

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ИМ. И.Я. ПОСТОВСКОГО
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИОС УРО РАН)**

На правах рукописи

БАКЛЫКОВ АРТЕМ ВАСИЛЬЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА АНАЛОГОВ «ТРИАЗАВИРИНА»
В РЯДУ ТРИАЗОЛОПИРИМИДИНОВ**

Специальность: 2.6.10. Технология органических веществ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
Русинов Г. Л.

Екатеринбург

2024

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. Литературный обзор.....	9
1.1 “Дезаза-Триазавирины” как новые перспективные противовирусные препараты.....	9
1.2 Возможные пути получения 1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидиновых гетероциклов	16
1.2.1 Методы построения [1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7(4 <i>H</i>)-онов.....	16
1.2.2 Методы построения производных 1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидина	22
Глава 2. Разработка технологии получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин».....	33
2.1 Разработка опытно-промышленного метода получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]-пиримидин-7-она.....	33
2.1.1 Оптимизация условий опытно-промышленного способа получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>] пиримидин-7-она.....	34
2.1.2 Разработка аналитической методики совместного определения 5-амино-3 <i>H</i> -1,2,4-триазола и 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7-она	36
2.1.3 Изучение влияния микроволнового излучения на синтез 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7-она	42
2.1.4 Изучение влияния сверхкритического CO ₂ на синтез 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]-пиримидин-7-она.....	43
2.2 Разработка опытно-промышленного метода получения 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7-она	46
2.2.1 Оптимизация условий опытно-промышленного способа получения 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>] пиримидин-7-она.....	46
2.2.2 Разработка аналитической методики совместного определения 5-амино-3 <i>H</i> -1,2,4-триазола, 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7-она и 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]-пиримидин-7-она.....	48
2.3 Разработка опытно-промышленного метода получения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидинидина <i>L</i> -аргининия и его аналогов.....	54
2.3.1 Оптимизация условий опытно-промышленного способа получения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидинидина <i>L</i> -аргининия и его аналогов	54

2.3.2 Разработка аналитической методики определения основного вещества в АФС НТП- <i>L-arg</i>	56
2.4 Построение технологической и аппаратурных схем производства.....	63
2.4.1 Процедура получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>] пиримидин-7-она.....	63
2.4.2 Процедура получения технического 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7-она.....	64
2.4.3 Процедура очистки технического 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7-она.....	67
2.4.4 Процедура получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирина».....	69
2.5 Исследования фармакокинетики препаратов ряда «Дезаза-Триазавирина» на примере НТП- <i>L-arg</i>	72
2.5.1. Разработка методики определения препаратов ряда «Дезаза-Триазавирина» в плазме крови человека на примере НТП- <i>L-arg</i>	72
2.5.2 Дизайн исследования фармакокинетики препарата ряда «Дезаза-Триазавирина».....	77
2.5.3 Результаты исследования фармакокинетики препарата ряда «Дезаза-Триазавирина».....	82
2.6 Рецептuru готовой лекарственной формы препарата ряда «Дезаза-Триазавирина».....	92
Глава 3. Исходные вещества, методики эксперимента и анализа полученных соединений (экспериментальная часть).....	100
3.1 Исходное сырье.....	100
3.2 Полупродукты синтеза.....	100
3.3 Характеристики готовых продуктов.....	103
3.4 Используемое оборудование.....	107
3.5 Аппаратурное обеспечение схемы получения препаратов ряда «Дезаза-Триазавирина»....	107
3.6 Методики ВЭЖХ анализа.....	108
3.6.1 Совместное определение аминотриазола и триазолопиримидинона.....	108
3.6.2 Совместное определение аминотриазола, триазолопиримидинона и нитротриазолопиримидинона.....	109

3.6.3	Определение 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидинида <i>L</i> -аргининия моногидрата – действующего вещества препарата ряда «Дезаза-Триазавирина».....	109
3.6.4	Определение 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидинида <i>L</i> -аргининия моногидрата в плазме крови человека.....	110
3.7	Методика получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7(4 <i>H</i>)-она в условиях микроволнового возбуждения.....	111
3.8	Методика получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7(4 <i>H</i>)-она в сверхкритических условиях	111
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	112
	СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	114
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. В период сезонных эпидемий респираторные вирусные инфекции поражают от 10 до 20% населения планеты. Ввиду распространения различных типов ОРВИ и гриппа, пневмоний, коронавирусной инфекции, приведшей к беспрецедентной смертности больных в 2020-2021 гг., очевидна необходимость создания новых лекарственных препаратов для противодействия как традиционным, так и новым вирусным заболеваниям.

В результате совместных исследований Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина и НИИ гриппа Минздрава России были разработаны оригинальные противовирусные препараты ряда, условно названного «Дезаза-Триазавирин», в основе которых лежит биологически активный азолоазиновый гетероцикл – 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин, обладающий низкой токсичностью и высокой активностью в отношении вируса гриппа, структурно похожий на другой азолоазиновый гетероцикл – 6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*]-1,2,4-триазин-7(4*H*)-он – базовую структуру препарата «Триазавирин». К настоящему времени одно из соединений ряда «Дезаза-Триазавирин» – 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид-*L*-аргининия моногидрат – успешно прошел первую фазу клинических исследований, в том числе, с использованием данных настоящей работы.

Исследования в области создания новых химических лекарственных препаратов состоят из большого количества стадий, каждая из которых по-своему значима. Одним из ключевых этапов внедрения новых препаратов является разработка эффективной с экологической и экономической точек зрения технологии производства субстанций препаратов. Следует отметить, что в современном обществе массовое производство и потребление синтетических лекарственных препаратов приводит к образованию существенного количества отходов, что влияет на экологическое равновесие. В связи с этим все более востребованными становятся синтетические методологии, связанные с без- или малоотходными технологиями, которые позволяют избегать или минимизировать использование небезопасных органических растворителей. Таковыми являются, например, являются подходы с использованием методов механохимии и/или синтеза в условиях микроволнового (далее МКВ) излучения при возможности масштабирования процессов.

В разработке лекарственного средства важной составляющей наряду с эффективностью и безопасностью является достижение технологичности процесса производства. При создании технологии получения препарата и наработке опытно-промышленных партий самостоятельное

место занимает валидированный аналитический контроль качества как собственно продукта, так и полупродуктов.

Целью работы является разработка опытно-промышленной технологии получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирина», а также исследование фармакокинетики препарата на основе одного из них. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **основные задачи**: выбор оптимального способа синтеза данных соединений, оптимизация всех технологических процессов, разработка технологического и аппаратурного оформления, аналитического контроля качества продуктов и их предшественников; разработка аналитической методики определения соединения ряда «Дезаза-Триазавирина» в плазме крови человека методом ультра-ВЭЖХ и изучение его фармакокинетики в рамках первой фазы клинических исследований.

Научная новизна и теоретическая значимость. Исходный способ химического синтеза субстанций ряда «Дезаза-Триазавирина» и их предшественников был модифицирован и масштабирован к требованиям опытно-промышленного производства. В результате разработан новый опытно-промышленный способ их получения. Так, разработан метод получения в опытно-промышленных условиях интермедиата – 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она – путем циклоконденсации 5-амино-3*H*-1,2,4-триазола с ацетоуксусным эфиром. Изучено влияние на синтез 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она МКВ излучения и сверхкритических условий. Разработан метод последующего нитрования 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она в опытно-промышленном масштабе. Найдены условия опытно-промышленного получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирина» реакцией солеобразования 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она с соответствующими основаниями: гидроксидом натрия, пиперидином, аминоэтиладамантаном (ремантадином) и *L*-аргинином. Разработаны технологические и аппаратурные схемы всех этапов производства. Проведена разработка аналитических методик совместного определения 5-амино-3*H*-1,2,4-триазола, 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она и 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она методом ВЭЖХ. Впервые выполнена разработка аналитической методики определения исследуемого ряда препаратов на примере 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид-*L*-аргининия моногидрата (далее НТП-*L*-arg) методом ВЭЖХ. Проведена валидация перечисленных выше аналитических методик в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 ГФ XIII, в результате чего показана возможность их применения для контроля качества на производстве. Проведена разработка и валидация методики определения НТП-*L*-arg в плазме крови человека методом ультра-ВЭЖХ с аналитической областью от 0.03 до 20.00 мкг/мл и пределом обнаружения 0.01 мкг/мл. С помощью разработанной методики была

изучена фармакокинетика НПТ-*L-arg* в рамках первой фазы клинических исследований. Предложена рецептура готовой лекарственной формы препарата на основе НПТ-*L-arg*.

Практическая значимость работы. Выполнен весь комплекс работ для выведения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирина» на первую фазу клинических исследований. Нарботаны опытно-промышленные партии субстанций, соответствующие требованиям государственной фармакопеи РФ и пригодные для производства лекарственных препаратов ряда «Дезаза-Триазавирина». Подготовлена теоретическая и экспериментальная база для создания промышленного производства субстанций ряда «Дезаза-Триазавирина», а также успешно проведена первая фаза клинических исследований препарата на основе НПТ-*L-arg*.

Методология и методы диссертационного исследования основаны на анализе литературных данных по теме работы, выборе оптимального пути получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин», отработке технологических режимов всех процессов, разработке и валидации аналитических методик контроля качества продукта и всех полупродуктов. Строение продукта и полупродуктов доказано с использованием различных аналитических методов (элементный анализ, ИК- и спектроскопия ЯМР, ВЭЖХ и др.); анализы выполнены в центре коллективного пользования "Спектроскопия и анализ органических соединений" (ЦКП САОС) при ИОС УрО РАН.

Степень достоверности результатов обеспечена применением современных аналитических методов с целью установления строения и чистоты продукта и полупродуктов (использовались ИК- и спектроскопия ЯМР, элементный анализ, ВЭЖХ, спектрофотометрия). Анализ осуществлялся на сертифицированных и поверенных приборах ЦКП САОС.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методы опытно-промышленного получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она, 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она, 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло-[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата и других активных фармацевтических субстанций (далее АФС) ряда «Дезаза-Триазавирина» с соответствующими основаниями: гидроксидом натрия, пиперидином и ремантадином.

2. Результаты экспериментов по влиянию МКВ излучения и сверхкритических условий на синтез 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она.

3. Аналитические методики совместного определения 5-амино-3*H*-1,2,4-триазола, 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она и 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она методом ВЭЖХ.

4. ВЭЖХ методика определения основного вещества в АФС НПТ-*L-arg*.

5. Технологическая и аппаратурная схемы получения АФС ряда «Дезаза-Триазавирина».

6. Способ определения НПТ-*L-arg* в плазме крови человека методом ультра-ВЭЖХ.

7. Результаты исследований фармакокинетики препарата на основе НПТ-*L-arg*, полученные с использованием разработанной методики.

8. Рецептúra готовых лекарственных форм препарата на основе АФС НПТ-*L-arg*.

Личный вклад соискателя состоит в сборе и систематизации литературных данных по методам синтеза и анализа полупродуктов и конечных продуктов, постановке целей и задач исследования, формировании экспериментальных подходов к разработке эффективного опытно-промышленного метода получения активных фармацевтических субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин» и полупродуктов их синтеза, анализе и интерпретации полученных данных, подготовке публикаций результатов исследований.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены на следующих конференциях: «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2017, 2018 гг.), «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2017 г.), на Третьем съезде аналитиков России (Москва, 2017 г.) и II – III Международные конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM, 2018-2019 гг.).

Препараты разработаны в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН, Уральском федеральном университете им. первого Президента России Б.Н. Ельцина совместно с Институтом молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и Научно-исследовательским институтом гриппа МЗ РФ при финансовой поддержке со стороны Федерального агентства по науке и инновациям в рамках приоритетного направления «Живые системы».

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 8 статей, из них – 4 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 3 статьи в изданиях, входящих в международные базы цитирования WoS и Scopus, и 6 тезисов докладов на конференциях.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа общим объёмом 125 страницы состоит из трех основных глав: литературного обзора, обсуждения результатов и экспериментальной части, а также оглавления, введения, заключения, списка литературы и условных сокращений. Работа содержит 101 ссылку на литературные источники, 36 таблиц, 31 схема и 36 рисунков.

Глава 1. Литературный обзор

В рамках литературного обзора рассмотрены выполненные к настоящему времени исследования противовирусной активности препаратов ряда «Дезаза-Триазавирина» в сравнении с ближайшим аналогом противовирусным препаратом «Триазавирин», а также анализ литературных данных по методам синтеза 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинового цикла, лежащего в основе строения субстанций.

1.1 “Дезаза-Триазавирины” как новые перспективные противовирусные препараты

“Дезаза-Триазавирины” – ряд новых синтетических противовирусных препаратов широкого спектра действия, лекарственные субстанции которые по химической структуре представляют собой ряд гетероциклических солей 5-метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидина **1a-d**, а именно натрия 5-метил-6-нитро-7-оксо-7*H*-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-4-иддигидрат **1a**, пиперидин-1-ия-5-метил-6-нитро-7-оксо-7*H*-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-4-ид моногидрат **1b**, 1-((3*г*,5*г*,7*г*)-адамантан-1-ил)этан-1-аминий 5-метил-6-нитро-7-оксо-7*H*-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-4-ид моногидрат **1c**, 5-метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинат-8*H*⁺-аргининия моногидрат **1d** [1, 2] (рисунок 1.1).

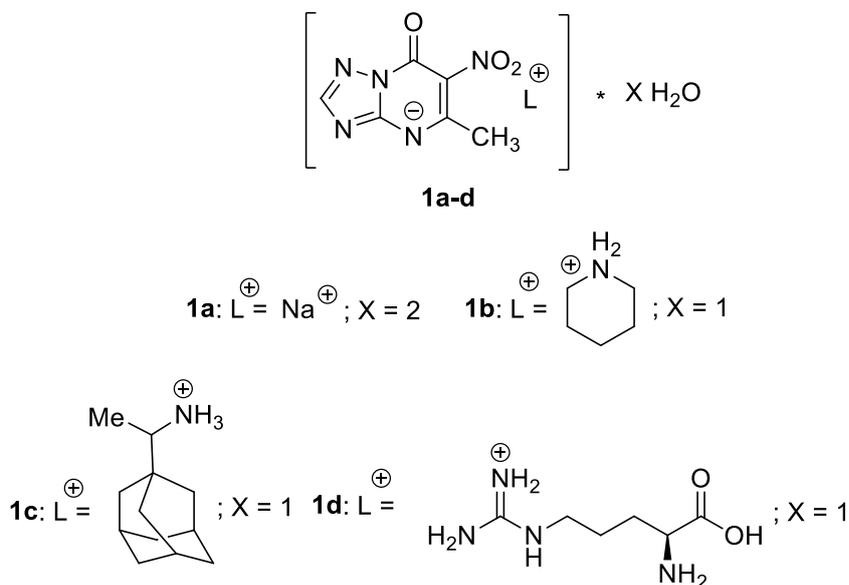
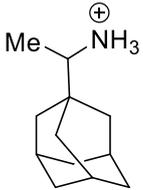
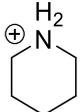
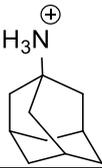
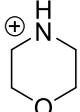
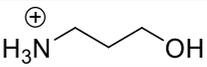


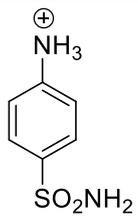
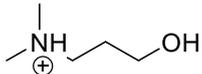
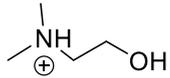
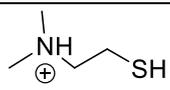
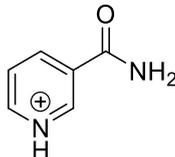
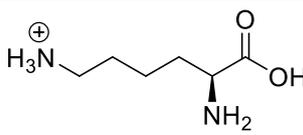
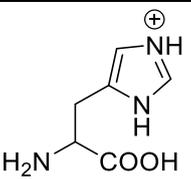
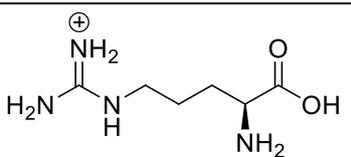
Рисунок 1.1

Выбор ряда катионов обусловлен данными, полученными в результате испытаний биологической активности субстанций ряда «Дезаза-Триазавирина», проведенных в НИИ Гриппа (г. Санкт-Петербург) под руководством академика О.И. Киселева [3]. Определение противовирусной активности препаратов в отношении вируса гриппа А/PR/8/34 А(Н1N1) проводилось на клетках MDCK в 96-луночных планшетах для клеточных культур. Из исходной вирусосодержащей аллантаоисной жидкости готовили серию десятикратных разведений от 10⁻¹ до

10^{-7} и вносили в соответствующие лунки с клеточным монослоем. После часового контакта при 36-37 °С в лунки добавляли препарат в рабочей концентрации. Результаты учитывали через 48 ч по реакции гемагглютинации (ГА) с взвесью 0.5% куриных эритроцитов. Вирусингибирующее действие препаратов оценивали по снижению титра вируса в опыте по сравнению с контролем. По результатам испытаний, выраженное противовирусное действие (lg_{ED50} 2.0-2.5) показала натриевая соль нитротриазолопиримидина **1a**. Высокую противовирусную активность (lg_{ED50} 2.5-3.0) в отношении вируса гриппа А/PR/8/34 А (штамм H1N1) показали соли нитротриазолопиримидина с участием пиперидина **1b**, аминоэтиладамантана (ремантадина) **1c** и *L*-аргинина **1d**. Также было показано, что среди активных противовирусных соединений с точки зрения минимальной токсичности наиболее предпочтительны натриевая соль триазолопиримидина **1a**, пиперидиновая соль **1b** и соль на основе аргинина **1d**, а с точки зрения противовирусного действия адамантилэтиламмониевая **1c**, пиперидиновая **1b** и аргининовая **1d** соли одинаково перспективны. Результаты исследования активности *in vitro* приведены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Токсичность и противовирусная активность *in vitro* различных солей триазолопиримидина **1** относительно соответствующих катионов [3]

Катион	Минимальная токсическая доза, mM	Максимальная рабочая концентрация, mM	Противовирусная активность, $lg_{ED50}/20\text{мкл}$
1	2	3	4
H ⁺	1.020	0.510	1.0
Na ⁺	1.200	0.600	2.0
Ag ⁺	0.330	0.165	1.5
	0.268	0.134	3.0
	0.358	0.179	3.0
	0.290	0.145	2.5
	0.354	0.177	2.0
	0.740	0.370	1.0

1	2	3	4
	0.544	0.272	1.0
	0.670	0.335	1.0
	0.704	0.352	0.5
	0.734	0.367	0.5
	0.630	0.315	0.5
	0.320	0.160	0.5
	0.294	0.147	0.5
	0.554	0.277	2.5

Соединения **1a-d** представляют собой желтые кристаллические вещества, растворимые в воде, диметилсульфоксиде, малорастворимые в этаноле, практически нерастворимы в изопропиловом спирте, хлороформе и большинстве апротонных растворителей. Не имеют характерной температуры плавления. Температуры дегидратации лежат в интервале 150-190 °С, температура разложения превышают 220 °С.

Препараты разработаны при финансовой поддержке со стороны Федерального агентства по науке и инновациям в рамках приоритетного направления «Живые системы» в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН, Уральском федеральном университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина совместно с Институтом молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и Научно-исследовательским институтом гриппа МЗ РФ.

«Дезаза-Триазавирины» являются представителем такого важного класса азотсодержащих гетероциклов, как азолазины. Структурное подобие природным пуринам обуславливает их разнообразную биологическую активность [4, 5].

Действительно, производные этого класса проявляют обширный круг биологических активностей, в частности противовирусные [6], антибактериальные [7, 8, 9], противотуберкулёзные [10], противораковые [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19], противомаларийные [20, 21, 22] и противолейшманиозные [23] свойства. Кроме того, в литературе встречаются упоминания о том, что азолазины являются противовоспалительными средствами [24], регуляторами кровяного давления [25], а также потенциальными веществами для лечения нейродегенеративных заболеваний [26, 27, 28].

Кроме того, исходя из недавно проведённых исследований антиоксидантной и противовирусной активности σ -аддуктов азоло[5,1-*c*]триазинов и азоло[1,5-*a*]пиримидинов, содержащих различные полифенольные фрагменты показано, что наибольшую антиоксидантную активность проявляют триазоло-триазин-7-олы, несущие нитрогруппы в положении С6. Авторы объясняют это тем, что появление дополнительного атома азота в азинах приводит к смещению электронной плотности с фенольного фрагмента на азолазиновый фрагмент, что облегчает процесс переноса электрона при окислении. В этом же исследовании отмечено, что вирусингибирующая активность 6-нитро-1,2,4-триазолоазинов зависит как от строения гетероциклического ядра, так и от заместителей в нём. Причём, заместители, находящиеся в положении С2, имеют гораздо большее влияние, чем полифенольные фрагменты в положении С7 (таблица 1.2) [29]. Таким образом, подтверждается значимость наличия нитрогруппы в структуре азолазиновых препаратов с точки зрения их биологической активности.

Таблица 1.2 – Зависимость цитотоксической и вирусоингибирующей активностей азолотриазинов и азолопиримидинов в клетках MDCK против вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) (анализ ингибирования цитодеструкции) от заместителей в положениях C2 и C7

Заместители	Азолотриазины			Азолопиримидины		
	C2-H	C2-SMe	C2-CF ₃	C2-H	C2-CF ₃	C2-фуранил
C7-ОН CC ₅₀ ^a , μM IC ₅₀ ^b , μM SI ^c	>1639 1093 ± 56 2	362 ± 12 44 ± 3 8	183 ± 11 > 120 2	1205 ± 49 21 ± 2 57	> 1200 101 ± 11 12	368 ± 26 42 ± 5 9
C7-Резорцинол CC ₅₀ , μM IC ₅₀ , μM SI	87±5 >36 2	99 ± 6 15 ± 3 7	40 ± 3 11 ± 2 4	119 ± 6 26 ± 2 5	877 ± 51 23 ± 2 39	252 ± 12 27 ± 4 9
C7-Флороглуцинол CC ₅₀ , μM IC ₅₀ , μM SI	123±10 28±4 4	33 ± 3 11 ± 3 3	108 ± 7 9 ± 2 13	> 1034 20 ± 3 51	838 ± 42 27 ± 3 32	280 ± 14 70 ± 11 4
C7-Пирогаллол CC ₅₀ , μM IC ₅₀ , μM SI	99±8 34±4 3	201 ± 19 18 ± 3 11	108 ± 4 33 ± 3 3	228 ± 17 86 ± 10 3	196 ± 15 26 ± 4 8	67 ± 4 10 ± 2 7
C7-Пирокатехол CC ₅₀ , μM IC ₅₀ , μM SI	> 1087 167 ± 22 7	258 ± 14 6 ± 1 43	119 ± 9 9 ± 1 14	405 ± 32 595 ± 61 1	373 ± 29 47 ± 6 8	317 ± 22 97 ± 12 3

^a50% цитотоксическая концентрация, при которой разрушается 50% клеток неинфицированного монослоя; ^b50% ингибирующая концентрация, при которой 50% клеток в инфицированном монослое защищены; ^cиндекс селективности, отношение CC₅₀/IC₅₀

Ранее совместными усилиями Института органического синтеза имени И.Я. Постовского Уральского отделения РАН, Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, НИИ гриппа Минздрава РФ, Вирусологического центра Министерства обороны РФ, ООО «Уральский центр биофармацевтических технологий» и ООО «Завод Медсинтез» на рынок был выведен другой представитель азолазинового ряда: «Триазавирин», обладающий широким спектром противовирусного действия [30].

Принимая во внимание тот факт, что данные по противовирусной активности препарата «Триазавирин» в сравнении с другими широко применяемыми противовирусными препаратами неоднократно обобщались [31, 32], в рамках настоящей работы, именно «Триазавирин» был выбран в качестве препарата сравнения для оценки противовирусной активности субстанций

ряда «Дезаза-Триазавирина» [3]. Так, для оценки противовирусной активности НТП-*L*-arg в отношении штамма вируса гриппа А/Сидней/5/97 (H3N2) использовались следующие показатели:

- РГА – реакция гемагглютинации - используется для оценки противовирусного действия препаратов в отношении вирусов (в том числе вируса гриппа), которые способны агглютинировать эритроциты ряда животных. В основе реакции гемагглютинации лежит способность вирусов «склеивать» эритроциты крови, адсорбируясь на них. Гемагглютинирующий титр вируса — это наибольшее разведение (наименьшее количество вируса), при котором наблюдается гемагглютинация. Таким образом, рассчитывают титр вируса, который выражают в десятичных логарифмах 50%-ной тканевой цитотоксической инфекционной дозы (ТИД50) и высчитывают разницу логарифмов между опытной и контрольной пробами, что показывает, на сколько снижается инфекционная доза вируса под действием препаратов;

- ИФА - метод иммуноферментного анализа - для изучения активности химических соединений используют модифицированный иммуноферментный анализ, который позволяет выявить уровень экспрессии вирусных антигенов на поверхности клеток в опытных (с исследуемым соединением) и контрольных группах (без соединений и/или с референс-препаратами – тамифлю, ремантадин пробах). Результаты учитываются по измерению оптической плотности в каждой группе. В ходе анализа производится расчёт количественного показателя ингибирования – отношения оптической плотности опыта (лунка с соединением) к оптической плотности вирусного контроля (лунка с вирусом без препарата) выраженное в процентах.

- МТТ – микротетразолиевый тест – метод оценки репликации вируса в присутствии препаратов по проявлению цитопатогенного действия вируса в культуре клеток, характеризующий интенсивность митохондриального дыхания живых клеток. МТТ основан на способности дигидрогеназ живых клеток восстанавливать желтую соль метилтетразолия (МТТ реагент) в формазан, имеющий фиолетовую окраску, интенсивность которой фиксируется спектрофотометрически. На основании полученных данных рассчитывают титр вируса, который выражают в десятичных логарифмах 50%-ной тканевой цитотоксической инфекционной дозы (ТИД50) и высчитывают разницу логарифмов между опытной и контрольной пробами. В ходе анализа также производится расчёт количественного показателя ингибирования – отношения оптической плотности опыта (лунка с соединением) к оптической плотности вирусного контроля (лунка с вирусом без препарата) выраженное в процентах.

При анализе данных по этим показателям (таблица 1.3) можно сделать вывод о том, что триазолопиримидиновая структура проявляет более мощный противовирусный эффект в

отношении вируса гриппа А/Сидней/5/97 даже в концентрации 5 мкг/мл по сравнению с «Триазавирином» в концентрации 50 мкг/мл.

Таблица 1.3 – Действие НТП-*L*-arg на вирус гриппа А/Сидней/5/97 (H3N2) *in vitro*

Препарат	Концентрация, мкг/мл	РГА $\Delta \lg \text{ТИД}_{50}$	ИФА _{max} , % ингибирования	МТТ $\Delta \lg \text{ТИД}_{50}$	МТТ _{max} , % ингибирования
НТП- <i>L</i> -arg	100	1,0±0,5	29,3	1,36	82,4
	50	1,0±0,25	16,4	0,65	83,8
	5	1,0±0,45	15,0	0,50	79,4
«Триазавирин»	50	0,75±0,30	13,6	0,50	62,0

Также, НТП-*L*-arg показал высокий уровень противовирусной активности на модели летальной гриппозной инфекции у мышей, вызванной вирусом А/Aichi/2/68 (H3N2) (Рисунок 1.2): при пероральном введении НТП-*L*-arg обладает высокой противовирусной активностью (коэффициент защиты >70%), несколько опережая по этому показателю препарат сравнения, «Триазавирин», в дозировке 100 мг/кг. При исследовании острой токсичности «Деаза-Триазавирин» на аутбредных крысах и мышах, а также беспородных собаках значения LD50 установить не удалось в связи с отсутствием гибели экспериментальных животных. Максимальная доза субстанции для грызунов при внутрижелудочном введении составила 40000 мг/кг. Максимальная доза НТП-*L*-arg при пероральном введении собакам составила 20000 мг/кг. Учитывая, что максимальная доза при внутрижелудочном введении крысам составила 40000 мг/кг, НТП-*L*-arg можно отнести к VI классу относительно безвредных веществ по классификации Hodge и Sterner [33]. Препарат сравнения – «Триазавирин», отнесен к малотоксичным лекарственным веществам (IV-V класс по классификации Hodge и Sterner), LD50 при внутрижелудочном введении «Триазавирин» аутбредным крысам и мышам разного пола - 8000-9500 мг/кг. Максимальная доза «Триазавирин» при пероральном введении собакам - 400 мг/кг.

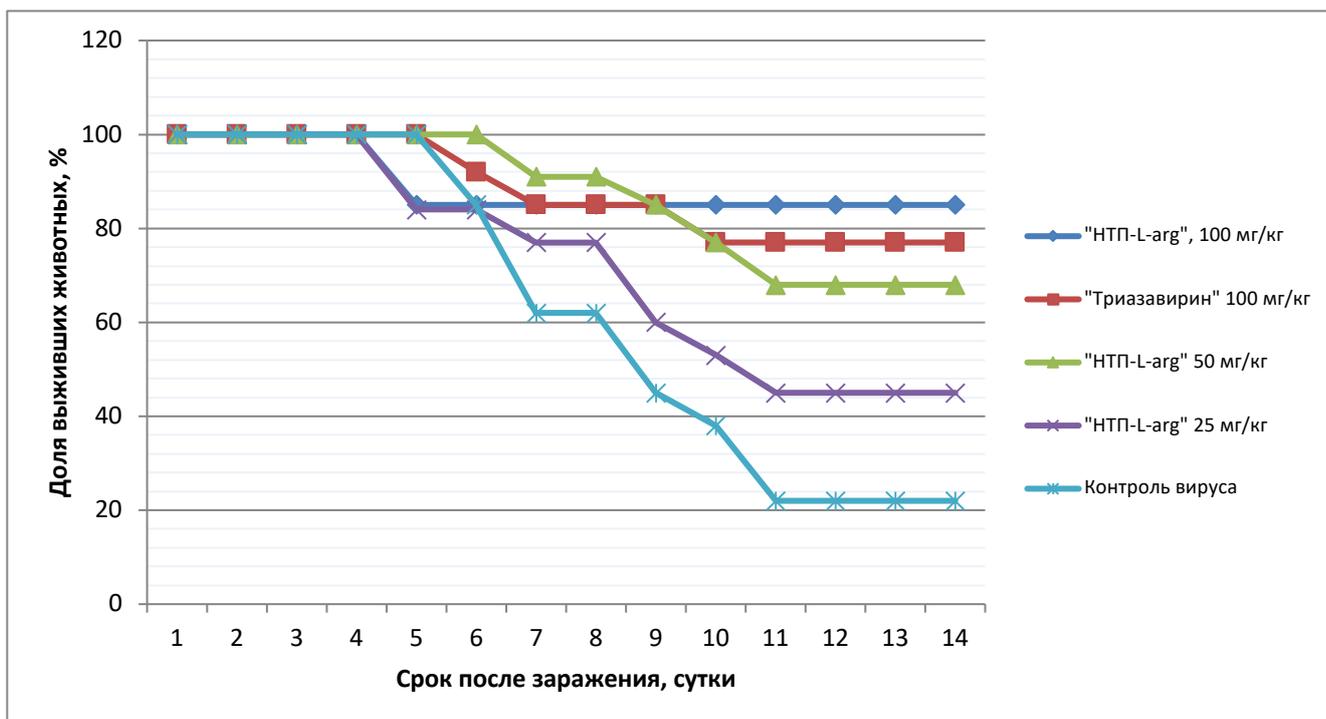


Рисунок 1.2 – Активность НТП-L-arg перорально, при лечебно-профилактической схеме введения (вирус гриппа A/Aichi/2/68). Заражающая доза вируса 10 LD50

Таким образом, 5-метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинат 8Н⁺ - аргининия моногидрат **1d** проявляет высокую и умеренную противовирусную активность *in vitro* и *in vivo*. В сравнении с прототипом - «Триазавирином» - заявляемое соединение показывает либо более высокую, либо соизмеримую активность. В то же время острая токсичность НТП-L-arg оказалась в несколько раз ниже по сравнению с «Триазавирином». Таким образом, при совместной оценке противовирусного действия и токсичности НТП-L-arg является более эффективным в сравнении с соединением-прототипом.

1.2 Возможные пути получения 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидиновых гетероциклов

Данный раздел литературного обзора посвящён поиску оптимального метода синтеза азолазинового цикла, лежащего в основе субстанций препаратов ряда «Дезаза-Триазавирин» на основе литературных данных. Выбор оптимальной методики производился с учетом токсичности исходных соединений, их доступности, стоимости, выходов на химических стадиях, методов выделения продукта и т.д.

1.2.1 Методы построения [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7(4Н)-оно

Одним из наиболее распространенных методов получения триазолопиримидонов **1.1a** является циклоконденсация различных 3-амино-1,2,4-триазолов **1.2** с ацетоуксусными эфирами **1.3** при кипячении в уксусной кислоте, которые получили развитие с середины прошлого века (схема 1.1) [34, 35].

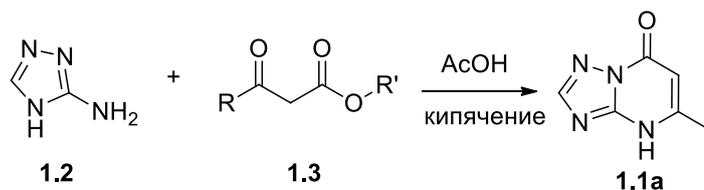


Схема 1.1

К настоящему времени для данного взаимодействия накоплено большое количество примеров использования как функционализированных по положению С5 3-амино-1,2,4-триазолов **1.4a,b**, так и различных производных ацетоуксусных эфиров **1.5a,b**. Ниже приведены наиболее репрезентативные примеры, отражающие структурную многогранность получаемых таким образом соединений **1.6a-c** (схема 1.2 [36], схема 1.3 [37, 38]).

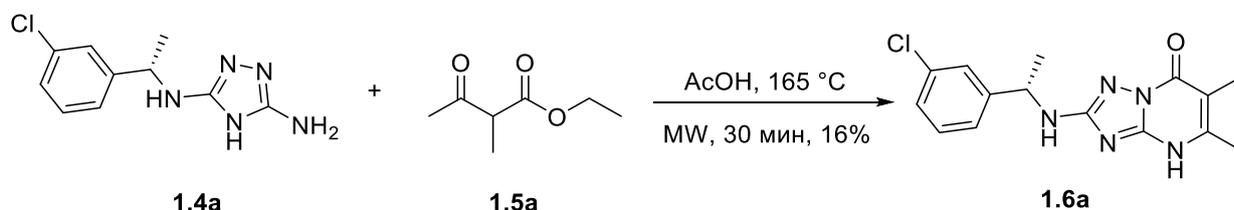


Схема 1.2

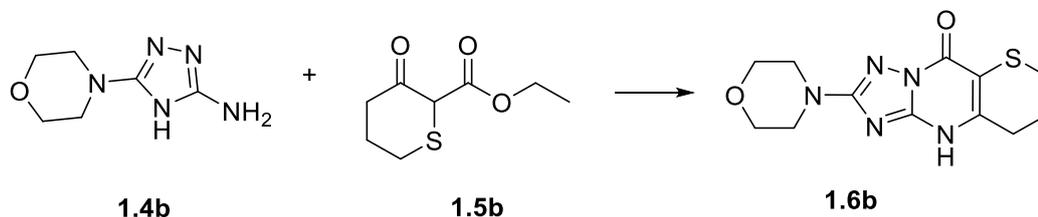
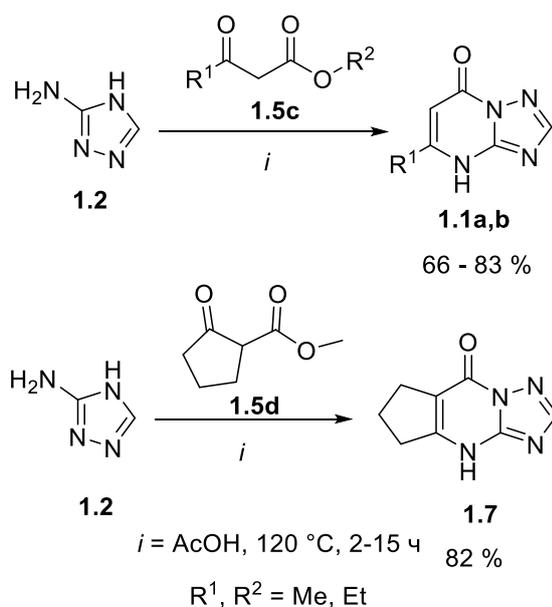
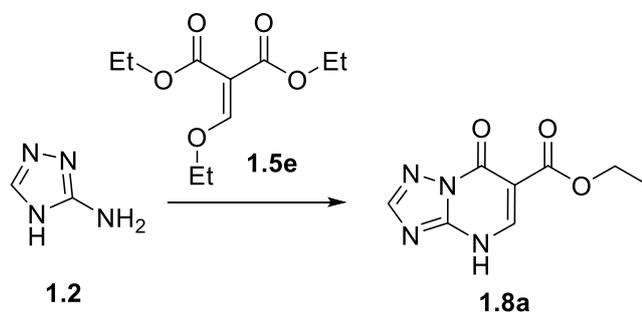


Схема 1.3

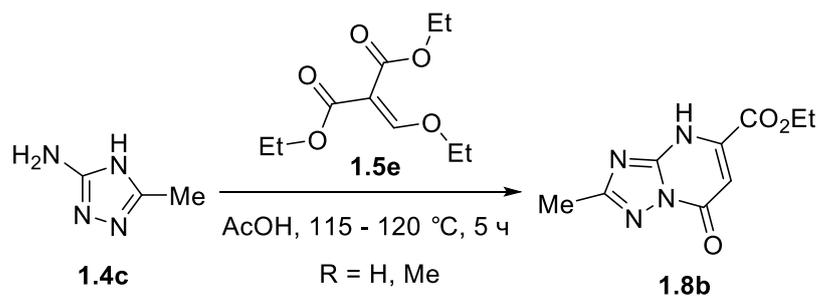
Благодаря относительной простоте и универсальности в последние годы данный подход к получению замещённых триазолопиримидинонов получил дальнейшее развитие и статус одного из основных. Например, как показано на схеме 1.4, 4*H*-1,2,4-триазол-3-амин **1.2** реагирует с различными β-кетозэфирами **1.5c**, в том числе с метил-2-циклопентанонкарбоксилатом **1.5d** при кипячении в уксусной кислоте с образованием целевых соединений **1.1a,b** и **1.7** соответственно [39].



Использование диэтилэтоксиметиленмалоната **1.5e** в качестве кетозэфира позволяет получить [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7(4*H*)-оны **1.8a** со свободным положением C5 полициклической системы (схема 1.5) [40, 41, 42].



Аналогичная циклизация аминотриазола **1.4c** в ледяной уксусной кислоте приводит к соответствующему 1,2,4-триазол[1,5-*a*]пиримидину **1.8b** с высокими выходами (схема 1.6) [43].



Описан метод получения триазолопиримидона **1.9** из легкодоступных амингуанидина гидрохлорида **1.10** и ацетоуксусного эфира **1.5f** в щелочной среде (схема 1.7) [44]. Промежуточным продуктом при этом выступает 2,3-диамино-6-метилпиримидин-4(3*H*)-он **1.11**, гетероциклизация которого с избытком уксусной кислоты приводит к конечному продукту **1.9**.

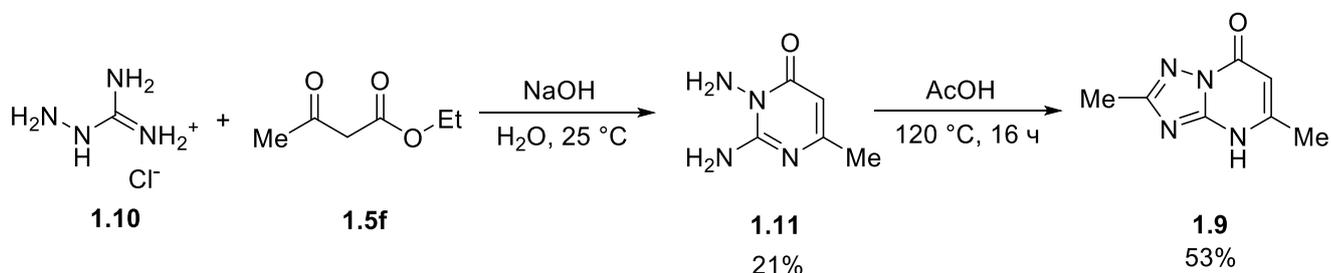


Схема 1.7

Изучено взаимодействие 5-амино-3-*R*-1*H*-1,2,4-триазолов **1.4d,e** и 2-циано-3-этоксиакрилата **1.12**, которое приводит к образованию 5-амино-6-этоксикарбонил-2-*R*-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинам **1.13a,b** [45]. Последующие гидролиз сложноэфирной группы, декарбоксилирование, диазотирование по аминогруппе и гидролиз диазониевой соли приводят к целевым соединениям **1.15a,b** (схема 1.8).

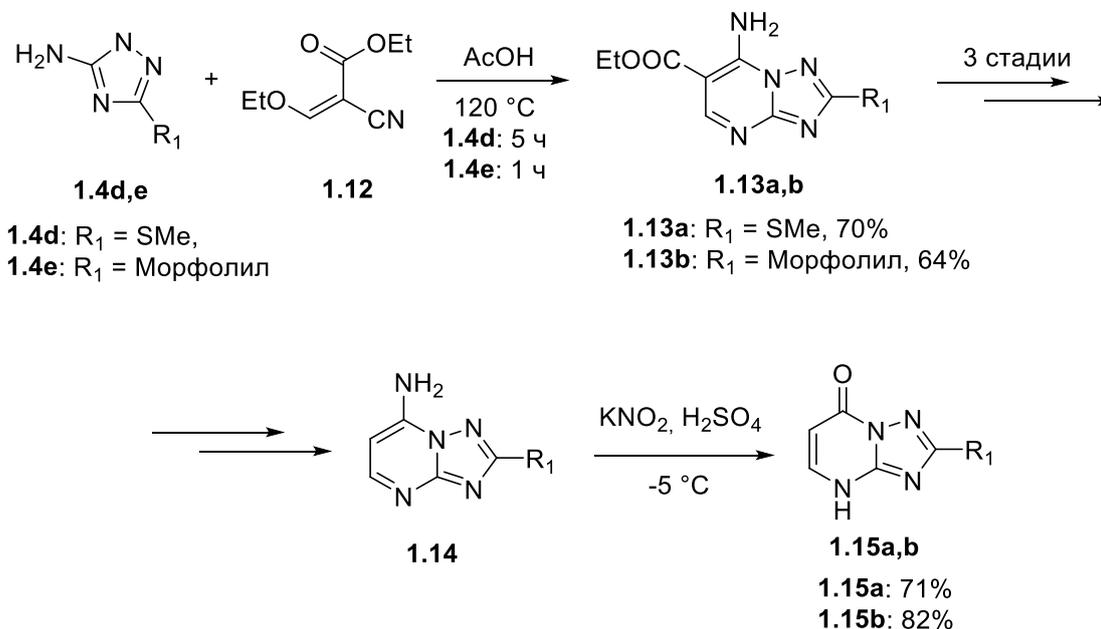


Схема 1.8

Описан оригинальный пример циклизации пиразола **1.16** и 5-амино-1,2,4-триазола **1.2** через образование промежуточного кетона **1.17**. Конечная циклизация с получением продукта **1.18** осуществляется в ДМФА в присутствии K₂CO₃ (схема 1.9) [46].

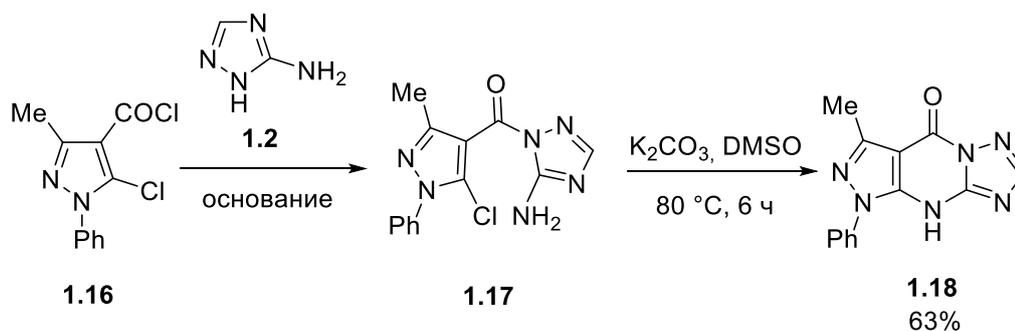


Схема 1.9

Guillaumet и соавторы привели пример получения соединения **1.19** в результате последовательности реакций нуклеофильного замещения атома хлора в структуре 1,2,4-триазина **1.20** и последующей циклизации 1,2,4-триазолов **1.2** и **1.4f** со сложноэфирной группой триазина. Данное взаимодействие протекает при использовании каталитической системы и в условиях «one-pot» синтеза (схема 1.10) [47].

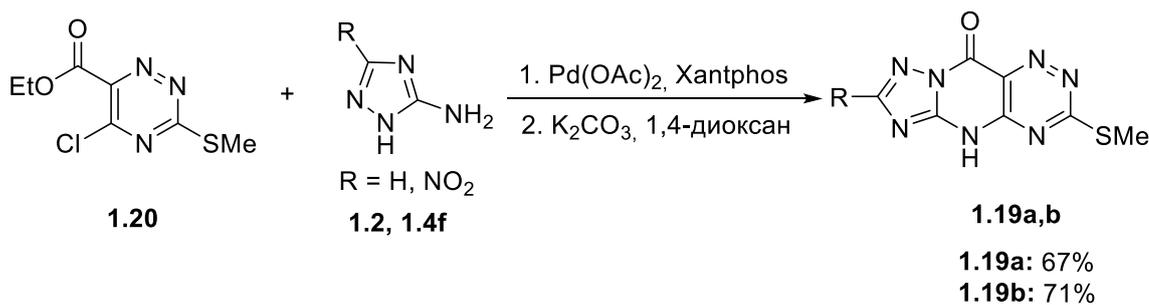


Схема 1.10

Описан удобный метод построения триазоло[1,5-*a*]пиримидонов **1.21** на основе соответствующих триазоло[1,5-*a*]пиримидинов **1.22** при их взаимодействии с 2-цианоацетамидом **1.23** [48]. При этом сперва происходит образование соответствующей натриевой соли **1.24**, обработка которой HCl приводит уже к конечным соединениям **1.21** (схема 1.11). Данный подход интересен благодаря высоким выходам продуктов и мягким условиям реакций.

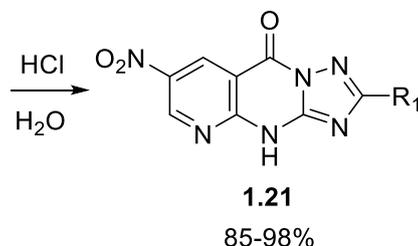
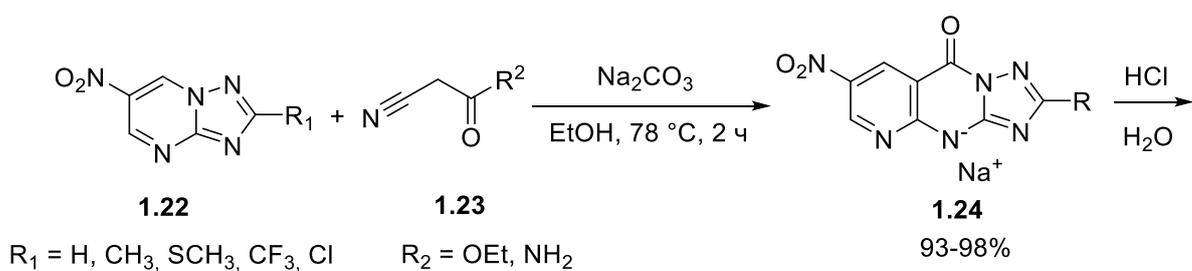


Схема 1.11

В литературе представлен метод построения 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидиновой системы на примере синтеза соединения **1.25** путем циклодегидрирования оксидигидропиримидина **1.26** в результате его окислительной циклизации под действием FeCl_3 (схема 1.12) [49]. При этом авторы сообщают, что важным условием для осуществления такого реакционного пути является наличие NH-фрагмента цикла.

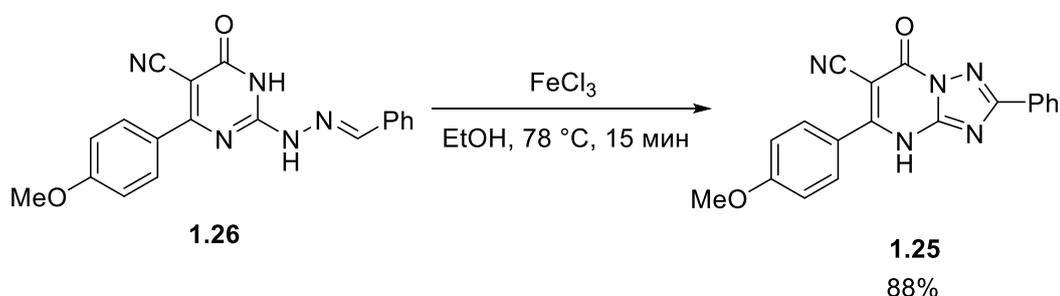


Схема 1.12

Кроме того, совсем недавно был разработан одностадийный метод синтеза замещённых 5-аминоазоло[1,5-*a*]пиримидинов **1.27** с применением синтетического эквивалента карбонильного диэлектрофила на основе кислоты Мелдрума (соединение **1.28**), что позволило авторам ввести замещённую аминогруппу в положение C5 азоло[1,5-*a*]пиримидинов **1.2, 1.4c,d,g** без использования жестких условий и палладиевых катализаторов. Описанный механизм данного взаимодействия предполагает образование промежуточного 6-карбокситриазолопиримидина **1.29** с последующим отщеплением карбоксильной группы (схема 1.13) [50].

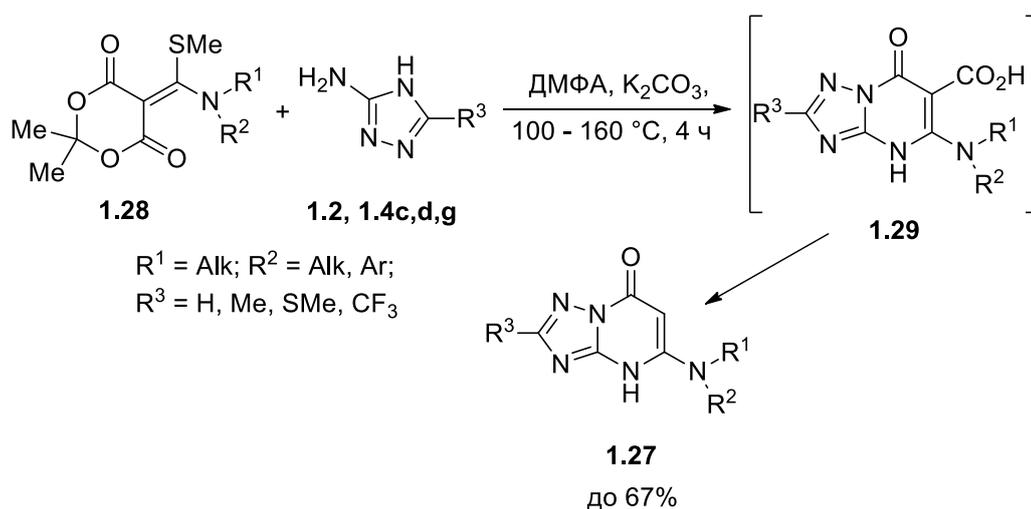


Схема 1.13

1.2.2 Методы построения производных 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина

Круг источников, посвященных синтезу азолопиримидинов, весьма обширен и подробное рассмотрение этих данных является темой для самостоятельных обзоров [51]. Поэтому в этой главе рассмотрены лишь основные подходы к получению соединений этого ряда. Можно выделить два основных подхода к синтезу триазолопиримидинов. В первом на основе реакций конденсаций с аминотриазолом формируют пиримидиновый цикл. Второй же, наоборот, заключается в использовании готовой пиримидиновой системы с последующим построением триазольной части молекулы.

Из 3-амино-[1,2,4]триазола и его производных.

3-Амино-[1,2,4]триазол и его производные часто используются как основа для построения триазолопиримидинов в реакциях с соответствующими карбонильными соединениями. Так 3-амино-1,2,4-триазол **1.30**, полученный гидролизом цианистого кальция и конденсацией с гидразином, реагирует с ацетофеноном в присутствии ZnCl_2 образуя дигидротриазолопиримидины **1.31** или **1.32** в различных соотношениях (таблица 1.4) [52, 53]. Циклоконденсация **1.30** с ацетофеноном в ДМФА приводит к триазолопиримидинам **1.31** и **1.33** через образование промежуточного соединения **1.34** (схема 1.14).

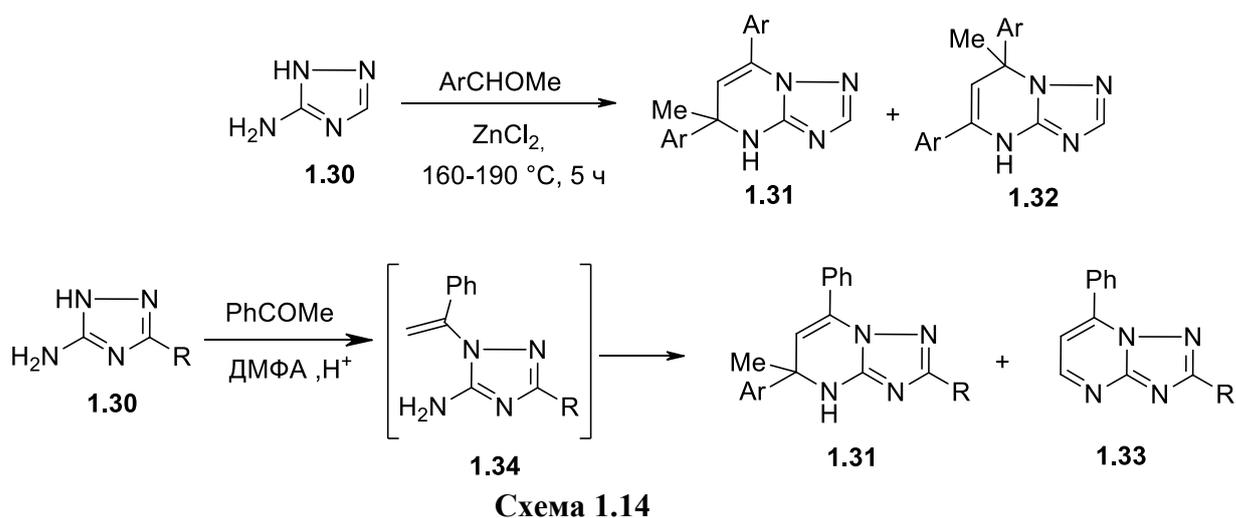


Таблица 1.4 – Соотношение и выходы продуктов **1.31** и **1.32**

Ar	Соотношение выходов продуктов, %		Общий выход продуктов 1.31+1.32, %
	1.31	1.32	
Ph	74	26	71
4-Me-C ₆ H ₄	63	37	72
4-MeO-C ₆ H ₄	50	50	77
4-Cl-C ₆ H ₄	65	35	92
4-Br-C ₆ H ₄	69	31	79
4-Ph-C ₆ H ₄	71	29	90

Значительное количество работ [54, 55, 56, 57, 58, 59] посвящено циклизации соединения **1.30** с 1,3-дикарбонилами **1.35** в уксусной кислоте, приводящее к образованию триазолопиримидинов **1.36** (схема 1.15) и использованием различных условий (таблица 1.5).

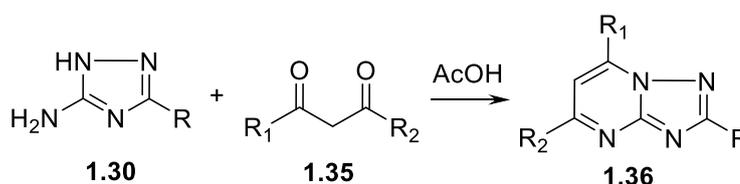
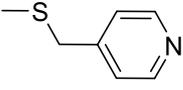
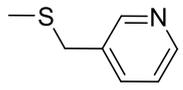
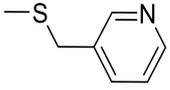
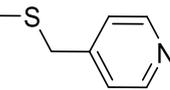


Схема 1.15

Таблица 1.5 – Заместители и выходы продуктов 1.36 и условия их образования

R	R ₁	R ₂	Условия реакции	Выход продукта 1.36, %		
1	2	3	4	5		
SMe	Me	Me	AcOH, MeOH/H ₂ O	76		
S ⁱ Pr				82		
S ⁱ Bu			AcOH, EtOH/H ₂ O	72		
SCH(CH ₃) ₂				60		
SCH ₂ C ₆ H ₅			AcOH, EtOH	89		
SCH ₂ -C ₆ H ₄ -Cl- <i>p</i>			AcOH, EtOH/H ₂ O	76		
SCH ₂ -C ₆ H ₄ -COOH- <i>p</i>			AcOH, EtOH	93		
SCH ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₃ - <i>o</i>			AcOH, DMF, MeOH	75		
SCH ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₃ - <i>m</i>				94		
SCH ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₃ - <i>p</i>			AcOH, EtOH	95		
				75		
				75		
SCH ₂ CH ₂ -C ₆ H ₅						62
SCH ₂ C ₆ H ₅			OH		AcOH	50
	Cl	70				
	SH	72				
	N(CH ₃) ₂	92				
	N(CH ₂) ₂ CH ₃ ·HCl	65				
	N(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	72				
	NHNH ₂ ·2HCl	85				
	NHN(CH ₃) ₂	71				
	<i>c</i> -NC ₅ H ₁₀	62				
	<i>c</i> -N(CH ₂ CH ₂) ₂ O	64				
N(C ₂ H ₅) ₂	83					

1	2	3	4	5
SCH ₂ C ₆ H ₄	Pr	Pr		77
SCH ₂ C ₆ H ₄ -CH ₃ - <i>p</i>				77
SO ₂ CH ₂ C ₆ H ₅				47
SO ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ -CH ₃ - <i>p</i>				80
				30
				27
NH ₂	Ph	Me		88
	<i>p</i> -Me-C ₆ H ₄			93
	<i>p</i> -Me-SC ₆ H ₄			98
	<i>p</i> -BrC ₆ H ₅			98
	<i>o</i> -ClC ₆ H ₄			90
	<i>m</i> -CF ₃ C ₆ H ₄			86
	<i>m,p</i> -(MeO) ₂ -C ₆ H ₃			80
	<i>m,p</i> -(Me) ₂ -C ₆ H ₃			83
	1-нафтил			62
1-пиридинил	65			

Так, 3-амино-[1,2,4]триазолы и их его производные вступают во взаимодействие с β -диметиламинопропиофеноном, ароматическими альдегидами и ацетофенонами, а также виниларилкетонами, образуя 5,7-замещенные 4,7(6,7)-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидины [60, 61, 62, 63]. Конкретный пример подобного превращения, представленный на схеме 1.16, иллюстрирует образование 7-оксозамещенного 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидина **1.37** путём циклизации 4-амино-1,2,4-триазола **1.2** и этилацетоацетата **1.5f** с выходом близким к количественному [64].

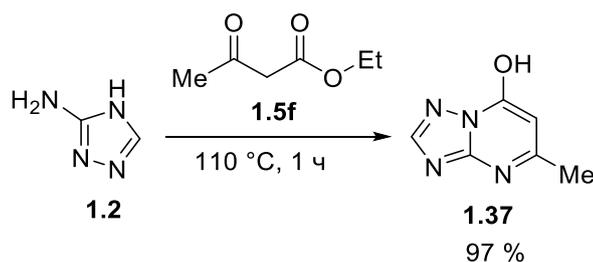


Схема 1.16

Также в качестве дикарбонильного соединения возможно использование моногидрата натриевой соли нитромалонового диальдегида **1.38**, приводящее к образованию 6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов **1.39** (схема 1.17) при взаимодействии с соответствующими триазольными субстратами **1.2, 1.4g** и **1.40**. Авторами описано дальнейшее обратимое присоединение молекулы воды при наличии акцепторного заместителя в азольной части молекулы или отсутствии такового с образованием 4,7-дигидропроизводных **1.41a,c** [29].

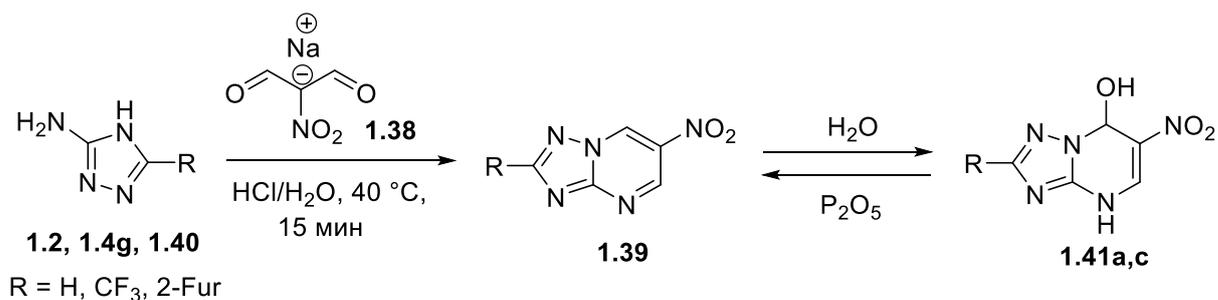


Схема 1.17

Наконец, 1,3-дикарбонильные соединения **1.35** могут быть использованы в реакции гетероциклизации по типу Биджинеллис альдегидами **1.42** и 3-алкилтио-5-амино-1,2,4-триазолами **1.43**. Таким образом, соответствующие соединения **1.44** были получены с отличными выходами (схема 1.18) [65].

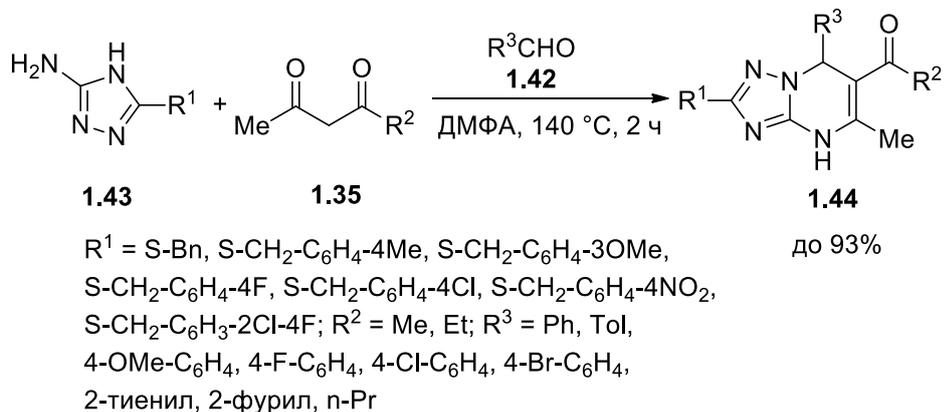


Схема 1.18

Данный подход, в отличие от первого, позволяет получать как незамещённые по азольному кольцу триазолопиримидины, так и замещённые при использовании соответствующих 3-амино-[1,2,4]триазолов.

Кроме описанных выше методов также имеются примеры циклизации ряда азолов **1.2, 1.4c,d,g, 1.40, 1.44** с другими соединениями, например (2*E*)-(3-морфолин-4-ил)акрилонитрилом

1.45 с образованием целевых соединений – азоло[1,5-*a*]пиримидин-7-аминов **1.46** (схема 1.19) [66]. Авторами описано использование смеси пиридина и уксусной кислоты в эквимолярном соотношении в качестве растворителя, что позволило довести выходы продуктов до 60-75%. В том же источнике описан другой синтетический подход к получению аналогичных соединений и основан на использовании в реакции циклизации 3,3-диэтоксипропионитрила **1.47**.

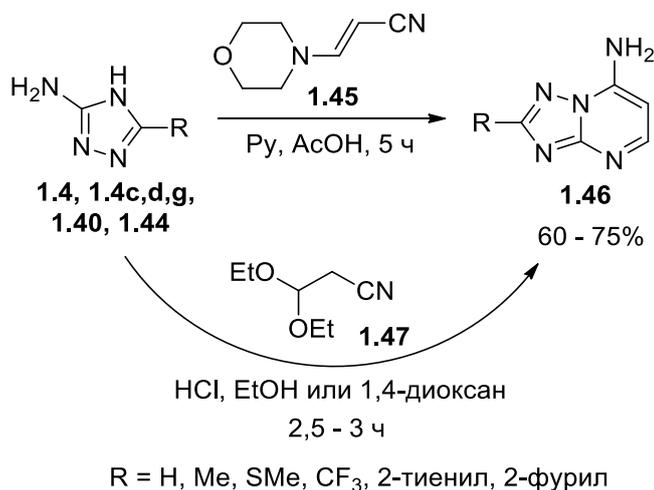


Схема 1.19

Ещё одним подходом к синтезу замещённых 1,2,4-триазолопиримидинов является реакция циклоконденсации гидразиниленда **1.48** с тем же рядом аминоазолов в ДМФА при температуре 120 °С [67]. Авторами отмечается простота протекания реакции при использовании ДМФА с последующим лёгким выделением продуктов **1.49** (схема 1.20). Авторами также предлагается альтернативный путь проведения взаимодействия без использования растворителя.

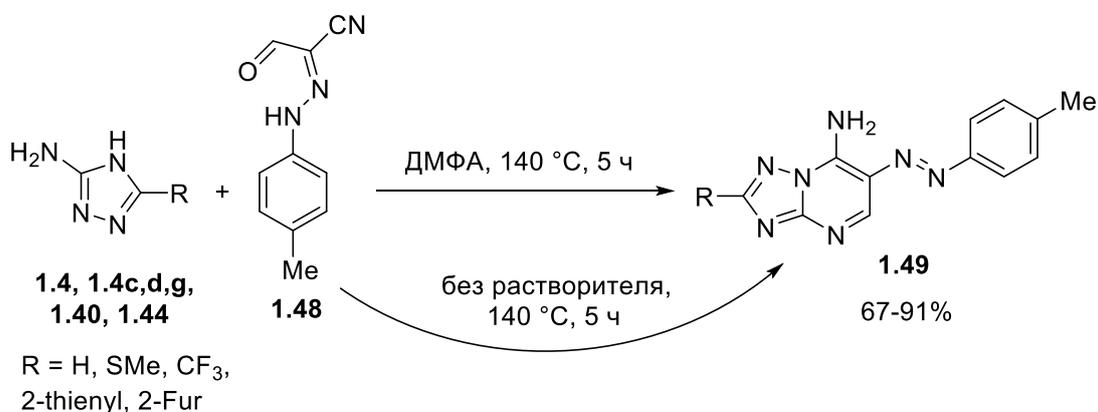


Схема 1.20

Из аминопиримидинов

Аминопири(ми)диновое ядро наравне с амитриазольным также является базовым для построения триазолопиримидиновых систем. На сегодняшний день в литературе представлен целый ряд соответствующих синтетических подходов.

Так, 1-(ациламино)пиримидиновые соли **1.50** циклизируются с аминами **1.51** в уксусной кислоте с образованием соответствующих триазолопиримидинов **1.52**. (схема 1.21) [68, 69].

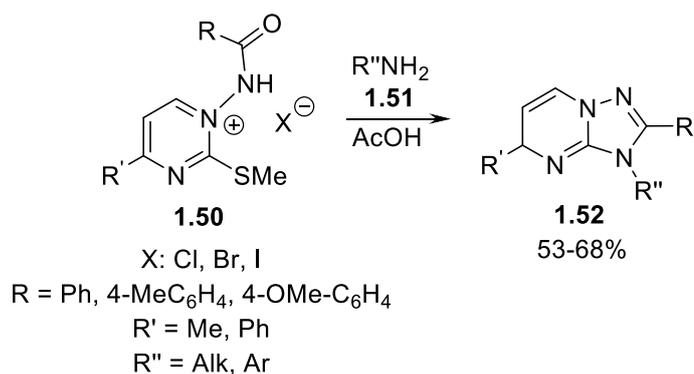


Схема 1.21

Триазолопиримидины могут быть получены исходя из 2-аминопиримидинов **1.53**. На первом этапе они трансформируются в *N,N*-диметиламинометиленамино-производные **1.56**, а последующие взаимодействия с гидроксиламином и гетероциклизация приводят к целевым продуктам **1.55**. (схема 1.22) [70, 71].

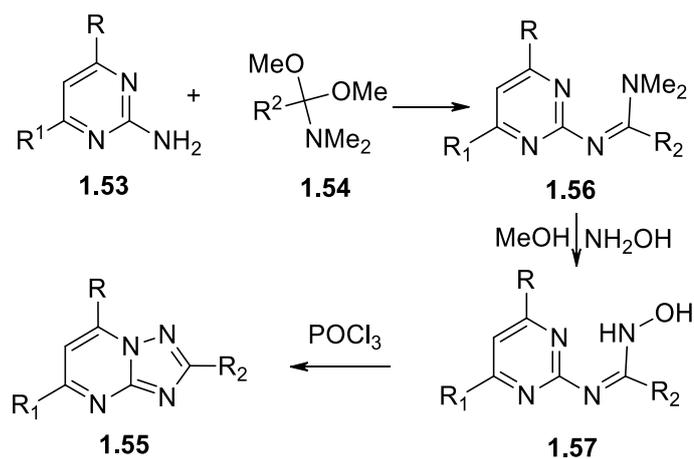


Схема 1.22

В циклизацию может быть вовлечен N-1 или N-3 атом пиримидина, как сообщают авторы; оба эти изомера были выделены [72].

Исходя из 2-аминопиримидинов **1.58** могут быть получены разнообразные 2-арил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидины **1.59** через образование интермедиата **1.60**, который приводит к конечным соединениям после окислительной циклизации действием тетраацетата свинца по схеме 1.23 [73]. Кроме того, в литературе встречаются описания методик окисления *N*-ариламидинов в различных условиях с образованием требуемого триазолопиримидинового ядра [74, 75, 76].

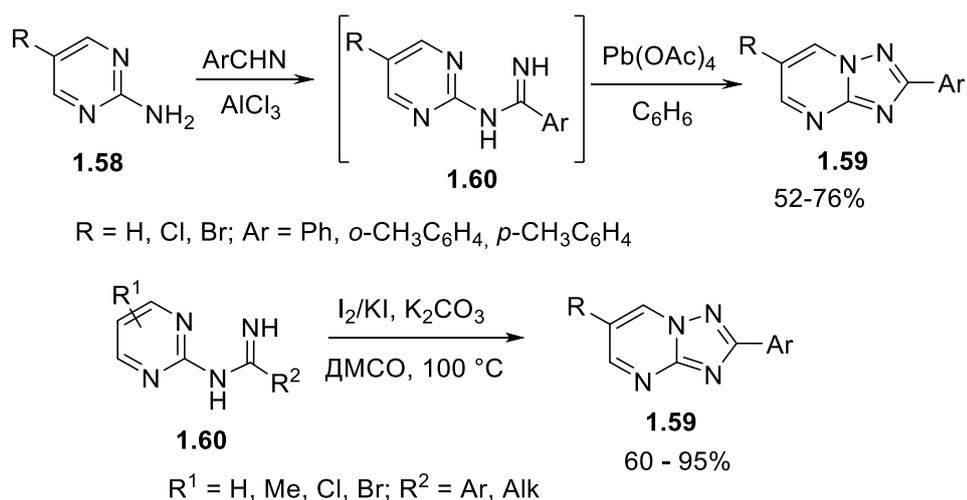


Схема 1.23

Другие примеры окислительной циклизации описаны в работах Ashish Bhatt и коллег [77, 78]. Здесь в качестве субстрата был использован *N*-(пиримидин-2-ил)бензимидамин **1.61**, окисленный с помощью Хлорамина Т или трихлоризоциануровой кислоты, в результате чего в обоих случаях был получен 2-фениламетил-1,2,4-триазолопиримидин **1.62** с выходом 85 и 87%, соответственно (схема 1.24).

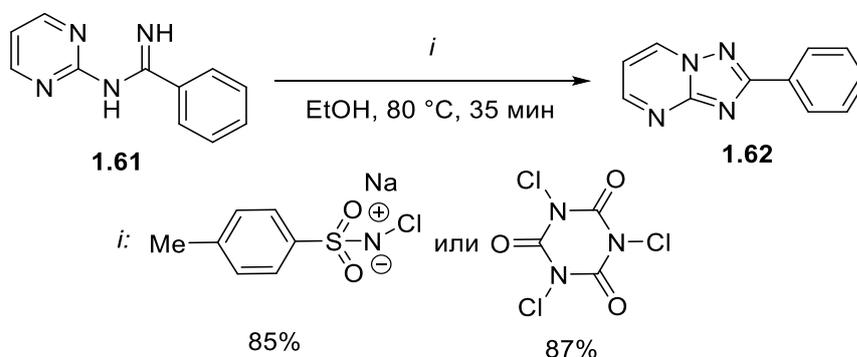


Схема 1.24

Также в литературе приведена двухэтапная циклизация-перегруппировка замещённого гидразинилпиримидина **1.63** с получением соответствующего триазолопиримидина **1.64** (схема 1.25) [79].

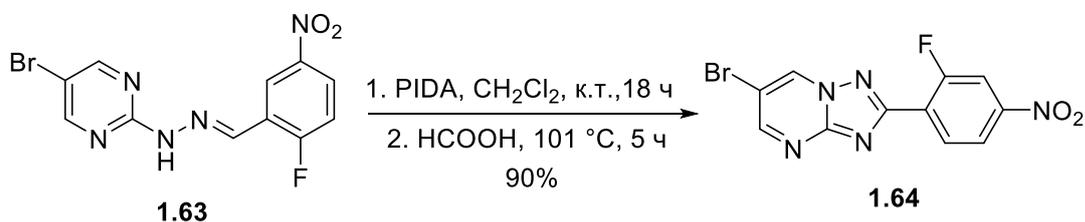


Схема 1.25

Другим удобным методом получения функционализированных 1,2,4-триазолопиримидинов **1.65** является циклизация Тизлера [80, 81]. Для этого сперва необходимо получить промежуточную *N*-этоксикарбонилтиомочевину **1.66** с помощью *N*-карбоэтоксиизоцианата **1.67** и соответствующего 2-аминопиримидина **1.68**. Далее взаимодействие полупродукта **1.66** с гидроксиламином приводит к структурным изменениям в интермедиатах (промежуточные структуры **1.69** и **1.70**), а последующее нагревание – к конечным 1,2,4-триазолопиримидинам **1.65** с выходами 69 и 91% (схема 1.26).

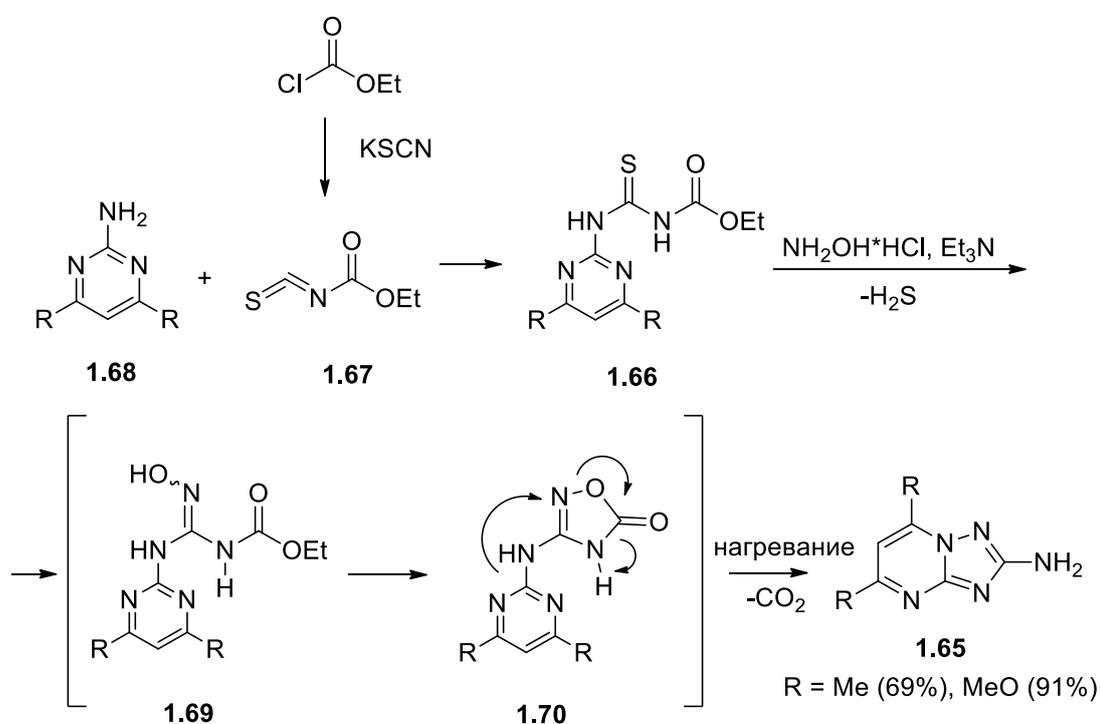


Схема 1.26

5-Бром-2-хлорпиримидин **1.71** может выступать в качестве исходного соединения для получения 1,2,4-триазолопиримидина **1.72** (схема 1.27) [82]. Данный метод подразумевает нуклеофильное замещение атома хлора на остаток гидразина при кипячении в этаноле, последующее взаимодействие соединения **1.73** с формальдегидом (образование интермедиата **1.74**) и финальную гетероциклизацию, проводимую в присутствии иодбензолдиацетата при комнатной температуре.

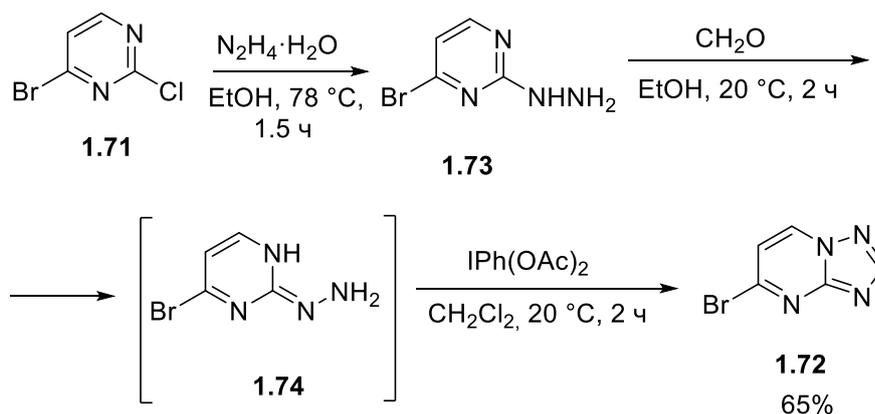


Схема 1.27

Отдельного внимания заслуживает методика циклоконденсации пиримидинов и аминотриазолов с применением диметилацетата *N,N*-диметилформамида в качестве аналога альдегидного компонента. Авторами отмечено, что одностадийное проведение реакции эфиров 3-(4-метил-2-*R*-пиримидин-5-ил)-3-оксопропионовой кислоты **1.75** с 5-амино-1,2,4-триазолами **1.2**, **1.4d**, **1.76** приводит к получению трудноразделимой смеси продуктов. Однако при последовательном проведении реакций зафиксировано образование метил-7-(2-*R*₁-4-метилпиримидин-5-ил)-2-*R*₂-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-6-карбоксилатов **1.77** (схема 1.28) через переходные структуры **1.78** и **1.79** [83].

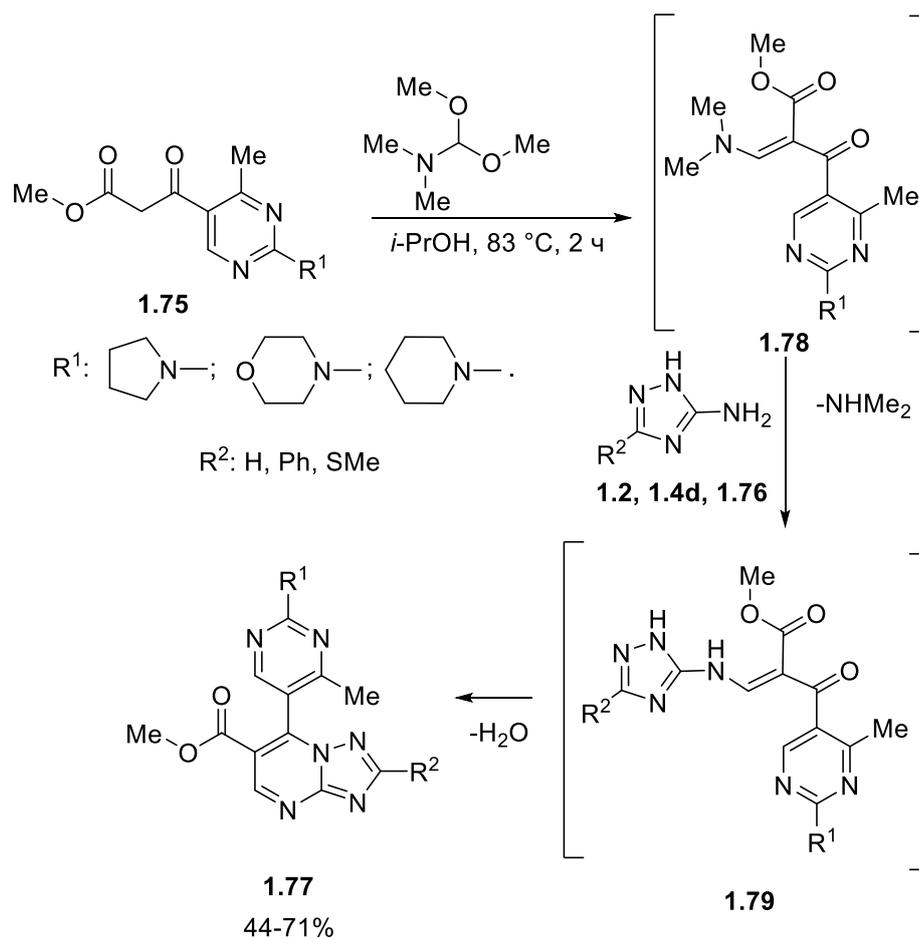


Схема 1.28

Таким образом, среди всех рассмотренных методов получения 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов наиболее интересной с точки зрения технологических разработок является циклоконденсация 3-амино-1,2,4-триазолов с ацетоуксусным эфиром. Данный вывод обусловлен такими факторами, как доступность и стоимость исходных соединений, достаточно высокие выходы продуктов на химических стадиях, а также селективность и масштабируемость применяемых при этом методик. Таким образом, этот подход был использован в рамках данной работы для получения субстанций для последующего производства препаратов ряда «Дезаза-Триазавирин».

Глава 2. Разработка технологии получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин»

На основании анализа литературных данных и исследований, проведенных ранее на кафедре органической и биомолекулярной химии ХТИ УрФУ, был сделан выбор наиболее приемлемого метода получения целевого продукта в промышленных условиях, который состоит из следующих стадий (схема 2.1):

- циклоконденсация 5-амино-3*H*-1,2,4-триазола (аминотриазола) **2** с ацетоуксусным эфиром при кипячении в уксусной кислоте с образованием 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она (триазолопиримидинона) **3**;

- нитрование триазолопиримидинона **3** нитрующей смесью с образованием 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она (нитротриазолопиримидинона) **4**;

- получение субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин» (солей 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидиниды **1a-d**) при обработке соединения **4** донорами соответствующих катионов, а именно гидроксидом натрия, пиперидином, ремантадином и *L*-аргинином.

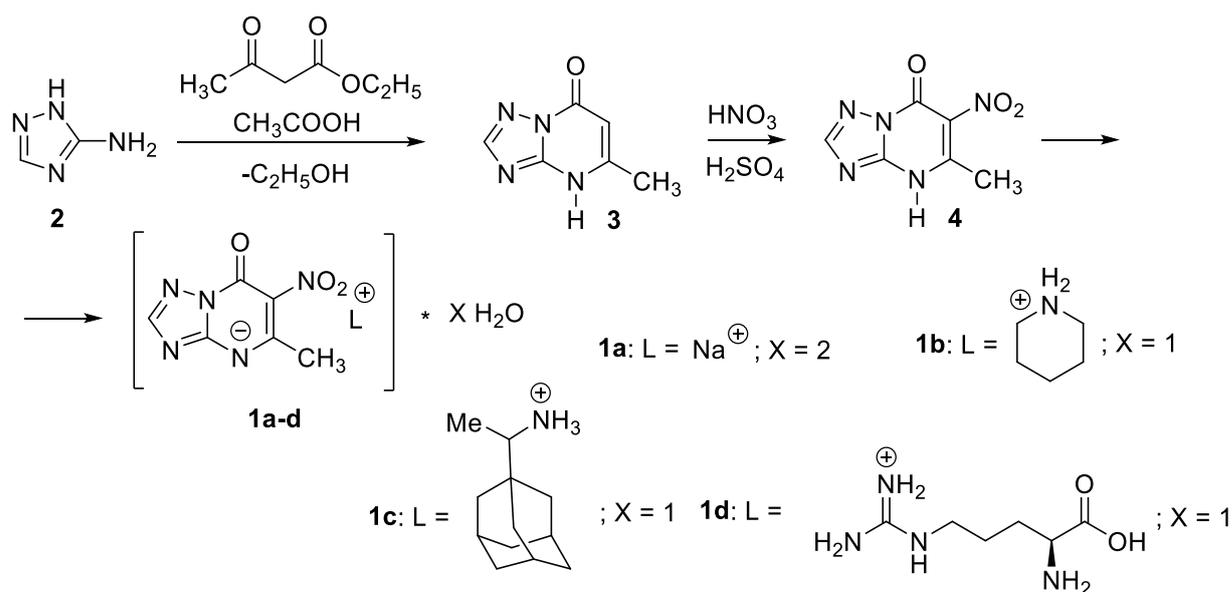


Схема 2.1

2.1 Разработка опытно-промышленного метода получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она

Синтез целевого полупродукта **3** представляет собой циклоконденсацию коммерчески доступного 5-амино-3*H*-1,2,4-триазола **2** с ацетоуксусным эфиром при кипячении в ледяной уксусной кислоте.

2.1.1 Оптимизация условий опытно-промышленного способа получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она

Данный процесс был масштабирован для получения 2.8 кг сухого очищенного 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она **3** за одну загрузку. Также в ходе работы предложен ряд изменений, улучшающих процедуру с точки зрения промышленного использования. В частности, были рассмотрены следующие факторы оптимизации: объем растворителя, температурный режим процесса, время протекания реакции, влияние отгонки летучих соединений, температура фильтрования продукта.

Так, в первых экспериментах одной из основных проблем данной стадии было загустение реакционной массы за счет кристаллизации продукта реакции. На основании этого, в первом эксперименте в 10 литровом реакторе из борсиликатного стекла, при загрузке 3-амино-1,2,4-триазола в количестве 7 моль и 10% избытке этилацетоацетата, синтез был проведен в 2000 мл уксусной кислоты, что на 40% превышает оптимальные показатели, выведенные в исходных условиях. Стоит отметить, что реакция проводилась при температуре в рубашке реактора 120-130 °С, при этом температура реакционной массы составила 109 °С. Смесь выдерживали при данном режиме в течение двух часов, после чего охлаждали до 30 °С для последующего фильтрования. Осадок был высушен до постоянной массы в течение двух суток. Благодаря дополнительному количеству растворителя, образующийся осадок не помешал перемешиванию реакционной массы, однако избыток уксусной кислоты повлиял на выход, который составил 62%, что ниже исходных результатов, в среднем, на 20%.

Следующий эксперимент был проведен согласно исходной методике: так на 588 граммов 3-амино-1,2,4-триазола **2** и 980 миллилитров ацетоуксусного эфира было взято 1400 миллилитров ледяной уксусной кислоты. В качестве перемешивающего устройства была выбрана якорная мешалка. При таком соотношении реагентов продукт начал кристаллизоваться до начала кипения реакционной массы, при этом наблюдался эффективный режим перемешивания благодаря якорной мешалке. Кроме того, такое соотношение привело к увеличению выхода до 67%, что, однако, было по-прежнему меньше первичных результатов.

Масштабирование предыдущей загрузки в три раза дало похожий результат – выход составил 70%. Таким образом, было предположено, что образующийся в ходе процесса получения полупродукта **3** этиловый спирт увеличивает растворимость триазолопиримидинона **3** в жидкой фазе и создает трудности в выделении полупродукта **3**. Данное предположение было доказано анализом полученного фильтрата на остаточное содержание триазолопиримидинона **3**, которое составило 25 % по массе, анализ проводили согласно методике описанной ниже. Наличие этилового спирта в фильтрате было подтверждено методом ГЖХ.

Таким образом, для достижения выходов исходного метода (80-85%) предыдущий эксперимент, при том же количестве и соотношении реагентов, был проведен с отгонкой летучих фракций во время протекания реакции. Так, при температуре в рубашке реактора 120-125 °С соответствующий показатель в реакционной массе составил 105-109 °С, а точка кипения летучих веществ оказалась в интервале 95-100 °С, при этом общее количество отогнанной жидкости составило 760 мл после двух часов кипячения реакционной массы. Однако выход повысился незначительно и составил 73%.

Другой точкой для оптимизации метода и повышения выхода было увеличение времени выдержки реакционной массы при кипении: так, увеличение этого показателя до трех часов привело к отгонке летучих компонентов в количестве 910 миллилитров и значительному повышению выхода до 84 %. Такой показатель соответствует выходам исходного способа и является удовлетворительным.

Максимальный выход был достигнут при ступенчатом проведении процесса, а именно: при выдерживании реакционной массы при температуре кипения в течение 1 ч с возвращением конденсата в сферу реакции и последующей отгонке летучих компонентов в течение 2 ч. В данном варианте было получено 780 мл отгона, а выход на стадии был повышен до 88%.

Кроме того, был поставлен эксперимент, в котором при сохранении выдержки реакционной массы при кипении в течение 2 ч, была изменена температура фильтрования суспензии. Так, для более полного выпадения продукта из реакционной смеси, последняя была охлаждена до 5 °С перед фильтрованием осадка. В результате такой модификации методики удалось получить продукт с выходом 81%, что так же является удовлетворительным показателем.

Таким образом, в результате масштабирования исходной методики первой стадии получения субстанции «Дезаза-Триазавирин» удалось найти оптимальные условия для безопасного проведения процесса с получением около 2.8 килограммов 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **3** за загрузку при выходе в 88%. Наиболее подходящим методом проведения процесса оказался общий подход, включающий: перемешивание реакционной массы якорной мешалкой при 150-200 об/мин, выдерживание при температуре кипения (107 ± 2 °С) в течение часа с последующей отгонкой летучих компонентов на протяжении 2 часов, охлаждение образовавшейся суспензии до 30 °С и фильтрование продукта. Выход **3** при этом составляет 81-88%

Результаты экспериментов сведены в таблицу **2.1.1.**

Таблица 2.1.1 – Оптимизация синтеза 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **3**.

№	Аминотриазол 2 , г	Ацетоуксусный эфир, мл	Уксусная кислота, мл	Температура РМ, °С	Время процесса, мин	Объем летучих компонентов, мл	Температура фильтрования, °С	Масса влажного, г	Время сушки, сут.	Масса сухого, г	Выход, %
1	588	980	2000	109	120	-	30	800	2	650	62
2	588	980	1400	109	120	-	30	950	7	709	67
3	1764	2940	4200	109	120	-	25	2900	12	2200	70
4	1764	2940	4100	105	120	760	30	3200	7	2300	73
5	1764	2940	4200	107	180	910	30	3500	9	2660	84
6	1764	2940	4200	107	180	780	30	3500	9	2780	88
7	1764	2940	4200	107	120	620	5	3700	8	2550	81

*2.1.2 Разработка аналитической методики совместного определения 5-амино-3Н-1,2,4-триазола и 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она*

Технологический контроль при проведении масштабирования технологии получения препарата и наработке опытно-промышленных партий занимает важное место в производстве лекарственных препаратов [84]. В процессе масштабирования и наработки опытно-промышленных партий субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин» особое внимание уделялось методам контроля качества получаемых полупродуктов и продуктов синтеза.

На первой стадии процесса – циклоконденсации аминотриазола **2** в триазолопиримидинон **3** контролировали степень конверсии исходного субстрата, проводили количественную оценку содержания получаемого полупродукта **3** и содержания в нем примеси исходного вещества **2**.

В литературе описаны различные методы определения аминотриазола: газохроматографические [85, 86], методы капиллярного электрофореза [87, 88], методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [89, 90]. Определение аминотриазола сопряжено со многими трудностями, и большинство методик предполагает проведение дополнительной процедуры дериватизации. Аналитических методик совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** в литературе не найдено.

Поэтому, для контроля качества получаемых полупродуктов была разработана методика совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** посредством ВЭЖХ.

При разработке методики необходимо было подобрать оптимальные хроматографические условия для эффективного разделения веществ: тип колонки, состав подвижной фазы, условия элюирования.

Первоначально для проведения анализа и разделения исследуемых веществ использовали наиболее часто применяемую колонку с привитой обращенной фазой C18, но время удерживания и разрешение пиков оказались недостаточными для проведения точного

количественного определения. Поэтому было решено опробовать колонки с привитой аминофазой для определения полярных соединений – Zorbax NH₂ (амино-пропилсилиановая фаза, Agilent Technologies, США) и Supelcosil LC-NH₂ (амино-пропиловая фаза, Supelco, США). Лучшие результаты были получены на колонке Zorbax NH₂, обеспечивающей наибольшую симметричность пиков при меньшем времени анализа, по сравнению с колонкой Supelcosil LC-NH₂.

При выборе состава подвижной фазы были исследованы различные буферные растворы: 0,01 М ацетат аммония в 0,04% гидроксиде аммония (pH=9); 0,01 М ацетат аммония в 0,02% уксусной кислоте (pH=5); 0,01 М ацетата аммония в 0,1% уксусной кислоте; 0,1% муравьиная кислота в воде, в различных соотношениях с ацетонитрилом и метанолом. Лучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве элюента 0,01 М ацетата аммония в 0,1% уксусной кислоте.

Валидация разработанной аналитической методики проведена по следующим параметрам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность [91].

Линейность методики характеризуется наличием линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

Для оценки линейности использовали стандартные растворы аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** с номинальными концентрациями от 0,004 до 0,081 мг/мл (таблица 2.1.2, 2.1.3). Установлено, что графики зависимости имеют линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций и описываются уравнениями: $y=23977x+1,4666$ для аминотриазола (рисунок 2.1.1) и $y=30299x+5,0862$ для триазолопиримидинона (рисунок 2.1.2), коэффициент корреляции в обоих случаях близок к единице (0,9994 и 0,9999, соответственно).

Таблица 2.1.2 – Данные для определения линейности графика зависимости концентрации аминотриазола **2** от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед ²			Среднее значение	СКО, %
	S ₁	S ₂	S ₃		
0,00404	103	104	101	102,67	1,49
0,00808	205	209	201	205,00	1,95
0,02020	470	463	475	469,33	1,28
0,04040	980	944	983	969,00	2,24
0,08080	1947	1945	1935	1942,33	0,33

Таблица 2.1.3 – Данные для определения линейности графика зависимости концентрации триазолопиримидинона **3** от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед ²			Среднее значение	СКО, %
	S ₁	S ₂	S ₃		
0,00399	129	126	131	128,67	1,96
0,00798	247	248	245	246,67	0,62
0,01996	611	613	612	612,00	0,16
0,03992	1209	1205	1207	1207,00	0,17
0,07984	2422	2432	2428	2427,33	0,21

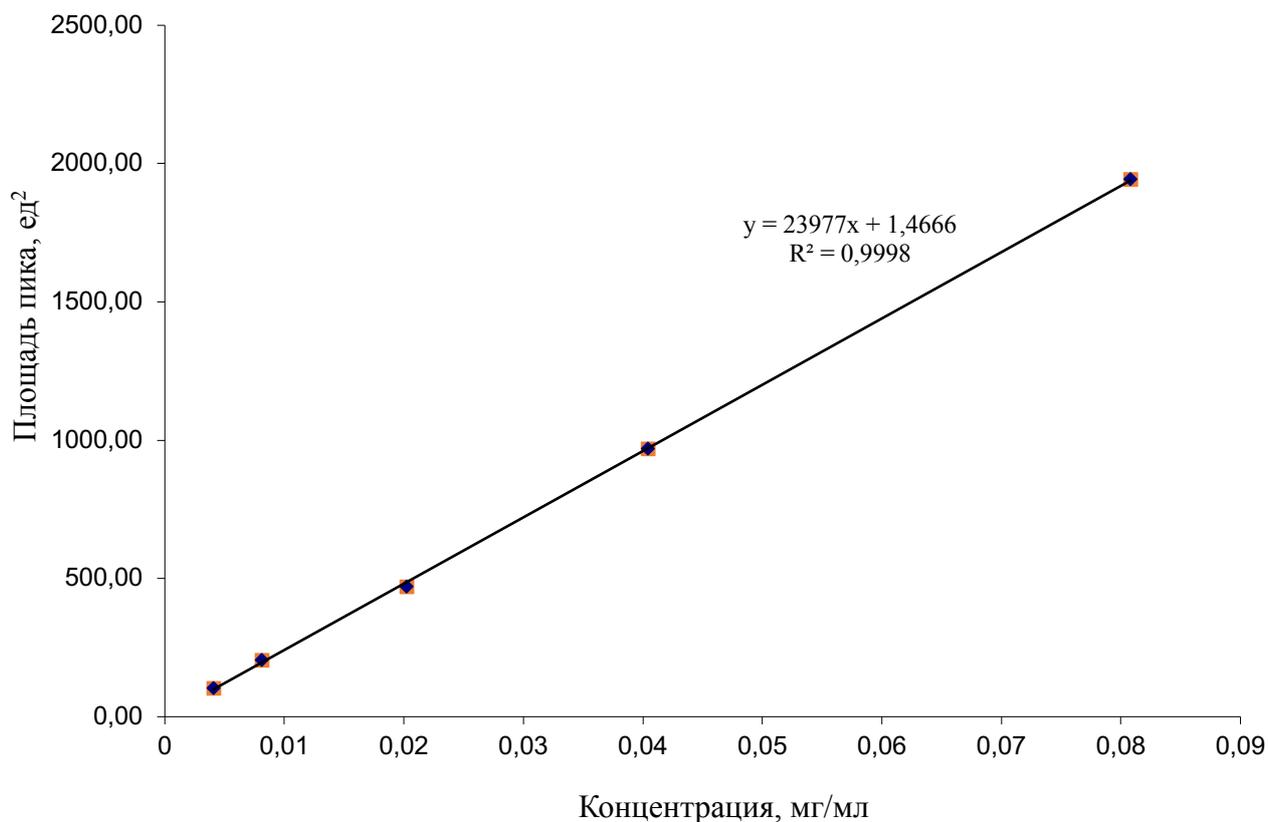


Рисунок 2.1.1 – График зависимости концентрации от площади пика для аминотриазола **2**

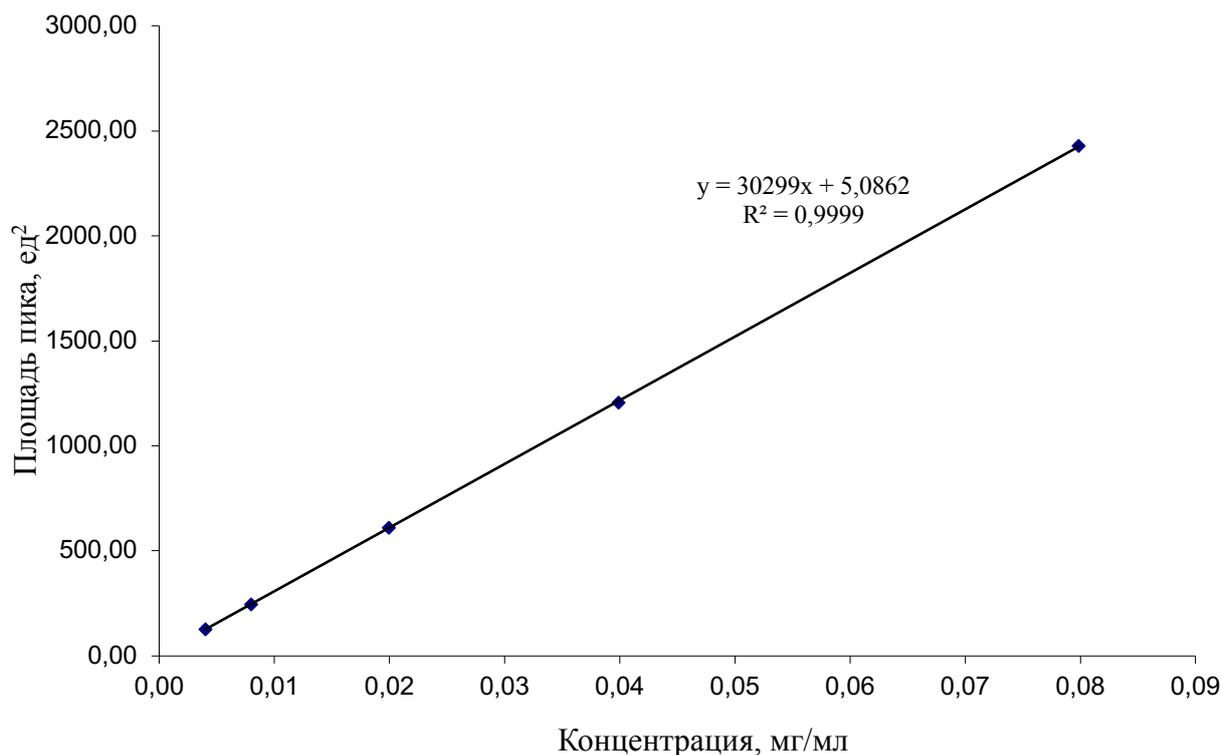


Рисунок 2.1.2 – График зависимости концентрации от площади пика для триазолопиримидинона **3**

Правильность характеризует близость результатов, получаемых с помощью данной методики, к истинному значению. Правильность методики устанавливали по результатам анализа методом добавок (таблица 2.1.4).

Предел количественного определения устанавливали через отношение аналитического сигнала к уровню шума. Минимальная концентрация аминотриазола **2**, при которой величина данного отношения – около 10:1, составляет 0,004 мг/мл, триазолопиримидинона **3** – 0,003 мг/мл.

Специфичность представляет собой способность достоверно определять анализируемое вещество в присутствии других компонентов и возможных примесей. Для подтверждения специфичности методики получены хроматограммы следующих растворов: триазолопиримидинона **3** (определяемого основного вещества), аминотриазола **2** (примеси) и матрицы. Время удерживания пика триазолопиримидинона **3** составило около 6,2 мин, аминотриазола **2** – около 2 мин. На хроматограмме матрицы отсутствуют пики, мешающие определению основного вещества и примеси в нем, что свидетельствует о возможности применения данной методики для определения исследуемых веществ (рисунок 2.1.3-2.1.5).

Сходимость характеризует степень согласованности результатов измерений (испытаний), полученных одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же

лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Коэффициент вариации параллельных определений для 6 измерений составил менее 2%.

Таблица 2.1.4 – Данные для оценки правильности методики

Введенное кол-во в образец, мг/мл	Результат, мг/мл	Процент восстановления, %	Среднее значение результатов, мг/мл	СКО, %	Коэффициент вариации
Аминотриазол 2					
0,00808	0,00810	100,25	0,00808	0,002	0,258
	0,00809	100,12			
	0,00806	99,75			
0,0202	0,0200	99,01	0,0203	0,055	2,718
	0,0199	98,51			
	0,0209	103,47			
0,0404	0,0409	101,24	0,0402	0,062	1,553
	0,0397	98,27			
	0,0400	99,01			
Триазолопиримидинон 3					
0,007984	0,007992	100,10	0,00798	0,001	0,138
	0,007970	99,82			
	0,007982	99,97			
0,01996	0,02006	100,50	0,0200	0,007	0,333
	0,01993	99,85			
	0,02002	100,30			
0,03992	0,04000	100,20	0,0400	0,014	0,338
	0,03988	99,90			
	0,04015	100,58			

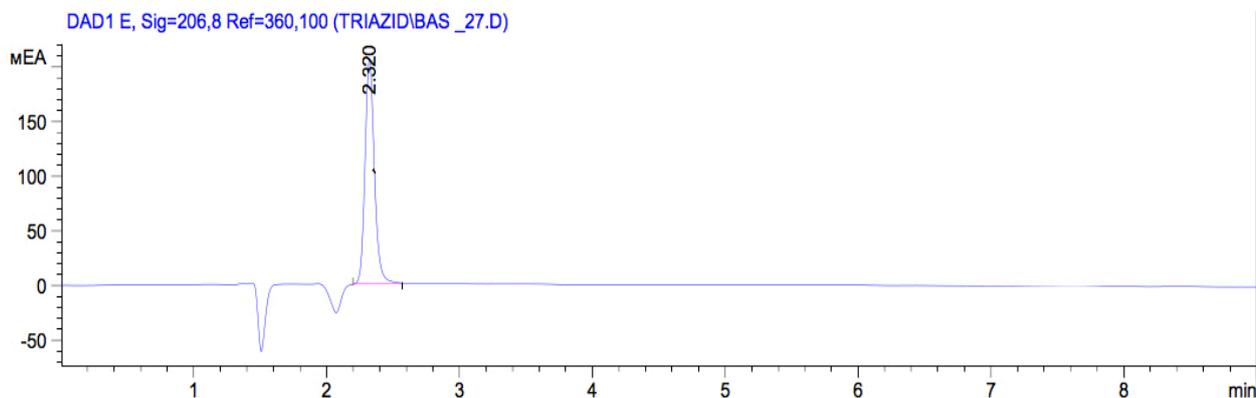


Рис. 2.1.3 – Хроматограмма аминотриазола 2, 206 нм

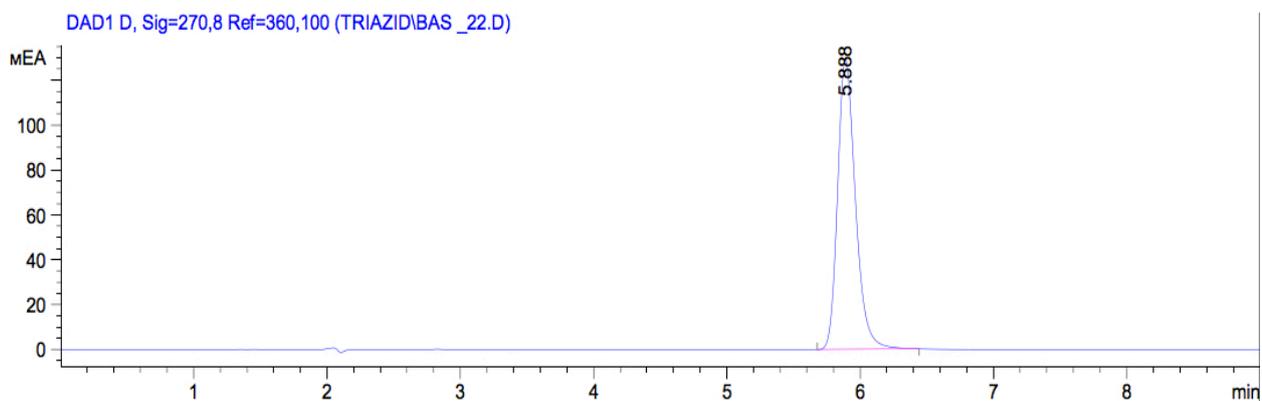


Рис. 2.1.4 – Хроматограмма триазолопиримидинона **3**, 270 нм

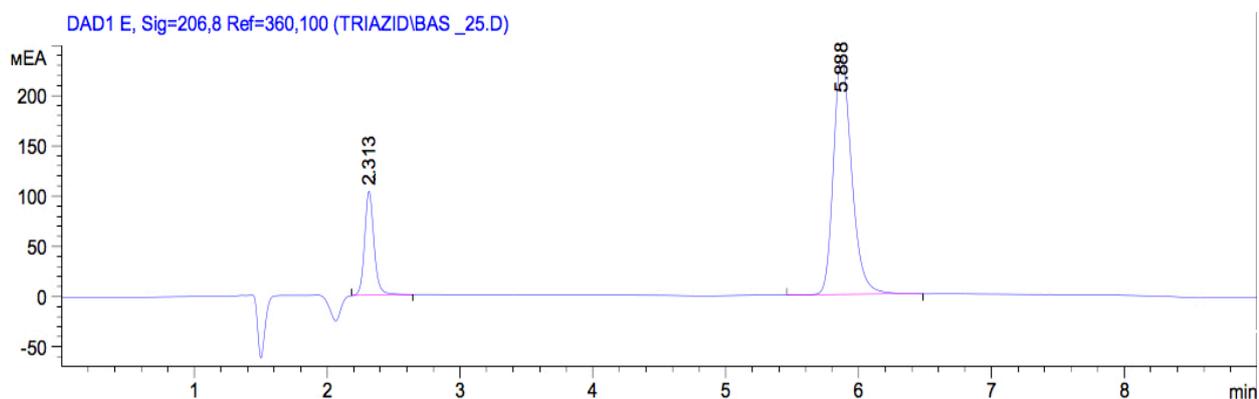


Рис. 2.1.5 – Хроматограмма совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3**, 206 нм

Таким образом, была разработана методика совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** посредством ВЭЖХ. Методика проста в применении, не требует больших временных затрат и дополнительных процедур дериватизации с большим расходом реагентов, обладает высокой чувствительностью и позволяет определять содержание примеси исходного вещества до 0,015% от основного вещества.

Проведенная валидация разработанной аналитической методики показывает возможность ее применения для контроля 1-ой стадии технологического процесса получения опытно-промышленных и промышленных партий АФС ряда «Дезаза-Триазавирин» [92].

Анализ произведенных опытных партий полупродукта **3**, осуществленный по данной методике, показал, что получаемый триазолопиримидинон **3** после фильтрации и сушки имеет чистоту 99,5% и пригоден для дальнейшего использования. Таким образом, исчезла необходимость в дополнительной очистке, путем перекристаллизации, что позволяет сократить число стадий производства.

2.1.3 Изучение влияния микроволнового излучения на синтез 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она

Для оптимизации метода получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*] пиримидин-7-она **3** было изучено влияния МКВ излучения на синтез этого полупродукта.

Исходя из общего механизма реакции получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*] пиримидин-7-она **3**, после образования открыто-цепного продукта конденсации между 2-аминотриазолом и ацетоуксусным эфиром, происходит его циклоконденсация в кислых условиях путем атаки частично положительно-заряженного атома углерода карбонильного фрагмента и после элиминирования молекулы этанола происходит образование целевого продукта **3**.

Как было описано выше, реакция реализуется в условиях длительного нагревания (180 мин) в ледяной уксусной кислоте. Между тем, использование нагрева в условиях микроволнового излучения становится все более популярным для органического синтеза [93, 94, 95, 96, 97, 98]. Основным преимуществом метода является значительное ускорение протекания реакций, хорошая проникающая способность, а также нагрев реакционной массы во всем объеме облучаемого материала вследствие т.н. молекулярного трения молекул реагентов и/или растворителей.

Проведение данной реакции в условиях МКВ излучения было опробовано с варьированием таких показателей как температура, время проведения процесса и используемый растворитель (таблица 2.1.5). Для этого смесь аминотриазола (42 мг, 0.5 ммоль), ацетоуксусного эфира (73 мг, 0.56 ммоль) и выбранного растворителя (500 мкл) перемешивали при необходимых условиях в течение заданного времени согласно параметрам эксперимента (таблица 2.1.5). Затем смесь охлаждали до комнатной температуры, образующийся осадок отфильтровывали, промывали этанолом и сушили.

Эксперименты показали, что снижение количества уксусной кислоты приводит к значительному снижению выхода продукта **3** независимо от времени и температуры реакции. То есть, проведение реакции при частичной замене уксусной кислоты на воду даже в условиях микроволнового возбуждения не позволяет получать соединение **3** с необходимой степенью конверсии. При этом установлено, что проведение реакции в ледяной уксусной кислоте за счет использования МКВ излучения позволяет сократить необходимое время реакции со 180 мин до 10-20 мин при сохранении высокой степени конверсии.

Для всех вариантов проведения процесса степень конверсии определялась с помощью метода ВЭЖХ по описанной выше методике, затем для наиболее успешных экспериментов продукт **3** был выделен из реакционной массы путем образования его осадка, в результате чего

был определен выход. Кроме того, подлинность и чистота продукта **3** были доказаны на основании данных спектроскопии ЯМР ^1H , масс-спектрометрии и элементного анализа.

Таблица 2.1.5 – Зависимость конверсии и экспериментальных выходов (указаны в скобках) 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7(4*H*)-она **3** от условий реакции

Параметры эксперимента	T=130 °C, t=10 мин	T=130 °C, t=20 мин	T=220 °C, t=10 мин	T=220 °C, t=20 мин	T=130 °C, t=180 мин
Конверсия, %					
Без МКВ излучения, 500 мкл CH_3COOH	–	6,9*	–	–	94,2 (82)****
С применением МКВ излучения					
500 мкл CH_3COOH	92,5 (78)**	94,9 (83)**	80,7	83,1	–
5 мкл CH_3COOH + 495 мкл H_2O	13,1	19,1	2,8	2,6	–
500 мкл H_2O	14,8	15,7	7,5	7,0	–

*реакция проводилась при кипячении в ледяной уксусной кислоте; **экспериментальные выходы указаны в скобках.

2.1.4 Изучение влияния сверхкритического CO_2 на синтез 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она

Для оптимизации метода получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*] пиримидин-7-она **3** была изучена возможность проведения реакции циклоконденсации в сверхкритическом CO_2 , который может стать заменой органическим растворителям, в результате чего может быть повышена экологичность процесса [99, 100].

Экспериментально проведена оценка влияния температуры, используемых в технологическом процессе растворителей и оценка возможности использования SiO_2 , TiO_2 и ZnCl_2 в качестве катализаторов. Для реализации экспериментов смесь аминотриазола **2** (42 мг, 0.5 ммоль) и ацетоуксусного эфира (73 мг, 0.56 ммоль) выдерживали в сверхкритическом CO_2 в различных условиях. В случае выделения продукта **3** смесь охлаждали до комнатной температуры, образующийся осадок отфильтровывали, промывали этанолом и сушили. Концентрацию аминотриазола **2**, триазолопиримидинона **3** и содержание посторонних примесей оценивали ранее разработанным методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.

На первом этапе было изучено влияние среды сверхкритического CO_2 на образование продукта **3**. Согласно данным таблицы 2.1.6, в среде сверхкритического CO_2 происходит образование продукта **3** с конверсией менее 8%, увеличение температуры и времени реакции способствует лишь незначительному ее повышению. Полученный результат может быть обусловлен низкой растворимостью исходных компонентов, в частности аминотриазола **2** в сверхкритическом CO_2 . Согласно литературным данным [83], сверхкритический CO_2 является

неполярным растворителем, о чем свидетельствует его низкая диэлектрическая проницаемость, отсутствие выраженного дипольного момента, низкая вязкость и поверхностное натяжение. Соответственно, в чистом виде сверхкритический CO₂ обладает низкой растворяющей способностью для большинства полярных и ионных молекул, и данное свойство упомянуто во многих публикациях как негативный фактор, тормозящий применимость этого сверхкритического флюида на практике.

Таблица 2.1.6 – Зависимость степени конверсии реакции (%) от температуры и времени проведения процесса в сверхкритическом CO₂

Температура, °С	Время реакции		
	60 мин	120 мин	180 мин
75	0%	1%	1%
110	1%	2%	2%
150	2%	3%	5%
190	-	-	8%

С другой стороны, известно, что присутствие CO₂-фильных компонентов, например, уксусной кислоты, кислот Льюиса или фторалканов в ряде случаев повышает растворимость органических молекул в сверхкритическом CO₂. В связи с вышесказанным, далее нами были изучены возможности использования добавок органических растворителей, кислот, а также неорганических катализаторов на выход целевого продукта при проведении рассматриваемой реакции.

Попытки замены уксусной кислоты на метанол, этанол и трифторуксусную кислоту привели к значительному снижению конверсии, независимо от времени проведения процесса и температуры реакции (таблица 2.1.7).

Таблица 2.1.7 – Зависимость степени конверсии реакции от температуры проведения процесса в сверхкритическом CO₂ в присутствии катализирующих добавок в течение 60 мин

Добавочный реагент	Температура	
	110 °С	150 °С
Метанол (избыток)	0,1%	1%
Этанол (избыток)	0,0%	1%
CF ₃ CO ₂ H (0.1 экв.)	9,0%	13%

При проведении реакции с использованием традиционного растворителя, т.е. уксусной кислоты, взятого в количестве 105 мкл, обеспечивает образование продукта реакции с конверсией до 66% при 110 °С в течение 180 мин, а при повышении температуры до 150 °С – до 92% (87% при выделении продукта) (таблица 2.1.8).

Таблица 2.1.8 – Зависимость степени конверсии реакции и экспериментальных выходов от температуры и времени проведения процесса в сверхкритическом CO₂ при проведении реакции в уксусной кислоте

Температура, °С	Конверсия привремени реакции, %		
	60 мин	120 мин	180 мин
75	25	30	30
110	45	55	66
150	62	77	92 (89)*

*экспериментальные выходы указаны в скобках.

Наиболее перспективный результат был получен при проведении реакции в сверхкритическом CO₂ в отсутствие растворителя в присутствии каталитических количеств кислоты Льюиса. Так, при добавлении безводного ZnCl₂ (0.1 экв.) в течение 60 мин наблюдалась конверсия 44%, 60% и 75% при температуре 110 °С, 150 °С и 190 °С, соответственно, а увеличение времени до 180 мин позволило увеличить степень конверсии до 90%. Использование же других реагентов (SiO₂ или TiO₂) при нагревании до 150 °С в течение 60 мин приводило к образованию целевого продукта с максимальной конверсией в 33% (таблица 2.1.9).

Таблица 2.1.9 – Зависимость степени конверсии реакции и экспериментальных выходов от температуры проведения процесса в сверхкритическом CO₂ в отсутствие растворителя в присутствии катализирующих добавок в течение 60 мин

Катализатор	Конверсия при температуре, %		
	110 °С	150 °С	190 °С
ZnCl ₂ (0.1 eq.)	44	60	75% (69%)* (90% (88%)* в случае 180 мин)
TiO ₂ (0.1 eq.)	23	33	-
SiO ₂ (0.1 eq.)	24	31	-

*экспериментальные выходы указаны в скобках.

Таким образом, проведенные исследования по влиянию МКВ излучения и сверхкритических условий на синтез триазолопиримидинона **3** являются крайне перспективными, так как позволяют сократить время реакции и отказаться от использования растворителей. В тоже время необходимо отметить, что отсутствие требуемого для этих исследований оборудования в полупромышленном или промышленном исполнении не позволило осуществить масштабирование синтеза по этой привлекательной методологии.

2.2 Разработка опытно-промышленного метода получения 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она

2.2.1 Оптимизация условий опытно-промышленного способа получения 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а] пиримидин-7-она

В рамках разработки технологии получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирина» проведены работы по оптимизации второй стадии – нитрования триазолопиримидинона **3** нитрующей смесью с образованием 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она **4**.

Важным отличием от исходной методики в синтезе нитротриазолопиримидина **4** стало изменение последовательности смешения компонентов при нитровании вследствие пирофорности субстанции **3**. Вместо постепенного добавления субстрата **3** в нитрующую смесь, обладающую повышенной окисляющей способностью, его раствор в серной кислоте дозируют в смесь серной и азотной кислот, что также позволяет дополнительно контролировать температуру процесса.

Для реализации этой методики была проведена оценка растворимости триазолопиримидинона **3** в серной кислоте, которая составила 500 г/л. При внедрении данной модификации удалось снизить количество используемой на данной стадии серной кислоты на 10 %, что не привело к снижению выхода нитропроизводного **4**, но, при этом, оправдано экономически.

Вторым важным усовершенствованием данной стадии стало изменение способа выделения 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она **4**, так, согласно исходной методике, после завершения стадии нитрования, выделение нитротриазолопиримидинона **4** заключается в постепенном дозировании реакционной массы к охлаждённому до 0 °С водному аммиаку, при этом перегрев содержимого реактора выше 35 °С недопустим, а в результате процесса происходит нейтрализация кислот и выделение 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидината аммония в виде осадка. Недостатками данного способа выделения полупродукта **4** из реакционной массы являются как использование токсичного водного аммиака в больших количествах, так и выделение значительного количества тепла при нейтрализации кислот, требующего отвода от реакционной массы для поддержания заданной температуры, тем самым увеличиваются энергетические и временные затраты. Полученный таким образом 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинат аммония проходит две стадии очистки: на первой стадии разрушается комплекс с ионном аммония в результате действия соляной кислоты, а затем полученный полупродукт отфильтровывают, сушат и перекристаллизовывают из воды с горячим фильтрованием.

Поэтому было предложено проводить выделение 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а] пиримидин-7-она **4** путем дозирования реакционной массы к охлажденной воде. Данная

процедура оказалась возможной вследствие разной растворимости триазолопиримидинона **3** и нитротриазолопиримидинона **4** в воде. Так, нитротриазолопиримидинон **4** при нормальных условиях в воде практически нерастворим, однако в кислых водных растворах 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он **4** имеет свою определенную растворимость, поэтому для нитротриазолопиримидинона **4** было необходимо подобрать определенный объем воды разбавления. Необходимый объем подбирали опытным путем в лабораторных условиях. Установлено, что для выделения 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **4** в максимальном количестве необходимо на 1 л реакционной массы использовать 3,125 л воды. Это усовершенствование, позволяющее избежать большого количества аммиачных стоков, привело и к увеличению выхода полупродукта **4** на 8-10 %

Также на данной стадии варьировали максимальную температуру реакционной массы при нитровании, как видно из таблицы 2.2.1, максимальный выход полупродукта **4** был достигнут при температуре нитрования не более 40 °С. Таким образом, оптимальным является ведение процесса при строгом контроле дозирования раствора 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **3** в серной кислоте для обеспечения температуры нитрования в пределах 40±2 °С.

Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 2.2.1.

Таблица 2.2.1 – Оптимизация синтеза 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она

№ опыта	5-метил-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7-он, г	Серная кислота, мл	Азотная кислота, мл	Максимальная температура нитрования, °С	Влажный технический НТП, г	Сухой технический НТП, г	Выход, %
1	1600	4800	1600	55,0	1690,7	1498,0	72,0
2	1600	4800	1600	42,0	1849,7	1555,4	74,8
3	1600	4800	1600	47,0	1930,2	1639,8	78,8
4	1600	4800	1600	39,4	1814,7	1790,0	86,1
5	1600	4800	1600	39,5	1908,1	1667,2	80,2
6	1600	4800	1600	34,0	1706,0	1465,1	70,4
7	1400	4200	1400	36,1	1535,7	1360,7	74,8

Предложенная методика получения 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **4** позволила не только избежать большого количества аммонийных стоков, но и увеличить выход полупродукта **4** на 8-10%.

2.2.2 Разработка аналитической методики совместного определения 5-амино-3Н-1,2,4-триазола, 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она и 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она

Для контроля качества получаемых полупродуктов разработана методика совместного определения аминотриазола **2**, триазолопиримидинона **3** и нитротриазолопиримидинона **4** посредством ВЭЖХ.

Основной задачей, которую необходимо было решить в процессе разработки методики определения полупродукта **4**, а также соединений **2** и **3**, являлся подбор оптимальных хроматографических условий для эффективного разделения веществ, а именно условий элюирования, состава подвижной фазы и типа колонки.

Для проведения анализа и разделения исследуемых веществ первоначально опробована разработанная ранее методика совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3**, предполагающая использование в качестве элюента смеси ацетонитрила и буферного раствора 0,01 М ацетата аммония в 0,1% растворе уксусной кислоты в соотношении 30:70, однако было установлено, что время выхода нитротриазолопиримидинона **4** при описанных условиях составляет 44,7 мин, а форма пика не отвечает необходимым критериям симметрии. В ходе подбора соотношения буферный раствор – ацетонитрил, установлено, что элюирующая сила растворителя не оказывает прямого влияния на время выхода нитротриазолопиримидинона **4** (для колонок с привитой аминофазой вода обладает большей элюирующей способностью, чем ацетонитрил [101]). Так, при изменении pH раствора в сторону более щелочной среды, за счет увеличения содержания ацетонитрила в подвижной фазе, происходило уменьшение времени удерживания нитротриазолопиримидинона **4**, а время выхода триазолопиримидинона **3** практически не изменялось и оставалось на уровне неудерживаемых веществ. Таким образом, логичным решением данной проблемы стала замена буферного раствора на более щелочной. Также необходимо учитывать, что при проведении технологического контроля удобно использовать унифицированные реактивы, поэтому при получении удовлетворительных результатов с ацетатом аммония замена его на другую соль нецелесообразна.

При выборе состава подвижной фазы были исследованы различные буферные растворы: 0,01 М ацетат аммония в 0,04% гидроксиде аммония (pH=9); 0,01 М ацетат аммония в 0,01% уксусной кислоте; 0,01 М ацетата аммония, в различных соотношениях с ацетонитрилом и метанолом. Лучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве элюента ацетонитрила в объемном соотношении 30:70 с 0,05 М раствором ацетата аммония.

Отдельно необходимо отметить, что ввиду низкой растворимости аминотриазола **2** в предлагаемой подвижной фазе, добавление муравьиной кислоты в раствор образца для

увеличения его растворимости приводит к появлению на хроматограмме испытуемого раствора пика муравьиной кислоты, который накладывается на пик самого аминотриазола **2**. Поэтому концентрация аминотриазола **3** в растворе образца не может превышать 0,04 мг/мл, а использование данной методики для промежуточного контроля конверсии первой стадии процесса лимитировано данной концентрацией.

Анализ проводили на колонке с привитой аминофазой – Zorbax NH₂ длиной 150 мм, внутренним диаметром 4.6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм. Элюент – ацетонитрил в объемном соотношении 30:70 с 0.05 М раствором ацетата аммония. Детектирование осуществляли при трех длинах волн, соответствующих максимумам светопоглощения веществ: 206 нм – для аминотриазола **2**, 270 нм – для триазолопиримидинона **3** и 360 нм – для нитротриазолопиримидинона **4**.

Валидация разработанной аналитической методики проводили по следующим параметрам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрिलाбораторная прецизионность.

Аналитическая область методики для аминотриазола **2** – от 1 до 10 мг/г, для триазолопиримидинона **3** – 1–20 мг/г для нитротриазолопиримидинона **4** – 200– 1000 мг/г.

Для подтверждения специфичности методики получены хроматограммы следующих растворов: нитротриазолопиримидинона **4** (основного определяемого вещества), триазолопиримидинона (примеси), аминотриазола **2** (примеси) и матрицы. Время удерживания пика нитротриазолопиримидинона **4** составило около 4,4 мин, аминотриазола **2** – около 1,7 мин, триазолопиримидинона **3** – около 5,8 мин. На хроматограмме матрицы отсутствуют пики, препятствующие определению основного вещества и примесей в нем, что свидетельствует о возможности применения данной методики для определения исследуемых веществ (рисунок 2.2.1).

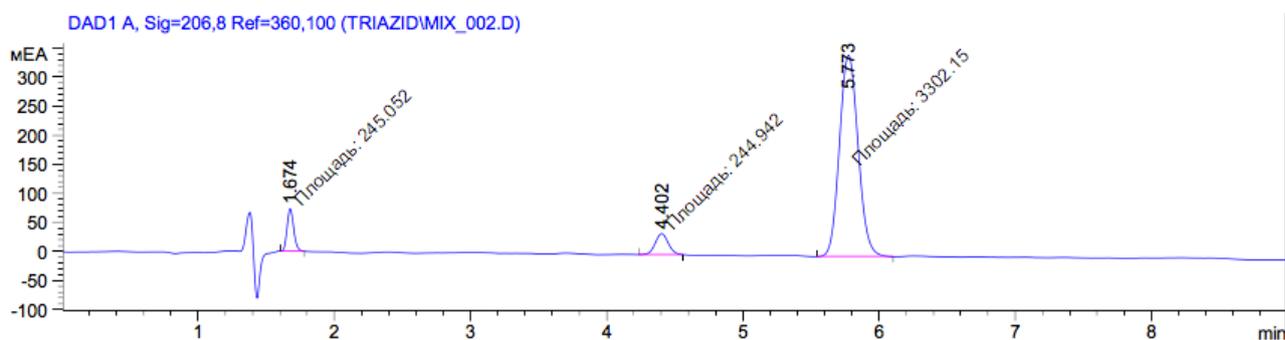


Рисунок 2.2.1 – Хроматограмма совместного определения аминотриазола **2** ($t=1.674$ мин) триазолопиримидинона **3** ($t=4.402$ мин) и нитротриазолопиримидинона **4** ($t=5.773$ мин), колонка Zorbax NH₂, УФ-детектирование (206 нм)

Для оценки линейности методики использовали стандартные растворы аминотриазола **2**, триазолопиримидинона **3** и нитротриазолопиримидинона **4** с номинальными концентрациями от 0,004 до 0,040 мг/мл, от 0,004 до 0,080 мг/мл и от 0,010 до 1,010 мг/мл соответственно (таблицы 2.2.2–2.2.4). Установлено, что графики зависимости имеют линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций, и описываются уравнениями: $y = 45731x - 11,951$ – для аминотриазола **2** (рисунок 2.2.2), $y = 54560x - 6,1752$ – для триазолопиримидинона **3** (рисунок 2.2.3) и $y = 6178,5x - 5,2835$ – для нитротриазолопиримидинона **4** (рисунок 2.2.4), коэффициент корреляции во всех случаях близок к единице (0,99992, 0,99997 и 0,99999 соответственно).

Правильность методики устанавливали по результатам анализа методом добавок (таблица 2.2.5).

Таблица 2.2.2 – Данные для определения линейности графика зависимости концентрации нитротриазолопиримидинона **4** от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед ²			Среднее значение	СКО, %
	S ₁	S ₂	S ₃		
0,01010	61	61	58	60,0	2,887
0,10100	620	614	613	615,7	0,615
0,50500	3113	3129	3096	3112,7	0,530
0,75750	4670	4688	4679	4679,0	0,192
1,01000	6244	6219	6237	6233,3	0,207

Таблица 2.2.3 – Данные для определения линейности графика зависимости концентрации триазолопиримидинона **3** от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед ²			Среднее значение	СКО, %
	S ₁	S ₂	S ₃		
0,00399	210	208	207	208,3	0,733
0,00798	418	429	425	424,0	1,313
0,01996	1075	1101	1085	1087,0	1,207
0,03992	2189	2155	2201	2181,7	1,094
0,07984	4356	4344	4334	4344,7	0,254

Таблица 2.2.4 – Данные для определения линейности графика зависимости концентрации аминотриазола **2** от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед ²			Среднее значение	СКО, %
	S ₁	S ₂	S ₃		
0,00404	175	171	173	172,0	1,163
0,00808	342	361	350	351,0	2,718
0,01010	454	458	451	454,3	0,773
0,02020	935	910	901	915,3	1,925
0,04040	1805	1857	1840	1834,0	1,446

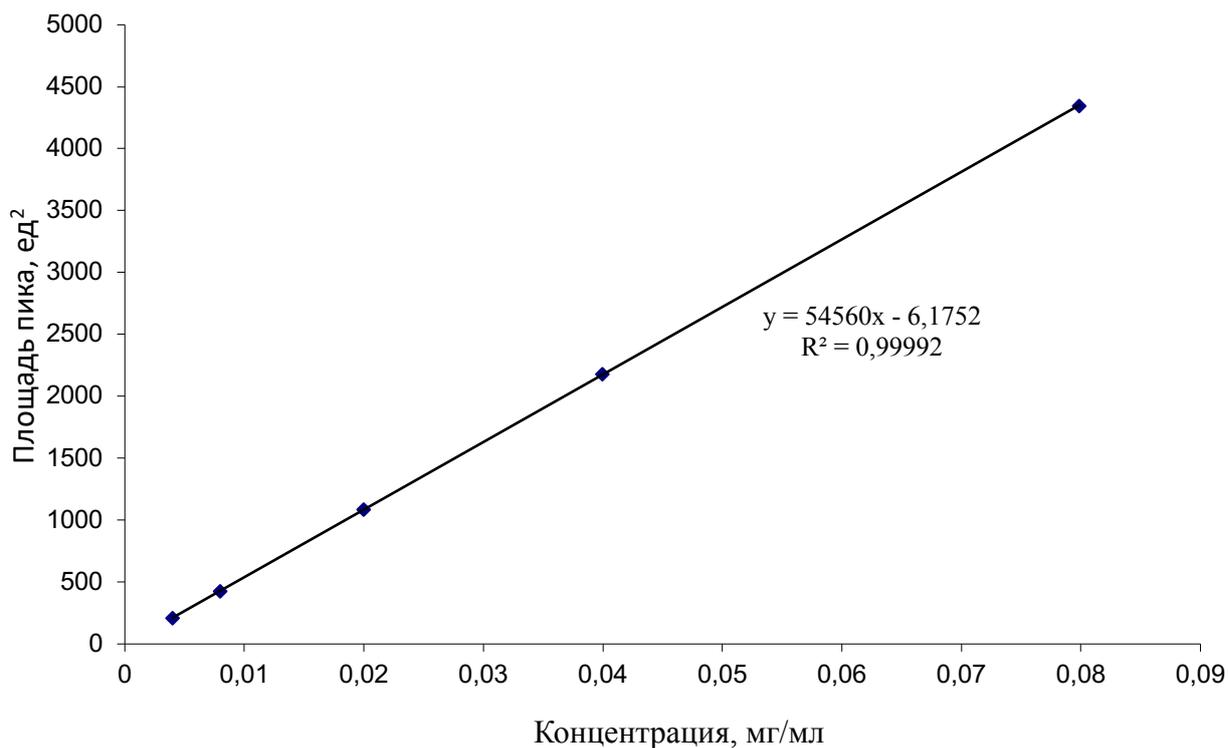


Рисунок 2.2.2 – График зависимости концентрации от площади пика для аминотриазола 2

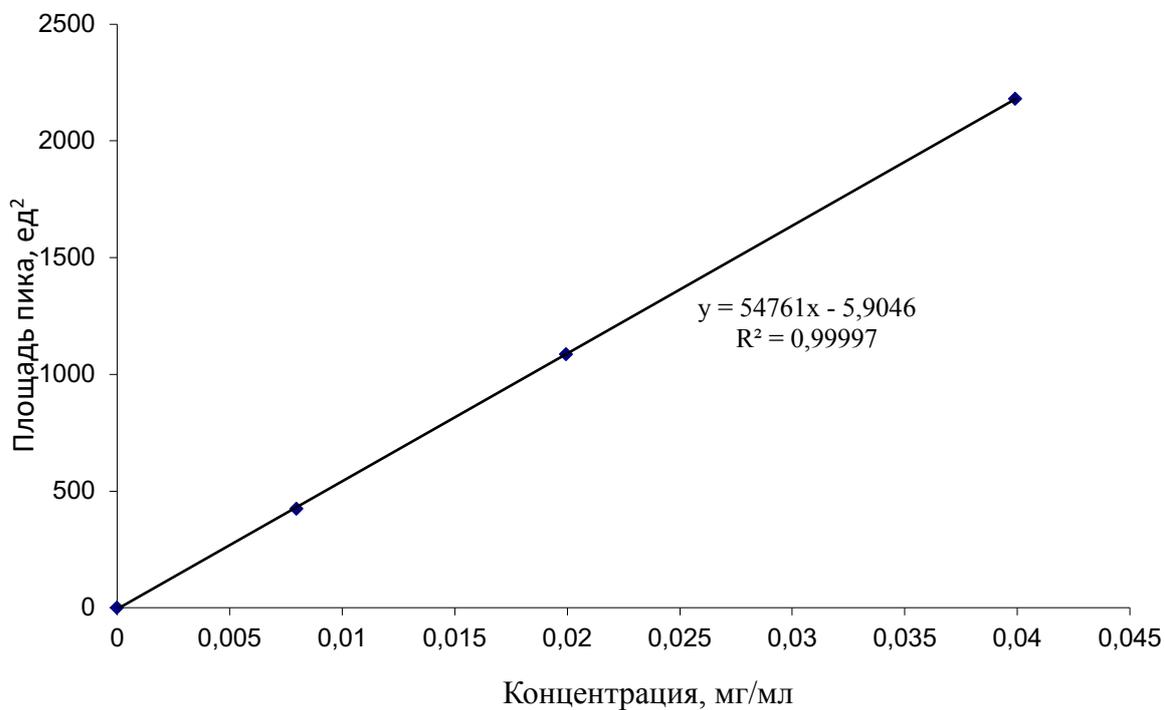


Рисунок 2.2.3 – График зависимости концентрации от площади пика для триазолопиримидинона 3

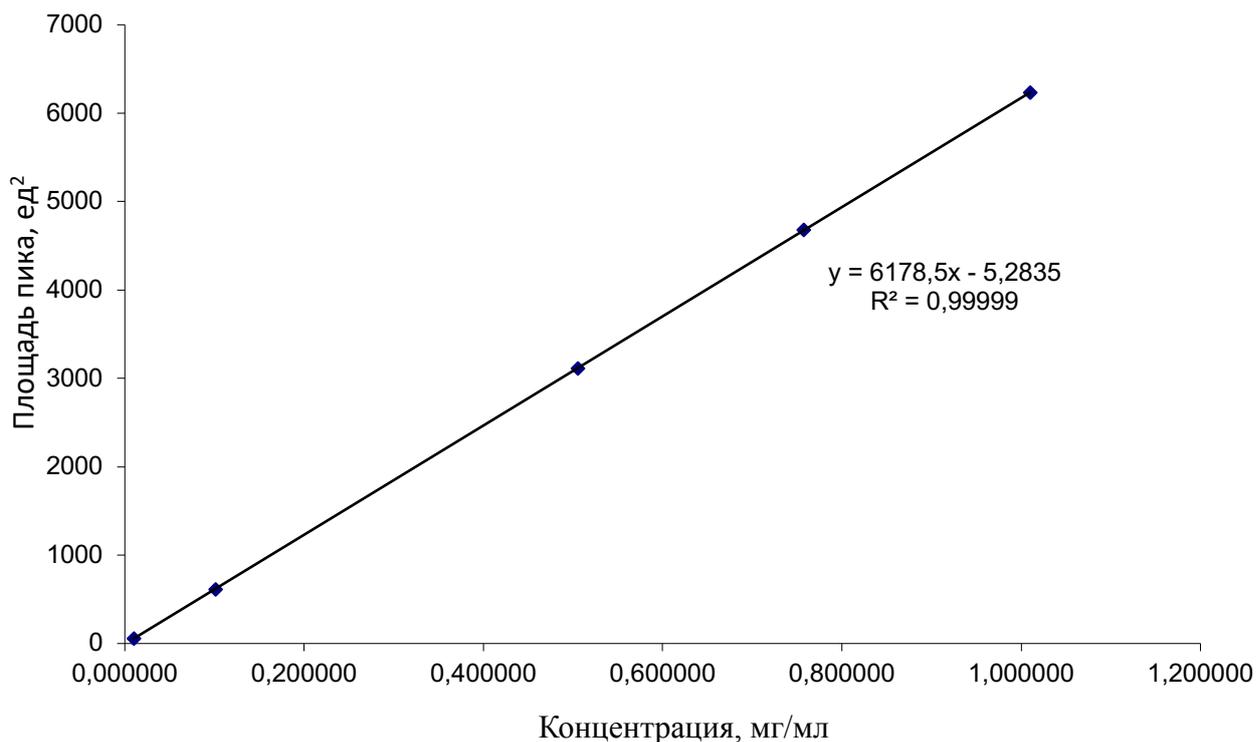


Рисунок 2.2.4 – График зависимости концентрации от площади пика для нитротриазолопиримидинона **4**

Аналитическая область методики для аминотриазола **2** – от 1 до 40 мг/г, для триазолопиримидинона **3** – 1 – 80 мг/г для нитротриазолопиримидинона **4** – 10 – 1000 мг/г.

Предел количественного определения в анализируемом растворе полупродукта **4** для аминотриазола **2** составил 0,30 мкг/мл, триазолопиримидинона **3** – 0,15 мкг/мл, нитротриазолопиримидинона **4** – 10,00 мкг/мл.

Разработанная методика проста в применении, не требует больших временных затрат и дополнительных процедур дериватизации с большим расходом реагентов, обладает высокой чувствительностью и позволяет определять содержание примесей аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** в полупродукте **4** до 0,10 %. Данная методика была успешно применена для анализа опытных партий препарата.

Таблица 2.2.5 – Данные для оценки правильности методики

Введенное кол-во в образец, мг/мл	Результат, мг/мл	Процент восстановления, %	Среднее значение результатов, мг/мл	СКО, %	Коэффициент вариации
Нитротриазолопиримидинон 4					
0,0101	0,01001	99,11	0,01020	0,018	1,773
	0,01022	101,19			
	0,01037	102,67			
0,101	0,1019	100,89	0,1021	0,072	0,706
	0,1015	100,50			
	0,1029	101,88			
0,5050	0,5011	99,23	0,5023	0,139	0,276
	0,5038	99,76			
	0,5019	99,39			
Триазолопиримидинон 3					
0,00798	0,00797	99,85	0,00798	0,002	0,197
	0,00796	99,71			
	0,00799	100,10			
0,01996	0,02010	100,70	0,0201	0,015	0,729
	0,02021	101,25			
	0,01992	99,80			
0,03992	0,04030	100,95	0,0402	0,027	0,668
	0,04038	101,15			
	0,03988	99,90			
Аминотриазол 2					
0,00808	0,00810	100,25	0,00809	0,009	1,115
	0,00817	101,11			
	0,00799	98,90			
0,02020	0,01992	98,61	0,0200	0,013	0,661
	0,02017	99,85			
	0,01997	98,86			
0,04040	0,04021	99,53	0,0401	0,040	0,984
	0,04049	100,22			
	0,03971	98,29			

2.3 Разработка опытно-промышленного метода получения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидиниды *L*-аргининия и его аналогов

2.3.1 Оптимизация условий опытно-промышленного способа получения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидиниды *L*-аргининия и его аналогов

В рамках разработки технологии получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин» проведены работы по оптимизации третьей, заключительной химической стадии процесса – реакции солеобразования 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **4**, выступающего в роли NH-кислоты, с *L*-аргинином, выступающем в роли основания. Реакция проводилась в водной среде с использованием изопропилового спирта для осаждения конечного продукта.

Исходная методика включала в себя растворение одного из сухих компонентов в очищенной воде и последующее добавление второго реагента, нагревание реакционной массы до образования раствора и высаживание продукта с помощью изопропилового спирта. Однако подобный метод синтеза малоприменим на пилотной установке: точное постепенное дозирование сухого компонента в реактор к реакционной суспензии является лимитированным приемом ввиду существенного усложнения конструкции дозирующего устройства, а также возможности возникновения местных перегревов и разбрызгивания содержимого..

Для оптимизации методики был поставлен следующий лабораторный эксперимент: в стакане были смешаны оба сухих реагента, добавлено расчетное количество воды и проведен нагрев реакционной массы до образования раствора с последующим высаживанием продукта **1d** (схема 2.1) изопропиловым спиртом. Оказалось, что подобное ведение процесса вполне применимо для промышленного метода синтеза. Таким образом, методика модифицирована с точки зрения последовательности смешения реагентов и включает в себя помещение сухих компонентов в реактор с последующим добавлением воды и изопропилового спирта при включенном перемешивающем устройстве.

В результате проведения первого синтеза в пилотной установке было установлено, что одной из ключевых точек процесса является резкое повышение вязкости реакционной суспензии при достижении температуры в 48-50 °С, при этом значительную роль играет постоянное и мощное перемешивание внутри реактора, что возможно при использовании эффективной якорной мешалки. Для снижения вязкости реакционной массы в этой точке было исследовано влияние разбавления суспензии дополнительным количеством воды при общем объеме жидкости в 2300 мл. При этом было увеличено и количество изопропилового спирта для сохранения соотношения вода-спирт, равного 1:3. Оказалось, что подобная модификация методики не приводит к снижению выхода продукта (93%), однако значительно повысилось время нагревания реакционной массы до образования раствора (300 мин). Кроме того,

оказалось, что быстрое охлаждение (55 мин) реакционной массы до 25 °С приводит к образованию осадка с большим размером гранул. Таким образом, было показано, что при наличии эффективной якорной мешалки нет оснований для увеличения объема реакционной массы за счет избыточного разбавления, и еще два синтеза были проведены по первоначальной методике, при этом выходы составили 94-95%. Стоит отметить, что увеличение времени охлаждения реакционной массы со 100 до 137 мин не приводит к существенному изменению размера гранул получаемого продукта.

Результаты экспериментов сведены в таблицу 2.3.1.1

Таблица 2.3.1.1 – Условия синтеза субстанции НТП-*L*-arg **1d**

	1	2	3	4
5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7-она 4 , г	1000	1000	1000	1000
<i>L</i> -аргинин, г	890	890	890	890
Вода очищенная, мл	1700	2300	1700	1700
Время нагревания РМ до образования раствора, мин	133	300	126	136
Температура образования раствора, °С	90	80	87	86
Изопропиловый спирт, мл	4700	6900	4700	4700
Время добавления ИПС, мин	10	10	9	8
Время охлаждения до 25 °С, мин	100	55	137	120
Масса влажного продукта 1d , г	2150	2550	2340	2380
Масса сухого продукта 1d , г	1810	1840	1880	1857
Выход, %	91	93	95	94
Соответствие по ¹ H ЯМР, D ₂ O: 1.69 (2H, м, CH ₂), 1.93 (2H, м, CHCH ₂), 2.59 (3H, м, CH ₃), 3.24 (2H, т, NHCH ₂), 3.80 (1H, т, CHCOOH), 8.22 (1H, с, C- 2)	+	+	+	+
Элементный анализ, %				
С 37.21	37.30	37.29	37.30	37.31
Н 5.46	5.50	5.45	5.42	5.51
Н 32.54	32.42	32.61	32.68	32.73

Для получения субстанций НТП-*Na* (**1a**), НТП-*Pip* (**1b**), НТП-*Rem* (**1c**) с применением остальных катионов (соответственно натрия, пиперидина, ремантадина) наиболее удачная методика была воспроизведена аналогичным образом с учётом эквимольного соотношения при загрузке 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **4**, равной 1000 г во всех случаях, и для каждого из них получены положительные результаты, приведённые в таблице 2.3.1.2.

**Таблица 2.3.1.2 – Условия синтеза субстанций с НТП-На (1a),
НТП-Pip (1b), НТП-Rem (1c)**

Донор катиона		Продукт			Соответствие	
Название	Загрузка, г	Масса до сушки, г	Масса после сушки, г	Выход, %	Спектр ¹ H ЯМР, ДМСО- <i>d</i> ₆ , δ, м.д.	Элементный анализ, %
Натрия гидроокись	205	1544	1235	95.2	2.47 (3H, с, CH ₃), 8.05 (1H, с, C-2)	C 28.65 H 3.26 N 27.47
Пиперидин	437	1806	1449	94.8	1.53 (2H, м, C-3-пиперидин), 1.62-1.67 (4H, м, C-2,5-пиперидин), 2.43 (3H, с, CH ₃), 3.02-3.05 (4H, м, C-1,6-пиперидин), 8.05 (2H, с, NH ₂ -пиперидин), 8.26 (1H, уш. с., C-2)	C 44.14 H 6.03 N 28.38
Ремантадин	917	2364	1902	94.6	1.14 (3H, д., <i>J</i> =6.8 Гц, CH ₃ -Rem), 1.50-1.72 (12H, м., адамантан), 2.02 (3H, уш.с., адамантан), 2.45 (3H, с, CH ₃), 2.83 (1H, кв., <i>J</i> =6.8 Гц, CH), 7.63 (3H, уш.с. 3H, NH ₃), 7.92 (1H, с, C-2)	C 55.16 H 7.22 N 21.31

2.3.2 Разработка аналитической методики определения основного вещества в АФС НТП-*L*-arg

Для контроля качества получаемых субстанций разработана методика определения основного вещества в АФС ряда «Дезаза-Триазавирина» на примере НТП-*L*-arg **1d** методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Известно, что *L*-аргинин является сильноосновным соединением (рK_a 12,48), тогда как нитротриазолопиримидин представляет собой NH-кислоту средней силы (рK_a около 2,8). Для «Дезаза-Триазавирина» значение рK_a составляет 9,8.

В соответствии со схемой синтеза субстанций ряда «Дезаза-Триазавирина», на примере НТП-*L*-arg (схема 2.2), конечный продукт может содержать до четырёх примесей предшественников: 3-амино-1,2,4-триазола **2**, 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **3**, 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидината 8H⁺-аргининия **5** и 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **4**. Выполненные хроматографические исследования всех ранее синтезированных партий НТП-*L*-arg не выявили ни в одном случае присутствия примеси 3-

амино-1,2,4-триазола **2** на уровне предела обнаружения, поэтому он исключается из дальнейшего рассмотрения в качестве возможной примеси в АФС НТП-*L*-arg.

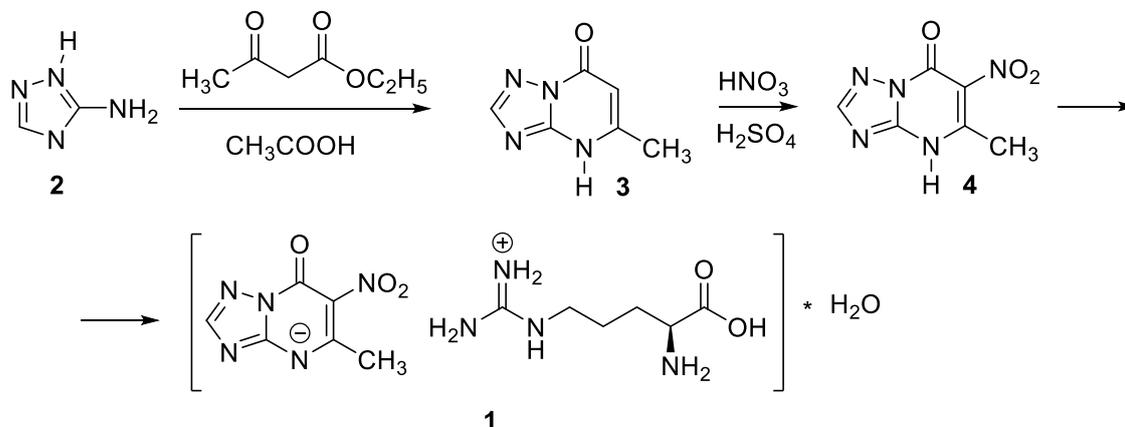


Схема 2.2

Что касается 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **4**, то рассматривать его в качестве примеси в АФС НТП-*L*-arg, на наш взгляд, также представляется нецелесообразным. Это соединение в водных растворах находится в равновесном состоянии с НТП-*L*-arg, и его количество будет зависеть от pH среды.

Для проведения анализа и разделения исследуемых веществ в качестве буферных растворов опробованы ацетат аммония и ацетат аргинина. При использовании ацетата аммония существует возможность появления других примесей в результате ионообмена между молекулами буфера и НТП-*L*-arg, что предполагает образование солей: ацетата аргининия **6**, 5-метил-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидината аммония **7**, 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидината аммония **8** (схема 2.3). По итогам анализа установлено, что на хроматограммах регистрируется пик, соответствующий ацетату аргининия **6**. Поэтому для предотвращения ионообменных процессов и появления дополнительных примесей при хроматографировании было решено заменить 0.05 М буферный раствор ацетата аммония в подвижной фазе на 0.04 М раствор ацетата аргининия. При использовании в качестве подвижной фазы 0.04 М раствора ацетата аргинина в объемном соотношении 92:8 с ацетонитрилом, на хроматограммах не было обнаружено пиков нежелательных примесей соединений **6 – 8**.

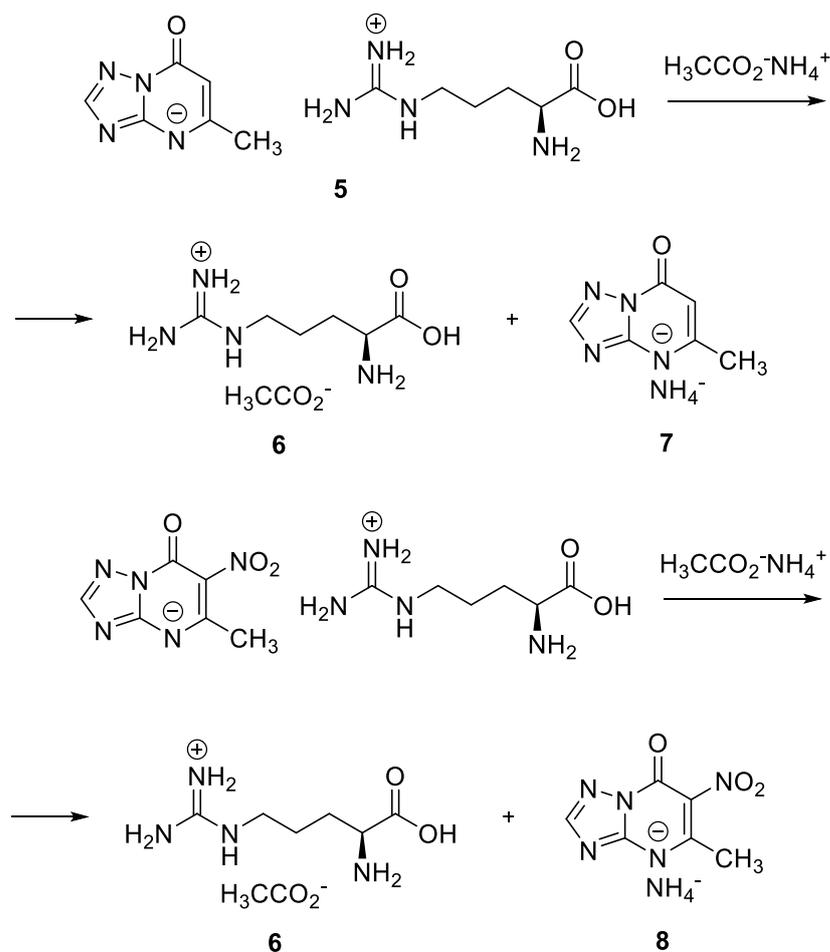


Схема 2.3

Для оптимизации условий проведения ВЭЖХ-анализа также варьировали такой параметр, как длина волны. Первоначально, при проведении анализа осуществляли детектирование при длине волны 220 нм. При регистрации хроматограмм достигается высокая интенсивность пика, соответствующего НТП-*L*-arg, для которого характерно высокое поглощение при данной длине волны. Однако, ацетат аргининия и ацетат аммония также имеют достаточно интенсивное поглощение на данной длине волны, в связи с чем для детектирования НТП-*L*-arg и примесей в данных условиях было решено использовать более длинноволновую область УФ-спектра (рисунок 2.3.1).

Таким образом, анализ проводили на хроматографической колонке с привитой обращенной октадецилсилановой фазой ЕКА 100-5-с18 длиной 250 мм, внутренним диаметром 4.6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм. Температура колонки – 25 °С. Режим элюирования – изократический. Скорость потока – 0.9 мл/мин. Детектирование осуществляли при 360 нм.

Процедуру валидации разработанной методики осуществляли по следующим параметрам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность [13].

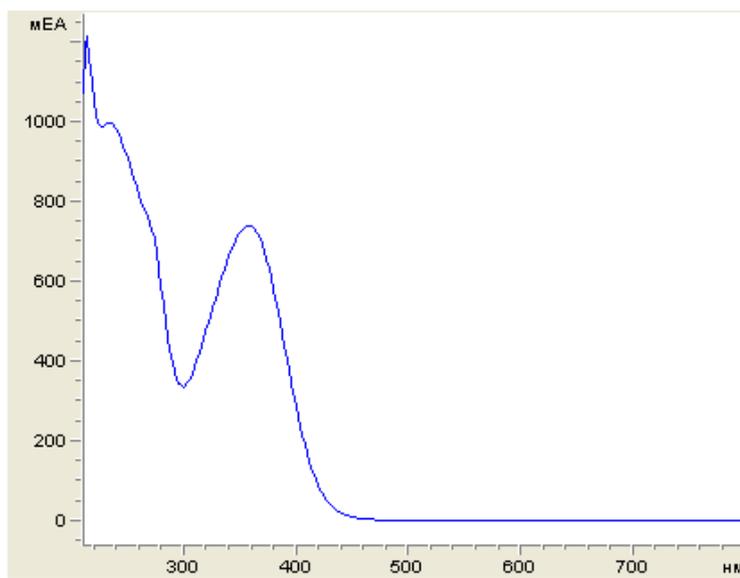


Рисунок 2.3.1 – УФ-спектр 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d**

Аналитическая область методики – от 80 до 120% по содержанию 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d** в субстанции.

Для подтверждения специфичности методики получены хроматограммы следующих растворов: 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d** (основного вещества) (рисунок 2.3.2) и матрицы (рисунок 2.3.3). Время удерживания пика основного вещества **1d** составило около 8.5 мин. На хроматограмме матрицы отсутствуют пики, препятствующие определению основного вещества, что свидетельствует о возможности применения данной методики для определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d**.

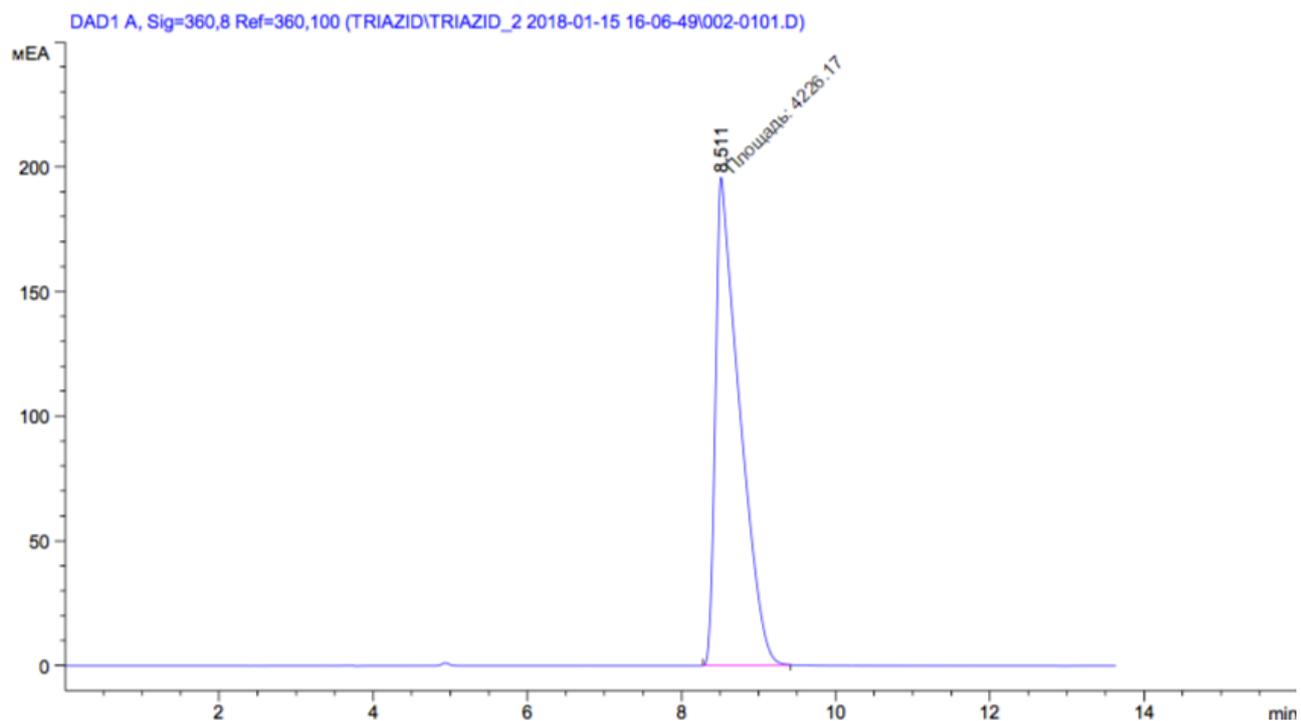


Рисунок 2.3.2 – Хроматограмма 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d**, 360 нм

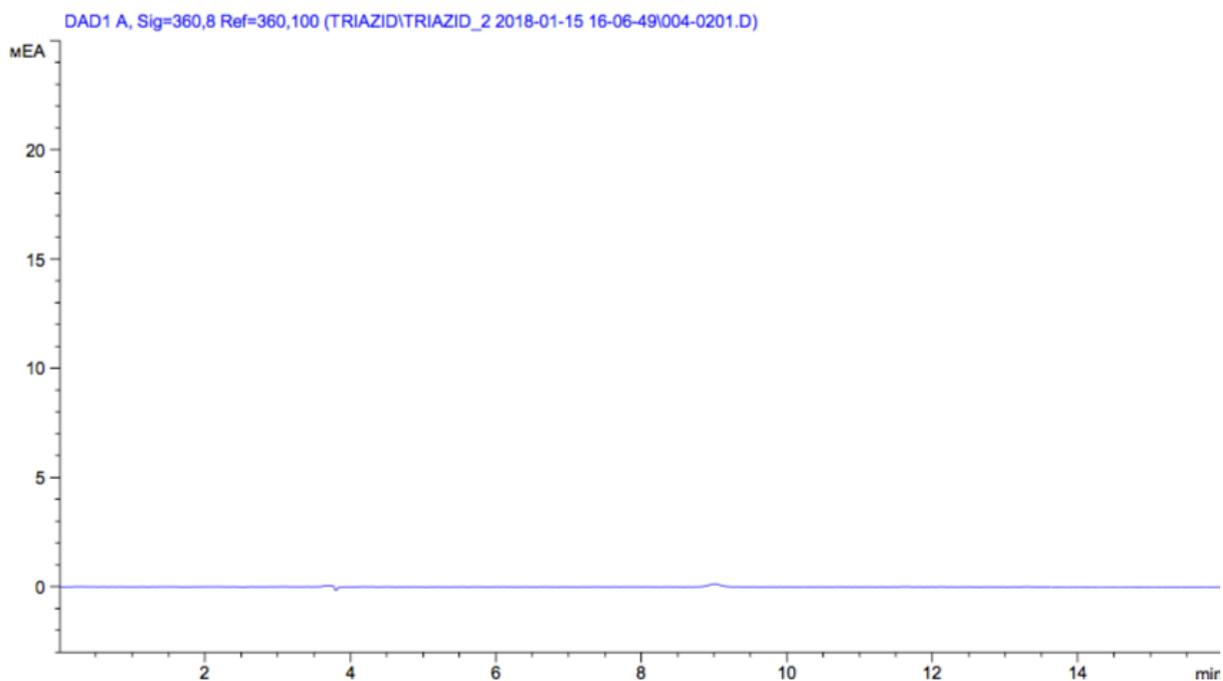


Рисунок 2.3.3 – Хроматограмма матрицы анализируемого вещества, 360 нм

Для оценки линейности использовали стандартные растворы 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d** с номинальными концентрациями от 0.8 до 1.2 мг/мл (таблица 2.3.2) Установлено, что графики зависимости

имеют линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций, и описываются уравнением: $y = 4244,7x - 39,6$ (рисунок 2.3.4), коэффициент корреляции близок к единице – 0,9999.

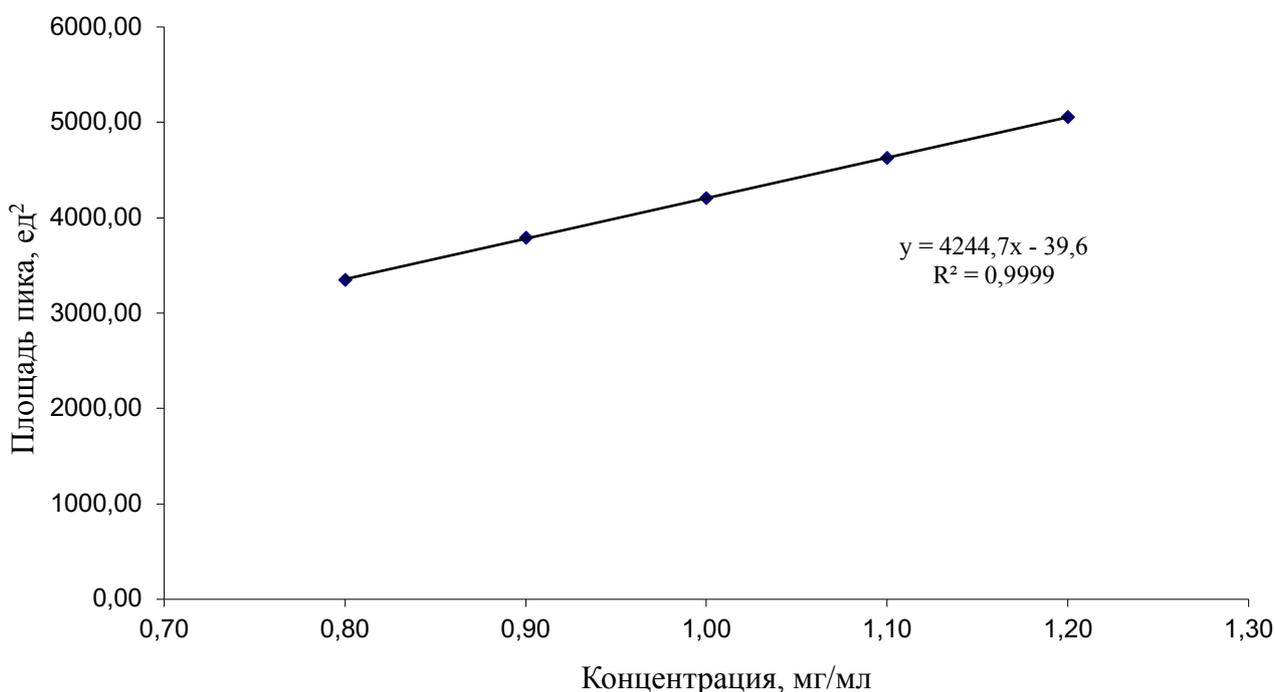


Рисунок 2.3.4 – График зависимости концентрации от площади пика для 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид *L*-аргининия моногидрата **1d**

Таблица 2.3.2 – Данные для определения линейности графика зависимости концентрации 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид *L*-аргининия моногидрата **1d** от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед ²			Среднее значение	СКО, %
	S ₁	S ₂	S ₃		
0,80	3360	3344	3343	3349,00	0,28
0,90	3792	3779	3798	3789,67	0,26
1,00	4214	4204	4205	4207,67	0,13
1,10	4631	4624	4622	4625,67	0,10
1,20	5051	5046	5063	5053,33	0,17

Правильность методики устанавливали по результатам анализа методом добавок (таблица 2.3.3). Для полученных значений концентраций были рассчитаны: процент восстановления, среднеквадратичное отклонение (СКО, %) и коэффициент вариации. Полученные величины среднеквадратичного отклонения (СКО, %) и относительного отклонения результата не превышают 3 %.

Таблица 2.3.3 – Данные для оценки правильности методики

Введенное количество в образец, мг/мл	Результат, мг/мл	Процент восстановления, %	Среднее значение результатов, мг/мл	СКО, %	Коэффициент вариации
5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-<i>a</i>]пиримидинида <i>L</i>-аргининия моногидрат 1d					
0,9000	0,9082	100,91	0,9055	0,249	0,275
	0,9032	100,36			
	0,9051	100,57			
1,0000	1,0027	100,27	1,0024	0,213	0,212
	1,0044	100,44			
	1,0002	100,02			
1,1000	1,1086	100,78	1,1084	0,095	0,086
	1,1093	100,85			
	1,1074	100,67			

Предел количественного определения данной методики по 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d** составил 0.45 мг/мл, а предел детектирования – 0,135 мг/мл.

Что касается сходимости методики, то коэффициент вариации параллельных определений для 6 измерений составил менее 1.5 %.

Проведенная валидация разработанной аналитической методики показала возможность ее применения для контроля последней стадии технологического процесса получения опытно-промышленных и промышленных партий АФС НТП-*L*-arg. Данная методика была успешно применена для анализа опытных партий АФС НТП-*L*-arg.

2.4 Построение технологической и аппаратурных схем производства

2.4.1 Процедура получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она

В мерник **1М** с помощью вакуума загружают уксусную кислоту, в мерник **2М** с помощью вакуума загружают ацетоуксусный эфир. В реактор **3Р** загружают через люк 3-амино-1,2,4-триазол **2**, включают перемешивание. Из мерника **1М** самотеком передают уксусную кислоту к 3-амино-1,2,4-триазолу **2** в реакторе **3Р**, после чего к реакционной смеси добавляют самотеком ацетоуксусный эфир из мерника **2М**. В теплообменник **4Т** подают холодную воду для конденсации паров, а реакционную массу нагревают до температуры 104-109 °С путем подачи теплоносителя в рубашку аппарата. Конденсат, образующийся в теплообменнике **4Т** в начале процесса, возвращают обратно в реактор **3Р**. Смесь перемешивают при данных параметрах в течение 60 мин, после чего переключают делитель потока, и образующийся в теплообменнике **4Т** конденсат направляют в сборник **5Сб** и далее – в сборник для жидких отходов, и выдерживают реакционную массу в течение 120 мин при выводе конденсата из сферы реакции. Затем смесь охлаждают до 30 °С и выдерживают 30 мин. Полученную суспензию направляют с помощью вакуума в верхнюю ёмкость нутч-фильтра **6Ф**, где осадок отделяют через слой фильтрующего полотна «Бельтинг» и дважды промывают очищенной водой через реактор **3Р**. Фильтрат направляют в сборник **7Сб**, а затем – в сборник для жидких отходов. Осадок, полученный в результате фильтрования, перегружают на поддоны и сушат при 100 °С в вакуум-сушильном шкафу **8Сш** до постоянной массы. Средний выход 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она **3** составляет 85%, чистота не менее 99.5% (ВР.1 – ТП.4, рисунок 2.4.1, 2.4.2).

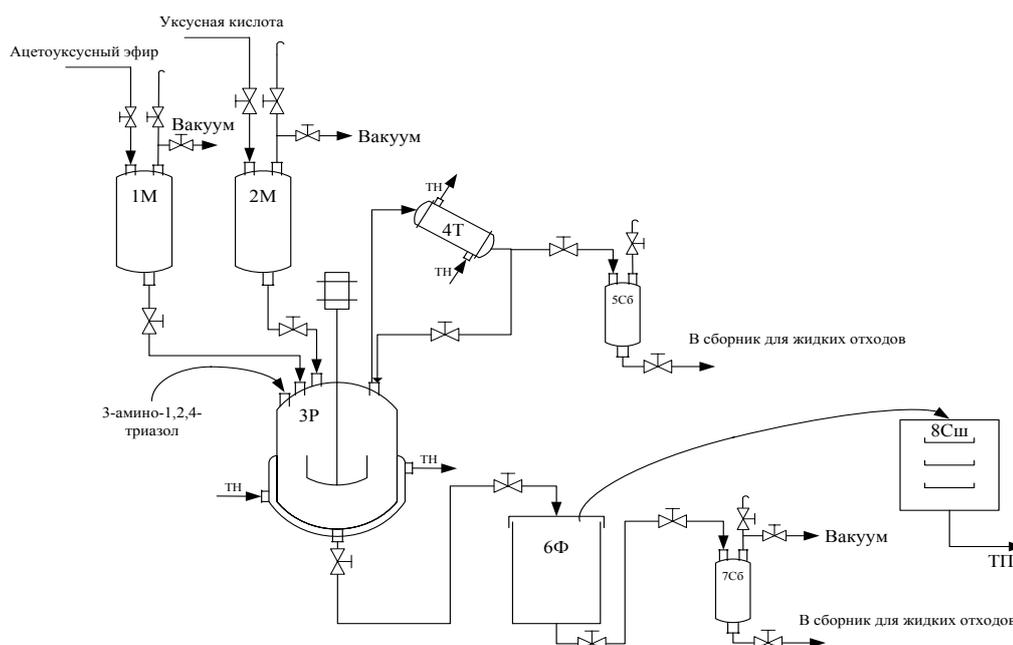


Рисунок 2.4.1 – Аппаратурная схема синтетического комплекса получения триазолопиримидинона **3**

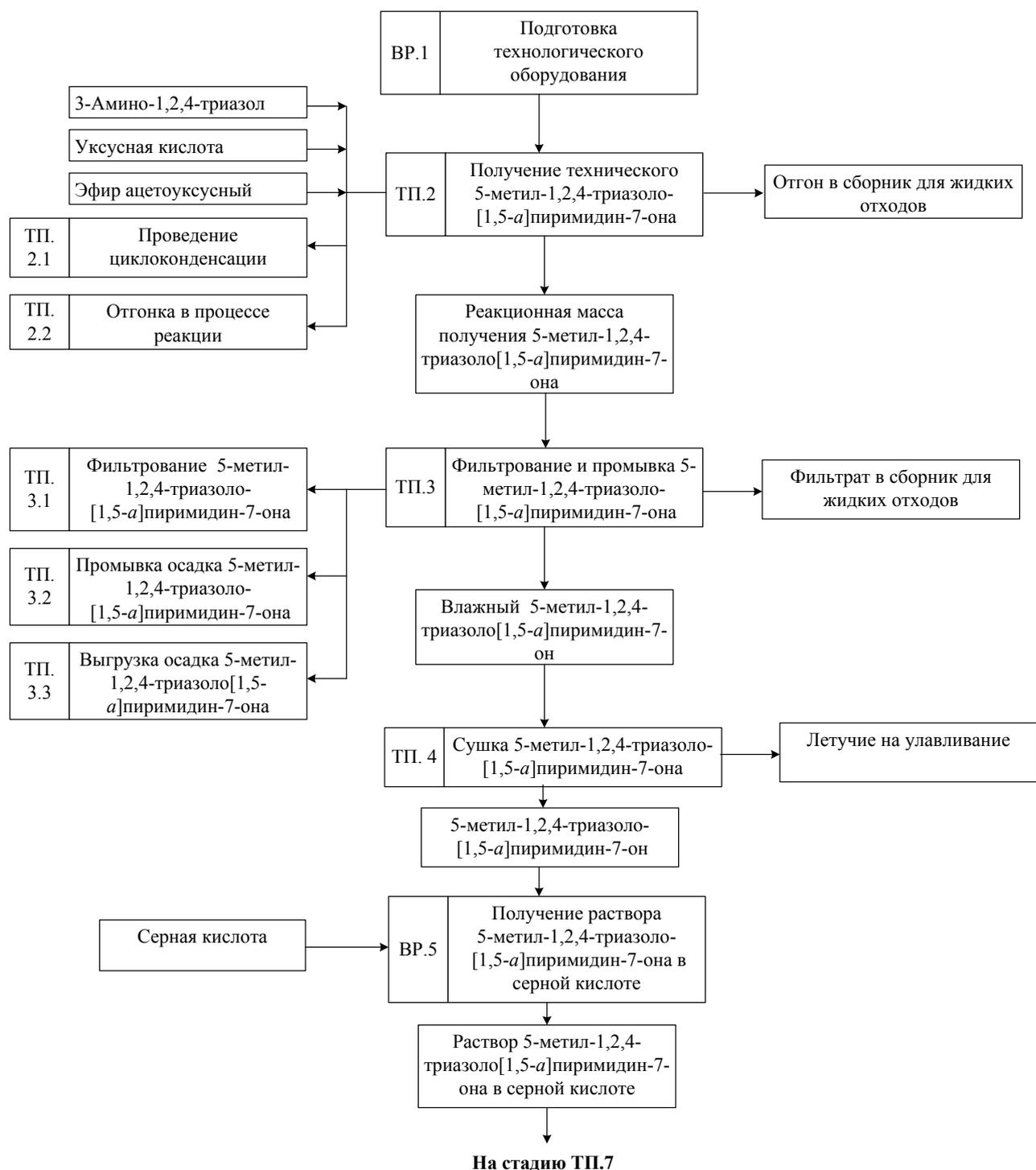


Рисунок 2.4.2 – Технологическая схема стадий BP.1 – BP.5

2.4.2 Процедура получения технического 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она

В мерник **9М** с помощью вакуума загружают концентрированную серную кислоту, которую затем направляют самотеком в реактор **11Р**, включают перемешивание. Серную кислоту в реакторе **11Р** охлаждают до температуры 10 °С путем подачи охлажденного теплоносителя в рубашку аппарата. Затем через люк в реактор **11Р** дозируют 5-метил-1,2,4-

триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он **3**, не допуская перегрева смеси выше 40 °С. После добавления всей массы 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **3** содержимое реактора **11P** перемешивают в течение 10 мин, после чего с помощью вакуума перекачивают полученный раствор в мерник **10M**.

В мерник **9M** загружают концентрированную серную кислоту с помощью вакуума. В реактор **11P** через люк загружают концентрированную азотную кислоту (70%), включают перемешивающее устройство. Азотную кислоту в реакторе **11P** охлаждают до температуры 10 °С. Затем из мерника **9M** в реактор **11P** дозируют серную кислоту, не допуская перегрева смеси выше 30 °С. После окончания дозирования серной кислоты и охлаждения полученной нитрующей смеси до температуры 10 °С, в реактор **11P** начинают дозировать раствор 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **3** в серной кислоте из мерника **10M**, не допуская нагрева содержимого реактора **11P** выше 40 °С. По окончании добавления раствора 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **3** в серной кислоте к нитрующей смеси реакционную массу выдерживают при температуре 35-40 °С в течение 120 мин. После завершения выдержки, реакционную массу охлаждают до 10 °С.

В мерник **12M** с помощью вакуума загружают очищенную воду, которую самотеком направляют в реактор **13P**. Затем в реакторе **13P** включают перемешивание, а в рубашку реактора подают теплоноситель, охлаждая содержимое до температуры не выше 20 °С. К охлажденной воде в реакторе **13P** дозируют с помощью вакуума реакционную массу из реактора **11P**, не допуская нагрева содержимого реактора **13P** выше 40 °С. Затем содержимое реактора **13P** охлаждают до 20 °С и выдерживают 30 мин. Суспензию из реактора **13P** направляют с помощью вакуума в верхнюю емкость нутч-фильтра **14Ф**, где осадок отделяют через слой фильтрующего полотна «Бельтинг» и дважды промывают очищенной водой через люк реактора **13P**. Фильтрат направляют в сборник **15Сб**, а затем – в сборник для жидких отходов. Промытый осадок технического 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **4** перегружают на поддоны (ВР.5 – ТП.9, рисунок 2.4.2, 2.4.3, 2.4.4).

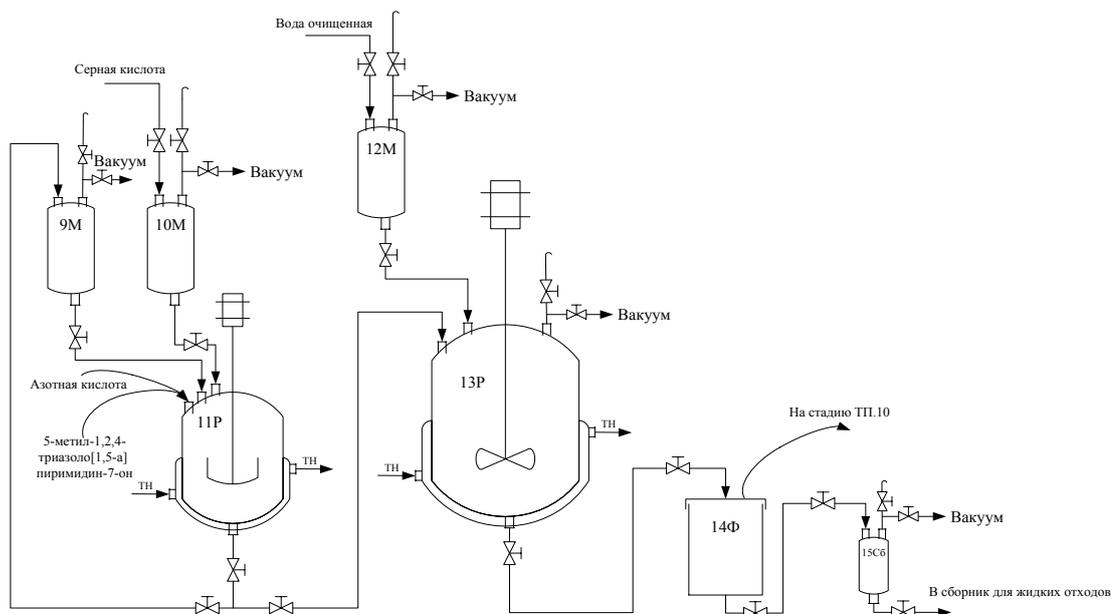


Рисунок 2.4.3 – Аппаратурная схема синтетического комплекса получения технического нитротриазолопиримидинона

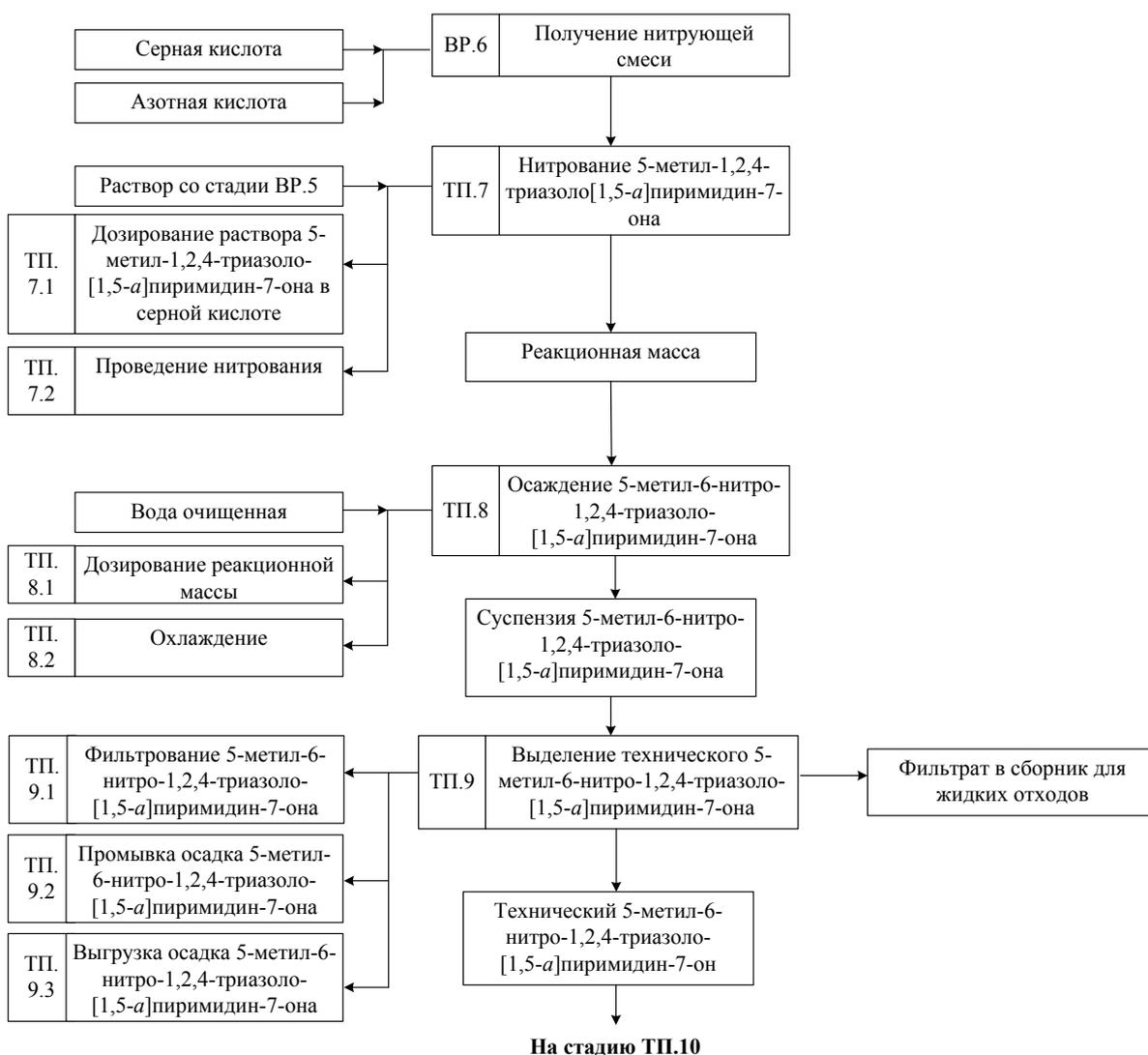


Рисунок 2.4.4 – Технологическая схема стадий ВР.6 – ТП.9

2.4.3 Процедура очистки технического 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она

В мерник **16М** с помощью вакуума загружают очищенную воду, которую затем самотеком сливают в реактор **17Р**, затем в мерник **16М** с помощью вакуума загружают вторую порцию очищенной воды и также сливают в реактор **17Р**, включают перемешивание. Затем в реактор **17Р** через люк загружают технический 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-он **4**. В рубашку реактора **17Р** подают теплоноситель, нагревают содержимое до 99-100 °С и выдерживают при этой температуре в течение 30 мин, до полного растворения полупродукта **4**.

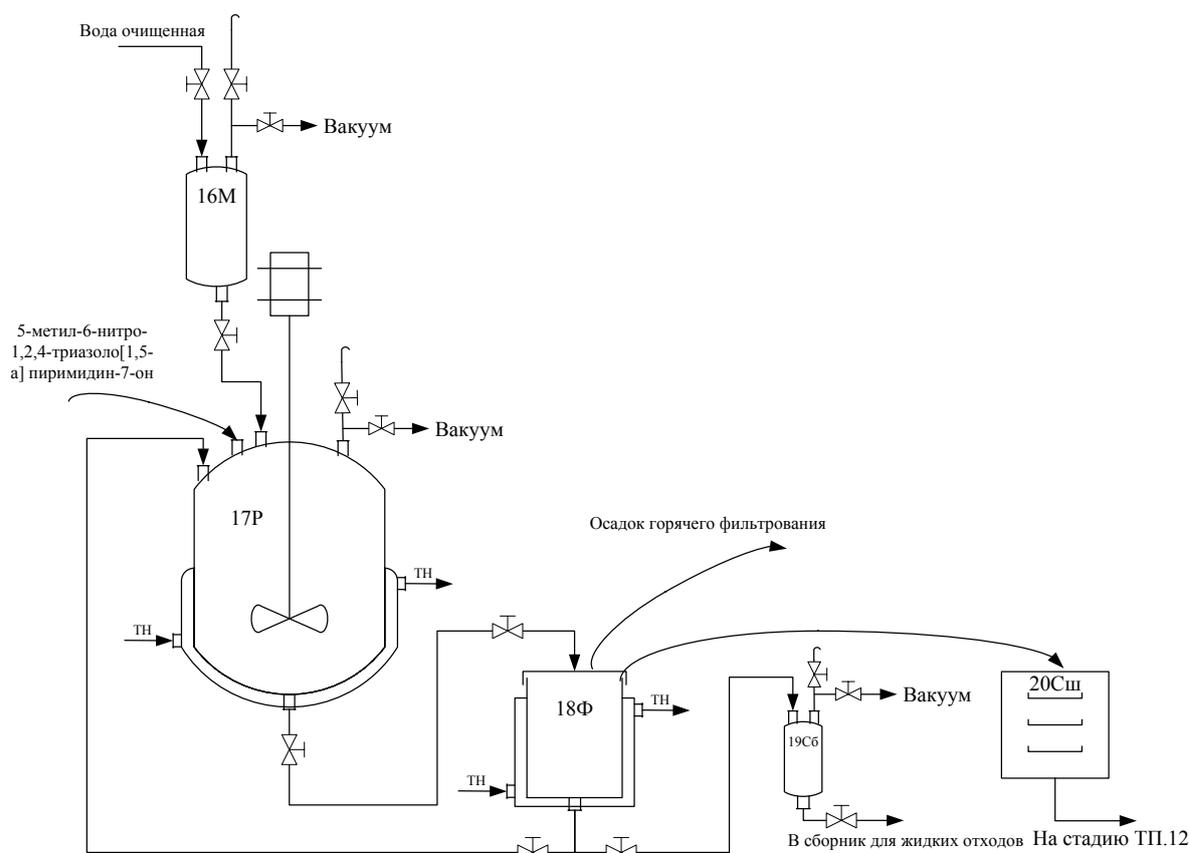


Рисунок 2.4.5 – Аппаратурная схема синтетического комплекса очистки технического нитротриазолопиримидинона

В рубашку нутч-фильтра **18Ф** подают теплоноситель с температурой 95-100 °С, выдерживают 10 мин, после чего смесь из реактора **17Р** направляют с помощью вакуума в верхнюю емкость нутч-фильтра **18Ф**, где осадок отделяют через один слой фильтрующего полотна «Бельтинг». После окончания фильтрования реактор **17Р** промывают очищенной водой в сборник для жидких отходов, далее фильтрат из нутч-фильтра **18Ф** направляют обратно в реактор **17Р** посредством вакуума, прекращают подачу горячего теплоносителя в рубашку нутч-фильтра **18Ф**. Полученный в результате горячего фильтрования осадок и использованное

фильтрующее полотно «Бельтинг» переносят в сборник для твердых отходов, а нутч-фильтр **18Ф** промывают очищенной водой через крышку нутч-фильтра в сборник для жидких отходов.

Возвращенный в реактор **17Р** фильтрат охлаждают до 20 °С и выдерживают 60 мин до окончания кристаллизации 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **4** в воде. Полученную в реакторе **17Р** суспензию направляют с помощью вакуума в верхнюю ёмкость нутч-фильтра **18Ф**, где выделившийся осадок отделяют через свежее фильтрующее полотно «Бельтинг», дважды промывают очищенной водой в количестве 4 л через реактор **17Р**. Фильтрат направляют в сборник **19Сб**, а затем в сборник для жидких отходов. Осадок, полученный в результате фильтрования, сушат при 100 °С в вакуум-сушильном шкафу **СШ20** до постоянной массы. Средний выход 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **4** составляет 86%, чистота не менее 99.7% (ТП.10 – ТП.11, рисунок 2.4.5, 2.4.6).

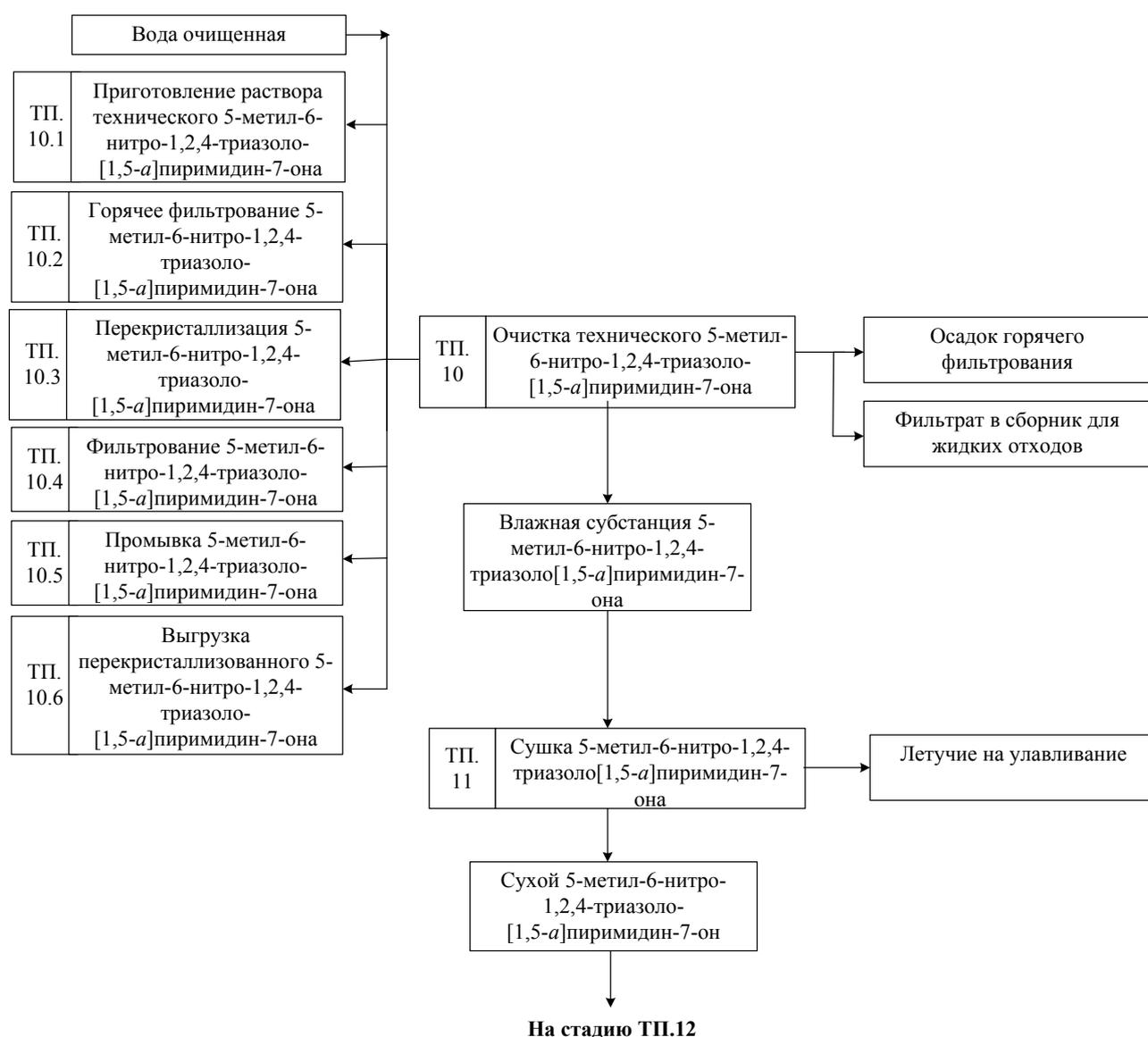


Рисунок 2.4.6 – Технологическая схема стадий ТП.10 – ТП.11

2.4.4 Процедура получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирина»

В мерник **21М** с помощью вакуума загружают очищенную воду. В мерник **22М** с помощью вакуума загружают изопропиловый спирт. В реактор **23Р** загружают через люк соответствующее основание, включают перемешивание. Из мерника **21М** самотеком передают очищенную воду к основанию в реакторе **23Р**, после чего к полученному раствору через люк реактора **23Р** загружают 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-он **4**. В теплообменник **24Т** подают холодную воду для конденсации паров. Реакционную массу нагревают до температуры 98-100 °С, выдерживают реакционную массу при заданной температуре в течение 15 мин. Затем в рубашку реактора **23Р** подают холодный теплоноситель и содержимое реактора **23Р** охлаждают до 75-80 °С. После охлаждения реакционной массы в реактор **23Р** из мерника **22М** самотеком подают изопропиловый спирт, содержимое реактора **23Р** нагревают до 80-85 °С и выдерживают в течение 20 мин. Затем содержимое аппарата охлаждают до 20-25 °С и выдерживают 3 ч для кристаллизации продукта.

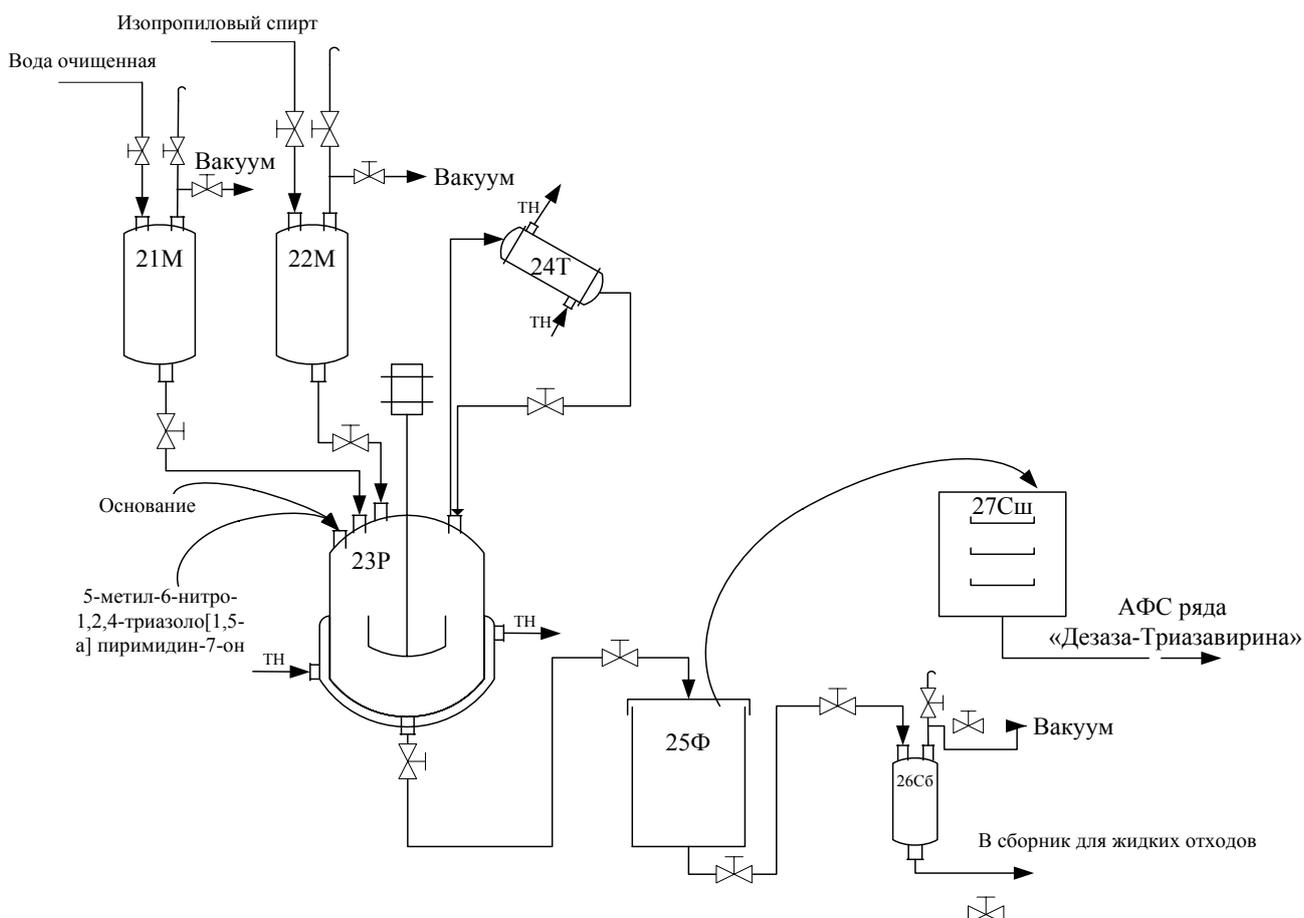


Рисунок 2.4.7 – Аппаратурная схема синтетического комплекса получения субстанции препарата ряда «Дезаза-Триазавирина»

Полученную суспензию направляют с помощью вакуума в верхнюю емкость нутч-фильтра **25Ф**, где полученный осадок отделяют через слой фильтрующего полотна «Бельтинг». Фильтрат направляют в сборник **26Сб**, а затем в сборник для жидких отходов. Осадок, полученный в результате фильтрования, дважды промывают порциями очищенной воды через люк реактора **23Р**, перегружают на поддоны и сушат при 60 °С в вакуум-сушильном шкафу **27СШ**. Средний выход АФС ряда «Дезаза-Триазавирина» составляет 97%, чистота не менее 99.5% (ТП.12 – ТП.14, рисунок 2.4.7, 2.4.8).



Рисунок 2.4.8 – Технологическая схема стадий ТП.12 – ТП.14

В результате проведенной технологической работы удалось сократить количество технологических стадий с 17 в первоначальном варианте до 14 в существующем технологическом процессе.

Сводная аппаратная схема процесса представлена на рисунке 2.4.9.

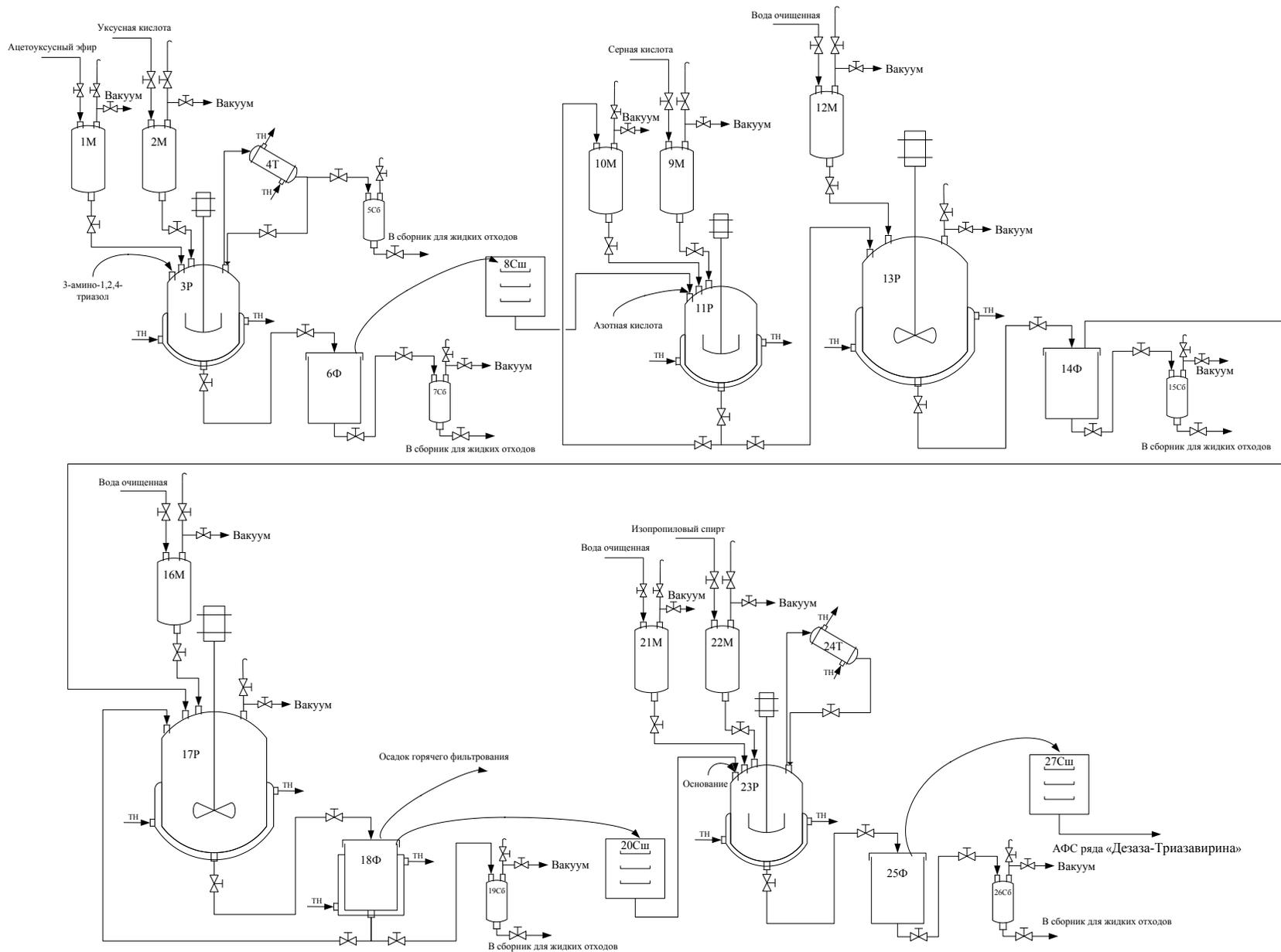


Рисунок 2.4.9 – Аппаратурная схема синтетического комплекса получения субстанции препаратов ряда «Дезаза-Триазавирин»

2.5 Исследования фармакокинетики препаратов ряда «Дезаза-Триазавирин» на примере НТП-*L*-arg

2.5.1. Разработка методики определения препаратов ряда «Дезаза-Триазавирин» в плазме крови человека на примере НТП-*L*-arg

Для осуществления фармакокинетических исследований препаратов ряда «Дезаза-Триазавирин» первоначально было необходимо разработать методику его определения в плазме крови человека. Это поможет решить две важнейшие задачи, во-первых, добиться эффективного разделения АФС и компонентов плазмы крови путем подбора оптимальных хроматографических условий анализа и, во-вторых, разработать воспроизводимый метод наиболее полной экстракции препарата из образцов плазмы.

Для решения первой задачи опробовали ранее разработанную методику определения НТП-*L*-arg в субстанции препарата, однако, форма пика АФС при описанных условиях не отвечала необходимым критериям симметрии, а также происходило наложение компонентов плазмы на хроматографический пик определяемого вещества. Для решения данной проблемы при выборе нового состава подвижной фазы исследованы различные буферные растворы в различных соотношениях с ацетонитрилом и метанолом. В результате в качестве подвижной фазы выбрана смесь 0.05 М раствора ацетата аммония с ацетонитрилом, а в ходе варьирования соотношения ацетонитрил – буферный раствор выбрана наиболее оптимальная начальная точка элюирования – соотношение 4% ацетонитрила и 96% буферного раствора с постепенным увеличением концентрации ацетонитрила до 25% в ходе анализа. Известно также, что увеличение доли органического модификатора в подвижной фазе позволяет увеличить срок службы хроматографической колонки и избавиться от лишних компонентов плазмы крови, не элюирующихся при низких концентрациях органического растворителя. Время выхода 5-метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1** в данных условиях составило около 1.15 мин.

При выборе состава подвижной фазы были исследованы различные буферные растворы: 0.01 М ацетат аммония в 0.04% гидроксиде аммония (рН = 9); 0.01 М ацетат аммония в 0.01% уксусной кислоте; 0.01 М ацетат аммония в различных соотношениях с ацетонитрилом и метанолом. Лучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве элюента смеси 0.05 М ацетата аммония с ацетонитрилом.

В качестве экстрагирующего агента нами опробованы: ацетонитрил, метанол, этанол и этилацетат. Использование этилацетата дало наилучшие результаты, т.к. количество переносимых в пробу компонентов плазмы крови резко снизилось ввиду использования неполярного растворителя. Полнота экстракции определяемого компонента и степень его растворимости в этилацетате в заданных пределах аналитической области методики

подтверждены в процессе валидации методики, а градуировочный график оказался линейен во всей области изучаемых концентраций.

Таким образом, разделение препарата и компонентов плазмы крови осуществляли в градиентном варианте элюирования, скорость потока – 0.4 мл/мин, температура колонки – 30 °С. Детектирование осуществляли при 358 нм. Объем вводимой пробы – 10 мкл. Время анализа – 5 мин.

Процедуру валидации разработанной методики осуществляли по следующим параметрам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность.

Аналитическая область методики – от 0.03 до 20.00 мкг/мл по содержанию 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d** в плазме крови.

Для подтверждения специфичности методики получены хроматограммы следующих растворов: 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1** в плазме крови человека (рисунок 2.5.1) и матрицы (самой плазмы крови, не содержащей анализируемое вещество) (рисунок 2.5.2), наложение данных хроматограмм представлено на рисунке 2.5.3. Время удерживания пика основного вещества **1** составило около 1.15 мин. На хроматограмме матрицы отсутствуют пики, препятствующие определению основного вещества, что свидетельствует о возможности применения данной методики для определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1** в плазме крови человека.

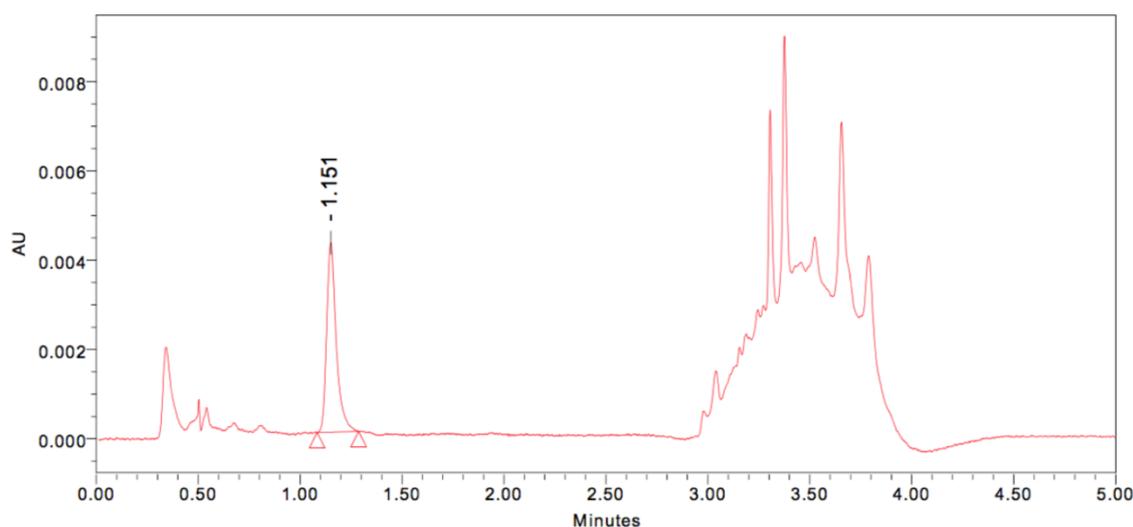


Рисунок 2.5.1 – Хроматограмма 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d** в плазме крови человека, 358 нм

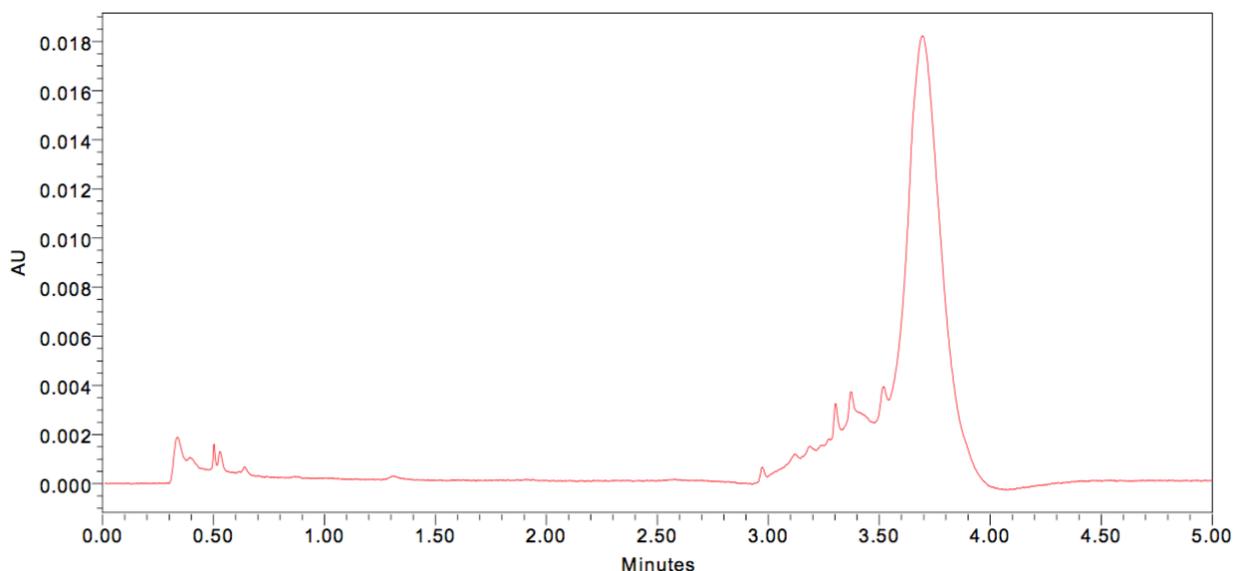


Рисунок 2.5.2 – Хроматограмма матрицы анализируемого вещества, 358 нм

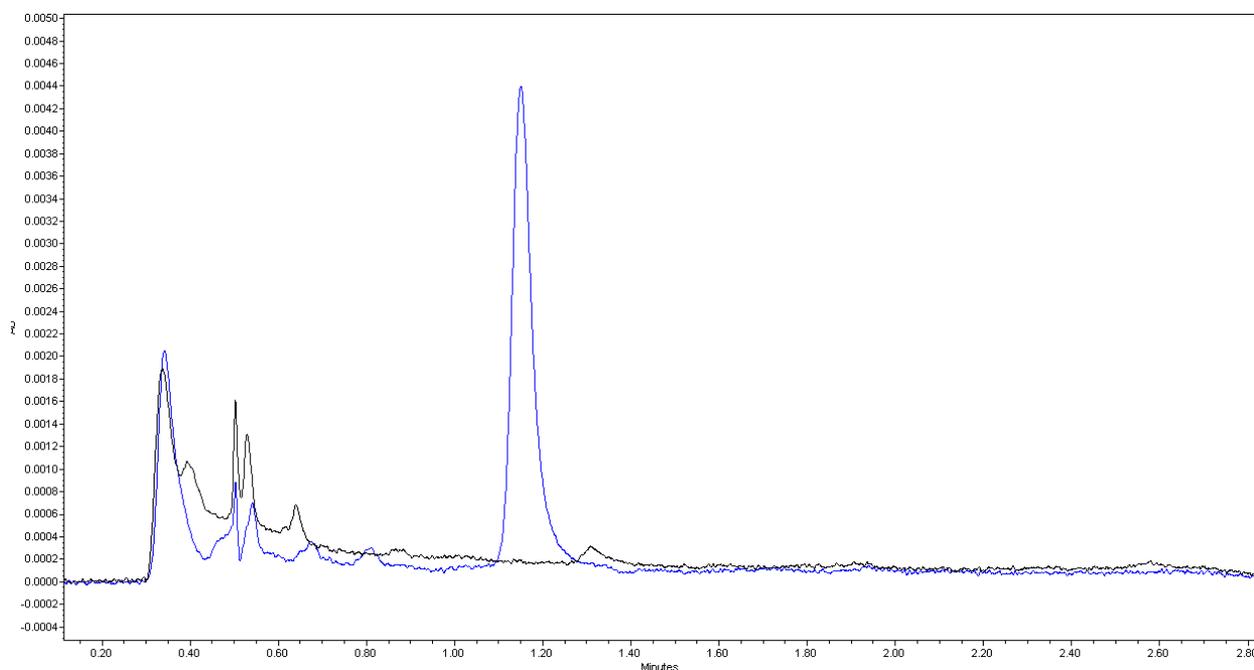


Рисунок 2.5.3 – Наложение хроматограммы матрицы анализируемого вещества на хроматограмму введенного в плазму «Дезаза-Триазавирина» **1d**, 358 нм

Для оценки линейности методики использовали стандартные растворы 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d** с номинальными концентрациями в плазме крови от 0.03 до 20.0 мкг/мл. Установлено, что графики зависимости имеют линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций, и описываются уравнением: $y = 44103x - 128,79$ (рисунок 2.5.4), коэффициент корреляции близок к единице (0.9994). Данные, полученные для определения линейности разработанной методики приведены в таблице 2.5.1.

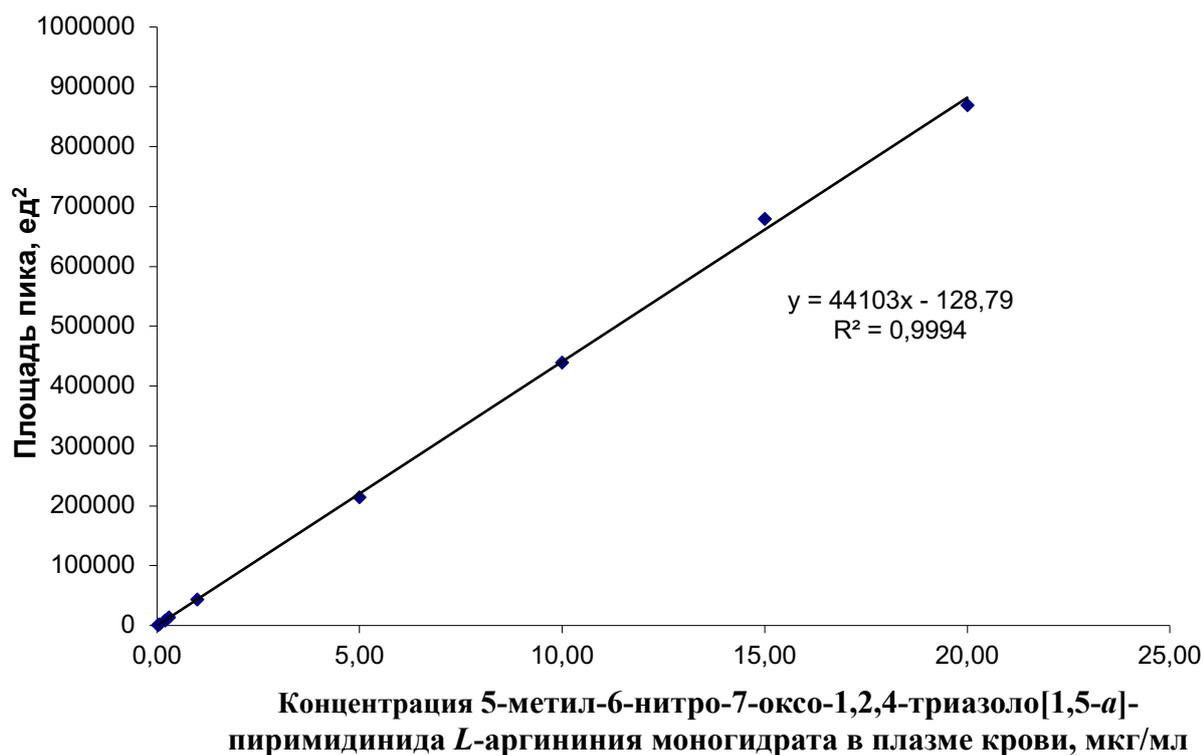


Рисунок 2.5.4 – График зависимости концентрации от площади пика для 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-a]пиримидинида L-аргининия моногидрата **1d**

Таблица 2.5.1 – Данные для определения линейности графика зависимости концентрации 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-a]пиримидинида L-аргининия моногидрата **1d** от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед ²			Среднее значение	СКО, %
	S ₁	S ₂	S ₃		
0,03	1246	1268	1269	1261,00	1,03
0,05	2121	2124	2099	2114,67	0,65
0,20	8467	8422	8419	8436,00	0,32
0,30	13511	13567	13592	13556,67	0,31
1,00	44059	43948	44001	44002,67	0,13
5,00	213615	214449	214981	214348,33	0,32
10,00	440014	439781	440186	439993,67	0,05
15,00	681119	679955	679056	680043,33	0,15
20,00	864316	867718	877728	869920,67	0,80

Для проверки правильности методики было приготовлено пять модельных смесей 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-a]пиримидинида L-аргининия моногидрата **1d** в плазме крови с концентрациями 20,00 мкг/мл, 1,00 мкг/мл и 0,05 мкг/мл методом добавок (таблица 2.5.2). Для полученных значений концентраций были рассчитаны: процент

восстановления, среднеквадратичное отклонение (СКО, %) и отклонение результата, %. Полученные величины СКО и относительного отклонения результата не превышают 3%.

Таблица 2.5.2 – Данные для оценки правильности методики

Введенное количество в образец, мкг/мл	Результат, мкг/мл	Процент восстановления, %	Среднее значение результатов, мкг/мл	СКО, %	Отклонение результата, %
5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-<i>a</i>]пиримидинида <i>L</i>-аргининия моногидрат 1d					
0,050	0,051	102,569	0,051	1,338	1,154
	0,050	100,891			
	0,050	99,576			
	0,050	100,210			
	0,051	102,523			
1,000	1,007	100,705	0,997	1,087	-0,261
	1,001	100,079			
	0,993	99,317			
	0,981	98,056			
	1,005	100,539			
20,000	19,915	99,574	20,088	0,689	0,440
	20,218	101,092			
	20,184	100,921			
	19,964	99,821			
	20,159	100,794			

Для определения предела обнаружения и предела количественного определения данной методики воспользуемся п. 2.2.2 и п. 3.2.2. ОФС.1.1.0012.15:

Предел обнаружения (ПО) находят по уравнению:

$$ПО = 3,3 \times S/b \quad (1)$$

Предел количественного определения (ПКО) рассчитывают по уравнению:

$$ПКО = 10 \times S/b \quad (2)$$

где: *S* – стандартное отклонение аналитического сигнала;

b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой).

Согласно ОФС.1.1.0012.15, для линейного калибровочного графика значение *S* принимают равным стандартному отклонению *S_a* свободного члена уравнения этого графика.

Таким образом, для данной методики, предел количественного определения по 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрату **1d** составил 0,0292 мкг/мл, а предел детектирования – 0,0096 мкг/мл.

Для определения сходимости и промежуточной прецизионности проводили статистическую обработку результатов определения концентраций определяемого компонента в плазме крови в разные рабочие дни. Для этого проводили анализ 3 растворов модельных смесей в плазме крови – 20,00 мкг/мл, 1,00 мкг/мл и 0,05 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали трижды, растворы использовали свежеприготовленными.

Расчет концентрации полученных растворов вели по полученному калибровочному графику. В качестве первого массива данных использовали результаты определения линейности. Для полученных значений концентраций были рассчитаны среднеквадратичное отклонение и критерий Кохрена, вычислен предел повторяемости. Полученные величины среднеквадратичного отклонения не превышают 5,0 %, а вычисленный критерий Кохрена ($G_{m(max)} = 0,589$) оказался ниже допустимого табличного, что свидетельствует об отсутствии грубой погрешности разработанной методики.

Таким образом, была разработана методика определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d** в плазме крови человека с концентрациями от 0,03 до 20 мкг/мл методом ультра-ВЭЖХ. Методика достаточно проста в применении, не требует больших временных затрат и дополнительных процедур дериватизации с большим расходом реагентов, обладает высокой чувствительностью.

С применением этой методики на следующем этапе работы на здоровых добровольцах было проведено исследование фармакокинетики препарата на основе НТП-*L*-arg в нескольких дозовых режимах.

*2.5.2 Дизайн исследования фармакокинетики препарата ряда «Дезаза-Триазавирина»**

В исследование были включены здоровые добровольцы обоего пола в возрасте от 18 до 45 лет, подписавшие информированное согласие. Основными критериями исключения являлись: беременность или кормление грудью; наличие острых и хронических заболеваний; сопутствующая терапия; недавнее участие в каком-либо клиническом исследовании.

В исследовании оценивали параметры фармакокинетики препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» указанные в таблице 2.5.3.

* Работа выполнялась совместно с ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России в рамках I фазы клинических исследований на основании разрешения № 250 на проведение клинического исследования от 12 апреля 2016 г., выданного Министерством здравоохранения Российской Федерации, и выписки из протокола № 120 заседания совета по этике от 01 марта 2016 г.

Таблица 2.5.3 – Оцениваемые параметры фармакокинетики

Наименование	Обозначение	Формула расчета	Единица измерения
C_{max}	максимальная концентрация	из графика	мкг/мл
T_{max}	время достижения максимальной концентрации	из графика	ч
k_{el}	константа элиминации	из графика, линейная регрессия по трем последним точкам кривой	ч ⁻¹
$T_{1/2}$	период полувыведения	$0,693/k_{el}$	ч
AUC_{0-t}	площадь под кривой концентраций за время наблюдения	$AUC = \int_0^t C dt$	мкг*ч/мл
$AUC_{0-\infty}$	площадь под кривой концентраций, экстраполированная до бесконечного времени	$AUC = \int_0^{\infty} C dt$	мкг*ч/мл
C_{min}	минимальная концентрация	из графика	мкг/мл
f_c	фактор кумуляции	AUC_2/AUC_1	-
f_c predicted	предсказанный фактор кумуляции	$-e^{-k_{el} \Delta t}$ Δt – интервал дозирования	-
f_e	фракция, выводимая в неизменном виде	общее количество выведенного вещества/доза	-
CL_R	почечный клиренс	общее количество выведенного вещества/AUC	мл/мин

В ходе исследования проводились следующие лабораторно-инструментальные обследования: общий анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи – в день скрининга и на 1, 5, 27, 34, 62 и 69 дни исследования, ЭКГ в 12 стандартных отведениях – в день скрининга и на 33 и 68 дни исследования, измерение АД, ЧСС – в день скрининга и на 1-5, 27, 28, 34-38, 62, 63, 69-73 дни исследования. Исследование включало 3 этапа: изучение фармакокинетики и переносимости при однократном приеме «Дезаза-Триазавирина»; при многократном режиме дозирования (добровольцы принимали препарат ежедневно однократно в течение 7 дней); при многократном режиме дозирования с увеличением кратности приема и суточной дозы препарата. В целом было проанализировано 11 схем приема препарата «Дезаза-Триазавирина» с эскалацией суточных доз от 300 мг до 1200 мг.

I этап. Изучение однократной дозы.

Изучение однократной дозы препарата 300, 600, 900 или 1200 мг проводили единообразно во всех группах следующим образом:

Накануне исследования субъекты не принимали пищи в течение как минимум 10 часов. Утром в день исследования они были госпитализированы в исследовательский центр. После общего врачебного осмотра, регистрации ЭКГ и АД участникам исследования устанавливали катетер в кубитальную вену, производили забор крови (3 мл) в полимерную пробирку с гепарином. Субъекты принимали препарат, запивая капсулы 200 мл простой воды. Через час они принимали стандартный завтрак. Забор образцов крови (3 мл) производили через установленный периферический катетер в полимерные пробирки с гепарином. Время забора составило 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 8; 12; 24; 48; 72; 96 ч. Одновременно производили сбор мочи в следующие интервалы времени: 0-4 ч; 4-8 ч; 8-12 ч; 12-24 ч. Регистрировали объем мочи в каждый из указанных промежутков, производили отбор 5 мл мочи для последующего анализа. Субъекты получали стандартный обед после забора 4-х часовой пробы, и ужин через 9 часов после начала исследования. После забора 12-ти часовой пробы катетер извлекали из вены. После забора 24 часовой пробы субъекты покидали исследовательский центр. Последующие визиты осуществляли на 3 и 4, и 5 день исследования, производили забор крови на определение концентрации изучаемого вещества, общий осмотр и регистрацию любых возникших жалоб или изменения клинических показателей.

К введению более высокой дозы приступали только после получения доказательств удовлетворительной переносимости предыдущей дозы.

II этап. Изучение многократного введения 1 раз в сутки.

Участники исследования посещали исследовательский центр на 28 день после приема однократной дозы препарата. После общего врачебного осмотра, регистрации ЭКГ и АД производили забор крови и мочи на определение исходных лабораторных показателей безопасности. Субъекты принимали препарат, запивая капсулы 200 мл простой воды, и продолжали принимать препарат ежедневно в то же время дня до 34 дня исследования, регистрируя любые изменения состояния здоровья. Накануне они госпитализировались в исследовательский центр. На 34 день осуществлялся общеврачебный осмотр, регистрация ЭКГ и АД, забор мочи и крови для определения лабораторных показателей безопасности, устанавливали кубитальный катетер, через который забирали кровь для изучения фармакокинетики таким же образом, как на предыдущем этапе. После забора 24 часовой пробы субъекты уходили из исследовательского центра. Повторные визиты осуществляли на 36, 37 и 38 день исследования, производили забор крови на определение концентрации

изучаемого вещества, общий осмотр и регистрацию любых возникших жалоб или изменения клинических показателей.

III этап. Изучение многократного введения 2 и 3 раза в сутки.

Участники исследования посещали исследовательский центр на 28 день после последнего приема однократной дозы препарата. После общего врачебного осмотра, регистрации ЭКГ и АД производили забор крови и мочи на определение исходных лабораторных показателей безопасности. Субъекты принимали утреннюю дозу препарата, запивая капсулы 200 мл простой воды, и продолжали принимать ежедневно в установленном режиме (2 или 3 раза в день), продолжая прием до 34 дня исследования, регистрируя любые изменения состояния здоровья. Накануне они госпитализировались в исследовательский центр. На 34 день осуществляли общеврачебный осмотр, регистрацию ЭКГ и АД, забор мочи и крови для определения лабораторных показателей безопасности, устанавливали кубитальный катетер, через который забирали кровь для изучения фармакокинетики таким же образом, как на предыдущем этапе. Забор крови осуществляли, начиная с момента перед приемом утренней дозы препарата. После забора 24 часовой пробы субъекты могли уйти из исследовательского центра. После этого они посещали исследовательский центр на 36, 37 и 38 день исследования, где производился забор крови на определение концентрации изучаемого вещества, общий осмотр и регистрация любых возникших жалоб или изменения клинических показателей.

На каждый следующий этап с увеличением дозы, добровольцы переходили в случае удовлетворительной переносимости и установленной безопасности на предыдущем этапе. Период «отмывания» между этапами введения препарата составлял 4 недели (5 периодов полувыведения).

Средняя продолжительность участия в исследовании для когорт I, II и III составила 73 дня, для когорты IV – 38 дней.

Учитывая стандартную предполагаемую вариабельность изучаемых параметров в исследовании включено 40 здоровых волонтеров, подписавших информированное согласие на участие. Субъекты были рандомизированы в одну из четырех групп по 10 человек в каждой. Период полувыведения у человека, экстраполированный на основе данных, полученных у животных, по формуле $T_{1/2чел} = (M_{чел}/M_{жив}) * 0,25 * T_{1/2жив}$ составляет порядка 23 ч для основной фазы убывания, и около 150 ч для остаточной фазы убывания. Учитывая наличие длительной остаточной фазы убывания, период «отмывания» между этапами введения препарата составил 4 недели (5 периодов полувыведения). Каждый этап с увеличением дозы проводили после завершения наблюдения введения меньшей дозы с целью убедиться в ее безопасности и удовлетворительной переносимости.

Забор крови для фармакокинетического анализа

При изучении фармакокинетических параметров образцы крови получали в следующие временные точки: 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 8; 12; 24; 48; 72; 96 ч после приема препарата, а также фоновые показатели крови (до приема препарата – точка 0). Сбор мочи проводился у добровольцев на этапе 1 в следующие интервалы времени: 0-4 ч; 4-8 ч; 8-12 ч; 12-24 ч. В каждый из указанных промежутков времени регистрировался объем мочи. Таким образом, забор проб для фармакокинетики проводился следующим образом: на 1 этапе – кровь и моча, на 2 и 3 этапах – только кровь.

Изучение безопасности и переносимости

Основными показателями безопасности и переносимости являлись - частота возникновения и тип нежелательных явлений, их тяжесть и связь с приемом препарата, динамика лабораторных и инструментальных показателей.

Изучение фармакокинетических параметров

Препарат определяли в плазме крови и моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Хроматографический анализ проводили на хроматографической колонке Phenomenex Luna C18 (2), 150x2,00 мм, 5 мкм при температуре 28 °С и предколонке Eclipse XDB-C18 4,6*12,5 мм, 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь 50 мМ фосфатный буферный раствор рН 4,67 – ацетонитрил, градиентная система с увеличением процента ацетонитрила от 5% на старте до 20% на 7 минуте. Время хроматографирования составляло 18 мин. УФ-детектирование проводили при длине волны 210±1,2 нм. Время удерживания НТП-*L*-arg составило около 8,8 мин.

В ходе исследования оценивались следующие фармакокинетические параметры - максимальная концентрация (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (T_{max}), константа элиминации (k_{el}), период полувыведения ($T_{1/2}$), площадь под кривой концентраций за время наблюдения (AUC_{0-t}), площадь под кривой концентраций, экстраполированная до бесконечного времени ($AUC_{0-\infty}$), минимальная концентрация (C_{min}), фактор кумуляции (f_c), фракция, выводимая в неизменном виде (f_e), почечный клиренс (CLR).

Статистический анализ

Статистическая обработка полученных данных была выполнена с использованием непараметрических и параметрических методов.

Для статистического анализа результатов принят уровень значимости 5% и мощность используемых критериев 80%. Описательная статистика измеряемых показателей содержит следующие значения: минимальные и максимальные значения, среднее, медиана, межквартильный размах.

Оценка клинико-лабораторных показателей внутри и между когортами на всех этапах исследования проведена с помощью критерия Краскелла-Уоллиса или критерия Фридмана с соответствующими апостериорными критериями. Категориальные данные описаны с помощью процентных соотношений и абсолютных значений. Сравнение категориальных данных проводилось с помощью точного критерия Фишера. Анализ выполнен с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics версии 21 для персонального компьютера.

Для анализа фармакокинетических параметров использовались методы линейной и нелинейной регрессии, анализа интегральных моментов, параметрических и непараметрических анализов парных и непарных наблюдений соответственно характеру данных. Анализ был выполнен с помощью программного обеспечения Statistica, Excell и GraphPadPrizm. Были представлены статистические характеристики максимальных, минимальных и средних величин с указанием интервала стандартной ошибки или процентилей в зависимости от характера данных. Принимаемый уровень вероятности для отвержения нулевой гипотезы установлен при $p < 0,05$.

2.5.3 Результаты исследования фармакокинетики препарата ряда «Дезаза-Триазавирина»

Проведена оценка переносимости, безопасности и фармакокинетики препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» на примере НТП-*L-arg* при использовании 11 схем приема препарата с эскалацией суточных доз от 300 мг до 1200 мг. Режим дозирования препарата составил 1, 2 и 3 раза в сутки.

Безопасность

В ходе проведенного исследования установлена безопасность и хорошая переносимость препарата ряда «Дезаза-Триазавирин» на примере НТП-*L-arg*.

Средние суммарные дозы на добровольца составили: в когорте I - 6600 мг, в когорте II - 11100 мг, в когорте III - 15600 мг, в когорте IV - 9600 мг. Все когорты добровольцев получали «Дезаза-Триазавирин» в нарастающих дозировках (максимальная разовая доза – 1200 мг, максимальная суточная доза 1200 мг, максимальная курсовая доза – 8400 мг).

Не установлено достоверной статистической связи между приемом препарата, нежелательными клиническими явлениями и изменениями лабораторных показателей. В ходе исследования было отмечено 53 клинических нежелательных явления, из которых, 25 нежелательных явлений зафиксированы в когорте I, 13 – в когорте II, 9 – в когорте III, 6 – в когорте IV. Все нежелательные явления были легкой степени тяжести, носили транзиторный характер и не требовали отмены препарата или проведения дополнительной терапии. В

процессе исследования не было зафиксировано ни одного серьезного нежелательного явления.

Среди зафиксированных нежелательных явлений (НЯ), явления с возможной/вероятной связью с приемом препарата распределились по когортам следующим образом: в когорте I – 15 НЯ с возможной связью с приемом препарата ($n_{\text{общее}}=25$); в когорте II – 6 НЯ с вероятной связью с приемом препарата ($n_{\text{общее}}=13$); в когорте III – 4 НЯ с возможной/вероятной связью с приемом препарата ($n_{\text{общее}}=9$); в когорте IV – 1 НЯ с возможной связью с приемом препарата ($n_{\text{общее}}=6$).

При этом необходимо отметить, что связи нежелательных явлений с увеличением дозы препарата не выявлено. Наибольшее количество случаев нежелательных явлений отмечено в когорте I, где доза препарата при всех трех схемах введения была минимальной.

Таким образом, за все время проведения исследования, по причинно-следственной связи нежелательных явлений с приемом препарата, нежелательные явления распределены следующим образом – вероятная связь ($n=8$), возможная связь ($n=18$), сомнительная связь ($n=18$), не связанные с приемом препарата ($n=9$).

Все нежелательные явления можно разделить на группы – гастроинтестинальные ($n=23$), респираторные ($n=4$), неврологические ($n=23$), кожные ($n=1$), сердечно-сосудистые ($n=1$), другие ($n=1$).

Среди нежелательных клинических явлений были отмечены: головная боль ($n=21$), боли в животе ($n=10$), диарея (неоформленный стул до 2х раз в сутки) ($n=5$), тошнота ($n=3$), потеря аппетита ($n=3$), слабость ($n=2$), заложенность в ушах ($n=1$), сердцебиение ($n=1$), чувство жажды ($n=1$), метеоризм ($n=1$), кожный зуд ($n=1$), катаральные явления (заложенность носа, насморк, боли в горле) ($n=4$).

Статистически значимых различий между количеством нежелательных явлений, дозами и схемами приема препарата выявлено не было (для нежелательных явлений с вероятной связью двусторонняя значимость точного критерия Фишера $p>0,999$, с возможной связью - $p=0,392$).

Таким образом, частота и характер нежелательных явлений не имели значимых различий в зависимости от когорт, схем применения и дозировок препарата.

Изучение изменений лабораторных показателей в разных когортах и при сравнении когорт между собой, не позволило установить определенных тенденций. Колебания величин лабораторных показателей не выходили за пределы физиологических норм ни в одной из 11 испытанных схем применения препарата.

Анализ совокупности данных показал, что НТП-L-arg не вызывал каких-либо изменений общеклинического статуса добровольцев, не нарушал функциональной

активности систем организма, не оказывал негативного влияния на оцениваемые параметры (ЭКГ, АД, ЧСС, температура тела).

Таким образом, применение препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» на основе АФС НТП-*L*-arg не оказывало патологического влияния на состояние жизнеобеспечивающих органов и систем организма, было безопасно и хорошо переносилось всеми участниками исследования.

Фармакокинетические параметры при однократном приеме препарата

Кривая убывания концентраций препарата после приема однократной дозы 300 мг была нелинейной и характеризовалась двумя фазами убывания. Период полувыведения в 1 фазе составлял 4,3 ч, во второй – 14 ч. Максимальные значения концентрации регистрировались в среднем через 4 ч, и составляли 0,07 мкг/мл (медиана). В половине случаев наблюдался второй равноценный пик концентраций в интервале 12 – 72 ч, с медианным значением 0,09 (от 0,06 до 0,2) мкг/мл. Усредненная кривая представлена на рисунке 2.5.5.

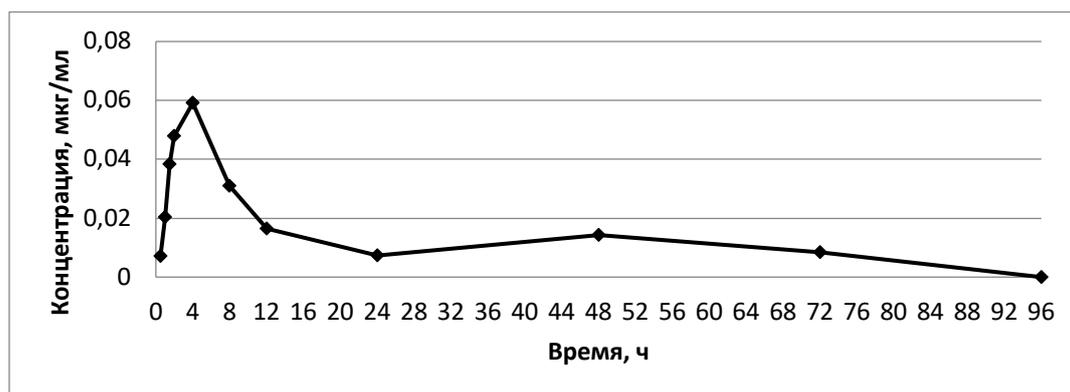


Рисунок 2.5.5 – Кривая убывания концентраций АФС ряда «Дезаза-Триазавирина» (НТП-*L*-arg) после приема однократной дозы 300 мг

Среднее время удерживания составило 39 ч. Начальная фаза абсорбции была быстрой, коэффициент в несколько раз превышал соответствующий коэффициент фазы элиминации, однако затем всасывание, вероятно, замедлялось, уравниваясь со скоростью элиминации. Общий плазменный клиренс составил в среднем 219 л/ч, что подтверждает преобладание элиминации над всасыванием. Соответственно, значение кажущегося объема распределения также в среднем составило 4379 л.

При приеме препарата в дозе 600 мг (рисунок 2.5.6) максимальная концентрация увеличилась пропорционально увеличению дозы, но достигалась несколько раньше, одновременно увеличивалась скорость убывания концентраций в 1 фазе, во второй –

оставалась в целом неизменной. Пропорционально дозе увеличивалось значение площади под кривой. Клиренс и кажущийся объем распределения примерно не изменялись.

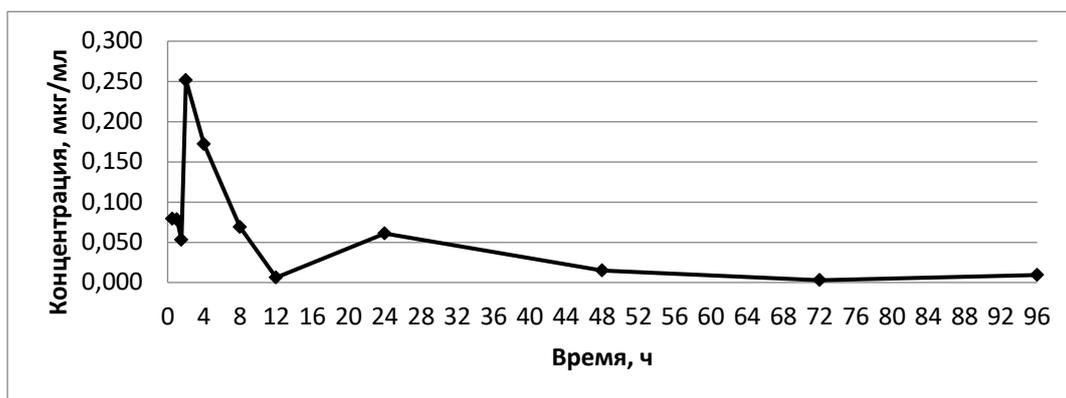


Рисунок 2.5.6 – Кривая убывания концентраций АФС ряда «Дезаза-Триазавирин» (НТП-*L*-arg) после приема однократной дозы 600 мг

При увеличении однократной дозы НТП-*L*-arg до 900 мг (рисунок 2.5.7), оба пика концентраций сдвигались во времени к началу. Максимум концентраций, также как значения площади под кривой увеличивались пропорционально дозе. Коэффициент элиминации на хвосте распределения не изменялся, незначительно уменьшались значения плазменного клиренса и кажущегося объема распределения.

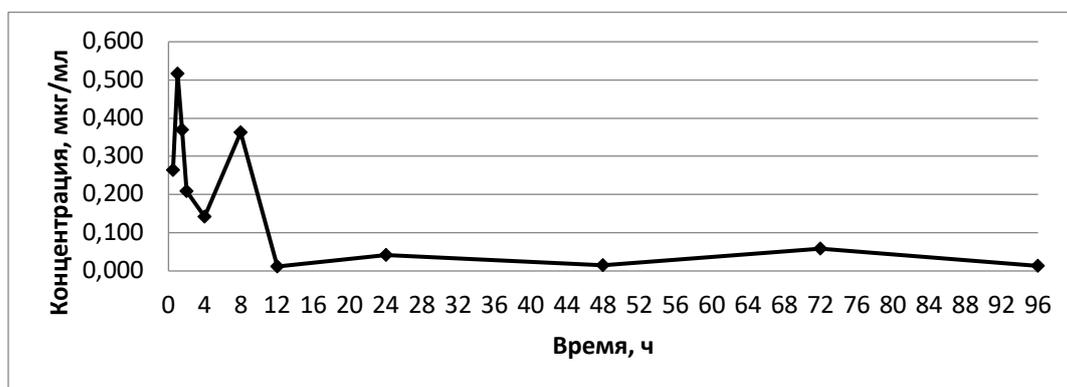


Рисунок 2.5.7 – Кривая убывания концентраций АФС ряда «Дезаза-Триазавирин» (НТП-*L*-arg) после приема однократной дозы 900 мг

При увеличении разовой дозы до 1200 мг начальная фаза абсорбции максимально сокращалась, средний максимум концентраций наблюдался около 3 ч, максимальное значение увеличивалось пропорционально дозе (рисунок 2.5.8). Вторая фаза убывания нивелировалась, соответственно, период полувыведения и среднее время удерживания уменьшались до значений 1 фазы.

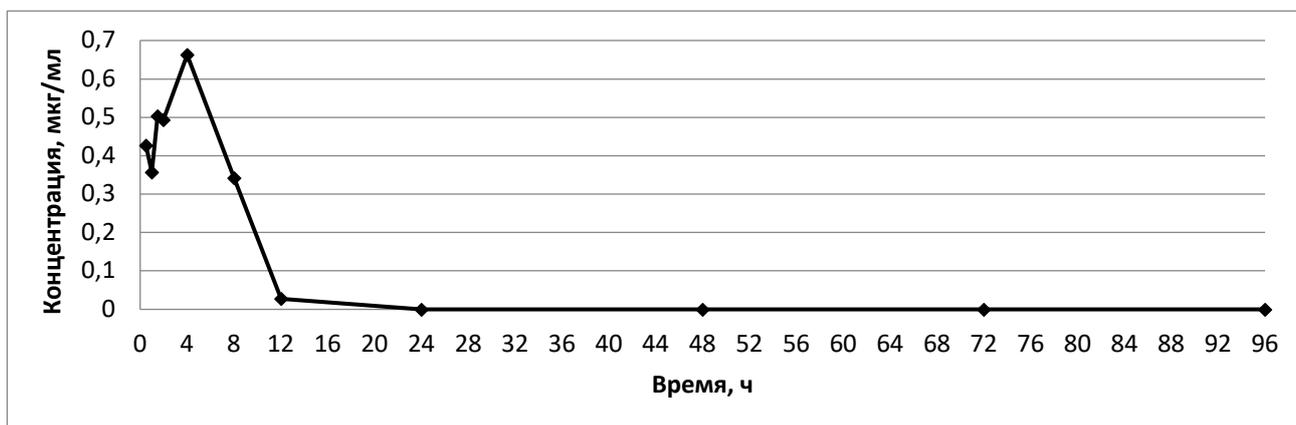


Рисунок 2.5.8 – Кривая убывания концентраций АФС ряда «Дезаза-Триазавирина» (НТП-*L*-arg) после приема однократной дозы 1200 мг

Оценка клиренса

С мочой при приеме препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» – НТП-*L*-arg – в дозе 300 мг в течение 24 ч в неизменном виде выделялось от 9 до 26% принятой дозы, в среднем – 16%. Соответственно, почечный клиренс составил в среднем (медиана) 63 л/ч. При увеличении дозы препарата до 600 мг, количество выведенного в неизменном виде с мочой препарата варьировалось от 11 до 32% (в среднем 23%). Основная часть, как и при приеме 300 мг, выводилась в интервале 4-8 ч. При приеме 900 мг однократно процент выводимого с мочой вещества несколько увеличивался (8-55%, в среднем – 32%). Необходимо отметить, что при увеличении дозы до 1200 мг общее количество, выведенного с мочой препарата не увеличилось, что подтверждает предположение о лимитировании всасывания в этой дозе. На рисунке 2.5.9 представлена динамика выделения НТП-*L*-arg с мочой при приеме однократной дозы во всех когортах.

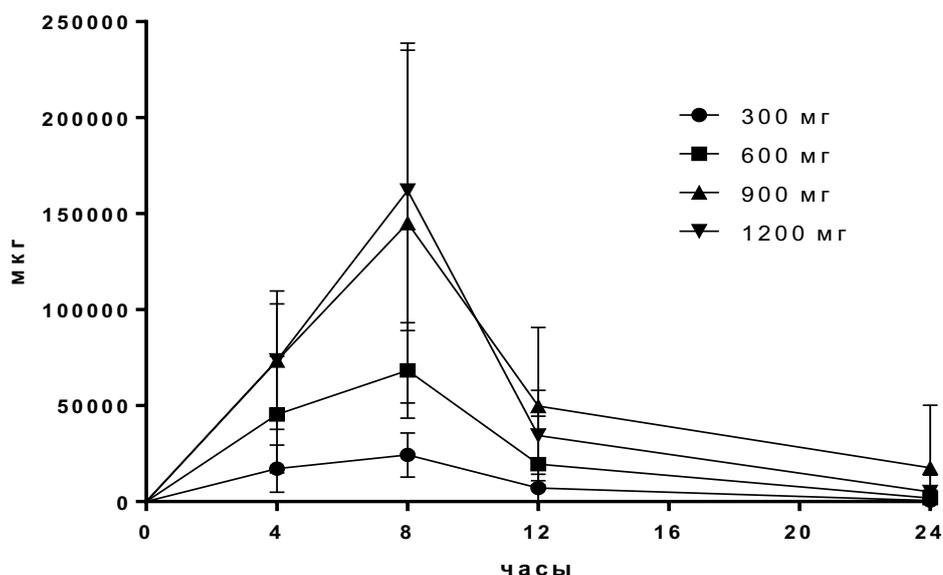


Рисунок 2.5.9 – Динамика выделения НТП-*L*-arg с мочой

Фармакокинетические параметры при многократном и длительном приеме

При многократном введении в дозе 300 мг в сутки препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» на основе АФС НТП-*L*-arg кумулировал (рисунок 2.5.10), среднее значение фактора кумуляции составило 5,3 (от 1,2 до 7,5). Максимальная концентрация была в 6 раз выше, чем при однократном приеме, и достигалась раньше. Несколько ускорилось убывание в первой фазе. Значение плазменного клиренса достоверно снижалось.

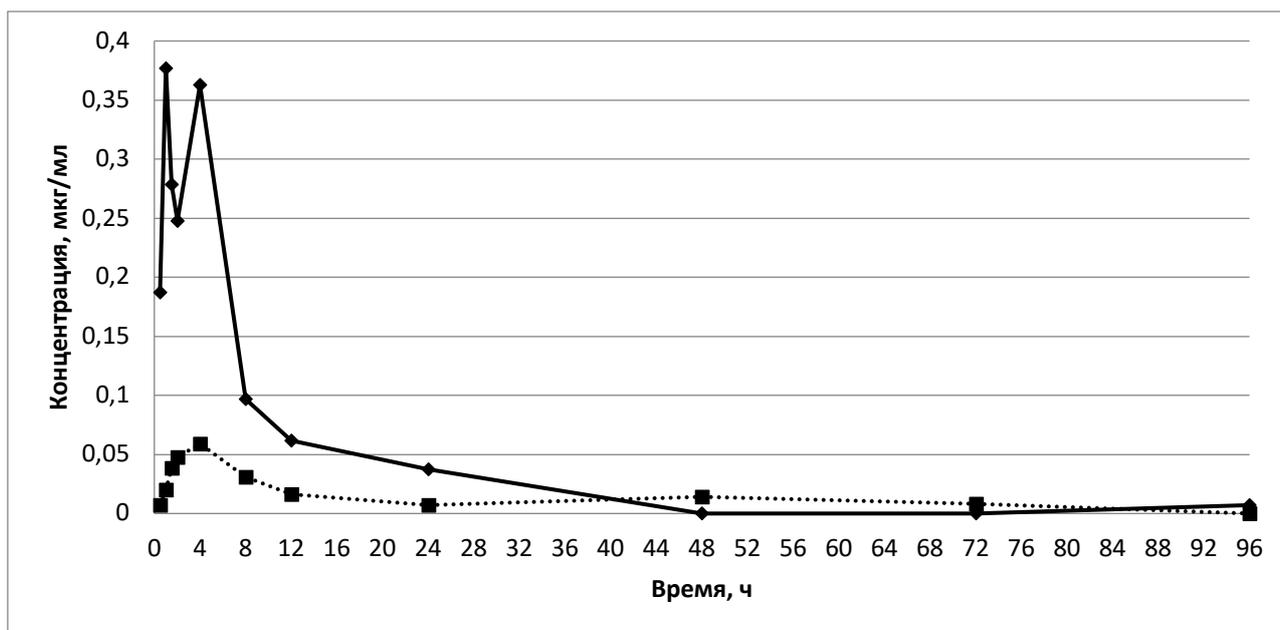


Рисунок 2.5.10 – Кривые убывания концентраций АФС ряда «Дезаза-Триазавирина» (НТП-*L*-arg) при однократном (прерывистая линия) и многократном (сплошная линия) приеме в дозе 300 мг

При многократном приеме препарата в дозе 600 мг 1 раз в сутки площадь под фармакокинетической кривой также незначительно увеличивалась (рисунок 2.5.11). Медиана значения фактора кумуляции составила 1,7 (от 0,24 до 8,9). Максимальные значения достигались дважды, как и в случае однократного приема, но происходило это раньше – в первый раз через 0,5-1,5 ч после введения, во второй – через 4-8 ч. Значения C_{max} , а также других показателей фармакокинетики, значимо не изменялись. В целом, как и для дозы 300 мг отмечался сдвиг обоих пиков концентраций влево и, как следствие сокращение общего времени удержания препарата в организме.

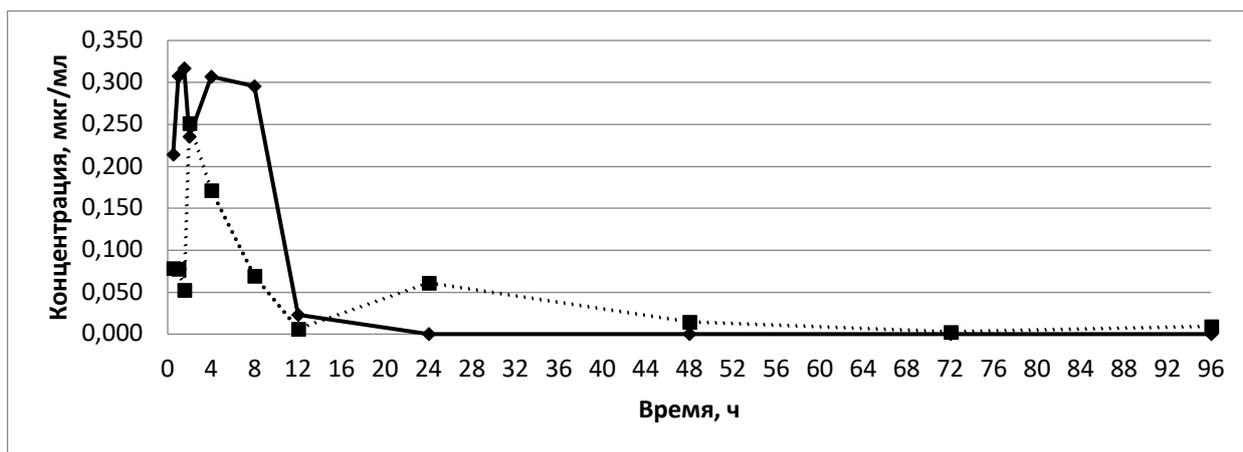


Рисунок 2.5.11 – Кривые убывания концентраций АФС ряда «Дезаза-Триазавирин» (НПТ-*L*-arg) при однократном (прерывистая линия) и многократном (сплошная линия) приеме в дозе 600 мг

При приеме 600 мг препарата (300 мг 2 раза в день), достигались такие же максимальные концентрации, как и при приеме его в дозе 600 мг один раз в сутки (рисунок 2.5.11, 2.5.12). Второй пик концентраций достигался раньше (в среднем через 4 ч). Вторая фаза убывания концентраций практически не наблюдалась, период полувыведения в среднем составил 1,2 ч, что совпадало с соответствующим значением при приеме НПТ-*L*-arg в дозе 600 мг 1 раз в сутки, и длительном приеме его в дозе 300 мг. Площади под фармакокинетической кривой были существенно ниже, чем при приеме 600 мг 1 раз в сутки. При этом скорость элиминации препарата ряда «Дезаза-Триазавирин» на основе НПТ-*L*-arg из плазмы существенно не изменялась, не наблюдалось кумуляции, напротив, C_{max} были снижены по сравнению с многократным приемом 1 раз в сутки.

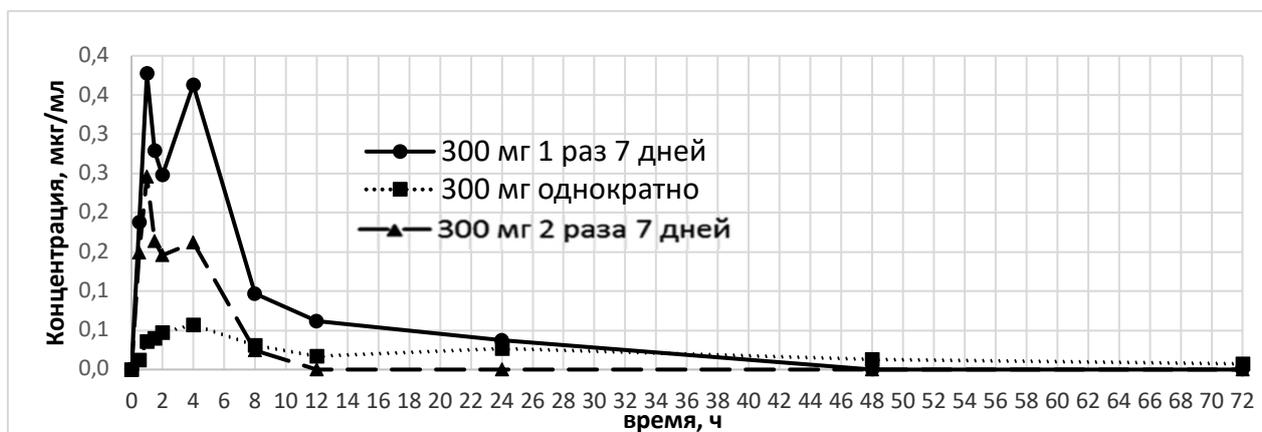


Рисунок 2.5.12 – Кривые убывания концентраций АФС ряда «Дезаза-Триазавирин» (НПТ-*L*-arg) при приеме в дозе 300 мг однократно, 300 мг 1 раз в сутки 7 дней, и 300 мг 2 раза в сутки 7 дней

При длительном приеме препарата в дозе 900 мг в сутки значения максимальной концентрации и время ее достижения значимо не изменялись (рисунок 2.5.13). Вторая фаза элиминации нивелировалась, первая характеризовалась такой же константой, как при однократном приеме. Площадь под фармакокинетической кривой имела тенденцию к снижению, в основном за счет отсутствия повторного появления препарата в крови через 11-12 ч (второй пик концентраций).

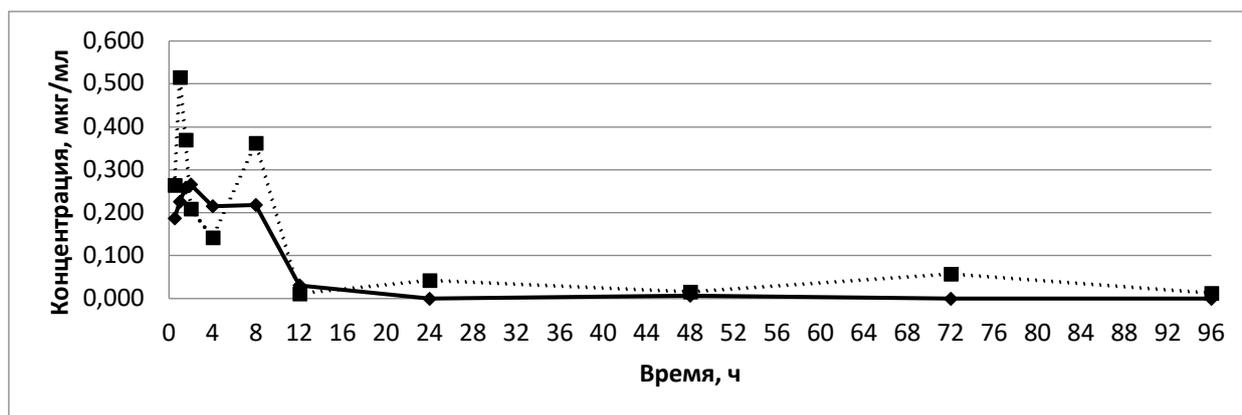


Рисунок 2.5.13 – Кривые убывания концентраций АФС ряда «Дезаза-Триазавирин» (НТП-*L*-arg) при однократном (прерывистая линия) и многократном (сплошная линия) приеме в дозе 900 мг

При дозировании 900 мг препарата в 3 приема по 300 мг кривая концентраций после каждого приема характеризовалась такими же значениями T_{max} , C_{max} и AUC, как после ежедневного приема препарата в дозе 900 мг 1 раз в сутки. Однако, благодаря подобным подъемам концентраций 3 раза в сутки, представляется, что этот режим обеспечивает наиболее стабильные концентрации препарата в крови наибольшую продолжительность времени без кумуляции (рисунок 2.5.13, 2.5.14).

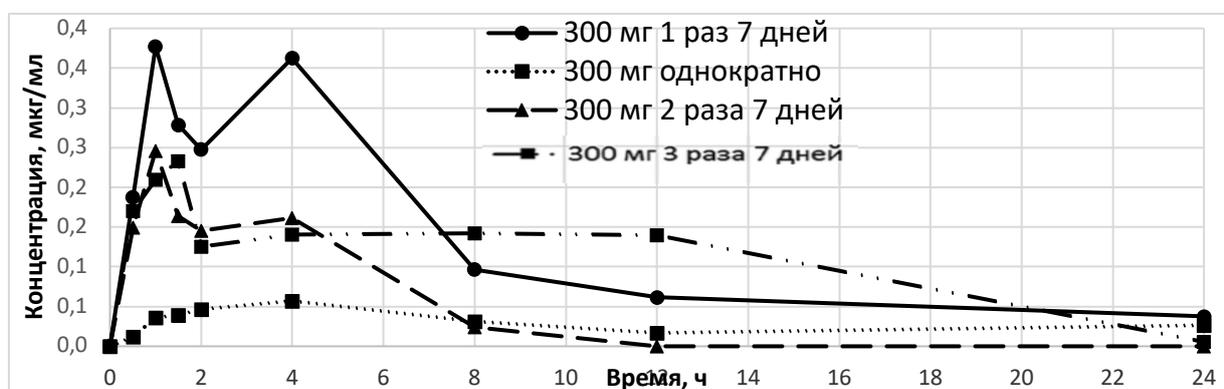


Рисунок 2.5.14 – Кривые убывания концентраций АФС ряда «Дезаза-Триазавирин» (НТП-*L*-arg) в разных режимах приема дозы 300 мг

При длительном приеме препарата в дозе 1200 мг в сутки значения максимальной концентрации и время ее достижения значимо не изменялись (рисунок 2.5.15).

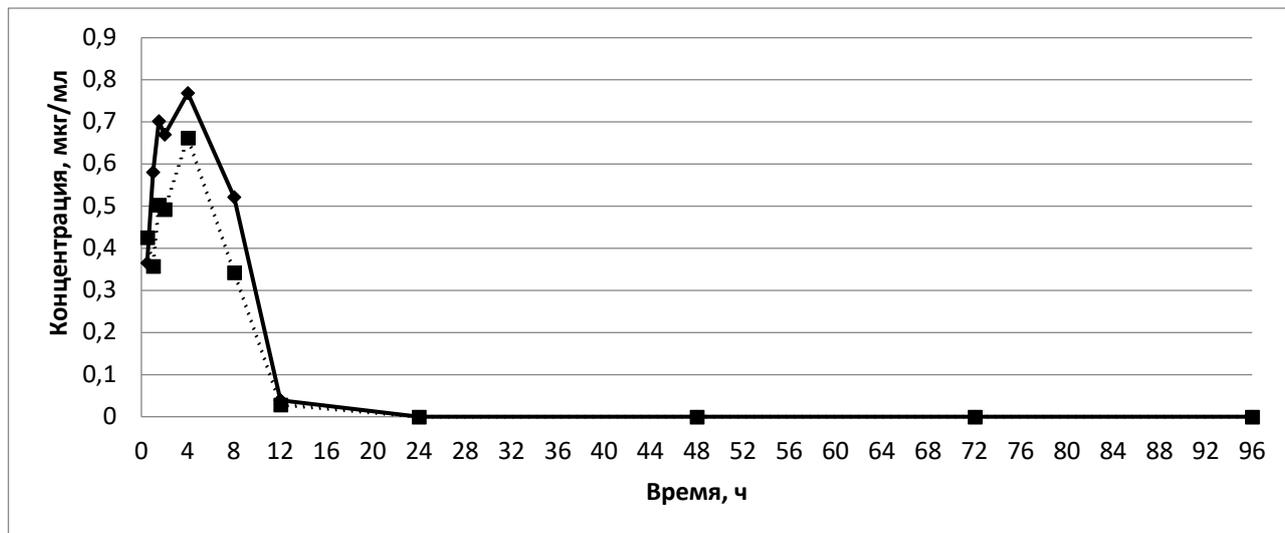


Рисунок 2.5.15 – Кривые убывания концентраций АФС ряда «Дезаза-Триазавирина» (НТП-*L*-arg) при однократном (прерывистая линия) и многократном (сплошная линия) приеме в дозе 1200 мг в сутки

Таким образом, по сравнению с данными, полученными при однократном приеме препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» в дозах 300, 600, 900 и 1200 мг, при многократном приеме в тех же дозах исчезали различия во времени достижения и величине максимальной концентрации, а также в значениях площади под фармакокинетической кривой и среднего времени удержания. Рассчитанный фактор кумуляции отмечен только для дозы 300 мг, в остальных дозах кумуляции практически не наблюдалось. Минимальным в дозе 300 мг был общий плазменный клиренс препарата, тогда как при более высоких дозах его значения значимо не различались. Отмечалась тенденция к снижению скорости всасывания при длительном приеме и при увеличении дозы, выраженной в значении константы абсорбции, однако статистической значимости эти различия не достигли, вероятно, в силу большого приближения в расчетах.

Обсуждение результатов исследования фармакокинетики препарата ряда «Дезаза-Триазавирина»

При анализе фармакокинетических параметров было показано, что при приеме внутрь препарат ряда «Дезаза-Триазавирина» на основе АФС НТП-*L*-arg быстро всасывается и обнаруживается в крови уже через 0,5 ч. Отмечается несколько пиков концентраций. Максимальные концентрации с увеличением дозы возрастают прямо пропорционально, и составляют в среднем 0,1 мкг/мл в дозе 300 мг, 0,3 мкг/мл в дозе 600 мг, 0,6 мкг/мл в дозе

900 мг, и 0,8 мкг/мл в дозе 1200 мг. С увеличением суточной дозы максимальная концентрация достигается раньше. Так, при однократном приеме 300 мг препарата время достижения максимальной концентрации составляет в среднем 4 ч, при длительном приеме – 1 ч, также, как и в дозах 900 и 1200 мг. Убывание концентраций в плазме носит двухфазный характер, в первой фазе период полувыведения составляет от 1,5 до 4 ч, во второй – 11-13 ч. Сразу после появления в плазме препарат интенсивно выводится почками в неизменном виде, в среднем – 30% независимо от доз. Относительное уменьшение выведения отмечается после приема 1200 мг АФС ряда «Дезаза-Триазавирина» – НТП-*L-arg*. Большая часть препарата выводится в интервале 4-8 ч.

При длительном применении в дозах 300 и 600 мг наблюдается некоторое увеличение площади под кривой (коэффициент кумуляции 5 и 1,7 соответственно), в дозах 900 и 1200 мг нарастания значения АUC (кумуляции) не отмечается. Коэффициент абсорбции при длительном применении снижается. Также при длительном приеме не регистрировалась вторая фаза элиминации, и общий период полувыведения составлял в среднем в 1,5-2 ч во всех дозах. Благодаря этому прием препарата несколько раз в сутки не приводил к кумуляции, но обеспечивал более длительное нахождение вещества в плазме. Клиренс и кажущийся объемы распределения были значительными независимо от дозы.

В целом, полученные данные говорят о лимитировании нарастания концентраций с увеличением дозы при длительном приеме, что делает в случае кратности приема более 1 раза целесообразным принимать препарат в дозе не выше 600 мг. Из числа кратных режимов введения наиболее стабильные концентрации создают режимы приема 300 мг 3 раза в сутки и 300 мг 2 раза в сутки. Поэтому, для дальнейших исследований именно эти режимы представляются наиболее целесообразными.

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлена безопасность и хорошая переносимость препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» на основе АФС НТП-*L-arg*. Изучение фармакокинетики препарата показало, что после приема внутрь препарат быстро всасывается и обнаруживается в крови уже через 0,5 ч. Максимальные концентрации с увеличением дозы возрастают прямо пропорционально. С увеличением суточной дозы максимальная концентрация достигается раньше. Убывание концентраций в плазме носит двухфазный характер, в первой фазе период полувыведения составляет от 1,5 до 4 ч, во второй – 11-13 ч. Анализ различных режимов приема препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» на основе АФС НТП-*L-arg* показывает, что из числа кратных режимов введения наиболее стабильные концентрации создают режимы приема 300 мг 3 раза в сутки и 300 мг 2 раза в сутки.

Сводные результаты показателей фармакокинетики препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» на основе АФС НТП-*L-arg* при различных дозировках и режимах приема представлены в таблице 2.5.4.

Таблица 2.5.4 – Сводные результаты показателей фармакокинетики препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» при приеме внутрь однократно и в течение недели

Показатель	300 мг		600 мг		900 мг		1200 мг	
	1 день	7 дней	1 день	7 дней	1 день	7 дней	1 день	7 дней
T_{max} (ч)	4	1	3	1	1	1	1,25	1
C_{max} (мкг/мл)	0,1	0,45	0,3	0,4	0,59	0,41	0,77	0,79
kel_1 (ч ⁻¹)	0,16	0,4	0,43	0,6	0,31	0,35	0,42	0,6
$T_{1/2_1}$ (ч)	4,3	1,7	1,6	1,2	2,2	2,2	1,7	1,5
kel_2 (ч ⁻¹)	0,05	0,05	0,06	-	0,06	-	-	-
$T_{1/2_2}$ (ч)	14	13,9	11,6	-	11,6	-	-	-
AUC_{0-t} (мкг*ч/мл)	1,2	4,7	2,88	3	5,41	2,5	4,70	6,3
$AUC_{0-\infty}$ (мкг*ч/мл)	1,37	3,5	2,92	3	5,48	2,5	4,70	6,3
$AUMC_{0-t}$ (мкг*ч ² /мл)	37,4	23	65,1	16	167	22	23,11	31,4
$AUMC_{0-\infty}$ (мкг*ч ² /мл)	53,5	54	68,9	16	172	22	23,11	31,4
MRT (ч)	39	4,5	23,6	5,7	22	7,8	4,5	4,5
Cl/F (доза/ AUC) (л/ч)	219	63	205	203	177,4	402	251	202
Vd/F (Cl/keI) (л)	4379	1714	3425	297	2359	862	634	441
K_a (ч ⁻¹)	0,72	2,3	1	0,3	2,8	0,6	2,3	0,35

2.6 Рецептúra готовой лекарственной формы препарата ряда «Дезаза-Триазавирина»*

Наибольшей проблемой при выборе рецептуры готовой капсулы препарата ряда «Дезаза-Триазавирин» является высокая электростатичность порошка 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1b**, способная приводить к налипанию субстанции на поверхностях оборудования и неравномерному дозированию субстанции ряда «Дезаза-Триазавирина» в капсулы. Для решения данной проблемы предложено проводить влажное гранулирование субстанции с дальнейшим дозированием полученного гранулята в капсулы.

Ниже представлен предложенный состав готовой лекарственной формы препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» (таблица 2.6.1).

* Работа выполнена совместно с к.фарм.н. Главатских С.А. (ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России)

Таблица 2.6.1 – Состав готовой лекарственной формы препарата

Состав:	г	%
5-Метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидинид <i>L</i> -аргининия моногидрат 1d	0,100	50,00
Вспомогательных веществ:		
Целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ)	0,076	38,00
Гипролоза низкозамещенная (ГПМЦ)	0,002	1,00
Крахмал кукурузный прежелатинизированный	0,015	7,50
Кроскармеллоза натрия	0,004	2,00
Натрия лаурилсульфат	0,001	0,50
Кремния диоксид коллоидный (аэросил)	0,001	0,50
Магния стеарат	0,001	0,50
Масса содержимого капсулы	0,200	100,00

Краткая технологическая схема для разработанного состава:

1. Приготовление увлажнителя (2% раствор ГПМЦ с натрием лаурилсульфатом).

Рассчитанное количество ГПМЦ и лаурил сульфат загружают в емкость, заливают водой и перемешивают до полного растворения.

2. Тщательно просеянные и отвешенные ингредиенты – АФС НТП-*L*-arg, МКЦ – загружают в емкость (смеситель) и тщательно перемешивают в течение 3-5 мин, увлажняют 2% раствором ГПМЦ с натрия лаурилсульфатом и перемешивают в течение 3-5 мин. Увлажненную массу протирают через сито с размером отверстий 2 мм.

3. Полученные влажные гранулы сушат до остаточной влаги 2%.

4. Сухие гранулы протирают через сито с размером отверстий 1 мм.

5. Полученные гранулы перемешивают с кроскармеллозой натрия в течение 3-5 мин, добавляют стеарат магния и аэросил. Массу перемешивают в течение 3 мин и передают на капсулирование.

ТП 1.1 Просеивание сырья

Перед началом работы внешним осмотром проверяют состояние грохота, пульта управления, просеивающей деки (сита) на отсутствие различного рода повреждений, загрязнений.

Устанавливают деку с соответствующим номером сита для просеиваемого сырья.

Просеивание аэросила, гидроксипропилцеллюлозы, магния стеарата, крахмала, натрия кроскармеллозы проводят через сито с размером отверстий 0,18 мм. Допустимо просеивание сырья вручную, под местным отсосом.

Под каждый из разгрузочных лотков устанавливают контейнеры для сбора просеянного сырья и отсевов. При помощи специальных рукавов соединяют разгрузочные лотки с бункерами-сборниками.

Просев каждого вида сырья производят отдельно. При переходе с одного вида сырья на другой производят зачистку просеивателя, деки с ситом и вспомогательного инструмента от остатков предыдущего продукта с помощью пылесоса или щеток-сметок. Аэросил просеивают после просеивания всех вспомогательных веществ. В случае, если выход просеянного сырья получен выше расчетного (регламентного), то образовавшиеся остатки используют для изготовления следующей серии продукта (следующей непосредственно за производимой) или уничтожают после последней серии продукта.

Включают грохот, последовательно просеивают предварительно отвешенные гидроксипропилцеллюлозу, магния стеарат, крахмал, натрий кроскармеллозу, аэросил. Сырье с помощью совка вручную загружают через люк в рабочую емкость аппарата.

Просеянное сырье, каждое отдельно, собирают в контейнера или в двойные полиэтиленовые пакеты, контейнера закрывают крышками.

На контейнер с сырьем прикрепляют сопроводительную этикетку и передают на следующую стадию. Сырье взвешивают на одну серию.

Отсевы собирают в специальную тару и отправляют в контейнер для отходов.

ТП 2.1 Приготовление увлажнителя

Перед началом работы внешним осмотром проверяют чистоту и целостность емкости, мерника.

Полученный со склада, крахмал (влажность не более 14 %) и натрий лаурилсульфат, отвешивают на весах. Из мерника наливают холодную воду в емкость. При перемешивании переносят предварительно отвешенный натрий лаурилсульфат, а затем крахмал прежелатинизированный. Перемешивание ведут по получения однородной суспензии гомогенного состава.

Приготовленный увлажнитель в емкости, снабженной соответствующей этикеткой передают на стадию ТП 3.

Суспензию крахмала готовят исходя из суточной потребности производства, срок её использования не более суток.

ТП 3.1 Получение влажной массы

Перед началом работы внешним осмотром проверяют чистоту, исправность и правильность сборки смесителя-гранулятора, калибратора их пультов управления и рабочих органов. Проверяют чистоту и целостность контейнеров для полупродукта.

Целлюлозу микрокристаллическую и АФС НТП-*L-arg* делят на загрузки смесителя-гранулятора.

В смеситель-гранулятор загружают порционно отвешенные целлюлозу микрокристаллическую и АФС НТП-*L-arg*. Сухую смесь перемешивают в смесителе-

грануляторе со скоростью вращения импеллера 200 оборотов в минуту в течение 2 минут. По окончании процесса перемешивания через форсунку порционно загружают крахмальную суспензию, полученную со стадии ТП 1. По истечении времени влажную массу выгружают из смесителя-гранулятора и протирают на калибраторе для влажной массы с установленной сеткой 2-3 мм, или вручную. Полученную массу передают для высушивания на сушилку-гранулятор.

ТП 3.2 Получение сухого крахмального гранулята

Сушку влажного гранулята осуществляют на установке псевдосжиженного слоя. Перед началом работы внешним осмотром проверяют чистоту и исправность установки, пульта управления, пневматической транспортной системы, состояние систем обеспечения установки (вентилятора, блока подготовки сжатого воздуха).

Управление работой установки осуществляют с пульта управления.

На пульте управления установки устанавливают режим прогрева рабочей камеры:

- мощность вытяжного вентилятора – 40 %,
- температура входящего воздуха – 70 °С,

Включают установку на прогрев в течение (5-20) минут.

По окончании прогрева устанавливают режим загрузки (мощность вытяжки 80 ÷ 100%). В рабочую емкость сушилки-гранулятора загружают влажную массу, полученную с операции ТП 3.1.

По окончании загрузки массы устанавливают режим высушивания:

- мощность вытяжного вентилятора 60-80 %,
- температура входящего воздуха 70 – 80 °С,
- температура смеси – не более 50 °С.

В данном режиме ведут процесс в течение 45 – 75 мин. По истечении времени снижают мощность вытяжки до 50 –60 %. В данном режиме (температура смеси в процессе сушки не должна превышать 50 °С, температура выходящего воздуха в конце сушки 32,0 – 32,8 °С массу высушивают до остаточной влажности $3 \pm 1\%$).

Контроль за изменением параметров технологического режима осуществляется по приборам на сушилке-грануляторе и показаниям на экране пульта управления.

При массовой доле влаги в грануляте более установленного значения продолжают сушку гранулята в том же режиме, с периодичностью контроля остаточной влажности гранулята от 1 до 5 минут (в зависимости от величины отклонения) до достижения остаточной влажности в грануляте $3 \pm 1\%$.

На период проведения анализа гранулята на остаточную влажность сушилку-гранулятор останавливают.

Высушенный гранулят выгружают в приемную емкость. Полученные сухие грануляты объединяют и направляют на сухое гранулирование (калибровку) на калибратор в котором установлена сетка с размером отверстий 1,0 мм.

Калиброванную сухую гранулированную массу собирают в приемную емкость, взвешивают на весах и передают на ТП 4 для получения массы.

ТП 4.1 Опудривание гранулята

Предварительно взвешенный высушенный и калиброванный сухой гранулят вручную загружают в смеситель. Затем в смеситель загружают предварительно отвешенные на весах просеянные гидроксипропилцеллюлозу, натрий кроскармеллозу, крахмал прежелатинизированный, аэросил, магния стеарат. Массу в смесителе для сухих смесей перемешивают со скоростью 15 об/мин в течение 30 мин.

Допустимо добавлять измельченные таблетки к последующей серии препарата в количестве, не превышающем 3 % от общей загрузки смеси.

Из смесителя отбирают пробы массы для анализа, после чего полученную массу для таблетирования выгружают из смесителя, установленного выгрузочным устройством вниз, в контейнер. Контейнер с массой взвешивают на весах и передают на ТП 7 для капсулирования. Содержание АФС НТП-L-arg должно быть от 45 до 55%.

ТП 5.1 Капсулирование

Перед началом работ по капсулированию проверяют чистоту, целостность используемого оборудования. Капсулирование осуществляется на настольной капсульной машине типа МС в комплектации для капсул № 1. Рабочий процесс является групповым и позволяет в течение одного рабочего цикла заполнить 150 капсул. Производительность устройства в среднем составляет 1500 до 2000 капсул в час.

Наполняют ориентирующее устройство МС-1 избыточным количеством капсул. Встряхивают устройство, чтобы капсулы сориентировались в ячейки. Удаляют лишние капсулы.

Устанавливают устройства МС-1 и МС-2 на ровную поверхность. Откидывают прозрачную верхнюю крышку устройства МС-2, убедившись, что фиксирующие барашки опущены.

На устройстве МС-1 расположены направляющие штифты, а на устройстве МС-2 - два ряда отверстий. Устанавливают ориентирующее устройство МС-2 с помощью штифтов, в первый ряд отверстий.

Нажимают на рычаг привода: капсулы, автоматически ориентируясь крышками вверх, упадут в ячейки на МС-2. В случае застревания капсул между подвижными рамками МС-1 несколько раз нажимают на привод и освобождают капсулы.

Прикрывают верхнюю крышку на МС-2 и, таким образом, подравнивают капсулы в ячейках. Повторяют операцию ориентации капсул, переставляя ориентирующее устройство МС-1 во второй ряд отверстий устройства МС-2.

После повторного снятия МС-1 закрывают верхнюю крышку и фиксируют её с помощью двух рычажков. Затягивая два барашка, расположенных на передней части МС-2, фиксируют нижние части капсул.

Чтобы открыть капсулы, поднимают верхнюю пластину за её нижнюю поверхность, нажимая на упоры. Снимают верхнюю пластину с зафиксированными крышками. Тела капсул остаются на основании устройства МС-2. Отпустив барашки, дать телам капсул установиться вровень с поверхностью основания.

Устанавливают рамку для заполнения порошка на четырех направляющих штырях.

После того, как все капсулы заполнены, снимают рамку и устанавливают верхнюю пластину с крышками капсул на место. Поднимая подвижное основание и опираясь руками о края верхней пластины, закрывают капсулы, избегая чрезмерного усилия, во избежание повреждения машины. Снимают верхнюю пластину – капсулы наполнены и закрыты. Далее открывают прозрачную верхнюю крышку и переворачивают пластину, чтобы освободить капсулы.

Наполненные капсулы собирают в контейнер и передают на операцию отбраковки капсул ТП 5.2.

ТП 5.2. Отбраковка капсул

Капсулы подвергаются визуальному контролю на инспекционном столе. Некондиционные капсулы собирают в контейнер и направляются для вскрытия, содержимое капсул поступает обратно на капсулирование (ТП 5.1). Сами раскрытые капсулы направляются на утилизацию. Кондиционные капсулы собирают в контейнер и передаются для фасовки и упаковки на стадию УМО 6.

УМО 6.1. Фасовка капсул

Фасовка капсул в контурную ячейковую упаковку.

Перед началом работы необходимо проверить чистоту и исправность фасовочной машины ФУ-7, наличие на подающих барабанах упаковочных материалов, температуру на узлах формования ячеек и сваривающих барабанах (250 - 270°C), наличие подвода сжатого воздуха и давление, соответствие маркировки упаковываемой продукции, установить номер серии. Время прогрева барабанов 20 минут.

Капсулы с помощью совка вручную загружают в бункер блистерной машины из контейнера.

Номер серии и срок годности на упаковку наносится узлом маркировки блистерной машины.

Во время работы блистерной машины контролируют, чтобы капсулы заполняли все ячейки пленки, контролируют качество склейки, качество нанесения маркировки, качество высечки.

Пленку ПВХ с подающего барабана через обводной ролик и штангу подают на форматный узел. Фольга с подающего барабана проходит через обводной ролик, верхний неприводной горячий валок и поступает на склейку с пленкой ПВХ. Пленка ПВХ с отформованными ячейками подается на стол машины, где производится заполнение ячеек капсулами, поступающими из вибропитателя через узел укладки. На столе осуществляется визуальный и инструментальный контроль заполнения ячеек капсулами, замена оператором некондиционных капсул. Установленная на столе щетка обеспыливает пленку, опрокидывает или вправляет плохо уложенные капсулы. Верхний неприводной горячий валок прижимает фольгу к пленке ПВХ с заполненными ячейками и производит склеивание. Склеенное полотно, подается протяжным механизмом по столу к прессу маркировки и далее - к вырубному штампу.

После вырубки готовые упаковки конвейером передаются на картонажную машину.

По окончании работы выключают вибропитатель, нагреватели сваривающих барабанов и электродвигатель автомата. Автомат освобождают от пыли, все его рабочие поверхности протирают спиртом.

Некондиционные упаковки собираются в емкость и затем отправляют на переработку. Целые, неповрежденные капсулы извлекают из упаковок и перефасовывают. Некондиционные капсулы подлежат утилизации.

Фасовка капсул в банки.

Фасовку в банки капсул осуществляют на машине для счета таблеток и капсул. Процесс счета непрерывный, автоматический. Подача банок осуществляется вручную. Капсулы, помещенные в загрузочный бункер, посредством вибрационного лотка подаются на вращающийся стол. Проходя через оптический узел счета капсулы поступают в банку. Переход от фасовки одного флакона к фасовке второго осуществляется перенаправлением потока капсул автоматическим переключением заслонки. Во время наполнения следующей банки, первая (заполненная ранее) заменяется порожней. Во время работы периодически проверяют правильность отсчитывания капсул.

Заполненные капсулами банки закрывают крышками вручную.

Укупоренные банки передают для нанесения этикетки и маркировки на этикетировочную машину. В процессе работы устанавливают тару вручную на транспортер

подачи тары или сдвигают тару на транспортер с накопительной площадки. Перемещение тары в машине, нанесение и прижатие этикетки осуществляется автоматически. Во время работы периодически проверяют качество нанесения маркировки.

УМО 6.2. Упаковка и маркировка

По 1 банке или 3 контурные ячейковые упаковки вместе с инструкцией по применению помещают в пачку из картона для потребительской тары.

Нанесение номера серии и срока годности на пачки осуществляется на маркираторе пачек. Допускается нанесение маркировки на пачки вручную с использованием штампа. Некачественные пачки пересчитывают, уничтожают путем измельчения и сдают в макулатуру.

Укладка инструкций по применению в пачки производится вручную. Некачественные инструкции по применению пересчитывают, уничтожают путем измельчения и сдают в макулатуру.

На фасовочном столе пачки картонные вручную упаковывают в ящик из гофрированного картона. В ящик из гофрированного картона вкладывают заполненный упаковочный лист. Свободное пространство заполняют бумажной или картонной макулатурой.

На этикетку для ящика из гофрированного картона и на этикетку «Упаковочный лист» наносят маркировку производят вручную с помощью клише.

Каждый ящик из гофрированного картона оклеивают лентой полиэтиленовой с липким слоем или лентой-скотч. На ящик наклеивают маркированную транспортную этикетку, ставят на поддон и передают на склад карантинного хранения.

Перед началом маркировки печатной продукции проверяют правильность набора клише (номер серии, срок годности, вес брутто, количество упаковок, дата выпуска, № упаковщика). В ходе работы постоянно контролируют качество нанесения штампа. Для нанесения реквизитов используют штемпельную краску фиолетового цвета.

Глава 3. Исходные вещества, методики эксперимента и анализа полученных соединений (экспериментальная часть)

3.1 Исходное сырье

Использованные в качестве исходных соединения вещества и методы их очистки представлены в таблице 3.1.1.

Таблица 3.1.1 – Исходное сырье для синтеза «Дезаза-Триазавирина»

Компонент сырья	Минимально допустимое содержание основного вещества, %	Очистка
3-Амино-1,2,4-триазол, по НД производителя	99,0	Не требуется
Ацетоуксусный эфир, по НД производителя	98,0	Не требуется
Кислота серная конц., по ГОСТ 4204-77	99,0	Не требуется
Кислота азотная конц., по ГОСТ 11125-84	70,0	Не требуется
Спирт изопропиловый, по ТУ- 2632-009-00207787-2002	99,7	Не требуется
Кислота уксусная ледяная, по ГОСТ 61-75	99,0	Не требуется
Натрия гидроксид х.ч., по ГОСТ 4328-77	99,0	Не требуется
Пиперидин, по НД производителя	99,0-99,5	Не требуется
Ремантадин, по НД производителя	98,5-101,0	Не требуется
L-Аргинин, по НД производителя	98,5-101,0	Не требуется
Вода очищенная, по ФС.2.2.0020.15	–	Не требуется

3.2 Полупродукты синтеза

В процессе получения препаратов ряда «Дезаза-Триазавирин» выделяются два основных полупродукта – 5-Метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7(4*H*)-он (триазолопиримидинон) **3** и 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он (нитротриазолопиримидинон) **4**. Характеристики данных полупродуктов представлены в таблицах 3.2.1 и 3.2.2 соответственно.

Таблица 3.2.1 – Характеристика триазолопиримидинона 3

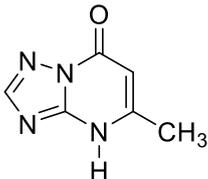
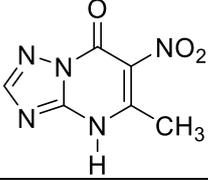
Химическое название	5-Метил-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7-он
Структурная формула	
Эмпирическая формула	C ₆ H ₆ N ₄ O
Молекулярная масса	150.23
Основные физико-химические свойства	
1. Внешний вид	Кристаллический порошок белого цвета
2. Температура плавления	290-292°C
3. Подлинность	
3.1. ИК спектр	ИК спектр должен иметь полное совпадение полос поглощения со стандартным образцом
3.2. УФ спектр	УФ спектр растворов этаноле в диапазоне 190-600 нм должен иметь максимум поглощения λ _{max} (245±2) нм УФ спектр растворов дистиллированной воде в диапазоне 190-600 нм должен иметь максимум поглощения λ _{max} (243±2) нм
3.3. ЯМР спектр	¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆), δ (м.д): 2.27 (с, 3H, C-CH ₃), 5.82 (с, 1H, CH), 8,05 (с, 1H, CH), 13.09 (уш. с, 1H, NH)
3.4 Масс-спектр	<i>m/z</i> (I _{отн.} , %): 151.06 [M + H] ⁺ (100), C ₆ H ₇ N ₄ O. M _{выч.} 151.06.

Таблица 3.2.2 – Характеристика нитротриазолопиримидинона 4

Химическое название	5-Метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-7-он
Структурная формула	
Эмпирическая формула	C ₆ H ₅ N ₅ O ₃
Молекулярная масса	195,14
Основные физико-химические свойства	
Показатель	Норма
1. Внешний вид	Порошок от почти белого до желтого цвета
2. Температура плавления	235-237 °С, с разложением
3. Подлинность	
3.1. ИК спектр	ИК спектр должен иметь полное совпадение полос поглощения со стандартным образцом
3.2. УФ спектр	УФ спектр раствора в этаноле в диапазоне 190-600 нм должен иметь максимум поглощения λ _{max} (216±2) нм. УФ спектр раствора в дистиллированной воде в диапазоне 190-600 нм должен иметь максимум поглощения λ _{max} (216±2) нм
3.3. ЯМР спектр	¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆), δ (м.д): 2.43 (с, 3H, C-CH ₃)

3.3 Характеристики готовых продуктов

Основные характеристики готовых субстанций лекарственных препаратов ряда «Дезаза-Триазавирина», предполагаемые к внесению в соответствующие фармакопейные статьи, представлены ниже в таблицах 3.3.1-3.3.4.

Таблица 3.3.1 – Характеристика готового продукта НТП-На

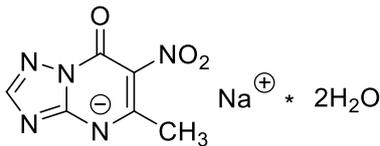
Химическое название	Натрия 5-метил-6-нитро-7-оксо-7 <i>H</i> -[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидин-4-ид дигидрат	
Структурная формула		
Эмпирическая формула	$C_6H_8N_5O_5Na$	
Молекулярная масса	253,04	
Основные физико-химические свойства		
Показатель	Метод	Норма
1. Внешний вид	Визуально	Кристаллический порошок желтого цвета
2. Растворимость	ГФ XIII	Легко растворим в диметилсульфоксиде, растворим в воде, очень мало растворим в этаноле, практически нерастворим в хлороформе, изопропиловом спирте
3. Температура плавления	ГФ XIII	Не имеет характерной температуры плавления. Температура дегидратации в интервале 150-190 °С. Температура разложения ≥ 220 °С.
4. Подлинность		
4.1. ИК спектр	ИК спектр	ИК спектр в таблетках калия бромида, в области от 4000 cm^{-1} до 400 cm^{-1} . Характеристические полосы (cm^{-1}): 1325 (NO_2); 1680 (C=O).
5. pH	ГФ XIII	5,8-6,2 (2,0 % водный раствор)
6. Посторонние примеси	ВЭЖХ	Суммарное содержание примесей – не более 1 %, любой единичной примеси - не более 0,5 %
7. Количественное определение	ВЭЖХ	Содержание $C_6H_8N_5O_5Na$ должно быть не менее 98,0 % и не более 102,0 % в пересчете на сухое вещество
8. Потеря в массе при высушивании	ГФ XIII	Не более 0,5 %
9. Сульфатная зола	ГФ XIII	Не более 0,1 %
10. Тяжелые металлы	ГФ XIII	Не более 0,001 %
11. Остаточные органические растворители	ГЖХ	Не более 0,5 %
12. Микробиологическая чистота	ГФ XIII, часть 1, категория 2.2	Соответствует

Таблица 3.3.2 – Характеристика готового продукта НТП-Рip

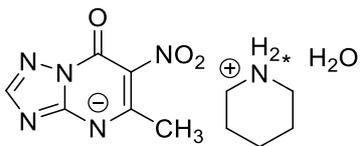
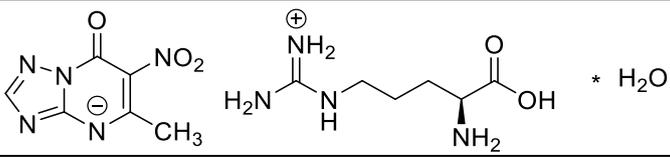
Химическое название	Пиперидин-1-ия 5-Метил-6-нитро-7-оксо-7H-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиримидин-4-ид моногидрат	
Структурная формула		
Эмпирическая формула	C ₁₁ H ₁₈ N ₆ O ₄	
Молекулярная масса	298.14	
Основные физико-химические свойства		
Показатель	Метод	Норма
1. Внешний вид	Визуально	Кристаллический порошок желтого цвета
2. Растворимость	ГФ XIII	Легко растворим в диметилсульфоксиде, растворим в воде, очень мало растворим в этаноле, практически нерастворим в хлороформе, изопропиловом спирте
3. Температура плавления	ГФ XIII	Не имеет характерной температуры плавления. Температура дегидратации в интервале 150-190 °С. Температура разложения ≥ 220 °С.
4. Подлинность		
4.1. ИК спектр	ИК спектр	ИК спектр в таблетках калия бромида, в области от 4000 см ⁻¹ до 400 см ⁻¹ . Характеристические полосы (см ⁻¹): 1316, 1490 (NO ₂); 1644 (C=O); 3400 (NH ₂ ⁺)
5. pH	ГФ XIII	5,8-6,2 (2,0 % водный раствор)
6. Посторонние примеси	ВЭЖХ	Суммарное содержание примесей – не более 1 %, любой единичной примеси - не более 0,5 %
7. Количественное определение	ВЭЖХ	Содержание C ₁₁ H ₁₈ N ₆ O ₄ должно быть не менее 98,0 % и не более 102,0 % в пересчете на сухое вещество
8. Потеря в массе при высушивании	ГФ XIII	Не более 0,5 %
9. Сульфатная зола	ГФ XIII	Не более 0,1 %
10. Тяжелые металлы	ГФ XIII	Не более 0,001 %
11. Остаточные органические растворители	ГЖХ	Не более 0,5 %
12. Микробиологическая чистота	ГФ XIII, часть 1, категория 2.2	Соответствует

Таблица 3.3.3 – Характеристика готового продукта НТП-Rem

Химическое название	1-((3r,5r,7r)-Адамантан-1-ил)этан-1-аминий 5-метил-6-нитро-7-оксо-7H-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиримидин-4-ид моногидрат	
Структурная формула		
Эмпирическая формула	$C_{18}H_{28}N_6O_4$	
Молекулярная масса	392.22	
Основные физико-химические свойства		
Показатель	Метод	Норма
1. Внешний вид	Визуально	Кристаллический порошок желтого цвета
2. Растворимость	ГФ XIII	Легко растворим в диметилсульфоксиде, растворим в воде, очень мало растворим в этаноле, практически нерастворим в хлороформе, изопропиловом спирте
3. Температура плавления	ГФ XIII	Не имеет характерной температуры плавления. Температура дегидратации в интервале 150-190 °С. Температура разложения ≥ 220 °С.
4. Подлинность		
4.1. ИК спектр	ИК спектр	ИК спектр в таблетках калия бромида, в области от 4000 cm^{-1} до 400 cm^{-1} . Характеристические полосы (cm^{-1}): 1316, 1490 (NO_2); 1375 (Me); 1644 (C=O); 3160 (NH_3^+)
5. pH	ГФ XIII	5,8-6,2 (2,0 % водный раствор)
6. Посторонние примеси	ВЭЖХ	Суммарное содержание примесей – не более 1 %, любой единичной примеси - не более 0,5 %
7. Количественное определение	ВЭЖХ	Содержание $C_{18}H_{28}N_6O_4$ должно быть не менее 98,0 % и не более 102,0 % в пересчете на сухое вещество
8. Потеря в массе при высушивании	ГФ XIII	Не более 0,5 %
9. Сульфатная зола	ГФ XIII	Не более 0,1 %
10. Тяжелые металлы	ГФ XIII	Не более 0,001 %
11. Остаточные органические растворители	ГЖХ	Не более 0,5 %
12. Микробиологическая чистота	ГФ XIII, часть 1, категория 2.2	Соответствует

Таблица 3.3.4 – Характеристика готового продукта НТП-L-arg

Химическое название	5-Метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5- <i>a</i>]пиримидинат 8H ⁺ -аргининия моногидрат	
Структурная формула		
Эмпирическая формула	C ₁₂ H ₂₁ N ₉ O ₆	
Молекулярная масса	387,36	
Основные физико-химические свойства		
Показатель	Метод	Норма
1. Внешний вид	Визуально	Кристаллический порошок желтого цвета
2. Растворимость	ГФ XIII	Легко растворим в диметилсульфоксиде, растворим в воде, очень мало растворим в этаноле, практически нерастворим в хлороформе, изопропиловом спирте
3. Температура плавления	ГФ XIII	Не имеет характерной температуры плавления. Температура дегидратации в интервале 150-190 °С. Температура разложения ≥ 220 °С.
4. Подлинность		
4.1. ИК спектр	ИК спектр	ИК спектр в таблетках калия бромида, в области от 4000 см ⁻¹ до 400 см ⁻¹ . Характеристические полосы (см ⁻¹): 1316, 1490 (NO ₂); 1644 (C=O); 1550 (COO ⁻); 3160 (NH ₃ ⁺).
4.2. УФ спектр	УФ спектр	УФ спектр в диапазоне 190-600 нм должен иметь максимумы поглощения λ _{max} : (206±2) нм, (234±2) нм, (274±2) нм, (356±2) нм
5. pH	ГФ XIII	5,8-6,2 (2,0 % водный раствор)
6. Посторонние примеси	ВЭЖХ	Суммарное содержание примесей – не более 1 %, любой единичной примеси - не более 0,5 %
7. Количественное определение	ВЭЖХ	Содержание C ₁₂ H ₁₉ N ₉ O ₅ должно быть не менее 98,0 % и не более 102,0 % в пересчете на сухое вещество
8. Потеря в массе при высушивании	ГФ XIII	Не более 0,5 %
9. Сульфатная зола	ГФ XIII	Не более 0,1 %
10. Тяжелые металлы	ГФ XIII	Не более 0,001 %
11. Остаточные органические растворители	ГЖХ	Не более 0,5 %
12. Микробиологическая чистота	ГФ XIII, часть 1, категория 2.2	Соответствует

3.4 Используемое оборудование

ГЖХ-МС анализ проводили, используя газовый хроматограф-масс-спектрометр Agilent GC 7890A MS 5975C Inert XL EI/CI с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором.

ВЭЖХ анализ полупродуктов и субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин» проводили на жидкостном хроматографе Agilent-1200 с диодно-матричным детектором и автосамплером.

Методику анализа препарата ряда «Дезаза-Триазавирин» на основе АФС НТП-*L-arg* в плазме крови человека разрабатывали с использованием жидкостного хроматографа Waters Acquity UPLC с фотодиодным детектором и автосамплером.

Масс-спектры с ионизацией электроспреем записаны на времяпролетном квадрупольном масс-спектрометре maXisimpact HD (BrukerDaltonics) в режиме регистрации положительных ионов в интервале 50-2500 Да с использованием ацетата лития в качестве калибранта шкалы масс со шприцевым вводом раствора образца.

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C записаны на спектрометре Bruker ADVANCE III-500 (500 и 126 МГц) в растворах в CDCl_3 и $\text{DMCO-}d_6$, внутренний стандарт ТМС.

Элементный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Perkin–Elmer PE-2400.

Температуры плавления определены на комбинированных столиках Voetius и не корректировались.

ИК-спектры ($4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$) полученных соединений были зарегистрированы на приборе Perkin–Elmer FT-IR Spectrometer Spectrum One и ИК-Фурье спектрометр Thermo Scientific Nicolet 6700с.

Исследование влияния микроволнового излучения осуществляли с использованием микроволнового реактора CEM Discovery с частотой излучения 2455 МГц, мощностью 200 Вт.

Изучение влияния сверхкритического CO_2 на синтез триазолопиримидинона **2** проводили с использованием сверхкритической флюидной лабораторной реакционной установки Waters PI-ReacSyS-250-200 с рабочим давлением 200 бар.

3.5 Аппаратурное обеспечение схемы получения препаратов ряда «Дезаза-Триазавирин»

В ходе работы было подобрано оборудование для опытно-промышленного производства АФС ряда «Дезаза-Триазавирин». Аппаратурная схема включает следующие основные стадии процесса:

1. Аппараты для синтеза и выделения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **3** в составе: реактор химический стеклянный снабженный якорным перемешивающим устройством и теплообменником, дозирующее оборудование, сборник для летучих компонентов, нутч-фильтр, сборник для фильтрата, вакуум-сушильный шкаф.

2. Аппараты для синтеза технического 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **3** в составе: 2 реактора химических стеклянных, снабженных якорным перемешивающим устройством, дозирующее оборудование, нутч-фильтр, сборник для фильтрата.

3. Аппараты для очистки технического 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **4** в составе: реактор химический стеклянный, дозирующее оборудование, нутч-фильтр, снабженный рубашкой для подачи теплоносителя, сборник для фильтрата, вакуум-сушильный шкаф.

4. Аппараты для синтеза и очистки 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия **1d** в составе: реактор химический стеклянный снабженный якорным перемешивающим устройством и теплообменником, дозирующее оборудование, нутч-фильтр, сборник для фильтрата, вакуум-сушильный шкаф.

Все материалы, контактирующие с субстанцией, соответствуют требованиям GMP. Разработанная аппаратурная схема представлена на рисунке 2.4.9.

3.6 Методики ВЭЖХ анализа

3.6.1 Совместное определение аминотриазола и триазолопиримидинона

В работе использовали жидкостной хроматограф Agilent-1200 с диодно-матричным детектором и автосамплером.

Хроматографическая колонка: Zorbax NH₂ длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм.

Температура колонки – 25 °С.

Режим элюирования – изократический.

Элюент – ацетонитрил и буферный раствор 0,01 М ацетата аммония в 0,1% уксусной кислоте в соотношении 30:70.

Скорость потока – 0,8 мл/мин.

Детектирование осуществляли при длине волны 206 нм для аминотриазола **2**, и при 270 нм для триазолопиримидинона **3**.

Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Для приготовления растворов стандартных и контрольных образцов использовали 1% раствор муравьиной кислоты в дистиллированной воде.

Диапазон измеряемых концентраций: 4,0–80,0 мкг/мл триазолопиримидинона **3** и 4,0–80,0 мкг/мл для аминотриазола **2** в растворе образца.

3.6.2 Совместное определение аминотриазола, триазолопиримидинона и нитротриазолопиримидинона

В работе использовали жидкостной хроматограф Agilent-1200 с диодно-матричным детектором и автосамплером.

Хроматографическая колонка: Zorbax NH₂ длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм.

Температура колонки – 25 °С.

Режим элюирования – изократический.

Элюент – ацетонитрил и буферный раствор 0,01 М ацетата аммония (30:70).

Скорость потока – 1,2 мл/мин.

Детектирование осуществляли при 206 нм для аминотриазола **2**, 270 нм для триазолопиримидинона **3**, и 360 нм для нитротриазолопиримидинона **4**.

Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Для приготовления растворов стандартных и контрольных образцов использовали раствор элюента.

Аналитическая область методики для аминотриазола **2** – от 1 до 40 мг/г, для триазолопиримидинона **3** – 1 – 80 мг/г для нитротриазолопиримидинона **4** – 10 – 1000 мг/г.

3.6.3 Определение 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида L-аргининия моногидрата – действующего вещества препарата ряда «Дезаза-Триазавирина»

В работе использовали жидкостной хроматограф Agilent-1200 с диодно-матричным детектором и автосамплером.

Хроматографическая колонка: ЕКА 100-5-с18 длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм.

Температура колонки – 25 °С.

Режим элюирования – изократический.

Элюент – ацетонитрил и буферный раствор 0,04 М ацетата аргинина (8:92).

Скорость потока – 0,9 мл/мин.

Детектирование осуществляли при 360 нм.

Объем вводимой пробы – 30 мкл.

Для приготовления растворов стандартных и контрольных образцов использовали раствор элюента.

Аналитическая область методики 80 – 120% по содержанию основного вещества – НТП-L-arg в АФС ряда «Дезаза-Триазавирина».

3.6.4 Определение 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата в плазме крови человека

В работе использовали жидкостной хроматограф Waters Acquity UPLC с фотодиодным детектором и автосамплером.

Хроматографическая колонка: ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) SB-C18 длиной 50 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, размер частиц сорбента 1,8 мкм.

Температура колонки – 30°C.

Режим элюирования – градиентный.

Элюент – ацетонитрил (А) и буферный раствор 0,05 М ацетата аммония (В).

Скорость потока – 0,4 мл/мин.

Детектирование осуществляли при 358 нм.

Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Параметры градиентного элюирования представлены в таблице 3.6.1.

Таблица 3.6.1 – Параметры элюирования

Время, мин	А, %	В, %
0,00	4,0	96,0
1,75	4,0	96,0
2,15	25,0	75,0
2,80	25,0	75,0
2,99	4,0	96,0

Диапазон измеряемых концентраций: от 0.03 до 20.0 мкг/мл по 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида *L*-аргининия моногидрату **1d** образце плазмы крови, предел количественного определения – 0,0292 мкг/мл; предел детектирования – 0,0096 мкг/мл.

Методика пробоподготовки образцов плазмы: 300 мкл чистой плазмы крови (либо плазмы с предварительно прибавленным стандартным раствором НТП-*L*-arg) вносят в центрифужные пробирки вместимостью 2,0 мл, прибавляют 100 мкл 1 М водного раствора соляной кислоты с помощью дозатора переменного объема. Далее плазму экстрагируют 1100 мкл этилацетата в течение 3 мин, встряхивают на вортекс-шейкере при 2400 об/мин в течение 20 секунд, центрифугируют на центрифуге при 8000 об/мин в течение 6 мин. Надосадочный слой жидкости отбирают в чистую пробирку и выпаривают в токе воздуха. Оставшийся осадок в первой пробирке вторично экстрагируют 1000 мкл этилацетата, встряхивают на вортекс-шейкере, центрифугируют, надосадочный слой жидкости добавляют

в пробирку к первому экстракту и выпаривают в токе воздуха. Полученный объединенный сухой остаток растворяют в 100 мкл 0,05 М раствора ацетата аммония, используемого для приготовления подвижной фазы, помещают в ультразвуковую баню на 1 мин, далее центрифугируют при 8000 об/мин в течение 6 мин и переносят в микроциалы для ВЭЖХ.

3.7 Методика получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7(4*H*)-она в условиях микроволнового возбуждения

Смесь аминотриазола **2** (42 мг, 0.5 ммоль), ацетоуксусного эфира (73 мг, 0.56 ммоль) и ледяной уксусной кислоты (100 мкл) перемешивали при необходимых условиях в течение заданного времени (таблица 2.1.5). Затем смесь охлаждали до комнатной температуры, образующийся осадок отфильтровывали, промывали этанолом и сушили. Полученные выходы представлены в табл. 2.1.5. Т.пл. > 250 °С. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м.д.: 2.3 с (3H, Me), 5.82 с (1H, H-6), 8.15 с (1H, H-2), 11.51 с (1H, NH). Масс-спектр, *m/z* (I_{отн.}, %): 151.06 [M + H]⁺ (100), C₆H₇N₄O. M_{выч.} 151.06. Найдено, %: C 47.84, H 4.22, N 37.16. C₆H₆N₄O. Вычислено, %: C 48.00, H 4.03, N 37.32.

3.8 Методика получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7(4*H*)-она в сверхкритических условиях

Смесь аминотриазола **2** (42 мг, 0.5 ммоль) и ацетоуксусного эфира (73 мг, 0.56 ммоль) выдерживали в сверхкритическом CO₂ в различных условиях. Для выделения продукта **3** смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли 95% этанолом (5 мл), образующийся осадок отфильтровывали, промывали 95% этанолом (2 x 1 мл) и сушили. Полученные результаты представлены в таблице 2.1.6-2.1.9. Т.пл. > 250 °С. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м.д.: 2.3 с (3H, Me), 5.82 с (1H, H-6), 8.15 с (1H, H-2), 11.51 с (1H, NH). Масс-спектр, *m/z* (I_{отн.}, %): 151.06 [M + H]⁺ (100), C₆H₇N₄O. M_{выч.} 151.06. Найдено, %: C 48.01, H 4.12, N 37.22. C₆H₆N₄O. Вычислено, %: C 48.00, H 4.03, N 37.32.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые разработаны применимые для опытно-промышленного использования методы синтеза субстанций ряда 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида с катионами натрия, пиперидиния, ремантадиния и *L*-аргининия:

- выбран и усовершенствован метод получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она в результате циклокондексации 3-амино-1,2,4-триазола с ацетоуксусным эфиром; также опробована реализация данного превращения в сверхкритических условиях и под воздействием микроволнового излучения;

- оптимизирован метод получения 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она путем нитрования 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она;

- оптимизирован метод получения солей 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида с различными катионами.

2. Созданы обоснованные технологическая и аппаратурная схемы производства потенциальных АФС ряда «Дезаза-Триазавирин».

3. Предложены рецептура и процесс изготовления готовой лекарственной формы препарата на примере АФС 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата.

4. Разработаны аналитические методики контроля качества получаемого препарата ряда «Дезаза-Триазавирин» и его полупродуктов:

- предложены методики совместного определения 5-амино-3*H*-1,2,4-триазола и 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она, а также 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она в присутствии 5-амино-3*H*-1,2,4-триазола и 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она методом ВЭЖХ;

- предложена методика количественного определения основного вещества в активной фармацевтической субстанции ряда «Дезаза-Триазавирин» методом ВЭЖХ на примере 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата;

- впервые разработан способ определения препарата ряда «Дезаза-Триазавирин» в плазме крови человека методом ультра-ВЭЖХ на примере 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата.

5. Проведены исследования фармакокинетики препарата ряда «Дезаза-Триазавирин» на примере 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата в рамках проведения первой фазы клинических исследований препарата. Было установлено, что после приема внутрь препарат быстро всасывается и обнаруживается в крови уже через 0,5 ч. Максимальные концентрации с увеличением дозы возрастают прямо пропорционально. С увеличением суточной дозы максимальная концентрация достигается

раньше. Убывание концентраций в плазме носит двухфазный характер, в первой фазе период полувыведения составляет от 1,5 до 4 ч, во второй – 11–13 ч. Анализ различных режимов приема препарата показывает, что из числа кратных режимов введения наиболее стабильные концентрации создают режимы приема 300 мг 3 раза в сутки и 300 мг 2 раза в сутки.

Перспективы дальнейшей разработки темы исследования. Результаты работы являются основой для организации промышленного производства субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин». Кроме того, результаты работ по изучению влияния МКВ излучения и сверхкритических условий на синтез триазолопиримидинона являются крайне перспективными в рамках создания безотходных или малоотходных технологий производства соединений ряда «Дезаза-Триазавирин».

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление
АФС – активная фармацевтическая субстанция
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЖХ – газожидкостная хроматография
ГПМЦ – гипролоза низкозамещенная
ДМСО – диметилсульфоксид
ДМСО-d₆ – гексадейтерированный диметилсульфоксид
ДМФА – диметилформамид
ИК – инфракрасный
ИФА – иммуноферментный анализ
МКВ (MW) – микроволновое излучение
МКЦ – целлюлоза микрокристаллическая
МТТ – микротетразолиевый тест
НТП-*L*-arg – 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид *L*-аргининия моногидрат
НЯ – нежелательные явления
ПВХ – поливинилхлорид
РГА – реакция гемагглютинации
ТМС – тетраметилсилан
УФ – ультрафиолетовый
ЧСС – частота сердечных сокращений
ЭКГ – электрокардиограмма
ЯМР – ядерный магнитный резонанс
АсОН – уксусная кислота
Ar – арил
CDCl₃ – дейтерированный хлороформ
Et – этил
EtOH – этанол
Me – метил
MeOH – метанол
Ph – фенил
Py – пиридил

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чупахин, О.Н. 5-Метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-альфа]пиримидинид *L*-аргининия моногидрат / О.Н. Чупахин, В.Н. Чарушин, В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, С.К. Котовская, О.И. Киселев, Э.Г. Деева, К.В. Саватеев, С.С. Борисов // Патент РФ 2529487 рег. в госреестре 27.09.2014 по заявке № 2013116765/04 от 15.04.2013.
2. Чупахин, О.Н. Натриевая соль 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она дигидрат / О.Н. Чупахин, В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, В.Н. Чарушин, А.Ю. Петров, О.И. Киселев // Патент РФ 2330036 рег. в госреестре 27.07.2008 по заявке № 2006145921/04 от 22.12.2006.
3. Саватеев, К.В. Синтез, строение, свойства и биологическая активность нитроазолопиримидинов: дис. канд. хим. наук: 02.00.03 / К.В. Саватеев. – Екатеринбург, 2016. – с. 182.
4. Саватеев, К.В. Азолоазины–антагонисты A_{2a} -рецептора. Структура и свойства / К.В. Саватеев, Е.Н. Уломский, И.И. Буторин, В.Н. Чарушин, В.Л. Русинов, О.Н. Чупахин // Успехи химии. – 2018. – Т. 87. – С. 636-669.
5. Fischer, G. Recent Progress in 1,2,4-Triazolo[1,5-*a*]pyrimidine Chemistry / ed. A. R. Katritzky // Advances in Heterocyclic Chemistry. – New York: Academic Press, 2007. – 267 p.
6. Yu, W. Design, synthesis, and biological evaluation of triazolo-pyrimidine derivatives as novel inhibitors of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) secretion / W. Yu, C. Goddard, E. Clearfield C. Mills, T. Xiao, H. Guo, J. D Morrey, N. E Motter, K. Zhao, T.M. Block, A. Cuconati, X. Xu // Journal of Medicinal Chemistry. – 2011. – Vol. 54. – P. 5660-5670.
7. Battaglia, U., Moody, C. J. A short synthesis of the triazolopyrimidine antibiotic essramycin // Journal of Natural Products. – 2010. – Vol. 73. – P. 1938-1939.
8. Mostafa, Y.A.-H. Synthesis and antimicrobial activity of certain new 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine derivatives / Y.A.-H. Mostafa, M.A. Hussein, A.A. Radwan, A.E.-H. N. Kfayy // Archives of Pharmacal Research. – 2008. – Vol. 31. – P. 279-293.
9. Girasolo, M.A. Synthesis, characterization, crystal structures and in vitro antistaphylococcal activity of organotin(IV) derivatives with 5,7-disubstituted-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine / M.A. Girasolo, L. Canfora, P. Sabatino, D. Schillaci, E. Foresti, S. Rubino, G. Ruisi, G. Stocco // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2012. – Vol. 106. – P. 156-163.
10. Bhatt, J.D., Chudasama C.J., Patel K.D. Pyrazole clubbed triazolo[1,5-*a*]pyrimidine hybrids as an anti-tubercular agents: Synthesis, in vitro screening and molecular docking study // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2015. – Vol. 23. – P. 7711-7716.

-
11. Zhao, X.-L. Synthesis and Anti-tumor Activities of Novel [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidines / X.-L. Zhao, Y.-F. Zhao, S.-C. Guo, H.-S. Song, D. Wang, P. Gong // *Molecules*. – 2007. – Vol. 12. – P. 1136-1146.
12. Richardson, C.M. Triazolo[1,5-*a*]pyrimidines as novel CDK2 inhibitors: Protein structure-guided design and SAR / C.M. Richardson, D.S. Williamson, M.J. Parratt, J. Borgognoni, A.D. Cansfield, P. Dokurno, G.L. Francis, R. Howes, J.D. Moore, J.B. Murray, A. Robertson, A.E. Surgenor, C.J. Torrance // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2006. – Vol. 16. – P. 1353-1357.
13. Gamal-Eldeen, A.M. Induction of intrinsic apoptosis pathway in colon cancer HCT-116 cells by novel 2-substituted-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene derivatives / A.M. Gamal-Eldeen, N.A. Hamdy, H.A. Abdel-Aziz, E.A. El-Hussieny, I.M.I. Fakhr // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 77. – P. 323-333.
14. Zhang, N. Synthesis and SAR of [1,2,4]Triazolo[1,5-*a*]pyrimidines, a Class of Anticancer Agents with a Unique Mechanism of Tubulin Inhibition / N. Zhang, S. Ayral-Kaloustian, T. Nguyen, J. Afragola // *Journal of Organic Chemistry*. – 2007. – Vol. 50. – P. 319-327.
15. Łakomska, I. Platinum(II) complexes with 5,7-disubstituted-1,2,4-triazolo [1,5-*a*]pyrimidines: Spectroscopical characterization and cytotoxic activity in vitro / I. Łakomska, M. Fandzloch, B. Popławska, J. Sitkowski // *Spectrochimica Acta Part A*. – 2012. – Vol. 91. – P. 126-129.
16. Doherty, A. M., Keiser, J.A. / Chapter 10. Growth Factors in Cardiovascular Disease // *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. – 1993. – Vol. 28. – P. 89-98.
17. Ishikura, K. Trepidil inhibits platelet-derived growth factor-induced migration via protein kinase A and RhoA/Rho-associated kinase in rat vascular smooth muscle cells / K. Ishikura, H. Fujita, M. Hida, M. Awazu // *European Journal of Pharmacology*. – 2005. – Vol. 515. – P. 28-33.
18. Bönisch, D. Antimitogenic effects of trapidil in coronary artery smooth muscle cells by direct activation of protein kinase A / D. Bönisch, A.A. Weber, M. Wittpoth, M. Osinski, K. Schrör // *Molecular Pharmacology*. – 1998. – Vol. 54. – P. 241-248.
19. Cheng, Y. Antiproliferative Effects of Trepidil in Vascular Smooth Muscle Cells are Associated by Inhibition of MAPK and P34cdc2 Activity / Y. Cheng, P. Liu, H. Chen, F. Zeng // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2000. – Vol. 35. – P. 1-6.
20. Boechat, N. New Trifluoromethyl Triazolopyrimidines as Anti-Plasmodium falciparum Agents / N. Boechat, L. C. S. Pinheiro, T. S. Silva, A.C.C. Aguiar, A.S. Carvalho, M.M. Bastos, C.C.P. Costa, S. Pinheiro, A.C. Pinto, J.S. Mendonça, K.D.B. Dutra, A.L. Valverde, O.A. Santos-Filho, I.P. Ceravolo, A.U. Krettli // *Molecules*. – 2012. – Vol. 17. – P. 8285-8302.

-
21. Kokkonda, S. Tetrahydro-2-naphthyl and 2-Indanyl Triazolopyrimidines Targeting *Plasmodium falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase Display Potent and Selective Antimalarial Activity / S. Kokkonda, X. Deng, K.L. White, J.M. Coteron, M. Marco, L. de L. Heras, J. White, F. El Mazouni, D.R. Tomchick, K. Manjаланagara, K.R. Rudra, G. Chen, J. Morizzi, E. Ryan, W. Kaminsky, D. Leroy, M.S. Martínez-Martínez, M.B. Jimenez-Diaz, S.F. Bazaga, I. Angulo-Barturen, D. Waterson, J.N. Burrows, D. Matthews, S.A. Charman, M.A. Phillips, P.K. Rathod // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 59. – P. 5416-5431.
22. Phillips, M.A. A Triazolopyrimidine-Based Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitor with Improved Drug-like Properties for Treatment and Prevention of Malaria / M.A. Phillips, K.L. White, S. Kokkonda, X. Deng, J. White, F. El Mazouni, K. Marsh, D.R. Tomchick, K. Manjаланagara, K.R. Rudra, G. Wirjanata, R. Noviyanti, R.N. Price, J. Marfurt, D.M. Shackleford, F.C.K. Chiu, M. Campbell, M.B. Jimenez-Diaz, S.F. Bazaga, I. Angulo-Barturen, M.S. Martinez, M. Lafuente-Monasterio, W. Kaminsky, K. Silue, A.-M. Zeeman, C. Kocken, D. Leroy, B. Blasco, E. Rossignol, T. Rueckle, D. Matthews, J. N. Burrows, D. Waterson, M.J. Palmer, P.K. Rathod, S.A. Charman // *ACS Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 2. – P. 945-957.
23. Ram, V.J. Functionalized azoles and triazolo[1,5-*a*]pyrimidines as latent leishmanicides / V.J. Ram, S. Pratibha, S. K. Singh, M. Kandpal, B.L. Tekwani // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 1997. – Vol. 7. – P. 1087-1090.
24. Nath, M. Organotin(IV) tryptophanylglycinates: potential non-steroidal antiinflammatory agents; crystal structure of dibutyltin(IV) tryptophanylglycinate / M. Nath, H. Singh, P. Kumar, A. Kumar, X. Song, G. Eng // *Applied Organometallic Chemistry*. – 2009. – Vol. 23. – P. 347-358.
25. Sato, Y. Studies on cardiovascular agents. 6. Synthesis and coronary vasodilating and antihypertensive activities of 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidines fused to heterocyclic systems / Y. Sato, Y. Shimoji, H. Fujita, H. Nishino, H. Mizuno, S. Kobayashi, S. Kumakura // *Journal of Organic Chemistry*. – 1980. – Vol. 23. – P. 927-937.
26. Kokel, D. Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish / D. Kokel, J. Bryan, C. Laggner, R. White, C.Y.J. Cheung, R. Mateus, D. Healey, S. Kim, A.A. Werdich, S.J. Haggarty, C.A. MacRae¹, B. Shoichet, R.T. Peterson // *Nature Chemical Biology*. – 2010. – Vol. 6. – P. 231-237.
27. Kumar, J. Synthesis and screening of triazolopyrimidine scaffold as multi-functional agents for Alzheimer's disease therapies / J. Kumar, P. Meena, A. Singh, E. Jameel, M. Maqbool, M. Mobashir, A. Shandilya, M. Tiwari, N. Hoda, B. Jayaram // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 119. – P. 260-277.

-
28. Kovalevich, J. Characterization of brain-penetrant pyrimidine-containing molecules with differential microtubule-stabilizing activities developed as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease and related tauopathies / J. Kovalevich, A.S. Cornec, Y. Yao, M. James, A. Crowe, V.M.-Y. Lee, J.Q. Trojanowski, A.B. Smith 3rd, C. Ballatore, K.R. Brunden // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. –2016. – Vol. 357. – P. 432-450.
29. Ulomskiy, E.N. Synthesis and biological evaluation of 6-nitro-1,2,4-triazoloazines containing polyphenol fragments possessing antioxidant and antiviral activity / E.N. Ulomskiy, A.V. Ivanova, E.B. Gorbunov, I.L. Esaulkova, A.V. Slita, E.O. Sinegubova, E.K. Voinkov, R.A. Drokin, I.I. Butorin, E.R. Gazizullina, E.L. Gerasimova, V.V. Zarubaev, V.L. Rusinov // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2020. – Vol. 30 – Article 127216.
30. Чупахин, О. Н. Натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*]-1,2,4-триазин-7(4*H*)-она, дигидрат, обладающая противовирусной активностью / О.Н. Чупахин, В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, В.Н. Чарушин, А.Ю. Петров, О.И. Киселев // Патент РФ 2294936 рег. в госреестре 10.03.2007 по заявке № 2005120250/04 от 29.06.2015.
31. Артемьев, Г. А. Разработка технологии производства субстанции противовирусного препарата «Триазавирин»: дис. канд. тех. наук: 05.17.04 / Г. А. Артемьев. – Екатеринбург, 2016, с. 153.
32. Триазавирин – противовирусный препарат нового поколения / под ред. О. Н. Чупахина, О. И. Киселева. – Екатеринбург, 2016. – с. 254.
33. Hodge, H.C. *Clinical Toxicology of Commercial Products* / H.C. Hodge, R.E. Gosselin, R.P. Smith, M.N. Gleason // *Acute Poisoning*. 4th ed., Williams & Wilkins, Baltimore. –1975.
34. Cook, J.W. *Derivatives of triaza-indolizines* / J.W. Cook, R.P. Gentles, S.H. Tucker // *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. – 1950. – Vol. 69. – P. 343-350.
35. Liu, H. *Pyrimido triazole-Benzazole compounds and its preparation method and application* / H. Liu, B. Yu, Y. Zheng, S. Yuan, D. Shen // *Chinese Patent CN 109020976 A*, № 201811139806.3, 28.09.2018.
36. Moreau, R.J. *Fragment-Based Drug Discovery of Inhibitors of Phosphopantetheine Adenylyltransferase from Gram-Negative Bacteria* / R.J. Moreau, C.K. Skepper, B.A. Appleton, A. Blechschmidt, C.J. Balibar, B.M. Benton, J.E. Drumm 3rd, B.Y. Feng, M. Geng, C. Li, M.K. Lindvall, A. Lingel, Y. Lu, M. Mamo, W. Mergo, V. Polyakov, T.M. Smith, K. Takeoka, K. Uehara, L. Wang, J.-R. Wei, A.H. Weiss, L. Xie, W. Xu, Q. Zhang, J. de Vicente // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 61. – P. 3309-3324.

-
37. Reiter, J. On triazoles XIX: The reaction of 5-amino-1,2,4-triazoles with functionalized acetoacetic esters / J. Reiter, L. Pongó, T. Somorai, I. Pallagi // *Chemical Monthly*. –1990. – Vol. 121. – P. 173-187.
38. Reiter, K. New triazolo-pyrimidine derivs. - prepd. from triazole and cyclic beta-keto-ester, useful in the inhibition of ptosis caused by tetra:benzine and as analgesics / K. Reiter, J. Reiter, Z. Budai, P. Trinka, L. Petocz, G. Gingler, I. Gyertyan, I. Gacsalyi // Germany Patent DE 4006873 A1, № P 4006873.0, 03.03.1989.
39. Wang, S. Development of Highly Potent, Selective, and Cellular Active Triazolo[1,5-*a*]pyrimidine-Based Inhibitors Targeting the DCN1– UBC12 Protein–Protein Interaction / S. Wang, L. Zhao, X-J. Shi, L. Ding, L. Yang, Z.-Z. Wang, D. Shen, K. Tang, X.-J. Li, M. Mamun, H. Li, B. Yu, Y.-C. Zheng, S. Wang, H.-M. Liu // *Journal of Medical Chemistry* – 2019. – Vol. 62. – P. 2772–2797.
40. Allen, C.F.H. The Structure of Certain Polyazaindenes. II. The Product from Ethyl Acetoacetate and 3-Amino-1,2,4-triazole / C.F.H. Allen, H.R. Beilfuss, D.M. Burness, G. Reynolds, J. Tinker, J. VanAllan // *Journal of Organic Chemistry*. – 1959. – Vol. 24. – P. 787-793.
41. Abd El-Aleam, R.H. Synthesis of 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine derivatives: Antimicrobial activity, DNA Gyrase inhibition and molecular docking / R.H. Abd El-Aleam, R.F. George, G.S. Hassan, H.M. Abdel-Rahman // *Bioorganic Chemistry*. – 2020. – Vol. 94. – Article 103411.
42. Tabrizi, M.A. Synthesis and structure activity relationship investigation of triazolo[1,5-*a*]pyrimidines as CB2 cannabinoid receptor inverse agonists / M.A. Tabrizi, P.G. Baraldi, E. Ruggiero, G. Saponaro, S. Baraldi, G. Poli, T. Tuccinardi, A. Ravani, F. Vincenzi, P.A. Borea, K. Varani // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 113. – P. 11-27.
43. Abd El-Aleam, R.H. Synthesis of 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine derivatives: Antimicrobial activity, DNA Gyrase inhibition and molecular docking / R.H. Abd El-Aleama, R.F. Georgeb, G.S. Hassan, H.M. Abdel-Rahman // *Bioorganic Chemistry* – 2020. – Vol. 94. – Article 103411.
44. Erkin, A.V., Krutikov, I. Formation, structure and heterocyclization of aminoguanidine and ethyl acetoacetate condensation products // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2009. – Vol. 79. – P. 1204-1209.
45. Reiter, J., Pongó, L., Dvortsák, P. On triazoles. VIII The reaction of 5-amino-1,2,4-triazoles with ethyl 2-cyano-3-ethoxyacrylate and 2-cyano-3-ethoxyacrylonitrile // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 1987. – Vol. 24. – P. 1149-1154.
46. Liu, Y. Convenient Preparation of Novel Fused Tri-heterocyclic Compounds / Y. Liu , X.-H. Zhang, J. Ren, G.-Y. Jin // *Synthetic Communications*. – 2004. – Vol. 34, P. 151-157.

-
47. Garnier, E. New Polynitrogen Materials Based on Fused 1,2,4-Triazines / E. Garnier, F. Suzenet, D. Poullain, B. Lebret, G. Guillaumet // *Synlett.* – 2006. – Vol. 37. – P. 0472-0474.
48. Chupakhin, O.N. Reaction of 6-nitroazolo[1,5-*a*]pyrimidines with acetonitriles / O.N. Chupakhin, V.L. Rusinov, A.A. Tumashov, T.L. Pilicheva, E.O. Sidorov, I.V. Karpin // *Chemistry Heterocyclic Compounds.* – 1991. – Vol. 27. – P. 210-215.
49. Rashed, N., Mousaad, A., Saleh, A. Synthesis of [1,5-*a*]Pyrimidinone Ring Derivatives // *Journal of the Chinese Chemical Society.* – 1993. – Vol. 40. – P. 393-397.
50. Lyapustin, D.N. The synthesis of new 5-R-aminoazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ones from an N,S-acetal derivative of Meldrum's acid / D. N. Lyapustin, I. V. Marusich, D. F. Fayzullina, E.N. Ulomsky, A.I. Matern, V.L. Rusinov // *Chemistry of Heterocyclic Compounds.* – 2023. – Vol. 59. – P. 63–72.
51. El Ashry, E.S.H., Rashed, N. 1,2,4-Triazolo[*x,y-z*]pyrimidines // *Advance in heterocyclic chemistry.* – 1998. – Vol. 72. – P. 127-224.
52. Araki, K. Polyaza heterocyclic ring derivative / K. Araki, A. Inui, T. Mishina, T. Nakamura, M. Obata, N. Tsuda // *Japanese Patent JPS 61227584 A, № JP5294085A, 15.03.1985.*
53. Wermann, K., Hartmann, M. Synthesis of Dihydro-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidines / K. Wermann, // *Synthesis.* – 1991. – P. 189-191.
54. Williams, L.A. The structure of certain polyazaindenes. Part VI. The structure of some products obtained from 3-amino-1,2,4-triazoles with acetylacetone and ethyl acetoacetate // *Journal of the Chemical Society.* – 1960. – P. 1829-1832.
55. Novinson, T. 2-(Alkylthio)-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidines as adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors with potential as new cardiovascular agents / T. Novinson, R.H. Springer, D.E. O'Brien, M.B. Scholten, J.P. Miller, R.K. Robins // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 1982. – Vol. 25. – P. 420-426.
56. Okabe, T. Dialkyl bicyclic heterocycles with a bridgehead nitrogen as purine analogs possessing significant cardiac inotropic activity / T. Okabe, B. Bhooshan, T. Novinson, I.W. Hillyard, G.E. Garner, R.K. Robins // *Journal of Heterocyclic Chemistry.* – 1983. – Vol. 20. – P. 735-751.
57. Kleschick, W.A. Novel sulfonamides derived from substituted 2-amino-1,2,4-triazolo(1,5-*a*)pyrimidines and compositions and methods of controlling undesired vegetation // *European Patent EP 0150974 A2, № 85300413.3, 22.01.1985.*
58. Kleschick, W.A., Bordner, J. Regioselection in the reaction of 3-amino-5-benzylthio-1,2,4-triazole with unsymmetrical 1,3-diketones // *Journal of Heterocyclic Chemistry.* – 1989. – Vol. 26. – P. 1489-1493.

-
59. Massari, S. Efficient and regioselective one-step synthesis of 7-aryl-5-methyl- and 5-aryl-7-methyl-2-amino[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidine derivatives / S. Massari, J. Desantis, G. Nannetti, S. Sabatini, S. Tortorella, L. Goracci, V. Cecchetti, A. Loregian, O. Tabarrini // *Organic and Biomolecular Chemistry*. – 2017. – Vol. 15. – P. 7944-7955.
60. Desenko, S.M., Orlov, V.D. Tautomeric forms of 5-(2-hydroxyphenyl)-7-phenyldihydro-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine // *Chemistry Heterocyclic Compounds*. – 1989. – Vol. 25. – P. 840.
61. Desenko, S.M. Imine-enamine tautomerism of dihydroazolopyrimidines. 3. 5-Aryl-substituted 4,7(6,7)-dihydro-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidines / S.M. Desenko, V.D. Orlov, V.V. Lipson, O.V. Shishkin, S.V. Lindeman, Yu.T. Struchkov // *Chemistry Heterocyclic Compounds*. – 1991. – Vol. 27. – P. 1242-1246.
62. Desenko, S.M. Imine-enamine tautomerization of dihydroazolopyrimidines 4. Synthesis and tautomerization of 5-(2-hydroxyphenyl)-dihydro-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidines / S.M. Desenko, V.D. Orlov, N.V. Getmanskii, S.A. Komykhov // *Chemistry Heterocyclic Compounds*. – 1993. – Vol. 29. – P. 1160-1162.
63. Desenko, S.M. Chemical conversions of 5,7-disubstituted dihydro-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidines / S.M. Desenko, V.D. Orlov, V.V. Lipson // *Chemistry Heterocyclic Compounds*. – 1990. – Vol. 26. – P. 1362-1366.
64. Zhang, Q. Discovery of Triazolo-pyridazine/-pyrimidine Derivatives Bearing Aromatic (Heterocycle)-Coupled Azole Units as Class II c-Met Inhibitors / Q. Zhang, X. Liu, W. Gan, J. Wu, H. Zhou, Z. Yang, Y. Zhang, M. Liao, P. Yuan, S. Xu, P. Zheng, W. Zhu // *ACS Omega*. – 2020. – Vol. 5. – P. 16482–16490.
65. Wang, T. Discovery, Structural Optimization, and Mode of Action of Essramycin Alkaloid and Its Derivatives as Anti-Tobacco Mosaic Virus and Anti-Phytopathogenic Fungus Agents / T. Wang, S. Yang, H. Li, A. Lu, Z. Wang, Y. Yao, Q. Wang // *Journal of Agricultural and Food Chemistry* – 2020. – Vol. 68. – P. 471–484.
66. Gazizov, D.A. Effective method for the synthesis of azolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-amines / D.A. Gazizov, V.V. Fedotov, E.B. Gorbunov, E.N. Ulomskiy, O.S. Yeltsov, G.L. Rusinov, V.L. Rusinov // *Chemistry of Heterocyclic Compounds* – 2019. – Vol. 55, Is. 6. – P. 573–577.
67. Gazizov, D.A. Access to azolopyrimidine-6,7-diamines as a valuable “buildingblocks” to develop new fused heteroaromatic systems / D.A. Gazizov, V.V. Fedotov, K.A. Chistyakov, E.B. Gorbunov, G.L. Rusinov, V.N. Charushin // *Tetrahedron*. – 2021. – Vol. 89. – Article 132172.
68. Jaenecke, G. Synthese substituierter 3*H*,5*H*-1,2,4-Triazolo[1,5-*a*]pyrimidine / G. Jaenecke, L. Meister, L. Dressel, R. Richter, H. Voigt // *Zeitschrift für Chemie*. – 1989. – Vol. 29. – P. 378-379.

-
69. Hassoun, A., Liebscher, J. Verfahren zur Herstellung von 3-amino-1,2,4-triazolo[2,3-*a*]-pyrimidiniumsalzen // Patent Germany (East) DD 270711 A1, № WPC07D/3148751, 19.04.1988.
70. Polanc, S. Heterocycles. CXVIII. Pyridazines. LXVI. Novel method of annelation of the 1,2,4-triazole ring of the N₂-C₃ bond to azines / S. Polanc, B. Vercek, B. Sek, B. Stanovnik, M. Tisler // Journal of Organic Chemistry. – 1974. – Vol. 39. – P. 2143-2147.
71. Stanovnik, B. Reactions of *N*-heteroarylformamide oximes and *N*-heteroarylacetamide oximes with *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal. Synthesis of 2-methyl-*s*-triazolo[1,5-*x*]azines and *N*-methylcyanoaminoazines / B. Stanovnik, A. Stimac, M. Tisler, B. Vercek // Journal of Heterocyclic Chemistry. – 1982. – Vol. 19. – 577-583.
72. Polanc, S. A novel synthesis of *s*-triazoloazines fused at the N₂-C₃ bond of the triazole ring / S. Polanc, B. Vercek, B. Stanovnik, M. Tisler // Tetrahedron Letters. – 1973. – Vol. 14. – P. 1677-1680.
73. Prasad, V.S.R., Reddy, K.K. Synthesis of 2-Aryl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]Pyrimidines // Synthetic Communications. – 1990. – Vol. 20. – P. 2617-2622.
74. Bartels, B. Cu-Catalyzed Aerobic Oxidative Cyclization of Guanidylpyridines and Derivatives / B. Bartels, C.G. Bolas, P. Cueni, S. Fantasia, N. Gaeng, A.S. Trita // Journal of Organic Chemistry. – 2015. – Vol. 80. – P. 1249-1257.
75. Song, L. I₂/KI-Mediated Oxidative N–N Bond Formation for the Synthesis of 1,5-Fused 1,2,4-Triazoles from *N*-Aryl Amidines / L. Song, X. Tian, Z. Lv, E. Li, J. Wu, Y. Liu, W. Yu, J. Chang // Journal of Organic Chemistry. – 2015. – Vol. 80. – P. 7219–7225.
76. Pattan, S. Synthesis and evaluation of some novel [1,2,4]triazolo[1,5- α] pyrimidine derivatives for anticancer activity / S. Pattan, M. Hole, J. Pattan, S. Karami // Indian Journal of Chemistry. – 2012. – Vol. 51B. – P. 774-779.
77. Bhatt, A.A Convenient Synthesis of 1,5-Fused 1,2,4-Triazoles from *N*-Arylamidines via Chloramine-T Mediated Intramolecular Oxidative N–N Bond Formation / A.A. Bhatt, R.K. Singh, R. Kant, B.K. Sarma // Synthesis. – 2019. – Vol. 51. – P. A–H.
78. Bhatt, A. Trichloroisocyanuric acid-mediated synthesis of 1,5-fused 1,2,4-triazoles from *N*-heteroaryl benzamidines via intramolecular oxidative N–N bond formation / A. Bhatt, R.K. Singh, B.K. Sarma, R. Kant. // Tetrahedron Letters. – 2019. – Vol. 60 – Article 151026.
79. Thomas, M. / Scaffold-Hopping Strategy on a Series of Proteasome Inhibitors Led to a Preclinical Candidate for the Treatment of Visceral Leishmaniasis / M. Thomas, S. Brand, M. De Rycker, F. Zuccotto, I. Lukac, P.G. Dodd, E.-J. Ko, S. Manthri, K. McGonagle, M. Osuna-Cabello, J. Riley, C. Pont, F. Simeons, L. Stojanovski, J. Thomas, S. Thompson, E. Viayna, J.M Fiandor, J.

Martin, P.G. Wyatt, T.J. Miles, K.D. Read, M. Marco, I.H. Gilbert // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2021. – Vol. 64, Is. 9. – P. 5905-5930.

80. Bell, B.M. Application of the Tisler Triazolopyrimidine Cyclization to the Synthesis of a Crop Protection Agent and an Intermediate / B.M. Bell, P.E. Fanwick, P.R. Graupner, G.A. Roth // *Organic Process Research & Development*. – 2006. – Vol. 10. – P. 1167-1171.

81. Ma, Y.-C. Synthesis, Crystal Structure and Herbicidal Activity of a Series of [1,2,4]Triazolo[1,5-*a*]pyrimidine-2-sulfonamide Compounds / Y.-C. Ma, Y.-H. Yu, G.-F. Hou, J.-S. Gao // *Heterocycles*. – 2016. – Vol. 92. – P. 829-843.

82. Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of 1,2,3-triazoles and 1,2,4-triazolo [1,5-*a*] pyrimidines in human breast cancer cells / M. Gilandoust, K. B. Harsha, C. D. Mohan, A.R. Raquib, S. Rangappa, V. Pandey, P.E. Lobie, Basappa, K.S. Rangappa // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2018. – Vol. 28. – P. 2314-2319.

83. Potapov, A.Yu. Three-Component Condencations of 3-Amino-1,2,4-triazoles, Methyl 3-(2-Cycloamino-4-methylpyrimidin-5-yl)-3-oxopropionates, and a Series of C1 Synthons as a Convenient Approach to Pyrimidin-5-yl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidines / A. Yu. Potapov, V. A. Polikarchuk, B. V. Paponov, I.V. Ledeneva, N.V. Stolpovskaya, D.V. Kryl'skiic, Kh.S. Shikhaliev // *Russian Journal of Organic Chemistry*. – 2021. – Vol. 57. – №. 2. – P. 219–225.

84. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 N 916 "Об утверждении Правил надлежащей производственной практики".

85. van der Poll, J.M., Vink, M., Quirijns, J.K. Determination of amitrole in plant tissues and sandy soils by capillary gas chromatography with alkali flame ionization detection // *Chromatographia*. – 1990. – Vol. 30. – P. 155-158.

86. Pepich, B.V. Development of U.S. EPA Method 527 for the Analysis of Selected Pesticides and Flame Retardants in the UCMR Surve / B.V. Pepich, B. Prakash, M.M. Domino, T.A Dattilio, D.J. Munch, E.K. Price // *Environmental Science & Technology*. – 2005. – Vol. 39. – P. 4996-5004.

87. Chicharro, M. Determination of 3-amino-1,2,4-triazole (amitrole) in environmental waters by capillary electrophoresis / M. Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, M. Moreno // *Talanta*. – 2003. – Vol. 59. – P. 37-45.

88. Takeda, S. Simultaneous separation and on-line concentration of amitrole and benzimidazole pesticides by capillary electrophoresis with a volatile migration buffer applicable to mass spectrometric detection / S. Takeda, K. Fukushi, K. Chayama, Y. Nakayama, Y. Tanaka, S.-I. Wakida // *Journal of Chromatography A*. – 2004. – Vol. 1051. – P. 297-301.

-
89. Dugay, J., Hennion, M.-C. Evaluation of the performance of analytical procedures for the trace-level determination of aminotriazole in drinking waters // *Trends in Analytical Chemistry*. – 1995. – Vol. 14. – P. 407-414.
90. Ion-pairing high-performance liquid chromatography determination of amitrole in apple after solid-phase extraction and precolumn derivatization / Y. Sun, L. Luo, F. Wang, J. Li, Y. Cao // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2009. – Vol. 395. – P. 465-471.
91. Общая фармакопейная статья ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том I.
92. Баклыков, А.В. Методика совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона – субстрата и полупродукта синтеза лекарственного препарата «Дезаза-Триазавирин» методом ВЭЖХ / А.В. Баклыков, А.А. Тумашов, С.К. Котовская, Е.Н. Уломский, Г.Л. Русинов, В.Л. Русинов, О.Н. Чупахин, В.Н. Чарушин // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2017. – №2. – С. 146-150.
93. Strauss, C. R., Varma, R.S. *Microwaves in Green and Sustainable Chemistry // Microwave Methods in Organic Synthesis* / ed. by M. Larhed, K. Olofsson. – Heidelberg : Springer, 2006. – P. 199-231.
94. Gabriel, C. Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating / C. Gabriel, S. Gabriel, E.H. Grant, E.H. Grant, B.S.J. Halstead, D.M.P. Mingos // *Chemical Society Reviews*. – 1998. – Vol. 27. – P. 213-224.
95. Varma, R.S., Naicker, K.P. Synthesis of allylbenzenes. by cross-coupling of allyl bromide with arylboronic acids using a palladium chloride and tetraphenylphosphonium bromide intercalated clay catalyst // *Green Chemistry*. – 1999. – Vol. 1. – P. 247-249.
96. de la Hoz, A., Diaz-Ortiz, A., Moreno, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects // *Chemical Society Reviews*. – 2005. – Vol. 34. – P. 164-178.
97. Baig, R.B.N., Varma, R.S. Alternative energy input: mechanochemical, microwave and ultrasound-assisted organic synthesis // *Chemical Society Reviews*. – 2012. – Vol. 41. – P. 1559-1584.
98. Sarkar, A. A decade update on solvent and catalyst-free neat organic reactions: a step forward towards sustainability / A. Sarkar, S. Santra, S. K. Kundu, A. Hajra, G.V. Zyryanov, O.N. Chupakhin, V.N. Charushin, A. Majee // *Green Chem.* – 2016. – Vol. 18. – P. 4475-4525.
99. Grodowska, K., Parczewski, A. Organic solvents in the pharmaceutical industry // *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. – 2010. – Vol. 67. – P. 3-12.
100. Budisa, N., Schulze-Makuch, D. Supercritical Carbon Dioxide and Its Potential as a Life-Sustaining Solvent in a Planetary Environment // *Life*. – 2014. – Vol. 4. – P. 331-340.

101. Dugay, J., Hennion, M.-C. Evaluation of the performance of analytical procedures for the trace-level determination of aminotriazole in drinking waters // Trends in Analytical Chemistry. – 1995. – Vol. 14. – P. 407-414.