

**Показатели воспроизводимости и повторяемости метода количественного определения соединения VMA-99-56 с использованием ВЭЖХ в диапазоне линейной зависимости площади хроматографического пика от концентрации растворов ( $M \pm m$ )**

Концентрация, мкг/мл	Повторяемость, $\pm \Delta$ %			Воспроизводимость (ср. ошибка измерения), %
	1-й день	2-й день	3-й день	
0,5	—	—	—	—
1	-3,7	0,52	27,51	10,57
5	7,8	17,57	28,04	17,80
10	0,6	13,44	32,79	15,61
25	7,2	-3,29	52,95	18,95

При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения водных растворов соединений при комнатной температуре, средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, показывая стабильность изучаемых веществ. При изучении влияния процессов замораживания и таяния было обнаружено, что средние абсолютные про-

центные колебания для изучаемых веществ находились в тех же пределах, что определяет стабильность веществ под влиянием данных факторов.

Разработанные хроматографические методы анализа обладают достаточной селективностью и позволяют определять в биологических пробах как само лекарственное вещество, так и его возможные метаболиты. При этом время удерживания стандарта позволяет отделять возможные метаболиты с меньшими временами удерживания от "мертвого объема" и фоновых веществ биологической пробы.

Методы извлечения подобраны оптимально и практически не влияют на среднюю ошибку измерения хроматографических методов количественного определения.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанные методы количественного определения являются высокоселективными и высокочувствительными, что позволяет эффективно использовать их для проведения фармакокинетических исследований.

© Коллектив авторов, 2006

УДК 615.31:547.854.4:542.91:615.281.8

## ВЛИЯНИЕ АЛКИЛЬНЫХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ В БОКОВОЙ ЦЕПИ ПРИ ЭКЗОЦИКЛИЧЕСКОМ АТОМЕ АЗОТА НА АНТИ-ВИЧ-1 АКТИВНОСТЬ *IN VITRO* НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1-(БЕНЗИЛОКСИМЕТИЛ)-5-(АРИЛАМИНО)УРАЦИЛА

А.А. Лобачев, А.А. Озеров, М.С. Новиков, Т. Хартман, Р.У. Букхайт

НИИ фармакологии ВолГМУ

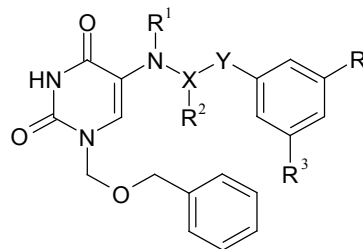
Антивирусный потенциал производных 5-(ариламино)урацила остается до настоящего времени не выясненным, несмотря на их структурное подобие многим высокоактивным противовирусным агентам нуклеозидной природы, применяющимся для лечения ВИЧ-инфекции в качестве важнейших компонентов комплексной высокоинтенсивной антиретровирусной терапии [5, 7], что делает перспективным и актуальным поиск новых противовирусных лекарственных средств на их основе [1–3]. Ранее в лаборатории синтеза противовирусных средств НИИ фармакологии ВолГМУ было обнаружено, что структурная модификация базовой структуры 1-(бензилоксиметил)-5-(ариламино)урацила, заключающаяся во введении дополнительных алкильных заместителей в различные положения боковой цепи при атоме азота  $N^1$ , привела в целом к снижению антивирусных свойств соединений данного ряда, повышению цитотоксичности и увеличению ингибиторной концентрации приблизительно на порядок [4].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияние дополнительных алкильных заместителей в ариламинном фрагменте новых производных 1-(бензилоксиметил)-5-(ариламино)урацила на их вирусингибиторные свойства.

#### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами были синтезированы новые  $N^1$ -замещенные производные 5-аминоурацила общей формулы:

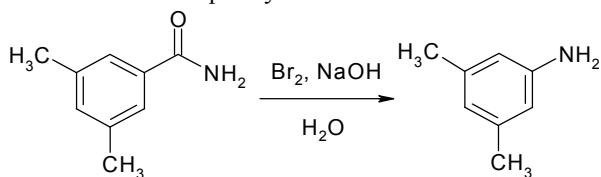


где: X = связь, CH, CH<sub>2</sub>; Y = связь, CH<sub>2</sub>; R<sup>1</sup> = H, CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; R<sup>3</sup> = H, CH<sub>3</sub>.

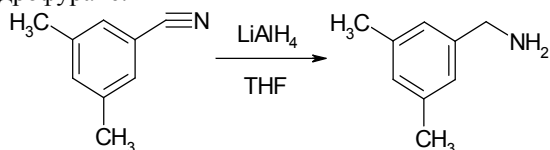
Первый этап синтеза включал получение метилированных в аминогруппу боковую цепь и аромати-

ческое ядро производных анилина, бензиламина и фенетиламина.

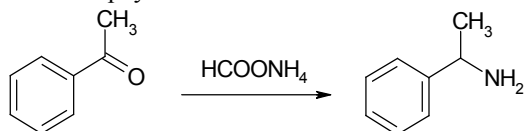
3,5-Диметиланилин был получен из соответствующего амида 3,5-диметилбензойной кислоты окислением по Гофману:



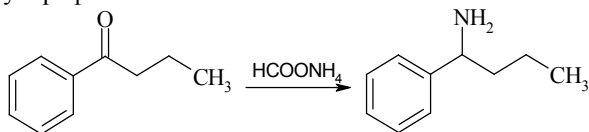
3,5-Диметилбензиламин синтезировали путем восстановления нитрила 3,5-диметилбензойной кислоты алюмогидридом лития в абсолютном тетрагидрофуране:



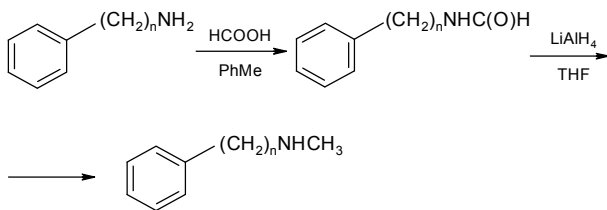
$\alpha$ -Метилбензиламин получали восстановительным аминированием ацетофенона формиатом аммония по Лейкарту:



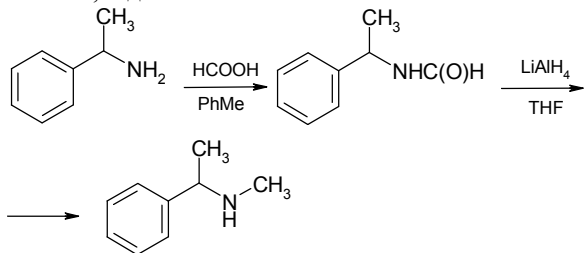
$\alpha$ -Пропилбензиламин получали аналогично из бутирофенона:



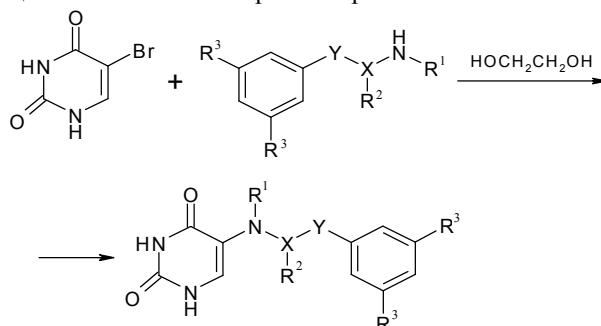
N-Метилпроизводные бензиламина и фенетиламина ( $n=1$  или 2) синтезировали в две стадии: прямым формилированием исходных жирноароматических аминов муравьиной кислотой с азеотропной отгонкой воды с толуолом и последующим восстановлением полученных формамидов алюмогидридом лития:



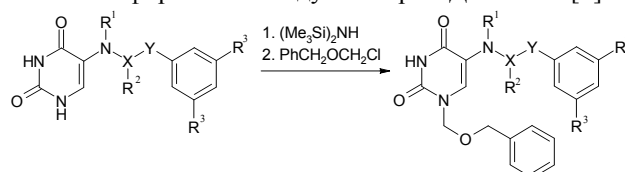
Аналогичным образом ранее полученный  $\alpha$ -метилбензиламин был превращен сначала в формиат, а затем в  $\alpha,N$ -диметилбензиламин:



Второй этап синтеза включал аминирование 5-бромурацила полученными метилированными аминами. Реакцию проводили в среде безводного кипящего этиленгликоля при 3–5-кратном избытке амина:



На заключительном этапе синтеза полученные 5-(ариламино)-урацилы алкилировали бензилхлорметиловым эфиром по методу Гилберта–Джонсона [8]:



Целевые соединения были очищены перекристаллизацией из 2-пропанола. Химическое строение полупродуктов и конечных веществ доказано методом ПМР-спектроскопии.

Противовирусные свойства синтезированных соединений *in vitro* в отношении ВИЧ-1 были изучены в ImQuest BioScience Inc. (Мериленд, США). Исследование анти-ВИЧ-1 активности *in vitro* проводили в культуре СЕМ-SS-клеток, которые суспендировали в культуральной среде в количестве 105 клеток/мл и инфицировали ВИЧ-1 (штамм НТЛВ-ПВВ) при мультипликации инфекции, равной 0,2. Немедленно после инфицирования вирусом вносили растворы, содержащие различные концентрации исследуемого вещества в ДМСО, и инкубировали в течение 4 суток при температуре 37 °С. Число живых клеток устанавливали по окончании инкубации при помощи бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия, при этом определяли концентрацию вещества, которая на 50% защищала СЕМ-SS-клетки от цитопатического эффекта ВИЧ-1 (EC<sub>50</sub>).

Цитотоксичность соединений изучали параллельно в неинфицированных культурах клеток, при этом определяли концентрацию вещества, которая на 50% уменьшала количество живых СЕМ-SS-клеток (CC<sub>50</sub>). Расчетным путем определяли индекс селективности, являющийся отношением цитотоксической концентрации к ингибиторной концентрации: SI = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> [6].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы были синтезированы новые производные 1-(бензилоксиметил)-5-(ариламино)урацила, представленные в таблице.

## Структура и физико-химические свойства синтезированных соединений

Соединение	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	X	Y	Брутто-формула	Т. пл., °С	Выход, %
1	H	–	CH <sub>3</sub>	связь	связь	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	119–122	60
2	CH <sub>3</sub>	–	H	CH <sub>2</sub>	–	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	103–105	86
3	H	CH <sub>3</sub>	H	CH	–	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	194–197	87
4	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	CH	–	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		47
5	H	–	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	–	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	126–129	62
6*	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH	–	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	162–163	28
7	CH <sub>3</sub>	–	H	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	136–139	79

\* – соединение 6 выделено в виде гидрохлорида.

В результате исследования анти-ВИЧ-1 активности было установлено, что в ряду 1-(бензилоксиметил)-5-(фениламино)урацила введение метильных групп в ариламидный фрагмент значительно повышает эффективную концентрацию до величины EC<sub>50</sub> > 100 мкМ с одновременным понижением цитотоксического порога CC<sub>50</sub> = 40,3 мкМ (соединение 1) в сравнении с исходным 1-(бензилоксиметил)-5-(фениламино)урацилом (EC<sub>50</sub> = 88,5 мкМ; CC<sub>50</sub> > 100 мкМ) [3].

Наоборот, в ряду 1-(бензилоксиметил)-5-(бензиламино)урацила введение дополнительных метильных групп в ариламидный фрагмент на порядок понижает эффективную концентрацию (для соединений 2 и 3 значения EC<sub>50</sub> = 6,1 и 8,4 мкМ соответственно) с сохранением низкой цитотоксичности (CC<sub>50</sub> > 100 мкМ для обоих веществ), а для соединения 5 этого ряда эффективная концентрация снизилась на два порядка и составила EC<sub>50</sub> = 0,7 мкМ при значительно меньшем увеличении цитотоксичности (CC<sub>50</sub> = 43,1 мкМ). Было отмечено, что введение пропильного фрагмента (соединение 4) значительно повышало эффективную и понижало цитотоксическую концентрации (EC<sub>50</sub> > 100 мкМ и CC<sub>50</sub> = 19,0 мкМ), т. е. ухудшало антивирусные свойства соединения.

В ряду соединений ряда 1-(бензилоксиметил)-5-(фенетиламино)-урацила дополнительное метилирование также оказывает существенное влияние на величину эффективной и цитотоксической концентраций, при этом введение метильной группы к экзоциклическому атому азота усиливает противовирусный эффект более чем в 4 раза (соединение 7) – EC<sub>50</sub>

= 19,9 мкМ и CC<sub>50</sub> > 100 мкМ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наиболее выраженные антивирусные свойства в отношении ВИЧ-1 *in vitro* продемонстрировал 1-(бензилоксиметил)-5-(3,5-диметилбензиламино)урацил с величиной эффективной концентрации 0,7 мкМ, который может служить основой для дальнейшей структурной модификации с целью поиска новых высокоактивных анти-ВИЧ-1 агентов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Озеров А.А., Новиков М.С. // Вестн. ВолГМУ. – 1999. – Т. 55, Вып. 5. – С. 44–46.
2. Озеров А.А., Новиков М.С., Брель А.К. // Современные проблемы фармацевтической науки и практики. – М., 1999. – Ч. 2. – С. 75–79.
3. Озеров А.А., Новиков М.С., Брель А.К. и др. // Химия гетероциклических соединений. – 1998. – Вып. 5. – С. 691–697.
4. Озеров А.А., Новиков М.С., Лобачев А.А., Гнатюк В.П., Бужайт П.У. // Бюлл. ВНИЦ РАМН и АВО. – 2004. – № 1. – С. 26–28.
5. Buckheit R.W. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2001. – Vol. 45. – P. 393–400.
6. Buckheit R.W., White E.L., Fliakas-Boltz V., et al. // Antimicrob. Agents Chemoter. – 1999. – Vol. 43. – P. 1827–1834.
7. Louie J.K., Hsu L.C., Osmond D.H., et al. // J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 186, № 7. – P. 1023–1027.
8. Nishimura T., Shimizu B., Iwai I. // Chem. Pharm. Bull. – 1963. – Vol. 11, № 11. – P. 1470–1472.

© Коллектив авторов, 2006

УДК 615.3:001:616–052

## ИНФОРМИРОВАННОСТЬ ПАЦИЕНТОВ О КОНФЛИКТЕ ИНТЕРЕСОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

В.Л. Аджиенко

*Кафедра клинической фармакологии и интенсивной терапии с курсами клинической фармакологии, клинической аллергологии, восстановительной терапии и курортологии ФУВ ВолГМУ*

Сложность набора испытуемых в клинические исследования (КИ) лекарственных средств (ЛС) является распространенной проблемой, стоящей в од-

ном ряду с важнейшими вызовами современной биоэтики и фармакологии [2]. При ее решении затрагиваются вопросы информированного согласия на уча-