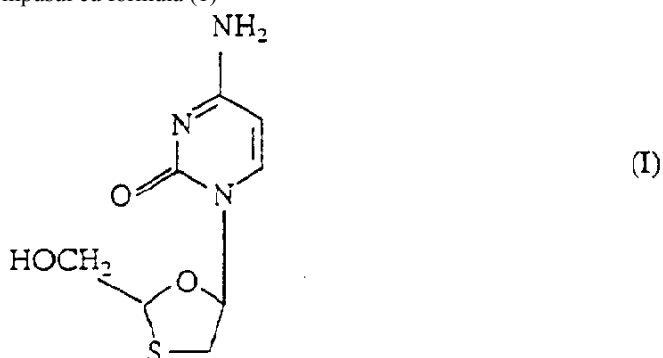


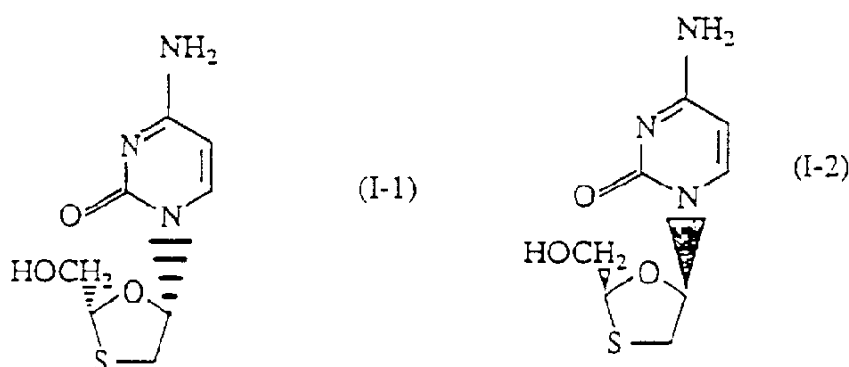
**Descriere:**

Invenția se referă la analogii nucleozidei și folosirea lor în medicină, în special la analogii nucleozidici ai 1,3-oxatiolanului, compozițiile farmaceutice pe baza lor și folosirea lor în tratamentul de infecții virotice.

Compusul cu formula (1)



este cunoscut de asemenea sub marca BCH-189 sau NGPB-21 și a fost descris ca un compus, ce posedă activitate antivirotică, în particular, ca un remediu contra virusului imunodeficientar (HIV), care cauzează SIDA. Compusul cu formula (1) este racematul a doi enantiomeri cu formula (1-1) și formula (1-2):



și a fost descris și cercetat sub formă de racemat. În prezent numai compusul 3-azido-3-dezoxitimidină (AZT, zidovudină, BW, 509) este aprobat în calitate de preparat pentru tratarea maladiei provocate de SIDA. Însă acest compus posedă o acțiune secundară considerabilă și de aceea nu poate fi folosit, iar odată folosit poate dăuna unui mare număr de bolnavi. În legătură cu aceasta există necesitatea permanentă de creare a compușilor, care ar fi efectivi contra HIV și în același timp ar poseda un indice terapeutic mai bun.

S-a descoperit că ambii enantiomeri cu formula (1) posedă aceeași acțiune contra SIDA, dar unul din ei ((-)-enantiomer) posedă o citotoxicitate mult mai joasă decât al doilea enantiomer. Astfel apare primul aspect al prezentei invenției(-)-enantiomerul (sau levogir) cu formula (1) și compușii farmaceutic acceptabili pe baza lui.

Formula chimică a (-)-enantiomerului este prezentată în felul următor:

(-)-cis-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă (aici și în continuare compusul A). El este absolut stereochemic cu compusul cu formula (1-1), formula căruia este (2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă.

De preferință, se asigură crearea compusului A liber de (+)-enantiomer, adică când acest compus A conține nu mai mult de 5% masice de (+)-enantiomer, însă mai preferabilă este varianta când cantitatea de (+)-enantiomer nu depășește aproximativ 2% mas. și varianta optimă este când el constituie ceva mai puțin de 1% mas.

Prin derivați farmaceutic acceptabili se subînțeleg orice săruri farmaceutic acceptabile, esteri sau sărurile acestor esteri ai compusului (A) sau ai oricărui altui compus, care la introducerea recipientului este capabil de a elimina (direct sau indirect) compusul (A) sau un metabolit activ antivirotic, sau restul pe baza acestui compus.

Compusul (A) poate fi modificat în scopul creării pe baza lui a derivaților farmaceutic acceptabili pe contul grupelor funcționale ca bază de pirimidină [1], precum și pe contul grupei oximetilice a ciclului oxatiolanic ă2, 3i. Modificările pe contul acestor grupe funcționale se includ în cadrul invenției prezente. Însă un interes deosebit prezintă derivații farmaceutic acceptabili, obținuți pe calea modificării grupei 2-oximetilice a ciclului oxatiolanic.

Esterii preferabili ai compusului (A) includ compușii în care atomul de hidrogen al grupei 2-oximetilice a grupei funcționale acilice R=C, în care gruparea necarbonilă R a esterului este selectată din grupa: hidrogen, alchil liniar sau ramificat (de exemplu metil, etil, n-propil, terț-butil, n-butil), alcoxiialchil (de exemplu, metoximetil, aralchil, de exemplu, benzil, ariloxiialchil, de exemplu, fenoximetil), aril (de exemplu, fenil, posibil substituit cu halogen, C<sub>1-4</sub> alchil, sau C<sub>1-4</sub> alcoxi); esterii sulfonici (de exemplu, alchil- sau aralchilsulfonil, de exemplu, metan-sulfonil); esterii aminoacizilor (de exemplu, L-valil sau L-izoleucil), precum și mono-, di- sau trifosfații.

În ce privește esterii descriși mai sus, dacă lipsește o altă specificație, oricare grupă alchil reprezentată conține în principal 1-16 atomi de carbon, în particular, 1-4 atomi de carbon. Oricare grupare de aril care figurează în acești esteri include mai cu seamă grupa fenilică.

În particular, esteri pot fi esteri de alchil C<sub>1-16</sub>, esterul benzilic nesubstituit sau esterul benzilic substituit cel puțin cu un atom de halogen (brom, clor, fluor sau iod), C<sub>1-6</sub> alchil, C<sub>1-6</sub> alcoxi, nitro sau cu grupa trifluorometilică.

Sărurile farmaceutic acceptabile ale compusului (A) includ acele săruri care sunt obținute din acizi și baze organice și anorganice farmaceutic acceptabile. La acizii potriviți se referă, de exemplu, clorura de hidrogen, bromura de hidrogen, acizii sulfuric, azotic, percloric, fumaric, maleinic, fosforic, glicolic, lactic, salicilic, succinic, toluol-p-sulfonic, tartric, acetic, citric, metansulfonic, formic, benzoic, malonic, naftalin-2-sulfo- și benzol-sulfonic. Alți acizi, așa ca acidul oxalic, deși ei înșiși nu sunt farmaceutic acceptabili, pot fi folosiți ca intermediari pentru obținerea compușilor descriși în invenția prezentă și a sărurilor lor acide farmaceutic acceptabile pentru adăugare.

Sărurile obținute din bazele corespunzătoare includ metalele alcaline (de exemplu, natriu), metalele alcalino-pământoase (de exemplu, magneziu), amoniu și  $\text{NR}_4^+$  (unde R este alchil  $\text{C}_{1-4}$ ).

Referințele care urmează în continuare la compuși, ce corespund prezentei invenției, includ și compusul (A) și derivații lui farmaceutic acceptabili.

Compușii prezentei invenții posedă ei înșiși activitate antivirală sau capătă astfel de proprietate în procesul metabolismului. În particular, acești compuși sunt efectivi la inhibarea replicării retrovirale, care includ și retrovirusurile omului, așa ca virusul imunodeficienței umane (HIV) care este cauza maladiei SIDA.

Astfel se asigură încă un aspect al invenției - compusul (A) sau derivații lui farmaceutic acceptabili se propune de a-i folosi în calitate de remediu terapeutic activ, în special în calitate de remediu antiviral, de exemplu, la tratarea bolilor infecțioase retrovirale.

Încă un aspect sau un aspect alternativ în prezenta invenție este asigurarea metodei de tratare a bolilor infecțioase virale, în special, a bolilor cauzate de retrovirusuri, așa ca HIV, atât la animale cât și la om, metodă care include introducerea unei cantități efective a compusului (A) sau a derivaților lui farmaceutic acceptabili.

În invenție se asigură, de asemenea, folosirea compusului (A) sau a derivaților lui farmaceutic acceptabili la producerea medicamentului pentru tratarea infecției virale.

Compușii descriși în prezenta invenție sunt utili, de asemenea, la tratarea complicațiilor, care sunt provocate de SIDA, așa ca complexul SIDA - asociat (ARC), limfadenopatia generalizată progresivă (PGL), complicațiile sistemului nervos legate de SIDA-asociată, așa ca parapareză toracică sau debilitatea mintală (demența), complicații anti-HIV seropozitive sau HIV- pozitive, sarcomul Caposi, purpura trombocitopenică și bolile infecțioase asociate, de exemplu, pneumocistoza *Pneumocystis carinii*.

Compușii prezentei invenții sunt utili, de asemenea, în preîntâmpinarea progresării bolilor clinice ale indivizilor, anti-HIV seropozitivi sau HIV-antigen pozitivi, de asemenea la profilaxia de mai departe a rezistenței față de HIV.

Compusul (A) sau derivații lui farmaceutic acceptabili pot fi de asemenea utilizați pentru preîntâmpinarea poluării cu virus a lichidelor fiziologice, așa ca sângele sau sperma *in vitro*.

Evident, termenul "tratament" se referă și la profilaxie, și la tratarea bolilor infecțioase sau a simptomelor.

Cantitatea de compus (A) care este necesară pentru tratare poate varia nu numai în dependență de compusul ales pentru tratare, ci și de metoda de administrare, natura bolii, de vârsta și starea bolnavului și în cele din urmă poate fi determinată de medic sau veterinar. De regulă, însă, doza potrivită variază în intervalul de la aproximativ 0.1 până la aproximativ 750 mg/kg de masă a corpului în 24 ore, de preferință, în intervalul de la circa 0.5 până la 60 mg/kg/24 ore, mai ales de la 1 până la 20 mg/kg în 24 ore.

Doza necesară poate fi administrată o singură dată, sau poate fi administrată fracționat, peste intervale de timp corespunzătoare, de exemplu, cantitatea de preparat necesară poate fi împărțită în două, trei, patru sau mai multe subdoze în 24 ore.

Este comod de a administra compusul în unități de formă terapeutică, care conțin, de exemplu, de la 10 până la 1500 mg, de obicei de la 20 până la 1000 mg, și este mai comod, când o unitate de formă terapeutică conține de la 50 până la 700 mg de ingredient activ.

În varianta ideală ingredientul activ se administrează în așa cantitate, ca picul concentrațiilor ingredientului activ în plasmă să constituie de la 1 până la 75  $\mu\text{M}$ , de preferință de la 2 până la 50  $\mu\text{M}$ , dar mai ales de la aproximativ 3 până la aproximativ 30  $\mu\text{M}$ . O astfel de stare poate fi atinsă, de exemplu, la injectarea intravenoasă a soluției de 0.1-5% de ingredient activ, posibil în soluție fiziologică, sau la administrarea orală în formă de sfere, care conțin aproximativ de la 1 până la 100 mg de ingredient activ. Nivelul dorit în sânge poate fi menținut prin infuzia continuă care asigură de la 0.01 până la 5.0 mg/kg/oră sau prin infuzia periodică intravenoasă care conține aproximativ de la 0.4 până la 5.0 mg/kg ingredient activ.

Administrarea compusului solicitat poate fi realizată în formă pură, însă este preferabil ca compusul să se introducă ca ingredient activ, sub formă de preparat farmaceutic.

Astfel, prezenta invenție asigură și preparatul farmaceutic, ce conține compusul (A) sau derivatul acestui compus farmaceutic acceptabil împreună cu unul sau mai mulți purtători farmaceutic acceptabili și, posibil, cu alte ingrediente terapeutice sau prof-lactice. Purtătorul trebuie să fie "acceptabil" în sensul compatibilității cu alte ingrediente din componența preparatului, și să nu intoxice recipientul, care primește acest preparat.

Compozițiile farmaceutice (preparatele) pot fi în forme terapeutice, potrivite pentru metodele de administrare perorală, rectală, nazală, locală (inclusiv transbucală și sublingvală), vaginală sau parenterală (inclusiv intramusculară, subdermală sau intravenoasă), sau într-o formă potrivită pentru inhalație sau suflare. Preparatele pot fi prezentate, când aceasta este comod, în formă de unități discrete ale formelor terapeutice și pot fi obținute prin orice metodă bine cunoscută specialiștilor din domeniul farmaceutic. Toate metodele enumerate includ stadiul de amestecare a compusului activ cu purtătorii lichizi sau cu purtători solizi mărunțiți fin sau și cu unii și cu alții, dacă apare necesitatea, și introducerea produsului în compoziția dorită.

Compozițiile farmaceutice (preparatele) potrivite pentru administrarea perorală pot fi produse sub formă de capsule, capsule de amidon și pastile, fiecare din ele conținând cantitatea de ingredient activ, calculată în prealabil; sub formă de praf sau granule; sub formă de soluție, suspensie sau emulsie. Ingredientul activ poate fi produs de asemenea sub formă de sfere, paste sau terciuri medicamentose. Pastilele și capsulele pentru introducerea perorală pot conține adaosuri tradiționale: lianți, lubrifianți, dezintegratoare sau substanțe umectante. Pastilele pot avea un înveliș aplicat prin metodele bine cunoscute de specialiști. Preparatele lichide perorale pot fi, de exemplu, sub formă de suspensii apoase sau uleioase, soluții, emulsii, siropuri, elixiruri sau sub formă de produse uscate, care pot fi diluate cu apă sau cu alt solvent potrivit înainte de folosire. Aceste preparate lichide pentru administrarea perorală pot conține adaosuri tradiționale, așa ca mijloace de suspensie, emulgatori, solvenți care nu conțin apă (care pot include uleiuri comestibile) sau conservanți.

Compozițiile care corespund prezentei invenții pot fi, de asemenea, utile pentru administrarea parenterală (injecții, de exemplu, injecțiile bolină sau infuziile continue) și pot fi produse sub formă de fiole, de seringi umplute în prealabil, volume nu prea mari de

infuzie, flacoane care conțin doze multiple cu adăugarea conservanților. Compozițiile pot fi în formă de suspensii, soluții sau emulsii în solvenți apoși sau uleioși și pot conține componente suplimentare, așa ca mijloace de suspensie, stabilizatoare și/sau de dispersie. În varianta alternativă preparatul pentru injecții sau infuzii poate fi produs sub formă de praf, care se obține în condiții aseptice din produs solid steril sau pe calea liofilizării din soluție; înainte de utilizare acest praf se diluează cu un diluant corespunzător, de exemplu, cu apă sterilă apirogenă.

Pentru aplicarea locală pe piele a compusului, care corespunde prezentei invenției, pot fi pregătite unguente, creme sau loțiuni sau emplastre transdermale. Unguentele sau cremele pot fi preparate, de exemplu, pe bază de apă sau ulei cu adaosuri potrivite de aglutinant și/sau gelatinizant. Loțiunile pot fi create pe bază de apă sau ulei, și pot de asemenea conține unul sau mai multe medii de emulgare, medii de suspendare, aglutinanți sau adaosuri colorante.

Compozițiile utilizate pentru introducerea locală în cavitatea bucală includ pastile ce conțin compusul activ introdus într-o bază aromatică, de obicei aceasta este o zaharoză și gumiarabic sau traganț; pastile care conțin ingredient activ în bază inertă, așa ca gelatina și glicerina sau zaharoza și gumiarabicul; apă pentru clătirea cavității bucale, ce conține ingredientul activ într-un purtător lichid potrivit.

Preparatele farmaceutice pentru introducerea rectală, în care purtător este o substanță solidă, se produc de obicei sub formă de supozitoare. Purtătorii potriviți vor fi uleiul de cacao și alte materiale, care se folosesc în aceste scopuri, dar supozitoarele se pot forma la amestecarea compusului activ cu purtătorul înmuiat sau topit, apoi amestecul obținut se răcește și se fasonează supozitoarele.

Preparatele pentru introducerea în vagin pot fi pregătite în formă de pesar, tampon, creme, geluri, paste, spume sau spreiri, care pe lângă ingredientul activ conțin suplimentar purtătorii potriviți.

Pentru introducerea intranasală compușii pot fi produși sub formă de spreiri, prafuri care se dispersează, sau sub formă de picături.

Picăturile pot fi pregătite pe bază apoasă sau neapoasă, care conține, de asemenea, una sau mai multe medii de dispersare, medii de solubilizare și de suspendare. Spreiurile lichide de obicei sunt furnizate pentru realizare în balonașe sub presiune.

Pentru realizarea inhalației compușii ce corespund prezentei invenției se furnizează de obicei din insuflator (pulverizator), inhalator de aerosoli sau din ambalajul, care se află sub presiune sau din orice alte mijloace tradiționale de furnizare a spreirilor aerosolice. Ambalajele care se găsesc sub presiune pot conține un pulverizator potrivit, așa ca diclorodifluormetan, dioxid de carbon, trichlorodifluormetan, diclorotetrafluoretan și alte gaze potrivite. În cazul unui aerosol comprimat dozarea se realizează cu ajutorul unei supape, care injectează cantități măsurate.

În varianta alternativă, pentru introducerea preparatului prin inhalații, sau prin insuflație, compușii care corespund prezentei invenției pot fi prezentați sub formă de compoziții de pulberi uscate, de exemplu, amestec de compus sub formă de pulbere cu o bază potrivită așa ca lactoza sau amidonul. Compoziția de pulbere poate fi pregătită și ambalată în capsule sau blister din care pulberea poate fi introdusă cu ajutorul inhalatorului sau insuflatorului.

În caz de necesitate preparatele descrise mai sus se adaptează în așa fel încât să se realizeze eliberarea treptată a ingredientului activ și livrarea lui continuă în organism.

Preparatele farmaceutice, care corespund prezentei invenției, pot conține, de asemenea, și alte ingrediente active, de exemplu mijloace antibacteriene sau conservanți.

Compușii prezentei invenției pot fi folosiți, de asemenea, în combinație cu alte remedii medicamentoase, de exemplu, cu alte remedii antiinfecțioase. În special, compușii prezentei invenției pot fi folosiți împreună cu remediile antivirolice cunoscute.

Astfel, prezenta invenție propune o combinație ce conține compusul (A) sau derivatul fiziologic acceptabil al acestui compus, precum și remedii active terapeutice, în special, remedii antivirolice.

Combi-națiile menționate mai sus pot fi prezentate pentru utilizare sub formă de preparate farmaceutice, și astfel de preparate farmaceutice, ce conțin combinația determinată mai sus, împreună cu purtătorii acceptabili farmaceutic constituie încă un aspect al prezentei invenții.

Mijloacele terapeutice potrivite pentru folosirea în astfel de combinații includ nucleozidele aciclice, așa ca aciclovir sau hanciclovir, interferonii, astfel ca  $\alpha$ ,  $\beta$  sau  $\gamma$ -interferon, inhibitorii excreției renale, așa ca probenicid, inhibitorii transportului nucleozidelor, așa ca dipiridamol, 2,3-dideoxinucleozidele, așa ca AZT, 2,3-dideoxicitidina, 2,3-dideoxiadenozina, 2,3-dideoxinozina, 2,3-dideoximidina, 2,3-dideoxi-2,3-didehidrotimidina și 2,3-dideoxi-2,3-didehidrocitidina, imunomodulatorii, așa ca interleicin-2(1L2) și factorul coloniostimulator macrofagului granulocitar (FCSMG), eritropoetina, ampligenul, timodulina, timopentina, foscarnetul, ribavirina și inhibitorii HIV - de legătură cu receptorii CD-4, de exemplu, CD-4 solubili, CD-4 în fragmente, molecule hibride de CD-4 (CD-4 marker de antigen al T-limfocitelor helperate), inhibitorii de glicozilare, astfel ca 2-deoxi-D-glucoza, castanospermina și 1-deoxinodchirimicina.

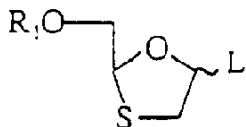
Componentele individuale ale acestor combinații pot fi introduse ori consecutiv, ori concomitent, separate sau combinate în preparatul farmaceutic unificat.

În cazurile în care compusul (A) sau derivatul farmaceutic acceptabil al acestui compus se folosește în combinație cu al doilea mijloc terapeutic activ față de același virus doza fiecărui compus poate fi aceeași ca și în cazul când compusul se folosește de unul singur.

Compusul (A) și derivații lui farmaceutic acceptabili pot fi obținuți prin metodele cunoscute în domeniul dat pentru obținerea compușilor cu structură analogică.

Structura stereochimică necesară a compusului (A) poate fi obținută, dacă în calitate de materie primă se ia materialul inițial optic, sau la dizolvarea amestecului racemic la oricare stadiu potrivit al sintezei. Pentru toate procesele produsul necesar pur din punct de vedere optic poate fi obținut la dizolvarea produsului final al fiecărei reacții.

În unul din aceste procese (A) 1,3-oxatiolanul cu formula (VIII)



(VIII)

în care grupa anomeră L este grupă substituită, se supune reacției cu o bază respectivă. Grupele potrivite L includ -OR, unde R reprezintă grupa alchil, de exemplu, grupa alchil C<sub>1-6</sub> este așa o grupă ca grupa metil sau R reprezintă gruparea acil, de exemplu, gruparea acil C<sub>1-6</sub> este ca un acetil sau halogen, de exemplu, iod, brom și clor.

Compusul cu formula VIII reacționează mai ales cu predecesorii bazelor de pirimidină (sililare în prealabil cu un astfel de agent de sililare ca hexametildisilazan) sau cu citozină într-un solvent acceptabil, ca clorura de metilen, cu utilizarea acidului Luis, așa ca tetraclorura de titan, staniu IV, compuși, de exemplu SnCl<sub>4</sub> sau trimetilsililtriflat.

1.3-oxatiolanul cu formula (VIII) se poate obține, de exemplu, la interacțiunea aldehidei cu formula (VII) cu un mercaptoacetal cu formula (VI) într-un solvent organic potrivit, așa ca toluenul în prezența catalizatorului acid, de exemplu, a acidului lui Liwis, așa ca clorura de zinc HSCH<sub>2</sub>CH(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> cu formula (VI) și C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHO cu formula (VII).

Mercaptoacetali cu formula (VI) pot fi obținuți prin metodele cunoscute în domeniul dat.

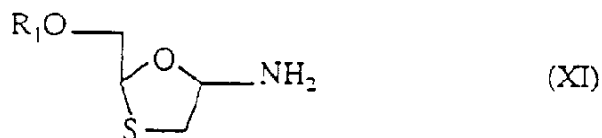
Aldehidele cu formula (VII) pot fi obținute conform metodelor cunoscute. Aldehida cu formula (VII) nepurificată poate fi purificată la transformarea ei într-un aduct cristalin bisulfid de combinare cu reducerea ulterioară a acestui aduct în aldehydă liberă.

În al doilea proces (B) compusul (A) se obține ca rezultat al interconversiei compusului cu formula (IX)



în care B reprezintă o bază convertibilă în citozină. Astfel de interconversie se poate desfășura în urma conversiei chimice simple (de exemplu, conversia uracilului în citozină), sau în urma conversiei fermentative cu folosirea deoxiribozil transferazei. Astfel de metode și condițiile pentru interconversia bazei sunt bine cunoscute specialiștilor din domeniul chimiei nucleozidelor.

În al treilea proces (C) compusul cu formula (XI)



poate fi transformat în compusul (A) ca rezultat al conversiei grupei anomerice NH<sub>2</sub> în bază citozinică cu metodele bine cunoscute în chimia nucleozidelor.

Despre majoritatea reacțiilor descrise mai sus au fost comunicări în contextul sintezei nucleozidelor.

Efectuarea reacțiilor descrise necesită materiale inițiale, care conțin grupe funcționale de protecție, ca urmare, în unele cazuri poate să apară sau la stadiul intermediar sau la stadiul final necesitatea de a înlătura grupa de protecție pentru a obține compusul necesar. Protecția și înlăturarea protecției grupelor funcționale se poate realiza cu folosirea metodelor tradiționale. Astfel, de exemplu, aminogrupele pot fi protejate prin grupa selectată din următoarele grupe: aralchil (de exemplu, benzil), acil, aril (de exemplu, 2,4-dinitrofenil) sau silil; înlăturarea ulterioară a grupei de protecție se realizează, dacă este necesar, cu ajutorul hidrolizei sau hidrogenolizei în condiții standard potrivite.

Grupa hidroxilică poate fi protejată cu utilizarea oricărei grupe hidroxile de protecție tradiționale. La grupele hidroxile de protecție potrivite se referă, de exemplu, alchil (de exemplu, metil, t-butil sau metoximetil), aralchil (de exemplu, benzil, difenilmetil sau trifenilmetil), grupele heterociclice, așa ca tetrahidropirani, acil (de exemplu, acetil sau benzoil) și grupele silile, așa ca trialchilsilil, de exemplu, t-butildimetilsilil. Grupele hidroxile de protecție pot fi înlăturate prin metodele tradiționale. Astfel, de exemplu, alchil, silil, acil și grupele de protecție heterociclice pot fi înlăturate pe calea solvolizei, de exemplu, la hidroliza în prezența acidului sau a bazei. Grupele de protecție aralchil pot fi înlăturate, de exemplu, așa ca trifenilmetil, de asemenea ca rezultat al solvolizei, de exemplu, prin hidroliză în mediu acid. Astfel de grupe aralchil, ca benzil, se pot scinda, de exemplu, ca rezultat al tratării cu BF<sub>3</sub> / esterat și anhidridă acetică cu înlăturarea ulterioară a grupelor acetat formate la stadiul corespunzător al sintezei. Grupele silile pot fi înlăturate, folosind în acest scop o sursă de ioni de fluor, așa ca fluorura de tetra-n-butil-amoniu.

În procesele de mai sus compusul (A) se obține, de obicei, sub formă de amestec de cis- și trans- izomeri, din care pentru noi prezintă interes cis-izomerul.

Acești izomeri pot fi separați prin metode fizice, de exemplu, cu ajutorul cromatografiei pe silicagel, sau ca rezultat al cristalizării fracționale cu folosirea directă a compusului sau a unui derivat potrivit al compusului, de exemplu, a acetatelor (care sunt obținute, de exemplu, la interacțiunea cu anhidridă acetică), care ulterior, după separare, se întorc din nou în produsul inițial (de exemplu, în urma deacetilizării în soluția de metanol a amoniacului).

Este cunoscut procedeul de obținere a sărurilor farmaceutic acceptabile ale prezentei invenții. Astfel, de exemplu, pentru a obține sarea acidă de adiție a compusului (A), produsul din oricare metodă descrisă mai sus poate fi transformat în sare ca rezultat al tratării bazei obținute în formă liberă cu un acid potrivit prin metodele tradiționale.

Sărurile acide de adiție farmaceutic acceptabile pot fi obținute la interacțiunea bazei libere cu acidul corespunzător, posibil în prezența unui solvent potrivit, așa ca esterul (de exemplu, etilacetat) sau alcoolul (de exemplu, etanolul, metanolul sau izopropanolul).

Sărurile bazice anorganice pot fi obținute la interacțiunea compusului inițial cu o bază corespunzătoare, bunăoară alcoxid (de exemplu, metoxid de sodiu), posibil în prezența solventului, așa ca alcoolul (de exemplu, metanol). Sărurile farmaceutic acceptabile pot fi obținute, de asemenea, din alte săruri, inclusiv sărurile farmaceutic acceptabile ale compusului (A) cu folosirea metodelor standard.

Compusul (A) poate fi transformat în fosfat farmaceutic acceptabil sau altă sare (eter) la interacțiunea cu un compus fosforilic, așa ca POCl<sub>3</sub>, sau cu un agent de esterificare potrivit, așa ca halogenura anhidridă sau anhidrida. Esterul sau sarea compusului (A) poate fi transformat în compusul inițial (A) prin hidroliză.

Separarea produsului final sau a produsului intermediar, sau a materialului inițial se poate realiza prin metodele cunoscute.

De exemplu, compusul (A) poate fi obținut prin metoda hiralică HPLC cu utilizarea fazei staționare potrivite, de exemplu β-ciclodextrina acilată sau triacetatul de celuloză și dizolvantul potrivit, de exemplu, alcool, așa ca etanol, sau soluția apoasă a

acetatului de trietilamoniu. În varianta alternativă compușii pot fi separați prin metoda enantiocatabolismului selectiv, care este catalizat de fermenți, așa ca citidindeaminază, sau pe calea degradării fermentative selective a derivatului potrivit în prezența 5'-nucleotidazei. La separarea cu utilizarea metodelor fermentative se poate folosi o soluție de ferment sau, mai comod, ferment imobilizat. Imobilizarea fermenților se poate înfăptui prin metodele cunoscute în domeniul dat, de exemplu, ca rezultat al absorbției pe rășină, așa ca Eupergit C.

În continuare sunt date exemple, în nici un caz exhaustive, de aplicare a prezentei invenții.

#### PRODUSUL INTERMEDIAR 1

##### 5-metoxi-1,3-oxatiolan-2-metanol-benzoat

Soluția de clorură de zinc (1,6 g) în metanol fierbinte (15 ml) s-a adăugat la agitare în soluția agitată de mercaptoacetaldehidă, dimetilacetal (34.2 g) și benzoiloxiacetaldehidă (48.3 g) în toluen (1300 ml), apoi soluția obținută s-a încălzit cu refrigerent cu reflux într-un curent de azot în decurs de 50 min. Amestecul răcit a fost concentrat, diluat cu o cantitate oarecare de toluen, apoi a fost filtrat prin kizelgur. Filtratul unit cu toluen a fost spălat cu soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu de două ori și cu soluție de sare, a fost uscat ( $\text{MgSO}_4$ ), apoi evaporat până la ulei, care a fost trecut prin coloana cromatografică, umplută cu dioxid de siliciu (2 kg, Merck 9385), a fost eluat cu cloroform și s-a obținut produsul 5-metoxi-1,3-oxatiolan-2-metanol-benzoat sub formă de ulei (45.1 g) care reprezintă un amestec de anomeri (1:1); parametrii NMR ai spectrului ( $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$ (3.1-3.3 (4H), 3.42 (6H), 4.4-4.6 (4H), 5.41 (1H), 5.46 (1H), 5.54 (1H), 5.63 (1H); 7.46 (4H), 7.58 (2H), 8.07 (4H);  $\text{max}(\text{SNV } 1717 \text{ cm}^{-1})$ .

#### PRODUSUL INTERMEDIAR 2

##### (±)-cis-1-(2-benzoiloximetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H) - pirimidin-2-4-dionă

Amestecul de uracil mărunțit minuțios (9.62 g), hexametilsilazană (50 ml) și sulfat de amoniu (30 mg) s-a încălzit cu refrigerent cu reflux într-un curent de azot până când soluția a devenit transparentă. Această soluție a fost răcită și apoi evaporată până la formarea uleiului incolor, care apoi în atmosferă de azot s-a dizolvat în acetonitril (50 ml). Soluția obținută s-a adăugat la soluția agitată răcită cu gheață de 5-metoxi-1,3-oxatiolan-2-metanolbenzoat (compusul intermediar 1) (19.43 g) în acetonitril (600 ml) și s-a adăugat trimetilsililtri fluorometansulfonat (14.7 ml). S-a înlăturat baia de gheață și soluția a fost încălzită în decurs de 45 min în curent de azot. După răcire și evaporare, rămășița a fost purificată prin metoda cromatografiei prin coloană trecând-o prin 1 kg de silicagel (Merck 9385) și a fost eluată cu amestec de cloroform/metanol = 9:1. Frațiile necesare au fost răcite și evaporate, obținând o rămășiță brută. Această rămășiță a fost supusă cristalizării fracționate dintr-o cantitate minimă de metanol fierbinte (1200 ml) și ca rezultat s-a obținut compusul menționat în titlu (6.32 g) în formă de cristale albe. Parametrii spectrului RMN: ( $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  11.36(1H, bs);

7.50-8.00 (6H,m); 6.20 (1H, t); 5.46 (2H, m)

4.62 (2H, m), 3.48 (1H, m), 3.25 (1H, m).

#### COMPUSUL INTERMEDIAR 3

##### (±)-cis-4-amino-1-(2-benzoiloximetil-1,3-oxatiolan-5-il)-1H-pirimidin-2-onă

###### Metoda (a)

Suspensia de citozină (20.75 g) și sulfat de amoniu (câteva mg) în hexametildisilazană (110 ml) a fost agitată și încălzită cu refrigerent cu reflux în decurs de 2.5 ore în curent de azot. Solventul a fost înlăturat prin evaporare, iar rămășița solidă s-a dizolvat în acetonitril uscat (350 ml). Această soluție, cu ajutorul unui ac elastic, a fost transferată în soluție de 5-metoxi-1,3-oxatiolan-2-metanolbenzoat (compusul intermediar 1) care a fost agitat și răcit cu gheață (43.57 g) în acetonitril (650 ml) în curent de azot. S-a adăugat trimetilsililtri fluorometansulfonat (33 ml), soluției i s-a permis să se încălzească până la temperatura de cameră (1.5 ore), apoi în decursul nopții a fost încălzită cu refrigerent cu reflux. Amestecul rămas a fost concentrat, diluat cu soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu (500 ml), apoi a fost efectuată extracția cu etilacetat (3x50 ml). Extractele unite au fost spălate cu apă (2x250 ml) și soluție de sare (250 ml), au fost uscate deasupra ( $\text{MgSO}_4$ ), apoi s-au evaporat până la obținerea spumei, care a fost trecută prin coloana cromatografică, umplută cu dioxid de siliciu (600 g, Merck 7734), a fost eluată cu amestec de etilacetat și metanol, ca rezultat s-a obținut un amestec de anomeri (1:1) 31.59 g. Amestecul a fost recristalizat din apă (45 ml) și etanol (9.0 ml), s-a obținut o rămășiță solidă 10.23 g, care a fost recristalizată din etanol (120 ml) și apă (30 ml), ca rezultat s-a obținut produsul menționat în titlu sub formă de substanță solidă de culoare albă (9.26 g):

$\text{max}(\text{MeOH})$  229.4 mm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  610); 272.4 mm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  293);

parametrii spectrului RMN 1H RMN ( $\text{DMCO d}_6$ )  $\delta$  3.14 (1H), 3.50 (1H), 4.07 (2H), 5.52 (1H), 5.66 (1H), 6.28 (1H), 7.22 (2H), 7.56 (2H), 8.10(2H).

###### Metoda (b)

Oxiclorura de fosfor (7.0 ml) s-a adăugat câte o picătură la suspensia de 1, 2, 4-triazol (11.65 g) care a fost agitată și răcită cu gheață în acetonitril (120 ml), apoi, păstrând temperatura în interiorul recipientului reactant mai jos de 15°C, s-a adăugat câte o picătură trietilamină (22.7 ml). Peste 10 min s-a adăugat încet soluție de (±)-cis-1-(2-benzoiloximetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2,4-dionă (6.27 g) în acetonitril (330 ml). Agitația a continuat în decursul nopții la temperatura de cameră. Amestecul s-a răcit pe baie de gheață și încet s-a adăugat trietilamină (30 ml), apoi - apă (21 ml). Soluția obținută s-a evaporat și rămășița s-a separat în soluția saturată de bicarbonat de sodiu (400 ml) și cloroform (3x200 ml). Extractele cloroformice reunite au fost uscate deasupra sulfatului de magneziu, filtrate și evaporate, ca rezultat s-a obținut rămășița brută (9.7 g). Rămășița a fost dizolvată în 1,4-dioxan (240 ml) și s-a adăugat soluție concentrată de amoniac apos (0.880 g, 550 ml). După 1.5 ore soluția a fost evaporată și rămășița a fost dizolvată în metanol. Această procedură a cauzat sedimentarea precipitatului solid, care a fost filtrat. Soluția-mamă a fost trecută prin coloana cromatografică umplută cu silicagel (600 g, Merck 9385). Frațiile necesare au fost colectate și evaporate, ca rezultat s-a obținut compusul menționat în titlu sub formă de substanță solidă de culoare galben-cafenie (2.81 g), identic compusului obținut după metoda (a).

###### Exemplul 1

##### (±)-(2R,S-cis)-4-amino-1-(2-hidroxitimetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă

Suspensia de (cis)-4-amino-1-(2-benzoiloximetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă (compusul intermediar 3) (8.19 g) și rășina de Amberlit IRA-400 (OH) (8.24 g) în metanol (250 ml) s-a agitat și s-a încălzit cu refrigerent cu reflux în decurs de 1 oră 15 min. Substanțele solide au fost filtrate, apoi spălate cu metanol.

Filtratele reunite au fost evaporate. Rămășița a fost triturată cu etilacetat (80 ml). Rămășița albă obținută a fost filtrată și ca rezultat s-a obținut produsul menționat în titlu (5.09 g), parametrii RMN ai spectrului <sup>1</sup>H RMN (DMCO d<sub>6</sub>) δ 3.04 (1H), 3.40 (1H), 3.73 (2H), 5.18 (1H), 5.29 (1H), 5.73 (1H), 6.21 (1H), 7.19 (2H), 7.81 (1H).

#### Exemplul 2

#### Separarea enantiomerilor (±)-cis-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă cu ajutorul CLPI hiralice

(A) 25 mg de produs racemic din exemplul (1) au fost supuse CLPI preparative în următoarele condiții:

Coloana: Merck Hibar Triacetat de celuloză, 250x10 mm, 10 μ;

Eluant: etanol;

Viteza fluxului: 3 ml/min;

Detector: UV, 270 nm;

Temperatura: de cameră.

După evaporarea fracțiilor corespunzătoare s-au obținut (-)-(2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă (6.8 mg aproximativ 100%) [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>21</sup>-137°(c.1.01 MeOH) și (+)-(2S,cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă (3.6 mg aproximativ 90%) [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>21</sup>+127°(c.1.01 MeOH).

(B) 26 mg de produs racemic din exemplul 1 au fost supuse CLPI preparative în următoarele condiții:

Coloana: ASTEC ciclobond 1-acetil, 250x4.6 mm;

Eluant: 0.2% acetat de trietilamoniu (este obținut prin adăugarea acidului acetic glacial la 0.2% soluție de trietilamină în apă până la valoarea finală pH 7.2);

Viteza fluxului: 2 ml/min;

Detector: UF, 300 nm;

Temperatura: de cameră.

După evaporarea fracțiilor corespunzătoare s-a obținut produsul brut

(-)-(2R,cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă (25mg) și produsul brut

(+)-(2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă (17 mg). Aceste fracții au fost supuse aparte

CLPI preparative în următoarele condiții:

Coloana: ASTEC ciclobond 1-acetil, 250x4.6 mm;

Eluant: 15 mM acetat de amoniu, pH 6.8;

Viteza fluxului: 0.5 ml/min;

Detector: UV, 300 nm;

Temperatura: 5°C.

Evaporarea fracțiilor corespunzătoare selectate a condus la obținerea a 5.0 mg (circa 91%) (-)-(2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă și 7.6 mg (circa 96%) (+)-(2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă.

#### Exemplul 3

#### (-)-(2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă

#### (i) (±)-(2R, S cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidinon-2-onă, dihidrogenfosfat acid, sarea de amoniu

Suspensia de (±)-(2R,S cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă (1.0 g) rece (0°C) și agitată din exemplul 1 în trimetilfosfat uscat (20 ml) a fost tratată cu oxiclorigură de fosfor (2.44 ml) și amestecul a fost agitat la 0°C în decurs de 35 min, apoi reacția a fost stopată în apă din gheață (60 g). Adăugând soluție apoasă 1N de hidroxid de sodiu, pH-ul amestecului rece a fost stabilit 2.5, apoi amestecul a fost trecut prin coloana umplută cu cărbune activat (10 g, DARCO) eluată mai întâi cu apă, pe urmă cu amestec de soluție apoasă amoniac-etanol. Frațiile care conțineau monofosfat brut au fost reunite și concentrate. Soluția obținută a fost trecută prin coloana umplută cu DEAE-Sefadex, A-25 (forma HCO<sub>3</sub>). Eluția a fost efectuată în gradientul de concentrații : apă (120 ml) până la 0.1 M de soluție de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (240 ml), apoi cu 0.2; 0.3 și 0.4 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (120, 240 și 400 ml, respectiv).

Fracțiile corespunzătoare au fost reunite și concentrate. Soluția obținută s-a diluat cu apă (40 ml) și s-a uscat prin liofilizare, ca rezultat s-a obținut produsul menționat în titlu sub formă de substanță solidă de culoare albă.

(1.37 g; λ<sub>max</sub> (pH 6, tampon) 271 nm (E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>=190);

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O) δ 3.23 (1H), 3.55 (1H); 4.0-4.2 (2H); 5.43 (1H); 6.07 (1H); 6.33 (1H); 8.08 (1H).

#### (ii) (-)-(2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă și (+)-(2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă

5-nucleotidaza (din *crotalus atrox venom*) (EC 3.1, 3.5) (60 mg cu conținutul de 17 unități/mg) s-a adăugat la soluția de (±)-(2R, S cis)-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă 6'-dihidrofosfat, sarea de amoniu (1.35 g) în tampon (30 ml), obținut din glicină (526 mg), clorură de magneziu (190 mg) și apă (100 ml), și amestecul a fost termostatat la 37°C în decurs de 2.5 ore. Apoi s-au mai adăugat încă 20 mg de ferment și incubarea a fost prelungită încă 3.5 ore. Acest amestec a fost trecut prin coloana, umplută cu DEAE-Sefadex A-25 (forma HCO<sub>3</sub>). Eluția s-a efectuat cu apă (160 ml), apoi 0.1; 0.2; 0.3 și 0.4 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (câte 200 ml de fiecare soluție).

Fracțiile corespunzătoare care conțin primul component eluat au fost reunite și evaporate, rămășița a fost supusă cromatografiei în coloana umplută cu silicagel (60 g Merck 7734), apoi a fost eluată cu amestecuri de cloroform-metanol.

Evaporarea fracțiilor corespunzătoare din amestecul metanol-etilacetat a dat: 0.30 g (-)-(cis)-4-amino-1-(2-hidroximetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă sub formă de substanță solidă de culoare albă:

$[\alpha]_D^{21} + 137^\circ$  (c. 1.04 MeOH);

<sup>1</sup>H RMN (DMSO)  $\delta$  3.04 (1H); 3.40 (1H), 3.73 (2H); 5.18 (1H); 5.29 (1H); 5.73 (1H); 6.21 (1H); 7.19 (2H); 7.81 (1H).

Fracțiile corespunzătoare, obținute din coloana cu sefadex, care conțin al doilea component eluat, au fost reunite și evaporate. Rămășița a fost dizolvată în apă (30 ml) și tratată cu fosfatăză bazică (extrasă din Escherichia Coli (EC 3.13.1) 1.5 ml cu 416 unități/ml), apoi a fost incubată la temperatura 37°C în decurs de 1 oră. Solventul a fost înlăturat prin evaporare și rămășița a fost trecută prin coloana cromatografică, umplută cu dioxid de siliciu (60 g Merck 7734), a fost eluat cu amestecuri de cloroform-metanol. Evaporarea fracțiilor corespunzătoare din amestecul metanol-etilacetat a condus la formarea (-)-(cis)-4-amino-1-(2-hidroximetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă în formă de substanță solidă de culoare albă (0.32 g):

$[\alpha]_D^{21} - 132^\circ$  (1.08 MeOH);

<sup>1</sup>H RMN (DMSO)  $\delta$  3.04 (1H); 3.40 (1H), 3.73 (2H); 5.18 (1H); 5.29 (1H); 5.73 (1H); 6.21 (1H); 7.19 (2H); 7.81 (1H).

#### Exemplul 4

##### **(-)-(2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroximetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă**

(I) Trei baloane cu volumul de 50 ml fiecare cu bulion nutritiv (Oxoid Ltd) au fost inoculate cu ansele bacteriale Escherichia coli (ATSS 23 848), culese de pe capsula cu agar nutritiv. Baloanele au fost incubate în decursul nopții la 37°C la agitare prin scuturare cu 250 rot./min, apoi conținutul fiecărui balon a fost folosit pentru inoculația mediului 41 CDD (acid glutamic 3 g/l; MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/l; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 g/l; NaCl 2.3 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O 1.1 g/l; NaH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O 0.6 g/l; citidină 1.2 g/l) în fermentator cu volumul de șapte litri. Fermentarea culturilor a avut loc prin scuturare cu 750 rot./min, 37°C cu aerare de 4 l/min. După 24 ore de cultivare celulele au fost colectate prin centrifugare (5000 g, 30 min), randamentul a constituit 72 g de masă umedă. Granulele celulare au fost resuspendate în 300 ml de tampon tris HCl (20 mM cu pH de 7.5) și au fost distruse prin ultrasunet (4x45 s). Precipitatul celular a fost înlăturat prin centrifugare (30.000 g, 30 min), iar proteina supernatantului a fost precipitată prin adăugare până la sulfat de amoniu până la saturație de 75%. Precipitatul a fost colectat prin centrifugare (30.000 g, 30 min) și granulele au fost resuspendate în 25 ml de tampon HEPES (100 mM, pH 7.0) care conține sulfat de amoniu (75% de saturație). Soluția de ferment s-a obținut la centrifugare (12000 rot./min, 30 min). Stratul supernatant a fost vărsat, iar granulele au fost dizolvate în tamponul tris-HC (100 mM, pH 7.0) aducând volumul până la cel inițial.

(II) Produsul exemplului 1 (115 g) a fost dizolvat în apă (100 ml) și amestecat. La această soluție s-a adăugat soluție de ferment (0.5 ml) și amestecul a fost menținut la valoarea pH constantă în urma adăugării continue a HCl (25 mM). Transformarea a fost verificată prin metoda HPLC hiralică, care a arătat că a avut loc deaminarea preferabilă a (+) enantiomerului substratului. După 22 ore (+) enantiomerul substratului (RT 12.5 min) a fost complet separat și pH-ul soluției a fost stabilit 10.5 adăugând soluție concentrată de hidroxid de sodiu.

Soluția obținută mai sus a fost eluată în coloana umplută cu Sephadex DEAE (A 25; Pharmacia; 30x1.6 cm) echilibrată în prealabil până la pH 11. Coloana a fost spălată cu apă (200 ml), apoi cu 0.1 M HCl. Au fost colectate fracții de 40 ml fiecare și analizate prin metoda HPLC cu fază reversibilă. Fracțiile 5-13, care conțineau (-)enantiomerul substratului care n-a reacționat, au fost unite și pH-ul lor a fost adus până la valoarea 7.5 prin adăugarea HCl.

Fracția 47, care conținea produsul dezaminat, a fost adusă la pH 7.5 prin adăugarea de NaOH. Analiza realizată prin metoda HPLC hiralică a arătat că acest material este un amestec, care constă în principal dintr-un enantiomer (RT 10.2 min) și alt enantiomer (RT 8.5 min) - produs secundar.

(III) Stadiul (II) a fost repetat la o scară mai largă. Compusul din exemplul 1 (363 mg) în 250 ml de apă a fost incubat cu soluția de ferment (0.5 ml), obținut la stadiul (I). După 18 ore și corespunzător 48 ore s-au mai adăugat porții de (0.5 ml) soluție de ferment. Amestecul reactant a fost supus amestecării în decurs de 70 ore, apoi a fost lăsat pentru 64 ore. Analiza făcută cu metoda CLPI hiralică a arătat că (+) enantiomerul substratului este complet deaminat și soluția obținută a fost adusă la valoarea pH-ului de 10.5 adăugând NaOH.

Soluția obținută mai sus a fost trecută prin aceeași coloană și a fost eluată ca și în stadiul (I). Fracțiile 2-6 care conțin amestecul de rămășițe ale substratului și produsului deaminat au fost colectate. Fracțiile 7-13 ce conțineau rămășițele substratului (-) enantiomer au fost colectate și pH-ul a fost adus până la 7.5. Fracțiile 25-26, care conțineau produsul deaminat, au fost colectate și neutralizate.

Fracțiile 2-6 au fost din nou trecute prin aceeași coloană cu Sephadex OAE. Fracțiile 3-11 din această a doua coloană conțineau substratul (-) enantiomer care nu a reacționat. Fracția 70 conținea produsul deaminat.

(IV) Fracțiile substratului dizolvat din stadiile (II) și (III) au fost unite și valoarea pH-ului adusă până la 7.5. Soluția a fost eluată prin coloana XAD-16(40x2.4 cm) ambalată în apă. Coloana a fost spălată cu apă, apoi eluată cu amestecul de acetonă: apă =1:4 vol./vol. Fracțiile ce conțineau (-) enantiomer BCH-189 au fost colectate și după liofilizare a fost obținut un praf de culoare albă (190 mg).

Metodele de HPLC, utilizate mai sus, corespund următorilor parametri:

1. HPLC analitică cu fază reversibilă:

Coloana: patron capilar, Spherisorb ODS-2 (5 mM), 150x4.6 mm;

Eluant de dihidrofosfat de amoniu (50 mM) +5% MeO;

Viteza fluxului: 1.5 ml/min;

Detector: UV, 270 nm;

Timpul de reținere: BCH-189 11.0 min și 12.5 min,

diaminat BCH-189 8.5 min și 10.2 min.

2. HPLC analitică hirală:

Coloana: ciclobond acetil, 250 × 4.6 mm;

Eluant: 0.2% soluție de trietilamoniu de acetat (pH 7.2);

Viteza fluxului: 1.0 ml/min;

Detector: UV, 270 nm;

Timpu de reținere: BCH-184 12.0 min și 12.5 min diaminat BCH-189 8.5 min și 10.2 min.

(Transformarea biologică a fost supravegheată prin cercetările micșorării picului în momentul 12.5 min și acumulării produsului în momentul 10.2 min.)

#### Exemplul 5

##### **(-)-cis-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă**

Lațurile bacteriale ale celulelor E coli (ATSS 32848) culese din ceștile bine crescute cu agar nutritiv au fost folosite pentru inocularea a două baloane Florence, fiecare din ele conținând 250 ml de bulion nutritiv. Cultura a fost incubată la 37°C la agitare prin scuturare (250 rot./min; 5 cm) timp de 18 ore. Apoi conținutul acestor baloane a fost folosit pentru inocularea a 40 l de mediu SDD cu citidină într-un vas de fermentare de 70 l.

Condițiile de fermentare au fost următoarele:

aerația 40 l/min, viteza agitării 750 rot./min la temperatura 37°C. În fermentator au fost instalate trei impelere Rushton. Procesul de fermentare a durat 18 ore, apoi cultura crescută a fost colectată folosind centrifuga Sharples pentru centrifugare continuă. Pasta de celule (greutatea umedă 150 g) înainte de a fi distruse celulele a fost congelată la -20°C.

#### Mediul SDD

	g/l
L-acidul glutamic	3
MgSO <sub>4</sub>	0.2
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5
NaCl	2.3
NaH <sub>2</sub> BO <sub>4</sub>	0.6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.1

Acest mediu a fost preparat cu apă distilată, a fost sterilizat la 121°C în decurs de 30 min.

Citidina (1.2 g/l) a fost sterilizată și adăugată înainte de inoculație.

Pasta de celule înghetată (150 g) a fost topită și suspendată în 750 ml 100 mM în tamponul HEPE S/N [2-hidroxietyl] piperazin-N'-2-acidul etansulfonic cu pH-ul de 7.5, care conținea 1 mM acid etilendiamintetraacetic (sare de sodiu) și 1 mM ditiotreit (soluție care distruge tamponul).

Celulele au fost distruse la trecerea suspensiei prin omogenizatorul Manton-Baclir sub presiunea de 7500 funt/diuim<sup>2</sup> (42x10<sup>2</sup> kPa). Această procedură a fost repetată de trei ori cu răcirea suspensiei aproximativ până la 5°C după fiecare trecere prin omogenizator. Omogenatul a fost limpezit prin centrifugare (1400 g, 60 min). Activitatea citidin deaminazică a fost adsorbită pe coloana cu Q-Sepharoză (volumul stratului 490 mg), echilibrată cu 50 mM Tris (hidroximetil) metilamin (pH 7.5), care conține 1 mM de clorură de sodiu. Frațiile active colectate (210 ml) au fost trecute prin coloana cu fenil-sepharoză (cu volumul stratului de 490 ml) echilibrată în prealabil cu soluție de tampon care conținea 3.2 M sulfat de amoniu. Fermentul legat a fost eluat cu soluție de sulfat de amoniu în gradient de concentrații descrescând. Frațiile cu activitate citidin deaminazică au fost colectate (695 ml), fermentul parțial purificat a fost apoi precipitat cu sulfat de amoniu de 80%. După centrifugare (1400 g, 60 min) granulele au fost resuspendate în 54 ml de strat supernatant din stadiul indicat mai sus și păstrate la 4°C.

6.2 ml de această soluție a fost centrifugată (18000 g, 90 min) și granulele au fost dizolvate în 24 ml de tampon de 0.5 M fosfat de caliu (pH 7.5). În decursul nopții sistemul a fost supus dializei în tampon de fosfat, pH 7.5. Volumul reținut a fost apoi eluat cu un volum egal de apă distilată (20 ml). La 35 ml de soluție dată s-a adăugat 1 g de sfere uscate Eupergit C, și amestecul a fost lăsat la temperatura de cameră pentru 150-300 ore (timpul a fost determinat de activitatea citidin deaminazică restantă în soluție). Fermentul imobilizat a fost spălat cu tampon HCl de 100 mM (pH 7.0), care conținea 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 M NaCl și 500 părți la 1 milion de ester etilic al acidului paraoxibenzoic (tampon pentru păstrare).

Fermentul imobilizat (2,7 g de masă umedă) a fost păstrat în acest tampon la 4°C până la momentul apariției necesității transformării biologice.

Produsul exemplului 1 (3 g) a fost dizolvat într-o retortă de 1 l, dotată cu un agitator magnetic, în 500 ml de apă distilată. Biotransformarea s-a efectuat la 32°C în termostat. Valoarea pH-ului a fost menținută constantă 7.0 datorită adăugării 1 M de acid acetic, 1 g de masă umedă de ferment imobilizat a fost spălat cu apă, în prealabil distilată până la începutul reacției.

Transformarea a fost supravegheată, folosind CLPI hiralică, care a arătat că de preferință se deaminează (+) enantiomerul substratului. La sfârșitul reacției (72 ore) sferile cu fermenți au fost filtrate și filtratul s-a folosit pentru separarea (-) enantiomerului necesar.

pH-ul amestecului reactant a fost adus până la 10.5, utilizând în acest scop 1 M sulfat de amoniu, și soluția a fost aplicată pe rășină diolit (Duolite A113) cu un grad înalt de polimerizare în ciclul OH (50 ml, 0.4 volumul stratului pe oră). Analogul uridinic a fost adsorbit de polimer (rășină), și (-) enantiomerul a fost trecut prin această rășină. Tot (-) enantiomerul, rămas pe rășină, a fost înlăturat prin spălarea cu soluție de amoniac de 0.04% (2 volume de strat, viteza fluxului fiind de 0.8 volume strat/oră).

pH-ul soluțiilor trecute și al apelor de spălat (600 ml) a fost adus până la 7.0, adăugând acid sulfuric concentrat, și soluția a fost trecută prin rășină HAD 16 (50 ml, viteza fluxului de 1.4 volume strat/oră). Coloana a fost spălată cu apă distilată (2.6 volume strat, viteza fluxului de 2 volume strat pe oră) și (-) enantiomerul a fost eluat cu amestecul acetonă-apă, luat în proporție de 1:3 (viteza fluxului de 1.5 volume pe oră).

Masa care conține fracția (-) enantiomer (4 volume strat) a fost concentrată cu evaporator Buchi până la un volum nu prea mare, apoi a fost filtrată prin filtru de sticlă nr. 3. Filtratul a fost uscat prin liofilizare și ca rezultat s-au obținut 1.4 g de produs denumirea căruia este dată în titlu, identic cu produsul obținut în exemplul 4.

#### Exemplul 6



**Compoziție pentru pastile**

A. Următoarea compoziție a fost obținută la granulara umedă a ingredientelor cu soluție de providon în apă, uscare și măsurare, după care urmează adăugarea stearatului de magneziu și presarea.

	mg/pastilă
(a) Ingredient activ	250
(b) Lactoza B.F.	210
(c) Providon B.F.	15
(d) Elicoleat de sodiu amidon	20
(e) Stearat de magneziu	5
	500

B. Următoarea compoziție este obținută la presare directă; lactoza este componentul nemijlocit al presării

	mg/pastilă
Ingredient activ	250
Lactoza	145
Avicel	100
Stearat de magneziu	5
	500

C. (Compoziție cu eliminare controlabilă) Această compoziție este obținută pe calea granularii umede a ingredientelor cu soluție de providon în apă, prin uscare și blindare, după care urmează adăugarea stearatului de magneziu și presarea.

	mg/pastilă
(a) Ingredient activ	500
(b) Oxipropilmetilceluloză	112
(c) Lactoza B.F.	53
(d) Providon B.F.	28
(e) Stearat de magneziu	7
	700

*Exemplul 7***Compoziție pentru capsule**

Compoziția pentru capsule este obținută prin amestecarea ingredientelor și umplerea capsulei, ce constă din două părți, cu acest amestec. Capsula este pregătită din gelatină dură.

	mg/capsulă
Ingredient activ	125
Lactoza	72.5
Avicel	50
Stearat de magneziu	2.5
	250

*Exemplul 8***Compoziție pentru injecții**

Ingredient activ 0.200 g, soluție de hidroxid de sodiu de 0.1 M pentru aducerea pH-ului aproximativ până la 11, apă sterilă până la 10 ml.

Ingredientul activ se suspendează într-o cantitate oarecare de apă, care poate fi încălzită și pH se aduce aproximativ până la 11 cu soluție de hidroxid de sodiu. Apoi dozarea se aduce până la volumul necesar și se filtrează prin filtrul cu membrană gradat steril într-o fiolă sterilă de sticlă cu volumul de 10 ml și se închide ermetic cu un dop steril și deasupra cu un strat de izolare.

*Exemplul 9*

	mg/supozitor
Ingredient activ	250
Grăsime solidă B.F.	1770
	2020

A cincea parte din grăsimea solidă se topește pe o tabla care este înzestrată cu o cămașă de încălzire cu abur la maxim 45°C.

Ingredientul activ se cerne prin sita de 200 μm și se adaugă la baza topită la agitare utilizând în acest scop un agitator cu decalaj înalt. Agitarea se face până la obținerea unei suspensii omogene. Menținând amestecul la temperatura de 45°C la el se adaugă grăsimea solidă restantă și se agită până la obținerea amestecului omogen. Suspensia este trecută complet prin sita de 200 μm din oțel

inoxidabil și la agitare continuă se lasă să se răcească până la 40°C la temperatura de la 38 până la 40°C. În forme de plastic potrivite de 2 ml se introduc câte 2.02 g de amestec. Supozitoarele se lasă să se răcească până la temperatura de cameră.

#### Exemplul 10

##### Activitatea biologică

##### Activitatea antivirotică

Activitatea antivirotică a compușilor descriși în exemplul 2 a fost studiată pe trei culturi de microbi HIV-1 și o cultură HIV-2 în următoarele linii de celule.

μM celule, T-celule semimature obținute de la un bolnav cu leucemie limfoblastoză, a fost infectată cu HIV-1 cultura GP-8.

Celulele C8166, celulele umane T-limfoblastoide, a fost infectată cu HIV-1 cultura RF.

Celule CEM, celulele umane T-limfoblastoide, au fost infectate cu HIV-1 culturile RF și U 455, sau cu HIV-2 cultura ROD. MT-4 celule, T-celulele umane ale liniei leucemice celulare, a fost infectată cu HIV-2 cultura RF.

Activitatea antivirotică în celulele C8166, μM și CEM s-a determinat pe calea inhibării formării sincitinei, iar în celulele MT-4 pe calea inhibării transformării formazanului. Activitatea antivirotică a preparatelor se determină analizând cantitatea HIV p24 antigene, sintetizate în prezența și în lipsa enantiomerilor. Rezultatele sunt expuse în tabelele 1 și 2.

Tabelul 1

Analiza	Activitatea antivirotică (mg/ml)					
	Formazan	Inhibarea formării cintiei				
Celule	MT-4	CEM	CEM	CEM	IM	C8166
Virusul HIV-1	HIV-1 RF	HIV-2 ROD	HIV-1 RF	HIV-1 U455	HIV-1 GB8	HIV-1 RF
(-) enantiomer	0.28	0.045	0.07	0.006	0.03	0.05
(+) enantiomer	0.20	0.055	0.04	0.008	0.05	0.01

Tabelul 2

##### Inhibarea sintezei HIV p24

Inhibarea sintezei HIV p24 (mg/ml)			
Celule	C8166	JM	MT-4
Virusul	RF	GB8	RF
(+) enantiomer	0.021	0.033	0.0008
(-) enantiomer	0.016	0.016	0.0004

#### B. CITOTOXICITATEA

Citotoxicitatea compușilor din exemplul 2, racematului (BCH-189; exemplul 1) și amestecului 50/50 a doi enantiomeri a fost determinată pe cinci CD4-linii celulare: H 9, JM, CEM, C8166 și V937.

Compușii predestinați pentru testări au fost diluați serial de la 100 g/ml până la 0.3 g/ml (concentrațiile limită) în 96 adâncituri ale microplășetelor de titrare, și în fiecare adâncitură a plășetelor au fost inoculate  $3.6 \times 10^4$  celule incluzând adânciturile de control libere de remediu. După incubarea la 37°C în decurs de 5 zile numărul de celule viabile a fost determinat pe calea înlăturării mostrei de celule a suspensiei de celule și calcularea celulelor legate cu trypan albastru în homocitometru. Rezultatele sunt expuse în tabelul 3.

Tabelul 3

##### Citotoxicitatea

Compusul	Citotoxicitate 50% (mg/ml)				
	Celule CEM	Celule JM	Celule H9	Celule U937	Celule C8166
(+) enantiomer	1	1.5	2	4	35
(-) enantiomer	>100	30	>100	>100	>100
BCH-189	3	3.5	8	15	90
1:1 Amestec	2.5	ND*	ND	ND	ND

\*ND = nu este determinat

#### Exemplul 11

În trei Centre Europene au avut loc cercetări ale fazei I/II pentru determinarea profilului siguranței (-)-(2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroxiimetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onei, prescrise pentru administrare zilnică de două ori pe zi, și în vederea aprecierii în prealabil a activității lui împotriva infectării cu virusul imunodeficienței umane (HIV). O sută patru pacienți (104) au primit doze de preparat conform greutateii corpului lor în kg, cuprinse în intervalul 0.5-20 mg/kg pe zi în decursul perioadei inițiale de tratament de 24 săptămâni. Eficiența tratamentului a fost apreciată prin analiza variației următorilor markeri substituiți: calcularea absolută a indicelui CD<sub>4</sub>, calcularea indicelui CD<sub>4</sub> în procente, antigenul p24 de ser, neopterin și 2-microglobulină. Reacțiile clinice obiective

de răspuns au fost apreciate pe baza creșterii masei și indicelui lui Karnovski. Pentru aprecierea eficienței tratamentului au fost utilizate de asemenea modificări ale sarcinii de virus.

#### Rezultate

Este clar că monoterapia este ușor suportabilă. Nu se observă o creștere a numărului de cazuri de acțiune nocivă la majorarea dozei, și toate rezultatele nefavorabile sunt considerate cauzal nelegate de terapie. Analiza marcherilor imuni, virotici și clinici a scos în evidență activitatea în intervalul examinat al dozelor. Pretutindeni au avut loc majorări neînsemnate și de scurtă durată ale indicelui CD<sub>4</sub> și procentului CD<sub>4</sub>. A avut loc micșorarea limitelor de sarcină virotică, care a fost menținută mai jos de linia de bază în decursul întregii perioade de analiză la majoritatea pacienților. S-a observat, de asemenea, o sporire neînsemnată, însă de lungă durată a masei.

#### Exemplul 12

La examinarea fazei II-III, ce include 129 pacienți cu SIDA pozitivi, au fost comparate combinațiile (-)-(2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroxi)metil-1,3-oxatolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă și 3'-azido-3'-deoxitimidin (AZT) cu un AZT.

La terapia combinată pacienții luau 300 mg doză de combinație solicitată de două ori pe zi și 200 mg doză de AT de trei ori pe zi. Pacienții supuși monoterapiei A T primeau 200 mg doză de trei ori pe zi.

La examinarea ce a durat 24 de săptămâni au fost apreciați trei coeficienți de eficacitate: indicele CD<sub>4</sub> de celule limfoide; nivelul de virus, depistat în celulele sangvine; și nivelul de virus în plasma/serul sangvin. Pacienților care au fost supuși în decurs de 24 săptămâni terapiei cu AZT li s-a prescripșit terapia combinată pe o perioadă suplimentară de 24 săptămâni.

#### Rezultate

Pacienții, care au fost supuși terapiei combinate, au avut majorarea maximă medie de 85 celule CD<sub>4</sub>, înregistrată în săptămâna a opta. Majorarea un timp îndelungat a fost de 80 celule mai sus de linia de bază (linia de bază se referă la măsurările anterioare examinării) în săptămâna a 24-a. Pacienții care au continuat terapia combinată au avut majorarea medie în săptămâna a 48-a mai mult de 49 celule. Majorarea maximă medie la pacienții care primeau doar AZT a constituit 34 CD<sub>4</sub> celule în săptămâna a patra. În săptămâna a 24-a pacienții care primeau numai AZT au observat o micșorare în medie cu șapte celule față de linia de bază. Însă la acei pacienți care au trecut de la monoterapia cu AZT la terapia combinată s-a înregistrat o majorare medie cu 40 celule față de linia de bază în săptămâna a 48-a.

La pacienții cărora li s-a administrat preparatul combinat nivelul de virus în celulele sangvine s-a micșorat cu 99% în săptămâna a 24-a, totodată, la pacienții care au continuat cursul dat de terapie a avut loc o scădere de lungă durată cu 99% mai jos de linia de bază în săptămâna a 48-a. La pacienții ce recepționau numai AZT nivelul de virus în celulele sangvine a scăzut în săptămâna a 4-a cu 70%, iar în săptămâna a 24-a a revenit la indicele în limitele de 11% în raport cu linia de bază. Pacienții, care primeau numai AZT și care au trecut la terapia combinată în săptămâna a 24-a, au avut gradul de micșorare 98% în săptămâna a 48-a.

Nivelurile de virus în plasmă/ser sangvin la pacienții supuși terapiei combinate scădeau cu 92% față de linia de bază de acum în săptămâna a doua, și se mențineau la circa 86% și 91% în săptămânile a 24-a și a 48-a, respectiv. Nivelul de virus în plasmă/ser sangvin la pacienții supuși numai AZT se micșora cu 76% în săptămâna a doua, și acest indice revenea la valoarea de 36% în săptămâna a 24-a. Pacienții care au trecut de la AZT la terapia combinată au avut 92% de micșorare a nivelului de virus de la linia de bază în săptămâna a 48-a.

#### Exemplul 13

S-a inițiat cercetarea fazei I/II cu sporirea dozei pentru aprecierea securității și activității combinației (-)-(2R, cis)-4-amino-1-(2-hidroxi)metil-1,3-oxatolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă. Pacienții selectați au avut maladia APC sau SIDA, și indicele CD<sub>4</sub> a constituit mai puțin de 300 celule pe mm<sup>3</sup>.

În fiecare lună se măsurau indicii CD<sub>4</sub>, p24 de antigen, beta-2-microglobulină (B2M), neopterin (N) și HIV-PCR. La fiecare trei luni au fost selectate PBMC pentru cultivarea HIV.

Au fost înregistrați 97 pacienți (78 APC, 19 SIDA) cu dozele de 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 și 20 mg/kg/zi. 85 (88%) de pacienți au fost supuși terapiei preliminare antiretrovirotice (în medie mai mult de 2 ani). Treizeci și cinci de pacienți s-au înlăturat de la cercetări, la nouă pacienți s-a dezvoltat infecție convențional patogenă. La unsprezece pacienți a avut loc micșorarea indicelui CD<sub>4</sub>. Un pacient a fost înlăturat de la terapie datorită neutropeniei legate de recepția medicamentului; alte simptome în legătură cu caracterul toxic al medicamentului nu au fost înregistrate la momentul în care s-au comunicat aceste date.

La câțiva pacienți, cărora li se administra doza de 20 mg/kg/zi s-a observat scăderea numărului absolut de neutrofile și mărirea MCV. Mărirea statistic semnificativă (p<0.0001) a indicelui absolut CD<sub>4</sub> a fost observată peste 4 săptămâni la pacienții, ce recepționau 4-12 mg/kg/zi. Devierile medii ale indicelui absolut CD<sub>4</sub>, procentul mediu al devierilor B2M și N și procentul mediu al devierilor p24 Ag la toți pacienții, ce recepționau 4-12 mg/kg/zi, sunt următoarele:

Săptămânile	CD <sub>4</sub>	B2M	N	p24Ag
4	Ș41	-12%	-10%	-18%
8	Ș9	-10%	-10%	-21%
16	Ș6	-11%	-8%	-4%