



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104102** (13) **C2**
(51) МПК**C07D 213/81** (2006.01)**A61P 31/16** (2006.01)**A61K 31/4425** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

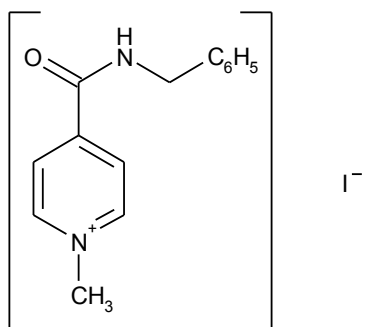
(21) Номер заявки: **а 2012 15039**
(22) Дата подання заявки: **15.06.2011**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.12.2013**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **PCT/IB2010/001956**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **17.06.2010**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **IB**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.04.2013, Бюл.№ 7**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.12.2013, Бюл.№ 24**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2011/059922, 15.06.2011**

(72) Винахідник(и):
**Жебровська Філя (UA),
Маргітич Віктор (UA),
Костюк Григорій (UA),
Сяркевич Олег (UA),
Ванат Михайло (UA)**
(73) Власник(и):
**ФАРМАК ІНТЕРНЕТНЛ ХОЛДІНГ ГМБХ,
Mariahilferstrasse 136, Office TOP 1.15, A-
1150 Vienna, Austria (AT)**
(74) Представник:
**Самілів Богдана Миколаївна, реєстр.
№198**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
NESTEROVA ET AL: "Studying of Anti-Epstein-Barr Virus Activity of Amizon and their Derivative", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, vol. 78, no. 2, 19 March 2008 (2008-03-19), page A61, XP022541825, ISSN: 0166-3542, DOI:10.1016/J.ANTIVIRAL.2008.01.130
BUKHTIAROVA T A ET AL: "Structure and antiinflammatory activity of Isonicotinic and Nicotinic Amides", PHARMACEUTICAL CHEMISTRY JOURNAL, SPRINGER NEW YORK LLC, US, vol. 31, no. 11, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 597-599, XP002501345, ISSN: 0091-150X, DOI: DOI:10.1007/BF02464277

(54) α -КРИСТАЛІЧНА ФОРМА КАРБАБЕНЗПІРИДУ**(57) Реферат:**

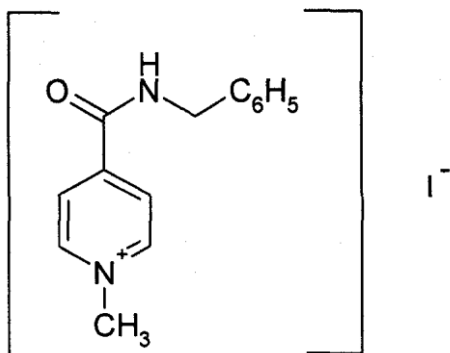
Цей винахід стосується кристалічної форми карбабензпіриду формули (I):

UA 104102 C2



та способу її одержання.

Також винахід стосується застосування кристалічної форми карбабензпіриду в лікуванні та попередженні вірусних інфекцій.

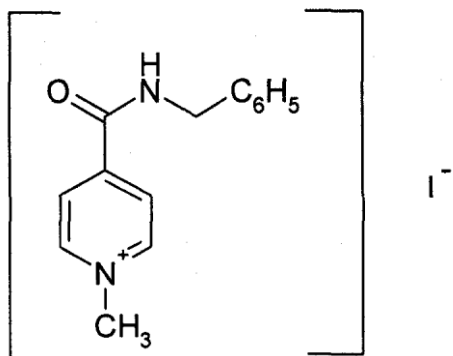


Галузь застосування винаходу

Цей винахід стосується нової кристалічної форми карбабензпіриду та методу його приготування. Також винахід стосується лікарського препарату, що містить нову кристалічну форму, тобто α -кристалічну форму карбабензпіриду. Нарешті, винахід стосується застосування

5 α -кристалічної форми карбабензпіриду для виготовлення лікарських засобів для лікування та запобігання вірусним інфекціям.

Карбабензпірид має таку формулу (I):



та також відомий як Амізон.

10 Передумови створення винаходу

Фармакологічно прийнятні солі карбабензпіриду мають цінні фармакологічні властивості.

Їх головною характеристикою є здатність лікувати та запобігати вірусним інфекціям, особливо викликаним вірусами грипу А.

15 Для фармакологічного застосування особливий інтерес становить речовина з високим ступенем чистоти. Крім того, бажано використовувати стабільний, добре налагоджений та масштабований виробничий спосіб, у результаті якого одержують продукт відповідної якості, який придатний для виготовлення лікарських засобів.

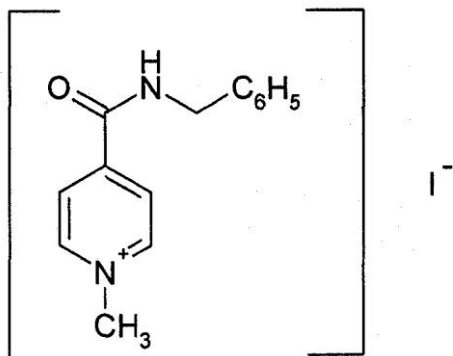
Опис прототипу

20 SU 583612 (1975) описує синтез карбабензпіриду для застосування у фармакологічних цілях, проте відсутній належний опис одержання активної речовини відтворюваним способом.

Отже, існувала потреба для методу синтезу, який би забезпечував одержання матеріалу з високим ступенем чистоти, що відповідає вимогам для фармакологічного застосування.

Формула винаходу

Цей винахід стосується α -кристалічної форми карбабензпіриду формули (I):



25

якому притаманні зазначені нижче параметри, визначені за допомогою методу порошкової рентгенівської дифракції з застосуванням для вимірювання дифрактометра (мідний антикатод), виражені відносно міжплощинної відстані d , кута Брега 2θ та відносної інтенсивності (виражається у відсотках найбільш інтенсивного променя), що наведені у таблиці нижче з

30

переліком кутів відхилення високої та середньої інтенсивності:

№	Кут 2 тета (°)	Міжплощинна відстань d(Å)	Відносна інтенсивність
1	2,3925	36,92687	5,23
2	10,2105	8,66366	5,95
3	11,3179	7,81828	5,70
4	12,3706	7,15527	10,86
5	13,9617	6,34318	3,67
6	16,2837	5,44354	6,62
7	17,4171	5,09177	8,45
8	17,6238	5,03251	66,93
9	19,8858	4,46489	100,00
10	20,3088	4,37284	7,36

Цю нову α -кристалічну форму карбабензпіриду одержано в результаті способу, що відповідно до цього винаходу складається з таких етапів:

- 5 (i) конденсація ізонікотинової кислоти з бензиламіном за підвищених температур,
- (ii) кристалізація та виділення конденсованого продукту, одержаного на вищеписаному етапі (i),
- (iii) реакція кристалічного продукту, одержаного на вищевказаному етапі (ii), з метилйодидом
- 10 (iv) перекристалізація неочищеного продукту, одержаної на етапі (iii), з водного розчину спирту.

Стислий опис креслень

Фіг. 1 представляє діаграму порошкової рентгенівської дифракції α -кристалічної форми карбабензпіриду відповідно до цього винаходу.

Фіг. 2 представляє криву диференційної сканувальної калориметрії α -форми.

- 15 Фіг. 3 представляє інфрачервоний спектр α -форми.

Фіг. 4 представляє вигляд молекули карбабензпіриду з кристалічною структурою, що показує застосовану схему нумерації. Показані еліпсоїди анізотропного зміщення для атомів, крім атомів водню з рівнем ймовірності 50%. Зміщення атомів водню відбувається з як завгодно малим радіусом.

- 20 Фіг. 5 показує вигляд молекулярної упаковки для α -кристалічної форми карбабензпіриду, одержаної із структури кристалу. (Кінцеві константи комірки: $a = 9.27390(10)\text{\AA}$, $b = 10.7187(2)\text{\AA}$, $c = 14.2161(2)\text{\AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, об'єм = $1413.14(4)\text{\AA}^3$. Кінцеві домішки: R1 [для 4152 I > 4 σ (I)] = 1.87 % wR2 [всі дані - 4309] = 4.40 %).

- 25 Фіг. 6 схематично показує переважний варіант способу для підготовки α -кристалічної форми карбабензпіриду відповідно до цього винаходу.

Детальний опис винаходу

- Відповідно до способів цього винаходу можна одержати нову кристалічну форму карбабензпіриду (Амізону), яка має високий ступінь чистоти. Як показано у нижченаведений експериментальній частині, відповідно до цього винаходу, нова кристалічна форма, яка має
- 30 ступінь чистоти щонайменше 99,5% та переважний - щонайменше 99,9%, визначений із застосуванням методу ВЕРХ.

- Ця нова кристалічна форма карбабензпіриду, тобто α -форма, характеризується спектром рентгенівського випромінювання як визначено у пункті 1, що містить перелік кутів відхилення високої та середньої інтенсивності. Заради повноти даних нижченаведена Таблиця 1 також
- 35 містить інші піки у спектрі рентгенівських променів відповідно до Фіг. 1.

Таблиця 1

№	Кут 2 тета (°)	Міжплощинна відстань d(Å)	Відносна інтенсивність
1	2,3925	36,92687	5,23
2	10,2105	8,66366	5,95
3	11,3179	7,81828	5,70
4	12,3706	7,15527	10,86
5	13,9617	6,34318	3,67
6	16,2837	5,44354	6,62
7	17,4171	5,09177	8,45
8	17,6238	5,03251	66,93
9	19,8858	4,46489	100,00
10	20,3088	4,37284	7,36
11	20,5068	4,33105	5,19
12	20,7785	4,27505	7,36
13	21,6883	4,09772	5,43
14	22,4553	3,95946	4,96
15	22,6282	3,92959	14,19
16	25,1931	3,53505	4,53
17	25,9608	3,43222	3,74
18	26,6025	3,35087	8,50
19	26,7790	3,32918	8,32
20	27,5071	3,24270	1,17
21	27,9630	3,19085	34,11
22	28,0126	3,18531	21,03
23	29,1890	3,05956	42,84
24	30,6379	2,91809	7,69
25	30,9488	2,88949	4,47
26	31,4818	2,84177	11,23
27	31,9139	2,80427	4,62
28	32,4529	2,75892	10,21
29	32,8634	2,72539	5,97
30	33,4828	2,67638	8,52
31	33,7418	2,65642	2,46
32	34,3000	2,61446	1,16
33	34,8705	2,57298	5,13
34	35,2361	2,54712	12,94
35	35,5986	2,52201	1,36
36	36,5494	2,45855	9,04
37	36,7967	2,44260	1,16
38	37,7826	2,38110	1,78

5 Альфа-форма карбабензпіриду також характеризується ДСК-кривою, як показано на Фіг. 2 (на цьому рисунку також вказано умови вимірювання). Альфа-кристалічна форма проявляє ендотермічний максимум на ДСК-кривій в межах від 187 до 199°C та, зокрема, від 189,0 до 191,0°C.

Крім того, α -форма карбабензпіриду характеризується ІЧ-спектром, як показано на Фіг. 3, з характерними піками, перерахованими у нижченаведеній Таблиці 2.

Таблиця 2

Хвильове число [см ⁻¹]	коливання
3236	N-H
3040	C-H
2934	C-H
1622	C=O
1600/1502	C=C
760 / 704	C-H

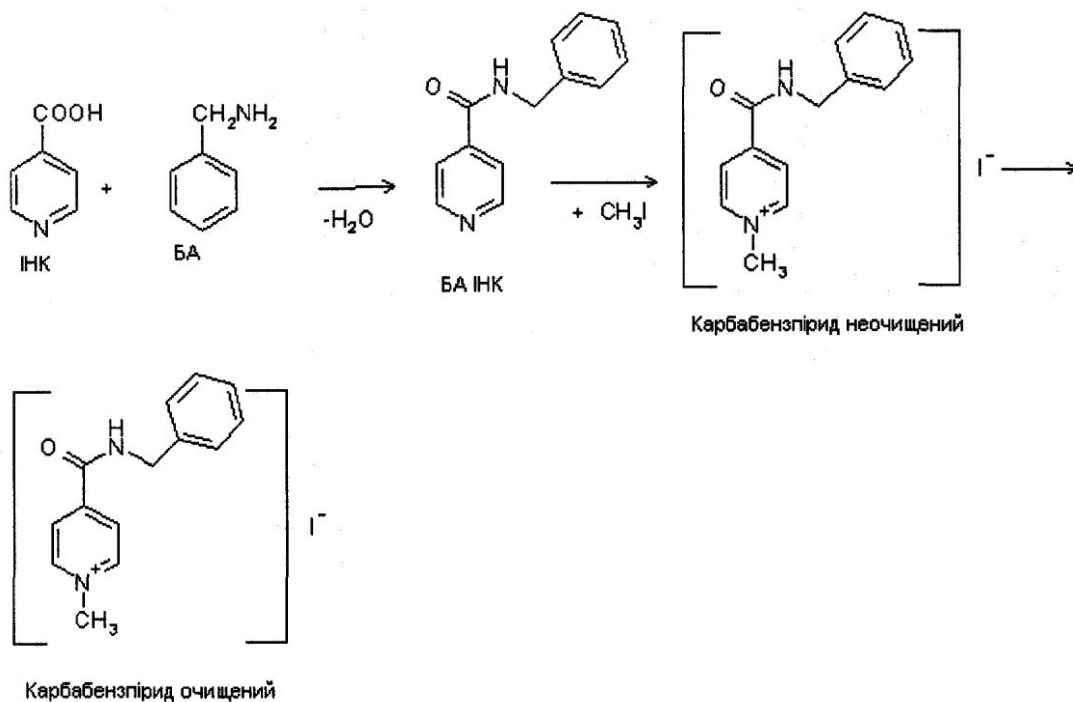
Як було згадано, α -кристалічна форма, яка має ступінь чистоти щонайменше 99,5% та переважний - щонайменше 99,9%, визначений із застосуванням методу ВЕРХ.

5 Такого високого ступеня чистоти не вдалося одержати у прототипі. Зокрема, це стало можливим завдяки використанню відповідно до цього винаходу способу значного зменшення вмісту у готовому препараті метилйодиду, відомої генотоксичної речовини.

Як вже було згадано, відповідно до цього винаходу спосіб складається із чотирьох основних етапів, а саме:

- 10 (i) конденсація ізонікотинової кислоти з бензиламіном за підвищених температур,
- (ii) кристалізація та виділення конденсованого продукту, одержаного на вищеписаному етапі (i),
- (iii) реакція кристалічного продукту, одержаного на вищевказаному етапі (ii), з метилйодидом та
- 15 (iv) перекристалізація неочищеного продукту, одержаної на етапі (iii), з водного розчину спирту.

Цей спосіб проілюстровано на нижченаведеній схемі:



20 де ізонікотинова кислота позначена ІНК, бензиламін - БА, а БАІНК означає бензиламід ізонікотинової кислоти.

Конденсація ізонікотинової кислоти із бензиламіном відбувається за підвищених температур, тобто в межах від 160 до 220°C.

Найбільшу перевагу надають температурному діапазону від 200 до 210°C.

25 Мольне співвідношення ізонікотинової кислоти та бензиламіну знаходиться в межах 1: (1,1-1,25).

Найбільша перевага надається співвідношенню приблизно 1:1,23.

У результаті реакції ізонікотинової кислоти та бензиламіну утворюється вода, яку видаляють за допомогою дистиляції з надлишком бензиламіну.

Продукт конденсації, а саме бензиламід ізонікотинової кислоти (БАІНК) виділяється з реакційної суміші при додаванні розчинника, який вибирають із групи розчинників, а саме - етилацетату, ацетонітрилу та ізопропанолу.

Найбільшу перевагу як розчиннику надають етилацетату.

Відповідно до переважного варіанту способу згідно з цим винаходом, розчин БАІНК, що містить вищезазначений розчинник, переважно етилацетат, обробляють активованим вугіллем.

Активоване вугілля використовують у кількості від 0,5% до 1,5% від об'єму розчинника, переважно приблизно 1%.

Час обробки активованим вугіллем становить від 20 до 40 хвилин, переважно близько 30 хвилин.

Температура, за якої здійснюють обробку активованим вугіллем, змінюється в межах від 65 до 75°C, переважно близько 70°C.

Далі активоване вугілля або деревне вугілля відфільтровують, а фільтрат спонтанно охолоджують до температури в межах від 25 до 35°C, переважно близько 30°C.

Спонтанне охолодження означає, що розчин просто залишають стояти, поки він не досягне бажаної температури. При цьому не застосовують жодних додаткових засобів або заходів для пришвидшення способу охолодження.

Після такого спонтанного охолодження до вищезгаданої температури застосовують охолоджуючий агент, що знижує температуру приблизно до рівня від 0 до 5°C.

Після перемішування збирають одержаний неочищений продукт.

Його одержують у формі пасти, яку обробляють водою. Масове співвідношення пасти БАІНК та води може бути від 1:2 до 1:3, переважно приблизно 1:2.

Цю водну систему нагрівають до температури в межах від 30 до 40°C, переважно від 32 до 35°C. Час перемішування становить від 1,5 до 2,5 годин, переважно близько 2 годин.

Після фільтрації преципітат двічі промивають холодною водою, а потім сушать, наприклад, за 25°C протягом 18 годин.

У результаті вищезгаданих етапів способу одержують БАІНК, який є гомогенним кристалічним порошком від жовтого до жовто-зеленого забарвлення та містить не більше ніж 0,5% домішок.

Такий високий ступінь чистоти дає можливість точно вирахувати кількість метилйодиду, який використовують на третьому етапі способу відповідно до цього винаходу.

Зазвичай реакція кватернізації БАІНК та метилйодиду проводиться з застосуванням надлишку останнього в межах від 5 до 15%, переважно від 8 до 12%.

Найбільшу перевагу надають надлишку метилйодиду, що становить приблизно 10%.

Відповідно до переважного варіанту способу згідно з цим винаходом, реакція кватернізації відбувається у водному розчині спирту. Вміст води у спирті зазвичай становить від 5 до 15%, переважно від 8 до 12%.

Найбільшу перевагу надають вмісту води близько 10%, а спиртом є етанол.

Неочищений продукт реакції кватернізації можуть виділяти із застосуванням фільтрації та промивати переважно водним розчином спирту. Переважно використовують 96% етанол.

Чисту α -форму карбабензпіриду відповідно до цього винаходу одержують завдяки рекристалізації неочищеного продукту, одержаного на етапі (iii), з водного розчину етанолу.

Зазвичай кількість води, наявної в етанолі становить від 5 до 15%, переважно від 7 до 13%.

Найбільшу перевагу для застосування на етапі (iv) надають 90% етанолу.

Відповідно до переважного варіанту заявленого способу співвідношення розчинника до неочищеного продукту, що застосовується на етапі (iv), знаходиться в межах від 1:2 до 1:4.

Найбільш переважним є співвідношення близько 1:3.

Після розчинення неочищеного продукту у розчиннику, переважно у 90% етанолі, розчин спонтанно (тобто без застосування охолоджуючих агентів) охолоджують від температури розчинника до рівня від 30 до 40°C.

Найбільшу перевагу надають спонтанному охолодженню гарячого розчину (тобто без застосування охолоджуючих агентів) до температури приблизно 30°C.

Після цього температуру знижують до рівня від 10 до 15°C.

Після перемішування протягом періоду від 1 до 3 годин чистий продукт можна відфільтрувати та промити, наприклад, 2 рази, холодним 96% спиртом.

Відповідно до переважного варіанту способу рекристалізації до розчину неочищеного продукту додають активоване деревне вугілля.

Винахід також стосується фармацевтичних препаратів, що містять як активна речовина α -кристалічну форму сполуки (I) із одним або кількома фармацевтично прийнятними, інертними компонентами. Лікарська форма може застосовуватися перорально, назально, ректально або

парентерально у формі таблеток, таблеток, вкритих оболонкою, желатинових капсул, пастилок, розчинів для перорального застосування, назальних спреїв, розчинів для ін'єкцій, супозиторіїв, розчинів для інгаляції або порошків, тощо.

Ефективне дозування може змінюватися від 125 мг до 2500 мг на день в один або 4 окремі прийоми.

Фармацевтичні препарати відповідно до цього винаходу можуть використовуватися у лікуванні або запобіганні вірусних інфекцій. Зокрема, їх використовують при інфекціях, спричинених такими вірусами грипу (А), як віруси штамів типу А [H3N2 (Каліфорнія та Вікторія/3/75), H1N1 (Нова Каледонія 20/99)].

Крім того, нова α -кристалічна форма карбабензпіриду відповідно до цього винаходу, а також лікарські засоби, що містять цю сполуку, виявляють противірусну активність щодо аденовірусів, вірусів Коксаки, еховірусів, цитомегаловірусу, метаневмовірусу та ентеровірусу, визначених за результатами аналізу відтворення вірусів.

І, врешті решт, виявлено, що нова α -кристалічна форма має вплив на вміст інтерферону у плазмі крові пацієнтів із грипом. Відповідно до цього винаходу вплив α -кристалічної форми карбабензпіриду сполуки (I) на клітинно-опосередковану імунну відповідь приводить до покращення клінічного перебігу гострих респіраторних захворювань та обмежує можливості розвитку вірусної імуносупресії, ускладнень та переходу інфекції у хронічну форму. Збільшення утворення інтерферону-гамма (IFN- γ) має особливо важливе значення, оскільки крім противірусної активності він виявляє різні ефекти на клітини імунної системи, мієломонітарні клітини та вважається ключовим цитокіном, що супроводжує спосіб антигенної стимуляції лімфоцитів.

Наступні приклади ілюструють винахід, проте жодним способом не обмежують його.

Експериментальна частина

Приготування БАІНК

Приклад 1

Суміш 91,4 г (0,7424 М) ізонікотинової кислоти та 97,9 г (0,9136 М) бензи-ламіну (1:1,23) нагрівають до температури 180°C з застосуванням зворотного конденсатора та перемішують протягом 1 год. При цьому температура реакції зменшується до 160°C. Тоді реакційну масу нагрівають до температури 210°C протягом 2 год з застосуванням прямого конденсатора для відгонки водного бензиламіну. Реакційну масу нагрівають до температури 220°C протягом 1,5 год з застосуванням прямого конденсатора для відгонки надлишку бензиламіну. Вміст реактора охолоджують до температури 100°C, додають 240 мл етилацетату, потім реакційну масу перемішують протягом 20 хв та додають 2,4 г деревного вугілля, після чого реакційну масу перемішують при температурі 70-75° С протягом 30 хв, фільтрують від деревного вугілля, а одержаний розчин спонтанно охолоджують до 30°C, а потім до 0-+5°C із застосуванням охолоджуючого агента, протягом 1 год перемішують та фільтрують.

Пасту БАІНК змішують з 180 мл води, нагрівають до температури 32-35°C та перемішують протягом 2 год.

Реакційну масу фільтрують, а преципітат у фільтрі промивають двічі 50 мл охолодженої води. Продукт висушують при температурі 25°C протягом 18 год.

Кількість БАІНК: 136,5 г (86,6 %).

Аналітичний контроль:

Вміст: 101,44%

Вміст супутніх домішок:

БА, %	ІНК, %	Всі домішки (разом), %
0,1	відсутня	0,1

Приклад 2

Цей приклад відрізняється від Прикладу 1 тим, що:

1. Суміш 294 г (2,39 М) ізонікотинової кислоти та 316,0 г (2,95 М) бензиламіну нагрівають.

2. Додають 772 мл етилацетату.

3. Пасту БАІНК змішують з 500 мл води.

Кількість БАІНК: 413,6 г (81,6 %).

Приклад 3

Цей приклад відрізняється від Прикладу 1 тим, що :

1. Суміш 45,7 г (0,3715 М) ізонікотинової кислоти та 49,1 г (0,4589 М) бензиламіну нагрівають.

2. Додають 120 мл етилацетату.

3. Пасту БАІНК змішують з 80 мл води.

Кількість БАІНК: 65,1 г (82,6 %).

Приготування неочищеного карбабензпіриду

Приклад 4

5 106,1 г (0,5 М) БАІНК поміщують у реактор, обладнаний мішалкою, зворотнім конденсатором та крапельною лійкою, додають 230 мл 90 % спирту, реакційну масу нагрівають до 38-40°C та перемішують протягом 30 хв до одержання розчину. Додають 2,3 г деревного вугілля і нагрівають реакційну масу до температури 60-70°C на 30 хв, після чого реакційну масу фільтрують, а деревне вугілля у фільтрі двічі промивають 5 мл 90% спирту. Одержаний розчин

10 нагрівають до температури 40-41 °C і по краплях додають 78,1 г (0,55 М) метилйодиду. Реакційну масу перемішують при температурі 40-41 °C протягом 1 год, нагрівають до кипіння та кип'ятять протягом 1 год. Реакційну масу спонтанно охолоджують до температури 40°C, а тоді на водяній бані до температури 10-15°C, при цій температурі суміш перемішують протягом 1,5 год (без затравки кристалів). Реакційну масу фільтрують, а преципітат на фільтрі двічі

15 промивають 55 мл охолодженого 96% спирту.

Продукт висушують при 25° С протягом 18 год та зважують.

Кількість неочищеного карбабензпіриду (пасти): 164,6 г (92,9 %)

Аналітичний контроль:

Вміст: 102,05%

Вміст супутніх домішок:

БА, %	БАІНК, %	ІНК, %	Інші домішки, %
відсутній	0,3	відсутня	0,05

Приклад 5

25 Цей приклад відрізняється від Прикладу 4 тим, що для реакції кватернізації використовують 398 г БАІНК (1,88 М), 868 мл 90 % спирту та 292,0 г (2,06 М) метилйодиду.

Кількість неочищеного карбабензпіриду (пасти): 586,8 г

Приклад 6

30 Цей приклад відрізняється від Прикладу 4 тим, що для реакції кватернізації використовують 30 г (0,14 М) БАІНК, 63,5 мл 90 % спирту, 21,42 г (0,15 М) метилйодиду.

Кількість неочищеного карбабензпіриду (пасти): 42,9 г

Приготування очищеної α -кристалічної форми карбабензпіриду

Приклад 7

35 580 г неочищеного карбабензпіриду розчиняють у 1744 мл 90 % спирту (1:3) (m/V), та додають 17 г активованого деревного вугілля. Реакційну масу нагрівають до температури кипіння, перемішують та кип'ятять протягом 30 хв і фільтрують. Одержаний розчин спонтанно охолоджують до температури 30°C, а тоді на охолоджуючій водяній бані до температури 10-15°C, після цього за такої температури перемішують протягом 1 год (без затравки кристалів). Реакційну масу фільтрують, а преципітат на фільтрі двічі промивають 105 мл охолодженого 96 % спирту.

40 Продукт висушують при температурі 25° С протягом 18 год та зважують.

Кількість очищеного карбабензпіриду: 502,8 г (62,5 % на основі ізонікотинової кислоти).

Аналітичний контроль:

Вміст: 100,97%

Вміст супутніх домішок:

БА, %	БАІНК, %	Загальна кількість домішок, %
відсутній	0,01	0,01

Приклад 8

50 Цей приклад відрізняється від Прикладу 7 тим, що для реакції рекристалізації використовують 30 г неочищеного карбабензпіриду, 90 мл 90% спирту та 0,1 г активованого деревного вугілля.

Кількість очищеного карбабензпіриду. 25,6 г (60,3% на основі ізонікотинової кислоти).

Аналітичний контроль:

Вміст: 100,58%

Вміст супутніх домішок:

БА, %	БАІНК, %	Загальна кількість домішок, %
0,005	відсутній	0,005

Приклад 9

Цей приклад відрізняється від Прикладу 7 тим, що для рекристалізації використовують 500 г неочищеного карбабензпіриду, 1500 мл 90 % спирту та 15 г активованого деревного вугілля.

Кількість очищеного карбабензпіриду. 425,79 г (75,4% на основі ізонікотинової кислоти).

Аналітичний контроль:

Вміст: 99,48%

Вміст супутніх домішок:

БА, %	БАІНК, %	Загальна кількість домішок, %
0,01	0,015	0,03

Приклад 10

50 г неочищеного карбабензпіриду розчиняють у 150 мл 90% алкоголю (1:3) (m/V), додають 1,5 г активованого деревного вугілля, реакційну масу нагрівають до температури кипіння, помішують і кип'ятять протягом 30 хв та фільтрують. Одержаний розчин спонтанно охолоджують до температури 30°C, а тоді на охолоджуючій водяній бані до температури 10-15°C, при цій температурі перемішують протягом 1 год (без затравки кристалів), фільтрують для одержання розчину, а фільтр двічі промивають 20 мл охолодженого 96% спирту.

Продукт висушують при 25°C протягом 18 год та зважують.

Кількість очищеного карбабензпіриду. 44 г (70,8% на основі ізонікотинової кислоти).

Аналітичний контроль:

Температура плавлення: 191,3°C

Вміст: 99,81%

Вміст супутніх домішок:

БА, %	БАІНК, %	Загальна кількість домішок, %
відсутній	0,01	0,03

Приклад 11

Цей приклад відрізняється від Прикладу 10 тим, що як розчинник використовують 70% спирт.

Кількість очищеного карбабензпіриду. 33 г (53,1% на основі ізонікотинової кислоти).

Аналітичний контроль:

Температура плавлення: 191,5°C

Вміст: 101,01%

Вміст супутніх домішок:

БА, %	БАІНК, %	Загальна кількість домішок, %
відсутній	0,03	0,05

Приклад 12

Цей приклад відрізняється від Прикладу 10 тим, що як розчинник використовують воду.

Кількість очищеного карбабензпіриду. 40,6 г (65,4 % на основі ізонікотинової кислоти).

Аналітичний контроль:

Температура плавлення: 191,4°C

Вміст: 100,19%

Вміст супутніх домішок:

БА, %	БАІНК, %	Загальна кількість домішок, %
відсутній	0,14	0,2

Приклад 13

Цей приклад відрізняється від Прикладу 10 тим, що неочищений карбабензпірид очищують, і карбабензпірид піддають другій рекристалізації з застосуванням як розчинник води. 40 г очищеного карбабензпіриду розчиняють у 460 мл води при температурі 30-35°C, перемішують

протягом 20 хв, а тоді спонтанно охолоджують до температури 22-25°C, далі перемішують протягом 1 год, а тоді охолоджують протягом 2 год до температури 7-10°C та фільтрують.

Кількість очищеного карбабензпіриду. 29,5 г (73,8%, на основі очищеного карбабензпіриду)

Аналітичний контроль:

5 Температура плавлення: 191,1 °C

Вміст: 99,11 %

Вміст супутніх домішок:

БА, %	БАІНК, %	Загальна кількість домішок, %
відсутній	0,007	0,04

10 Інформація про структуру кристалу (α -кристалічна форма карбабензпіриду)

Для кристалографічного аналізу з застосуванням рентгенівських променів використовували жовту призму $C_{14}H_{15}IN_2O$, з приблизними розмірами 0,26 мм × 0,34 мм × 0,40 мм. Дані щодо інтенсивності рентгенівського випромінювання визначалися при 173(2) К на системі Bruker SMART APEX II, обладнаній графітовим монохроматором та $MoK\alpha$ запаяною трубкою з ультратонким фокусом ($\lambda = 0,71073\text{\AA}$), що працює за потужності 1250 Вт (50 кВ, 25 мА). Детектор був розташований на відстані 60 мм від кристалу. Було одержано 458 зображень з шириною сканування 1.5° у ω та 211 додаткових зображень з шириною сканування 1.5° у ϕ . Всі зображення були одержані з витримкою 20 с/зображення. Загальний час одержання даних становив 5 годин. Зображення були інтегровані за допомогою пакета програмного забезпечення Bruker SAINT з застосуванням алгоритму інтеграції вузьких зображень. Інтеграцію даних виконували з застосуванням ромбічної елементарної комірки, що дало загалом 18403 відбиттів до максимального кута падіння $\theta = 30,54^\circ$ (розділення - 0,7 Å), з яких 4309 були незалежними (надлишковість 4,27, повнота = 99,7%, $R_{int} = 2,67\%$, $R_{sig} = 2,29\%$) і 4152 (96,4 %) перевищували $4\sigma(F^2)$. Остаточні параметри елементарної комірки ($a = 9,27390(10)\text{\AA}$, $b = 10,7187(2)\text{\AA}$, $c = 14,2161(2)\text{\AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, об'єм = $1413,14(4)\text{\AA}^3$) ґрунтуються на уточненні центрів мас XYZ 9894 відбиттів понад 2θ з $2,38^\circ < 2\theta < 30,54^\circ$. Аналіз даних показав незначний розпад під час збору даних. Дані були відкориговані з урахуванням ефекту поглинання з застосуванням чисельного методу (SADABS). Співвідношення мінімального до максимального очевидного пропускання становило 0,79. Підраховані коефіцієнти мінімального та максимального пропускання (на основі розміру кристалу) становлять 0,4625 та 0,5872.

Структура була визначена та уточнена за допомогою пакета програмного забезпечення Bruker SHELXTL (версія 6.1) з застосуванням просторової групи $P2(1)2(1)2(1)$, із $Z = 4$ для складу елементарної комірки $C_{14}H_{15}IN_2O$. Остаточне уточнення з застосуванням анізотропного наближення повноматричного метода найменших квадратів за F^2 з 164 змінними зійшлося при $R1 = 1.87\%$ для даних, що спостерігались, і при $wR2 = 4.40\%$ - для всіх даних. Ступінь відповідності був 1,117. Найбільший пік при остаточному диференційному відтворенні електронної густини був $0,260\text{ е}^-/\text{\AA}^3$, а дірка - $0,752\text{ е}^-/\text{\AA}^3$ із середньоквадратичним відхиленням $0,093\text{ е}^-/\text{\AA}^3$. Густина, розрахована на основі остаточної моделі, склала 1.665 г/см^3 і $F(000)$, 696 e^- .

40 Результати рентгеноструктурного графічного аналізу кристалу підсумовані у наступних таблицях:

Таблиця 3

Цифрові дані про кристал

Ідентифікаційний код	BatchNo38	
Назва сполуки	BatchNo38	
Емпірична формула	$C_{14}H_{15}IN_2O$	
Молекулярна формула	$C_{14}H_{15}IN_2O$	
Молекулярна маса за формулою	354,18	
Температура	173(2) К	
Довжина хвилі	0,71073 Å	
Розмір кристалу	0,40 × 0,34 × 0,26	мм
Кристалічна форма	жовта призма	
Кристалічна система	орторомбічна	
Просторова група	$P2(1)2(1)2(1)$	

Продовження таблиці 3

Ідентифікаційний код	BatchNo38	
Розмір ґратки	a = 9.27390(10) Å b = 10.7187(2) Å c = 14.2161(2) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Об'єм	1413.14(4) Å ³	
Z	4	
Густина (вирахована)	1.665 мг/м ³	
Коефіцієнт абсорбції	2.257 мм ⁻¹	
F(000)	696	

Таблиця 4

Атомні координати та еквівалентні ізотропні параметри атомного зміщення (Å²).
U(eq) представлено у вигляді однієї третини від сліду ортогоналізованого U_{ит} тензора

	x/a	y/b	z/c	U(eq)
I1	0,059362(13)	0,220079(11)	0,681751(8)	0,02914(4)
N1	0,69454(18)	0,05287(15)	0,58001(10)	0,0271(3)
N2	0,28947(17)	0,02738(14)	0,81732(11)	0,0264(3)
O1	0,46021(17)	-0,10841(13)	0,86668(9)	0,0349(3)
C1	0,7327(2)	-0,0307(2)	0,64696(15)	0,0364(5)
C2	0,6437(2)	-0,0549(2)	0,72023(15)	0,0345(4)
C3	0,5104(2)	0,00550(17)	0,72769(12)	0,0237(3)
C4	0,4756(2)	0,09259(18)	0,65976(12)	0,0264(4)
C5	0,5688(2)	0,11448(17)	0,58631(12)	0,0276(4)
C6	0,7919(2)	0,0751(2)	0,49994(13)	0,0373(5)
C7	0,4168(2)	-0,02994(16)	0,81034(12)	0,0255(4)
C8	0,1835(2)	-0,00506(18)	0,88881(12)	0,0297(4)
C9	0,1874(2)	0,07944(16)	0,97341(12)	0,0238(3)
C10	0,2960(2)	0,06614(17)	1,04050(13)	0,0264(4)
C11	0,2997(2)	0,1429(2)	1,11906(13)	0,0326(4)
C12	0,1953(3)	0,2329(2)	1,13172(14)	0,0395(5)
C13	0,0859(3)	0,2455(2)	1,06617(16)	0,0429(5)
C14	0,0835(2)	0,1694(2)	0,98697(14)	0,0355(4)

Таблиця 5

Довжини зв'язків (Å)

N1-C5	1,343(2)	N1-C1	1,354(2)
N1-C6	1,472(2)	N2-C7	1,335(2)
N2-C8	1,456(2)	N2-H2N	0,8800
O1-C7	1,229(2)	C1-C2	1,354(3)
C1-H1	0,9500	C2-C3	1,400(3)
C2-H2	0,9500	C3-C4	1,381(2)
C3-C7	1,509(3)	C4-C5	1,376(3)
C4-H4	0,9500	C5-H5	0,9500
C6-H6A	0,9800	C6-H6B	0,9800
C6-H6C	0,9800	C8-C9	1,506(2)
C8-H8A	0,9900	C8-H8B	0,9900
C9-C14	1,377(3)	C9-C10	1,394(3)
C10-C11	1,388(3)	C10-H10	0,9500
C11-C12	1,378(3)	C11-H11	0,9500
C12-C13	1,385(3)	C12-H12	0,9500
C13-C14	1,391(3)	C13-H13	0,9500
C14-H14	0,9500		

Таблиця 6

Кути зв'язків (°)

C5-N1-C1	120,36(17)	C5-N1-C6	120,29(16)
C1-N1-C6	119,35(17)	C7-N2-C8	122,64(16)
C7-N2-H2N	118,7	C8-N2-H2N	118,7
C2-C1-N1	120,51(19)	C2-C1-H1	119,7
N1-C1-H1	119,7	C1-C2-C3	120,56(18)
C1-C2-H2	119,7	C3-C2-H2	119,7
C4-C3-C2	117,77(18)	C4-C3-C7	125,45(17)
C2-C3-C7	116,78(16)	C5-C4-C3	119,93(17)
C5-C4-H4	120,0	C3-C4-H4	120,0
N1-C5-C4	120,82(16)	N1-C5-H5	119,6
C4-C5-H5	119,6	N1-C6-H6A	109,5
N1-C6-H6B	109,5	H6A-C6-H6B	109,5
N1-C6-H6C	109,5	H6A-C6-H6C	109,5
H6B-C6-H6C	109,5	O1-C7-N2	123,79(18)
O1-C7-C3	119,43(17)	N2-C7-C3	116,79(16)
N2-C8-C9	113,40(15)	N2-C8-H8A	108,9
C9-C8-H8A	108,9	N2-C8-H8B	108,9
C9-C8-H8B	108,9	H8A-C8-H8B	107,7
C14-C9-C10	118,77(17)	C14-C9-C8	121,04(17)
C10-C9-C8	120,18(17)	C11-C10-C9	120,54(18)
C11-C10-H10	119,7	C9-C10-H10	119,7
C12-C11-C10	120,17(19)	C12-C11-H11	119,9
C10-C11-H11	119,9	C11-C12-C13	119,71(19)
C11-C12-H12	120,1	C13-C12-H12	120,1
C12-C13-C14	119,9(2)	C12-C13-H13	120,0
C14-C13-H13	120,0	C9-C14-C13	120,87(19)
C9-C14-H14	119,6	C13-C14-H14	119,6

Таблиця 7

Торсійні кути (°)

C5-N1-C1-C2	1,1(3)	C6-N1-C1-C2	-178,5(2)
N1-C1-C2-C3	0,4(3)	C1-C2-C3-C4	-2,0(3)
C1-C2-C3-C7	178,4(2)	C2-C3-C4-C5	2,0(3)
C7-C3-C4-C5	-178,38(17)	C1-N1-C5-C4	-1,0(3)
C6-N1-C5-C4	178,63(18)	C3-C4-C5-N1	-0,6(3)
C8-N2-C7-O1	-5,2(3)	C8-N2-C7-C3	174,76(15)
C4-C3-C7-O1	-179,47(19)	C2-C3-C7-O1	0,1(2)
C4-C3-C7-N2	0,6(3)	C2-C3-C7-N2	-179,81(18)
C7-N2-C8-C9	97,4(2)	N2-C8-C9-C14	104,6(2)
N2-C8-C9-C10	-76,5(2)	C14-C9-C10-C11	-0,5(3)
C8-C9-C10-C11	-179,44(17)	C9-C10-C11-C12	0,3(3)
C10-C11-C12-C13	0,6(3)	C11-C12-C13-C14	-1,4(3)
C10-C9-C14-C13	-0,2(3)	C8-C9-C14-C13	178,67(19)
C12-C13-C14-C9	1,2(3)		

5 Антивірусна активність проти штамів вірусу грипу типу А [H3N2 (Каліфорнія та Вікторія/3/75), H1N1 (Нова Каледонія 20/99)]

Метою нижчеописаного дослідження було перевірити антивірусну активність α -кристалічної форми карбабензпіриду, що має кодову назву "FAV00A" проти різних штамів вірусів грипу типу А.

10 Пригнічення вірусної інфекції у культурі клітин MDCK (NBL-2) (клітини Мадін-Дарбі нирки собаки) перевіряли, визначаючи зменшення титрів вірусів за допомогою методу оцінки

зменшення «врожаю» вірусів. Як контроль ефективності FAV00A використали речовину порівняння (Занамівір - інгібітор нейрамінідази) з відомим протівірусним ефектом до вірусів грипу.

1. Матеріали та методи

5 Система для проведення досліджень

Клітини: Лінія клітин Мадін-Дарбі нирки собаки (MDCK, NBL-2) була одержана з Американської колекції типових культур (ATCC), Рок-вілл, Меріленд, ATCC-номер CCL-34. Культуру клітин зберігали у рідкому азоті. Робочий запас клітин NBL-2 вирощували у мінімальному поживному середовищі, доповненому 5% ембріональної телячої сироватки (ETC) протягом не більше 20 циклів відповідно до стандартної операційної процедури (СОП). Клітини NBL-2 вирощували у колбах для культури клітин з площею поверхні 25 см² на мінімальному поживному середовищі (МПС) при 37°C та переносили у розведення 1:10 або 1:20 двічі на тиждень. У кожну лунку 96-лункового планшета вносили 100 мкл клітинної суспензії, що містила 8×10^4 клітин. Відповідно до СОП, клітини в плановому порядку перевіряли на наявність мікоплазм за допомогою набору Venor@GeM для традиційної полімеразної ланцюгової реакції, (виробництва «Мінерва Біолабс ГмбХ» (Minerva Biolabs GmbH), Берлін, Німеччина).

Клітини, які використовували у дослідженні, не були контаміновані.

Віруси: До вірусів грипу, що використовувалися для перевірки антивірусної активності, належали: вірус грипу типу А H1N1 (штам Нова Каледонія 20/99), вірус грипу типу А H3N2 (штами Вікторія/3/75 та Каліфорнія), вірус грипу типу В (штами Тайвань 2/62 та Цзянсу). Запас вірусів був одержаний при розмноженні вірусів грипу на безсироватковому МПС з додаванням 2 мкг/мл трипсину з застосуванням клітин NBL-2 як господаря. Для гарантування стабільності вірусу до зараженої вірусом культури клітин NBL-2 після 2-3 днів інкубації при 37°C, додали 1% сироваткового альбуміну корів (САК), перед заморожуванням на ніч при температурі -80°C. З очищених супернатантів культури клітин, використовуючи низькошвидкісне центрифугування, приготували маточні розчини з вірусами, а тоді поділили на аліквоти по 500 мкл. Цей вихідний матеріал з вірусами зберігали при -80°C до моменту застосування. Відповідні титри інфекційності вірусів у вихідних розчинах визначали титруванням на моношарі NBL-2 клітин у 96-лункових планшетах та оцінювали дозу зараження 50% культури тканин (TCID₅₀). Інфекційний титр визначали методом Спірмена-Кербера (Spearman C (1908). The method of "right and wrong cases" ("constantstimuli") without Gauss's formulae. British Journal of Psychology 2: 227-242; Karber G (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche [A contribution to the collective treatment of a pharmacological experimental series]. Archiv fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie 162: 480-483.)

35 Середовище для культури клітин:

МПС (MEM), Номер за каталогом. Т 031-10, «Біохром» (Biochrom)

ETC (FCS), Номер за каталогом F-7524, «Сігма» (Sigma)

Фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS) 10х:

40 Фосфатно-сольовий буферний розчин Номер за каталогом L 182-10, «Дульбекко Біохром» (Dulbecco Biochrom) додати до 1 л води для ін'єкцій, Номер за каталогом 0370-3452, «Браун» (Braun).

Автоклавують та зберігають за кімнатної температури, термін придатності 1 рік; два місяці в разі застосування.

PBS 1х:

45 450 мл води для ін'єкцій + 50 мл 10х PBS

Зберігати за кімнатної температури, термін придатності один рік; два місяці в разі застосування.

NaHCO₃, 7.5%:

75 г NaHCO₃, Номер за каталогом S-4019, «Сігма» (Sigma)

50 Розчиняють у 1 л води (Millipore-H₂O).

Зберігати за температури 2-8°C, термін придатності один рік; два місяці в разі застосування.

Нерес (N-2-гідрокси-етилпіперазин N'-2-етансульфонова кислота), 1 М:

238,31 г Нерес, Номер за каталогом S-4019, «Сігма» (Sigma)

33,75 мл NaOH 32%

55 Розчинити в 1 л води (Millipore-H₂O).

Зберігати за температури 2-8°C, термін придатності один рік; чотири місяці в разі застосування.

L-глутамін, 0.2 М:

60 29,2 г L-глутаміну, Номер за каталогом G-5763, «Сігма» (Sigma) Розчинити в 1 л води (Millipore-H₂O).

Зберігати за температури $\leq -18^{\circ}\text{C}$ протягом одного року; два місяці за температури $2-8^{\circ}\text{C}$ в разі застосування.

Пеніцилін/Стрептоміцин:

- 10 МЕГ α Пеніцилін (пеніцилін), «Грюненталь» (Grünenthal) 10 г Стрептоміцин-сульфат,
5 Номер за каталогом S-6501, «Сіґма» (Sigma)
Розчинити в 1 л води (Millipore-H₂O).

Зберігати за температури $\leq -18^{\circ}\text{C}$ протягом одного року; два тижні за температури $2-8^{\circ}\text{C}$ в разі застосування.

Трипсин/ЕДТК розчин:

- 10 2,0 г трипсину 1:250 BAEE 1570 одиниць/мл, Номер за каталогом T-4799, «Сіґма» (Sigma)
0,6 г ЕДТК-Na (Tritriplex III), Номер за каталогом 8418.0100, «Мерк» (Merck) Розчинити в 1 л 1x PBS.

Зберігати за температури $\leq -18^{\circ}\text{C}$ протягом одного року; один місяць за температури $2-8^{\circ}\text{C}$ в разі застосування.

- 15 Як підтримуюче середовище використовували безсироваткове МПС з додаванням 2% herpes, 2% NaHCO₃, 1% пеніциліну/стрептоміцину, яке містить 2 мкг/мл трипсину.

2. Визначення антивірусної активності (метод оцінки зменшення «врожаю» вірусів)

- Метод оцінки зменшення «врожаю» вірусів - потужний метод для оцінки ефективності
протівірусних сполук. Цей метод дає можливість виконати кількісний аналіз утворення
20 інфекційних вібріонів у оброблених препаратом культурі порівняно з «врожаєм» вірусів у
необробленому контрольному зразку. Під час цієї процедури інфіковані вірусом культури
інкубують з протівірусними сполуками протягом достатнього для реплікації періоду, а тоді
оцінюють на наявність нового потомства вірусів методом титрування на окремому моношарі
культури клітин (Shipman C Jr, Smith SH, Carlson RH, Drach JC (1976). Antiviral activity of
25 arabinosyladenine and arabinosylhypoxanthine in herpes simplex virus-infected KB cells: selective
inhibition of viral deoxyribonucleic acid synthesis in synchronized suspension cultures. Antimicrob
Agents Chemother. 9: 120-127; Collins P, Bauer DJ (1977). Relative potencies of anti-herpes
compounds. Ann N Y Acad Sci. 284: 49-59; Prichard MN, Turk SR, Coleman LA, Engelhardt SL,
Shipman C Jr, Drach JC (1990). A microtiter virus yield reduction assay for the evaluation of antiviral
30 compounds against human cytomegalovirus and herpes simplex virus. J Virol Methods. 28: 101-106).

2.1 Принцип дослідження:

- Дослідження виконувалося у колбах для культури клітин у трьох паралелях. Були проведені
два незалежні експерименти. Концентрації випробовуваної та референтної сполуки попередньо
визначалися під час вимірювань цитотоксичності, що описано вище. Найвища використана
35 концентрація не повинна була виявляти жодного токсичного ефекту на клітини. Попередні
експерименти були спершу проведені у двох різних варіантах з застосуванням 400 мкг
випробовуваної речовини FAV00A та 10 нг Занамівіру як референтної сполуки. Експеримент
проводився з застосуванням вірусу грипу типу В штаму Тайвань 2/62 та вірусу грипу типу А
штаму Нова Каледонія. При першому варіанті дослідження клітини NBL-2 висівали у колби для
40 культури клітин з площею поверхні 25 см² на МПС за 37°C у розведенні 1:10. Клітини
підраховували, а тоді заражали після промивання фосфатно-сольовим буферним розчином при
множинності інфікування 0,01 для обох штамів вірусу грипу. До одного ряду (у трьох паралелях)
інфікованих клітин одночасно додали 400 мкг FAV00A (одночасно з вірусом). Клітини інкубували
протягом 45 хвилин при 37°C , щоб дозволити вірусу здійснити адсорбцію, а тоді тричі
45 промивали фосфатно-сольовим буферним розчином для видалення неадсорбованих вірусів.
Після цього групу інфікованих клітин, попередньо інкубованих із 400 мкг FAV00A, знову
обробили 400 мкг FAV00A. Другу групу інфікованих клітин обробили 10 нг Занамівіру. Також у
дослідження був включений вірусний контроль без додавання випробовуваної або референтної
сполуки. Другий варіант дослідження виконували подібно до першого, але без етапу
50 попередньої інкубації з 400 мкг FAV00A (одночасне додавання FAV00A). При цьому клітини
спершу інфікували вірусами, після чого інкубували протягом 45 хвилин для того, щоб дозволити
вірусу адсорбуватися. Після триразового промивання фосфатно-сольовим буферним розчином
культуру інфікованих клітин обробляли 400 мкг FAV00A або 10 нг Занамівіру. Колби з культурою
інкубували за 37°C у інкубаторі з 5% CO₂ протягом 24 годин, а тоді заморожували на ніч, а
55 наступного дня розморожували. Етапи заморожування та розморожування зумовлювали
дезінтеграцію клітин та вивільнення вірусів, які вони містили. Таким чином, можна було
визначити загальну кількість вірусу. Після низькошвидкісного центрифугування у кожній
експериментальній моделі (контроль вірусу, а також випробовувана та референтна сполуки)
визначали кількість вірусу використовуючи "титрування до кінцевої точки" у 96-лунковому

планшеті, при цьому одержували титр вірусу/кількість, за якої 50% клітин є інфікованими або неінфікованими (TCID₅₀/мл).

Усі подальші експерименти з усіма випробовуваними вірусами грипу проводили за другим варіантом. Для цього виконували підрахунок клітин, які потім інфікували після промивання фосфатно-сольовим буферним розчином при множинності інфікування 0,01 для всіх використаних типів вірусу грипу, крім H3N2 (Каліфорнія), який використовували для інфікування клітин при множинності інфікування 0,001. Були випробовувані дві різні концентрації (400 мкг та 800 мкг FAV00A; 100 нг та 1000 нг Занамівіру).

Титрування до кінцевої точки.

Відповідно до СОП підготували один 96-лунковий планшет (для кожної експериментальної моделі) з чутливою культурою клітин. У кожну лунку засіяли 50 мкл суспензії клітин. Клітини вирощували за 37°C в атмосфері із 5% CO₂ протягом трьох або чотирьох днів для утворення суцільного моношару. Після низькошвидкісного центрифугування здійснювали 10-разове серійне розведення (до 10⁻⁹) одержаних вірусів з застосуванням підтримуючого середовища. На кожній пластині 1-й та 2-й ряди (у кожному по 8 лунок) використовували для контролю культури клітин, а з 3-го по 12-й - для 10-разово серійно розведених вірусів, починаючи з нерозведеного матричного зразка та закінчуючи розведенням 10⁻⁹. У відповідні ряди внесли по 50 мкл розведення вірусів, тоді як у лунки контрольних рядів вносили по 50 мкл підтримуючого середовища. Планшети інкубували протягом 2-3 днів за температури 37°C у інкубаторі із CO₂. Після завершення інкубаційного періоду планшети вивчали мікроскопічно на наявність цитопатогенного ефекту (ЦПЕ). Дослідження проводили незалежно двома лаборантами. Титр вірусів був підрахований за методом Спірмена-Кербера. Після цього вираховували відсоток зменшення титру при додаванні випробовуваної або референтної сполуки порівняно з контролем (взято за 100%).

2.2 Одержані результати

Зменшення «врожаю» вірусів виражали як TCID₅₀/мл, показаний також % вірусного інфікування, а також у скільки разів спостерігалось зменшення в разі обробки випробовуваною або референтною сполукою по відношенню до вірусного контролю (100 %). Оскільки проводили два експерименти з випробовуваною та референтною сполукою, у таблицях наведено середні величини:

Таблиця 8

Вірус грипу типу А, штам Нова Каледонія (H1N1)

	Титр (TCID ₅₀ /мл)	% «врожаю» вірусів відносно контролю	Кратність зменшення
Контроль вірусу	2,11×10 ⁶	100	-
FAV00A 400 мкг (із 45 хв попередньої інкубації)	1,10×10 ⁶	52	1,92
FAV00A 400 мкг (без попередньої інкубації)	6,56×10 ⁵	31	3,23
Занамівір 10 нг	4,85×10 ⁵	23	4,35

Таблиця 9

Вірус грипу типу А, штам Каліфорнія (H3N2)

	Титр (TCID ₅₀ /мл)	% «врожаю» вірусів відносно контролю	Кратність зменшення
Контроль вірусу	2,95×10 ⁴	100	-
FAV00A 400 мкг	2,25×10 ⁴	76	1,32
FAV00A 800 мкг	1,80×10 ⁴	61	1,64
Занамівір 10 нг	1,18×10 ²	0,4	250

Таблиця 10

Вірус грипу типу А, штам Вікторія (H3N2)

	Титр (TCID ₅₀ /мл)	% «врожаю» вірусів відносно контролю	Кратність зменшення
Контроль вірусу	$2,90 \times 10^6$	100	-
FAV00A 400 мкг	$1,20 \times 10^6$	41	2,44
FAV00A 800 мкг	$7,75 \times 10^5$	27	3,70
Занамівір 10 нг	$7,05 \times 10^2$	0,02	5000

Таблиця 11a

Вірус грипу типу А, штам Нова Каледонія (H1N1)

	Титр (TCID ₅₀ /мл)	% «врожаю» вірусів відносно контролю	Кратність зменшення
Контроль вірусу	$2,11 \times 10^6$	100	-
FAV00A 400 мкг	$6,81 \times 10^5$	32	3,13
Занамівір 100 нг	$7,00 \times 10^4$	3	33,33

Таблиця 12b

Вірус грипу типу А, штам Нова Каледонія (H1N1)

	Титр (TCID ₅₀ /мл)	% «врожаю» вірусів відносно контролю	Кратність зменшення
Контроль вірусу	$9,70 \times 10^6$	100	-
FAV00A 800 мкг	$2,70 \times 10^6$	28	3,57
Занамівір 100 нг	$1,42 \times 10^6$	15	6,67

5 3. Висновки

Вищенаведені дані підтверджують, що FAV00A має протівірусний ефект проти вірусів грипу типу А, перевірений зменшенням «врожаю» вірусів у культурі клітин NBL-2. Час додавання в експерименті дає змогу припустити, що FAV00A впливає на етапи адсорбції вірусу до специфічних рецепторів на мембрані клітин. До цих етапів належить розпакування вірусів та реплікація.

10 Антивірусна активність проти аденовірусів, вірусу Коксакі, еховірусу, цитомегаловірусу, метапневмовірусу та ентеровірусу, визначена методом оцінки «врожаю» вірусів

Метою дослідження було дослідити вплив випробовуваної речовини FAV00A на реплікацію аденовірусів, метапневмовірусу людини, еховірусу, вірусу Коксакі А9, ентеровірусу 71 та цитомегаловірусу людини, визначаючи титр вірусу. Титри вірусів визначалися за методом оцінки зменшення «врожаю» вірусів.

1. Матеріали та методи

1.1 Матеріали та методи дослідження

1.1.1 План дослідження

20

Вірус	Джерело, звідки взято вірус	Культура клітин для розмноження вірусу	Підтримуюче середовище	Множинність інфікування*
Коксакі А9	Hygienish-bakteriologisches landesuntersuchungsamt "Westfalen"	HFF	МПС + 2% ЕТС	0,005
Аденовірус 3	ATCC (ATCC No: VR-847)	A549	МПС + 2% ЕТС	0,05
Аденовірус 5	ATCC (ATCC No: VR-5)	A549	МПС + 2% ЕТС	0,05
Цитомегаловірус людини, штам AD-169	ATCC (ATCC No: VR-538)	HFF	МПС + 2% ЕТС	0,02
Цитомегаловірус людини, штам HI91	Власний ізолят 9	HFF	МПС + 2% ЕТС	0,02
Метапневмовірус	ATCC (ATCC No: VR-92)	МК2 клітини	МПС + 2 мкг/мл трипсину	0,1
Еховірус 11	Власний ізолят	HFF	МПС + 2% ЕТС	0,005
Еховірус 30	Hygienish-bakteriologisches landesuntersuchungsamt "Westfalen"	HFF	МПС + 2% ЕТС	0,01
Ентеровірус 71	Власний ізолят	HFF	МПС + 2% ЕТС	0,1

* - множинність інфікування - співвідношення інфекційних агентів (наприклад, фагів або вірусів) до їхніх мішеней (наприклад, клітин)

5

1.1.2 Система для проведення досліджень

Клітини: Для культивування цитомегаловірусу, ентеровірусу, еховірусу та вірусу Коксакі А9 використали культуру преуціальних фібробластів людини (HFF). Клітини HFF визначали відповідно до вищенаведеного опису [1]. Клітини LLC-MK2 (МК2) одержані з Американської колекції типових культур (ATCC, Роквілл, Меріленд) були використані для культивування метаневмовірусу. Клітини А549 були одержані з ATCC та використані для культивування аденовірусу.

10

Робочий запас клітин вирощували у мінімальному поживному середовищі (МПС), доповненому 5% ембріональної телячої сироватки (ЕТС) протягом не більше 20 циклів відповідно до стандартної операційної процедури (СОП). Клітини вирощували у колбах для культури клітин з площею поверхні 25 см² на МПС при 37°C. Для культивування у кожну лунку 96-лункового планшета вносили 100 мкл клітинної суспензії, клітини росли до досягнення конфлюентності.

15

Клітини в плановому порядку перевіряли на наявність мікоплазм за допомогою набору Vero®GeM для традиційної полімеразної ланцюгової реакції, (виробництва «Мінерва лабс ГмбХ» (Minerva labs GmbH), Берлін, Німеччина). Клітини, які використовували у дослідженні, не були контаміновані.

20

Середовище для культури клітин:

МПС (MEM), Номер за каталогом. Т 031-10, «Біохром» (Biochrom)

25

ЕТС (FCS), Номер за каталогом F-7524, «Сіма» (Sigma)

Фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS) 10х:

Фосфатно-сольовий буферний розчин Номер за каталогом L 182-10, «Дульбекко Біохром» (Dulbecco Biochrom) додати до 1 л води для ін'єкцій, Номер за каталогом 0370-3452, «Браун» (Braun).

30

Автоклавують та зберігають за кімнатної температури, термін придатності 1 рік; два місяці в разі застосування.

PBS 1х:

450 мл води для ін'єкцій + 50 мл 10х PBS

Зберігати за кімнатної температури, термін придатності один рік; два місяці в разі застосування.

35

NaHCO₃, 7,5%:

75 г NaHCO₃, Номер за каталогом. S-4019, «Сіма» (Sigma)

Розчиняють в 1 л води (Millipore-H₂O).

Зберігати за температури 2-8°C, термін придатності один рік; два місяці в разі застосування.

Нерес, (N-2-гідрокси-етилпіперазин N'-2-етансульфонова кислота), 1М:

238,31 г Нерес, Номер за каталогом S-4019, «Сігма» (Sigma)

33,75 мл NaOH 32%

Розчинити в 1 л води (Millipore-H₂O).

- 5 Зберігати за температури 2-8°C, термін придатності один рік; чотири місяці в разі застосування.

L-глутамін, 0,2 М:

29,2 г L-глутаміну, Номер за каталогом G-5763, «Сігма» (Sigma)

Розчинити в 1 л води (Millipore-H₂O).

- 10 Зберігати за температури ≤ -18°C протягом одного року; два місяці за температури 2-8°C в разі застосування.

Пеніцилін/Стрептоміцин:

10 МЕГ α Пеніцилін (пеніцилін), «Грюненталь» (Grunenthal)

10 г Стрептоміцин-сульфат, Номер за каталогом S-6501, «Сігма» (Sigma)

- 15 Розчинити в 1 л води (Millipore-H₂O).

Зберігати за температури ≤ -18°C протягом одного року; два тижні за температури 2-8°C в разі застосування.

Трипсин/ЕДТК розчин:

2,0 г трипсину 1:250 BAEE 1570 одиниць/мл, Номер за каталогом T-4799, «Сігма» (Sigma)

- 20 0,6 г ЕДТК-Na (Tritriplex III), Номер за каталогом 8418.0100, «Мерк» (Merck)

Розчинити в 1 л 1x PBS.

Зберігати за температури ≤ -18°C протягом одного року; один місяць за температури 2-8°C в разі застосування.

- 25 Як підтримуюче середовище використовували безсироваткове МПС з додаванням 2% нерес, 2% NaHCO₃, 1% пеніциліну/стрептоміцину, яке містить 2 мкг/мл трипсину.

1.2 Визначення антивірусної активності (метод оцінки зменшення «врожаю» вірусів)

Метод оцінки зменшення «врожаю» вірусів - потужний метод для оцінки ефективності протівірусних сполук. Цей метод дає можливість виконати кількісний аналіз утворення інфекційних вібріонів у обробленій препаратом культурі порівняно з «врожаєм» вірусів у необробленому контрольному зразку. Під час цієї процедури інфіковані вірусом культури інкубують з протівірусними сполуками протягом достатнього для реплікації періоду, а тоді оцінюють на наявність нового потомства вірусів методом титрування на окремому моношарі культури клітин (Shipman C Jr, Smith SH, Carlson RH, Drach JC (1976). Antiviral activity of arabinosyladenine and arabinosylhypoxanthine in herpes simplex virus-infected KB cells: selective inhibition of viral deoxyribonucleic acid synthesis in synchronized suspension cultures. Antimicrob Agents Chemother. 9: 120-127; Collins P, Bauer DJ (1977). Relative potencies of anti-herpes compounds. Ann N Y Acad Sci. 284: 49-59; Prichard MN, Turk SR, Coleman LA, Engelhardt SL, Shipman C Jr, Drach JC (1990). A microtiter virus yield reduction assay for the evaluation of antiviral compounds against human cytomegalovirus and herpes simplex virus. J Virol Methods. 28: 101-106).

- 40 1.2.1 Принцип дослідження:

Дослідження виконували у колбах для культури клітин у трьох паралелях. Було проведено два незалежні експерименти. Клітини підраховували, а тоді заражали після промивання фосфатно-сольовим буферним розчином при множинності інфікування, зазначеній у 4.1.1. До культури клітин одночасно додали FAV00A (разом із вірусом). Тоді клітини інкубували протягом 45 хвилин при 37 °C, щоб дозволити вірусу здійснити адсорбцію, а тоді тричі промивали фосфатно-сольовим буферним розчином для видалення неадсорбованих вірусів. Після цього групу інфікованих клітин, попередньо інкубованих з FAV00A, знову обробили FAV00A. Також у дослідження був включений вірусний контроль без додавання випробовуваної або референтної сполуки. Колби з культурою інкубували при 37 °C у інкубаторі з CO₂. Після 3 днів (еховірус, ентеровірус, вірус Коксакі), 4 днів (аденовірус), 5 днів (цитомегаловірус) або 8 днів (метапневмовірус) клітини заморожували на ніч, а наступного дня розморожували. Етапи заморожування та розморожування зумовлювали дезінтеграцію клітин та вивільнення вірусів, які вони містили. У такий спосіб можна було визначити загальну кількість вірусів. Після низькошвидкісного центрифугування у кожній експериментальній моделі (контроль вірусів, а також випробовувана та референтна сполуки) проводили визначення кількості вірусів з застосуванням "титрування до кінцевої точки" у 96-лунковому планшеті - при цьому одержували титр вірусу/кількість, за якої 50% клітин є інфікованими або неінфікованими (TCID₅₀/мл).

Титрування до кінцевої точки

- 60 Відповідно до СОП підготували один 96-лунковий планшет (для кожної експериментальної моделі) з чутливою культурою клітин. У кожну лунку засіяли 50 мкл суспензії клітин. Клітини

виросщували при 37 °С в атмосфері із 5% CO₂ протягом трьох або чотирьох днів для утворення суцільного моношару. Після низькошвидкісного центрифугування здійснювали 10-разове серійне розведення (до 10⁻⁹) одержаних вірусів з застосуванням підтримувального середовища. На кожній пластині 1- та 2-й ряди (у кожному по 8 лунок) використовувались для контролю культури клітин, а з 3-го по 12-й (у кожному по 8 лунок) - для 10-разово серійно розведених вірусів, починаючи з нерозведеного матричного зразка та закінчуючи розведенням 10⁻⁹. У відповідні ряди внесли по 50 мкл розведення вірусів, тоді як у лунки контрольних рядів вносили по 50 мкл підтримувального середовища. Планшети інкубували протягом 2-3 днів при температурі 37 °С в інкубаторі з CO₂. Після завершення інкубаційного періоду планшети вивчали мікроскопічно на наявність цитопатогенного ефекту (ЦПЕ). Дослідження проводились незалежно двома лаборантами. Титр вірусів був визначений за методом Спірмена-Кербера (Spearman C (1908). The method of "right and wrong cases" ("constantstimuli") without Gauss's formulae. British Journal of Psychology 2: 227-242; Karber G (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche [A contribution to the collective treatment of a pharmacological experimental series]. Archiv fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie 162: 480-483.). Після цього вираховували відсоток зменшення титру при додаванні випробовуваної або референтної сполуки порівняно з контролем (взято за 100%).

1.3 Одержані результати

Зменшення «врожаю» вірусів виражали як TCID₅₀/мл, показаний також % вірусного інфікування, а також у скільки разів спостерігалось зменшення після обробки випробовуваною або референтною сполукою по відношенню до вірусного контролю (100 %). Оскільки проводились два експерименти з випробовуваною та референтною сполукою, у таблицях наведено середні величини:

Таблиця 13

Аденовірус 3

Вірус	FAV00A (мкг/мл)		
	50	25	12,5
$6,1 \times 10^7 \pm 4,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^7 \pm 2,5 \times 10^6$ (43,5%)	$5,4 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^7$ (11,3%)	$7,2 \times 10^7 \pm 4,2 \times 10^7$ (н.д. ²)

Таблиця 14

Аденовірус 5

Вірус	FAV00A (мкг/мл)		
	50	25	12,5
$5,4 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8 \pm 5,1 \times 10^7$ (68,4%)	$3,0 \times 10^8 \pm 9,0 \times 10^7$ (43,7%)	$7,0 \times 10^8 \pm 3,9 \times 10^8$ (н.д.)

Таблиця 15

Метапневмовірус людини

Вірус	FAV00A (мкг/мл)		
	500	250	125
$4,5 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$ (95,6%)	$5,4 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$ (н.д. ²)	$4,0 \times 10^4 \pm 2,2 \times 10^4$ (88,5%)

Таблиця 16

Ентеровірус 71

Вірус	FAV00A (мкг/мл)		
	500	250	125
$4,0 \times 10^3 \pm 2,2 \times 10^3$	$9,6 \times 10^1 \pm 2,8 \times 10^1$ (97,6%) ¹	$6,5 \times 10^2 \pm 4,6 \times 10^2$ (83,6%)	$5,4 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$ (н.д. ²)

Таблиця 17

Вірус Коксакі А9

Вірус	FAV00A (мкг/мл)		
	50	25	12,5
$3,1 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5 \pm 7,9 \times 10^4$ (65,3%) ¹	$1,7 \times 10^5 \pm 5,2 \times 10^4$ (45,7%)	$1,7 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^4$ (45,3%)

Таблиця 18

Еховірус 11

Вірус	FAV00A (мкг/мл)		
	250	125	62,5
$3,0 \times 10^3 \pm 9,0 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7 \pm 4,4 \times 10^7$ (79,9%) ¹	$1,9 \times 10^8 \pm 1,4 \times 10^8$ (36,4%)	$1,8 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^8$ (41,8%)

Таблиця 19

Еховірус 30

Вірус	FAV00A (мкг/мл)		
	100	50	25
$9,6 \times 10^7 \pm 2,8 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7 \pm 9,0 \times 10^7$ (68,3%) ¹	$7,9 \times 10^7 \pm 2,8 \times 10^7$ (17,0%)	$1,2 \times 10^8 \pm 8,2 \times 10^7$ (н.д. ²)

Таблиця 20

Цитомегаловірус людини HI91

Вірус	FAV00A (мкг/мл)		
	500	250	125
$3,7 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3$ (93,5%) ¹	$5,2 \times 10^3 \pm 3,5 \times 10^3$ (86,0%)	$2,7 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^3$ (24,9%)

Таблиця 21

Цитомегаловірус людини AD169

Вірус	FAV00A (мкг/мл)		
	500	250	125
$9,0 \times 10^4 \pm 3,0 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$ (41,1%) ¹	$1,0 \times 10^5 \pm 7,9 \times 10^4$ (н.д. ²)	$2,2 \times 10^5 \pm 5,8 \times 10^4$ (н.д.)

5

2. Висновок

Вищенаведені дані підтверджують, що досліджувана сполука FAV00A має противірусний ефект проти аденовірусів, вірусу Коксакі, еховірусу, цитомегаловірусу, метапневмовірусу та ентеровірусу, що перевірено методом оцінки «врожаю» вірусів.

10

У вищеописаних експериментах використовувалися такі скорочення:

АТСС = Американська колекція типових культур

САК = сироватковий альбумін корів

ЦПЕ = цитопатогенний ефект

ЕТС = ембріональна теляча сироватка

15

MDCK = клітини Мадін-Дарбі нирки собаки

МПС = мінімальне поживне середовище

МІ = множинність інфекції

PBS = фосфатно-сольовий буфер

ПЛР = полімеразно-ланцюгова реакція

ДСН = додецилсульфат натрію

СОП = стандартна операційна процедура

ТС₅₀ = концентрація, що викликає 50% токсичності

5 TCID₅₀ = доза інфікування клітинної культури, за якої 50% клітин інфіковано

Вплив FAV00A на рівень інтерферону у плазмі крові пацієнтів із грипом

У добровольців, що приймали FAV00A на 7-й день прийому препарату (візит V3), виявили значне підвищення рівнів IFN- α та IFN- γ у порівнянні з початковим вмістом цих речовин та вмістом інтерферонів у групі, що приймала плацебо. Підвищення рівнів IFN- α також спостерігалось у пацієнтів, що приймали плацебо, однак це зростання було менш інтенсивним у порівнянні з групою, в якій застосовували FAV00A (Таблиця 22).

Таблиця 22

Динаміка рівня циркулюючого інтерферону різних типів у сироватці крові добровольців з гострою респіраторною вірусною інфекцією у групах FAV00A/плацебо

Візит	Параметр	IFN- α				IFN- γ			
	Група	Середнє значення	P	Помилка середнього значення	Медіана	Середнє значення	P	Помилка середнього значення	Медіана
V1	Плацебо	22,541		1,676	22,5	33,008		1,280	31,8
	FAV00A	22,290		1,264	23,7	33,168		0,912	33,25
V3	Плацебо	31,768*	<0,001	1,345	30,75*	30,478*	0,001	0,694	30,45*
	FAV00A	37,563*		1,308	37,4*	44,670*		0,765	45,85*
V4	Плацебо	29,388*	0,625	1,592	30,6*	30,393*	<0,001	0,892	30,9*
	FAV00A	30,072*		1,123	30,55*	41,313*		0,770	40,1*

P - ступінь надійності міжгрупових відмінностей

15 * - відмінності між параметрами статистично достовірні порівняно з Візитом V1 (визначено за допомогою коваріантного аналізу)

Рівень циркулюючого IFN- γ зменшувався у контрольній групі пацієнтів на третьому (V3) та четвертому (V4) візитах.

20 Результати свідчать про інтерферогенний ефект FAV00A. Підвищення рівнів IFN- α у контрольній групі відображає індукцію утворення цього білка у відповідь на вірусну інфекцію.

Загальновідомо, що вірусна інфекція призводить до активації різних систем транскрипції у клітинах, тобто завдяки стимулюванню утворення декількох хемокинів та цитокінів FAV00A робить свій внесок в утворення антивірусного захисту організму шляхом стимуляції утворення інтерферону I та імунного інтерферону γ . Останній утворюється переважно Т-лімфоцитами та активованими моноцитами. Цей спосіб зумовлює поляризацію Т-клітинної імунної відповіді щодо Т-хелперів 1-го типу. Як видно з таблиці, рівні циркулюючого IFN- γ значно підвищились на 7-й день після початку лікування у добровольців, що приймали FAV00A, і залишалися високими протягом періоду реконвалесценції до 14-го дня дослідження, що пояснює як терапевтичний, так і профілактичний ефект препарату. Рівні IFN- γ у контрольній групі пацієнтів дещо знижувалися протягом дослідження.

Отже показано, що прийом FAV00A стимулює утворення інтерферонів типу I та II, що визначає його головні функції у клітинно-опосередкованому захисті від вірусних інфекцій. Результати дослідження ефекту FAV00A на вміст інтерферону в організмі корелюють з даними, зібраними під час статистичної обробки аналізів периферичної крові добровольців. Статистично достовірне (критерій Вілкоксона) зменшення рівня моноцитів у відсотках виявлено у контрольній групі пацієнтів на візитах V3 та V4 ($p=0,002$ та $p=0,033$, відповідно). Протягом дослідження у пацієнтів, що приймали FAV00A, не було виявлено значного зниження рівня моноцитів у крові. Цей факт свідчить про обмеження імуносупресивного ефекту вірусної інфекції на клітинну імунну відповідь у групі, яку лікували FAV00A.

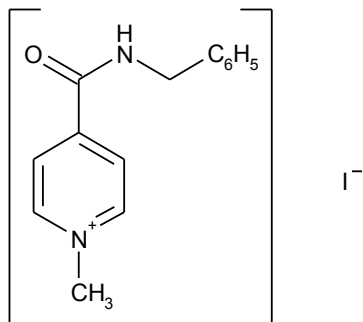
40 Вплив препарату на клітинно-опосередковану імунну відповідь покращує клінічний перебіг гострих респіраторних захворювань та обмежує можливості розвитку вірусної імуносупресії,

ускладнень та переході інфекції у хронічну форму. Особливо важливе значення має підвищення утворення IFN- γ , оскільки він, крім антивірусної активності, виявляє різноманітні ефекти на клітини імунної системи, мієломоніцитарні клітини та вважається ключовим цитокином, що супроводжує антигенну стимуляцію лімфоцитів.

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. α -Кристалічна форма карбабензпіриду формули (I):



10 яка має, головним чином, наступні параметри, визначені за допомогою методу порошкової рентгенівської дифракції з застосуванням для вимірювання дифрактометра (мідний антикатод), виражені відносно міжплощинної відстані d , кута Брега 2 тета та відносної інтенсивності (виражається у відсотках до найбільш інтенсивного променя), що зазначені у нижченаведеній таблиці з переліком наступних кутів відхилення високої та середньої інтенсивності:

15

№	Кут 2 тета (°)	Міжплощинна відстань d (Å)	Відносна інтенсивність
1	2,3925	36,92687	5,23
2	10,2105	8,66366	5,95
3	11,3179	7,81828	5,70
4	12,3706	7,15527	10,86
5	13,9617	6,34318	3,67
6	16,2837	5,44354	6,62
7	17,4171	5,09177	8,45
8	17,6238	5,03251	66,93
9	19,8858	4,46489	100,00
10	20,3088	4,37284	7,36

2. α -Кристалічна форма карбабензпіриду за пунктом 1, яка має ступінь чистоти щонайменше 99,5 %, визначений із застосуванням методу ВЕРХ.

20 3. α -Кристалічна форма карбабензпіриду за пунктом 2, яка має ступінь чистоти щонайменше 99,9 %, визначений із застосуванням методу ВЕРХ.

4. α -Кристалічна форма карбабензпіриду за пунктом 1, яка має єдиний ендотермічний максимум на ДСК-кривій в межах від 187 до 193 °С.

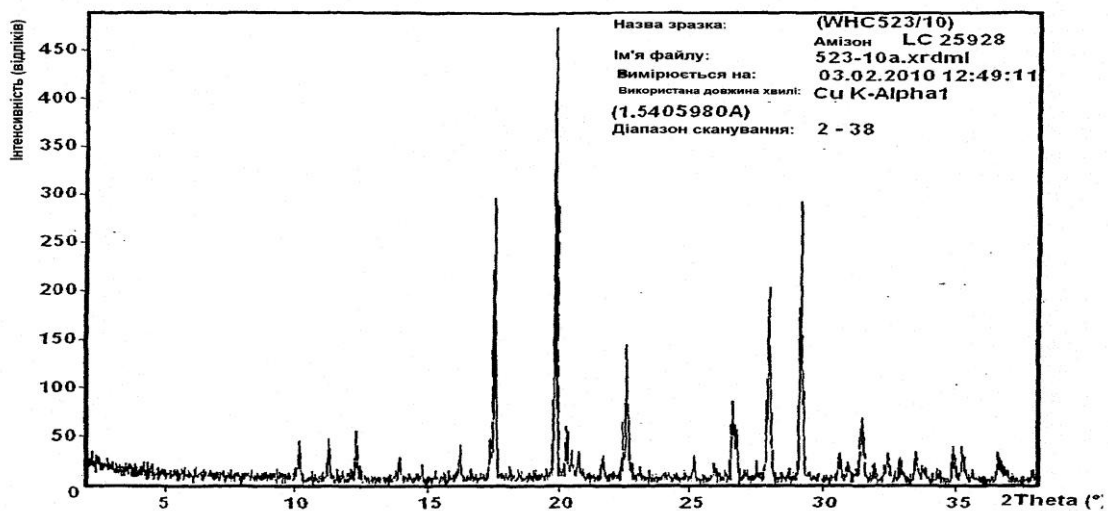
25 5. α -Кристалічна форма карбабензпіриду за пунктом 1, яка має ІЧ-спектр з характерними піками, показаними у нижченаведеній таблиці:

Хвильове число [см ⁻¹]	коливання
3236	N-H
3040	C-H
2934	C-H
1622	C=O
1600/1502	C=C
760/704	C-H

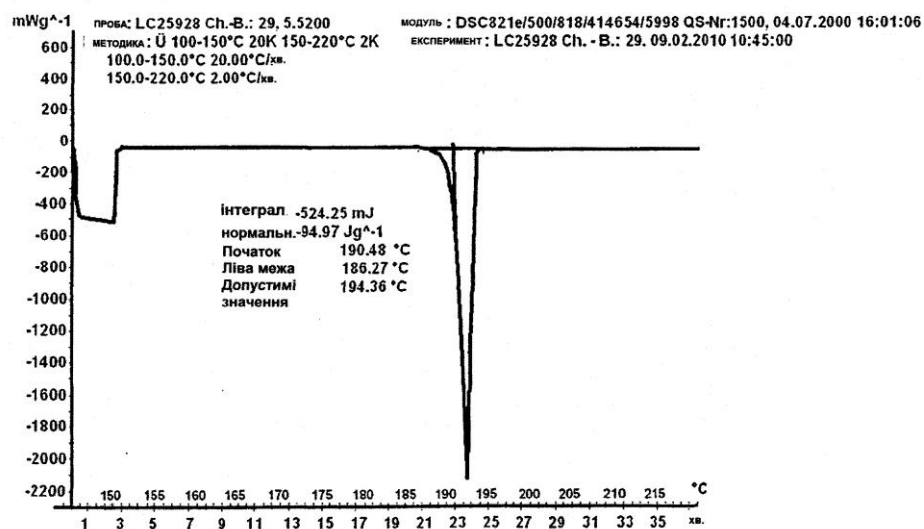
6. Спосіб одержання α -кристалічної форми карбабензпіриду за пунктом 1, за яким здійснюють наступні стадії:

30 (i) конденсацію ізонікотинової кислоти з бензиламіном при підвищених температурах,

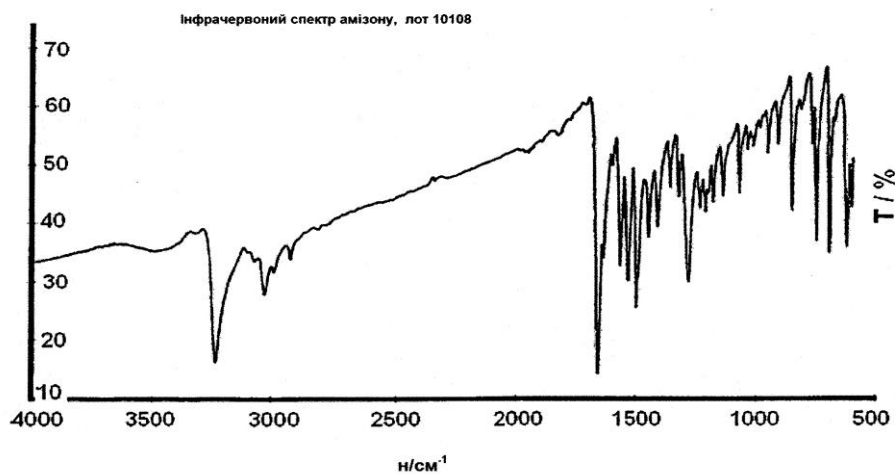
- (ii) кристалізацію та виділення конденсованого продукту, одержаного на вищевказаному етапі (i),
 (iii) реакцію кристалічного продукту, одержаного на вищевказаному етапі (ii), з метилйодидом та
 (iv) перекристалізацію неочищеного продукту, одержаного на етапі (iii), з водного розчину
 5 спирту.
7. Спосіб за пунктом 6, у якому реакцію конденсації між ізонікотиною кислотою та бензиламіном відповідно до етапу (i) здійснюють із застосуванням надлишку бензиламіну в межах від 10 до 25 %.
8. Спосіб за пунктом 6, у якому продукт реакції конденсації між ізонікотиною кислотою та
 10 бензиламіном, тобто бензиламід ізонікотинової кислоти (БАІНК), кристалізують з реакційної суміші з застосуванням розчинника, який вибирають із групи, що включає етилацетат, ацетонітрил та ізопропанол.
9. Спосіб за пунктом 8, що додатково включає застосування активованого вугілля.
10. Спосіб за будь-яким з пунктів 6, 8 або 9, у якому продукт, одержаний на етапі (ii), тобто
 15 БАІНК, обробляють водою.
11. Спосіб за пунктом 6, у якому на етапі (iii) реакцію кватернізації бензиламіду ізонікотинової кислоти та метилйодиду здійснюють із застосуванням надлишку метилйодиду в межах від 5 до 15 %.
12. Спосіб за пунктом 11, у якому реакцію кватернізації здійснюють у водному розчині спирту.
13. Спосіб за пунктом 12, у якому водний розчин спирту являє собою 90 % етанол.
14. Спосіб за пунктом 6, в якому додатково здійснюють етап промивання неочищеного продукту, одержаного на етапі (iii), водним розчином спирту.
15. Спосіб за пунктом 14, у якому водний розчин спирту являє собою 96 % етанол.
16. Спосіб за пунктом 6, у якому водний розчин спирту, що застосовують на етапі (iv), являє
 25 собою етанол, що містить воду у кількості від 5 до 15 % об/об.
17. Спосіб за пунктом 16, у якому водний розчин спирту являє собою 90 % етанол.
18. Спосіб за пунктом 6, у якому співвідношення неочищеного продукту та водного розчину етанолу, що застосовують на етапі (iv), знаходиться в межах від 1:2 до 1:4.
19. Спосіб за пунктом 18, у якому співвідношення неочищеного продукту та водного розчину етанолу, що застосовують на етапі (iv), становить 1:3.
20. Спосіб за пунктом 6, у якому перекристалізацію на етапі (iv) здійснюють при спонтанному охолодженні киплячого розчину неочищеного продукту в водному етанолі до температури в межах від 30 до 40 °C з подальшим охолодженням розчину до температури в межах від 10 до 15 °C з наступним перемішуванням протягом періоду від 1 до 3 годин.
21. Фармацевтична композиція, що містить α -кристалічну форму карбабензпіриду формули (I) відповідно до будь-якого з пунктів 1-5 та фармацевтично прийнятний носій.
22. α -Кристалічна форма карбабензпіриду формули (I) відповідно до будь-якого з пунктів 1-5 для застосування в лікуванні та попередженні вірусних інфекцій.
23. α -Кристалічна форма карбабензпіриду за пунктом 22, де вірусні інфекції являють собою
 40 інфекції, спричинені вірусами грипу типу А.
24. α -Кристалічна форма карбабензпіриду за пунктом 23, де вірусні інфекції являють собою інфекції, спричинені вірусом типу А [H3N2 (Каліфорнія та Вікторія/3/75), H1N1 (Нова Каледонія 20/99)].
25. α -Кристалічна форма карбабензпіриду за пунктом 22, де вірусні інфекції являють собою
 45 інфекції, спричинені аденовірусами, вірусом Коксакі, еховірусом, цитомегаловірусом, метапневмовірусом та ентеровірусом.
26. α -Кристалічна форма карбабензпіриду формули (I) відповідно до будь-якого з пунктів 1-5 для застосування в лікуванні гострих респіраторних захворювань.



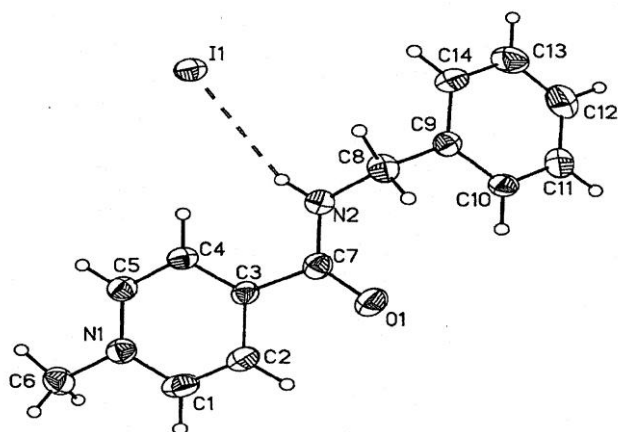
Фіг.1



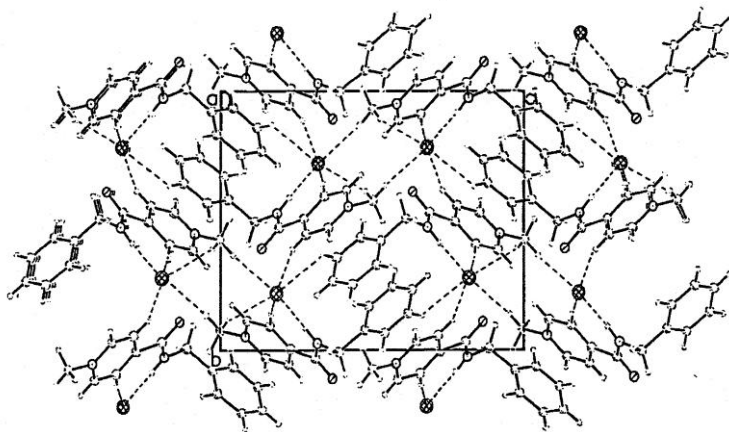
Фіг.2



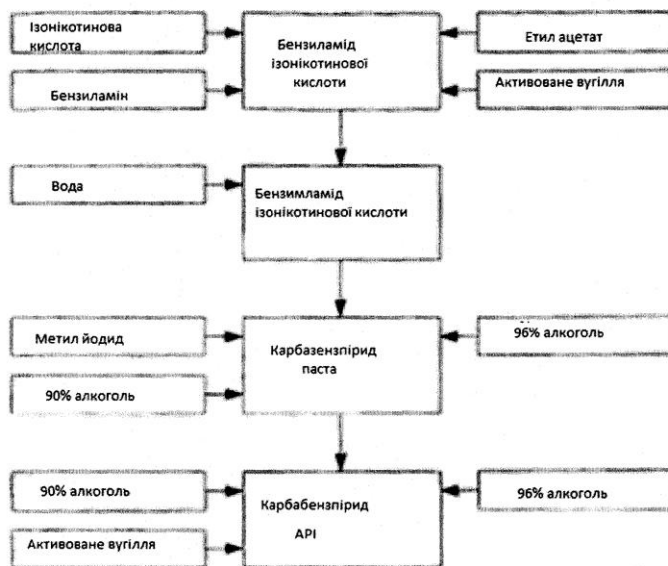
Фіг.3



$\Phi_{ir.4}$



$\Phi_{ir.5}$



Фіг.6

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601