



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **97-00898**

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: **01.11.1995**

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate: **17.11.1994 US 08/340.972**

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **US 95/14086 01.11.1995**

(41) Data publicării cererii:

BOPI nr.

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 96/16072 30.05.1996**

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.04.2003 BOPI nr. **4/2003**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 4526988; 4965374

(71) Solicitant: **ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, INDIANA, US**

(73) Titular: **ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, INDIANA, US**

(72) Inventatori: **CHOU TA SEN, INDIANAPOLIS, US; POTEET LAURIE MICHELLE, ZIONSVILLE, US; KJELL DOUGLAS PATTON, LAFAYETTE, US**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A., BUCUREȘTI**

(54) **PROCEDEU PENTRU PURIFICAREA ȘI IZOLAREA NUCLEOZIDEI ÎMBUNĂTĂȚITE ÎN ANOMER-BETA**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la un procedeu pentru purificarea și izolarea unei nucleozide îmbogățite în anomer-*beta*, care cuprinde: a) obținerea unui amestec conținând Rⁿ și o nucleozidă îmbogățită în anomer-*beta* într-un solvent cu punct de fierbere ridicat; b) diluarea amestecului

cu un solvent organic; c) adăugarea amestecului de reacție peste soluția apoasă de acid și d) menținerea amestecului de acid, astfel obținut, la o temperatură cuprinsă între 70 și 100°C până precipită nucleozida îmbunătățită în anomer-*beta*.

Revendicări: 5

RO 118296 B1



Invenția se referă la un procedeu pentru purificarea și izolarea nucleozidei îmbunătățite în anomer *beta*, și anume a 2'-deoxi-2',2'-difluoronucleozidelor utilizate în domeniul chimiei farmaceutice ca agenți terapeutici.

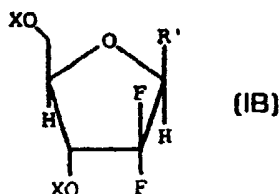
Este cunoscut interesul continuu pentru sinteza 2'-deoxinucleozidelor și a analogilor lor, reflectat în utilizarea cu succes a acestora ca agenți terapeutici în maladiile virale și canceroase. O fază critică în sinteza 2'-deoxinucleozidelor este faza de purificare și izolare a formei anomer - *beta* a nucleozidelor, formă care este cea dorită. Această fază este critică, întrucât procedeele de sinteză a 2'-deoxinucleozidelor nu sunt în general stereo-selective și conduc la un amestec de nucleozide *alfa* și *beta*. Vorbruggen și alții, *J. Org. Chem*, 41, 2084, (1976), M. Hofer, *Chem. Ber.*, 93, 2777 (1960), Walker și alții, *Nucleic Acid Researh*, 12, 6827 (1984), R.P. Hodge și alții, *J. Org. Chem.*, 56, 1553 (1991), Tann și alții, *J. Org. Chem*, 50, 3644 (1985), Howell și alții, *J. Org. Chem.*, 53, 85 (1088) și **US 4965374**, Chou și alții, toți au raportat diferite sinteze ale unui amestec de anomeri *alfa* și *beta* ai deoxinucleozidelor.

În ciuda progreselor în ceea ce privește tehnologia de sinteză a nucleozidelor, continuă să existe o necesitate privind un procedeu capabil să purifice și să izoleze într-un mod eficient 2'-deoxi-2', 2'-difluoronucleozidele îmbogățite în anomer-*beta* cu randament îmbunătățit, în care difluoronucleozidele au fost sintetizate în absența unui catalizator.

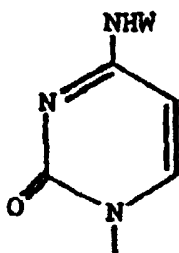
Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este de a asigura un procedeu pentru purificarea și izolarea nucleozidei îmbunătățite în anomer-*beta*.

Procedeul pentru purificarea și izolarea nucleozidei îmbunătățite în anomer-*beta* înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că el cuprinde:

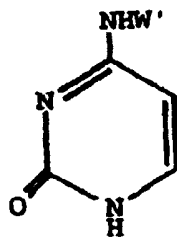
a) obținerea unui amestec conținând R" și o nucleozidă îmbogățită în anomer-*beta* având formula:



în care fiecare X este selectat în mod independent dintre grupări protectoare hidroxi, iar R' este o nucleobază având formula:



în care W este o grupare protectoare amino, iar R" este o nucleobază având formula:

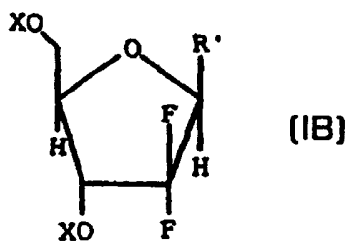


RO 118296 B1

- în care W' este o grupare protectoare amino sau hidrogen; într-un solvent cu punct de fierbere ridicat; 50
- b) diluarea amestecului cu un solvent organic selectat dintr-un grup constând din eteri, esteri, precum și nitrili,
- c) adăugarea amestecului de reacție diluat peste soluția apoasă de acid; și
- d) menținerea amestecului acid astfel preparat la o temperatură cuprinsă între 70 și 100°C, până când produsul având formula (IB), în care W este acum W' , a precipitat. 55
- În mod corespunzător, obiectul prezentei invenții este de a asigura un procedeu pentru purificarea și izolarea într-un mod eficient a 2'-deoxi-2', 2'-difluoronucleozidelor îmbogățite în anomer-*beta*.
- Alte obiective și avantaje ale prezentei invenții vor deveni evidente în urma descrierii și a exemplurilor de realizare care urmează. 60
- În tot cursul acestei descrieri, toate temperaturile sunt date în grade Celsius, toate proporțiile, procentajele și altele asemenea sunt în unități de greutate, iar toate amestecurile sunt în unități de volum, cu excepția cazurilor când este indicat altfel. Amestecurile anomerice sunt exprimate ca raport greutate/greutate sau sub formă de procentaj. Termenul "alchil", singur sau în combinație, se referă la grupe de hidrocarburi alifatică cu lanț neramificat, ciclic și ramificat, care conține, de preferință, până la 7 atomi de carbon, cum sunt grupările metil, etil, *n*-propil, izopropil, *n*-butil, *terț*-butil, *n*-pentil, *n*-hexil, 3-metilpentil și altele, sau hidrocarburi alifatică substituie cu lanț neramificat, ciclic și ramificat, cum sunt cloretil, 1,2-dicloretil și altele asemenea. Termenul "substituit", singur sau în combinație, se referă la substituirea cu una sau mai multe grupări selectate dintre ciano, halo, carboalcoxi, toluil, nitro, alcoxi, alchil și dialchilamino. Termenul "îmbogățit în anomer", singur sau în combinație, se referă la un amestec anomer în care raportul unui anomer specificat este mai mare decât 1: 1 și include și cazul unui anomer substanțial pur. 65
- Grupările protectoare hidroxi (X) se referă la grupări protectoare hidroxi, cunoscute de cei care lucrează în domeniu, așa cum sunt descrise în Capitolul 3 din *Protective Groups in Organic Chemistry* (Grupări protectoare în chimia organică), McOmie, Ed. Plenum Press, New-York (1973) și în Capitolul 2 din *Protective Groups in Organic synthesis* (Grupări protective în sinteza organică, Gren, John, Ed. J. Wiley and sons, New-York (1981). 75
- Grupările protectoare hidroxi preferate sunt grupări care formează esteri cum sunt formil, acetil, acetil substituit, propionil, butinil, pivaloil, 2-cloroacetil, benzoil, benzoil substituit, fenoxicarbonil, etoxicarbonil, *terț*-butoxi-carbonil, viniloxicarbonil, 2,2,2-tricloroetoxicarbonil și benziloxicarbonil; grupări formând alchileteri, cum sunt benzil, difenilmetil, trifenilmetil, *terț*-butil, metoximetil, tetrahidropiraniil, alil, tetrahidrotienil, 2-metoxietoximetil; carbamați cum sunt N-fenilcarbamat și N-imidazoilcarbamat; mai preferate sunt grupările benzoil, benzoil mono-substituit, benzoil disubstituit, acetil, pivaloil, trifenilmetil eteri, iar cea mai preferată este gruparea benzoil. 80
- Grupările protectoare amino (W) sunt selectate dintr-un grup constând din grupări formând silil amină, cum sunt trialchilsilil, incluzând trimetilsilil, izopropildialchilsilil, alchildiizopropilsilil, triizopropilsilil, 1,1,3,3,-tetraizopropildisloxanil, *terț*-butildialchilsilil și *terț*-butildiarilsilil; carbamați cum sunt *terț*-butoxicarbonil, benziloxicarbonil, 4-metoxivenziloxicarbonil și 4-nitrobenziloxicarbonil; formil, acetil, benzoil, și pivalamido; grupări formând eteri cum sunt metoximetil, *terț*-butil, benzil, alil și tetrahidropiraniil; o grupă protectoare amino preferată este trimetilsilil. 85
- 90

95 Cea dintâi fază din procedeul prezentei invenții revendicate este de a asigura un amestec conținând R" și o nucleozidă îmbogățită în anomerul *beta*, având formula care urmează:

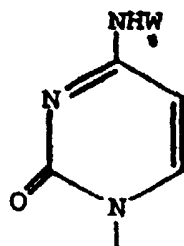
100



105

în care fiecare X este selectat în mod independent dintre grupările protectoare hidroxi, iar R' este o nucleobază având formula:

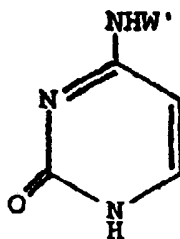
110



115

în care W este o grupare protectoare amino; iar R" este o nucleobază având formula:

120



125

în care W' este o grupare protectoare amino sau hidrogen.

Un asemenea amestec poate fi obținut pe mai multe căi. Metodele de sintetizare a unui asemenea amestec au fost descrise și revendicate în **CBE 93304817.5**. Unele dintre procedeele care urmează, (care nu utilizează un catalizator): folosesc un exces de nucleobază R", pag.9, din Cererea de Brevet European No. 93304817. 5; și utilizează un solvent cu punct de fierbere ridicat, pag.10, alineatul 13-17) descrise în **CBE 93304817.5**, este posibil să se prepare nucleozide îmbogățite în anomer-*beta* într-un raport anomic *alfa* față de *beta* de la mai mare decât 1: 1 până la mai mic sau egal cu 1: 9. Trebuie utilizat un exces mare de R", pentru a se obține aceste raporturi. Excesul R" este separat față de produsul dorit, prin procedeul care face obiectul prezentei invenții.

135

Solventul cu punct de fierbere ridicat este un solvent care are temperatura de fierbere peste 70°C. Solventul cu punct de fierbere ridicat este un solvent moderat polar, stabil față de acizi și ne-nucleofilic. Solvenții tipici, având punct de fierbere ridicat, sunt solvenții haloalchil aromatici, solvenți aromatici substituiți alcoxi și halo, precum și amestecuri ale acestora. Solvenții cu punct de fierbere ridicat, preferați, sunt 1,2-diclorețan, 1,1,2-triclorețan glyme, diglyme toluen, xileni, anisol, diclorobrommetan, clorbenzen, dibromclorometan, tribromometan, dibromometan, acetonitril, propionitril, dioxan, precum și amestecuri ale acestora, dintre care cel mai preferat este anisolul.

140

RO 118296 B1

O dată asigurată amestecul conținând Rⁿ și nucleozida îmbogățită în anomer-*beta*, descrisă mai înainte, procedeul din prezenta invenție continuă după cum urmează. În primul rând, amestecul de reacție este diluat cu un solvent organic având un punct de fierbere mai ridicat de 60°C. Solvenții acceptabili sunt cei din clasa eterilor, esterilor și nitrililor; sunt preferați acetonitrilul, acetatul de etil și tetrahidrofuranul. Diluția este efectuată la o temperatură ridicată, care ar putea fi temperatura de reacție. Solventul organic trebuie să fie încălzit, de asemenea, la temperatură ridicată, iar atât temperatura amestecului de reacție, cât și a solventului, trebuie să fie cuprinsă în domeniul de la 70°C până la 100°C. Solventul cel mai preferat este acetonitrilul. 145

Cantitatea de solvent organic adăugată este situată în domeniul cuprins între 1 ml și 5 ml per gram de Rⁿ (citozină protejată sau neprotejată) utilizat. Nici un fel de perioadă de menținere specială nu este necesară după diluarea amestecului de reacție; amestecul diluat poate fi preluat imediat de faza următoare. Amestecul de reacție, diluat, este adăugat la o cantitate mare de acid apos la o temperatură ridicată. Scopul soluției apoase de acid este de a dizolva excesul de Rⁿ (citozină protejată sau neprotejată), care a fost utilizat în reacția de glicozilare descrisă la pag.9 a Cererii de Brevet European 93304817. Prin urmare, cantitatea și gradul de aciditate a soluției apoase de acid depinde de cantitatea de exces de Rⁿ (citozină protejată sau neprotejată), utilizată în reacția în sine. Suplimentar, cantitatea de soluție apoasă de acid depinde de alegerea substanței acide utilizate în prepararea soluției apoase de acid. 155

Acidul cel mai preferat este acidul clorhidric, utilizat într-o concentrație de la 1 N până la 6 N, mai preferabil în concentrație de 4N. Atunci când acest acid este utilizat, iar cantitatea de exces Rⁿ (citozină protejată sau neprotejată) este situată în domeniul de la 5 X până la 20 X, cantitatea de soluție apoasă de acid clorhidric este de la 3 ml până la 5 ml per 1 gram de Rⁿ (citozină protejată sau neprotejată) utilizat. 160

Cu toate acestea, și alți acizi minerali, precum și alte condiții de lucru sunt utilizabile și ar putea fi chiar preferate în diferite circumstanțe. De exemplu, substanțe minerale acide cum sunt acidul sulfuric, acidul sulfuros, acidul fosforic, acidul azotic și acidul fosfonic pot fi, de asemenea, utilizate dacă aceasta se dorește de către operator. Concentrația acidului poate varia în limite relativ largi, în proporție aproximativ inversă față de volumul acceptabil al fazei totale de izolare. În general, pot fi utilizate concentrații de la 1N până la 10% pentru soluția de acid apoasă. Volumul soluției apoase de acid trebuie optimizat pe cale experimentală pentru fiecare acid individual în parte și pentru cantitatea din amestecul de reacție. Experimentările necesare sunt foarte simple, reclamând ca operatorul să efectueze doar ajustări succesive ale concentrației acidului și volumului față de amestecul de reacție specific, utilizat, observând solubilitatea lui Rⁿ (citozină protejată sau neprotejată) în fiecare caz. 170

Soluția apoasă de acid nu trebuie să fie fierbinte atunci când ea este combinată cu amestecul de reacție. Soluția apoasă de acid poate fi la temperatura ambiantă, atâta timp cât întregul amestec este încălzit la o temperatură ce se situează în domeniul cuprins între 70 și 100°C. Căldura de reacție poate fi suficientă pentru a aduce amestecul la această temperatură, sau ar putea fi necesar ca în unele cazuri amestecul să fie încălzit din exterior. În unele cazuri, căldura de reacție este mai mare decât cea necesară pentru a aduce amestecul la temperatura de 100°C, astfel încât amestecul de reacție trebuie răcit pentru a-l menține sub temperatura de 100°C. Aceasta este necesar întrucât este important ca temperatura soluției apoase de acid să nu fie atât de ridicată, încât unele din grupările de protecție să fie scindate încă în această fază a procesului. Atunci când se utilizează acetonitril ca solvent organic, temperatura cea mai ridicată este, de preferință, cuprinsă între 70 și 80°C. 175

Amestecul acid rezultat din adăugarea amestecului de reacție diluat la soluția apoasă de acid este menținut, preferabil, sub o agitare moderată, o anumită perioadă de timp. Modificările fizice care se produc pe durata acestei perioade de menținere duc la dizolvarea 180

195 excesului de R" (citozină protejată sau neprotejată) în stratul acidificat, și precipitarea nucleozidei *beta* dorite. Precipitarea este selectivă, și nucleozida-*alfa* nedorită rămâne în cea mai mare parte dizolvată în stratul organic. Astfel, amestecul acidificat trebuie păstrat la temperatură constantă, până când aceste două modificări fizice au fost efectuate. În general, o perioadă de timp ce variază între 10 min și 1 h este considerată ca fiind corespunzătoare.

200 După o perioadă de menținere suficientă, nucleozida *beta* precipitată este separată din cele două faze lichide prin filtrare sau centrifugare, și este spălată cu o cantitate adițională de soluție apoasă acidă. Filtrarea sau centrifugarea trebuie să fie efectuată la o temperatură aproximativ constantă, pentru a preveni ca R" dizolvat (citozina protejată sau neprotejată) să precipite din soluție. Nucleozida-*beta*, izolată și purificată în această manieră, mai poate avea o grupare protectoare amino (W) prezentă, sau gruparea protectoare amino (W) poate fi scindată și înlocuită cu un atom de hidrogen. Nucleozida-*beta*, izolată și purificată
205 în maniera de mai sus, este de o puritate superioară în raport cu nucleozida-*alfa*, față de R" (citozină protejată sau neprotejată) și alte impurități, și s-a găsit, de asemenea, că produsul dorit este obținut cu un randament superior.

Atunci când amestecul acidificat a fost filtrat sau centrifugat pentru a îndepărta produsul solid, straturile organice și apos ale filtratului sunt separate. Excesul de E" (citozină protejată sau neprotejată) se află în stratul apos și poate fi îndepărtat din acest strat, și reciclat înapoi în proces. R" (citozină protejată sau neprotejată) poate fi recuperat ușor, prin răcirea stratului apos și filtrarea a R" (citozină protejată sau neprotejată) precipitat, sau făcând stratul apos bazic, răcind soluția bazică și filtrând-o în vederea colectării E" (citozină protejată sau neprotejată) precipitat. Citozina recuperată în procedeul de mai sus este în mod obișnuit recirculată în proces pentru a forma amestecul, așa cum este descris în Cererea de Brevet European **93304817.5**. În acest fel, procedeul revendicat asigură o recirculare economică a lui R" (citozină protejată sau neprotejată), ceea ce reprezintă o caracteristică benefică a procedeuului.
215

220 Faza finală a procedeuului o reprezintă îndepărtarea grupărilor protectoare X, precum și orice cantitate de W rămasă în nucleozida solidă, purificată, având formula IB. Același raport anomic al nucleozidei neprotejate se obține prin îndepărtarea grupărilor protectoare.

Majoritatea grupărilor protectoare silil-amino sunt ușor scindate prin utilizarea unui solvent protic, cum este apa sau un alcool. Majoritatea grupărilor protectoare silil-amino sunt vulnerabile la scindare, la contactul cu un acid mineral. Grupările protectoare acil, cum este benzoilul sau grupările protectoare acil-amino, sunt îndepărtate prin hidroliză cu o bază puternică, la o temperatură cuprinsă între 0 și 100°C. Baze tari sau moderat tari, adecvate a fi utilizate în această reacție, sunt bazele care au un pKa (la temperatura de 25°C) de 8,5 până la 20,0. Asemenea baze includ hidroxizi ai metalelor alcaline cum este hidroxidul de sodiu sau hidroxidul de potasiu, alcoxizi ai metalelor alcaline cum este metoxidul de sodiu sau *terț*-butoxidul de potasiu; amide ale metalelor alcaline; amine cum este dietilamina, hidroxilamina, amoniacul și altele asemenea, precum și alte baze obișnuite, cum este hidrazina sau altele asemenea. Cel puțin un echivalent al unei baze este necesar pentru fiecare grupare protectoare.
225

Grupările protectoare acil pot fi îndepărtate, de asemenea, cu catalizatori acizi, cum sunt acidul metansulfonic, acidul clorhidric, acidul bromhidric, acidul sulfuric, sau cu o rășină schimbătoare de ioni acidă. Este de preferat ca o asemenea hidroliză să se efectueze la temperatură relativ ridicată, cum este temperatura de reflux a amestecului, dar temperaturi joase cum ar fi temperatura ambiantă pot fi, de asemenea, utilizate, atunci când se folosesc acizi deosebit de puternici. Trebuie avută însă în vedere prezervarea acestor grupări protectoare acil, astfel încât ele să nu fie în mod prematur scindate în timpul fazelor timpurii ale procedeuului care face obiectul prezentei invenții.
235
240

Îndepărtarea grupărilor protectoare eter este efectuată prin metode obișnuite, de exemplu, cu etantiol sau cu clorură de aluminiu.

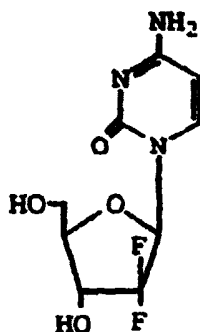
RO 118296 B1

Grupările protectoare *terț*-butildimetilsilil reclamă condiții acide, cum ar fi contactul cu acid clorhidric gazos, în vederea îndepărtării lor.

Îndepărtarea grupărilor protectoare poate fi în mod convenabil efectuată în solvenți alcoolici, în special soluții apoase de alcanoli cum este, de exemplu, metanolul. Cu toate acestea, reacția de deblocare poate fi efectuată, de asemenea, în orice solvent convenabil, cum ar fi polioli incluzând etilen glicoli, eteri cum ar fi tetrahidrofuran, cetone cum ar fi acetona și metil etil cetona sau dimetilsulfoxidul.

Într-un exemplu preferat de realizare a invenției, reacția de deblocare utilizează amoniac pentru a îndepărta gruparea protectoare benzoil hidroxi, la o temperatură de 10°C. Cu toate acestea, este de preferat a se utiliza în această reacție un exces de bază, în ciuda faptului că utilizarea unui exces de bază nu este crucială.

Nucleozida îmbogățită în anomer *beta*, rezultată, având formula care urmează, sau o sare de adiție acidă, organică sau anorganică a acesteia, poate fi extrasă și/sau izolată din amestecul de reacție cu ajutorul procedurii descrise în brevetul **US 4965374**.



Nucleozida îmbogățită în anomer - *beta*

Exemplul care urmează ilustrează aspectele specifice ale prezentei invenții, nu intenționează să limiteze în vreun fel scopul acestei invenții și nu trebuie în nici un caz interpretat astfel.

Exemplul 1. Prepararea, purificarea și izolarea a 1-(2'-deoxi-2', 2'-difluoro-3', 5'-di-O-benzoil-D-ribofuranosil)-4-aminopirimidin-2-onă cu 22,5 echivalenți de bis-trimetilsilil-citozină, îmbogățit în anomer *beta*

La 250 ml capacitate, a unui balon cu trei gâturi s-au adăugat 30 g de citozină, 25 mg de sulfat de amoniu și 150 ml de hexametildisilazan, iar amestecul a fost încălzit la temperatura de 125°C și menținut timp de 30 min după dizolvarea tuturor părților solide. Apoi temperatura a fost ridicată până la 145°C, menținută la această temperatură până când a încetat fierberea, și apoi menținută la temperatura de 120°C sub vacuum, până când solidele au început să se formeze deasupra nivelului de lichid din balon. Apoi amestecul a fost răcit la temperatura de 105°C și s-au adăugat 25 ml de anisol.

Într-un alt balon, cu capacitatea de 125 ml, s-au combinat 10 ml de anisol și 5,75 g de 2-deoxi-2,2-difluoro-3, 5-dibenzoil-D-ribofuranosil-1-*alfa* metansulfonat, și amestecul a fost încălzit până când s-a format o fază lichidă omogenă. Acest lichid a fost adăugat, la temperatură constantă, la amestecul de citozină, și amestecul combinat a fost menținut la temperatura de 100°C timp de 24 h.

O porție de 133 ml de acid clorhidric 4 N a fost introdusă într-un balon cu capacitatea de 500 ml. O porție de 31,3 ml de acetonitril s-a adăugat la amestecul de reacție, iar amestecul de reacție diluat a fost apoi turnat peste acid, sub agitare constantă, în timp ce s-a aplicat o baie de răcire la balonul cu capacitatea de 500 ml. Amestecul combinat a fost apoi agitat la temperatura de 70°C timp de 10 min și a fost apoi filtrat la temperatură constantă. Turta umedă a fost apoi transformată în slam timp de 10 min la temperatura de 70°C, cu o

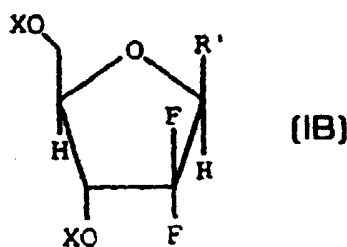
295 cantitate de 25 ml de acid clorhidric 4N, și a fost apoi filtrată din nou. Această turtă de pe
 filtru a fost transformată în șlam timp de 10 min la temperatura de 70°C, cu o cantitate de
 25 ml de apă deionizată, filtrată, iar turta umedă a fost din nou transformată în șlam la tem-
 peratura de 70°C, cu o cantitate de 50 ml de apă deionizată. Valoarea pH a șlamului apos
 a fost crescută la 7 cu bicarbonat de sodiu, iar amestecul a fost apoi agitat timp de 10 min,
 la temperatura de 50°C sau mai ridicată, și a fost din nou filtrat. Această turtă de pe filtru a
 fost transformată din nou în șlam, cu o nouă cantitate de 50 ml de apă deionizată, la tempe-
 300 ratura de 70°C, timp de 10 min, filtrată, iar turta de pe filtru a fost uscată și analizată. Ea a
 cântărit 3,98 g, reprezentând un randament de izolare de 61 procente și conținând mai puțin
 de 1 procent de produs anomer-*alfa*, care nu este dorit.

305 Prezenta invenție a fost descrisă în detaliu, incluzând exemplele preferate de reali-
 zare a acesteia. Cu toate acestea, trebuie apreciat că persoanele specializate în acest do-
 meniu, pe baza consideranțiilor din prezenta descriere, pot opera modificări și/sau îmbu-
 nătățiri ale acestei invenții, care se încadrează în scopul și spiritul prezentei invenții și sunt
 menționate în revendicările care urmează.

Revendicări

310 1. Procedeu pentru purificarea și izolarea nucleozidei îmbogățite în anomer-*beta*,
 caracterizat prin aceea că acesta cuprinde:

a) obținerea unui amestec conținând R" și o nucleozidă îmbogățită în anomer-*beta*,
 având formula:



320 în care fiecare X este selectat în mod independent dintre grupări protectoare hidroxi iar R"
 este o nucleobază având formula:



330 în care W este o grupare protectoare amino, iar R" este o nucleobază având formula:



în care W' este o grupare protectoare amino sau hidrogen; într-un solvent cu punct de
 fierbere ridicat;

RO 118296 B1

b) diluarea amestecului cu un solvent organic selectat dintr-un grup constând din eteri, esteri precum și nitrili, 340

c) adăugarea amestecului de reacție diluat peste soluția apoasă de acid; și

d) menținerea amestecului acid astfel preparat la o temperatură cuprinsă între 70 și 100°C, până când produsul având formula (IB), în care W este acum W', a precipitat.

2. Procedeu în conformitate cu revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** amestecul de reacție este diluat cu acetonitril, acetat de etil și tetrahidrofuran. 345

3. Procedeu în conformitate cu revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** soluția apoasă de acid este de acid clorhidric de concentrație 1N până la 6N.

4. Procedeu în conformitate cu revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** amestecul acid este agitat în timp ce produsul precipită. 350

5. Procedeu în conformitate cu revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** include în continuare deblocarea produsului (IB) purificat pentru a forma nucleozida care este 1-(2'-deoxi-2',2'-difluoro-D-ribofuranozil-4-aminopirimidin-2-onă.

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**

Examinator: **ing. Eremia Laura**

