

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

На правах рукописи

БАКЛЫКОВ Артем Васильевич

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

2.6.10. Технология органических веществ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Екатеринбург – 2024

Работа выполнена в лаборатории гетероциклических соединений ФГБУН Институт органического синтеза им. И.Я. Пастера Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель: кандидат химических наук, старший научный сотрудник, **РУСИНОВ Геннадий Леонидович**

Официальные оппоненты: **БУРЫНДИН Виктор Гаврилович**, доктор технических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Уральский государственный лесотехнический университет», г. Екатеринбург, профессор кафедры технологий целлюлозно-бумажных производств и переработки полимеров;

ПЕТРОВ Александр Юрьевич, доктор фармацевтических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург, профессор кафедры фармации;

ШАБУНИНА Ольга Владимировна, кандидат химических наук, АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», доцент научного центра трансляционной медицины

Защита состоится «17» июня 2024 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета УрФУ 1.4.06.09 по адресу: г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, ауд. И-420 (зал Ученого совета).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»: <https://dissovet2.urfu.ru/mod/data/view.php?d=12&rid=5958>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета

Поспелова Татьяна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

Целью работы является разработка опытно-промышленной технологии получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин», 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-Триазавирин» 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 НТП-*L*-arg в рамках первой фазы клинических исследований. Предложена рецептура готовой лекарственной формы препарата на основе НТП-*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 НТП-*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-три-азоло-[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. Рецепт готовой лекарственной формы 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-Триазавирина» 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 14 научных работ, из них – 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ, 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.

Благодарности. Автор выражает сердечную благодарность и глубочайшую признательность научному руководителю диссертационной работы к.х.н., с.н.с. Г.Л. Русинову; д.х.н. Т.И. Горбуновой, д.х.н. Д.С. Копчуку и к.х.н. А.В. Щепочкину, за неоценимую помощь и поддержку при проведении исследования; к.т.н. Г.А. Артемьеву и к.х.н. А.А. Тумашову за безграничный приобретенный опыт; М.И. Кодессу и всему коллективу ЦКП «САОС» при ИОС УрО РАН за проведение аналитических измерений; д.х.н., профессору, чл.-корр. РАН В.Л. Русинову, д.х.н., профессору, академику РАН В. Н. Чарушину, д.х.н., профессору, академику РАН О. Н. Чупахину за помощь и поддержку при проведении диссертационного исследования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Литературный обзор

В рамках литературного обзора рассмотрены выполненные к настоящему времени исследования противовирусной активности субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин» в сравнении с ближайшим аналогом – противовирусным препаратом «Триазавирин», а также анализ литературных данных о методах синтеза 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинового цикла – ключевого структурного фрагмента субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин».

2 Разработка технологии получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин»

На основании анализа литературных данных и исследований, проведенных ранее на кафедре органической химии ХТИ УрФУ, был сделан выбор наиболее приемлемого метода получения целевого продукта в опытно-промышленных условиях, который состоит из следующих стадий (схема 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*]пиримидина **1a-d**) обработкой соединения **4** соответствующими основаниями: гидроксидом натрия, пиперидином, ремантадином и *L*-аргинином.

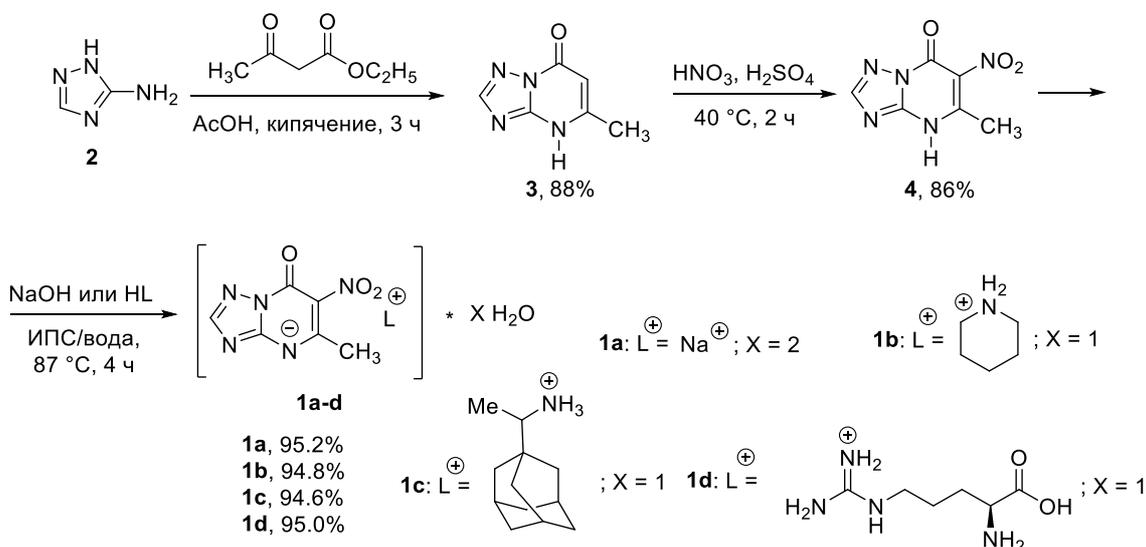


Схема 1

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

Синтез 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.

Данный процесс был масштабирован для получения 2.8 кг сухого очищенного 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]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.

В результате проведенных экспериментов установлено, что оптимальным режимом является выдержка реакционной массы при температуре кипения (107 ± 2 °C) в течение 1 ч с последующей отгонкой летучих компонентов в течение 2 ч, охлаждение образовавшейся суспензии до температуры 30 °C и фильтрование продукта. Выход **3** при этом составляет 81-88%.

Для контроля качества получаемых полупродуктов разработана методика совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** посредством ВЭЖХ (рисунок 1). Наиболее часто применяемая колонка с привитой обращенной октадецилсилановой фазой C18 не позволила достичь времени удерживания и разрешения пиков, достаточных для проведения точного количественного определения ввиду высокой полярности аминотриазола **2**. Поэтому для анализа была выбрана amino-пропилсилановая фаза и колонка Zorbax NH₂ длиной 150 мм, диаметром 4.6 мм и размером частиц сорбента 5 мкм, обеспечивающая большую симметрию пиков при меньшем времени анализа, по сравнению с колонкой Supelcosil LC-NH₂ при идентичном типоразмере. При выборе состава подвижной фазы были исследованы различные буферные растворы (0.01 М ацетат аммония в 0.04% гидроксиде аммония; 0.01 М ацетат аммония в 0.02% уксусной кислоте; 0.01 М ацетата аммония в 0.1% уксусной кислоте; 0.1% муравьиная кислота в воде) в разных соотношениях с ацетонитрилом и метанолом. Лучшие результаты достигнуты при использовании в качестве элюента 0.01 М ацетата аммония в 0.1% уксусной кислоте в объемном соотношении с ацетонитрилом 30:70. Методика не требует больших временных затрат, сложных процедур дериватизации и позволяет определять содержание аминотриазола **2** от 0.1 до 50.0% от полупродукта **3**.

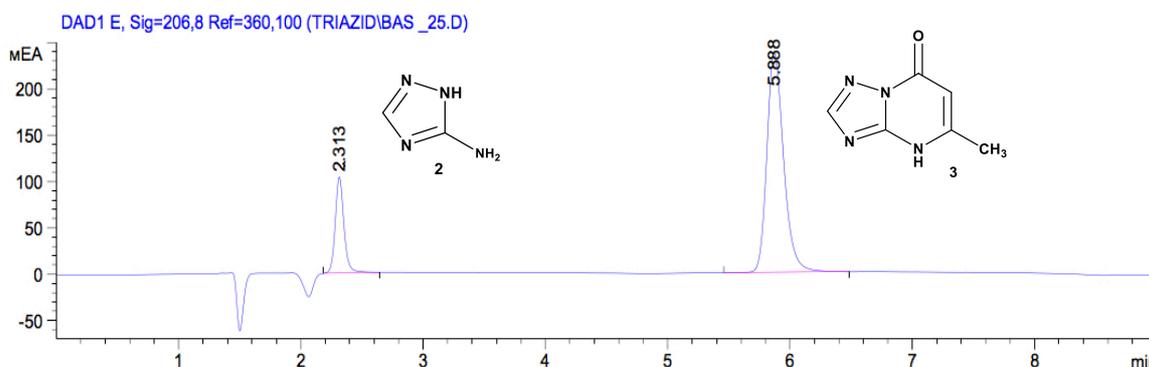


Рисунок 1 – Хроматограмма аминотриазола **2** ($t = 2.313$ мин) и триазолопиримидинона **3** ($t = 5.888$ мин) при совместном определении, УФ-детектирование, 206 нм

Валидация разработанной аналитической методики проведена по следующим характеристикам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность. По результатам показана возможность ее применения для контроля первой стадии процесса получения опытно-промышленных и промышленных партий активных АФС ряда «Дезаза-Триазавирина».

Результаты анализа произведенных опытных партий полупродукта **3**, осуществленный по данной методике, показали, что триазолопиримидинон **3**, получаемый после фильтрации и сушки, имеет чистоту не менее 99.5% и пригоден для дальнейшего использования без проведения дополнительной очистки путем перекристаллизации, описанной в лабораторной методике. Таким образом, удалось сократить число стадий производства.

Для оптимизации метода получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **3** с точки зрения снижения времени проведения процесса и возможности замены уксусной кислоты другими растворителями было изучено влияние на реакцию МКВ излучения и сверхкритических условий.

Проведение данной реакции циклоконденсации в условиях МКВ излучения с частотой 2455 МГц и мощностью 200 Вт было опробовано с варьированием таких показателей, как температура, время проведения процесса и используемый растворитель (таблица 1). Эксперименты показали, что уменьшение количества уксусной кислоты приводит к значительному снижению выхода продукта **3**, независимо от времени и температуры реакции. При этом установлено, что при проведении реакции в ледяной уксусной кислоте удается сократить необходимое время реакции со 180 мин до 10-20 мин при сохранении высокой конверсии и выхода.

Таблица 1 – Зависимость конверсии и препаративных выходов 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, % (выход, %)					
Без МКВ излучения, 500 мкл CH ₃ COOH	–	6.9*	–	–	94.2 (82)****
С применением МКВ излучения					
500 мкл CH ₃ COOH	92.5 (78)**	94.9 (83)**	80.7	83.1	–
5 мкл CH ₃ COOH + 495 мкл H ₂ O	13.1	19.1	2.8	2.6	–
500 мкл H ₂ O	14.8	15.7	7.5	7.0	–

*реакция проводилась при кипячении в ледяной уксусной кислоте;

** препаративные выходы указаны в скобках.

Эта же реакция исследована в сверхкритическом CO₂ при рабочем давлении 200 бар с использованием сверхкритической флюидной лабораторной реакционной установки Waters TI-ReacSyS-250-200. Экспериментально проведена оценка влияния температуры, используемых в технологическом процессе растворителей, а также кислот Льюиса SiO₂, TiO₂ и ZnCl₂ в качестве катализатора. Концентрацию аминотриазола **2**, триазолопиримидинона **3** и наличие предполагаемых примесей оценивали с использованием ранее приведенной методики ВЭЖХ с УФ-детектированием. Использование чистого сверхкритического CO₂ в отсутствие любых

других растворителей и катализаторов привело только к 5% конверсии. 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).

При проведении процесса в ледяной уксусной кислоте наибольшая конверсия (92%) была достигнута при температуре 150 °С и времени взаимодействия 180 мин (таблица 3).

При использовании кислоты Льюиса $ZnCl_2$ в качестве кислотного катализатора в отсутствие уксусной кислоты удалось достичь 90% конверсию при температуре 150 °С и времени взаимодействия 180 мин (таблица 4).

Таблица 2 – Зависимость степени конверсии реакции от температуры проведения процесса в сверхкритическом CO_2 в присутствии со-растворителей в течение 60 мин

Со-растворитель	Конверсия, % при температуре	
	110 °С	150 °С
Метанол (избыток)	0.1	1.0
Этанол (избыток)	0.0	1.0
CF_3CO_2H (0.1 экв.)	9.0	13.0

Таблица 3 – Зависимость степени конверсии реакции от температуры и длительности процесса в сверхкритическом CO_2 при проведении реакции в уксусной кислоте (3.0 экв.)

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

* препаративный выход

Таблица 4 – Зависимость степени конверсии реакции и препаративных выходов от температуры проведения процесса в сверхкритическом CO_2 в отсутствие растворителя в присутствии катализирующих добавок в течение 60 минут

Катализатор	Конверсия при температуре, %		
	110 °С	150 °С	190 °С
$ZnCl_2$ (0.1 экв.)	44	60	75% (69%)* (90% (88%)* в случае 180 мин)
TiO_2 (0.1 экв.)	23	33	-
SiO_2 (0.1 экв.)	24	31	-

* в скобках указаны препаративные выходы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что использование МКВ излучения и сверхкритического CO_2 в ходе синтеза триазолопиримидинона **3** является крайне перспективным, т.к. позволяет сократить время реакции и отказаться от применения традиционных растворителей. В то же время необходимо отметить, что отсутствие требуемого для этих исследований оборудования в полупромышленном или промышленном исполнении не позволило осуществить масштабирование синтеза с использованием этих подходов.

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

В ходе работы выполнена оптимизация второй стадии получения соединений ряда «Де-заза-Триазавирин» – нитрования триазолопиримидинона **3** нитрующей смесью с образованием 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]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, в дополнение к повышению безопасности, удалось снизить количество используемой на данной стадии серной кислоты на 10 % без ущерба выходу нитропроизводного **4**.

Известный лабораторный способ выделения нитротриазолопиримидинона **4** предполагал нейтрализацию нитрующей смеси раствором аммиака. Важным усовершенствованием этой стадии стал отказ от использования аммиака: для выделения целевого полупродукта реакционная масса по завершению синтеза разбавлялась водой, осадок отфильтровывался и перекристаллизовывался из воды. Данная процедура очистки оказалась эффективной благодаря разной растворимости триазолопиримидинона **3** и нитротриазолопиримидинона **4** в воде. Замена аммиака на дешевую и нетоксичную воду позволила уменьшить количество отходов, а также увеличить выход полупродукта **4** на 8-10 %. Усовершенствование процесса выделения и очистки позволило масштабировать стадию для получения 1.6 кг сухого очищенного 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она **4** за одну загрузку.

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

Для проведения анализа и разделения исследуемых веществ первоначально опробована ранее приведенная (п. 2.1) методика совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3**, однако, время удерживания нитротриазолопиримидинона **4** при этих условиях составляет 44.7 мин, а форма пика не соответствует критериям симметрии, что делает ее неприемлемой. В ходе подбора соотношения «буферный раствор – ацетонитрил» установлено, что элюирующая сила растворителя не оказывает прямого влияния на время удерживания нитротриазолопиримидинона **4**. Так, при изменении pH подвижной фазы в сторону более основной среды за счет увеличения доли ацетонитрила, происходило уменьшение времени удерживания нитротриазолопиримидинона **4**, а время удерживания триазолопиримидинона **3** практически не изменялось и оставалось на уровне неудерживаемых веществ. Таким образом, логичным решением данной проблемы стала замена буферного раствора на более основный. Лучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве элюента смеси ацетонитрила с 0.05 М раствором ацетата аммония в объемном соотношении 30:70. Используемая колонка – Zorbax NH₂ длиной 150 мм, внутренним диаметром 4.6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм. Детектирование осуществляли при трех длинах волн, соответствующих максимумам поглощения веществ: 206 нм – для аминотриазола **2**, 270 нм – для триазолопиримидинона **3** и 360 нм – для нитротриазолопиримидинона **4**.

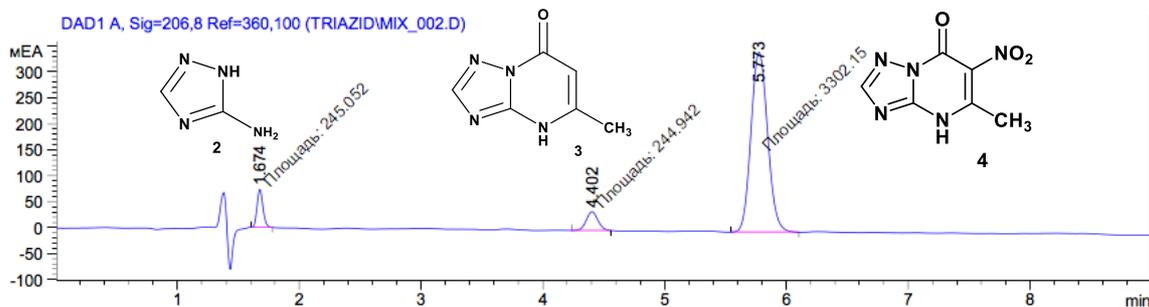


Рисунок 2 – Хроматограмма совместного определения аминотриазола **2** ($t = 1.674$ мин) триазолопиримидинона **3** ($t = 4.402$ мин) и нитротриазолопиримидинона **4** ($t = 5.773$ мин), колонка Zorbax NH₂, УФ-детектирование, 206 нм

Методика не требует больших временных затрат, сложных процедур дериватизации и позволяет определять содержание примесей аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** в диапазоне 0.1 – 4.0% и 0.1 – 8.0% от полупродукта **4** соответственно.

Проведена валидация разработанной аналитической методики по следующим параметрам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрिलाбораторная прецизионность, по результатам которой показана возможность ее применения для контроля 2 стадии процесса получения препаратов ряда «Дезаза-Триазавирина». Данная методика успешно применена при наработке опытных партий АФС.

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

Нами 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, выступающим 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, 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. Поэтому методика модифицирована с точки зрения последовательности смешения реагентов и включает в себя помещение сухих компонентов в реактор с последующим последовательным добавлением воды и изопропилового спирта при включенном перемешивающем устройстве. Для получения субстанций препаратов ряда «Дезаза-Триазавирина», содержащих катионы натрия, пиперидиния и ремантадиния (НТП-*Na*, НТП-*Pip* и НТП-*Rem*, соответственно), наиболее удачная методика была воспроизведена аналогичным образом. Усовершенствованный таким образом процесс был масштабирован для получения 1.8 кг сухого очищенного продукта.

Для контроля качества получаемых АФС разработана методика определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидиниды *L*-аргининия **1d** методом ВЭЖХ с УФ-детектированием (рисунок 3). Для проведения анализа и разделения исследуемых веществ

был использован буферный раствор на основе ацетата аммония, однако, при проведении анализа, установлено, что на хроматограммах регистрируется пик, соответствующий ацетату аргинина. Предположено, что при использовании ацетата аммония существует возможность ионообмена между молекулами подвижной фазы и продукта **1d** с образованием ацетата аргинина, 5-метил-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида аммония и 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида аммония, которые в ходе анализа могут обнаруживаться и фиксироваться на хроматограмме, усложняя интерпретацию его результатов. Поэтому логичным было решение заменить 0.05 М буферный раствор ацетата аммония в составе подвижной фазы на раствор ацетата аргинина. В итоге, 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.

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.

Проведена валидация разработанной аналитической методики по следующим параметрам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрिलाбораторная прецизионность, по результатам которой показана 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.

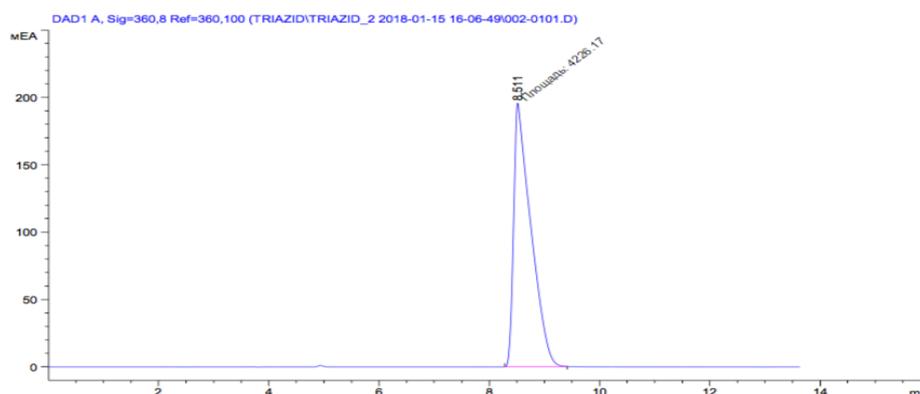


Рисунок 3 – Хроматограмма 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрата **1d**, УФ-детектирование, 360 нм

2.4 Построение технологической и аппаратурной схем производства

2.4.1 Процедура получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]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, включают перемешивание. Из мерника **1М** самотеком передают уксусную кислоту к 3-амино-1,2,4-триазолу 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-*a*]пиримидин-7-она **3** составляет 85% (ВР.1 – ТП.4, рисунок 4), чистота не менее 99.5%.

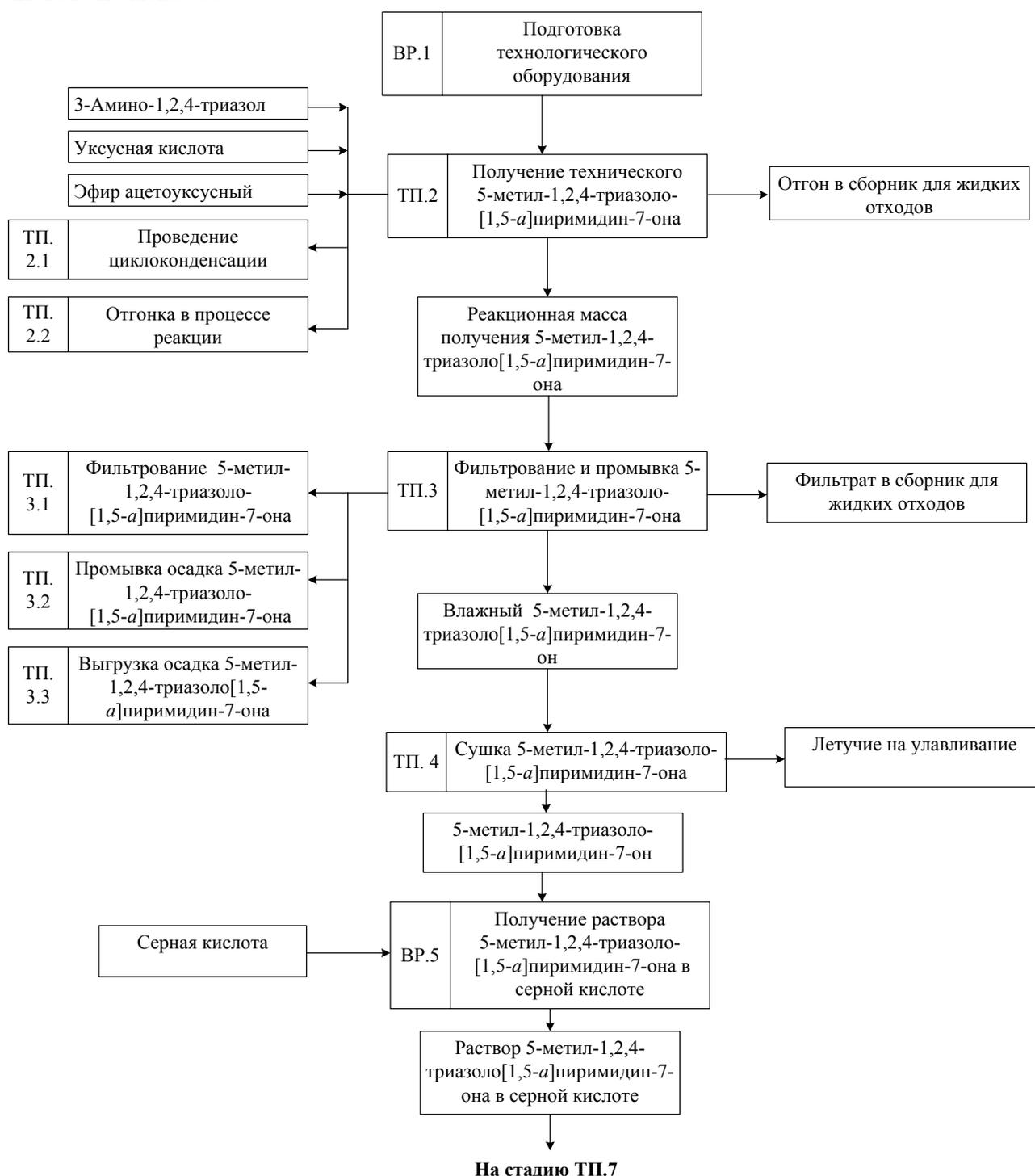


Рисунок 4 – Технологическая схема стадий ВР.1 – ВР.5

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

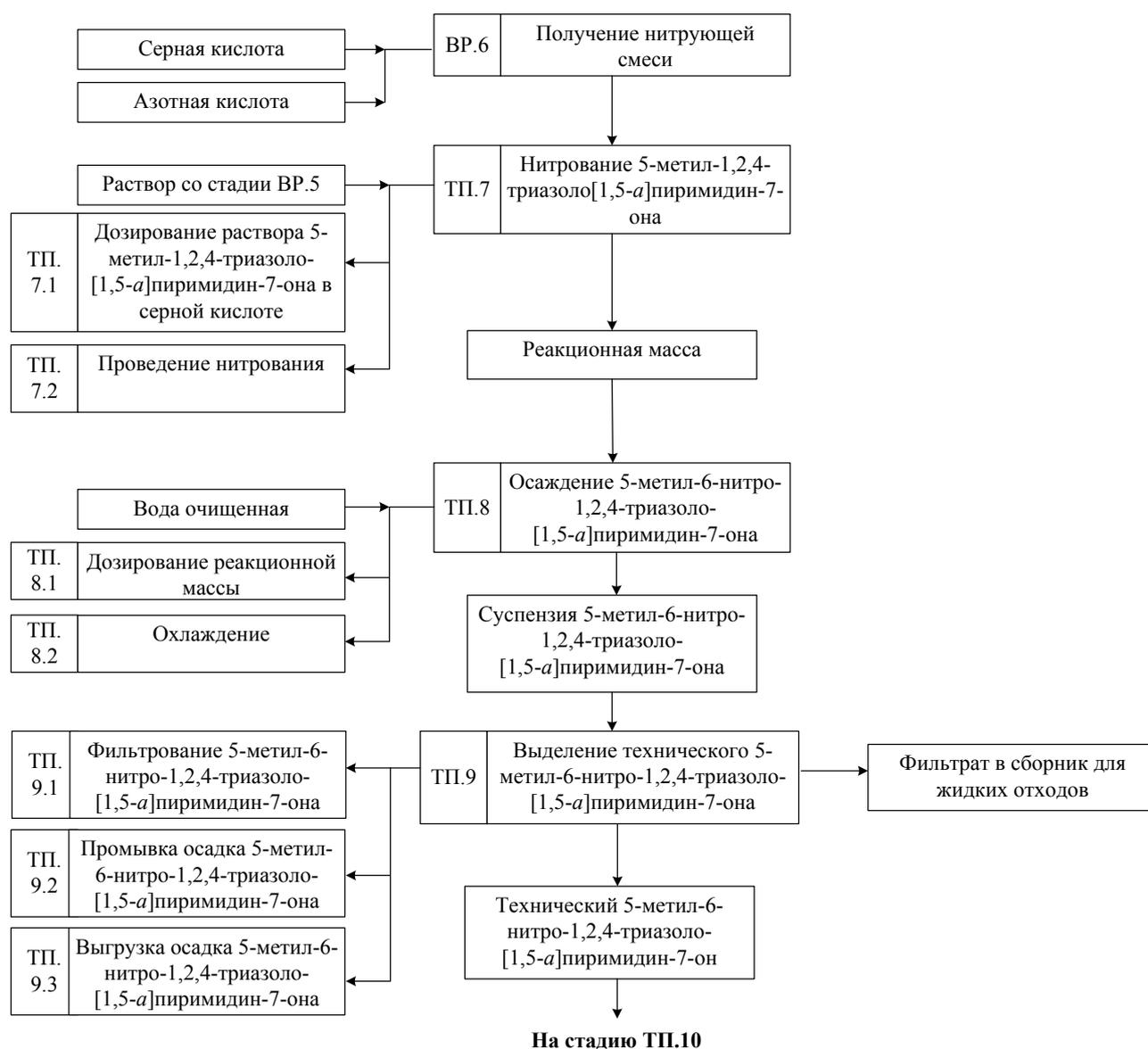


Рисунок 5 – Технологическая схема стадий BP.6 – TP.9

В мерник **9М** загружают концентрированную серную кислоту с помощью вакуума. В реактор **11Р** через люк загружают концентрированную азотную кислоту (70%), включают перемешивающее устройство. Азотную кислоту в реакторе **11Р** охлаждают до температуры 10 °С. Затем из мерника **9М** в реактор **11Р** 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 **11Р** начинают дозировать раствор 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она в серной кислоте из мерника **10М**, не допуская нагрева содержимого реактора **11Р** выше 40 °С. По окончании добавления раствора 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она 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 **12М** с помощью вакуума загружают очищенную воду, которую самотеком направляют в реактор **13Р**. Затем в реакторе **13Р** включают перемешивание, а в рубашку реактора подают теплоноситель, охлаждая содержимое до температуры не выше 20 °С. К охлажденной воде в реакторе **13Р** дозируют с помощью вакуума реакционную массу из реактора **11Р**, не допуская нагрева содержимого реактора **13Р** выше 40 °С. Затем содержимое реактора **13Р** охлаждают до 20 °С и выдерживают 30 мин. Суспензию из реактора **13Р** 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 **13Р**. 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 перегружают на поддоны (ВР.5 – ТП.9, рисунки 4, 5).

2.4.3 Процедура очистки технического 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]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-*a*]пиримидин-7-он. 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.

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 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% (ТП.10 – ТП.11, рисунок 6), чистота не менее 99.7%.

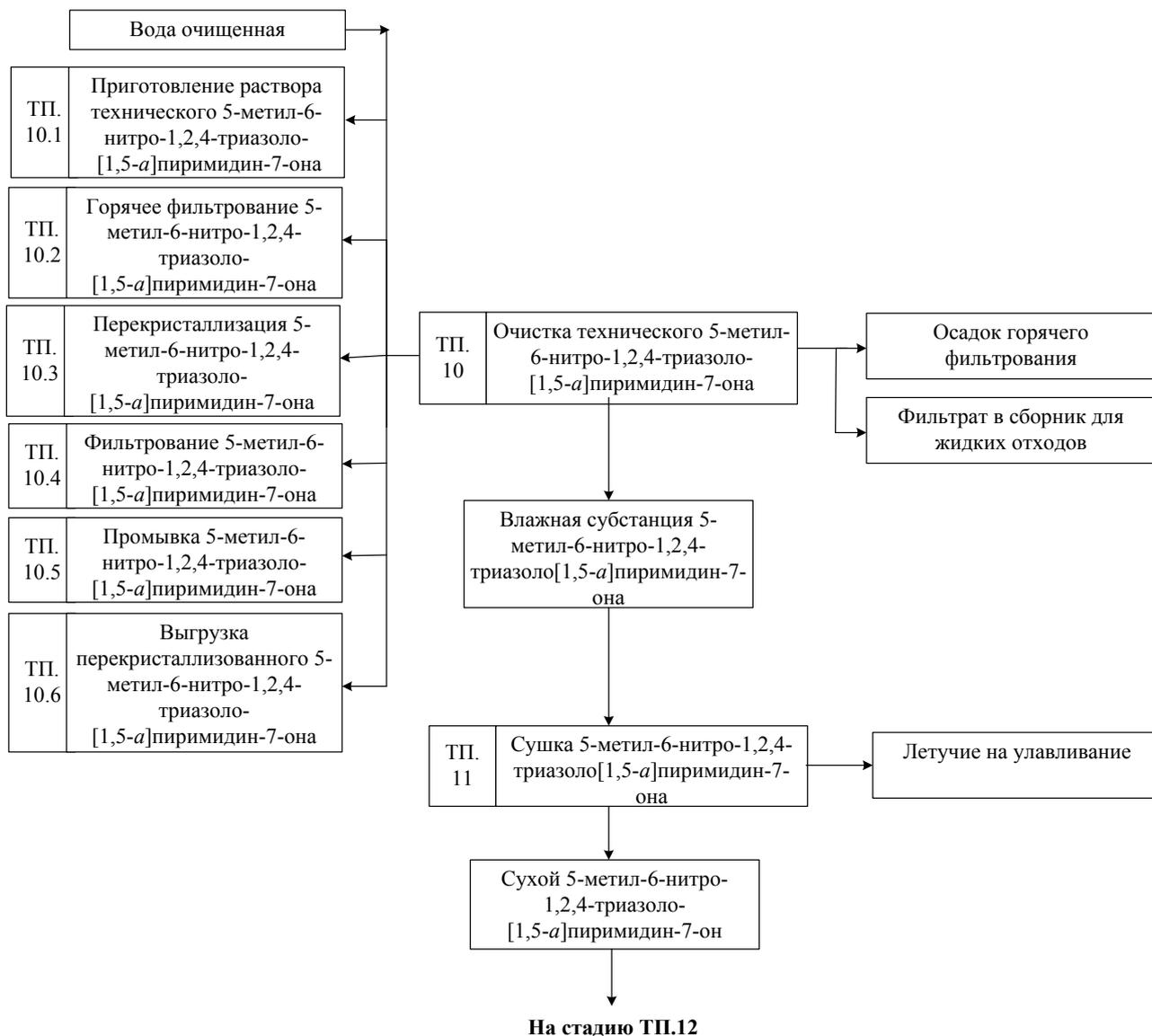


Рисунок 6 – Технологическая схема стадий ТП.10 – ТП.11

2.4.4 Процедура получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирин»

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-*a*]пиримидин-7-он. 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.

Полученную суспензию направляют с помощью вакуума в верхнюю емкость нутч-филтра 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% (ТП.12 – ТП.14, рисунок 7), чистота не менее 99.5%.

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

Аппаратурная схема процесса приведена на рисунке 8.



Рисунок 7 – Технологическая схема стадий ТП.12 – ТП.14

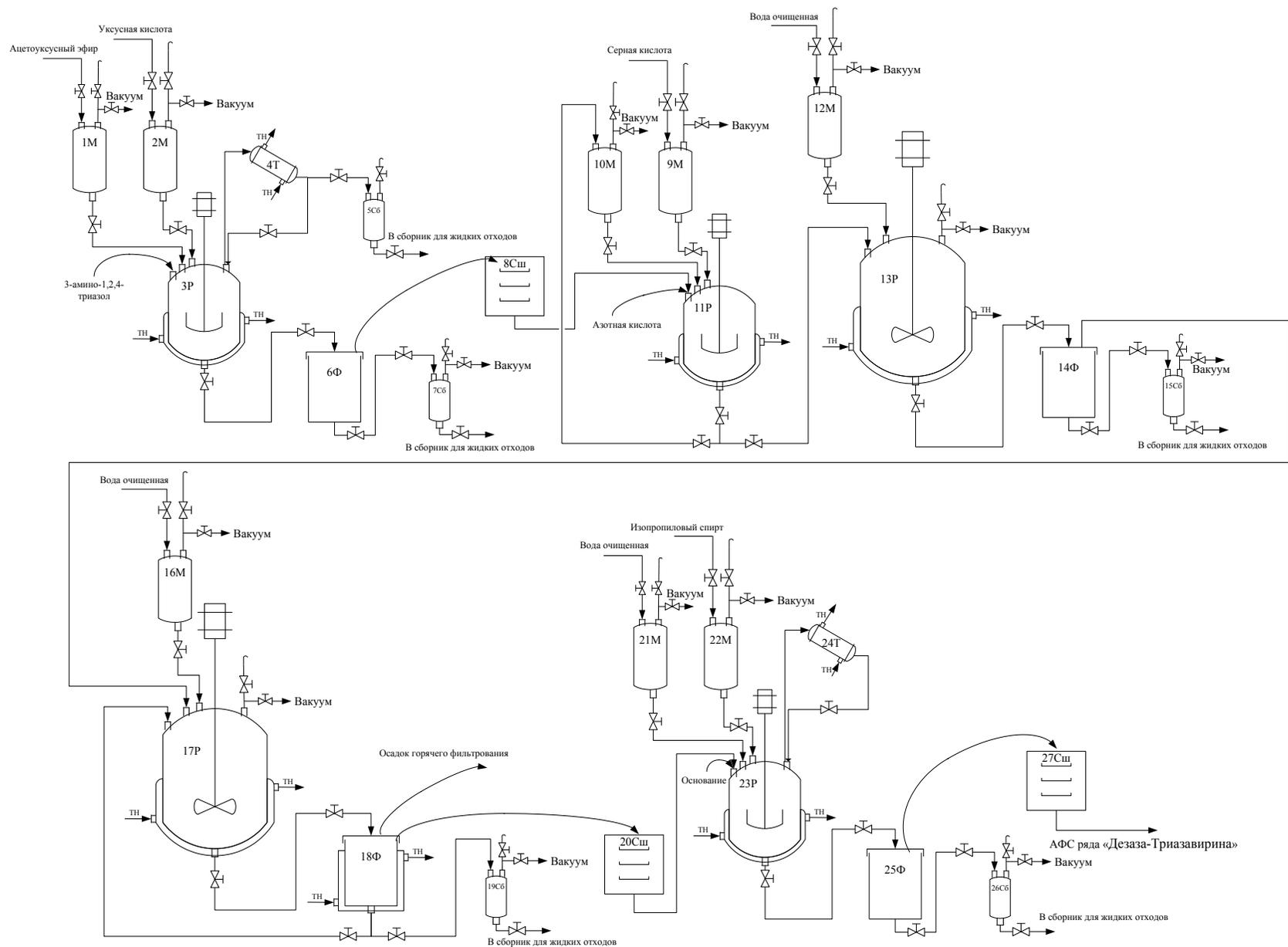


Рисунок 8 – Аппаратурная схема синтетического комплекса получения субстанций ряда «Дезаза-Триазавирина»

2.5 Исследование фармакокинетики препарата на основе 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия*

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

Для решения первой задачи изначально опробовали описанную ранее (п. 2.3) методику определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия **1d** в АФС, однако, форма пика основного вещества при описанных условиях не отвечала необходимым критериям симметрии. Также происходило наложение компонентов плазмы на хроматографический пик определяемого вещества. Для решения данной проблемы при выборе нового состава подвижной фазы были исследованы различные буферные растворы ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ в различных соотношениях, 0.01 М ацетат аммония в 0.04% гидроксиде аммония; 0.01 М ацетат аммония в 0.01% уксусной кислоте; 0.01 – 0.05 М ацетат аммония) в разных соотношениях с ацетонитрилом и метанолом. В результате чего в качестве подвижной фазы выбрана смесь 0.05 М раствора ацетата аммония с ацетонитрилом, а в ходе варьирования соотношения ацетонитрил – буферный раствор была выбрана оптимальная начальная точка элюирования – соотношение 4% ацетонитрила и 96% буферного раствора с постепенным увеличением концентрации ацетонитрила до 25% в ходе анализа.

В качестве экстрагирующего агента нами были опробованы ацетонитрил, метанол, этанол и этилацетат. Использование этилацетата дало наилучшие результаты, т.к. количество переносимых в пробу компонентов плазмы крови резко снизилось в результате использования слабо полярного 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 от 0.03 до 20.00 мкг/мл; предел детектирования 0.0096 мкг/мл.

После подготовки пробы разделение НТП-*L*-arg 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 (рисунок 9).

Проведена валидация разработанной аналитической методики по следующим параметрам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрिलाбораторная прецизионность, по результатам которой показана возможность ее применения для осуществления фармакокинетических исследований препарата на основе АФС НТП-*L*-arg.

На следующем этапе работы на здоровых добровольцах проведено исследование фармакокинетики препарата на основе АФС НТП-*L*-arg в нескольких дозовых режимах.

* 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.

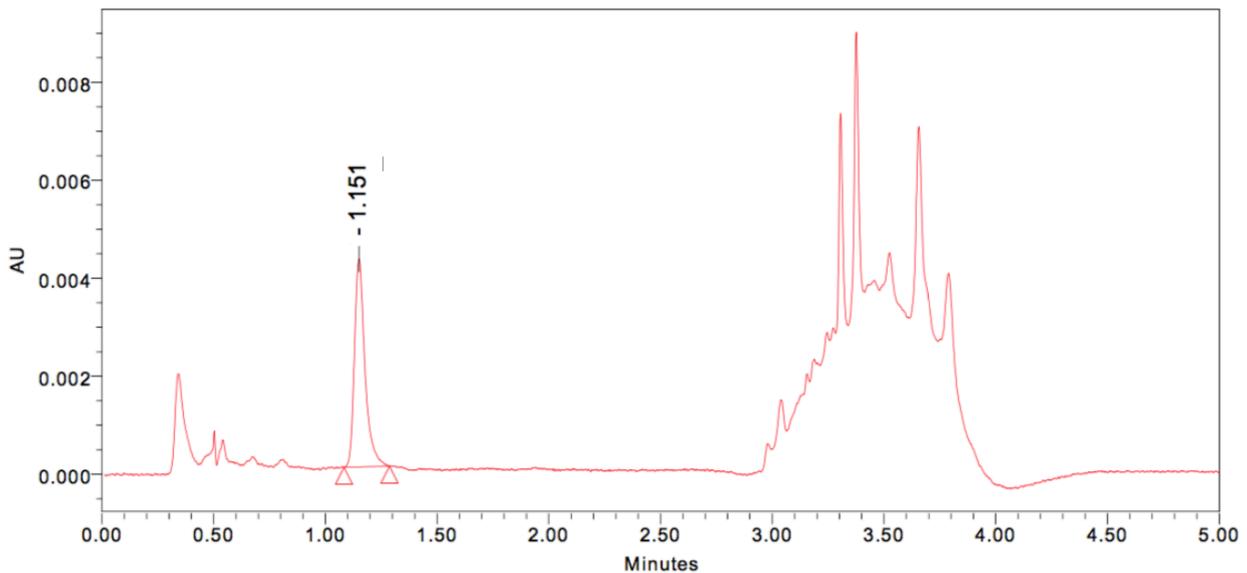


Рисунок 9 – Хроматограмма 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидина *L*-аргининия моногидрата **1d** в плазме крови человека, УФ-детектирование, 358 нм

Изучение фармакокинетики препарата показало, что после приема внутрь НТП-*L*-arg 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: при однократном приеме 300 мг НТП-*L*-arg время достижения максимальной концентрации составляет в среднем 4 ч, при длительном приеме – 1 ч. 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 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. Профиль убывания концентрации НТП-*L*-arg представлен на рисунке 10.

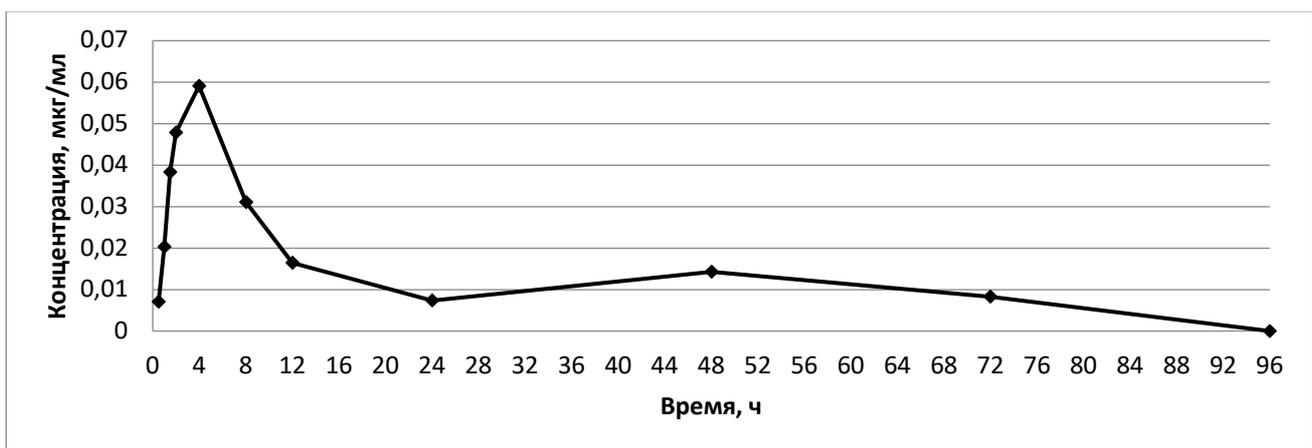


Рисунок 10 – Кривая убывания концентраций НТП-*L*-arg после приема однократной дозы 300 мг

2.6 Рецептuru готовой лекарственной формы препарата ряда «Дезаза-Триазавирин»*

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

Ниже представлен состав готовой лекарственной формы – капсул №1 препарата на основе АФС НТП-*L*-arg (таблица 5):

Таблица 5 – 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
Гидроксипропилцеллюлоза 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% водный р-р 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: 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинида *L*-аргининия моногидрат **1d** и МКЦ загружают в емкость смесителя-гранулятора и тщательно перемешивают в течение 2-5 мин, увлажняют 2% раствором ГПМЦ и натрия лаурилсульфата и перемешивают в течение 3-5 мин. Увлажненную массу протирают через сито с размером отверстий 2 мм.

3. Полученные влажные гранулы сушат на установке псевдоожиженного слоя до остаточной влаги 2%.

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

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

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:

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

- выбран и усовершенствован метод получения 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-она в результате циклоконденсации 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*]пиримидинидина с различными катионами.

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

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*]пиримидинидина *L*-аргининия моногидрата.

4. Разработаны аналитические методики контроля качества получаемого препарата ряда «Дезаза-Триазавирина» 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-Триазавирина» методом ВЭЖХ на примере 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинидина *L*-аргининия моногидрата;

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

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

*статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, определенных
ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ*

1. **Баклыков А. В.** Улучшенная методика количественного определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинидина l-аргининия моногидрата – действующего вещества лекарственного препарата «Триазид» в плазме крови человека методом ультра-ВЭЖХ / **А.В. Баклыков**, А.А. Тумашов, Г.Л. Русинов, В.Л. Русинов, В.Н. Чарушин, Д.С. Копчук // Бутлеровские сообщения. – 2018. – Т.55. – №7. – С. 148–154 (0,44 п.л./0,24 п.л.).
2. **Baklykov A. V.** Synthesis of 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one – a semi-product of the synthesis of antiviral drug triazide® in the conditions of microwave excitation / **Artem V. Baklykov**, Gennady L. Rusinov, Grigory A. Artem'ev, Dmitry S. Kopychuk, Grigory V. Zyryanov, Vladimir L. Rusinov, Valery N. Charushin // AIP Conference Proceedings. – 2019. – Vol.2063. – 040005 (0,25 п.л./0,15 п.л.) (Scopus, Web of science).
3. **Baklykov A. V.** Synthesis of 5-Methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine-7(4H)-one in Supercritical Carbon Dioxide / A. V. Baklykov, G. L. Rusinov, V. L. Rusinov, V. N. Charushin, D. S. Kopychuk, G. V. Zyryanov, G. A. Artemyev // Russian Journal of General Chemistry. – 2019. – Vol.89, №1. – P. 151–152 (0,13 п.л./0,07 п.л.) (Scopus, Web of science).
4. **Baklykov A. V.** Comparison of methods of synthesis of 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one in supercritical carbon dioxide / **Artem V. Baklykov**, Gennady L. Rusinov, Grigory V. Zyryanov, Dmitry S. Kopychuk, Valery N. Charushin, Grigory A. Artem'ev, Vladimir L. Rusinov, Albert F. Khasanov // AIP Conference Proceedings. – 2020. – Vol.2280. – 0018786 (0,31 п.л./0,15 п.л.) (Scopus, Web of science).

Публикации в других научных изданиях:

5. **Баклыков А. В.** Методика совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона – субстрата и полупродукта синтеза лекарственного препарата «Триазид» 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(19). – С. 146–150 (0,31 п.л./0,13 п.л.).
6. **Баклыков А. В.** Методика совместного определения аминотриазола, триазолопиримидинона и нитротриазолопиримидинона – субстрата и полупродуктов синтеза лекарственного препарата «Триазид» 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. – №4(21). – С. 98–102 (0,31 п.л./0,14 п.л.).
7. **Баклыков А. В.** Методика определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинидина l-аргининия моногидрата – действующего вещества лекарственного препарата «Триазид» методом ВЭЖХ / **А.В. Баклыков**, А.А. Тумашов, С.К. Котовская, Е.Н. Уломский, Г.Л. Русинов, В.Л. Русинов, Д.С. Копчук, О.Н. Чупахин, В.Н. Чарушин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – №2(23). – С. 78–83 (0,38 п.л./0,16 п.л.).

8. Деева Э.Г. Новый противовирусный препарат «Триазид». Результаты I фазы клинического исследования / Э.Г. Деева, Ю.И. Шевчик, А.А. Шалджан, К.А. Загородникова, А.А. Тумашов, **А.В. Баклыков**, С.К. Котовская, О.Н. Чупахин, В.Н. Чарушин, В.Л. Русинов, Д.С. Копчук // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – №3(24). – С. 172–180 (0,56 п.л./0,11 п.л.).
9. **Баклыков А. В.** Особенности совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона методом ВЭЖХ / **Баклыков А.В.**, Тумашов А.А., Русинов Г.Л., Русинов В.Л. // Сборник тезисов конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». Краснодар, 2017. – С. 105 (0.10 п.л. / 0.04 п.л.).
10. **Баклыков А. В.** Особенности совместного определения триазолопиримидинона и нитротриазолопиримидинона методом ВЭЖХ / **Баклыков А.В.**, Тумашов А.А., Русинов Г.Л., Русинов В.Л. // Третий съезд аналитиков России. Сборник тезисов докладов. Москва, 2017. – С. 150 (0.12 п.л. / 0.05 п.л.).
11. **Баклыков А. В.** Влияние микроволнового излучения на синтез 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7(4H)-она / **Баклыков А.В.**, Тумашов А.А., Русинов Г.Л.// Сборник тезисов конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». Екатеринбург, 2017. – С. 393 (0.12 п.л. / 0.05 п.л.).
12. **Baklykov, A.V.** Synthesis of 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5- α]pyrimidin-7(4H)-one – a semi-product of the synthesis of antiviral drug Triazide® in the conditions of microwave excitation. / **A.V. Baklykov**, G.L. Rusinov, G.A. Artem'ev, D.S. Korchuk, G.V. Zyryanov, V.L. Rusinov, V.N. Charushin // II Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM2018). Тезисы докладов. Екатеринбург. – 2018. – С. DR-47. (0.12 п.л./0.02 п.л.)
13. **Баклыков, А.В.** Сравнение методов синтеза 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5- α]пиримидин-7(4H)-она в сверхкритическом диоксиде углерода / **А.В. Баклыков**, Г.Л. Русинов, Г.В. Зырянов, Д.С. Копчук, В.Н. Чарушин, Г.А. Артемьев, В.Л. Русинов, А.Ф. Хасанов // III Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM2019). Сборник тезисов. Екатеринбург. – 2019. – С. 3Д-83 (0.12 п.л./0.02 п.л.)
14. **Баклыков А. В.** Особенности количественного определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5- α]пиримидинидина l-аргининия моногидрата методом ВЭЖХ/ **Баклыков А.В.**, Тумашов А.А., Русинов Г.Л.// Сборник тезисов конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». Екатеринбург, 2018. – С. 69 (0.12 п.л. / 0.05 п.л.).