

Синтез и определение активности нового производного гидроксиоксопиримидина — потенциального объекта для изготовления противовоспалительного геля

Е.В. Куваева, Ю.М. Ладутько, Д.А. Колесник, П.О. Левшукова, Е.В. Федорова

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»,
Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Введение. Соединения, имеющие в своем строении гидроксипиримидиновый фрагмент, обладают выраженной и разнообразной биологической активностью. Низкая растворимость многих производных гидроксипиримидина в воде является существенным недостатком с позиции создания новых лекарственных средств. Из 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она была получена его водорастворимая форма в виде натриевой соли. Данное вещество, как было выявлено в ходе компьютерного скрининга его возможной биологической активности *in silico*, потенциально может быть использовано в качестве фармацевтической субстанции для производства (изготовления) лекарственных препаратов (ЛП). Поскольку ассортимент гидроксипиримидиновых ЛП в виде наружных лекарственных форм крайне мал, а полученное соединение обладает гидрофильными свойствами, актуальным является заключение субстанции в лекарственную форму — гель.

Цель. Синтез водорастворимой формы нового производного гидроксипиримидина, определение ее острой токсичности и противовоспалительной активности, а также критических стадий разработки и дальнейшего изготовления наружной гидрофильной лекарственной формы на ее основе.

Материалы и методы. Целевое соединение получено в результате взаимодействия 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она и эквимолярного количества водного раствора гидроксида натрия. Острую токсичность определяли на белых мышах (5 групп по 10 животных, которым вводили раствор исследуемого соединения в дозировках 1100, 1200, 1300, 1400 и 1500 мг/кг соответственно), наблюдая за развитием основных симптомов и регистрируя время гибели животных в течение 72 ч с момента введения препарата. Для экспериментальной оценки противовоспалительной активности были использованы две модели: «формалиновый отек лап мышей» и «ватная гранулема у крыс» (для каждой модели — 3 группы животных по 10 особей в каждой: 1-я группа получала препарат сравнения диклофенак, 2-я — исследуемое соединение, 3-я (контроль) — раствор натрия хлорида).

Результаты. 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия синтезирован с выходом $85 \pm 1\%$. *In vivo* доказано, что исследуемое соединение относится к 5-му классу токсичности — «практически нетоксично» и обладает выраженной противовоспалительной активностью. Составлена диаграмма Исикавы для определения критических стадий разработки и изготовления мягкой лекарственной формы — геля с целевой субстанцией.

Заключение. Синтезировано новое соединение с противовоспалительным действием — 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия, которое обладает низкой токсичностью и выраженной противовоспалительной активностью. Критическими стадиями разработки и изготовления геля с синтезированным соединением являются: подготовка основы и лекарственного вещества, введение лекарственного вещества в основу, гомогенизация и фасовка.

Ключевые слова: водорастворимые гидроксипиримидины, острая токсичность, противовоспалительная активность, ICH Q8 «Фармацевтическая разработка», диаграмма Исикавы.

Образец цитирования: Куваева Е.В., Ладутько Ю.М., Колесник Д.А., Левшукова П.О., Федорова Е.В. Синтез и определение активности нового производного гидроксиоксопиримидина — потенциального объекта для изготовления противовоспалительного геля // Journal of Siberian Medical Sciences. 2022;6(1):46–55. doi: 10.31549/2542-1174-2022-6-1-46-55

Поступила в редакцию 18.08.2021
Прошла рецензирование 05.10.2021
Принята к публикации 25.10.2021

Автор, ответственный за переписку
Колесник Денис Андреевич: ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет». 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14.
E-mail: denis.kolesnik@spcpcu.ru

Received 18.08.2021
Revised 05.10.2021
Accepted 25.10.2021

Corresponding author
Denis A. Kolesnik: Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, 14, Prof. Popov str., Saint Petersburg, 197376, Russia.
E-mail: denis.kolesnik@spcpcu.ru

Synthesis and determination of the activity of a new derivative of hydroxyoxypyrimidine, a potential object for the manufacture of anti-inflammatory gel

E.V. Kuvaeva, Yu.M. Ladutko, D.A. Kolesnik, P.O. Levshukova, E.V. Fedorova

Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint Petesburg, Russia

ABSTRACT

Introduction. Compounds with a hydroxypyrimidine fragment in their structure exhibit pronounced and diverse biological activity. The low solubility of many hydroxypyrimidine derivatives in water is a significant drawback in the development of new medicines. From 5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4(3H)-one, its water-soluble form being a sodium salt was obtained. This compound, as it was revealed during the computer screening of its possible biological activity *in silico*, can potentially be used as a pharmaceutical substance for the production (manufacture) of drugs. Since the line of hydroxypyrimidine drugs in the topical dosage forms is extremely limited, and the resulting compound has hydrophilic properties, it is important to enclose the substance in a gel dosage form.

Aim. Synthesis of a water-soluble form of new hydroxypyrimidine derivative, determination of its acute toxicity and anti-inflammatory activity, as well as critical stages of development and further production of a topical hydrophilic dosage form based on the obtained compound.

Materials and Methods. The target compound was obtained from the interaction of 5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4(3H)-one and an equimolar amount of an aqueous solution of sodium hydroxide. Acute toxicity was determined on white mice (5 groups of 10 animals, which were injected with a solution of the study compound at a dose of 1100, 1200, 1300, 1400, and 1500 mg/kg respectively), observing the development of the main symptoms and recording the time of death of the animals within 72 h from the moment of the drug administration. For the experimental assessment of anti-inflammatory activity, two models were used: formalin-induced mice paw edema and cotton pellet implantation-induced granuloma in rats (for each model there were 3 groups with 10 animals per group: the 1st group received the reference drug diclofenac, the 2nd – the compound under study, the 3rd (control) – sodium chloride solution).

Results. The yield of the obtained sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate was $85 \pm 1\%$. It has been proven *in vivo* that the test compound belongs to the 5th class of toxicity (practically non-toxic) and has a pronounced anti-inflammatory activity. An Ishikawa diagram was drawn up to determine the critical stages of the development and manufacture of a semisolid dosage form, a gel with a target substance.

Conclusion. A new compound with anti-inflammatory action has been synthesized, sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-4-olate, which has low toxicity and pronounced anti-inflammatory activity. The critical stages in the development and manufacture of a gel with synthesized compound are: preparation of the base and drug substance, introduction of the drug substance into the base, homogenization and packaging.

Keywords: water-soluble hydroxypyrimidines, acute toxicity, anti-inflammatory activity, ICH Q8 Pharmaceutical Development, Ishikawa diagram.

Citation example: Kuvaeva E.V., Ladutko Yu.M., Kolesnik D.A., Levshukova P.O., Fedorova E.V. Synthesis and determination of the activity of a new derivative of hydroxyoxypyrimidine, a potential object for the manufacture of anti-inflammatory gel. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022;6(1):46–55. doi: 10.31549/2542-1174-2022-6-1-46-55

ВВЕДЕНИЕ

Соединения, имеющие в своем строении пиримидин-4,6-диольный фрагмент, обладают выраженной и разнообразной биологической активностью, однако ассортимент лекарственных препаратов на их основе на фармацевтическом рынке невелик [1]. По данным Государственного реестра лекарственных средств [2], ассортимент гидроксипиримидиновых лекарственных препаратов включает 104 торговых наименования с учетом лекарственной формы и производителя. Всего на территории Российской Федерации зарегистрировано 8 международных непатентованных наименований (МНН) лекар-

INTRODUCTION

Compounds with a pyrimidine-4,6-diol fragment in their structure have pronounced and diverse biological activity, but the assortment of drugs based on them on the pharmaceutical market is small [1]. According to the State Register of Medicines [2], the line of hydroxypyrimidine medicines includes 104 trade names, taking into account the dosage form and manufacturer. In total, 8 international non-proprietary names (INN) of medicinal products containing hydroxypyrimidine are registered in the Russian Federation.

The low water solubility of many hydroxypyrimidine derivatives is a significant drawback in the development of new medicines. The pharmaceutical

ственных препаратов с содержанием гидроксипримидина.

Низкая растворимость многих производных гидроксипримидина в воде является существенным недостатком с позиции создания новых лекарственных средств. В ходе анализа фармацевтического рынка было выявлено присутствие высокой доли (79 %) липофильных лекарственных препаратов.

Из 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она [3] была получена его водорастворимая форма в виде натриевой соли — 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия [4]. Перед тем как приступить к экспериментальному исследованию биологической активности данного вещества *in vivo*, был проведен компьютерный скрининг его возможной биологической активности *in silico* с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), расположенной на веб-сервисе со свободным доступом через Интернет. В процессе скрининга были получены данные о предположительной противовоспалительной и анальгетической активности данного вещества с вероятностью $p_a \approx 0.5$.

Противовоспалительная фармакотерапия является симптоматической, препараты первой линии — это нестероидные противовоспалительные средства. Риск развития серьезных побочных эффектов (нарушение агрегации тромбоцитов, осложнения со стороны ЖКТ, нарушение функции почек, печени и др.) при системном применении таких препаратов крайне высок и определяет актуальность поиска других подходов к терапии. Одним из них является использование противовоспалительных и анальгезирующих средств в виде наружных лекарственных форм, что сопровождается снижением риска развития побочных эффектов по сравнению с препаратами системного действия из-за значительного уменьшения концентрации действующих веществ в крови.

Обзор фармацевтического рынка [2] показал, что ассортимент лекарственных средств, имеющих в своем строении гидроксипиримидиновый фрагмент, в виде наружных лекарственных форм крайне мал. И поскольку исследуемое соединение обладает гидрофильными свойствами, то актуальным является заключение субстанции в лекарственную форму — гель.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получить водорастворимую форму нового производного гидроксипримидина, определить острую токсичность и противовоспалительную

market analysis revealed the presence of a high proportion (79%) of lipophilic drugs.

From 5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4 (3H)-one [3], we have obtained its water-soluble sodium salt, sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate [4]. Before the experimental study of the biological activity of this substance *in vivo*, a computer screening of its possible biological activity *in silico* was carried out using the PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) software product located on a web service with free access via the Internet. During the screening, data were obtained on the presumptive anti-inflammatory and analgesic activity of this substance with a probability of $p_a \approx 0.5$.

Anti-inflammatory pharmacotherapy is aimed at treating symptoms, and first-line drugs are non-steroidal anti-inflammatory medicines. The risk of developing serious side effects (impaired platelet aggregation, gastrointestinal complications, impaired renal and liver function, etc.) with the systemic use of such drugs is extremely high and determines the relevance of the search for other treatment approaches. One of them is the use of anti-inflammatory and analgesic agents in topical dosage forms, which is accompanied by a decrease in the risk of side effects in comparison with drugs of systemic action due to a significant decrease in the concentration of active substances in the blood.

A review of the pharmaceutical market [2] showed that the range of drugs with a hydroxypyrimidine fragment in their structure in the form of topical dosage forms is extremely limited. Since the investigated compound has hydrophilic properties, it may be relevant to enclose the substance in a gel dosage form.

AIM OF THE RESEARCH

To obtain a water-soluble form of new hydroxypyrimidine derivative, to determine the acute toxicity and anti-inflammatory activity of the synthesized substance *in vivo*, as well as the critical stages of further manufacture of the topical hydrophilic dosage form.

MATERIALS AND METHODS

5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4(3H)-one was obtained as a result of the reaction of N'-phenylbenzene carboximidamide with diethylbutylpropanedioate in dimethylformamide during catalysis by potassium hydrogen carbonate. The synthesis scheme is shown in Fig. 1.

The target water-soluble compound was obtained by treating 5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimi-

активность синтезированного вещества *in vivo*, а также критические стадии дальнейшего изготовления наружной гидрофильной лекарственной формы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-он был получен в результате взаимодействия N'-фенилбензолкарбонсимидамида с диэтилбутилпропандиоатом в среде диметилформамида при катализе гидрокарбонатом калия. Схема синтеза представлена на рис. 1.

Целевое водорастворимое соединение получали путем обработки 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она эквимолярным количеством водного раствора гидроксида натрия при перемешивании в течение 30 мин (рис. 2). Твердый целевой продукт получали упариванием реакционной массы при 40–45 °C и давлении 80–96 мбар.

Острую токсичность и биологическую активность определяли *in vivo*. Все эксперименты на животных были проведены в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» и Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Острую токсичность *in vivo* определяли на белых мышках-самцах массой 20 ± 2 г, из которых были сформированы 5 групп по 10 животных. Раствор 5-бутил-6-оксо-1,2-дифенил-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия в воде для инъекций (0.5 мл) вводили однократно внутривенно в дозировках 1100 мг/кг (1-я группа), 1200 (2-я группа), 1300 (3-я группа), 1400 (4-я группа) и 1500 мг/кг (5-я группа). Выживаемость животных определяли, наблюдая за ними в течение 72 ч (через 24 и 48 ч) от момента введения

din-4(3H)-one with an equimolar amount of an aqueous solution of sodium hydroxide with stirring for 30 min (Fig. 2). The solid target product was obtained by evaporation of the reaction mixture at 40–45°C and a pressure of 80–96 mbar.

Acute toxicity and biological activity were determined *in vivo*. All experiments on animals were carried out per the Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated November 3, 2016 No. 81 About approval of the Rules of proper laboratory practice of the Eurasian Economic Union in the field of drug circulation, and the National Standard of the Russian Federation GOST R 53434-2009 Principles of Proper Laboratory Practice.

Acute toxicity *in vivo* was determined on white male mice weighing 20 ± 2 g, from which 5 groups of 10 animals each were formed. A solution of sodium 5-butyl-6-oxo-1,2-diphenyl-1,6-dihydropyrimidine-4-olate in water for injection (0.5 ml) was injected once intraperitoneally at doses of 1100 mg/kg (1st group), 1200 (2nd group), 1300 (3rd group), 1400 (4th group), and 1500 mg/kg (5th group). The survival rate of the animals was determined by observing them for 72 h (after 24 and 48 h) from the moment of administration of the test compound. The development of the main symptoms and the time of death of animals were recorded [5].

For experimental evaluation of anti-inflammatory activity, two models were chosen: formalin-induced mice paw edema and cotton pellet-induced granuloma in rats.

The dose of the reference drug was calculated taking into account the conversion factor

$$\text{Dose (mg/kg)} = \text{SD/M} \cdot k,$$

where SD – a single dose of the drug, dose (mg/ml) in one ampoule;

M – the average weight of a person (70 kg);

k – conversion factor for a rat (11.8) and a mouse (5.9).

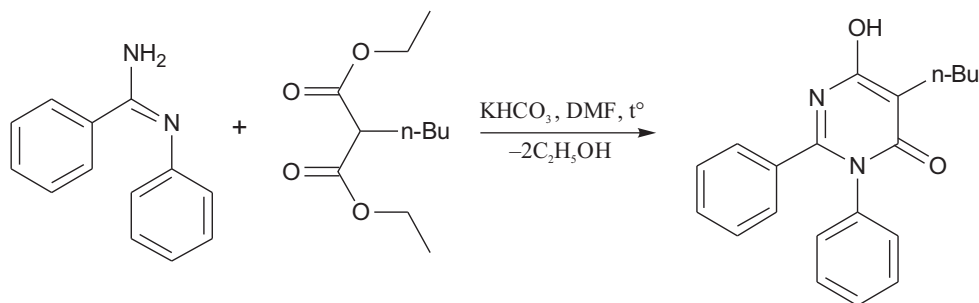


Рис. 1. Синтез 5-бутил-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4(3H)-она
Fig. 1. Synthesis of 5-butyl-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidin-4 (3H)-one

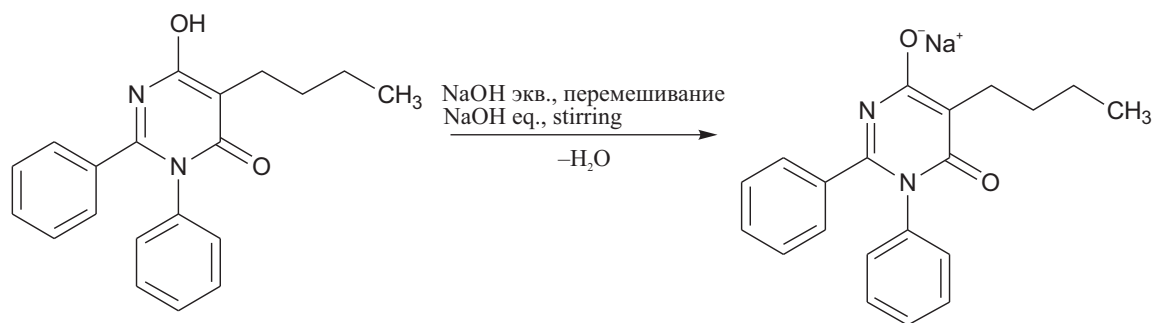


Рис. 2. Синтез 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропириимидин-4-олята натрия (экв. — эквимольный)
Fig. 2. Synthesis of sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate (eq. — equimolar)

исследуемого соединения. Регистрировали развитие основных симптомов и время гибели животных [5].

Для экспериментальной оценки противовоспалительной активности были выбраны две модели: «формалиновый отек лап мышей» и «ватная гранулема у крыс».

Дозу препарата сравнения рассчитывали с учетом коэффициента пересчета

$$\text{Доза (мг/кг)} = \text{РД/М} \cdot k,$$

где РД — разовая доза препарата — доза (мг/мл) в одной ампуле;

М — средняя масса человека — 70 кг;

k — коэффициент пересчета на крысу (11.8) и мышь (5.9).

Дозировка исследуемого вещества рассчитывалась эквимольно терапевтической дозе референтного препарата.

Для моделирования «формалинового отека» [5] использовали белых мышей-самцов массой 20 ± 2 г, из которых были сформированы 3 группы по 10 особей в каждой (табл. 1).

Животные опытных групп получали исследуемое соединение и препарат сравнения, которые вводили внутривенно за 1 ч до начала эксперимента. Животные контрольной группы получали внутривенно 0.9% раствор натрия хло-

The dose of the test substance was calculated as equimolar for therapeutic dose of the reference drug.

For formalin-induced edema modeling [5], white male mice weighing 20 ± 2 g were used, of which 3 groups of 10 animals each were formed (Table 1).

The animals of the experimental groups received the test compound and the reference drug, which were injected intraperitoneally 1 h before the start of the experiment. Animals of the control group received 0.9% sodium chloride solution intraperitoneally. Acute edema was induced by subplantar injection (under the plantar aponeurosis) of 2% formalin solution in a volume of 0.5 ml to each animal. The edema intensity was assessed by the change in the thickness of the paw (mm) using an electronic micrometer before and 1, 2, 24, and 48 h after the injection of the formalin solution. The anti-inflammatory activity of the test compounds was determined by the formula

$$\text{Suppression of inflammation (\%)} = \left(1 - \frac{S_1 - S_2}{S_3 - S_4} \right) \cdot 100,$$

where S_1 — the thickness of the paw (mm), measured after a certain period after the formalin injection in the animal that received the test drug;

Таблица 1. Описание групп животных модели «формалиновый отек»

Table 1. Description of groups of animals of the formalin edema model

Группа / Group	Вещество / Substance	Доза, объем / Dose, volume
1-я / 1st	Диклофенак (раствор для инъекций, Hemofarm, 25 мг/мл) Diclofenac (solution for injection, Hemofarm, 25 mg/ml)	12.6 мг/кг (mg/kg)
2-я / 2nd	Исследуемое соединение (раствор в воде для инъекций (Renewal)) Test compound (aqueous solution for injection (Renewal))	20 мг/кг (mg/kg)
3-я (контроль) / 3rd (control)	Раствор натрия хлорида 0.9% (Solopharm) Sodium chloride solution 0.9% (Solopharm)	0.5 мл (ml)

рида. Острый отек вызывали субплантарным введением (под подошвенный апоневроз) 2% раствора формалина в объеме 0.5 мл каждому животному. Выраженность отека оценивали по изменению толщины лапки (мм) с помощью электронного микрометра до и через 1, 2, 24 и 48 ч после введения раствора формалина. Противовоспалительную активность исследуемых соединений определяли по формуле

$$\text{Угнетение воспаления (\%)} = \left(1 - \frac{S_1 - S_2}{S_3 - S_4} \right) \cdot 100,$$

где S_1 — толщина лапки (мм), измеренной через определенный промежуток времени после введения формалина у животного, получавшего исследуемый препарат;

S_2 — толщина лапки (мм), измеренной до введения формалина у животного, получавшего исследуемый препарат;

S_3 — толщина лапки (мм), измеренной через определенный промежуток времени после введения формалина у контрольного животного;

S_4 — толщина лапки (мм) до введения формалина у контрольного животного.

Для моделирования «ватной гранулемы» [5] использовали белых крыс-самок массой 300 ± 20 г, из которых были сформированы 3 группы по 10 особей в каждой (табл. 2).

Крысам, находящимся под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг), в области спины выбривали шерсть и делали продольный надрез кожи и подкожной клетчатки. Затем пинцетом в подкожной клетчатке формировали полость, в которую помещали стерильный ватный шарик (15 мг) и накладывали 1 шов. Исследуемый препарат и препарат сравнения вводили внутривентрально 1 раз в сутки в течение 7 дней. Контрольной группе в течение 7 дней внутривентрально вводили 0.9% раствор натрия хлорида. На 8-й день имплантированный шарик с образовавшейся фиброзно-грануляционной тканью извлекали,

S_2 — the paw thickness (mm), measured before formalin injection in the animal that received the test drug;

S_3 — the thickness of the paw (mm), measured after a certain period after the formalin injection in the control animal;

S_4 — the paw thickness (mm) before formalin injection in the control animal.

For the cotton pellet-induced granuloma modeling [5], white female rats weighing 300 ± 20 g were used, of which 3 groups of 10 animals each were formed (Table 2).

In rats under chloral hydrate anaesthesia (300 mg/kg), hair was shaved in the back area, and a longitudinal incision was made in the skin and subcutaneous tissue. Then, in the subcutaneous tissue a cavity was formed with tweezers, into which a sterile cotton pellet (15 mg) was placed, and 1 stitch put. The test drug and the reference drug were administered intraperitoneally once a day for 7 days. The control group was injected intraperitoneally with 0.9% sodium chloride solution for 7 days. On the 8th day, the implanted pellet with the formed fibro-granulomatous tissue was removed, weighed and dried to constant weight at 60°C . Anti-inflammatory activity was assessed by the calculated values of the mass of the granuloma, which characterizes inflammation.

RESULTS AND DISCUSSION

Sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate (Fig. 3) was obtained by the reaction of 5-butyl-6-hydroxy-1,2-diphenyl-1,6-dihydropyrimidine-4(3H)-one with an equimolar amount of an aqueous solution of sodium hydroxide. The yield was $85 \pm 1\%$.

The experimental median lethal dose was 1350 ± 11.21 mg/kg. Thus, the test compound belongs to the 5th class of toxicity, practically non-toxic (according to K.K. Sidorov's Classification).

Таблица 2. Описание групп животных модели «ватная гранулема»
Table 2. Description of groups of animals of the cotton pellet granuloma model

Группа / Group	Вещество / Substance	Доза, объем / Dose, volume
1-я / 1st	Диклофенак (раствор для инъекций, Hemofarm, 25 мг/мл) Diclofenac (solution for injection, Hemofarm, 25 mg/ml)	6.32 мг/кг (mg/kg)
2-я / 2nd	Исследуемое соединение (раствор в воде для инъекций (Renewal)) Test compound (aqueous solution for injection (Renewal))	33.3 мг/кг (mg/kg)
3-я (контроль) / 3rd (control)	Раствор натрия хлорида 0.9% (Solopharm) Sodium chloride solution 0.9% (Solopharm)	0.5 мл (ml)

взвешивали и высушивали до постоянной массы при 60 °С. Противовоспалительную активность оценивали по расчетным величинам массы гранулемы, характеризующим воспаление.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия (рис. 3) был получен взаимодействием 5-бутил-6-гидрокси-1,2-дифенил-1,6-дигидропиримидин-4(3H)-она с эквимольным количеством водного раствора гидроксида натрия. Выход составил $85 \pm 1\%$.

Экспериментальная среднелетальная доза составила 1350 ± 11.21 мг/кг. Таким образом, исследуемое соединение относится к 5-му классу токсичности — «практически нетоксично» (согласно классификации по К.К. Сидорову).

Исследования противовоспалительной активности *in vivo* показали, что 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия обладает выраженной противовоспалительной активностью, действуя как на этапе острого экссудативного воспаления (модель «формалиновый отек»), так и на стадии хронического пролиферативного и иммунного воспаления (модель «ватная гранулема»), а также находится на одном уровне с препаратом сравнения (табл. 3, 4) [6].

Таким образом, учитывая выраженную противовоспалительную активность и низкую токсичность синтезированного водорастворимого лекарственного вещества, целесообразно разработать наружную лекарственную форму с ним.

Согласно требованиям регуляторной практики, для улучшения качества готового продукта и процесса его производства необходимо принимать во внимание рекомендации ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» (ICH Q8 Pharmaceutical Development), разработанные в рамках Международной конференции по гармонизации требований к регистрации лекарственных средств для человека. Наиболее распространенным инструментом анализа оценки критических точек может служить диаграмма Исикавы («Рыбий скелет»), которая за счет своей незамкнутости позволяет определить возможные риски: исходное сырье, технологические факторы и др. На основании комплексного анализа разработанной диаграммы (рис. 4) определены критические стадии разработки и изготовления мягкой лекарственной формы — геля с 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олятом натрия: подготовка основы и лекарственного вещества, введение лекарственного вещества в основу, гомогенизация и фасовка.

In vivo anti-inflammatory activity studies have shown that sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate has a pronounced anti-inflammatory activity, acting both at the stage of acute exudative inflammation (formalin edema model), and at the stage of chronic proliferative and immune inflammation (cotton pellet granuloma model), and is also at the same level as the reference drug (Tables 3, 4) [6].

Thus, given the pronounced anti-inflammatory activity and low toxicity of the synthesized water-soluble medicinal substance, it is advisable to develop its topical dosage form.

According to the requirements of regulatory practice, in order to improve the quality of the finished product and its manufacturing process, it is necessary to take into account the recommendations of ICH Q8 Pharmaceutical Development, developed within the framework of the International Council on Harmonization for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. The most common tool for analyzing the assessment of critical points can be the Ishikawa diagram (fishbone diagram), which, due to its openness, allows to determine possible risks inherent in the starting materials, technological factors, etc. Based on a comprehensive analysis of the developed diagram (Fig. 4), critical stages of the development and manufacturing of a semisolid dosage form, gel with sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate were defined: preparation of the base and drug substance, introduction of the drug substance into the base, homogenization and packaging.

CONCLUSION

A new compound has been synthesized, sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate. Experimental pharmacological studies have shown that the compound under study has low toxicity and exhibits pronounced anti-inflammatory activity. Based on a comprehensive analysis of the Ishikawa diagram, the critical stages of the development and manufacture of a topical dosage form, a gel with synthesized hydroxypyrimidine, were identified: preparation of the base and drug substance, the introduction of the drug substance into the base, homogenization and packaging.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

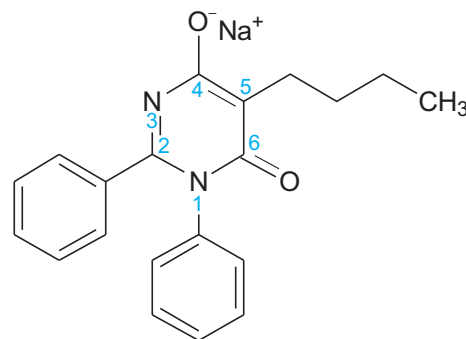


Рис. 3. Формула 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия с нумерацией главного цикла

Fig. 3. The formula of sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate with the numbering of the main cycle

Таблица 3. Результаты оценки противовоспалительной активности в модели «формалиновый отек» у мышей ($n = 10$)

Table 3. The results of evaluation of anti-inflammatory activity in the formalin edema model in mice ($n = 10$)

Группа / Group	Угнетение воспаления, % / Inhibition of inflammation, %			
	через 1 ч / after 1 h	через 2 ч / after 2 h	через 24 ч / after 24 h	через 48 ч / after 48 h
Диклофенак Diclofenac	$-7.69 \pm 2.39^*$	12.20 ± 3.07	14.82 ± 3.00	15.70 ± 3.79
Исследуемое соединение Test compound	$12.60 \pm 8.19^{**}$	25.65 ± 5.68	26.81 ± 6.77	30.85 ± 8.18

* На фоне применения референсного препарата наблюдалось отсутствие угнетения воспаления с некоторой его провокацией.
The use of the reference drug was characterized by the absence of inhibition of inflammation, and to some extent by its provocation.

** Различия статистически значимы ($p \leq 0.05$) по сравнению с группой «Диклофенак».
Differences are statistically significant ($p \leq 0.05$) compared with the diclofenac group.

Таблица 4. Результаты оценки противовоспалительной активности в модели «ватная гранулема» у крыс ($n = 10$)

Table 4. The results of evaluation of anti-inflammatory activity in the cotton pellet granuloma model in rats ($n = 10$)

Группа животных Group of animals	Масса гранулемы, г Granuloma mass, g		Расчетная величина массы гранулемы, характеризующая воспаление, г Estimated value of granuloma mass characterizing inflammation, g	
	сырая (M_1) raw (M_1)	высушенная (M_2) dried (M_2)	экссудативная фаза ($M_1 - M_2$) exudative phase ($M_1 - M_2$)	пролиферативная фаза ($M_1 - M_p$) proliferative phase ($M_1 - M_p$)
Имплантация ватного шарика (контроль) Cotton pellet implantation (control)	0.253 ± 0.018	0.088 ± 0.006	0.164 ± 0.012	0.074 ± 0.006
Имплантация ватного шарика + диклофенак Cotton pellet implantation + diclofenac	$0.199 \pm 0.011^*$	$0.069 \pm 0.005^*$	$0.129 \pm 0.01^*$	$0.054 \pm 0.005^*$
Имплантация ватного шарика + исследуемое соединение Cotton pellet implantation + test compound	$0.186 \pm 0.009^{*}\#$	$0.060 \pm 0.004^{*}\#$	$0.126 \pm 0.006^{*}\#$	$0.045 \pm 0.004^{*}\#$

Примечания: M_p — масса шарика (0.015 г).

* Различия статистически значимы при $p \leq 0.05$ по сравнению с группой контроля.

Статистически значимых различий с группой сравнения (диклофенак) нет.

Notes: M_p — the mass of the pellet (0.015 g).

* Differences are statistically significant at $p \leq 0.05$ compared to the control group.

There are no statistically significant differences with the diclofenac group.

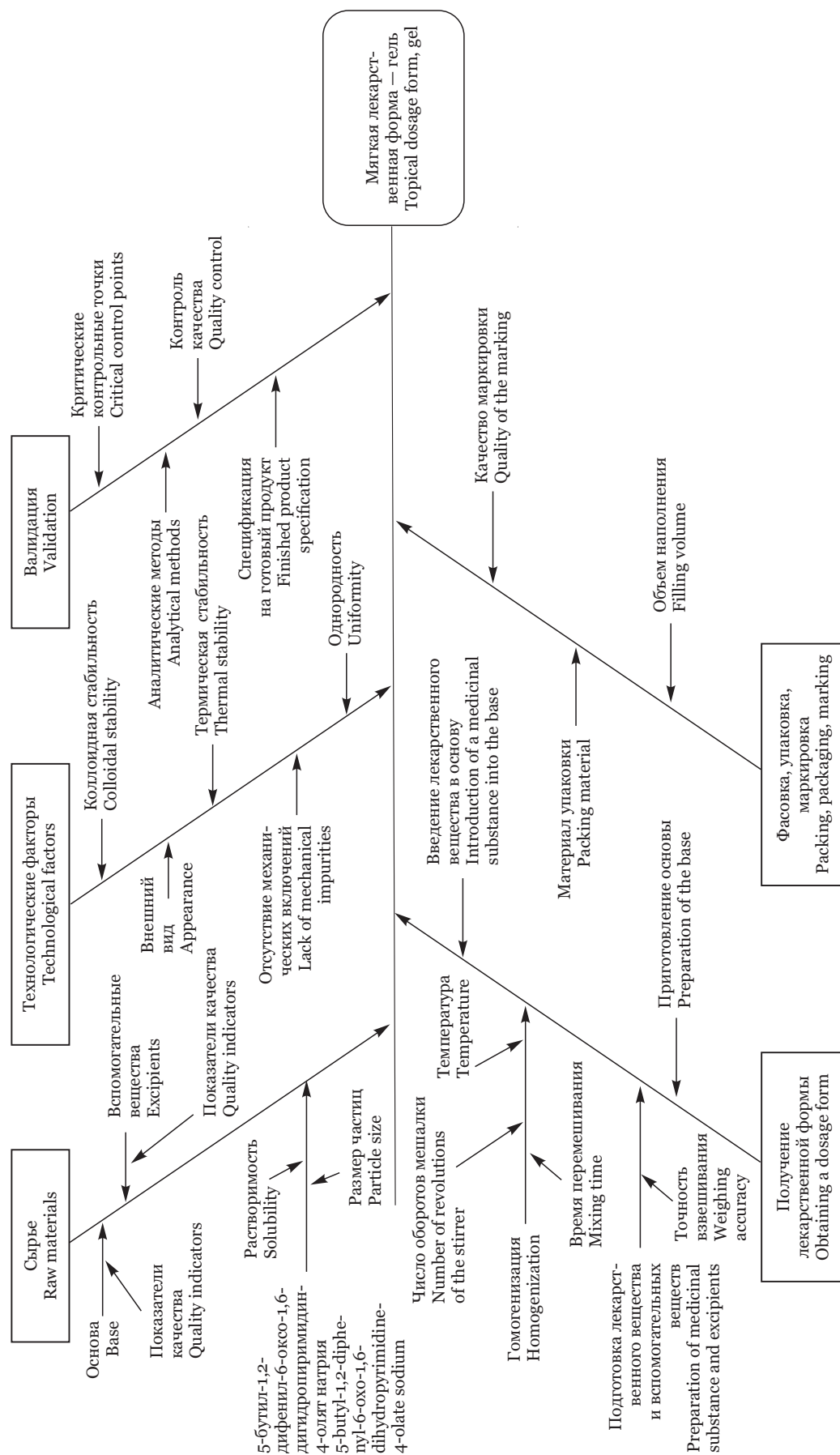


Рис. 4. Диаграмма Исикавы технологии лекарственной формы с 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропириимидин-4-олатом натрия
Fig. 4. Ishikawa fishbone diagram of the technology of the dosage form with sodium 5-butyl-1,2-diphenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-4-olate

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезировано новое соединение — 5-бутил-1,2-дифенил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия. С помощью экспериментальных фармакологических исследований доказано, что исследуемое соединение обладает низкой токсичностью и проявляет выраженную противовоспалительную активность. На основании комплексного анализа диаграммы Исакавы опреде-

лены критические стадии разработки и изготовления мягкой лекарственной формы — геля с синтезированным гидроксипиримидином: подготовка основы и лекарственного вещества, введение лекарственного вещества в основу, гомогенизация и фасовка.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jansa P., Holý A., Dračinský M. et al. 5-Substituted 2-amino-4,6-dihydropyrimidines and 2-amino-4,6-dichloropyrimidines: synthesis and inhibitory effects on immune-activated nitric oxide production // *Medicinal Chemistry Research*. 2014;23(10):4482–4490. doi: 10.1007/s00044-014-1018-9.
2. Государственный реестр лекарственных средств. URL: grls.rosminzdrav.ru (дата обращения: 21.10.2021).
3. 5-Замещенные-6-гидрокси-2,3-дифенилпиримидин-4-(3H)-оны и способ их получения: Патент 2738605 C1, Российская Федерация, МПК C07D 239/54 (2006.01). Д.А. Колесник, Е.В. Куваева, Т.Л. Семакова, О.Ю. Стрелова, И.П. Яковлев; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России. Оpubл. 14.12.2020.
4. Колесник Д.А., Куваева Е.В., Яковлев И.П., Кириллова Е.Н., Семакова Т.Л. Синтез гидрофильных форм 6-гидроксипиримидин-4(3H)-онов и оценка их острой токсичности *in silico* и *in vivo* // Бутлеровские сообщения. 2021;66(4):41–45. doi: 10.37952/ROI-jbc-01/21-66-4-41.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / отв. ред. А.Н. Миронов. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
6. Куваева Е.В., Колесник Д.А., Левшукова П.О., Кириллова Е.Н., Ивкин Д.Ю. Оценка противовоспалительной активности нового производного 1,6-дигидропиримидина // *Фармация*. 2021;70(4):44–47. doi: 10/29296/25419218-2021-04-07.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Куваева Елена Владимировна — канд. фармацевт. наук, доцент кафедры органической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия.

Ладутько Юлия Михайловна — канд. фармацевт. наук, декан фармацевтического факультета, доцент кафедры технологии лекарственных форм ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия.

Колесник Денис Андреевич — ассистент кафедры органической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия.

Левшукова Полина Олеговна — аспирант кафедры органической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия.

Федорова Елена Владимировна — канд. фармацевт. наук, доцент кафедры органической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия.

REFERENCES

1. Jansa P., Holý A., Dračinský M. et al. 5-Substituted 2-amino-4,6-dihydropyrimidines and 2-amino-4,6-dichloropyrimidines: synthesis and inhibitory effects on immune-activated nitric oxide production. *Medicinal Chemistry Research*. 2014;23(10):4482–4490. doi: 10.1007/s00044-014-1018-9.
2. State Register of Medicines. URL: grls.rosminzdrav.ru (accessed 21.10.2021).
3. 5-Substituted-6-hydroxy-2,3-diphenylpyrimidine-4-(3H)-ones and a method for their preparation: Patent 2738605 C1, Russian Federation, IPC C07D 239/54 (2006.01). D.A. Kolesnik, E.V. Kuvaeva, T.L. Semakova, O.Yu. Strelova, I.P. Yakovlev; applicant and patentee of Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University. Publ. 14.12.2020.
4. Kolesnik D.A., Kuvaeva E.V., Yakovlev I.P., Kirillova E.N., Semakova T.L. 6-hydroxypyrimidin-4(3H)-ones hydrophilic forms synthesis and of their acute toxicity *in silico* and *in vivo* assessment. *Journal Butlerov Communications*. 2021;66(4):41–45. doi: 10.37952/ROI-jbc-01/21-66-4-41. (In Russ.)
5. Mironov A.N. (ed.) (2012). *Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs. Part 1*. Moscow: Grif i K. 944 p. (In Russ.)
6. Kuvaeva E.V., Kolesnik D.A., Levshukova P.O., Kirillova E.N., Ivkin D.Yu. Evaluation of anti-inflammatory activity of a new 1,6-dihydropyrimidine derivative. *Pharmacy*. 2021;70(4):44–47. doi: 10/29296 / 25419218-2021-04-07. (In Russ.)

ABOUT THE AUTHORS

Elena V. Kuvaeva – Cand. Sci. (Pharmaceut.), Associate Professor, Department of Organic Chemistry, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia.

Yulia M. Ladutko – Cand. Sci. (Pharmaceut.), Dean, Faculty of Pharmacy, Associate Professor, Department of Technology of Dosage Forms, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia.

Denis A. Kolesnik – Assistant, Department of Organic Chemistry, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia.

Polina O. Levshukova – Post-graduate Student, Department of Organic Chemistry, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia.

Elena V. Fedorova – Cand. Sci. (Pharmaceut.), Associate Professor, Department of Organic Chemistry, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia.