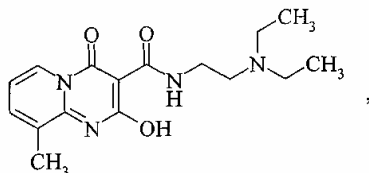


UA⁽¹⁹⁾

виявляв би високу активність відносно вірусу простого герпесу як *in vitro*, так і *in vivo* в більш низьких концентраціях.

Завдання винаходу вирішується шляхом одержання діетиламіноетиламиду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти формули:



який виявляє активність відносно вірусу простого герпесу.

Заявлену сполуку синтезують взаємодією етилового ефіру 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти з діетиламіно-етиламіном при кип'ятінні зі зворотнім холодильником з подальшим відокремленням утвореного осаду.

Винахід ілюструються наведеними нижче прикладами.

Приклад 1. Одержання діетиламіноетиламиду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти. До розчину 2,48г (0,01моль) етилового ефіру 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти в 15мл етилового спирту додають 2,11мл (0,015моль) діетиламіноетиламіну і кип'ятять зі зворотнім холодильником протягом 10 годин. Охолоджують, розбавляють реакційну суміш діетиловим ефіром. Осад діетиламіноетиламиду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти відфільтровують, ретельно промивають діетиловим ефіром, сушать. Вихід 2,61г (82%). Т. пл. 84-86°C. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д. (J, Гц): 9.70 (1H, т, J = 5.1, NH); 8.81 (1H, д, J = 7.0, H-6); 7.93 (1H, д, J = 6.9, H-8); 7.24 (1H, т, J = 7.1, H-7); 3.42 (2H, к, J = 6.1, NHCH_2); 2.59 (6H, м, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2$); 2.42 (3H, с, 9- CH_3); 0.98 (6H, т, J = 7.1, 2 CH_3). Знайдено, %: С 60.44; Н 6.90; N 17.51. $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3$. Вираховано, %: С 60.36; Н 6.97; N 17.60. (Спектр ЯМР ^1H варіанту заявленої сполуки зареєстровано на приладі Varian Mercury-VX-200 (200МГц) в розчині $\text{DMSO}-d_6$, внутрішній стандарт ТМС).

Приклад 2. Цитотоксичність діетиламіноетиламиду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти. Створення ефективних і разом з тим безпечних протівірусних препаратів є однією з найскладніших проблем сучасної фармацевтичної хімії та медицини. Складність ця полягає в необхідності виявлення речовин, здатних вибірково подавляти репродукцію вірусу, не зачіпаючи при цьому процесів життєдіяльності клітин макро-організму. Враховуючи дану обставину, перш за все нами визначена цитотоксичність діетиламіноетиламиду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти. Для цього були використані культури перевитих клітин нирки ембріону теляти (НТ) та коронарних судин теляти (КСТ). Перші вирощували в середовищі 199 з додаванням 10% бичачої сироватки,

другі - в середовищі, яке складалось з рівних об'ємів середовища Ігла та середовища 199 з 10%-ним вмістом бичачої сироватки. Для попередження можливого бактеріального забруднення живильних середовищ в процесі проведення експериментальних досліджень в них додавали антибіотики - пеніцилін і стрептоміцин. Обидва види клітин культивували в термостаті при 37°C і рН середовища 7.2-7.4 протягом 2-х діб. Після цього ростове середовище з пробірок видаляли, а до сформованого моношару культуральних клітин додавали по 0,2мл водного розчину заявленої сполуки в концентрації 0,25% та по 0,8мл підтримуючого живильного середовища. Пробірки - 10 штук - інкубували при 37°C, спостерігаючи за ними протягом 7-8 діб. Контролем служили пробірки з клітинними культурами без додавання заявленої сполуки. Цитотоксичність визначали шляхом перегляду в мікроскопі при малому ($\times 10$) збільшенні за порушеннями моношару та зміною морфології клітин у вигляді їх округлення, зморщування чи відторгнення дегенерованих клітин від поверхні скла.

Як виявилось, діетиламіноетиламід 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти в 0,25%-ній концентрації протягом декількох діб взагалі не проявляв цитотоксичної дії. Лише на 5-ту добу спостережень з'явилися перші ознаки токсичного ураження. Однак до означеного строку аналогічні зміни відмічалися і в контрольних культурах клітин. Таким чином, на підставі проведених досліджень можна стверджувати, що одному з основних критеріїв, які враховуються при відборі речовин з потенційною протівірусною активністю - відсутності цитотоксичного впливу на клітини макро-організму - 0,25%-ний водний розчин заявленої діетиламіноетиламиду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти повністю відповідає.

Приклад 3. Протигерпесна активність діетиламіноетиламиду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти в дослідях *in vitro*. ДНК-вміщуючий ВПГ-1 найбільш розповсюджений в родині Herpesviridae, тому саме він і був обраний як тест-вірус. Протигерпесну активність заявленої діетиламіноетиламиду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти та препарату порівняння п-карбетоксіфенілаконітімиду вивчали по реакції нейтралізації в культурах перевитих клітин НТ та КСТ з урахуванням цитопатичної дії, яку виявляє ВПГ-1. Досліди були поставлені наступним чином: до 0,2 мл суспензії, яка містить ВПГ-1 в робочій дозі 100 ЦПД_{50/0,2мл} (цитопатична доза вірусу, яка викликає ураження 50% моношару клітин), додають 0,2мл 0,25%-ного водного розчину заявленої сполуки і утворену суміш інкубують при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. В пробірки з дводобовою культурою клітин вносять 0,2мл одержаної суміші, а потім 0,8мл підтримуючого живильного середовища 199 без сироватки (в ній можлива присутність антивірусних інгібіторів). Таким чином, фактична концентрація заявленої діетиламіноетиламиду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти

при випробовуваннях становила 0,25мг/мл. Досліди з препаратом порівняння - п-карбетоксіфенілаконітімідом - були поставлені аналогічно в його ефективній концентрації 6мг/мл. Як контроль були використані клітинні культури без додавання до них тест-вірусу, а також клітини, інфіковані ВПГ-1 в зазначеній робочій дозі але без досліджуваних речовин (заявленої сполуки чи

препарату порівняння). Після інкубації при 37°C протягом 7 діб реєстрували морфологічні зміни моношару клітин (цитопатичний ефект вірусу). Титр вірусу в присутності досліджуваних речовин і в контролі розраховували в Іg ЦПД₅₀. Затримку репродукції ВПГ-1 оцінювали за наявністю різниці титрів вірусу порівняно з контрольними показниками. Дані експерименту наведені в табл. 1.

Таблиця 1

**Дія заявленої сполуки та препарату порівняння на ВПГ-1 (штам УС)
в дослідях *in vitro***

Сполука	Концентрація речовин, мг/мл	Затримка репродукції ВПГ-1 (в Іg)
Діетиламіноетиламід 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-α]-піримідин-3-карбонової кислоти (заявлена сполука)	0,25 мг/мл	>2,2
п-Кабетоксіфенілаконітімід (препарат порівняння)	6 мг/мл	2,0
Контроль: ВПГ-1 (100ЦПД ₅₀ /0,2мл)		Затримка репродукції ВПГ-1 відсутня

Наведені в табл. 1 експериментальні дані свідчать про те, що заявлений діетиламіноетиламід 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-α]-піримідин-3-карбонової кислоти *in vitro* виявляє більш високу ступінь затримки репродукції ВПГ-1 в культурі клітин, тобто більш виражену протигерпесну активність, ніж препарат порівняння, причому в значно меншій концентрації (у 24 рази).

Приклад 4. Протигерпесна активність діетиламіноетиламіду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-α]-піримідин-3-карбонової кислоти в дослідях *in vivo* на моделі герпетичного кератокон'юктивіту у кролів.

Вивчення протигерпесної активності заявленої сполуки та препарату порівняння в дослідях *in vivo* проводили на моделі герпетичного кератокон'юктивіту кролів породи "шиншила" з вагою тіла 2-2,5кг враховуючи те, що їхня рогівка чутлива до ураження ВПГ-1. Всього в дослідях було використано 15 кроликів. Після відтворення офтальмогерпесу 10 з них склали 2 дослідні групи по 5 кроликів для вивчення активності заявленої сполуки та препарату порівняння, а останні 5 кроликів - контрольну групу.

Герпетичну природу експериментального кератиту підтверджували шляхом виявлення в сльозній рідині антигену ВПГ за допомогою імуноферментного аналізу. Для цього інфекційний матеріал - сльозну рідину і вміст пухирців на роگیвці (0,2-2,0мл) збирали в стерильні флакони невеликої ємкості, в які для попередження росту бактеріальної флори додавали антибіотик (пеніцилін або канаміцин) в концентрації 0,1%. При цьому використовували діагностичну тест-систему Герпес-Скрин ЗАТ «НИАРМЕДИК ПЛЮС» (Москва, Росія).

Облік результатів імуноферментного аналізу реєстрували за допомогою імуноферментного аналізатора АИФ-Ц-01С шляхом вимірювання оптичної густини (ОГ), яку визначали в оптичних одиницях (о.о.) при довжині хвилі 492нм. Всього в кожній піддослідній групі тварин за першу добу захворювання було вивчено по 6 проб: сльозної рідини - 3 і вмісту пухирців - 3. В усіх пробах було виявлено герпесвірусний антиген. На другу добу захворювання на фоні посилення клінічної картини кератиту - збільшення набряку, сльозовиділення та розширення площі ураження роگیвки ока - відмічено також і значне зростання показників ОГ в зразках інфекційного матеріалу до 0,482-0,491 о.о. (у неінфікованих тварин цей показник складає в середньому 0,241 о.о.).

Для лікування експериментального офтальмогерпесу в піддослідних групах кроликів починаючи з другого дня після інфікування використовували заявлений діетиламіноетиламід 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-α]-піримідин-3-карбонової кислоти у вигляді 0,25%-ного стерильного водного розчину шляхом закапування в око по 2-3 краплі 4-5 разів на день. Препарат порівняння п-кабетоксіфенілаконітімід, враховуючи його низьку розчинність у воді, застосовували у вигляді стерильної стабілізованої твіном-80 6%-ної водної суспензії. Контрольній групі тварин закапували фізіологічний розчин за аналогічною схемою.

Клінічними критеріями ефективності лікування піддослідних тварин слугували ступінь ураження площі роگیвки ока, тривалість запальних явищ та зникнення пухирців, а також початок епітелізації роگیвки ока. Крім того, враховувалась виживаємість інфікованих кроликів та наявність приєднаної

вторинної (бактеріальної) інфекції. Всі одержані дані наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

**Дія заявленої сполуки та препарату порівняння на ВПГ-1 (штам УС)
у дослідях *in vivo***

Сполука	Кількість тварин	Кількість тварин зі ступенем ураження площі рогівки ока				Вижило тварин	Тривалість хвороби (дні)	Приєднання бактеріальної інфекції, кількість тварин
		25%	50%	75%	100 %			
Заявлена сполука	5	2	3	0	0	5	9-10	1 з 5-ти
Препарат порівняння	5	1	2	2	0	5	12-13	3 з 5-ти
Контрольна група (без лікування)	5	0	1	3	1	3	14-15	2 із 3-х, які вижили

Як видно з наведених у таблиці 2 даних, лікування інфікованих кроликів 0,25%-ним водним розчином заявленого діетиламіноетиламідом 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-α]-піримідин-3-карбонової кислоти суттєво вплинуло на ступінь ураження площі рогівки ока, яка у двох тварин склала 25% і у трьох - 50%. На відміну від групи, де застосовувався препарат порівняння, та контрольної групи, серед цих тварин не було помічено значного (до 75%) та тотального (100%) ураження рогівки ока. Все це свідчить про більш тяжкий перебіг захворювання при лікуванні п-кабетоксіфенілаконітімідом і, тим більше, при відсутності лікування. У двох з п'яти кроликів, які не одержували лікування (у одного на 3-ю, а у другого - на 5-ту добу захворювання) розвився менінгоенцефаліт, який призвів до загибелі тварин.

Стухання клінічної симптоматики і початок епітелізації рогівки при лікуванні діетиламіноетиламі-

дом 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-α]-піримідин-3-карбонової кислоти наставало на 2-3 дні раніше, ніж у випадку п-кабетоксіфенілаконітімідом і на 4-5 днів раніше, ніж у контрольній групі. Крім того, у двох останніх групах частіше розвивалась вторинна (бактеріальна) інфекція, яка уразила 3 з 5 тварин у групі з використанням п-кабетоксіфенілаконітімідом і 2 з 3 кроликів, що вижили в контролі. У групі, де лікування проводилось діетиламіноетиламідом 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-α]-піримідин-3-карбонової кислоти вторинна інфекція у вигляді серозно-гнійних виділень з ока була зафіксована лише у 1 з 5 кроликів.

Результати лабораторного дослідження інфекційного матеріалу у піддослідних групах тварин в динаміці розвитку захворювання наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Результати імуноферментного дослідження інфекційного матеріалу піддослідних груп кроликів з офтальмогерпесом в динаміці захворювання (в показниках ОГ)

Варіанти досліджу	Оптична густина (ОГ) інфекційного матеріалу в динаміці по днях після інфікування							
	1	2	3	5	8	10	12	14
Заявлена сполука	0,308	0,482	0,491	0,393	0,303	0,243	0,242	0,242
Препарат порівняння	0,310	0,489	0,506	0,508	0,428	0,335	0,266	0,249
Контрольна група (без лікування)	0,311	0,491	0,515	0,538	0,487	0,442	0,382	0,270

Примітки: 1. ОГ неінфікованих тварин = 0,241 о.о.

2. Наведені середні показники ОГ.

Аналіз наведених у таблиці 3 даних показав, що в усіх трьох групах тварин на 2-гу та 3-тю добу захворювання показники виявлення герпесвірусного антигену, а саме ОГ інфекційного матеріалу, продовжували зростати, що співпадало з наростанням клінічної симптоматики (збільшення набряку, сльозовиділення, розширення площі ураження рогівки ока). В групі піддослідних тварин, яких лікували 0,25%-ним водним розчином діетиламіноетиламиду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти вже на 4-5-тий день захворювання на фоні стихання клінічних симптомів відмічено помітне зниження лабораторних показників (ОГ) виявлення ВПГ-антигену (таблиця 3). На 10-тий день захворювання показник ОГ в цій групі знизився до 0,243 о.о. і практично зрівнявся з середніми даними ОГ у неінфікованих тварин (0,241), що свідчить про лабораторну нормалізацію інфекційного процесу.

При застосуванні 6%-ної суспензії п-кабетоксіфенілаконітіміду тільки на 6-7-ий день захворювання з'являється тенденція до зниження лабораторних показників виявлення ВПГ-антигену, а їх повна нормалізація настає на 2-3 доби пізніше, ніж у випадку заявленої сполуки.

В контрольній групі кількість ВПГ-антигену в інфекційному матеріалі збільшувалась до високих цифр протягом 7 днів, перевищуючи середній показник ОГ неінфікованих тварин більше ніж у 2 рази. На 10-12-ий день лабораторні показники почали нормалізуватися, хоча все, ще значно перевищували норму, до якої вдалося повернутися тільки на 15-ий день після початку захворювання.

Таким чином, використання з лікувальною метою 0,25%-ного водного розчину діетиламіноетиламиду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти показало суттєвий позитивний ефект на клінічні показники експериментального офтальмогерпесу, тобто виражену

протигерпесну активність при більш тяжкому перебігу захворювання у випадку застосування п-кабетоксіфенілаконітіміду та загибелі двох кроликів при відсутності лікування.

Заявлена сполука не виявляє цитотоксичності по відношенню до клітин макроорганізму, а за протигерпесною активністю в значно меншій дозі суттєво перевищує препарат порівняння п-кабетоксіфенілаконітімід як *in vitro*, так і *in vivo*, що дозволяє значно скоротити строки лікування герпесвірусних інфекцій.

Сполука одержується з доступних реагентів та за простими методиками, які можуть бути здійснені в умовах хіміко-фармацевтичних підприємств або лабораторій з використанням стандартного обладнання.

Діетиламіноетиламід 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2- α]-піримідин-3-карбонової кислоти може бути використаний як лікарська субстанція при створенні протигерпесних засобів у вигляді водного розчину та інших лікарських формах.

Джерела інформації

1. Е.С. Белозеров, Ю. И. Буланьков / Болезни герпесвирусной группы. -Элиста: АПП Джангар, 2005. - С.64.

2. R.J. Whitley, D.W. Kimberlin / Herpes simplex encephalitis: children and adolescents // Semin. Pediatr. Infect. Dis. - 2005. Vol. 16, No. 1. - P. 17.

3. Пат. 22189 А Україна. / П-Карбетоксіфенілаконітімід, який виявляє активність відносно вірусу везикулярного стоматиту та вірусу простого герпесу / А.В. Мартинов, М.В. Смелянська, О.О. Пархоменко, Л.О. Панченко, І.Ю. Кучма, В.П. Черних, Л.А. Шевчук // Заявл. 05.12.1996; Опубл. 30.06.1998. - Бюл. №3.

4. М. Д. Машковский / Лекарственные средства. - Харьков: Торсинг, 1997. -Том 2.-С. 354.