

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 910 302**

51 Int. Cl.:

C07K 5/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2018** **PCT/IB2018/059234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2019** **WO19102397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2018** **E 18827226 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.01.2022** **EP 3713952**

54 Título: **Procedimiento para la síntesis de derivados del glutatión**

30 Prioridad:

22.11.2017 IT 201700133856

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:

12.05.2022

73 Titular/es:

REDOX-CO S.R.L. (100.0%)
Piazza Bologna 1
00162 Roma, IT

72 Inventor/es:

BARTOCCINI, FRANCESCA;
FRATERNALE, ALESSANDRA y
PIERSANTI, GIOVANNI

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 910 302 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la síntesis de derivados del glutatión

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud de patente reivindica la prioridad de la solicitud de patente italiana No. 102017000133856 presentada el 22/11/2017.

10 SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de derivados del glutatión.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 El glutatión es sin duda uno de los agentes antioxidantes y desintoxicantes más importantes que el organismo es capaz de producir y desempeña una función importante en la respuesta inmune. A nivel celular se sintetiza a partir del glutamato, de la glicina y de la cisteína, que es donante del grupo tiol (-SH) responsable de la actividad biológica del glutatión.

20 Numerosas afecciones fisiopatológicas (envejecimiento, enfermedades degenerativas, etc.) se caracterizan por estrés oxidativo y el agotamiento del glutatión. En estos estados es ciertamente ventajoso restablecer los niveles fisiológicos de glutatión en los tejidos. Sin embargo, la ingesta de glutatión de fuentes externas no es particularmente eficaz, ya que carece de un transportador específico que le permita atravesar la membrana celular.

25 Se ha descubierto que el derivado del glutatión que mejor garantiza el paso a través de la membrana celular, manteniendo al mismo tiempo las características antioxidantes y desintoxicantes del glutatión, es el N-acil glutatión.

30 Hasta el momento, todos los procedimientos de síntesis utilizados tienen criticidades en términos de producción, como para poner en peligro su utilización a gran escala. En este sentido, uno de los procedimientos de síntesis propuestos consiste en la N-acilación del glutatión con un éster activado seguida de una reducción. Sin embargo, en este procedimiento, están presentes otros grupos susceptibles en la molécula durante la reducción.

35 Otro procedimiento de síntesis consiste en la utilización del grupo tritilo para proteger el grupo tiol del glutatión, procediendo posteriormente a la N-acilación y desprotección posterior del grupo tritilo. Tal como resultará inmediatamente evidente para un experto en la materia, este procedimiento implica escalas temporales, costes y rendimientos que impiden su aplicación a escala industrial.

40 Otro procedimiento consiste en la utilización de 4-nitrobenzoílo para proteger el grupo tiol del glutatión, procediendo posteriormente a la acilación del grupo NH_2 con 1-acil-1H-benzotriazol y desprotección posterior, utilizando pirrolidina en metanol seco durante cuatro horas. Aquí nuevamente, las escalas temporales, los costes y los rendimientos impiden la utilización del procedimiento a gran escala.

45 Otro procedimiento de síntesis (dado a conocer en la Patente JP S63 2922) consiste en la utilización del grupo Boc para proteger el grupo tiol del glutatión, procediendo posteriormente con la N-acilación y desprotección posterior del grupo Boc.

50 Por lo tanto, se ha sentido la necesidad de un procedimiento para la síntesis de N-acil glutatión con características técnicas tales como para garantizar una aplicación ventajosa del mismo a escala industrial.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

55 El objeto de la presente invención es un procedimiento de síntesis para la preparación de N-acil glutatión, caracterizado por que comprende una etapa de acilación en la que, en una solución acuosa con un pH que oscila entre 8 y 10, se hace reaccionar el glutatión con un anhídrido de fórmula $(\text{RCO})_2\text{O}$, con la formación de S,N-diacil glutatión, y una etapa posterior de alcoholisis selectiva del grupo S-acilo, en la que el S,N-diacil glutatión producido en la etapa anterior se disuelve en una solución de alcóxido/alcohol ($\text{R}'\text{O}^-/\text{R}'\text{OH}$) y posteriormente el producto obtenido se trata con una resina de intercambio catiónico; R siendo H o un grupo hidrocarbonado lineal o ramificado con un número de átomos de carbono que oscila entre C1 y C24; siendo R' un grupo radical hidrocarbonado lineal o ramificado con un número de átomos de carbono que oscila entre C1 y C4.

60 Preferentemente, en dicha etapa de acilación, la solución acuosa comprende un carbonato de un metal alcalino o alcalinotérreo o un bicarbonato de un metal alcalino.

65 Preferentemente, R se elige entre el grupo compuesto por un grupo alquilo C1-C24 lineal o ramificado, un grupo alquenilo C2-C24 lineal o ramificado, un grupo arilo C6-C24, un grupo lineal o ramificado con una parte arilo C6-C14

y una parte alquilo C1-C6, un grupo mixto arilo C6-C14 y alquilo o alquenilo C1-C6; teniendo dicho grupo arilo de 0 a más sustituyentes iguales o diferentes que están comprendidos en el grupo que consiste en un átomo de halógeno, hidroxilo, alcóxido C1-C6 lineal o ramificado, saturado o insaturado, amino, posiblemente monosustituido o polisustituido, sustituido con un grupo alquilo C1-C6 lineal o ramificado.

Preferentemente, R' es CH₃.

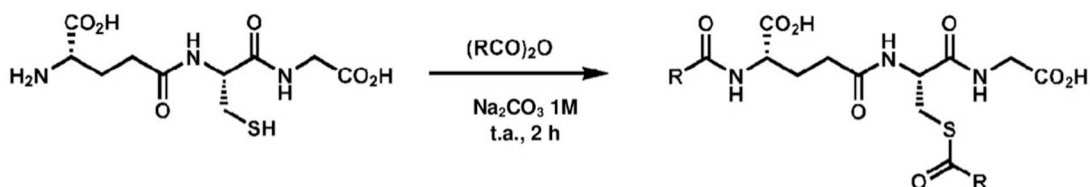
Preferentemente, dicha etapa de acilación comprende una operación de acidificación de la solución, en la que se hace reaccionar el glutatión con un anhídrido de fórmula (RCO)₂O.

Preferentemente, dicha etapa de acilación y dicha etapa de alcoholisis selectiva se llevan a cabo a temperatura ambiente.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

A continuación, se dan algunos ejemplos de realización puramente a modo de ejemplo no limitativo.

- Etapa de acilación -



Se colocó en un matraz de tres bocas una solución acuosa 1 M de Na₂CO₃ en la que se habían disuelto 100 mg de glutatión. A esta solución se añadieron gota a gota 0,668 milimoles de anhídrido acético ((CH₃CO)₂O) y la solución producida de este modo se mantuvo en agitación durante dos horas. Posteriormente, la solución se acidificó a pH 3,5 mediante la adición de, aproximadamente, 0,2 ml de una solución de HCl 6 N. La fase acuosa se lavó tres veces con 3 ml de éter etílico y, posteriormente, se acidificó a pH 1,5 mediante la adición de, aproximadamente, 0,1 ml de una solución de HCl 6N. A continuación, la solución acuosa se concentró a presión reducida hasta la mitad del volumen y posteriormente se decantó.

Se repitió el mismo procedimiento anterior utilizando un anhídrido diferente del anhídrido acético.

En concreto, se repitió el procedimiento utilizando, respectivamente, anhídrido butanoico ((CH₃CH₂CH₂CO)₂O), anhídrido 2,2-dimetilpropiónico ((CH₃)₂C(CH₃)CO)₂O y anhídrido benzoico ((PhCO)₂O).

Los compuestos S,N-diacyl glutatión producidos se sometieron a un análisis espectroscópico para verificar su identidad.

A continuación, se informa de los valores de espectroscopia de masas y resonancia magnética obtenidos para cada uno de los cuatro S,N-diacyl glutationes preparados:

R = Me

Rendimiento: 77 %

EM (ESI): 392 (M+1)⁺.

RMN de ¹H (400 MHz, MeOH-d₄) δ 4,60 (dd, J₁ = 8,5 y J₂ = 5,0 Hz, 1H), 4,30 (dd, J₁ = 8,0 y J₂ = 5,0 Hz, 1H), 3,85 (d, J = 17,0 Hz, 1H), 3,75 (d, J = 17,0 Hz, 1H), 3,48 (dd, J₁ = 14,0 y J₂ = 5,0 Hz, 1H), 3,15 (dd, J₁ = 14,0 y J₂ = 8,5 Hz, 1H), 2,37-2,33 (m, 5H), 2,20-2,11 (m, 1H), 2,03-1,96 (m, 4H).

RMN de ¹³C (100 MHz, MeOH-d₄) δ 195,7, 176,1, 174,1, 173,9, 171,5, 170,6, 53,6, 52,7, 42,5, 31,9, 30,2, 29,0, 28,0, 21,4.

R = n-Pr

Rendimiento: 85 %

EM (ESI): 448 (M+1)⁺.

RMN de ¹H (400 MHz, D₂O) δ 4,62 (dd, J₁ = 8,0 y J₂ = 5,0 Hz, 1H), 4,32 (dd, J₁ = 9,0 y J₂ = 5,0 Hz, 1H), 3,96 (s, 2H), 3,42 (dd, J₁ = 14,5 y J₂ = 5,0 Hz, 1H), 3,13 (dd, J₁ = 14,5 y J₂ = 8,0 Hz, 1H), 2,59 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 2,39 (t,

J = 7,5 Hz), 2H), 2,24 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 2,19-2,12 (m, 1H), 2,00-1,91 (m, 1H), 1,65-1,54 (m, 4H), 0,88 (t, J = 7,0, 3H), 0,87 (t, J = 7,0, 3H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 203,7, 177,3, 175,3, 174,9, 173,0, 172,1, 52,6, 52,1, 52,1, 45,3, 41,2, 37,3, 31,6, 29,9, 26,3, 18,9, 12,7, 12,6.

R = t-Bu

Rendimiento: 83 %

EM (ESI): 476 ($\text{M}+1$)⁺.

RMN de ^1H (400 MHz, MeOH-d_4) δ 4,57 (dd, J1 = 9,0 y J2 = 5,0 Hz, 1H), 4,26 (dd, J1 = 7,0 y J2 = 5,5 Hz, 1H), 3,84 (d, J = 17,0 Hz, 1H), 3,73 (d, J = 17,0 Hz, 1H), 3,46 (dd, J1 = 14,0 y J2 = 5,0 Hz, 1H), 3,13 (dd, J1 = 14,0 y J2 = 9,0 Hz, 1H), 2,32 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,17-2,02 (m, 2H), 1,24 (s, 9H), 1,23 (s, 9H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOH-d_4) δ 206,2, 179,1, 176,4, 174,2, 174,1, 170,6, 53,8, 52,8, 47,0, 46,1, 42,8, 31,8, 29,7, 28,2, 26,4, 26,3.

R = Ph

Rendimiento: 72 %

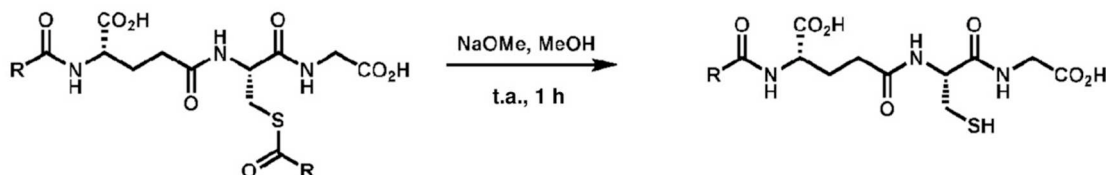
EM (ESI): 516 ($\text{M}+1$)⁺.

RMN de ^1H (400 MHz, MeOH-d_4) δ 7,94 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,86 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,64-7,44 (m, 6H), 4,76 (dd, J1 = 8,5 y J2 = 5,0 Hz, 1H), 4,59 (dd, J1 = 8,5 y J2 = 5,0 Hz, 1H), 3,90 (d, J = 17,0 Hz, 1H), 3,83 (d, J = 17,0 Hz, 1H), 3,70 (dd, J1 = 14,0 y J2 = 5,0 Hz, 1H), 3,36 (dd, J1 = 14,0 y J2 = 9,0 Hz, 1H), 2,46 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,36-2,27 (m, 1H), 2,19-2,10 (m, 1H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOH-d_4) δ 189,8, 173,1, 172,5, 171,0, 169,3, 167,0, 135,1, 131,8, 129,4, 126,9, 126,6, 126,5, 125,5, 125,3, 51,2, 46,9, 39,9, 30,4, 28,5, 25,7

A partir de los valores indicados anteriormente, se determina la naturaleza de los compuestos S,N-acilato con los grupos RCO derivados de los respectivos anhídridos utilizados.

- Etapa de alcoholisis selectiva -



Se colocó en un matraz de 10 ml equipado con un ancla magnética una solución en metanol de 0,31 mmol de S,N-diacil glutatión preparado tal como se ha descrito anteriormente. Se añadieron a la solución 0,93 ml de una solución 1 M de metóxido de sodio en metanol. La solución se mantuvo en agitación durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente el disolvente se evaporó a presión reducida.

El residuo sólido obtenido se solubilizó en 1 ml de agua y se vertió lentamente en un vaso de precipitados que contenía una resina de intercambio catiónico (Dowex 50W-X8(H)) y 0,4 ml de agua.

En concreto, antes de su utilización se regeneró la resina mediante una solución de H_2SO_4 0,25N y posteriormente se lavó con agua hasta detectar ausencia de sulfato y un pH igual a 7.

La suspensión del vaso de precipitados se filtró y la resina se lavó con 5 ml de agua. El filtrado se concentró a presión reducida mediante coevaporación con 1 ml de xileno. El sólido obtenido se molturó con 5 ml de éter etílico y se filtró.

El respectivo N-acil glutatión obtenido se sometió a análisis espectroscópico para verificar su identidad.

A continuación, se informa de los valores de espectroscopía de masas y resonancia magnética obtenidos para cada uno de los cuatro N-acil glutationes preparados:

R = Me

Rendimiento: 75 %

EM (ESI): 350 ($\text{M}+1$)⁺.

RMN de ^1H (400 MHz, MeOH- d_4) δ 4,56 (dd, $J_1 = 7,0$ y $J_2 = 4,5$ Hz, 1H), 4,38 (dd, $J_1 = 8,5$ y $J_2 = 5,0$ Hz, 1H), 3,89 (s, 2H), 2,94-2,87 (m, 2H), 2,42 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,24-2,16 (m, 1H), 2,10-1,94 (m, 4H).

5 RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOH- d_4) δ 174,9, 173,8, 172,7, 171,8, 171,1, 55,6, 52,7, 41,5, 31,7, 27,5, 25,5, 21,2.

R = n-Pr

Rendimiento: 91 %

EM (ESI): 378 ($M+1$) $^+$.

10 RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) δ 4,52 (dd, $J_1 = 7,0$ y $J_2 = 5,5$ Hz, 1H), 4,25 (dd, $J_1 = 9,0$ y $J_2 = 5,0$ Hz, 1H), 3,89 (s, 2H), 2,92- 2,83 (m, 2H), 2,42 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,23 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,19-2,12 (m, 1H), 1,99-1,91 (m, 1H), 1,61-1,52 (m, 2H), 0,87 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H);

15 RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 177,2, 176,0, 175,3, 173,8, 172,3, 55,5, 52,6, 41,7, 37,4, 31,6, 26,5, 25,5, 18,9, 12,8.

R = t-Bu

Rendimiento: 80 %

EM (ESI): 392 ($M+1$) $^+$.

20 RMN de ^1H (400 MHz, MeOH- d_4) δ 4,58 (dd, $J_1 = 7,0$ y $J_2 = 5,5$ Hz, 1H), 4,39 (dd, $J_1 = 9,0$ y $J_2 = 5,0$ Hz, 1H), 3,94 (s, 2H), 2,91-2,86 (m, 2H), 2,44 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 2,29-2,21 (m, 1H), 2,09-2,00 (m, 1H), 1,23 (s, 9H).

25 RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOH- d_4) δ 180,0, 174,1, 173,8, 171,6, 171,3, 55,5, 52,3, 40,7, 38,2, 31,6, 26,6, 26,4, 25,6.

R = Ph

Rendimiento: 73 %

EM (ESI): 412 ($M+1$) $^+$.

30 RMN de ^1H (400 MHz, MeOH- d_4) δ 8,02 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,47-7,42 (m, 3H), 4,63-4,56 (m, 2H), 3,87 (s, 2H), 2,92-2,81 (m, 2H), 2,55-2,48 (m, 2H), 2,36-2,30 (m, 1H), 2,19-2,10 (m, 1H). RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOH- d_4) δ 172,7, 172,3, 170,4, 169,6, 167,0, 130,9, 127,6, 126,5, 125,5, 53,9, 51,3, 39,4, 30,2, 25,3, 23,9.

35 A partir de los valores anteriores, se determina la naturaleza de los productos de N-acilato con el restablecimiento del grupo SH en el sustrato de S,N-acil glutatión respectivo utilizado.

40 A partir de la descripción anterior, resulta evidente inmediatamente que el procedimiento de síntesis objeto de la presente invención ofrece la gran ventaja de ser extremadamente simple, económico y de garantizar un rendimiento elevado. De hecho, cabe destacar que las reacciones de acilación y alcoholisis selectiva tienen lugar a temperatura ambiente, y que se utilizan disolventes tales como agua (para la reacción de acilación) y metanol (para la reacción de alcoholisis selectiva).

45 Las ventajas anteriores hacen que el procedimiento de síntesis objeto de la presente invención pueda ser aplicado a escala industrial sin sufrir los problemas de productividad típicos de los procedimientos del estado de la técnica conocido.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de síntesis para la producción de N-acil glutatión, **caracterizado por que** comprende una etapa de acilación, durante la que, en una solución acuosa con un pH que oscila entre 8 y 10, se hace reaccionar el glutatión con un anhídrido de fórmula $(\text{RCO})_2\text{O}$ con la formación de S,N-diacil glutatión, y una etapa posterior de alcoholisis selectiva del grupo S-acilo, durante la que el S,N-diacil glutatión producido en la etapa anterior se disuelve en una solución de alcóxido/alcohol ($\text{R}'\text{O}/\text{R}'\text{OH}$) y, posteriormente, el producto obtenido se trata con una resina de intercambio catiónico; R siendo H o un grupo hidrocarbonado lineal o ramificado con un número de átomos de carbono que oscila entre C1 y C24; siendo R' un grupo radical hidrocarbonado lineal o ramificado con un número de átomos de carbono que oscila entre C1 y C4.
2. Procedimiento de síntesis, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** durante dicha etapa de acilación, la solución acuosa comprende un carbonato de un metal alcalino o alcalinotérreo o un bicarbonato de un metal alcalino.
3. Procedimiento de síntesis, según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** R se elige entre el grupo que consiste en un grupo alquilo C1-C24 lineal o ramificado, un grupo alqueno C2-C24 lineal o ramificado, un grupo arilo C6-C24, un grupo lineal o ramificado con una parte arilo C6-C14 y una parte alquilo C1-C6, un grupo mixto arilo C6-C14 y alquilo o alqueno C1-C6; teniendo dicho grupo arilo de 0 a más sustituyentes iguales o diferentes, que están comprendidos en el grupo que consiste en un átomo de halógeno, hidroxilo, alcóxido C1-C6 lineal o ramificado, saturado o insaturado, amino, posiblemente monosustituido o polisustituido, sustituido con un grupo alquilo C1-C6 lineal o ramificado.
4. Procedimiento de síntesis, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** R' es CH_3 .
5. Procedimiento de síntesis, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicha etapa de acilación comprende una operación de acidificación de la solución, durante la que se hace reaccionar el glutatión con un anhídrido de fórmula $(\text{RCO})_2\text{O}$.
6. Procedimiento de síntesis, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicha etapa de acilación y dicha etapa de alcoholisis selectiva se llevan a cabo a temperatura ambiente.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

• IT 102017000133856

• JP S632922 A