



409190

File 23-7-75

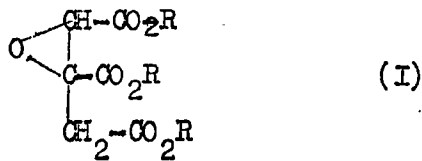
Int. Cl. <sup>2</sup> : C07D11A61K

P A T E N T E  
D E  
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DERIVADOS DEL ACIDO TREC-ÉPOXIACONÍTICO", a favor de la firma suiza F. HOFMANN-LA ROCHE & CIE. S.A., residente en BASILEA (Suiza).

= . =  
MEMORIA DESCRIPTIVA

EL presente invento se refiere a nuevos compuestos de la fórmula



en donde R representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquílico inferior, y sales de los triácidos de la fórmula I.

El invento se refiere, asimismo, a un procedimiento para la preparación de estos compuestos y sales.

5.

10.

409190



DIC. 1972

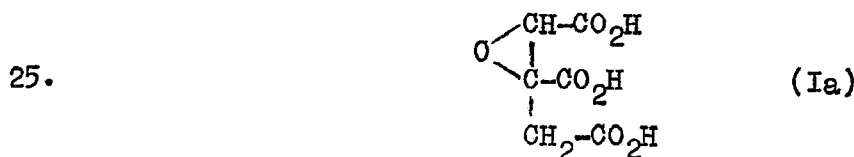
Como se utiliza a través de la descripción, el término "alquilo inferior" significa un grupo de hidrocarburo de cadena recta o ramificada que no contiene insaturación y que tiene hasta e incluye 8 átomos de carbono, tal como

- 5. metilo, etilo, hexilo, isopropilo, tercibutilo, etc. El término "arilo" significará fenilo o naftilo que puede estar substituido con uno de los grupos siguientes: halógeno (es decir, cloro, bromo, yodo o flúor), alquilo inferior, hidroxilo, alcoxi inferior o nitro. El término "alcoxi inferior", significará un grupo de éter alquílico en el que el grupo alquílico es como el descrito antes.

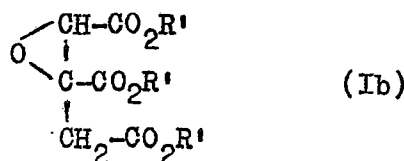
- 15. Los compuestos de la fórmula I, así como las sales farmacéuticamente aceptables de los triácidos de la fórmula I inhiben la síntesis del ácido graso en sistemas biológicos y son útiles en el tratamiento de la obesidad y en las condiciones correctoras de anomalías de los lípidos.

- 20. Las sales farmacéuticamente inaceptables de los triácidos de la fórmula I pueden convertirse, con métodos conocidos, en los compuestos de la fórmula I o en sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la fórmula I anterior comprenden los triácidos de la fórmula



y los triésteres de la fórmula





en donde R' representa un grupo alquílico inferior.

Según el presente invento los compuestos de la fórmula I y sus sales se preparan con un procedimiento que se caracteriza porque se epoxida un compuesto de la fórmula

5. la



10. en donde U' representa un grupo sulfoniloxi de alquilo inferior o un grupo sulfoniloxi de arilo inferior, V' representa un grupo hidroxilo y U, V y W representan, cada uno, un grupo de alcoxi inferior, o U' y V' juntos representan un enlace adicional entre los átomos de carbono adyacentes y U, V y W representan, cada uno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi inferior o U y V juntos representan un átomo de oxígeno y W representa un grupo hidroxilo,
15. porque en la producción de un triéster de la fórmula I se esterifica un triácido obtenido de la fórmula I, porque en la producción de un triácido de la fórmula I se saponifica un triéster obtenido de la fórmula I, porque en la producción de una sal de un triácido de la fórmula I se hace reaccionar dicho triácido con una base y porque en la producción de un antípoda óptico de la fórmula I se resuelve un racemato obtenido en sus antípodas y se aísla el antípoda deseado.
- 20.
- 25.

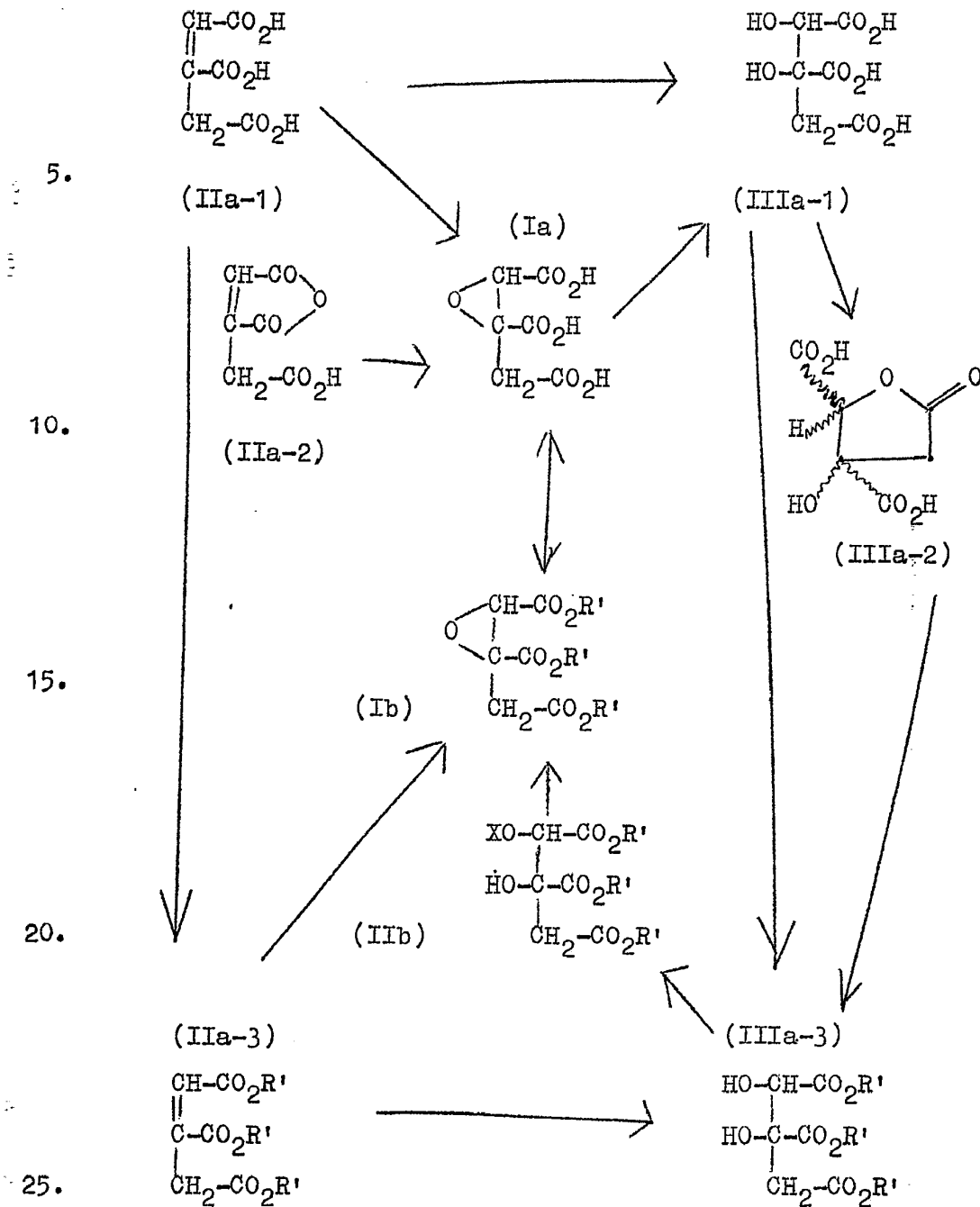
Los compuestos de la fórmula II comprenden los triácidos de la fórmula



409.190



ESQUEMA REACCIONAL A



donde R' es alquilo inferior y X es alquilsulfoni  
lo inferior o arilsulfonilo inferior.

409190

- 6 -



972

- Las fórmulas estructurales antes representadas y las del esquema reaccional A no ilustran la estereoquímica relativa o absoluta de las moléculas particulares. Sin embargo, debe comprenderse que la totalidad de los compuestos aquí descritos existen en dos formas estereoquímicas relativas: una forma cis y una forma trans para compuestos de la fórmula II y una forma treo y una forma eritro para el resto de los compuestos. Para facilitar la descripción de las transformaciones estereoquímicas aquí referidas se ha adoptado la nomenclatura treo y eritro como ha sido definida por Cram y colaboradores, J. Amer. Chem. Soc., vol 74 página 5828 (1952) y por Prelog y colaboradores, Experientia, vol. 12, página 81 (1956). Cada una de estas formas estereoquímicas relativas existe como un racemato y como dos antípodas ópticos, y las fórmulas aquí mostradas significa que incluyen la totalidad de las formas isómeras y antípodas de los compuestos representados.

- El ácido epoxiaconítico, compuesto Ia, puede prepararse por epoxidación de ácido aconítico, compuesto IIa-1.
20. El ácido trans-aconítico proporciona el treo-epóxido y el cis-aconítico proporciona el eritro-epóxido. La epoxidación se realiza apropiadamente utilizando un agente epoxidante. Agentes epoxidantes representativos, útiles para esta reacción, incluyen peróxido de hidrógeno y perácidos. Los perácidos apropiados incluyen ácido persulfúrico, ácido peracético, ácido trifluorperacético, ácido mono-perftálico, ácido perbenzoico, ácido metacloroperbenzoico, etc. Cuando se utiliza peróxido de hidrógeno en calidad de agente epoxidante, se prefiere utilizar un catalizador de epoxidación en conjun -

409190

- 10



- ción con él. Un catalizador de epoxidación particularmente efectivo es el ácido tungstico o una sal del mismo, particularmente una sal de metal alcalino. La epoxidación se realiza de preferencia en un medio acuoso, pero puede emplearse como un diluyente, si se desea, un disolvente orgánico, tal como un alcohol o éter. Alternativamente puede realizarse la epoxidación en un disolvente orgánico inerte, tal como un hidrocarburo, un hidrocarburo halogenado o un éter. La temperatura reaccional esté apropiada en la zona de aproximadamente 0° C a aproximadamente 100°C. Para evitar la transposición de ácido cis-aconítico a ácido trans-aconítico antes de la epoxidación, es generalmente preferido epoxidar el ácido cis entre aproximadamente 20° y 50°. El anhídrido del ácido cis-aconítico, compuesto IIa-2, puede emplearse apropiadamente en lugar del ácido.

- La epoxidación de los ésteres aconíticos de la fórmula IIa-3 a ésteres epóxidos de la fórmula Ib puede realizarse de la misma forma que se ha descrito antes para la conversión de IIa-1 en Ia.

- La interconversión de epóxidos Ia y Ib puede realizarse con procedimientos químicos usuales. Por ejemplo, el triácido epóxido de la fórmula Ia puede esterificarse para formar el triéster epóxido de la fórmula Ib al contactar el citado ácido con un diazo-alquileo tal como diazometano o diazoetano de acuerdo con procedimientos bien conocidos. Inversamente, el triéster de la fórmula Ib puede hidrolizarse para formar el triácido de la fórmula Ia mediante tratamiento con una base.

409190



Bases apropiadas incluyen por ejemplo, hidróxi -  
dos de metal alcalino, por ejemplo hidróxido de sodio; y  
carbonatos o bicarbonatos de metal alcalino, por ejemplo  
5. carbonato sódico o bicarbonato sódico. La hidrólisis puede  
realizarse en un medio alcohólico acuoso a temperaturas que  
alcanzan de aproximadamente 0 a aproximadamente 50°C.

En general no se prefiere hidrolizar el éster eri  
tro-epóxido de la fórmula Ib para formar el ácido eritro-  
10. epóxido correspondiente de la fórmula Ia debido a la relati  
va labilidad de los eritro-epóxidos en comparación con los  
treo-epóxidos correspondientes.

Según se ha descrito antes puede obtenerse un com-  
puesto de la fórmula Ib a partir de un éster sulfonato de  
15. la fórmula IIb mediante tratamiento con una base. Las bases  
apropiadas incluyen, por ejemplo, sales de ácidos alcanol -  
cos inferiores, por ejemplo acetato sódico o propionato  
sódico; hidróxidos de metal alcalino, por ejemplo, hidróxi -  
do sódico; carbonatos de metal alcalino, por ejemplo, carbo-  
20. nato sódico; hidruros de metal alcalino, por ejemplo hidru-  
ro sódico; etc. La elección de los disolventes y de las tem  
peraturas de reacción no es crítica y variará según la natu-  
raleza de la base utilizada. Los disolventes apropiados in-  
cluyen alcanoles inferiores, por ejemplo, metanol o etanol;  
25. hidrocarburos, por ejemplo benceno o tolueno; y similares.  
Cuando se utiliza un alcohol como disolvente se prefiere  
utilizar el alcohol correspondiente a la porción R' del com  
puesto de la fórmula IIb de modo que no se produzca transes-  
terificación. Cuando se utiliza una base más fuerte que un

409190

- 9 -

409190



- alcóxido, se prefiere utilizar un disolvente aprótico como el benceno o el tolueno, de modo que no se produzca reacción entre la base y el disolvente. Las combinaciones apropiadas de bases y disolventes incluyen, por ejemplo, hidruro sódico en benceno, acetato sódico en metanol, etc. La temperatura reaccional puede estar comprendida entre 20° aproximadamente y 150°C aproximadamente. Puede utilizarse una temperatura reaccional inferior cuando se utilice una base más fuerte y viceversa. Esta reacción de eliminación se produce con la inversión de configuración. Así pues, treomesilato proporciona eritro-epóxido y eritro-mesilato proporciona treo-epóxido.

Los materiales de partida de la fórmula IIa son compuestos conocidos.

15. Los materiales de partida de la fórmula IIb son compuestos nuevos.

- Un método posible para la preparación de los compuestos de la fórmula IIb envuelve, como una primera etapa, la cis-hidroxiación de un éster aconítico IIa-3. La reacción de cis-hidroxiación puede realizarse al utilizar un peróxido en presencia de un catalizador de hidroxiación. Un peróxido especialmente preferido es el peróxido de hidrógeno. Un catalizador de hidroxiación especialmente preferido es el tetróxido de osmio. El catalizador puede emplearse en pequeña cantidad en comparación con el sustrato a ser hidroxiado, por ejemplo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25 moles por ciento. Aproximadamente se prefiere 0,1 mol por ciento de catalizador de hidroxiación. La hidroxiación se realiza apropiadamente en un di-

409190

- 10 -



- solvente o mezcla de disolventes acuosos cualesquiera, Cuando se utiliza tetróxido de osmio en calidad de catalizador de hidroxilación, se prefiere en general tratar la mezcla reaccional con un agente reductor antes de la elaboración.
5. Los agentes reductores apropiados incluyen sulfito sódico, bisulfito sódico, tiosulfato sódico, etc. La temperatura reaccional de la reacción de hidroxilación puede estar en la zona de aproximadamente 0° a aproximadamente 100°C. Por ejemplo, si se utiliza un éster trans-aconítico de la fórmula IIa-3, se produce entonces un treo-diol de la fórmula IIIa-3.

- En una segunda etapa el grupo de hidroxilo secundario del diol de la fórmula IIIa-3 puede entonces ser funcionalizado selectivamente para formar un grupo partiente
15. OX apropiado, en donde X es alquilo inferior-sulfonilo o aril-sulfonilo mediante reacción con el haluro de sulfonilo apropiado. De este modo se obtiene un compuesto de la fórmula IIb. Haluros de sulfonilo apropiados incluyen el cloruro de metansulfonilo, el cloruro de p-toluensulfonilo, el cloruro de p-bromobencensulfonilo, el cloruro de p-nitro
20. bencensulfonilo, etc. Se prefiere en particular el cloruro de metansulfonilo, en cuyo caso, el compuesto de la fórmula IIb es un éster de metansulfonato (mesilato). La esterificación se realiza apropiadamente en presencia de una base. Bases preferidas son las aminas orgánicas, por ejemplo
25. la piridina, la trietilamina, etc. Un exceso de la amina puede servir en calidad de disolvente reaccional, o un disolvente orgánico inerte puede servir en calidad de diluente. Diluentes apropiados incluyen hidrocarburos, por ejemplo

409190



C. 1972

- el benceno o el tolueno; éteres, por ejemplo el éster etílico o el tetrahidrofurano; hidrocarburos clorados, por ejemplo el cloruro de metileno; etc. La temperatura de la reacción de esterificación puede hallarse en la gama de
5. aproximadamente  $-20^{\circ}$  a aproximadamente  $50^{\circ}\text{C}$ . Se prefiere una zona de temperatura de aproximadamente  $0^{\circ}$  a aproximadamente  $20^{\circ}\text{C}$ . En la reacción de esterificación no existe cambio en estereoquímica en el carbono que comporta el hidroxilo secundario. Así el treo-diol proporciona el treo-mesilato y el eritro-diol proporciona el eritro-mesilato.
- 10.

Un método alternativo para la preparación de un compuesto de la fórmula IIIa-3 incluye, como una primera etapa, la preparación de un compuesto de la fórmula IIIa-1 mediante cis-hidroxilación de un compuesto de la fórmula IIA-1 o disociación de un compuesto de la fórmula Ia.

15.

La cis-hidroxilación citada de un compuesto IIA-1 puede llevarse a cabo de igual modo que se ha descrito antes para la conversión de un triéster aconítico IIA-3 a un diol IIIa-3.

20. La conversión de Ia a IIIa-1 puede llevarse a cabo mediante disociación acuosa del epóxido en presencia de ácido o de una base. Por lo general, el ácido hidroxí-cí-trico IIIa-1 se convierte en la gamma-lactona IIIa-2 en la mezcla reaccional durante la elaboración.

25. Bases apropiadas incluyen los hidróxidos de metales alcalinos, por ejemplo el hidróxido de sodio. Como se ha indicado anteriormente, la reacción de hidrólisis se realiza en un medio acuoso. La temperatura reaccional puede variar de aproximadamente  $20$  a unos  $150^{\circ}\text{C}$ . En general,

409190

409190



se prefiere una temperatura reaccional de aproximadamente 50 a unos 100°C.

5. Un epóxido de la fórmula Ia puede asimismo disociarse al calentarlo sólo en un medio acuoso; es decir, el propio ácido epóxido sirve como el catalizador ácido. La temperatura reaccional para esta disociación autocatalizada puede hallarse en la zona de aproximadamente 20° a unos 150° aunque se prefiero en general una temperatura de aproximadamente 50 a unos 100°C. Se prefiere realizar la disociación del treo-epóxido bajo condiciones básicas, y la disociación del eritro-epóxido bajo condiciones ácidas.

Entonces puede prepararse un diol IIIa-3 mediante esterificación de un ácido hidroxí-cítrico IIIa-1.

15. Alternativamente, puede prepararse un diol IIIa-3 a partir de gamma-lactona de ácido hidroxí-cítrico de la fórmula IIIa-2 por alcanolisis del anillo de lactona y esterificación concomitante de los grupos carboxílicos. En esta reacción, la gamma-lactona se trata con el alcohol deseado, R'OH, en donde R' tiene la significación anterior, en presencia de un ácido. En un procedimiento preferido, el alcohol sirve como un disolvente reaccional, aunque puede utilizarse cualquier disolvente orgánico inerte en calidad de diluente. Los ácidos apropiados incluyen los ácidos minerales, por ejemplo el ácido clorhídrico o el ácido sulfúrico; el ácido sulfónico orgánico, por ejemplo el ácido p-toluensulfónico; etc. La temperatura reaccional puede darse en la zona de aproximadamente 50 a unos 100°C. Se puede utilizar una fuente de ácido mineral en lugar de un ácido mineral en esta reacción, por ejemplo, un haluro de ácido, tal



como cloruro de acetilo puede adicionarse a la mezcla reaccional que contiene el disolvente de alcohol para generar in situ cloruro de hidrógeno.

- Los compuestos ópticamente activos de las fórmulas
5. I, IIIa-1, IIIa-3 y IIb pueden prepararse en una variedad de formas. En un caso, pueden resolverse directamente con - puestos de la fórmula Ia. Un procedimiento de resolución envuelve la cristalización fraccionada de las sales del compuesto Ia con una base ópticamente activa, por ejemplo, una
10. amina ópticamente activa. Una amina especialmente preferida para efectuar la resolución de compuestos de la fórmula Ia es la cinconidina.

- Alternativamente, puede resolverse un diol IIIa-3 o un éster sulfonato IIb. Asimismo, pueden prepararse pro -
15. ductos ópticamente activos partiendo de un ácido hidroxici- trico ópticamente activo de la fórmula IIIa-1 o su gamma- lactona de la fórmula IIIa-2.

- Los compuestos de la fórmula I son útiles para in- hibir la síntesis de ácido graso en sistemas biológicos. Los
20. sistemas biológicos en los cuales pueden utilizarse los compuestos de la presente invención incluyen aquellos que contienen enzima que disocia citrato. Los sistemas biológi- cos preferidos son los mamíferos, particularmente los mamí- feros no rumiantes.

25. La inhibición de la síntesis de ácido graso en sistemas biológicos, mediante el uso de los compuestos de la presente invención se cree que proviene de la inhibición de la enzima que disocia citrato contenida en tales sistemas. La disociación del citrato es catalizada por la enzima que

409190

- 14 -



disocia citrato de acuerdo con la estequiometría: citrato + CoA + ATP  $\longrightarrow$  acetilo - CoA + oxaloacetato + ATP + P<sub>i</sub>.

- En la conversión de carbohidratos y varios amino - ácidos para el engorde de mamíferos no rumiantes, el citrato es la fuente mayor de la co-enzima acetilica A que se utiliza para la síntesis de los ácidos grasos. El citrato se forma en la mitocondria mediante la reacción de síntesis del citrato. Luego se metaboliza vía el ciclo de ácido cítrico. Bajo condiciones, cuando la producción de energía excede la demanda de energía, se desvia algo de citrato al espacio extra-mitocondrial de la célula donde se utiliza para la síntesis de ácido graso, es decir, para almacenado de energía. Los nuevos compuestos de la fórmula I de la presente invención son así útiles en el tratamiento de obesidad y en la corrección de anomalías de los líquidos. Los epóxidos de la fórmula Ia pueden asimismo utilizarse en la forma de sus sales básicas no-tóxicas, aceptables farmacéuticamente. Las sales preferidas para este propósito incluyen los metales alcalinos, por ejemplo sodio o potasio; los metales alcalinotérreos, por ejemplo el calcio; o las sales complejas, tal como las sales del amonio o de amonio substituido, tal como una sal mono- o di- ó tri-alquilamónica o una sal mono-, di- ó tri-hidroxi-alquilamónica. Los compuestos pueden elaborarse en la forma de preparaciones farmacéuticas convencionales; por ejemplo, los compuestos antes citados pueden mezclarse con vehículos orgánicos o inorgánicos, farmacéuticamente inertes, apropiados para la administración parentérica o entérica, tal como, por ejemplo, agua, gelatina, lactosa, almidón, estearato magnésico, talco, aceite ve-
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.



1972

- getal, gomas o similares. Pueden administrarse en formas farmacéuticas convencionales, por ejemplo, formas sólidas, por ejemplo, tabletas, cápsulas, grageas, supositorios, o similares; o en formas líquidas, por ejemplo, soluciones, suspensiones o emulsiones. Además, las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de esta invención pueden someterse a los expedientes farmacéuticos convencionales, tal como esterilización, y pueden contener excipientes farmacéuticos convencionales, tal como agentes preservantes, estabilizantes, emulsionantes, sales para el ajuste de la presión osmótica o amortiguadores. Las composiciones pueden contener asimismo otros materiales terapéuticamente activos.
- 5.
- 10.

- Una unidad de dosificación farmacéutica apropiada puede contener de aproximadamente 15 a 600 mg del compuesto antes citado.
- 15.

- Los regímenes de dosificación parentérica apropiados en mamíferos comprenden de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg por día. Sin embargo, para cualquier sujeto particular, pueden ajustarse los regímenes de dosificación específicos de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de los compuestos arriba citados. Debe comprenderse que las dosificaciones aquí expresadas son solamente a título de ejemplo; no limitando, en ninguna extensión, el objeto o la práctica de la invención.
- 20.
- 25.

La presente invención puede ilustrarse más claramente mediante los ejemplos que siguen. Todas las temperaturas están indicadas en grados centígrados.

409190

409190



EJEMPLO 1.-

Preparación del ácido ( $\pm$ )-treo-1,2-epoxi-1,2,3-propantricarboxílico /ácido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico/

5. Se agita a 85° por 2 horas una solución de ácido trans-aconítico (10 g) y ácido tungstico (2,0 g) en solución de hidróxido de sodio 1N (143 cc) conteniendo peróxido de hidrógeno (30%; 6 cc). La solución se enfría, se adiciona ácido clorhídrico 10N (15,5 cc) y luego se extrae exhaustivamente con éter utilizando un extractor líquido-líquido.
10. La evaporación de la capa etérea proporciona un sólido blanco que al cristalizar en éter-cloruro de metileno da el epóxido, punto de fusión 167-169°C. Se aísla una segunda recolección, de punto de fusión 159-164° a partir de los licores madre. El espécimen puro analíticamente se
15. obtiene del mismo sistema disolvente, punto de fusión 168-170°C.

EJEMPLO 2.-

1) Resolución de ácido ( $\pm$ )-treo-1,2-epoxi-1,2,3-propantricarboxílico /ácido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico/

20. Se calienta a reflujo una solución de ácido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico (3,0 g) en metanol (120 cc). A la solución hirviente se adiciona cinconidina (9,0 g) seguido por acetato de etilo (250 cc) y se continua el calentamiento hasta que se inicia la cristalización de la sal. La solución se deja enfriar y se recoge por filtración la sal de cinconidina y se lava con acetato de etilo (20 cc) (recolección A). El filtrado se concentra y se obtienen dos recolecciones adicionales de material cristalino (recolección B y C). Los licores madre se evaporan hasta sequedad bajo pre-
- 25.

409190



1972

si3n reducida para dar un s3lido blanco (recolecci3n D). Las recolecciones A y D se procesan como se indica m3s abajo. Las recolecciones B y C se combinan para el reciclado.

(2) Preparaci3n del 3cido (+)-treo-epoxiacon3tico.-

- 5. La recolecci3n A se dispersa en cloroformo y se extrae con soluci3n de hidr3xido de sodio 1N (1 x 25 cc; 1 x 10 cc). Los extractos b3sicos combinados se lavan con cloroformo (2 x 10 cc), luego se acidifican con 3cido clorh3drico 1N (36 cc) y se concentra bajo presi3n reducida. El residuo
- 10. resultante se extrae con acetato de etilo caliente y el cloruro de sodio residual se elimina por filtraci3n. El filtrado se concentra bajo presi3n reducida y la cristalizaci3n del producto en acetato de etilo-tetracloruro de carbono da el ep3xido como un solvato de tetracloruro de carbono.
- 15. El secado al aire proporciona el treo-ep3xido dextrogiro como el monohidrato, punto de fusi3n 108-1123;  $[\alpha]_D^{25} + 63,1^2$  (c, 1,0, H<sub>2</sub>O).

(3) Preparaci3n del 3cido (-)-treo-epoxiacon3tico.-

- 20. La recolecci3n D se dispersa en cloroformo (40 cc) y se extrae con dos porciones (35 cc y 15 cc) de soluci3n de hidr3xido de sodio 1N. Los extractos acuosos combinados se lavan con cloroformo (2 x 10 cc), luego se acidifican con 3cido clorh3drico 1N (51 cc) y se evapora hasta sequedad bajo presi3n reducida. La trituraci3n del residuo con acetato de etilo y la evaporaci3n de los extractos dan un
- 25. aceite que en la cristalizaci3n fraccional en acetato de etilo-tetracloruro de carbono proporciona el ep3xido levogiro solvatado. Despu3s de secado al aire, el monohidrato ten3a el punto de fusi3n de 108-1123;  $[\alpha]_D^{25} - 62,5^2$

409190



(c, 1,0, H<sub>2</sub>O).

(4) Preparación de gamma-lactona del ácido (+)-eritro-hidroxicítrico. (ácido de Hibiscus) a partir de ácido (+)-treo-epoxiaconítico.-

- 5. Una solución del epóxido dextrogiro preparado como en el párrafo 2 (1,9 g : 30 miliequivalentes) en hidróxido de sodio 1N (30 cc) se refluje bajo nitrógeno por tres días, luego la mezcla reaccional se enfría a 80° y se adiciona rápidamente con agitación una solución de cloruro de calcio (2,6 g) en agua (5 cc). El precipitado blanco resultante se recoge por filtración y se lava a fondo con agua, luego se disuelve en la cantidad mínima de ácido clorhídrico 1N (15 cc). La solución se pasa a través de una columna de resina intercambiadora catiónica. Los eluentes ácidos se evaporan hasta sequedad y luego el residuo se calienta en un baño de vapor para inducir a la cristalización para dar lactona esencialmente pura. El residuo se disuelve en acetato de etilo y la solución amarillo pálida se decolora con carbón vegetal. Dos cristalizaciones en acetato de etil-tetracloruro de carbono proporcionan ácido de hibiscus analíticamente puro, punto de fusión 187-188°;  $[\alpha]_D^{25} + 109°$  (c, 1,0, H<sub>2</sub>O), idéntico con material auténtico.
- 10.
- 15.
- 20.

EJEMPLO 3.-

Preparación del ácido (±)-eritro-1,2-epoxi-1,2,3-propantricarboxílico [ácido (±)-eritro-epoxiaconítico]

25.

Una solución de ácido tungstico (1,3 g) en peróxido de hidrógeno (30%; 6,6 cc) se adiciona a anhídrido cis-aconítico (10,1 g) en agua (115 cc) y la mezcla reaccional agitada se sitúa en un baño de aceite calentado previamente a



- 40°. La reacción se mantiene a esta temperatura por 90 minutos, luego se sitúa en un extractor líquido-líquido y se extrae continuamente con éter. La concentración del extracto obtenido después de 5,5 horas da un aceite. La cristalización
5. fraccionada (acetato de etilo-tetracloruro de carbono) de este material da el eritro-epóxido, de punto de fusión 176-178°, y una segunda recolección, de punto de fusión 168-172°. El material obtenido de la extracción continúa durante la noche proporciona epóxido adicional, de punto de fusión 173-176°.
10. El (+)-eritro-epóxido puro se obtiene por cristalización en acetato de etilo-tetracloruro de carbono, de punto de fusión 175,5-178°.

EJEMPLO 4.-

15. Preparación del éster trimetílico del ácido (+)-eritro-1,2-epoxi-1,2,3-propantricarboxílico / éster trimetílico del ácido (+)-eritro-epoxiaconítico

- Una solución del éster trimetílico del ácido (+)-treo-1-mesiloxi-2-hidroxi-1,2,3-propantricarboxílico (56,0 g) en metanol (800 cc) conteniendo acetato de sodio (28,0 g) se
20. refluye durante 100 minutos y luego se enfría a temperatura ambiente. Un precipitado copioso que se ha formado durante la reacción se separa por filtración y se descarta y el filtrado se concentra bajo presión reducida. El residuo se recoge con cloroformo y la solución se lava consecutivamente con
25. salmuera y solución diluida de bicarbonato sódico. La capa orgánica ( $MgSO_4$ ) seca se evapora bajo presión reducida y el aceite resultante cristaliza en éter-hexano para dar el epóxido, de punto de fusión 54-57°. El epóxido analíticamente puro se obtiene de éter-hexano, de punto de fusión 55-57°.

409190

- 20 -

409190



El éster trimetílico del ácido ( $\pm$ )-treo-1-metiloxi-2-hidroxi-1,2,3-propantricarboxílico utilizado en el procedimiento anterior puede prepararse como sigue :

a) Preparación del aconitato de trans-trimetilo.

5. Se adiciona cloruro de acetilo (100 cc) a una solución enfriada de ácido trans-aconítico (100 g) en metanol (1.500 cc). La solución se refluje durante 3,5 horas, luego se enfría a temperatura ambiente. Se adiciona piridina suficiente (86 cc) para neutralizar la mezcla reaccional, luego se elimina la mayor parte del disolvente bajo presión reducida. El aceite resultante se disuelve en cloruro de metileno y la solución se lava consecutivamente con solución diluida de ácido clorhídrico, agua, solución diluida de bicarbonato sódico y finalmente agua. El extracto de cloruro de metileno se seca ( $MgSO_4$ ) y se concentra bajo presión reducida para dar el éster trimetílico en forma de un aceite amarillo pálido. Este material se destila bajo presión reducida para proporcionar el triéster como un líquido incoloro (punto de ebullición 110-112°; 0,6 mm).

20. b) Preparación del éster trimetílico del ácido ( $\pm$ )-1,2-dihidroxi-1,2,3-propantricarboxílico.

25. A una solución de aconitato de trans-trimetilo (57 g) en acetona (300 cc) y agua (75 cc) se adiciona una solución de tetróxido de osmio en acetona (1%; 7,5 cc) seguido por peróxido de hidrógeno (30%; 37 cc). La solución agitada se lleva a reflujo y se mantiene a esta temperatura durante 4 horas. La mezcla reaccional se enfría y se deja durante la noche a temperatura ambiente, luego se adiciona suficiente bisulfito sódico (1 g) aproximadamente, para des-



cargar el oxidante restante. El disolvente se elimina bajo presión reducida y el aceite residual se disuelve en agua (300 cc) y se extrae con éter (4 x 250 cc). Las capas de éter se lavan por contracorriente a su vez con agua (100 cc).

5. Se disuelve cloruro de sodio (130 g) en las capas acuosas combinadas que se extraen luego con cloruro de metileno (5 x 300 cc). Los extractos combinados de cloruro de metileno se secan ( $MgSO_4$ ) y se evaporan para dar un aceite viscoso. La cristalización del aceite en éter-hexano proporciona 29,3 g del ( $\pm$ )-treo-diol, de punto de fusión 74-76°.
10. Se obtiene la muestra analítica de la propia mezcla de disolvente, de punto de fusión 75-76°.

c) Preparación del éster trimetílico del ácido ( $\pm$ )-treo-1-mesiloxi-2-hidroxi-1,2,3-propantricarboxílico.

15. Se adiciona cloruro de metansulfonilo (4,5 cc; 57 milimoles) a una solución enfriada (5°) del ( $\pm$ )-treo-diol preparado como se ha indicado antes (12,0 g; 48 milimoles) en piridina (100 cc) y la mezcla se mantiene a 0-5° durante dos horas. Luego se adicionan varios pedacitos de
20. hielo a la mezcla reaccional y después de 5 minutos se vierte en una mezcla de hielo-agua (500 cc), que contiene ácido clorhídrico concentrado (110 cc). La solución ácida amarillo pálido se extrae con cloruro de metileno (3 x 200 cc) y las capas orgánicas se lavan consecutivamente con salmuera y con una solución saturada de bicarbonato sódico. Los
25. extractos de cloruro de metileno ( $MgSO_4$ ) secos se decoloran (carbón vegetal) y luego se evaporan hasta sequedad. La cristalización del residuo en cloruro de metileno-hexano da cristales amarillo pálido, de punto de fusión 92-94°.

409190

409190



El mesilato analíticamente puro se obtiene por cristalización en acetato de etilo-hexano, de punto de fusión 91-93°.

EJEMPLO 5.-

Preparación del éster trimetílico del ácido ( $\pm$ )-treo-1,2-epo-

5. xi-1,2,3-propantricarboxílico /éster trimetílico del ácido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico/.

- Se adiciona cuidadosamente cloruro de acetilo (20 cc) a una solución de ácido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico (20 g) en metanol (400 cc) previamente enfriada por medio de un baño de hielo-agua. La solución se refluje durante una hora, luego se enfría y se adiciona suficiente piridina (25 cc) para neutralizar la mezcla reaccional. El disolvente se elimina bajo presión reducida y el aceite resultante se divide utilizando cloruro de metileno y agua. La capa de cloruro de metileno se lava con salmuera, solución de ácido clorhídrico 0,5 N y finalmente solución diluída de bicarbonato sódico. Las capas acuosas se lavan a contracorriente a su vez con cloruro de metileno, luego los extractos orgánicos combinados se secan ( $MgSO_4$ ) y se concentran bajo presión reducida para dar un aceite viscoso. La cristalización del producto crudo en éter-hexano proporciona epóxido esencialmente puro, de punto de fusión 34°. La muestra analítica se obtiene del mismo disolvente, de punto de fusión 38-40°.

EJEMPLO 6.-

25. Método alternativo para la preparación del éster trimetílico del ácido ( $\pm$ )-treo-1,2-epoxi-1,2,3-propantricarboxílico /éster trimetílico del ácido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico/.

Este compuesto puede prepararse a partir del éster trimetílico del ácido ( $\pm$ ) eritro-1-mesiloxi-2-hidroxi-1,2,3-

409190



-propantricarboxílico, en forma análoga a la descrita en el ejemplo 4.

El ( $\pm$ )-eritro-mesilato así utilizado puede prepararse como sigue :

5. a) Preparación del éster trimetílico del ácido( $\pm$ )-eritro-1,2-dihidroxí-1,2,3-propantricarboxílico.

A una solución de gamma-lactona del ácido ( $\pm$ )-eritro-hidroxicítrico (21 g) en metanol (400 cc) se adiciona cloruro de acetilo (21 g). La solución se lleva a reflujo y se mantiene a esta temperatura durante 90 minutos, luego se enfría y se deja por la noche a temperatura ambiente. Se adiciona piridina suficiente (19 cc) para neutralizar la mezcla reaccional, luego se elimina el disolvente bajo presión reducida. El jarabe resultante se disuelve en agua (350 cc) y la solución se extrae con éter (5 x 100 cc). Los extractos de éter se lavan a contracorriente a su vez con agua (2 x 100 cc); Se disuelve cloruro de sodio (125 g) en las capas acuosas combinadas y la solución se extrae con cloruro de metileno (1 x 350 cc; 3 x 125 cc). Los extractos de cloruro de metileno se lavan consecutivamente con salmuera y con solución saturada de bicarbonato sódico. Los extractos de cloruro de metileno ( $MgSO_4$ ) secos se concentran bajo presión reducida para dar el éster trimetílico en forma de aceite viscoso.

25. b) Preparación del éster trimetílico del ácido( $\pm$ )-eritro-1-mesiloxi-2-hidroxí-1,2,3-propantricarboxílico.

( $\pm$ )-eritro-diol (23,7 g) crudo preparado como se ha descrito antes, se disuelve en piridina (200 cc) y a la solución enfriada (5°) se adiciona cloruro de metansulfonilo

409190

- 24 -



- (7,2 cc). La mezcla reaccional se almacena a 0-5° durante 150 minutos, luego se vierte en una mezcla de hielo-agua (1 litro) conteniendo ácido clorhídrico concentrado (210 cc). La solución roja resultante se extrae con cloruro de metileno (4 x 200 cc) y luego las capas orgánicas se lavan a su vez con salmuera y con solución saturada de bicarbonato sódico. Los extractos de cloruro de metileno combinados se secan ( $MgSO_4$ ) luego se decoloran (carbón vegetal) y se concentran bajo presión reducida para dar un aceite amarillo pálido. La trituración del residuo con éter proporciona mesilato crudo que al recristalizar en cloruro de metileno-hexano proporciona 21,7 g de material puro, de punto de fusión 104-106°.

EJEMPLO 7.-

15. El éster trimetílico del ácido  $\pm$  eritro-1,2,epoxi-1,2,3-propantricarboxílico, se prepara a partir de ( $\pm$ )-treo-mesilato, como se ha descrito en el ejemplo 4.

20. Este treo-mesilato puede prepararse a partir de gamma-lactona del ácido ( $\pm$ )-treo-hidroxicítrico de modo análogo al descrito en el párrafo a) y b) del ejemplo 6.

La lactona así utilizada puede prepararse como sigue :

25. Una solución del eritro-epóxido preparada como en el ejemplo 3 (190 mg) en agua (3 g) se calienta en un baño de vapor durante 4,5 horas. El disolvente se separa bajo presión reducida y el residuo oleoso se calienta en un baño de vapor durante 30 minutos para dar 190 mg de gamma-lactona del ácido ( $\pm$ )-treo-hidroxi-cítrico.

Se esterifica una pequeña cantidad utilizando



409190

diazometano en éter. El examen del éster resultante mostró que era éter dimetílico de gamma-lactona del ácido ( $\pm$ )-treo-hidroxi-cítrico esencialmente puro.

- Método alternativo para la preparación de gamma-lactona de ácido ( $\pm$ )-treo-hidroxi-cítrico a partir de ácido trans-aconítico.
- 5.

- Se disuelve ácido trans-aconítico (50 g) en agua (280 cc) que contiene peróxido de hidrógeno (30%; 31 cc). A esta mezcla se adiciona una solución de tetróxido de osmio en n-butanol (0,5%; 12 cc) y la mezcla reaccional se agita a temperatura ambiente por 66 horas (después de 48 horas, se adicionan 7 cc complementarios de peróxido de hidrógeno). Tras completado de la reacción, se calienta la solución en un baño de vapor para destruir el exceso de oxidante y luego se elimina el disolvente
- 10.
- 15.
- bajo presión reducido. El residuo oleoso resultante, que contiene ácido ( $\pm$ )-treo-hidroxicítrico se calienta en un baño de vapor bajo vacío elevado para asegurar la lactonización gradual del producto que es indicada
- 20.
- por una solidificación gradual del residuo. La cristalización de este material en acetato de etilo-tetracloruro de carbono proporciona 24,0 g de la lactona, de punto de fusión 171°. La concentración del agua madre proporcionan 3,4 g adicionales de material, de punto de fusión 169°. La recristalización en el mismo sistema disolvente proporciona la muestra analítica, de punto de fusión 172°.
- 25.

Resolución de gamma-lactona de ácido ( $\pm$ )-treo-hidroxicítrico  
co

409190

- 25 -



972

Una solución de la lactona racémica (1,0 g) en agua (30 cc) se calienta hasta ebullición y luego se adiciona cinconina finamente pulverizada (2,7 g) hasta que ya no se disuelve. La solución se diluye a unos 50 cc y luego se filtra caliente. El filtrado se concentra a unos 30 cc, se deja enfriar a temperatura ambiente y el precipitado cristalino resultante (recolección nº 1; 1,5 g) se recoge por filtración y se seca. El filtrado se trata como anteriormente con una porción adicional de cinconina (300 mg) y al enfriar deposita rápidamente una segunda recolección de material cristalino (recolección nº 2; 0,2 g). Al reposar por la noche, el filtrado no proporciona ninguna recolección subsiguiente hasta que se induce la cristalización por raspado. Por consiguiente se forma un precipitado voluminoso y se recoge por filtración para proporcionar 1,4 g de recolección nº 3.

La recolección nº 1 (1,5 g) se fija en cloroformo (150 cc) y se extrae con 60 cc de solución de hidróxido de sodio 0,2 N. La capa acuosa se lava con cloroformo y luego se pasa a través de una resina intercambiadora de cationes (Amberlite IR 120, 12 cc). El eluyente ácido se concentra bajo presión reducida para proporcionar 340 mg de lactona cristalina. La cristalización en acetato de etilo-tetracloruro de carbono proporciona 210 mg de la gamma-lactona de ácido (-)-treo-hidroxicitrico, de punto de fusión 176-178°;  $[\alpha]_D^{25} + 103,9^\circ$  (c, 1,0, H<sub>2</sub>O). Este material es idéntico al "ácido de garcinia" natural.

El tratamiento de la recolección nº 3 en una forma similar proporciona 320 mg de lactona levogiro cruda que



al cristalizar proporciona 180 mg de la gamma-lactona de ácido (+)-treo-hidroxicitrico, de punto de fusión 175-178°;  $[\alpha]_D^{25} -102,8^\circ$  (c, 1,0, H<sub>2</sub>O).

EJEMPLO 8.-

5. Preparación del éster trimetílico del ácido 1(R), 2(S)-1,2-epoxi-1,2,3-propantricarboxílico /éster trimetílico del ácido (-)-eritro-epoxiaconítico/.

- Una solución del éster trimetílico del ácido 1(S), 2(S)-1-mesiloxi-2-hidroxi-1,2,3-propantricarboxílico /(-)-treo-mesilato/ (15 g) en metanol (200 cc) que contiene acetato de sodio se agita bajo reflujo durante 2 horas. La mezcla reaccional se enfría y la mayor parte del metanol se evapora bajo presión reducida. El residuo se recoge en cloroformo y la solución de cloroformo se lava consecutivamente con salmuera, solución de bicarbonato de sodio y finalmente con salmuera. La capa orgánica se seca y se evapora bajo presión reducida para dar un aceite. La cristalización del producto en éter da el epóxido, de punto de fusión 64-65°. El mismo disolvente proporciona la muestra pura analíticamente, de punto de fusión 64-65°;  $[\alpha]_D^{25} - 34,6^\circ$  (c, 1,07, CH<sub>3</sub>OH).

El (-)-treomesilato utilizado en el procedimiento anterior puede obtenerse como sigue:

- a) Preparación del éster trimetílico del ácido (-)-treo-1,2-dihidroxi-1,2,3-propantricarboxílico.

25. A una solución enfriada de gamma-lactona del ácido (+)-treo-hidrocitrónico (ácido de "garcinia"; 10 g) en metanol (200 cc) se adiciona cloruro de acetilo (10 cc). La solución se calienta a reflujo durante 90 minutos, luego se enfría a temperatura ambiente. Se adiciona piridina suficien-

409190



te (9,0 cc) para neutralizar la mezcla reaccional, y luego se separa el disolvente bajo presión reducida. El residuo oleoso se dispersa en salmuera y se extrae con cloruro de metileno (5 x 100 cc). Los extractos orgánicos se lavan a su vez con solución de ácido clorhídrico 1N y con solución de bicarbonato sódico saturada. Los extractos se combinan, se secan ( $MgSO_4$ ) y se concentran bajo presión reducida para dar éster trimetílico de diol crudo en forma de un aceite.

5. b) Preparación del éster trimetílico del ácido  
 10. 1(S),2(S)-1-mesiloxi-2-hidroxi-1,2,3-propan-tricarboxílico  
(-)-treo-mesilato

Se adiciona cloruro metan-sulfónico (3,55 cc) a una solución de (-)-treo-diol crudo preparado como se ha descrito antes (11,7 g) en piridina (100 cc) previamente enfriada a 5-10°. La mezcla reaccional se mantiene a 0-5° por 2,5 horas, luego se vierte en una mezcla agitada de hielo-agua que contiene 100 cc de ácido clorhídrico concentrado. La solución resultante se extrae con cloruro de metileno (4 x 200 cc) y los extractos se lavan a su vez con salmuera (1 x) y bicarbonato sódico saturado (2 x). Los extractos combinados se secan ( $MgSO_4$ ) se decoloran (carbón vegetal) y se concentran bajo presión reducida para dar el mesilato crudo como un aceite. La trituración del aceite con éter proporciona un sólido, de punto de fusión 83-86°. La recristalización de este material en cloruro de metileno-hexano da el mesilato, de punto de fusión 89-91°. Se obtiene la muestra pura analíticamente mediante cristalización en éter-hexano, de punto de fusión 89-91°;  $[\alpha]_D^{25} = 8,38^\circ$  (c, 0,75,  $CH_3OH$ ).

Ejemplo 8bisPreparación de éster trietílico de ácido (±)-eritro-1,2-epoxi-1,2,3-propantricarboxílico

- Se adiciona hidruro de sodio (57% en una dispersión de aceite; 140 mg) a una solución de éster trietílico de ácido (±)-treo-1-mesiloxi-2-hidroxi-1,2,3-propantricarboxílico (1,1 g) en benceno seco (15 cc). Después de 15 minutos a temperatura ambiente, se diluye la mezcla de reacción con hielo-agua (50 cc). La capa acuosa se lava con benceno y luego las soluciones orgánicas combinadas y secas ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) se evaporan para proporcionar 800 mg de epóxido esencialmente puro.

El (±)-treo-mesilato utilizado anteriormente puede obtenerse como sigue:

15. a) Preparación de éster trietílico de ácido (±)-treo-hidroxi cítrico

- Se disuelve ácido trans-aconítico (50 g) en una mezcla de benceno y etanol (1:1; 500cc) que contiene 1 cc de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Se refluje la solución y los vapores que se condensan se dejan percolar a través de un tamiz molecular antes de volver al frasco de reacción. Después de 24 horas, se concentra la mezcla de reacción hasta sequedad y el residuo se toma en cloruro de metileno y se lava con solución de bicarbonato de sodio diluida y fría.
25. El extracto orgánico se evapora bajo presión reducida y el residuo oleoso se destila bajo presión reducida para proporcionar 49,0 g de éster trietílico de ácido transaconítico como un líquido incoloro (punto de ebullición

409190

- 26b -



972

118-122<sup>o</sup>; 0,1 mm).

- El triéster anterior (12 g) en una mezcla de acetona (50 cc) y agua (15 cc) que contiene 2 cc de una solución al 0,5% de tetróxido de osmio en n-butanol se trata con
5. peróxido de hidrógeno (30%; 6 cc). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente por 48 horas y luego se adiciona 1 cc complementario de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. Después de 16 horas adicionales de tiempo de reacción, la mezcla se diluye con 250 cc de solución de bisulfito de sodio al 5%
10. y la mezcla se extrae con cloruro de metileno (2 x 200 cc). Los extractos de cloruro de metileno se lavan con agua, luego se secan (MgSO<sub>4</sub>) y se concentra bajo presión reducida para proporcionar 13 g de éster trietílico de ácido (±)-treo-hidroxicitrico como un aceite; ir (CHCl<sub>3</sub>) 3500
15. y 1730 cm<sup>-1</sup>.

b) Preparación de éster trietílico de ácido (±)-treo-1-mesiloxi-2-hidroxi-1,2,3-propantricarboxílico

- Una solución de éster trietílico de ácido (±)-treo-hidroxicitrico (8,7 g) en piridina (62 cc) se enfría a 0<sup>o</sup>.
20. Se adiciona cloruro metan-sulfónico (3,3 cc) y la solución se mantiene a 0-5<sup>o</sup> por 90 minutos, luego se vierte en una mezcla de hielo-agua (350 cc) que contiene 62 cc de HCl concentrado. La solución resultante se extrae con éter (2 x 250 cc) y los extractos de éter se lavan a su
25. vez con solución diluída de NaHCO<sub>3</sub> (1X) y con agua (2X). Los extractos orgánicos secos (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) se concentran hasta sequedad para proporcionar 10,2 g del monomesilato como un aceite.

EJEMPLO 9.-

Se preparan de forma convencional cápsulas que tienen la composición siguiente :

	<u>Por cápsula</u>
5. ácido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico	250 mg
Lactosa	60 mg
Almidón de maiz	35 mg
Estearato magnésico	<u>5 mg</u>
Peso total	350 mg

10. EJEMPLO 10.-

Se preparan de forma convencional tabletas que tienen la composición siguiente :

	<u>Por tableta</u>
Acido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico	200 mg
15. Dihidrato de fosfato dicálcico, no molido	235 mg
Almidón de maiz	70 mg
FD & C yellow $\neq$ 5 - Aluminium Lake 25%	2 mg
Durkee 117	25 mg
Estearato de calcio	<u>3 mg</u>
20. style="text-align: right;">Peso total	535 mg

EJEMPLO 11.-

Se preparan cápsulas de forma convencional que tiene la composición siguiente :

	<u>Por cápsula</u>
25. ácido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico	50 mg
Lactosa	125 mg
Almidón de maiz	30 mg
Talco	<u>5 mg</u>
Peso total	210 mg

409190



EJEMPLO 12.-

Se preparan, de forma convencional, tabletas que tienen la composición siguiente :

	<u>Por tableta</u>
5. Acido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico	25 mg
Dihidrato de fosfato dicalcico, no molido	175 mg
Almidón de maiz	24 mg
Estearato de magnesio	<u>1 mg</u>
Peso total	225 mg

10. EJEMPLO 13.-

Se preparan, de forma convencional, tabletas de la composición siguiente :

	<u>Por tableta</u>
Acido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico	100 mg
15. Lactosa	202 mg
Almidón de maiz	80 mg
Almidón de maiz de grado alimenticio prehidrolizado	20 mg
Estearato de calcio	<u>8 mg</u>
Peso total	410 mg

20. EJEMPLO 14.-

Se preparan, en forma convencional, tabletas de la composición siguiente :

	<u>Por tableta</u>
25. Acido ( $\pm$ )-treo-epoxiaconítico	500 mg
Almidón de maiz	30 mg
Lactosa	88 mg
Gelatina	12 mg
Talco	15 mg
Estearato de magnesio	<u>5 mg</u>
Peso total	650 mg

409190

409190



EJEMPLO 15.-

Medida de lipogenesis in vivo.

A ratas hembra Charles River con un peso de 120-150 g se les proporcionó acceso libre al agua y se las alimentó con una dieta comercial antes del inicio del experimento. Cada grupo experimental de animales se mantuvo previamente en ayunas durante 2 días y luego se las alimento con comida mediante una comida única diariamente de 9-12 de la mañana. La comida consistía de una dieta de glucosa al 70% exenta de grasa (G-70) conteniendo 70% de glucosa, 24% de vitamina exenta de caseína, 5% de sal y 1% de vitamina, a la cual se adicionó 40 g de celulosa por kg.

El último día de la alimentación, en un momento determinado antes de la iniciación de la comida, se administró el derivado epóxido en ASV de la composición de cloruro de sodio 0,9 %, celulosa carboximetilica 0,5%, alcohol bencílico 0,86 % y Tween 80 (monoleato de polioxietilen-sorbitan) 0,39% o en solución salina. En un momento determinado después de la alimentación, se anestesiaron ligeramente las ratas con Penthrane (metoxiflurano) y se inyectaron en la vena de la cola con 0,25 cc de una solución con la composición siguiente: 12,3 mg de alanina, alanina de 5 microC<sup>14</sup>C (actividad específica = 156 mC/milimol) en forma de precursor de ácido graso y 30,6 mg de alfa-cetoglutarato en forma de un aceptor de transaminasa disueltos en solución salina a un pH de 7,4 - 7,6. Después de 30 minutos se sacrificaron las ratas por decapitado y sus hígados se escindieron, se pesaron rápidamente, se desmenuzaron en 15 cc de agua y se homogeneizaron en un homogeneizador Potter-Elvehjem con 5 carreras de

409190

- 30 -



- un almirez de teflón impulsado por una mandriladora. Alicuotas duplicadas de 3 cc de homogeneatos de hígado entero se adicionan a tubos conteniendo 2,1 cc de NaOH 5N y se saponificaron con 2,6 cc de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N y se extrajeron dos veces con 5 cc de éter de petróleo (punto de ebullición 40-60°). Se adicionaron directamente los sobrenadantes a viales contadores de cristal, se evaporó hasta sequedad y se adicionaron 10 cc de fluido de escintilación de tolueno-PPO-POPOP. Se analizaron muestras con respecto a la actividad absoluta en un contador de escintilación Packard-Tri-carb. Los datos resultantes se expresaron como nanomoles de alanina<sup>14</sup>C incorporados/gramo de tejido/30 minutos.

Inhibición de ratas in vivo de lipogenesis por administración oral de epóxidos<sup>1</sup>

Epóxido <sup>2</sup>	Lipogenesis	
	nanomoles de alanina <sup>14</sup> C/g de hígado/30 min.	% de inhibición
ASV	1022.4 ± 58.7(21) <sup>3</sup>	0
ácido (±)-treo-epoxiaconítico	280.6 ± 81.9(5)	73
ácido (-)-treo-epoxiaconítico	198.7 ± 32.5(5)	81
ácido (+)-treo-epoxiaconítico	364.8 ± 72.0(5)	64
ácido (±)-eritro-epoxiaconítico	808.5 ± 189.8(5)	20
éster trimetílico del ácido (-)-eritro-epoxiaconítico	624.2 ± 175.6(5)	39

<sup>1</sup> Se mantuvieron en ayunas previamente ratas durante 2 días, se alimentaron con comida, la dieta G-70 durante 12 días



y se ensayó in vivo inmediatamente después de completar la última comida.

- 2 Se suspendieron derivados en ASV (2,63 milimoles/kg) y se dieron por el tubo estomacal 60 minutos antes de la alimentación.
- 5.
- 3 Término medio de  $\pm$  SEM para el número de ratas indicadas en paréntesis.

Inhibición de ratas in vivo de lipogenesis por administración oral del ácido (+)-treo-epoxi-aconítico<sup>1</sup>

10.

Grupo	Dosis administrada (en solución salina)	Lipogenesis	
	Milimoles/kg	nanomoles de alanina <sup>14</sup> C/g de hígado/30 min.	% de inhibición
1	-	1091.4 $\pm$ 55.6(31) <sup>2</sup>	0
2	5.26	222.0 $\pm$ 41.8(15)	80
3	2.63	372.2 $\pm$ 66.7(19)	66
4	1.32	668.7 $\pm$ 129.0(9)	39
5	0.66	769.2 $\pm$ 52.1(9)	29

15.

20.

- <sup>1</sup> Se mantuvieron en ayunas ratas previamente durante dos días y se alimentaron con comida, la dieta G-70 durante 9 días. En el último día de la alimentación se dieron los derivados 60 minutos antes de la comida y se ensayó in vivo 5 horas después de la iniciación de la alimentación.
- 25.
- <sup>2</sup> Término medio de  $\pm$  SEM para el número de ratas indicadas en paréntesis.

409190

409190



Efecto del pre-tratamiento con ácido (+)-treo-epoxiaconítico en la rata de lipogenesis in vivo<sup>1</sup>

5.	Grupo	Concentración (en solución salina)	Tiempo de administración (horas antes de la alimentación)	Lipogenesis in vivo	
		Milimoles/kg	horas	nanomoles de alanina <sup>14</sup> C/g de hígado/30 min.	% de inhibición
	A	-	16	1255.2 ± 123.5(8) <sup>3</sup>	0
10.	A	5.26	16	495.1 ± 63.3(3)	60
	A	2.63	16	1573.2 ± 163.1(4)	+25
	B	-	16 y 12 <sup>2</sup>	1189.1 ± 127.3(5)	0
	B	5.26	16 y 12	486.2 ± 104.4(5)	59
	B	2.63	16 y 12	616.9 ± 173.5(5)	48

15. <sup>1</sup> Se mantuvieron en ayunas previamente las ratas durante 2 días y se alimentaron con comida, la dieta G-70 durante 10 días. Se ensayaron in vivo 5 horas después de la iniciación de la alimentación.

20. <sup>2</sup> Se dieron derivados 16 horas antes de la alimentación (día 9) y 12 horas antes de la alimentación (día 10).

<sup>3</sup> Término medio de ± SEM para el número de ratas indicadas en paréntesis.

= . =

N O T A

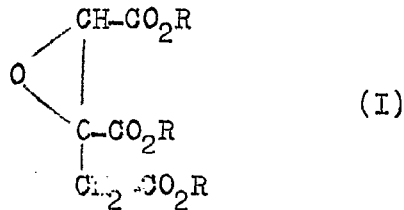
25. Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente estadounidense serial nº 204.334 del 2 de Diciembre de 1971.

Handwritten signature



1. Procedimiento para la preparación de derivados del ácido treo-epoxiaconítico, así como, sus sales y ésteres de alquilo inferior, de la fórmula general

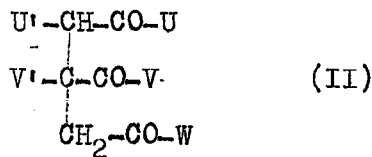
5.



10.

en donde R representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquílico inferior,  
y sales de los triácidos de la fórmula I, caracterizado porque en una primera etapa del proceso, se somete a una reacción de epoxidación un compuesto de la fórmula

15.

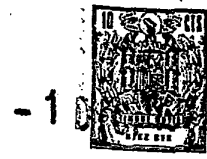


20.

25.

en donde U' representa un grupo sulfoniloxi de alquilo inferior o un grupo sulfoniloxi de arilo inferior, V' representa un grupo hidroxilo y U, V y W representan, cada uno, un grupo de alcoxi inferior, o U' y V' juntos representan un enlace adicional entre los átomos de carbono adyacentes y U, V y W representan, cada uno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi inferior,  
y, en una sucesión opcional de etapas complementarias a la de epoxidación anterior, se somete el triácido de fórmula I resultante en la primera etapa a salificación con una base, con resolución, en una etapa ulterior opcional, del

Ag

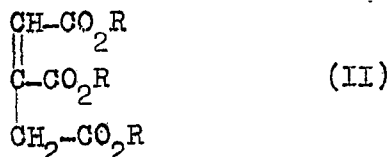


409190

- 1 -

racemato de fórmula general I , resultante en las anteriores, en sus antípodas ópticos.

- 2. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en calidad de material de partida de la fórmula II se selecciona un compuesto con la configuración trans, de la fórmula



- 10. en donde R tiene el mismo significado dado en la reivindicación 1.

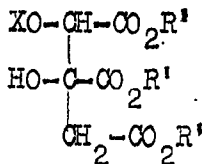
- 15. 3. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque en su realización se utiliza en la primera etapa del proceso como agente epoxidante para el material de partida de la fórmula IIa, peróxido de hidrógeno.

- 20. 4. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque en su realización la reacción de epoxidación se conduce en presencia de una cantidad catalítica de ácido tungstico o una sal de metal alcalino.

- 25. 5. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado en una alternativa de su realización, porque se selecciona como material de partida de la fórmula II un compuesto que tiene la configuración eritro



de la fórmula



5.

donde X representa un grupo alquil sulfonilo inferior o aril sulfonilo inferior y R' representa un grupo alquílico inferior y en la primera etapa del proceso se utiliza una base como agente epoxidante.

10.

6. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico inerte.

15.

7. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque especialmente se seleccionan acetato sódico como base y, como disolvente, un alcohol de la fórmula

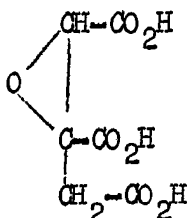


donde R' tiene el significado indicado antes.

20.

8. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porqué en la etapa ulterior opcional de resolución de los antípodas ópticos en un compuesto de la fórmula general I, que tiene la configuración treo- y presenta la estructura

25.

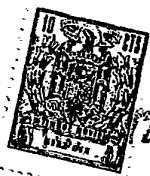


(Ia)

*Pg*

409190

409190



se somete el citado compuesto, resultante de las etapas anteriores, a una sucesión de fases operativas que comprenden:

5. (a) tratar el compuesto racémico citado con una amina ópticamente activa para formar dos sales diastereoméricas;
- (b) separar dichas sales diastereoméricas, y
- (c) descomponer una de las sales formadas en la etapa (b) para proporcionar un antípoda óptico del compuesto de la fórmula anterior.
10. 9. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque se selecciona la cinconidina como la amina ópticamente activa y porque las sales se separan mediante precipitación selectiva a partir de un medio disolvente.
15. 10. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque se selecciona el metanol y el acetato etílico como medio disolvente.
20. 11. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 8 a 10 caracterizado porque particularmente en la formación de los compuestos de la fórmula I, en que R es hidrógeno, se utiliza como material de partida un compuesto de la fórmula II, en donde U, V y W representan cada uno hidroxilo.
25. 12. Procedimiento para la preparación de derivados del ácido treo-epoxiaconítico.

Según se describe y reivindica en la presente

Wey

409190

- 37 -

409190

- 1 DIO



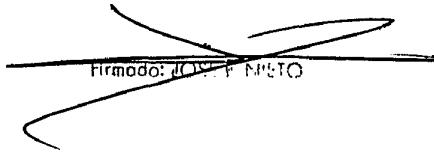
memoria descriptiva que consta de 37 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 1 de Diciembre de 1972

p.a.

JAIME ISERN

p. p.

  
Firmado: JOSE F. MATEO

