена, раствор размешивали 20 минут при 10°C. Затем сухой лед удаляли из холодильника, и раствор перемешивали еще 30 минут при 10°C для выпаривания избытка фосгена. Водный раствор переносили в 2-л колбу и добавляли 100мл воды, использованной для промывки реакционного сосуда. Продукт осаждали путем добавления 1000мл ацетона, фильтровали и осушали в течение ночи в вакуумной печи при комнатной температуре. Выход продукта составлял 2,11г, характеристическая вязкость твердого продукта составляла 0,30дл/г в воде, а M_η = 2300.

Пример 5

Получение HBPDS/P/C формулы:



Олигомер A(η = 6)

Повторяли процедуру Примера 4 с использованием следующих количеств реагентов:

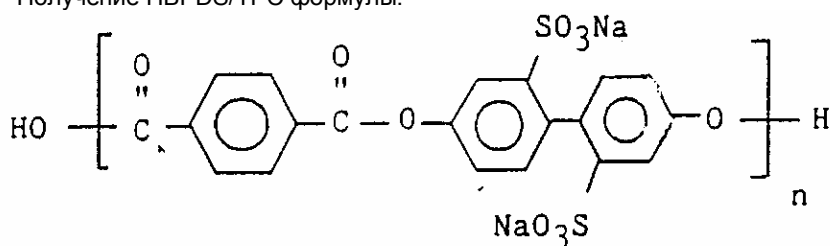
Реагент	Количество	мМ
HBPDS	12,35г	29,25
п-крезол	1,07г	9,91
P	10, г	102
вода	400мл	

pH начального раствора составлял 10,0, а затем pH доводили до 8,1 с помощью концентрированной соляной кислоты. В течение 32 минут добавляли фосген вместе с 31мл 5М гидроокиси натрия для поддержания pH между 7,5 и 8,0. После выпаривания фосгена, реакционную смесь переносили в 2-л колбу и добавляли 100мл воды, используемой для промывки реакционного сосуда. Продукт осаждали путем добавления 1400мл ацетона, фильтровали и осушали в течение ночи в вакуумной печи при комнатной температуре. Выход продукта составлял 1,89г, характеристическая вязкость твердого продукта составляла 0,17 дл/г в воде, а M_η - 2700.

¹H ЯМР: (б) 2,2 (с); 7,0 (с); 7,5 (шир.с).

Пример 6

Получение HBPDS/TPC формулы:



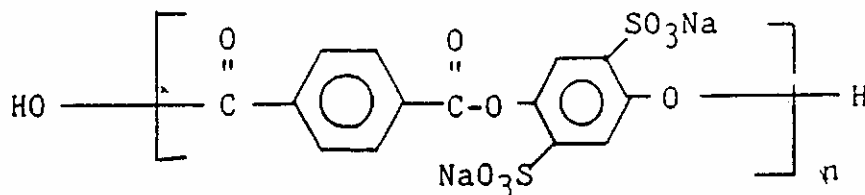
Олигомер А ($\eta = 4$)

В 500-мл колбу, снабженную дефлегматором, воронкой для добавления, и механической мешалкой, загружали 7,92г (18,7мМ) НВР DS, 3,16г (37, мМ) бикарбоната натрия, 125 мл воды, и 25мл метилхлорида. К размешанной реакционной смеси добавляли 3,80г (18,7мМ) ТРС в 100мл метилхлорида в течение 1 часа. Полученный раствор размешивали в течение 1,5 часа при комнатной температуре в атмосфере азота. Затем раствор переносили в 2-л колбу и добавляли 100мл воды, использованной для промывки реакционного сосуда. Для расслоения эмульсии добавляли ацетон в избытке 250мл. После добавления 1000мл ацетона, на дне колбы образовывалось твердое вещество, которое на вид было похоже на шарики, наполненные водой. Раствор фильтровали, осаждали 750мл ацетона, снова фильтровали и осушали в течение ночи в вакуумной печи при комнатной температуре. В результате получали 4,89г коричневого твердого продукта, характеристическая вязкость которого составляла 0,16дл/г в воде, а $M_n = 2100$. Затем продукт анализировали:

^1H ЯМР б: 2,2 (с); 7,0 (шир.с); 7,25 (шир.с); 7,5 (шир.с); 8,0 (шир.с).

Пример 7

Получение HBDS /TPC формулы:



Олигомер А ($\eta = 3$)

Повторяли процедуру Примера 6 с использованием следующих количеств реагентов:

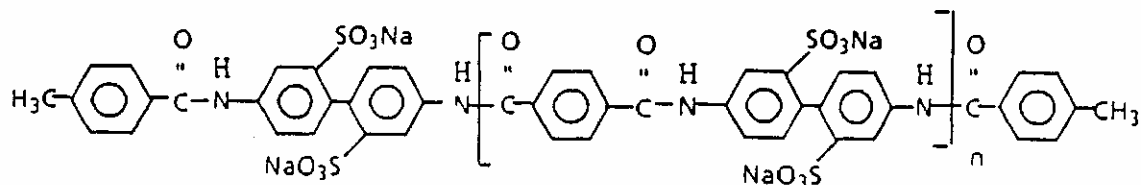
Реагент	Количество	мМ
HBDS	6,51г	18,8
NaHCO ₃	3,15г	37,5
CH ₂ Cl ₂	125мл	
TPC	3,84г	18,9
Вода	125мл	

Полученный раствор размешивали в течение 1,5 часа при комнатной температуре в присутствии азота. Затем раствор переносили в 1-л колбу и добавляли 100мл воды, использованной для промывки реакционного сосуда. В колбу добавляли 450мл ацетона для расслоения эмульсии. В нижнем слое воды образовывался осадок. Затем раствор переносили в делительную воронку и нижний слой отделяли. Затем водный раствор обрабатывали 500мл ацетона. Образовавшееся твердое вещество фильтровали, и осушали 2 дня в вакуумной печи при комнатной температуре. В результате получали продукт весом 4,38г и с характеристической вязкостью 0,05дл/г. Анализ с помощью ^1H ЯМР и ЖХВД показали значительное количество исходного дифенола.

Для удаления, не прореагировавшего исходного материала, 2,0г вышеуказанного твердого продукта растворяли в 200 мл воды. Продукт осаждали путем добавления 700мл ацетона, фильтровали и осушали в течение ночи в вакуумной печи при комнатной температуре. В результате получали 0,41г твердого продукта, который имел характеристическую вязкость 0,11дл/г в воде, и $M_n = 1300$.

Пример 8

Получение BPDC/TPC/МВС формулы:



Олигомер А ($\eta = 6$)

В смеситель Уэринга добавляли 200мл деионизованной воды и 2,65г (25,0мМ) карбоната натрия и смесь размешивали при малой скорости до тех пор, пока смесь не растворится. К реакционной смеси добавляли 2,217г (6,25мМ) BP DS через воронку для добавления порошка. Воронку промывали 50мл воды, которая протекала в смесь. В результате образовался прозрачный бесцветный раствор натриевой соли.

Затем приготавливали второй раствор, содержащий 1,088г (5,357мМ) ТРС и 0,193мл (236мг, 1,786мМ) МВС в 200мл хлороформа. Этот раствор сразу добавляли в раствор натриевой соли при этом энергично размешивая. Полученную в результате суспензию белого цвета размешивали при малой скорости в течение 15 минут.

После размещения в течение 15 минут, суспензию переносили в 2-л колбу, а смеситель промывали около 200мл воды, которую добавляли к суспензии. К суспензии добавляли 200мл ацетона. Эмульсия расслаивалась на две фазы с неявным осадком. Нижний слой удаляли через делительную воронку; верхний слой возвращали в колбу. Затем в колбу добавляли 450мл ацетона в целях осаждения. Осадок фильтровали через три слоя марли. Остаточные растворители удаляли из белого желатинообразного продукта путем сильного отжатия марли. Неочищенный продукт растворяли в 600мл воды и снова осаждали путем разведения до полного объема 1600мл ацетона. Осадок снова собирали, растворяли в 150мл воды, и осаждали путем добавления 850мл ацетона. Осадок собирали, как описано выше, затем осушали в вакуумной печи в течение ночи при 35 - 36 С, и получали 0,8г волокнистого белого продукта.

Второй урожай продукта получали из первоначального маточного раствора с выходом 0,9г. Объединенные твердые фракции растворяли путем добавления 500мл ацетона, в результате чего получали 1,26г беловатого твердого продукта, $M_n = 3450$. Характеристическая вязкость составляла 3,85дл/г в воде. Анализ продукта показал:

1H ЯМР: 6 2,1(с); 7,44 (с); 7,78 (с); 8,02 (шир.с).

Олигомер В ($n = 3$)

Повторяли процедуру Примера 8А с использованием следующих количеств реагентов:

Реагент	Количество	ММ
BPDS	2,217г	6,25
TPC	0,952г	4,688
MBC	412мг	3,125
Na_2CO_3	2,65г	

и получали 1,58г ($M_n = 2000$) продукта в виде беловатого порошка. Характеристическая вязкость составляла 1,93дл/г в воде и 2,41дл/г в HBSS.

Олигомер С ($n = 9$)

Повторяли процедуру Примера 8А с использованием следующих количеств реагентов:

Реагент	Количество	ММ
BPDS	2,217г	6,250
TPC	1,142г	5,625
MBC	165мг	1,250
Na_2CO_3	2,65г	

и получали белый волокнистый продукт с выходом 1,42г ($M_n = 4900$). Характеристическая вязкость составляла 4,23дл/г в воде.

Биологические данные

Пример 1

Способность анти-ВИЧ-олигомера для предупреждения образования синцитиев и экспрессия антигена Р24-вирусного ядра с использованием JM-клеток и вирусного штамма GB8

Для того чтобы показать, что олигомер настоящего изобретения блокирует ВИЧ-инфекцию, Т-клетки CD4 (JM) подвергали воздействию клинического изолята ВИЧ-1, GB8. Сначала вирус инкубировали с олигомером в течение 15 минут, а затем добавляли клетки. После 2-х часовой адсорбции, вирусный инокулят удаляли, а клетки промывали три раза для удаления следов введенного вируса. Противовирусную активность определяли после 3-х дневной инкубации путем построения графической зависимости среднего числа синцитиев, обнаруженных в четвертичных культурах от \log_{10} - концентрации анионного полимера или других испытуемых соединений. Способность олигомера также измеряли путем анализа на антиген вирусного ядра (Р24 тест-Абботт) в надосадочной жидкости. В качестве положительного контроля использовали гепарин, декстрансульфат, rs CD4, ATZ и/или ddc-данные, которые приведены в Таблицах

Таблица 1

Соединение	Концентрац. мкг/мл	Синцитии	Р24 пг/мл	% контроль
Контроль	--	+++	>453600	100
Гепарин	5.0	0	2500	<0.1
	2.5	+/0	25775	<0.1
	1.25	+/0	N.A.	N.A.
	0.6	++	44570	0.1
Пример 1А	5.0	0	N.D.	N.A.

	2.5	0	96	<0.1
	1.25	0	541	<0.1
	0.6	+	37355	0.13
Пример 1В	5.0	0	465	<0.1
	2.5	0	365	<0.1
	1.25	+	35890	<0.1
	0.6	+	32820	0.1
N.D. = не обнаружено				
N.A.= не анализировались				

Пример 11

Инфектирование вирусом JM-клеток осуществляли в присутствии различных концентраций испытуемых соединений. JM-клетки (1 X 10) и 50 - 100 синцитий- образующих единиц вируса (GB8) добавляли в дублированные лунки планшеты для тканевых культур, содержащих 1мл объемов среды для выращивания без лекарственного средства и с содержанием лекарственного средства. Планшету инкубировали в течение 2 дней при 37°C, а затем анализировали на присутствие синцитиев. В то же время клетки промывали и культуральную среду заменяли. Затем инкубировали еще два дня, бес клеточные супернатанты собирали и анализировали на концентрацию антигена P24- вирусного ядра с использованием анализа Coulter на ВИЧ- антиген. Результаты анализа приводятся в Таблицах II - IV. В указанных Таблицах: N.D. = не обнаружено и N.A. = не анализировали.

Таблица 11

Соединение	Конц. мкг/мл	Синцитии 2 дня	Среднее	%	P24 ед./мл	%
Контроль	--	39, 27, 42, 31, 42, 41, 51, 13, 57, 53, 56, 38, 41, 47, 41, 45, 52	42	100	3.6×10^5	100
rs CD4	5	0	0	0	4.4×10^4	12
Гепарин	10	0, 0	0	0	1.1×10^4	3
	3	0, 0	0	0	1.1×10^4	5
	1	2, 1	2	5	2.8×10^4	8
	0.3	21, 22	22	52	4.1×10^4	11
	0.1	28, 20	24	57	N.A.	N.A.
	0.03	39, 19	29	69	N.A.	N.A.
	0.01	33, 42	38	90	N.A.	N.A.
Пример 1А	10	0, 0	0	0	N.D.	N.D.
	3	0, 0	0	0	N.D.	N.D.
	1	0, 0	0	0	9.1×10^3	3
	0.3	9, 19	14	33	4.0×10^4	11
	0.1	21, 28	25	58	4.0×10^5	100
	0.03	52, 52	52	123	4.3×10^5	100
	0.01	54, 66	60	143	N.A.	N.A.
Пример 1В	10	0, 0	0	0	N.D.	N.D.
	3	0, 0	0	0	N.D.	N.D.
	1	0, 0	0	0	1.6×10^3	0.4
	0.3	2, 0	1	2	3.8×10^4	11
	0.1	36, 13	25	58	4.4×10^5	100
	0.03	43, 40	42	100	4.1×10^5	100
	0.01	40, 54	47	112	N.A.	N.A.
Пример 3А	20	9, 1	5	12	N.D.	N.D.
	10	4, 2	3	7	4.1×10^4	11
	5	15, 14	15	36	3.6×10^5	100
	2.5	37, 38	38	90	2.5×10^5	69
	1.25	27, 13	20	48	4.3×10^5	100

	0.6	46, 55	51	120	N.A.	N.A.
Пример 8А	100	0, 0	0	0	N.D.	N.D.
	30	0, 0	0	0	N.D.	N.D.
	10	0, 0	0	0	N.D.	N.D.
	3	0, 0	0	0	4.4×10^4	12
	1	2, 3	3	7	4.3×10^4	12

Таблица 111

Соединение	Конц. мкг/мл	Синцитии	Средн. MEAN	%	P24 пг/мл	%
Контроль	--	46, 52, 69, 79, 84, 69, 81, 67, 68, 71, 64, 75	69	100	332300	100
rs CD4	10	0, 0	0		5340	1.6
	1	15, 24	20	28	88700	27
	0.1	35, 44	40	57	202000	61
Гепарин	100	0, 0	0		989	0.3
	10	0, 0	0		70700	21
	1	9, 17	13	19	211000	63
Пример 8А	500	0, 0	0		N.A.	N.A.
	50	0, 0	0		11600	3.5
	5	39, 31	35	51	268599	81

Пример 111

Способность различных анти-ВИЧ-олигомеров к предупреждению гибели вирус- индуцированных клеток с использованием MT4-клеток и штамма RF.

Различные олигомеры растворяли в RPMI- среде, а затем анализировали на анти-ВИЧ- активность путем удвоенных разведений растворов на 96-луночной планшете для микротитрования. Затем к каждой лунке добавляли 5×10^4 клеток и 100 TCID₅₀ вируса, и планшеты инкубировали в течение 7 дней при 37°C. Затем к каждой лунке добавляли МТТ и планшеты инкубировали еще 2 часа. Голубые кристаллы формазана растворяли, используя кислый изопропанол, и измеряли поглощение при 540нм. Результаты представлены в Таблице IV.

Таблица IV

Соединение	MW ^a	ED ₅₀ мкг/мл	TD ₅₀ мкг/мл
Гепарин	10,000 – 40,000	4,6	> 100
Пример 1В	4,168	2,2	> 100
Пример 1А	2,958	1,6	> 100
Пример 8С	5,290	2,2	> 100
Пример 8А	3,689	1,5	> 100
Пример 8В	2,180	2,1	> 100
Пример 2В	4,204	2,5	> 100
Пример 2А	2,883	1,9	> 100
Пример 3В	5,314	1,7	> 100
Пример 3А	3,284	>> 10	> 100

^aСреднечисловая молекулярная масса

Пример 1У

Исследование способности к предварительной обработке клеток различными олигомерами и к блокированию инфицирования ВИЧ-1 с использованием JM-клеток и GB8 -штамма ВИЧ-1

JM-клетки предварительно обрабатывали в течение ночи при 37°C различными соединениями при 20мкг/мл или оставляли необработанными. Клетки промывали 3 раза в RPMI-среде, в затем инфицировали ВИЧ - 1 (GB8) в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем клетки опять промывали 3 раза в RPMI-среде, ресуспендировали в свежей среде для их распределения в дублированных лунках, и инкубировали при 37°C. Через 2 дня подсчитывали синцитии, а бесклеточные супарнатанты собирали и анализировали на присутствие антигена вирусного ядра P24, используя анализ на ВИЧ-антиген Coulter™. Результаты представлены в Таблице У..

Таблица У

Соединение	Среднее число	%	P24 пг/мл	%
Контроль	119	100	28290	100
Пример 1А	14	12	2623	9
Пример 1В	52	44	2790	10
Пример 3А	153	129	26880	95
Гепарин	136	114	29090	103
Декстрансульфат	184	155	28710	101

Пример У

Исследование способности анти-ВИЧ-1-олигомеров к предупреждению образования синцитиев и экспрессия антигена Р24-вирусного ядра с использованием различных вирусных штаммов (GB8 и RF) и клеток (JM и C8 166)

Клетки инфицировали штаммом RF или GB8 в течение 24 часов при 37°C при множественности инфекции 0,001. Клетки промывали три раза для удаления остаточного вируса, а затем снова помещали на свежую культуральную среду. После чего клетки обрабатывали указанными концентрациями испытуемых соединений через 24 и 48 часов после инфицирования (p.i.). Через указанное количество дней p. i. определяли уровни синцитиев и Р24 описанными выше способами. Результаты представлены в Таблицах УI-УIII

Таблица УI

Эффект обработки ВИЧ-1 (GB8)-инфицированных клеток
(JM) через 24 часа после инфицирования

Соединение	Доза (мкМ)	Время добавления послеинфицирова- ния (часы)	синцитии на лунку через 3 дня p.i. ^{a)}	P24 пг/мл через бдней p.i. ^{a)}	контроль %
Контроль	0	-	>100	1.03×10^6	100
Пример 1А	2.5	0	0	4.2×10^2	0.04
Пример 1А	2.5	24	0	1.21×10^4	1.2
Пример 1А	1.2	24	<10	1.5×10^4	1.5
Пример 1А	0.62	24	< 20	5.6×10^4	5.4
Пример 1А	0.31	24	> 50	1.65×10^5	16.0

а)

p. i. - после инфицирования

Результаты Таблицы УI показывают, что вирус-индуцированные цитопатологические изменения, такие, как образование синцитиев, могут быть ингибированы даже, если соединения вводятся в уже инфицированные клетки. Эти результаты также показывают, что анионные олигомеры действуют по механизму блокирования связывания вируса с поверхностным белком клеток CD4.

Таблица УII

Эффект обработки ВН4-1(RF)- инфицированных клеток
(C8166) через 24 часа после инфицирования

Соединение	Доза (мкМ)	Время добавления после инфицирования часы	Синцитии на лунку		P24 пг/мл через 6 дней p.i. ^{a)}	Контроль %
			2 дня	3 дня		
Контроль	0	-	+	+++	9.5×10^5	100
DdC	10	0	0	0	1.3×10^4	1.4
DdC	10	24	+	+++	4.2×10^5	44.2
AZT	10	0	0	0	1.0×10^4	1.1
AZT	10	24	+	++	4.4×10^4	4.6
Пример 1А	10	0	0	0	1.6×10^4	1.7

Пример 1А	10	24	0	0	9.2×10^3	1.0
Пример 1А	5	24	0	0	9.3×10^3	1.0
Пример 1А	2.5	24	0	0	9.18×10^4	10.2
Пример 1А	1.25	24	0	++	1.5×10^6	100
Пример 1А	0.62	24	+	+++	7.0×10^5	74

а)

р. i.- после инфицирования

Результаты Таблицы УII показывают, что олигомеры настоящего изобретения являются эффективными против различных вирусных штаммов и различных типов клеток, даже если эти олигомеры добавляются через 24 часа после инфицирования вирусом.

Таблица УIII

Эффект обработки ВИЧ-1(G B8) - инфицированных клеток (JM) через 48 часов после инфицирования

Соединение	Доза (мкМ)	Время добавления после инфицирования (часы)	Синцитии на лунку ^{в)} через 3 дня р.i. ^{а)}	Через 6 дней р.i. ^{а)}	P24 пг/мл	Контроль %
Контроль	0	-	69 61 70	Дегенерированные клетки	1.1×10^5	100
Пример 1А	1.2	0	0 0 0	0 0 0	4.5×10^2	0.41
Пример 1А	1.2	48	19 10 12	2 5 9	2.1×10^4	19.0

Примечания к Таблице УIII

а) р. i.- после инфицирования

в) Через 48 часов р.i. в контрольных лунках наблюдали приблизительно 50 синцитий/лунка. В то же время, лунки загружали 5 мкг/мл олигомера Примера 1А и затем инкубировали. Синцитии подсчитывали на 3-й день р. i. На 4-й день р.i. клетки промывали в среде, содержащей 5 мкг/мл олигомера Примера 1А, и затем инкубировали в 5 мкг/мл олигомера Примера 1А. Вирус-контрольные клетки промывали в среде, не содержащей испытуемые соединения, и снова инкубировали параллельно. На 6-ой день. р. i. бесклеточную среду всех образцов собирали и определяли уровни антигена вируса Р24.

Результаты этих исследований показали, что олигомеры Примера 1А очищают культуры от синцитиев, стабилизируют от инфекции, и снижают уровни антигена вируса в клетках, зараженных вирусом.

Пример УI

Протокол: С8166-клетки инфицировали ВИЧ (штаммом RF) в течение 1 часа при комнатной температуре до получения множественности инфекции приблизительно 0,01инф.ед. на клетку. Затем клетки промывали три раза, ресуспендировали в свежей среде, и распределяли по дублированным лункам, содержащим различные концентрации испытуемого соединения. После выдерживания в течение 2-х дней при 37°C, клетки исследовали на присутствие синцитиев, а супернатант анализировали на антиген Р24-вирусного ядра, используя метод анализа на ВИЧ -антиген Coulter.

Таблица IX

Анти-ВИЧ-активность различных фениловых и бифениловых сложных эфиров дисульфоновой кислоты и поликарбонатных олигомеров

Соединение	Концентрация олигомера (мкг/мл)	Синцитии через 2 дня	P24 пг/мл через 2 дня	Вирусный контроль %
Вирусный контроль	-	+++	3.2×10^3	100
Пример 6	100	0	нег.	0
	50	0	нег.	0

	25	0/+	нег.	0
	12	0/+	нег.	0
Пример 4	100	++/+++	1.93×10^2	60
	50	++/+++	2.82×10^2	88
	25	++/+++	4.82×10^3	100
	12	++/+++	3.05×10^3	95
Пример 7	100	0/+	нег.	0
	50	++	8.7×10^2	27
	25	++/+++	1.45×10^3	45
	12	++/+++	3.14×10^3	98
Пример 5	100	+++	1.06×10^3	33
	50	+++	2.78×10^3	87
	25	+++	2.32×10^3	73
	12	+++	3.25×10^3	100
AZT	1	0	нег.	0
	0.1	0	нег.	0
	0.1	0/+	нег.	0

Пример УII

JM-клетки инфицированы ВИЧ (штаммом GB8) и получали приблизительно 200 синцитий/1 x 10⁵ клеток через 3 дня после заражения; инфицирование вирусом проводили в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем клетки промывали и резуспендировали в свежей среде, распределяли по дублированным лункам планшеты для тканевой культуры, содержащим различные концентрации испытуемых соединений. Через 3 дня клетки исследовали, синцитии подсчитывали, а супернатант анализировали на антиген P24-вирусного ядра с использованием метода ВИЧ-Ag -анализа Coulter.

Таблица X

Соединение	Концентрация олигомера (мкг/мл)	Среднее число синцитий через 3 дня p.i.	P24 пг/мл ^x через 3 дня p.i.
Вирус-контроль	-	>200	5.2×10^3
ddc	10	0	нег.
	1	0	нег.
	0.1	2	нег.
	0.01	80	5.4×10^3
Пример 6	200	0	-
	100	0	нег.
	50	12	нег.
	25	25	6.8×10^3
Пример 7	200	0	нег.
	100	7	нег.
	50	24	нег.
	25	43	нег.
Пример 5	200	14	нег.
	100	22	нег.
	50	68	нег.

	25	>200	6.7×10^1
Пример 4	200	токс.	-
	100	токс.	-
	50	64	нег.
	25	95	6.5×10^3

х
 супернатант сканировали при 1/100 -разведении
 Несмотря на проиллюстрированные и описанные выше конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам, очевидно, что настоящее изобретение не ограничивается изложенными вариантами и что возможны различные его изменения и модификации, не выходящие, однако, за рамки существа и объема нижеследующей формулы изобретения.