

9 MAR. 1963



P.- 23.842

6258 "A.H-51"

283 32

283632

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

P A T E N T E D E I N T R O D U C C I O N

formulada el 22 de Diciembre de 1962, con el N^o. 283.632

en

E S P A Ñ A

por DIEZ años

a nombre de: AKTIEBOLAGET LEO, entidad sueca, establecida

en: 166, Langvinkelsgatan, Helsingborg, Suecia, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE COMPUESTOS CON ACCION

ANTI-ENZIMATICA AUMENTADA"

=====

El presente invento tiene por objeto, en la medida en que se hayan de destinar a servir como remedios, sustancias con poder anti-enzimático exaltado frente a la fosfatasa alcalina y a la hialuronidasa. Tiene por objeto igualmente la preparación de tales sustancias.

Se conocen ya sustancias diversas que ejercen una acción anti-enzimática de este tipo; otras se han obtenido durante el curso de trabajos de investigación que constituyen la base del presente invento. Así, por ejemplo, la heparina, el ácido hialurónico sulfonado, la rutina, la



5 quercetina, el ácido ascórbico, la floretina y algunas otras sustancias tienen un efecto antagonista del de la hialuronidasa, mientras que la heparina, el ácido ascórbico, el fosfato de estrona, la floretina y otras tienen un efecto anti-fosfatásico, particularmente frente a la fosfatasa alcalina.

10 Ahora bien, la solicitante ha encontrado que, en la mayoría de los casos, el efecto anti-hialuronidásico y el efecto anti-fosfatásico están relacionados entre sí, Sin embargo, el efecto de las sustancias enumeradas arriba y de las sustancias análogas es débil.

15 La solicitante ha encontrado, además, que, para un grupo de sustancias que comprende algunas de las sustancias mencionadas anteriormente, era posible aumentar considerablemente el efecto anti-enzimático por fosforilación. En la mayor parte de los casos, el efecto se ha aumentado aproximadamente de 100 a 10.000 veces por esta fosforilación. El hecho de que la exaltación del poder de los fosfatos orgánicos así obtenidos, y por otra parte desconocidos hasta ahora, 20 no es atribuible a su solubilidad mayor en agua, se demuestra por lo siguiente: Las sustancias fosforiladas son más eficaces que las que no están fosforiladas, incluso a concentraciones para las cuales las sustancias no fosforiladas son solubles en el agua.

25 El invento tiene, pues, por objeto, principalmente, procurar nuevos compuestos que son fosfatos de una o varias sustancias que tienen cada una por lo menos un hidroxilo fenólico y que tienen una de las configuraciones, estrechamente afines, que se detallarán más adelante.

30 Tiene igualmente por objeto procurar nuevos productos

283632



de reacción que contienen fósforo, que derivan de cada una de las sustancias conocidas especificadas más adelante y del oxloruro de fósforo, y son solubles en el agua o, por lo menos, en los álcalis diluidos.

5 Otro objeto del invento es suministrar un procedimiento de preparación de compuestos con efecto anti-enzimático exaltado frente a los enzimas citados arriba; según este procedimiento, se disuelve una sustancia que pertenece al grupo mencionado arriba en un disolvente capaz de favorecer la fosforilación por un agente adecuado para asegurarla, 10 por ejemplo, el oxloruro de fósforo; se añade el mencionado agente y, si hay lugar, promotores de fosforilación; se deja en reposo la mezcla reaccional hasta que la fosforilación ha alcanzado el grado deseado y se hidroliza el producto de la reacción. 15

Otros objetos y ventajas del invento se desprenderán de la descripción que sigue, bien entendido que no tiene carácter limitativo, particularmente en lo que se refiere a las condiciones de realización y a las proporciones.

20 Se obtienen, en conjunto, buenos resultados sometiendo a la fosforilación sustancias que poseen por lo menos un hidroxilo fenólico y responden a una de las fórmulas 1 a 4 del esquema adjunto.

En estas fórmulas:

25 X representa un átomo de hidrógeno o un hidroxilo, Z, Y, U' y U'' representan cada uno un hidroxilo, un grupo aciloxílico o alcoholoxílico o un átomo de hidrógeno, a condición de que una sola de las letras Z e Y y una sola de las letras U' y U'' pueda representar el hidrógeno, y 30

283632



V representa un hidroxilo o un grupo aciloxílico o alcoholoxílico.

Se ve que las fórmulas dadas corresponden a las de derivados de flavona, flavanona, calcona y dihidro-calcona, respectivamente. En las fórmulas 3 y 4, V representa siempre un hidroxilo, o un grupo aciloxílico o alcoholoxílico, de manera que las sustancias que responden a estas fórmulas están estrechamente relacionadas con las sustancias que responden a las fórmulas 1 y 2; se sabe, en efecto, perfectamente que, tratando por un ácido un derivado de calcona que posea un OH en posición orto con respecto al átomo de carbono del núcleo aromático I unido al grupo cetónico, se obtiene el derivado correspondiente de flavanona. En solución alcalina, esta reacción puede invertirse. Así, cuando se trata la hesperetina por un álcali, se obtiene la 3.2'.4.6' - tetrahidroxi-4-metoxi-calcona, y, por tratamiento ácido, se transforma este compuesto en hesperetina.

Por lo que se ha explicado anteriormente, se comprende claramente también que una de las letras Y,Z,U' o U'' o V debe representar un hidroxilo, pero, en tanto que la posición de V debe estar en orto con respecto al átomo de carbono unido al grupo cetónico, la posición de Y,Z,U' y U'' es arbitraria.

Se han ensayado diversos grupos alcoxicos habiendo dado resultado satisfactorio, por ejemplo, CH₃O y C₂H₅O. Igualmente, se ha ensayado un cierto número de grupos acilicos diferentes, por ejemplo, el grupo benzoilico y grupos carbalcoxicos tal como el grupo carbobenzoxílico.

Así pues, de acuerdo con el presente invento, se obtienen efectos anti-fosfatásico y anti-hialuronidásico fuerte-



mente aumentados con el producto de la fosforilación del derivado dihidrogenado de la 4.3.4.6' - tetrahidroxi-calcona, es decir, de la floretina. Además, a fin de mencionar ejemplos particulares de compuestos indicados arriba, se indicará que se consigue una exaltación muy satisfactoria del poder inhibitor con respecto a la fosfatasa alcalina y de la hialuronidasa con los productos de la fosforilación de la quercetina, de la naringina, de la hesperetina, de la apigenina, de la 4.3.4.6'-tetrahidroxi-calcona, de la 4.3.4'-trihidroxi-calcona, de la 3.2.4.6'-tetrahidroxi-4-metoxi-calcona, de la 4.3.4'-trihidroxi-3-metoxi-calcona, de la 4-metil-floretina y de la 3'-metil-floretina.

Como ejemplo del efecto que se puede conseguir gracias al presente invento, se puede mencionar que la floretina ejerce in vitro una acción inhibitora detectable sobre la fosfatasa alcalina a la dosis de 0,03 mg. por cm³, pero no a dosis menores, en tanto que el producto de la fosforilación de la floretina es todavía eficaz, en las mismas condiciones, a la dosis de 0,00003 mg. por cm³. Con respecto a la hialuronidasa, la floretina es activa a la dosis de 0,03 mg. por cm³ pero no lo es ya a dosis inferiores, en tanto que el compuesto fosforilado inhibe el efecto enzimático a la dosis de 0,00003 mg. por cm³. A una dosis de 0,003 mg. por cm³, se obtiene una inhibición total del efecto enzimático. Los otros compuestos preparables de acuerdo con el invento ejercen una acción análogamente aumentada.

Cuando los compuestos que se han de someter a la fosforilación no llevan más que un solo hidroxilo fenólico libre (es decir, que los otros, si los hay, se encuentran bloqueados, por ejemplo, por causa de una alcoholación o de una

283632



acilación), se supone que los compuestos fosforilados son mono-ésteres. Si hay varios hidroxilos libres durante el curso de la fosforilación, éste o estos otros hidroxilos participan igualmente en la reacción. Por otra parte, se supone que, en muchos casos, se produce una condensación por combinación de un grupo de ácido fosfórico con varios hidroxilos. Como corroboración de esta hipótesis, se ha comprobado que, en muchos casos, la fosforilación efectuada de acuerdo con el invento conducía a productos con molécula más o menos grande. Sucede especialmente así cuando el compuesto que hay que someter a la fosforilación lleva por lo menos tres hidroxilos fenólicos activos. Por regla general, se obtiene el efecto inhibitor de acción enzimática de máxima intensidad con los compuestos de fosforilación de peso molecular mayor. Para un mismo compuesto orgánico y los mismos agentes de fosforilación, es posible formar productos fosforilados de diversas magnitudes moleculares si se interrumpe la reacción a intervalos. Cuanto más tiempo se deja proseguir la reacción, más parece que aumenta el efecto inhibitor frente a los enzimas, a condición, sin embargo, de que el producto de la fosforilación sea todavía soluble en el agua, en álcali diluido o en ambos. No obstante, se puede llevar la reacción hasta la fase en que el producto se hace, no solamente poco soluble en agua o insoluble, sino que se hace también insoluble en álcali diluido. Los compuestos fosforilados que ofrecen interés y se pueden preparar de acuerdo con el invento son los que son solubles en agua y en álcali diluido. Se puede igualmente provocar cambios de magnitud molecular y de solubilidad en el agua, en álcali diluido, o en ambos, modificando el disolvente empleado durante la fos-

283632



forilación o modificando el orden de mezclado, o bien aún, cambiando la cantidad de los agentes de fosforilación empleada. Se supone que estas amplitudes de variaciones son provocadas por la diferencia de actividad del hidroxilo en diversas condiciones.

Normalmente, los compuestos fosforilados que son objeto del invento son insolubles en los disolventes orgánicos tales como alcohol, acetona, y éter etílico, anhidro, aun cuando se presentan excepciones, como se verá por los ejemplos particulares que se darán más adelante. Los compuestos obtenidos contienen aproximadamente de 6 a 12 % de fósforo.

Cuando se han obtenido productos de fosforilación de molécula demasiado grande, se pueden fragmentar por hidrólisis para formar productos solubles.

En los ejemplos que siguen, se han determinado los efectos anti-enzimáticos sobre la fosfatasa alcalina midiendo la acción de un preparado de fosfatasa de riñón sobre fosfato de fenilo y de sodio en presencia de las sustancias consideradas. Para determinar los efectos inhibidores frente a la hialuronidasa, se observa la acción de estas sustancias sobre la hialuronidasa por un método viscosimétrico.

EJEMPLO 1

Se disuelven 1,4 partes de floretina en 10 partes de piridina anhidra. A una temperatura de -10 a -15° , se añade lentamente una solución de 0,8 partes de oxloruro de fósforo en 5 partes de piridina anhidra. Al cabo de 5 a 10 minutos a la temperatura de -10 a -15° , la mezcla de reacción comienza a ponerse turbia y viscosa. Después de otro minuto, se hidroliza con hielo finamente machacado con lo cual se obtiene una solución límpida que contiene un producto bruto

283332



de fosforilación de floretina. Este producto puede purificarse de diversas maneras:

5 a) Se acidula la solución que contiene el producto bruto de fosforilación con ácido clorhídrico, con lo cual precipita un aceite. Se separa el aceite de la fase acuosa y se lava con acetona y con éter. Se disuelve el residuo en una solución acuosa de bicarbonato sódico y, sobre la solución obtenida, se añade ácido clorhídrico, con lo cual resulta un producto sólido.

10 b) Se evapora en vacío la solución obtenida por la hidrólisis y que contiene el producto bruto de fosforilación, después de lo cual se elimina la mayor parte de la piridina por tratamiento con ácido clorhídrico diluido. El residuo semi-sólido se trata con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, con lo cual se disuelve el ácido
15 poli-floretina-fosfórico. La solución obtenida se extrae con éter, luego se añade ácido clorhídrico diluido, lo cual provoca la precipitación de un producto semisólido. Se trata éste primero con acetona, luego con éter y se obtiene así
20 un producto sólido.

El producto sólido que se obtiene, bien sea por la purificación a, o bien por la purificación b, es un polifosfato de floretina, sustancia incolora que se disuelve fácilmente en las soluciones acuosas de bicarbonato y bastante
25 bien en agua; es insoluble en etanol anhidro, acetona anhidra y éter anhidro. Ejerce una acción netamente inhibidora sobre la hialuronidasa y la fosfatasa alcalina a concentraciones de 0,00003 mg. por cm³.

EJEMPLO 2.

30 Se disuelven 0,7 partes de 4.2'.4'.6'-tetrahidróxi-



calcona en 5 partes de piridina anhidra. Se enfría la solución a una temperatura de -10 a -15° y se añade lentamente una solución de 0,4 partes de oxloruro de fósforo en 5 partes de piridina anhidra. Al cabo de 5 minutos, a la temperatura de -10 a -15° , comienza a enturbiarse la solución y, 10 minutos más tarde, se forma un precipitado rojo-pardo. Se hidroliza la mezcla de reacción con hielo finamente machacado, lo cual da una solución que contiene un producto bruto de fosforilación de la 4.2'.4'.6'-tetrahidroxi-calcona.

10 Este producto bruto puede purificarse de diversas maneras:

a) Se añade ácido clorhídrico para acidular la solución y entonces precipita un aceite. Se separa el aceite de la fase acuosa y se lava con acetona y éter. El residuo se disuelve en una solución acuosa de bicarbonato sódico y se añade ácido clorhídrico sobre la solución así obtenida. De este modo resulta un producto sólido.

20 b) Se evapora la solución en vacío, después de lo cual se separa la mayor parte de la piridina por tratamiento con ácido clorhídrico diluido. El residuo semi-sólido se trata con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, con lo cual se disuelve un polifosfato de 4.2'.4'.6'-tetrahidroxi-calcona. La solución obtenida se extrae con éter y después se añade ácido clorhídrico diluido, lo cual provoca la precipitación de un producto semisólido. Se trata éste primeramente con acetona y luego con éter obteniéndose así un producto sólido.

25 El producto sólido obtenido, bien sea por la purificación a o bien por la purificación b es un ácido polifosfato de 4.2'.4'.6'-tetrahidroxi-calcona, sustancia anaranjada que es soluble en el agua y en las soluciones acuosas de

30

28332



-9

bicarbonato y es insoluble en etanol anhidro, acetona anhidra y éter anhidro. Ejerce una acción netamente inhibidora sobre la hialuronidasa y la fosfatasa alcalina a concentraciones de 0,00005 mg. por cm³.

5 EJEMPLO 3.

Se disuelven 1,5 partes de hesperitina en 10 partes de piridina anhidra. A una temperatura de -10 a -15°, se añade lentamente una solución de 0,8 partes de oxloruro de fósforo en 5 partes de piridina anhidra. Al cabo de 5-10 minutos a la temperatura de -10 a -15°, la mezcla de reacción comienza a ponerse turbia y viscosa. Un minuto después se la hidroliza con hielo finamente machacado; se obtiene entonces una solución límpida que contiene un producto bruto de fosforilación de hesperitina. Este producto bruto puede purificarse de diversas maneras.

a) Se acidula la solución añadiendo ácido clorhídrico, con lo cual precipita un aceite. Se separa el aceite de la fase acuosa y se le lava con acetona y éter. Se disuelve el residuo en solución acuosa de bicarbonato sódico y se añade ácido clorhídrico, lo cual da un producto sólido.

b) Se evapora la solución en vacío, después de lo cual se retira la mayor parte de la piridina por tratamiento con ácido clorhídrico diluido. Se trata el residuo semi-sólido con una solución acuosa saturada de bicarbonato y entonces se disuelve el poli-fosfato de hesperetina. Se extrae la solución así obtenida con éter, luego se añade ácido clorhídrico diluido a la fase acuosa, como consecuencia de lo cual precipita un producto semi-sólido. Se le trata primeramente con acetona, luego con éter y se obtiene entonces un producto sólido.

283632



El producto sólido que resulta, bien sea por la purificación a, o bien por la purificación b, es un poli-fosfato de hesperetina. Es una sustancia incolora que se disuelve fácilmente en las soluciones acuosas de bicarbonato, es poco soluble en agua, y es insoluble en etanol anhidro, acetona anhidra y éter anhidro. Ejerce una acción netamente inhibidora sobre la hialuronidasa y la fosfatasa alcalina a concentraciones de 0,001 mg. por cm³.

EJEMPLO 4.

10 Se disuelven 1,3 partes de 4.2'.4'-trihidroxi-calcona en 10 partes de piridina anhidra. A una temperatura de -10 a -15°, se añade lentamente una solución de 0,8 parte de oxicloloruro de fósforo en 5 partes de piridina anhidra. Al

15 cabo de 5 minutos a -10°, la solución comienza a enturbiarse. Al cabo de 5-10 minutos más, se forma un residuo rojo-pardo. Se hidroliza entonces la mezcla de reacción con hielo finamente machacado. Se evapora en vacío la solución así obtenida y se elimina del residuo la mayor parte de la piridina tratándole con ácido clorhídrico diluido. Se trata el

20 residuo semi-sólido con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y se extrae la solución así obtenida con éter. Se añade ácido clorhídrico diluido a la fase acuosa, lo cual precipita un producto semi-sólido que se trata primeramente con acetona y luego con éter. Se obtiene así un

25 producto sólido. Es un poli-fosfato de 4.2'.4'-trihidroxi-calcona, de un color rojo-pardo, soluble en agua, muy soluble en las soluciones acuosas de bicarbonato e insoluble en etanol anhidro, acetona anhidra y éter anhidro. Ejerce una acción netamente inhibidora sobre la hialuronidasa y la

30 fosfatasa alcalina a dosis de 0,0005 mg. por cm³.



EJEMPLO 5.

5 Se disuelven 1,5 partes de quercetina en 10 partes de
piridina anhidra. A una temperatura de -10 a -15° , se añade
lentamente una solución de 0,8 partes de oxiclóruo de fós-
foro en 5 partes de piridina anhidra. Después de 15 minutos
a la temperatura de -10 a -15° , la mezcla de reacción comien-
za a enturbiarse y, 5 minutos más tarde, se forma un preci-
pitado pardo-amarillento. Se hidroliza entonces la mezcla
de reacción con hielo finamente machacado, lo cual da una
10 solución. Se puede precipitar el poli-fosfato de quercetina
añadiendo ácido clorhídrico diluido a la solución acuosa.
Sin embargo, es preferible el método que sigue.

Se evapora en vacío la solución obtenida por hidrólisis y se trata el residuo con ácido clorhídrico diluido. Se
15 obtiene un polvo amarillo que se disuelve en sosa cáustica
diluida. Se extrae la solución varias veces con éter y, a
continuación, se precipita con ácido clorhídrico diluido.
El producto así obtenido es un poli-fosfato de quercetina,
sustancia amarilla que se disuelve fácilmente en las solu-
20 ciones acuosas de bicarbonato y bastante bien en agua, pero
que es insoluble en etanol anhidro, acetona anhidra y éter
anhidro. Ejerce una acción netamente inhibidora sobre la
hialuronidasa y la fosfatasa alcalina a concentraciones de
0,001 mg. por cm^3 .

25 EJEMPLO 6.

Se disuelven 2,74 partes de floretina en 20 partes de
piridina anhidra. A -10° , se añade lentamente una solución
de 0,8 partes de oxiclóruo de fósforo en 10 partes de piri-
dina anhidra. Al cabo de unas dos horas, la solución comien-
za a enturbiarse y, 15 minutos más tarde, se forma un pre-
30



5 cipitado viscoso. A continuación, se hidroliza la mezcla de
 reacción con hielo finamente machacado. Se evapora la solu-
 ción obtenida en vacío, y se trata el aceite que queda con
 ácido clorhídrico diluido. Se obtiene a continuación una
 10 sustancia sólida, incolora, que se separa por filtración y
 se seca. Se elimina de la sustancia sólida la floretina que
 no ha reaccionado y que puede quedar tratando primero con
 acetona y luego con éter. El residuo es un poli-fosfato de
 floretina que se disuelve fácilmente en agua y en las solu-
 ciones de bicarbonato, pero que es insoluble en etanol an-
 hidro, acetona anhidra y éter anhidro. Ejerce una acción
 netamente inhibidora sobre la hialuronidasa y la fosfatasa
 alcalina a concentraciones de 0,00003 mg. por cm³.

EJEMPLO 7.

15 Se disuelven 3,74 partes de floretina en 30 partes de
 quinoleína anhidra. A -10°, se añade lentamente una solución
 de 0,8 partes de oxicloloruro de fósforo en 5 partes de qui-
 noleína anhidra. Se aumenta poco a poco la temperatura de
 la mezcla de reacción hasta 20° y se mantiene así durante
 20 dos horas. A continuación, se enfría esta mezcla a -10° y
 se le añade lentamente una solución de 1,6 partes de ox-
 cloruro de fósforo en 5 partes de quinoleína anhidra. Luego,
 se aumenta otra vez la temperatura de la mezcla de reacción
 y se la mantiene a 20°, hasta que comienza a hacerse semi-
 25 sólida. Esto lleva aproximadamente una hora.

Se enfría la mezcla nuevamente a -10° y se la hidroliza
 con hielo finamente machacado: de este modo se obtiene
 una solución. Se alcaliniza esta solución hasta un pH de
 11 añadiendo una solución de sosa cáustica diluida, después
 30 de lo cual se elimina la quinoleína por extracción repetida



con una mezcla de acetona y de éter (1:3). A la fase acuosa se añade a continuación ácido clorhídrico diluido, lo cual da un precipitado pardo claro. El producto así obtenido es un poli-fosfato de floretina, soluble en los álcalis acuosos diluidos, poco soluble en agua y en el bicarbonato acuoso e insoluble en etanol anhidro, acetona anhidra y éter anhidro. El producto ejerce una acción netamente inhibidora sobre la hialuronidasa y la fosfatasa alcalina a concentraciones de 0,00001 mg. por cm³.

10 EJEMPLO 8.

Se disuelve una parte de naringenina en 10 partes de piridina anhidra. A -10°, se añade lentamente una solución de 0,6 partes de oxicloloruro de fósforo en 5 partes de piridina anhidra. Al cabo de media hora, la solución comienza a enturbiarse. 5 minutos después, se hidroliza la mezcla de reacción con hielo finamente machacado y se obtiene así una solución. La solución se evapora entonces en vacío, después de lo cual se elimina la mayor parte de la piridina por tratamiento con ácido clorhídrico diluido. Se trata el residuo semi-sólido con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, con lo cual se disuelve el polifosfato de naringenina. Se extrae con éter la solución obtenida, después de lo cual se añade ácido clorhídrico diluido a la fase acuosa, precipitando un producto semi-sólido. Se le trata primero con acetona y después con éter. Se obtiene así un producto sólido que es un poli-fosfato de naringenina. Es una sustancia incolora, bien soluble en el bicarbonato acuoso, poco soluble en agua e insoluble en etanol anhidro, acetona anhidra y éter anhidro. Ejerce una acción netamente inhibidora sobre la hialuronidasa y la fosfatasa



alcalina a concentraciones de 0,001 mg. por cm³.

EJEMPLO 9.

Se disuelve 1,1 partes de 3.2'.4'.6'-tetrahidroxi-4-
 metoxi-calcona en 10 partes de piridina anhidra. A -10°,
 se añade lentamente una solución de 0,6 partes de oxiclo-
 ruro de fósforo en 5 partes de piridina anhidra. Al cabo
 de 5 minutos más, a -10°, la solución comienza a enturbiar-
 se. Pasados 10 minutos, se forma un precipitado pardo-roji-
 zo. Se hidroliza entonces la mezcla de reacción con hielo
 finamente machacado obteniéndose una solución. Se evapora
 en vacío y se elimina la mayor parte de la piridina con
 ácido clorhídrico diluido. El residuo está ahora semisólido
 y contiene un poli-fosfato de 3.2'.4'.6'-tetrahidroxi-4-
 metoxi-calcona que se disuelve en una solución acuosa satu-
 rada de bicarbonato sódico. Se extrae la solución obtenida
 con éter y, sobre la fase acuosa, se añade ácido clorhídri-
 co diluido; se provoca así la precipitación de un producto
 semi-sólido. Se le trata con éter, lo cual da un producto
 sólido, en este caso, un poli-fosfato de 3.2'.4'.6'-tetra-
 hidroxi-4-metoxi-calcona. Se trata de una sustancia pardo-
 rojiza, bien soluble en bicarbonato acuoso, soluble en el
 agua e insoluble en etanol anhidro, acetona anhidra y éter
 anhidro. Ejerce una acción netamente inhibidora sobre la
 hialuronidasa y la fosfatasa alcalina a concentraciones de
 0,00005 mg. por cm³.

EJEMPLO 10.

Se disuelve 1 parte de 4.2'.4'-trihidroxi-3-metoxi-
 calcona en 10 partes de piridina anhidra. A -10°, se añade
 lentamente una solución de 0,6 partes de oxiclórico de fós-
 foro en 5 partes de piridina anhidra. Al cabo de 5 minutos



-9

a -10° , la solución comienza a enturbiarse. Pasados 10 minutos más, se forma un precipitado pardo-rojizo. Se hidroliza entonces la mezcla de reacción con hielo finamente machacado y se obtiene así una solución. Se evapora ésta en vacío, después de lo cual se separa la mayor parte de la piridina por tratamiento con ácido clorhídrico diluido. El residuo es ahora semisólido y contiene un poli-fosfato de 4,2',4'-trihidroxi-3-metoxi-calcona. Se le disuelve por tratamiento con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico. Se extrae la solución obtenida con éter y se añade entonces ácido clorhídrico diluido a la fase acuosa. Precipita un producto semi-sólido. Se le trata primero con acetona, después con éter, obteniéndose así un producto sólido que es un poli-fosfato de 4,2',4'-trihidroxi-3-metoxi-calcona. Se trata de una sustancia roja, soluble en agua, muy soluble en el bicarbonato acuoso e insoluble en etanol anhidro, acetona anhidra y éter anhidro. Ejerce una acción netamente inhibitoria sobre la hialuronidasa y la fosfatasa alcalina a concentraciones de 0,0005 mg. por cm^3 .

20 EJEMPLO 11.

Se disuelve una parte de 3'-metil-floretina en 10 partes de piridina anhidra. A -10° , se añade lentamente una solución de 0,6 partes de oxloruro de fósforo en 5 partes de piridina anhidra. A los 15 minutos, a -10° , se forma un precipitado cristalino de cloruro de piridinio. Se eleva poco a poco la temperatura a 20° y se mantiene así durante 15 minutos. Por este procedimiento, la solución se enturbia y el precipitado se transforma en un grumo viscoso. Se hidroliza entonces la mezcla de reacción con hielo finamente machacado. No se forma inmediatamente una so-



lución límpida; el precipitado voluminoso se disuelve poco a poco. Se evapora entonces la solución en vacío y se trata el residuo con ácido clorhídrico diluído. Se obtiene así una sustancia incolora. Se la separa del líquido y se la disuelve en bicarbonato acuoso. Se extrae la solución varias veces con éter y luego se añade ácido clorhídrico. Precipita un producto incoloro. Este producto es un poli-fosfato de 3'-metil-floretina, soluble en bicarbonato acuoso e insoluble en etanol anhidro, acetona anhidra y éter anhidro. Ejerce una acción netamente inhibidora sobre la hialuronidasa y la fosfatasa alcalina a concentraciones de 0,00005 mg. por cm³.

EJEMPLO 13.

Se disuelve una parte de 4-metil-floretina en 10 partes de piridina anhidra. A -10°, se añade lentamente una solución de 0,6 partes de oxicloruro de fósforo en 5 partes de piridina anhidra. Al cabo de 15 minutos a -10°, se forma un precipitado cristalino de cloruro de piridinio. Se eleva poco a poco la temperatura a 20° y se mantiene así durante 15 minutos. Por este procedimiento, la solución se enturbia y el precipitado se transforma en un grumo viscoso. Se hidroliza la mezcla de reacción con hielo finamente machacado. No se obtiene inmediatamente una solución límpida; el precipitado voluminoso se disuelve poco a poco. Se evapora entonces la solución en vacío y luego se trata el residuo con ácido clorhídrico diluído. Se obtiene así una sustancia incolora. Se la separa del líquido y se la disuelve en bicarbonato diluído. Se extrae la solución obtenida con éter, varias veces, y se le añade ácido clorhídrico. Precipita un producto incoloro. Este producto es un poli-fosfato de 4-metil-floretina,



soluble en bicarbonato acuoso e insoluble en etanol anhidro, acetona anhidra y éter anhidro. Ejerce una acción netamente inhibidora sobre la hialuronidasa y la fosfatasa alcalina a concentraciones de 0,00005 mg. por cm³.

5

EJEMPLO 13.

10

Se disuelven 1,5 partes de 2'.4'.6'-tribenzoil-floretina en 10 partes de piridina anhidra. A -10°, se añade lentamente una solución de una parte de oxiclóruo de fósforo en 10 partes de piridina anhidra. Durante varias horas, se mantiene la solución a la temperatura ambiente; a continuación se la enfría y se la hidroliza con hielo finamente machacado. Se evapora entonces en vacío y se trata el residuo con ácido clorhídrico diluído. Por este procedimiento, se obtiene una sustancia incolora que se disuelve en bicarbonato sódico acuoso. Se extrae la solución obtenida con éter y se le añade ácido clorhídrico. Se forma un precipitado. El producto así obtenido es un poli-fosfato de 2'.4'.6'-tribenzoil-4-floretina, sustancia incolora, soluble en bicarbonato acuoso, etanol y acetona, pero insoluble en éter. Tratando esta sustancia con álcalis diluídos, se obtiene un fosfato de 4-floretina que se puede aislar en forma de sal de bario gracias a su gran solubilidad en el agua. La sustancia ejerce una acción netamente inhibidora sobre la hialuronidasa y la fosfatasa alcalina a concentraciones de, aproximadamente, 0,01 mg. por cm³.

15

20

25

EJEMPLO 14.

30

Se disuelven 1,5 partes de 4-hidroxi-2'.4'.6'-tribenzoil-oxi-calcoona en 10 partes de piridina anhidra. Se añade lentamente, a -10°, una solución de una parte de oxiclóruo de fósforo en 10 partes de piridina anhidra. Se mantiene la

283,32



mezcla a la temperatura ambiente durante varias horas; a continuación, se la enfría y se la hidroliza con hielo finamente machacado. Se evapora la solución en vacío y se trata el residuo con ácido clorhídrico diluido. Por este procedimiento, se obtiene una sustancia incolora que se disuelve en bicarbonato sódico acuoso. Se extrae la solución obtenida con éter y se añade ácido clorhídrico, con lo cual se forma un precipitado. El producto es un poli-fosfato de 2'.4'.6'-tribenzoil-oxi-4-calcona, sustancia incolora, soluble en bicarbonato acuoso, pero insoluble en éter. Después de haber tratado esta sustancia con álcalis diluidos, se obtiene un fosfato de 2'.4'.6'-trihidroxil-4-calcona. Las soluciones acuosas de este compuesto son de color naranja. Gracias a su solubilidad tan elevada, se aísla la sustancia, de preferencia bajo forma de sal, por ejemplo la sal de bario. Ejerce una acción netamente inhibidora sobre la hialuronidasa y la fosfatasa alcalina a concentraciones, de aproximadamente, 0,01 mg. por cm³.

20

- N O T A -

Los puntos de invención propia, no nueva, pero no establecida, practicada, ni divulgada en España que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Introducción por DIEZ años, son los siguientes:

- 1.- Un procedimiento de preparación de compuestos con acción anti-enzimática aumentada frente a la fosfatasa alcalina y a la hialuronidasa, según el cual se disuelve una sustancia que tiene por lo menos un hidroxilo fenólico

30

28332



que responde a una de las fórmulas 1 a 4 adjuntas (teniendo las letras la significación siguiente: X designa un átomo de hidrógeno y un hidroxilo, Z, Y, U' y U'' designan cada una un hidroxilo, un grupo aciloxílico o alcohiloxílico o un átomo de hidrógeno, con la reserva de que una sola de las letras Z e Y y una sola de las letras U' y U'' puede representar hidrógeno y V designa un hidroxilo o un grupo aciloxílico o alcohiloxílico) en un disolvente anhidro y capaz de fijar el ácido clorhídrico, se añade oxiclórico de fósforo, se deja la mezcla en reposo a baja temperatura o a una temperatura que va hasta la ambiente se vierte la mezcla de reacción en agua y se aísla el producto de la hidrólisis así obtenido.

2.- Un procedimiento de preparación de compuestos con acción anti-enzimática aumentada.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veinte hojas escritas a máquina por una sola cara.

9 MAR. 1963

Madrid,

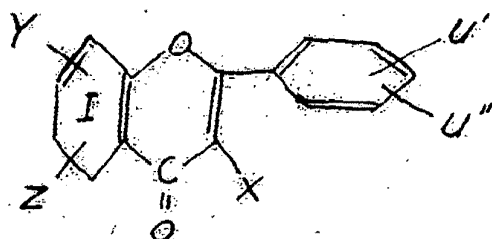
B. A.
 Alberto de Echeburu
 Por Poder

283632

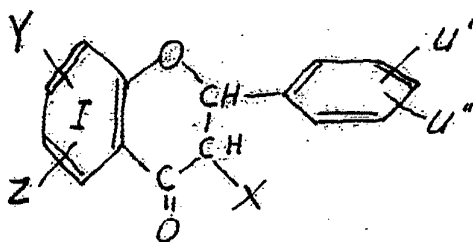
A.F.A.



Förmula 1.

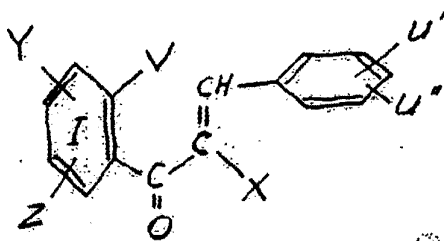


Förmula 2.



283632

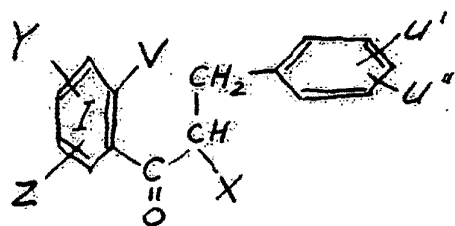
Förmula 3.



283632

283632

Förmula 4.



Alberto de Elzouza
1888