



(19) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 100922 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6 )

C07J071/00 A C07J017/00 B  
C07H013/04 B A61K031/705 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1992.10.01

(30) *Prioridade:* 1991.10.04 US 771668  
1991.10.04 US 771709

(43) *Data de publicação do pedido:*  
1993.10.29

(45) *Data e BPI da concessão:*  
05/99 1999.05.25

(73) *Titular(es):*

PROCTER & GAMBLE COMPANY, THE  
ONE PROCTER & GAMBLE PLAZA CINCINNATI, OHIO, 45202  
US

(72) *Inventor(es):*

ADAM WIESLAW MAZUR  
STANISLAW (NMN) PIKUL  
BRUCE PAUL DAGGY  
US  
US  
US

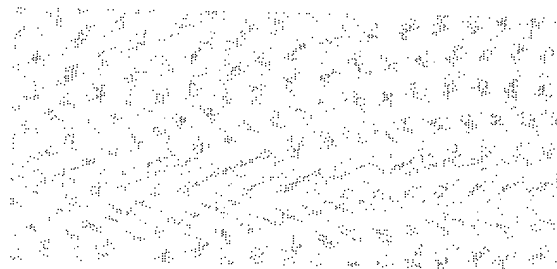
(74) *Mandatário(s):*

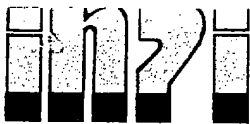
MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA  
RUA DO ARCO DA CONCEIÇÃO 3, 1º AND. 1100 LISBOA  
PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE 5-C-HIDROXIMETIL-HEXOSE DE ESTEROIS QUE BAIXAM O TEOR DE COLESTEROL NO SANGUE

(57) *Resumo:*

DERIVADO DE ESTERÓIS; COLESTEROL





Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
0.1.nº 100.922 F		1992/10/01	

Requerente (71):

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, norte-americana com sede em One Procter & Gamble, Plaza, Cincinnati, Ohio 45202 ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA.

Inventores (72):

Staninslaw (NMN) Pikul; Bruce Paul Daggy; Adam Wieslaw Mazur, ambos residentes nos ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA.

Reivindicação de prioridade(s) (30)

Figura (para interpretação do resumo)

Data do pedido	Pais de Origem	N.º de pedido
1991/10/04	US	07/771.709
1991/10/04	US	07/771.668

Epigrafe: (54)

PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE 5-C-HIDROXIMETIL-HEXOSE DE ESTEROIS QUE BAIXAM O TEOR DE COLESTEROL NO SANGUE.

Resumo: (máx. 150 palavras) (57)

Divulgam-se novas saponinas que contêm 5-C-hidroxi-metil-hexose e um esterol ou triterpeno. Estes materiais, quando consumidos por seres humanos e animais, baixam o nível de colesterol no sangue. Estes compostos podem ser administrados sob a forma de preparação farmacêutica à dieta alimentar ou ser incorporados nas composições alimentares. As composições obtêm-se preparando e em seguida fazendo reagir uma flúor ou bromo 5-C-hidroxi-metil-hexose hexacilada com esterol. De acordo com um segundo processo, faz-se reagir 5-C-hidroxi-metil-hexose hexacilada com um esterol na presença de trimetilsilil-trifluormetanossulfonato.

fu FRL 1393

1 "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE 5-C-HIDROXIMETIL-HEXOSE DE  
ESTEROIS QUE BAIXAM O TEOR DE COLESTEROL NO SANGUE"

5 CAMPO TÉCNICO

10 A presente invenção refere-se a novos derivados de 5-C-hidroxi-  
metil-hexose de esteróis e à sua utilização para baixar os níveis tanto de colesterol no soro  
10 como de triglicéridos no soro. Estas novas saponinas são resistentes à absorção e ao metabolismo.

15 ENQUADRAMENTO GERAL DA INVENÇÃO

15 As saponinas são um tipo de glicósidos que se encontram na Natureza. Uma saponina é constituída por uma sapogenina e um açúcar. O açúcar pode ser um mono-  
20 sacárido ou um oligo-sacárido. A sapogenina é um esteróide ou um triterpeno.

25 As saponinas encontradas na soja, luzerna e ginseng foram extensivamente estudadas relativamente ao seu efeito de abaixamento do teor de colesterol no soro. Reduzem-se tanto a capacidade do animal poder observar colesterol como também o nível de colesterol no seu soro. O trabalho sobre as saponinas de soja e o metabolismo dos lípidos foi realizado por Ohominami e col., na School of Medicine, Ehime University do Japão, em 1991. Este trabalho está  
30 resumido em CA96: 210724X. O trabalho sobre o ginseng está resumido em CA101: 204131G. Este trabalho foi realizado por Moon e col., University of Seoul, Coreia. O efeito da dieta de rebentos de luzerna e de saponinas de luzerna é tema de uma dissertação de David L. Stone, University of Califor-

35

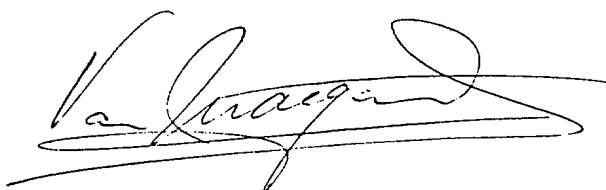
Case:4491 X

1 consiste em espiro-estanois, diosgenina, colesterol, cito-  
esterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, tigogeni-  
na, ácido oleanóico, saponóis de soja, protoscigenina,  
protopanaxadióis e protopanaxadióis.

5 15a. - Composto de acordo com as reivindica-  
ções 13 ou 14, caracterizado por a citada hexose ser 5-C-  
hidroximetil-L-arabino-hexopiranosido e o referido esterol  
ser diosgenina, tigogenina ou colesterol.

10 Lisboa, - 08 FEB 1953

Por THE PROCTER & GAMBLE COMPANY

15 

20 **VASCO MARQUES LEITE**  
Agente Oficial  
de Propriedade Industrial  
Carteira - Arco de Conceição, 3, 1.º - 1100 LISBOA

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/58

25

30

35

fu FA 1993

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE 5-C-HIDROXIMETIL-HEXOSE DE ESTEROIS QUE BAIXAM O TEOR DE COLESTEROL NO SANGUE"

#### CAMPO TÉCNICO

A presente invenção refere-se a novos derivados de 5-C-hidroxi-metil-hexose de esteróis e à sua utilização para baixar os níveis tanto de colesterol no soro como de triglicéridos no soro. Estas novas saponinas são resistentes à absorção e ao metabolismo.

#### ENQUADRAMENTO GERAL DA INVENÇÃO

As saponinas são um tipo de glicósidos que se encontram na Natureza. Uma saponina é constituída por uma sapogenina e um açúcar. O açúcar pode ser um monossacárido ou um oligo-sacárido. A sapogenina é um esteróide ou um triterpeno.

As saponinas encontradas na soja, luzerna e ginseng foram extensivamente estudadas relativamente ao seu efeito de abaixamento do teor de colesterol no soro. Reduzem-se tanto a capacidade do animal poder observar colesterol como também o nível de colesterol no seu soro. O trabalho sobre as saponinas de soja e o metabolismo dos lípidos foi realizado por Ohominami e col., na School of Medicine, Ehime University do Japão, em 1991. Este trabalho está resumido em CA96: 210724X. O trabalho sobre o ginseng está resumido em CA101: 204131G. Este trabalho foi realizado por Moon e col., University of Seoul, Coreia. O efeito da dieta de rebentos de luzerna e de saponinas de luzerna é tema de uma dissertação de David L. Stone, University of Califor-

FEV. 1993

Case:4491 X

1      nia, Berkeley (CA 102: 1657570). Um mecanismo para a acti-  
vidade hipocolesterolêmica das saponinas foi publicado por  
Sidhu e col., no British Journal of Nutrition em 1986.

5      A patente de InvençãO Japonesa 86/249 364,  
concedida a Osaka Yakuhin Kenky, descreve a utilizaçãO de  
saponina de soja para evitar a trombose.

10      A patente de InvençãO Norte-Americana Número  
4 242 502, concedida a Malinow e col. (cedida nos Estados  
Unidos da América, 1980), refere-se à utilizaçãO de saponi-  
nas para inibir a absorçãO de colesterol. De acordo com  
esta referênciã, a modificaçãO da parte de oligo-sacárido  
da saponina por hidrólise em condições ácidas suaves afecta  
a capacidade da saponina para afectar a absorçãO de coles-  
terol.

15      A patente de InvençãO Norte-Americana Número  
4 524 067, concedida a Arichi e col. (Osaka Chemical Labo-  
ratory, 1985) refere-se à utilizaçãO de saponinas de feijãO  
para baixar o teor de colesterol.

20      Ullos e col., Biochim. Biophys. Acta (1985),  
337 (2), PÁGINAS 181 - 189, resumido em Index Medicus,  
descreve experiênciãs em que diferentes esteroides de  
plantas, incluindo saponinas, aumentam a secreçãO biliar de  
colesterol.

25      A patente de InvençãO Norte-Americana Número  
4 602 003, concedida a Malinow (1986), descreve sapogenina  
sintética e compostos de esterol que inibem a absorçãO de  
colesterol e que sãO utilizados para tratar a hipercoleste-  
rolemia. Estes compostos sãO glicósidos sintéticos de  
tigogenina, diosgenina, smilagenina e semelhantes. Celobia-  
se-tigogenina e celobiose-diosgenina sãO também fabricados  
bem como os derivados de éster.

30      A patente de InvençãO Norte-Americana Número  
4 602 005, concedida a Malinow (1986), está relacionada com  
a Patente de InvençãO 4 602 003. O tigogenina-celobiosido é  
descrito como sendo particularmente eficaz no tratamento de

35

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/08

*Alf. 1993*

Case:4491 X

hipercolesterolemia e de arterosclerose.

1 O fígado desempenha um papel central na  
regulação da concentração e do fluxo do colesterol no  
sangue. Reconheceu-se já há muito tempo que a manipulação  
da circulação entero-hepática do colesterol e/ou dos ácidos  
5 biliares é um meio para modificar os níveis do colesterol  
do sangue, particularmente os níveis de colesterol de  
lipoproteínas de pequena densidade (LDL-C), devido às suas  
influências sobre o metabolismo hepático. Agentes que se  
ligam ao colesterol ou de outra forma evitam a absorção do  
10 colesterol e dos ácidos biliares através da parede dos  
intestinos, se forem administrados numa dose suficiente,  
fazem com que o fígado regule para cima o teor de receptor  
de LDL. A queda resultante das concentrações de LDL acredi-  
ta-se geralmente que proporcione benefícios terapêuticos  
15 significativos.

Embora se saiba que as saponinas possuem o  
benefício de baixar o colesterol, também se sabe que estes  
materiais se hidrolisam no sistema digestivo. Quando o  
agrupamento de açúcar é eliminado, isto é, a ligação glico-  
20 sídica é clivada, o colesterol deixa de ser removido. Por  
consequência, um derivado de saponina que não se hidrolise  
no estômago nem nos intestinos será muito desejável. Este  
composto poderia mesmo ser derivado do colesterol.

25 Surpreendentemente, a Requerente descobriu  
que, derivatizando um esterol com um açúcar substituído por  
5-C-hidroximetilo, se obtém um derivado de saponina que não  
se hidrolisa no estômago nem nos intestinos, mas que mesmo  
assim ainda funciona de forma a fazer baixar colesterol e  
os triglicéridos no soro. Os 5-C-hidroximetil-açúcares são  
30 o assunto de Patente de Invenção Norte-Americana Número  
5 041 541 (1991).

é um objectivo da presente invenção propor-  
cionar novas saponinas que se hidrolisam muito pouco no  
tubo digestivo. é ainda outro objectivo da presente inven-

35

11 FEB. 1993

Case:4491 X

ção proporcionar novos compostos que fazem baixar o colesterol absorvido pelo organismo e que também baixam os níveis de colesterol no soro em organismos de animais e humanos. Estes e outros objectivos serão evidenciados na discussão descrita na presente memória descritiva.

É um objectivo da presente invenção proporcionar um processo para a preparação destas novas saponinas. É ainda outro objectivo da presente invenção proporcionar estes novos compostos por meio de um processo económico e eficiente. Estes e outros objectivos tornar-se-ão evidentes a partir da discussão que se realiza na presente memória descritiva.

Todas as percentagens são em peso, a não ser que se indique de outra maneira.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

As novas saponinas de acordo com a presente invenção abrangem 5-C-hidroximetil-hexose-mono-sacáridos, di-sacáridos ou tri-sacáridos que estão ligados a esteróis por meio de uma ligação glicosídica. Também se podem utilizar derivados deste 5-C-hidroximetil-carbo-hidrato, incluindo di-sacáridos e tri-sacáridos que contêm pelo menos uma ligação simples açúcar dos novos carbo-hidratos acima mencionados ligados por uma ligação glicosídica a um esterol. Os esteróis são escolhidos do grupo que consiste em espiro-estenóis, tais como diosgenina e tigogenina, assim como outros que incluem colesterol, alfa-sitosterol, beta-sitosterol, estegmasterol, sitostanol, ergosterol e campesterol.

Estas novas saponinas quando são ingeridas por via oral por pacientes humanos ou animais têm como resultado a obtenção de menores níveis de colesterol no soro. Também se espera que protejam contra a arterosclerose e as suas sequelas.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 3/08

1. REV. 1983

Case:4491 X

Na presente invenção, também se incluem as composições farmacologicamente aceitáveis contendo estes derivados de esterol sob a forma de dosagens unitárias.

As novas saponinas de acordo com a presente invenção abrangem 5-C-hidroxi-metil-hexose mono--sacáridos, di-sacáridos ou tri-sacáridos que estão ligados a esteróis por meio de uma ligação glicosídica. Estas 5-C-hidroxi-metil-saponinas preparam-se pelo seguinte processo, que compreende as operações que consistem

- 1) na acilação de 5-C-hidroxi-metil-hexose realizada em duas fases que compreendem
  - a) fazer-se reagir um anidrido de ácido com a referida hexose na presença de uma base;
  - b) fazer-se reagir o produto da operação a) com um anidrido de ácido e uma quantidade catalítica de um ácido forte; e
- 2) na reacção da hexose acilada com um fluoreto na presença de eterato de trifluoreto de boro, fazendo reagir a hexose acilada com um brometo na presença de cianeto de mercúrio e em seguida fazendo reagir o derivado fluorato ou bromado com o esterol.

Como variante, a operação 2) compreende a reacção da hidroxi-metil-hexose axilada com esterol em condições anidras, na presença de trimetil-silil-trifluor-metano-sulfonato.

Os grupos acilo são hidrolisados na presença de um catalisador de alcoolato de metal alcalino para se obter o esterol-5-C-hidroxi-metil-arabino-hexapiranosido.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

DEFINIÇÕES

O termo "compreendendo", tal como é utilizado na presente memória descritiva, compreende as expressões

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/008

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

Handwritten signature and date: 11.11.1983

Case:4491 X

"consistindo em" e "consistindo essencialmente em".

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

As expressões "novas saponinas" e "hidroximetil-saponinas", tal como são utilizadas na presente memória descritiva, referem-se aos derivados de 5-C-hidroximetilo de hexoses e aos seus estérico-isómeros que são ligados a um esterol para proporcionar uma saponina. A ligação faz-se por intermédio de uma ligação glicosídica. Para derivatizar o esterol, podem utilizar-se derivados de mono-sacáridos, di-sacáridos e tri-sacáridos das hexoses.

O termo "esterol", tal como é utilizado na presente memória descritiva, refere-se a esteróis naturais ou sintéticos de origem vegetal ou animal ou a triterpenos. O termo inclui os fitosteróis e os micosteróis, bem como o colesterol. Para um estudo mais pormenorizado dos esteróis, veja-se, por exemplo, W. D. Nes, E. E. J. Parish Ed. "Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids", Academic Press, Inc. (1989).

Os esteróis preferidos são escolhidos do grupo que consiste em diosgenina, estigmastanol, tigogenina, colesterol, alfa-sitosterol, beta-sitosterol, stigmasterol, ergosterol, campesterol, ácidos oleanóicos, sapogenóis de soja, proto-ascigenina, togenóis, protopanaxadióis e protopanaxadióis.

A expressão "galactose-oxidase", tal como é utilizada na presente memória descritiva, refere-se a D-galactose:oxigénio  $\alpha$ -óxido-redutase, que é identificada como E. C. 1.1.3.9 ou sob o número de registo 9028-79-9 de Chemical Abstracts.

O termo "catalase", tal como é utilizado na presente memória descritiva, refere-se a  $H_2O_2:H_2O_2$ -óxido-redutase, que é identificada como E. C. 1.11.1.6. A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogénio. Estas enzimas ocorrem tanto em células vegetais como e células animais.

O termo "hexose" significa um hidrato de

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/80

Case:4491 X

1 carbono que contém seis átomos de carbono. Este termo  
abrange tanto as hexoses que contêm aldeído (aldo-hexoses)  
como as hexoses que contêm cetona (ceto-hexoses).

5 O termo "aldo-hexoses" refere-se ao grupo de  
açúcares cuja molécula contém seis átomos de carbono, um  
grupo aldeído e cinco grupos álcool. Os dezasseis estereo-  
isômeros da série das aldo-hexoses são D-alose, D-altrose,  
D-glucose, D-manose, D-gulose, D-idose, D-galactose,  
D-talose, L-alose, L-altrose, L-glucose, L-manose, L-gulo-  
10 se, L-idose, L-galactose e L-talose. Estes açúcares existem  
em solução sob uma forma de mistura em equilíbrio de diver-  
sas "formas tautoméricas": uma forma de anel de pirano; uma  
forma de anel de furano; ou uma forma de aldeído de cadeia  
linear. As aldo-hexoses podem também ocorrer na configura-  
ção anumérica alfa ou beta, dependendo da posição do grupo  
15 C-1-hidroxilo.

O termo "D-ceto-hexose" refere-se ao grupo  
de açúcares que contêm seis átomos de carbono, um grupo  
cetona e cinco grupos álcool. Os oito estereo-isômeros são  
D- e L-isômeros de psicose, frutose, sorbose e tagatose.  
20 Tal como as aldo-hexoses, estas ceto-hexoses podem existir  
em solução sob a forma de uma mistura em equilíbrio de  
diversas "formas tautoméricas": a forma de anel de pirano;  
a forma de anel de furano; e a forma de cetona de cadeia  
linear.

25 Os compostos específicos e as composições a  
serem utilizadas nestes processos devem, por consequência,  
ser farmacologicamente aceitáveis. Tal como é utilizada na  
presente memória descritiva, a expressão componente "farma-  
ceuticamente aceitável" é um componente apropriado para ser  
30 utilizado em seres humanos e/ou animais sem efeitos secun-  
dários adversos (tais como toxicidade, irritação e resposta  
alérgica), compatíveis com uma proporção razoável de bene-  
fício/risco. Além disso, tal como é utilizada na presente  
memória descritiva, a expressão "quantidade segura e efi-

35

A. FEL. 1993

1 "caz" refere-se à quantidade de um componente que é sufi-  
ciente para proporcionar a resposta terapêutica pretendida  
sem efeitos secundários adversos (tais como toxicidade,  
irritação ou resposta alérgica) compatíveis com uma propor-  
5 ção razoável de benefício/risco quando é utilizada da  
maneira de acordo com a presente invenção. A "quantidade  
segura e eficaz" específica varia com factores tais como o  
estado particular do paciente a tratar, o estado físico do  
paciente, a duração do tratamento, a natureza da terapia  
simultânea (se se fizer alguma) e as formulações especifi-  
10 cas utilizadas.

### DESCRIÇÃO DOS NOVOS COMPOSTOS

16 Para preparar os esteróis de acordo com a  
presente invenção, podem utilizar-se mono-sacáridos, di-  
sacáridos ou tri-sacáridos de 5-C-hidroximetil-aldo-hexose.  
Os derivados de 5-C-hidroximetil-aldo-hexose ureferidos são  
os derivados de galactose, glucose e manose. Devido à  
relativa facilidade de sintetizar compostos à base de  
20 galactose, os derivados de D-galactose são os compostos  
mais preferidos. Estes podem existir sob a forma de aldo-  
hexopiranosea e de aldo-hexofuranoses.

As formas de realização preferidas são os  
derivados de 5-C-hidroximetil de frutos e sorbose, devido à  
25 facilidade de obtenção destes açúcares naturais.

Os di-sacáridos preferidos compreendem pelo  
menos uma 5-C-hidroximetil-aldo-hexose ou uma 5-C-hidroximi-  
30 metil-ceto-hexose.

Os derivados de esterois de acordo com a  
presente invenção contêm pelo menos um grupo de 5-C-hidro-  
ximetil-açúcar (isto é, mono-sacáridos, derivados de mono-  
sacáridos) dos mono-sacáridos acima referidos (I ou II)  
covalentemente ligados por intermédio de ligações de  
glicósido. Os esteróis contêm um grupo álcool que reage com  
35

1. FEV. 1997  
*[Handwritten signature]*

Case:4491 X

o açúcar para formar uma ligação glicosídica.

1 A síntese dos esterol-glicosídeos compreende  
a reacção de uma 5-C-hidroxi-metil-hexose acilada ou prote-  
gida de qualquer outra maneira com um esterol na presença  
de um catalizador ou de um dissolvente inerte. O grupo de  
5 protecção é eliminado e o derivado de esterol preparado.

Também se pode fazer reagir com o esterol o  
correspondente derivado fluorado ou bromado do açúcar.

10 O processo para transformar uma hexose num  
composto à base de 5-hidroxi-metil-D-aldo-hexose realiza-se  
utilizando as seguintes operações:

1. Oxidação Enzimática de D-Aldo-Hexose Baseado com  
Composto com D-Aldo-Hexose: Oxigénio 6-Óxido-Redutase

15 A redução realiza-se num vaso limpo, agita-  
to. Prefere-se um misturador com uma velocidade da ponta  
compreendida entre cerca de 30,5 a 122 metros por minuto  
((100 e 400 pés por minuto). As condições de esterilização  
evitam a desactivação da enzima por contaminação microbia-  
20 na.

Prepara-se uma solução aquosa com uma con-  
centração compreendida entre cerca de 1 e cerca de 50%,  
preferivelmente entre cerca de 10 e cerca de 20% de um  
composto à base de D-aldo-hexose. Ajusta-se o pH da solução  
25 para reforçar a cinética da reacção. Pretende-se um pH da  
solução compreendido entre cerca de 6 e cerca de 8 quando  
se utiliza galactose-oxidase como enzima. A transformação  
enzimática com galactose-oxidase necessita de uma tempera-  
tura compreendida entre cerca de 1 e cerca de 50°C. A  
30 reacção pode realizar-se a temperaturas até à temperatura  
de desactivação da enzima. No entanto, a temperaturas  
maiores, pode verificar-se o desenvolvimento de micróbios.  
Uma temperatura compreendida entre cerca de 3 e cerca de  
25°C proporciona uma boa estabilidade da enzima, bons

35

Mod. 71 - 20.000 ex. - X/0/08

REV. 1974

Case:4491 X

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

valores de saturação do oxigénio a pressão normal e uma cinética da reacção razoável para a galactose-oxidase. Os tempos de reacção típicos estão compreendidos dentro do intervalo de cerca de uma a cerca de vinte e quatro horas.

À solução tipicamente adiciona-se entre cerca de 1.000 e cerca de 1.000.000 de unidade de actividade de enzima por mole de D-aldo-hexose ou de compostos à base de D-aldo-hexose. Preferivelmente, utiliza-se uma actividade compreendida entre cerca de 100.000 e 300.000 unidades.

O nível de oxigénio disponível em solução também afecta a operação de oxidação; prefere-se uma solução saturada com oxigénio. Pode fazer borbulhar-se continuamente ar e/ou oxigénio através da solução para manter a saturação de oxigénio. Pode insuflar-se continuamente 2 ou 3 volumes de ar por volume de solução por minuto utilizando anéis de espalhamento com elevada área de contacto o que proporciona bons resultados. Os agentes anti-espumificantes apropriados incluem dimetil-silicone, outros compostos de organo-silicone e o silicone FG-10 (da firma Dow Chemical). O nível de agente anti-espumificante está compreendido entre 10 e 100 ppm.

é também vantajoso reduzir ou eliminar a quantidade de peróxido livre no vaso de reacção. Pode utilizar-se a adição de cerca de 10.000 a cerca de 2.000.000 de unidades de actividade de catalase por mole de composto de D-aldo-hexose. Podem empregar-se outros procedimentos para a remoção do peróxido. Verificou-se que catiões cobre presentes na solução de oxidação melhoram a estabilidade da enzima. Utiliza-se entre cerca de 0.1 mM a cerca de 2 mM de  $CuSO_4$ . A albumina do soro é também um bom estabilizador da enzima.

Finalmente, a catalase e a D-aldo-hexose:oxigénio ó-óxido-redutase são separadas da solução do produto. Isto pode fazer-se utilizando métodos convencionais. A

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/04

11/11/1993

Case:4491 X

técnica de separação preferida é a ultrafiltração através de uma membrana com cerca de 1.000 a cerca de 30.000 unidades de peso molecular de corte (MWCO).

2. Condensação do Produto da Oxidação com Aldeído Fórmico de Maneira a Obter-se Derivados de 5-C-Hidroxi-tilo do D-Galactose Composto Baseado em

Adicionam-se entre cerca de 4 e cerca de 40 equivalentes molares de aldeído fórmico (mais preferivelmente entre cerca de 4 e cerca de 8 equivalentes molares) e entre cerca de 1 e cerca de 13 equivalentes, entre cerca de 1 e cerca de 3 equivalentes molares) à solução filtrada proveniente da operação 1 (substrato). Prefere-se uma concentração resultante compreendida entre cerca de 10 e cerca de 30% de substrato. Prefere-se um valor de pH compreendido entre cerca de 12 e cerca de 13. A solução de reacção é mantida a uma temperatura compreendida entre cerca de 15 e cerca de 40°C até se completar a reacção. Pode ser necessário arrefecimento até a reacção exotérmica ter cessado (tipicamente, cerca de uma hora). Agita-se a solução até a reacção de condensação ter atingido o grau de completamento pretendido (cerca de uma a cerca de vinte e quatro horas, tipicamente, dezasseis horas).

A fim de se controlar a temperatura e o pH durante a reacção de condensação (evitando-se desta forma a destruição do aldeído), prefere-se fazer reagir previamente o aldeído fórmico com o hidróxido de sódio numa operação separada. As soluções de aldeído fórmico aquoso e de hidróxido de sódio são combinadas e agitadas a uma temperatura compreendida entre cerca de 15 e cerca de 35°C até a reacção exotérmica terminar (tipicamente, cerca de trinta minutos). Aquece-se então a solução até uma temperatura compreendida entre cerca de 15 e cerca de 40°C e adiciona-se rapidamente à solução de filtrado obtida na operação 1.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/01

1. FEV. 1993

Case:4491 X

1 enquanto se mantém uma temperatura compreendida entre cerca de 15 e cerca de 40°C. Agita-se a solução até a reacção de condensação ter atingido o grau de completamento pretendido.

5 É possível utilizar outras bases (por exemplo, Ca(OH)<sub>2</sub>, KOH e as suas misturas) em vez de todo ou parte do hidróxido de sódio.

10 Um outro processo para realizar a reacção de condensação com o aldeído fórmico é por intermédio da reacção do aldeído de açúcar que é produzido por intermédio da reacção de oxidação com galactose-oxidase e aldeído fórmico numa resina fortemente básica. O produto da oxidação e o aldeído fórmico são feitos contactar com uma resina que tem um valor de pH pelo menos igual a 11,5, a temperaturas compreendidas entre cerca de 20 e cerca de 50°C, 15 durante 0,5 a 24 horas. Utiliza-se uma proporção de aldeído fórmico para aldeído de açúcar compreendida entre 4 : 1 e 8 : 1. Preferivelmente, a proporção está compreendida entre cerca de 4 : 1 e cerca de 5 : 1.

20 Na mistura da reacção de oxidação, encontram-se presentes sais e tampões suficientes para formar e manter as condições fortemente básicas necessárias para realizar a reacção de condensação. À medida que a reacção progride, formam-se sais adicionais a partir do ácido fórmico formado e estes são absorvidos pelas resinas. A 25 utilização de aldeído fórmico isento de metanol e de óxido cúprico como catalisador facilita a reacção.

30 O produto desta reacção pode ser purificado utilizando a destilação fraccionada para eliminar o excesso de aldeído fórmico e/ou técnicas de adsorção de uma maneira semelhante à outra reacção de condensação.

3. Purificação

35 Da solução de reacção resultante, devem ser

Mod. 71 - 20.000 ex. - X/108

EL.FEV.1993

Case:4491 X

1 eliminados os iões indesejados (por exemplo,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}^+$ )  
e o aldeído fórmico residual. A purificação pode realizar-  
se por meios convencionais, tais como utilização de resinas  
de adsorção, diálise, precipitação ou uma combinação de  
5 diversas técnicas. A destilação fraccionada pode também ser  
utilizada para remover efectivamente o aldeído fórmico.

A solução resultante da operação de purifi-  
cação acima mencionada contém geralmente entre cerca de 1 e  
50% de produto de 5-C-hidroxi-metilo. A solução que contém o  
produto aquoso purificado pode ser utilizada directamente  
10 ou concentrada até níveis maiores (por exemplo, até entre  
cerca de 90% e cerca de 95% de açúcar).

é desejável concentrar a solução a baixas  
temperaturas para evitar a decomposição térmica do composto  
de 5-C-hidroxi-metilo. Prefere-se a osmose inversa empregan-  
do membrana com cerca de 100 MWCO e uma rejeição de 99% de  
15 NaCl a temperaturas compreendidas entre cerca de 10 e cerca  
de 38°C. Os exemplos destas membranas incluem membranas  
compósitas de película fina de poli-sulfona/poliamida HR-98  
ou HR-99, fabricadas por Niro Corporation.

20 O processo mais directo para cristalizar os  
compostos à base de 5-C-hidroxi-metil-aldo-hexose consiste  
em saturar uma solução aquosa a uma temperatura elevada e  
arrefecê-la para precipitar os cristais de produto. No  
entanto, esta técnica pode ser prejudicada pela presença de  
25 impurezas e de subprodutos nas solução. A seguinte técnica  
é mais eficaz para precipitar o produto e reduzir o nível  
de impurezas e de subprodutos.

Prepara-se uma solução a 90-95% do composto  
produzido. Elimina-se a água usando adições de etanol  
30 (1 : 1)/evaporações (geralmente são suficientes uma ou duas  
destas maneiras de proceder).

O residuo sólido resultante da evaporação  
dinal do etanol é dissolvido em metanol sob refluxo;  
utiliza-se uma proporção de 1 : 1 a cerca de 3 : 1 de

35

11 FEB 1997

Case:4491 X

1 metanol para sólido. Esta operação é seguida pelo arrefeci-  
mento da solução até uma temperatura compreendida desde  
cerca de -10 a cerca de 20°C, durante entre cerca de uma a  
cerca de doze horas. Os cristais são então filtrados e  
lavados com metanol frio (cerca 0°C).

5 O metanol residual pode ser removido por  
secagem e/ou por recristalização em água. Os cristais podem  
ser lavados com acetona para retirar ainda mais impurezas.

10 Os solventes utilizados na cristalização  
podem ser eliminados por secagem em vácuo, em leito fluidi-  
zado ou por outras técnicas conhecidas.

Uma descrição pormenorizada da síntese  
destes compostos está referida no pedido de patente de  
Mazur e col., EP 0 341 063 (1989).

15 4. Acilação de 5-C-Hidroximetil-hexose

20 Em primeiro lugar, a 5-C-hidroximetil-hexose  
é transformada numa 5-C-hidroximetil-hexose acilada para  
proteger o açúcar durante as reacções subsequentes e para  
controlar os produtos da reacção quando o açúcar reage com  
o esteroi.

25 A 5-C-hidroximetil-hexose é transformada no  
derivado acilado por meio de uma reacção de esterificação  
em duas fases. Para produzir os ésteres, pode utilizar-se  
qualquer anidrido do ácido carboxílico. Preferivelmente,  
utilizam-se os anidridos de ácidos que têm dois a seis  
átomos de carbono. Mais preferivelmente, utiliza-se o  
anidrido acético para proteger os grupos hidroxilo.

30 Faz-se reagir a 5-C-hidroximetil-hexose com  
um anidrido de ácido na presença de uma base. A piridina  
utilizada como dissolvente funciona bem nesta reacção. A  
reacção realiza-se geralmente às temperaturas ambientes.

Nesta reacção inicial, esterificam-se quatro  
radicais hidroxilo de um mono-sacárido e acilam-se até seis

35

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

21. FEV. 1993

Case:4491 X

ou sete radicais hidroxilo de um di-sacárido. Durante esta reacção, forma-se o derivado anidro do açúcar.

O açúcar parcialmente acilado é em seguida feito reagir com o anidrido de ácido carboxílico adicional e uma quantidade catalítica de ácido sulfúrico concentrado ou anidro. Esta operação abre a ponte anidra e adicionam-se mais dois grupos acilo. A 5-C-hidroxi-metil-hexose está agora completamente acilada. Os derivados acilados são geralmente cristalinos e formam-se com bom rendimento.

A acilação pode realizar-se numa única fase utilizando um excesso de anidrido de ácido e ácidos anidros ou muito concentrados, preferivelmente ácido sulfúrico, como catalisador. No entanto, este processo não é o preferido.

A título de exemplo, as seguintes condições de realização da reacção originam bons resultados:

- Temperatura : ambiente.
- Dissolvente : piridina.
- Duração : uma a vinte e quatro horas.
- Proporção de anidrido de ácido/substrato de hidrato de carbono : 1 a 2 equivalentes por cada grupo hidroxilo.

O derivado de açúcar parcialmente acetilado ou a 5-C-hidroxi-metil-hexose podem ser esterificados utilizando um catalisador ácido nas seguintes condições :

- Temperatura : 0 a 200C.
- Dissolvente : anidrido acético.
- Duração : uma a vinte e quatro horas.
- Catalisador : ácido sulfúrico concentrado, ácido fosfórico ou ácido trifluormetano-sulfónico.

5. Condensação com Esterol

A hexose hexa-acilada é acoplada com o esterol por meio de uma das seguintes vias :

1. reacção com esterol utilizando trimetil-silil-tri-

Mod. 71 - 20.000 s.s. - 9/08

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

151.1937

Case:4491 X

fluormetano-sulfonato:

- 1 2. transformação do derivado de 1-bromo e em seguida reacção com o esteroi: e
3. transformação do derivado de 1-flúor e reacção com o esteroi.

5 Na opção 1., mistura-se o esteroi com a hexa-acil-5-C-hidroxi-metil-hexose e trifluormetano-sulfonato de trimetil-sililo no seio de um dissolvente inerte. Preferivelmente, como dissolventes, utilizam-se hidrocarbonetos clorados. Emprega-se uma proporção compreendida entre 1 : 1 e 2 : 1 de hexose para esteroi. Esta reacção proporciona o penta-acil-5-C-hidroxi-metil-hexose-esteroi com rendimentos iguais a cerca de 20%.

15 No caso da opção 2., forma-se uma 1-bromo-penta-acil-5-C-hidroxi-metil-hexose instável fazendo reagir brometo de hidrogénio no seio de ácido acético com o derivado de açúcar acilado. O derivado de bromo é geralmente instável e deve ser feito reagir imediatamente com o esteroi e um catalisador. A reacção realiza-se em pequenas quantidades utilizando hidrocarbonetos clorados como dissolvente. Obtém-se um rendimento de 30% ou menor. Nesta reacção, o cianeto de mercúrio actua bem como catalisador.

25 No caso da opção 3., forma-se uma 1-flúor-pentacil-5-C-hidroxi-metil-hexose estável fazendo reagir a hexose acilada com piridina e fluoreto de hidrogénio. Uma possível reacção secundária compreende a clivagem do grupo acetilo da posição 2 da hexose. Este grupo hidroxilo é facilmente reacilado fazendo reagir o composto fluorado na posição 1 com um anidrido de acilo, como se descreveu acima.

30 Os derivados fluorados na posição 1 preparados por este processo são cristalinos e estáveis. Podem ser cristalizados com etanol ou outros álcoois de alquilo e armazenados. Estes materiais constituem boas fontes de 5-C-hidroxi-metil-hexose para a derivatização de certo número de

ALL REV 1993

1 materiais. São muito reactivos nas reacções de acoplamento com esteróis.

5 A reacção destas 1-flúor-pentacil-5-C-hidro-ximetil-hexose com o esterol realiza-se melhor quando o esterol tenha sido transformado no seu derivado de trimetil-sililo (TMS). A reacção com o TMS-esterol realiza-se utilizando hidrocarbonetos clorados como dissolventes e eteratos de trifluoreto de boro como catalisadores. O produto resultante é um derivado de pentacil-5-C-hidroxi-

10 metil-hexose do esterol. Os derivados de pentacilo de hidroximetil-saponinas são cristalinos e facilmente purificados por meio de técnicas convencionais. Os grupos acilo são agora hidrolisados para preparar esteril-5-C-hidroximetil-hexósido.

15 Para hidrolisar os compostos de pentacilo, eles são suspensos em metanol ou outro álcool de alquilo inferior e adiciona-se um alcoolato de metal alcalino (por exemplo, metóxido de sódio). Agita-se a mistura durante cerca de quatro a vinte e quatro horas à temperatura de refluxo ou à temperatura ambiente.

20 Filtra-se o produto e leva-se com álcool. O produto é uma substância sólida. O álcool reagente e de lavagem contém derivados adicionais de 5-C-hidroximetil-hexose-esterol, que podem ser recuperar o álcool através de uma coluna de resina da forma ácida de Amberly e R120 (da firma Aldrich) até que o álcool (metanol) seja neutro. A saponina é recuperada a partir do eluente alcoólico.

25 O derivado de esterol pode ser seco sob vácuo para eliminar quaisquer vestígios de dissolvente.

30 Verificou-se que as condições reaccionais acima mencionadas proporcionam bons rendimentos de hidroximetil-saponinas.

AL REV. 1993

Case:4491 X

Método de Tratamento

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

Uma quantidade segura e eficaz de hidroximetil-saponina é fornecida a animais ou a seres humanos. Geralmente, utiliza-se uma dose compreendida entre 5 e 600 mg por quilograma de peso corporal. Preferivelmente, esta dose está compreendida entre 5 a 200 mg/kg e é administrada uma a quatro vezes por dia.

As formas de dosagem sólidas incluem comprimidos, cápsulas, grânulos, pós e granel, bolos ou bolachas e produtos do tipo de rebuçados. Os comprimidos podem conter agentes apropriados como ligantes, lubrificantes, diluentes, desintegrantes, corantes, apaladantes, que provoquem o fácil escorregamento e que auxiliem a derreter. As formas de dosagem líquidas por via oral incluem soluções aquosas, emulsões, suspensões, soluções e/ou suspensões reconstituídas a partir de grânulos não efervescentes e preparações efervescentes reconstituídas a partir de grânulos efervescentes. Estas formas de dosagem por via oral líquidas podem conter, por exemplo, dissolventes apropriados, agentes preservantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensão, diluentes, agentes edulcorantes, agentes para derreter e agentes corantes e apaladantes. Uma forma de dosagem líquida preferida é constituída por uma bebida que contém sumo ou outro tipo de bebida.

Exemplos específicos de agentes veiculares e excipientes farmacologicamente aceitáveis que podem ser utilizados para formular as formas de dosagem por via oral de acordo com a presente invenção são descritos na patente de Invenção Norte-Americana Número 3 309 297, concedida a Robert em 2 de Setembro de 1975. Técnicas e composições para formas de dosagem úteis nos métodos de acordo com a presente invenção são descritos nas seguintes referências Modern Pharmaceutics, capítulos 9 e 10 (Banker & Thodes, Editores, 1975); Lieberman e col., Pharmaceutical Dosage

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/08

Handwritten signature and date: 21 FEB 1993

Case:4491 X

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

Forms: Tablets (1981); e Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 2da. Edição (1976).

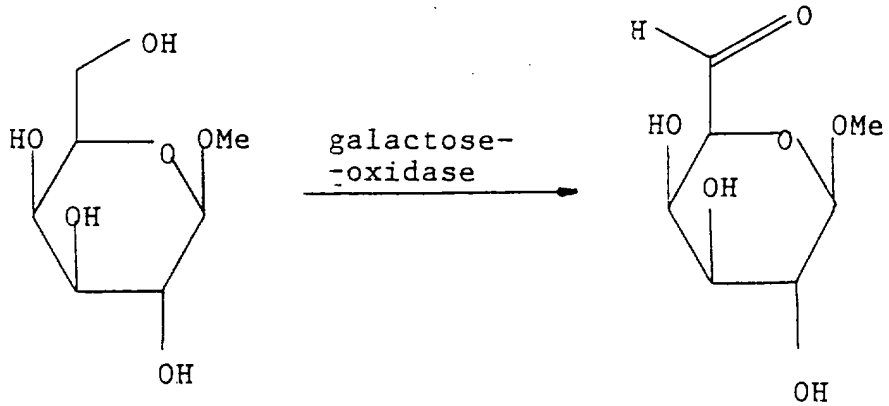
Os 5-C-hidroximetil-hexose-esteróis podem também ser utilizados em combinações com agentes liqantes dos ácidos biliares ou inibidores da síntese do colesterol, por exemplo, psílio, celulose ou colestiramina.

A preparação dos 5-C-hidroximetil-hexose-esteróis é descrita nos Exemplos seguintes. Os Exemplos são apenas ilustrativos da invenção e não se pretende que a limitem.

EXEMPLO I

Preparação de metil-5-C-hidroximetil-alfa-L-arabino-hexopiranosido a partir de metil-beta-D-galactósido

1. Oxidante de metil-beta-D-galactopiranosido com galactose-oxidase



Reagentes	Massa molecular	Moles	Quantidade
Metil B-D-galactopiranosido	194,18	0,103	20,0 g

Sigma Chemical Co.,  
(No. M-6757)

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/08

Alfalu 1993

Case:4491 X

1	Tampão de fosfato, 100 mM	----	----	412,0 ml
	Catalase, 16900 unidades/mg	----	----	7,5 mg
5	Sigma Chemical Co., (No. C-40)			
	Galactose-oxidase	---	---	9000 unidades

10 A reacção realiza-se num vaso de um litro equipado com um distribuidor de ar e agitador suave. Utiliza-se condições estéreis para evitar a desactivação da enzima por contaminação do micróbios. A reacção efectua-se a 40C para minimizar a desactivação da galactose-oxidase.

15 Dissolve-se metil-beta-D-galactopiranosido (81) no tampão de fosfato arejado. O caudal volumétrico do ar descarregado pelo arejador é regulado para se obter uma solução saturada com oxigénio, enquanto se evita a formação de espuma na solução. A 40C, adicionam-se galactose-oxidase e catalase e areja-se a solução durante vinte horas.

20 As enzimas são separadas da solução obtida como produto por ultrafiltração usando uma membrana de 10.000 MWCO (Diaflo 13242, fabricada por Amicon). O filtrado resultante contém o produto de oxidação, metil-beta-D-galacto-hexo-dialo-1,5-piranosido ((2)).

25 2. Condensação do produto da oxidação com aldeído fórmico para obtenção de metil-5-C-hidroximetil-alfa-L-arabino-hexapiranosido (3)

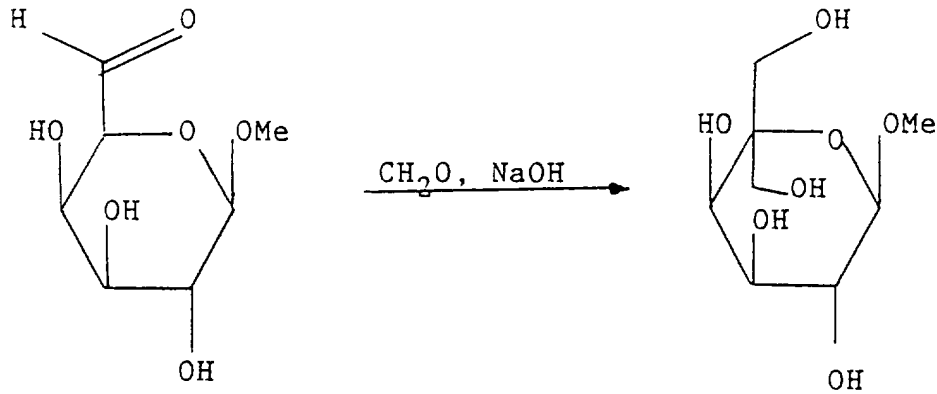
Mod. 71 - 20.000 es. - 9/08

30

35

*Handwritten signature*  
 FEB 1957

1  
5  
10

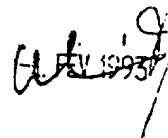
23

Reagentes

Quantidade

15	Solução filtrada contendo o produto de oxidação da fase 1 metil B X <sup>-</sup> D-galacto-hexadialdo-1,5-piranosido	400 ml
	Solução (aquosa) a 37% de aldeído fórmico	400 ml
20	Solução (aquosa) a 50% de hidróxido de sódio	144 ml

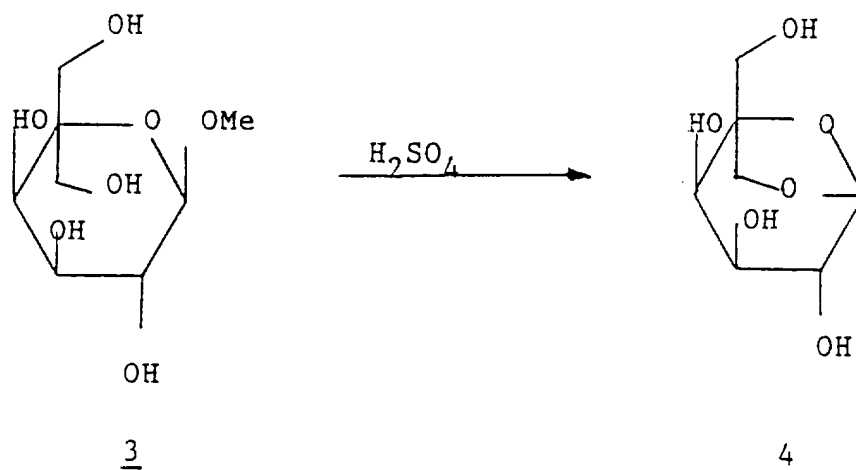
25 Combina-se a solução filtrada proveniente da operação 1 com a solução de aldeído fórmico num vaso de um litro. Adiciona-se a solução de hidróxido de sódio à solução do filtrado/aldeído fórmico durante o intervalo de tempo de uma hora enquanto se mantém a temperatura da solução compreendida entre 20 e 25°C com banho de gelo-  
 30 água. Depois de a reacção exotérmica ter terminado, retira-se o banho de gelo-água e agita-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante dezasseis horas. Aquece-se a mistura reaccional a 55°C e desioniza-se utilizando colunas de permuta de iões : primeiro, com Amberlite IR-120 ((H+),  
 35



depois com Amberlite IRA-400 (OH<sup>-</sup>), sendo ambos os enchi-  
 1 mentos fabricados por Rohm & Haas. Por fim, a solução  
 desionizada do produto é eluída através de uma coluna  
 contendo resina permutadora de iões de Amberlite IRA-400  
 (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) para remover o aldeído fórmico restante. A evapo-  
 5 ração lenta à temperatura ambiente até à secura, seguida  
 de secagem do resíduo à temperatura ambiente sob vácuo  
 durante a noite origina 18,5 gramas (80%) do produto (3).

### EXEMPLO II

#### Preparação de 1,6-anidro-5-C-hidroximetil-beta-L-altropira- nose



25 Dissolve-se metil-5-C-hidroximetil-alfa-L-  
 arabino-hexapirranose (3) (59 gramas, 0,263 mole) em ácido  
 sulfúrico 0,70 M (260 ml) e agita-se a 100°C durante noventa  
 minutos. Arrefece-se a solução até à temperatura ambien-  
 te e neutraliza-se utilizando uma resina permutadora de  
 30 iões (Amberlite IRA-400 (OH<sup>-</sup>)). Separa-se a resina por  
 filtração e aquece-se o filtrado a refluxo durante quinze  
 minutos com carvão activado (4,0 gramas). Separa-se o  
 carvão por meio de um filtro de fibra de vidro e evapora-se  
 o filtrado até à secura com etanol. Aquece-se a refluxo o

EL. FIV. 1993

Case:4491 X

1 resíduo branco com a forma de cera durante quinze minutos  
com metanol (50 ml). Guardar-se a solução durante a noite a  
09C. Filtra-se o produto para se obterem 20 gramas (39,6%)  
de 1,6-anidro-5-C-hidroximetil-beta-L-altropiranoose (4).

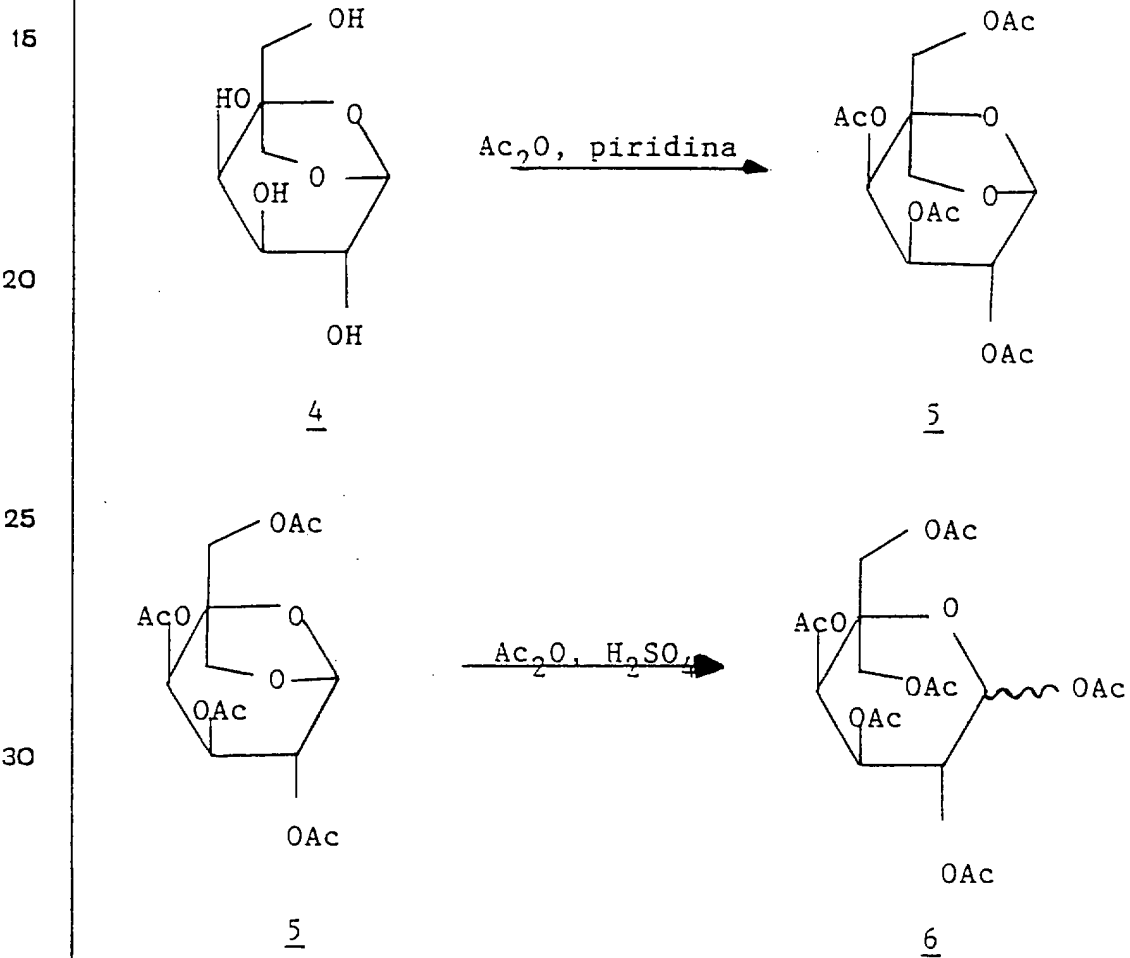
5 Ponto de fusão = 166,5 - 168,59C.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +145.1 (c 7,2 em água)

D

EXEMPLO III

10 Preparação de 5-C-acetoximetil-1,2,3,4,6-penta-O-acetil-L-  
arabino-hexapiranoose (6)



Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/08

-1. FEV. 1993

Case:4491 X

1                   À temperatura ambiente durante três horas,  
agita-se uma solução de 1,6-anidrido-5-C-hidroxi-  
metil-beta-L-altropiranosose bruta (4) (10 gramas, 52 milimoles) numa  
mistura de anidrido acético (100 ml) e piridina (100 ml).  
Despeja-se a mistura reaccional em água com gelo (300 ml)  
5 e extrai-se o produto com cloreto de metileno (300 ml).  
Lava-se a fase orgânica com HCl 1 molar (3 x 400 ml),  
bicarbonato de sódio (300 ml) e água (300 ml).

10                   A evaporação do dissolvente origina 19  
gramas de 5-C-acetoximetil-1,6-anidrido-2,3-tri-O-acetil-beta-  
L-altropiranosose bruta (5), que, sem sofrer qualquer poste-  
rior purificação, é dissolvida em anidrido acético (300 ml)  
e a solução é arrefecida a 0 - 5°C. Enquanto se mantém esta  
temperatura, adiciona-se lentamente ácido sulfúrico (30  
gramas).

15                   Depois de se ter completado a adição, reti-  
ra-se o banho de gelo e agita-se a solução à temperatura  
ambiente durante duas horas. Nesse momento, o ensaio de  
cromatografia em camada fina (placas de Analtech GF, tolu-  
eno : cetona, 2 : 1) mostra a presença de um produto único  
20 principal com uma pequena quantidade de impurezas mais  
polares. Destrói-se o excesso de anidrido acético por  
adição lenta de água (45 ml) com arrefecimento a temperatu-  
ras inferiores a 30°C. Subdivide-se a solução resultante  
entre cloreto de metileno (300 ml) e solução aquosa de  
25 bicarbonato de sódio (300 ml), lava-se a fase orgânica  
repetidamente com bicarbonato de sódio (3 x 300 ml) e água  
(300 ml). A evaporação do dissolvente origina 17,0 gramas  
(70% de rendimento) de (6).

30   [6] 26,2 = +39,5° (C 8,3 em CHCl<sub>3</sub>).

D

Análise calculada para C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>13</sub> : C 49,35; H 5,67.

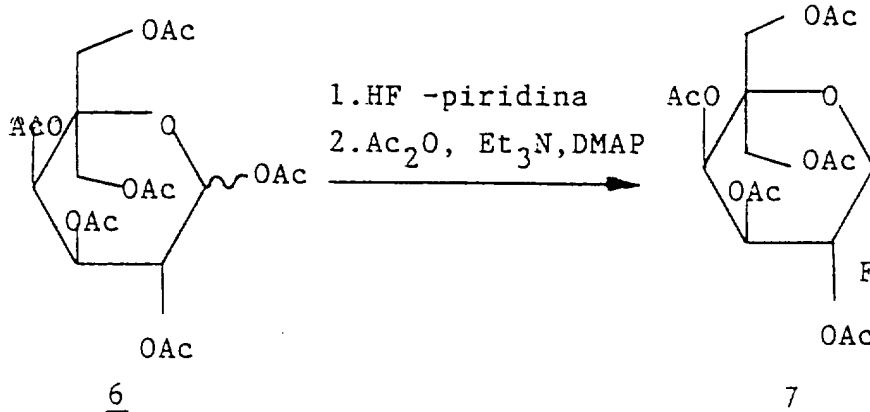
Valores determinados : C 49,16; H 5,60.

FLV. 1993/7

Case:4491 X

EXEMPLO IV

Síntese de 5-C-acetóxi-metil-1-flúor-2,3,4,6-tetra-O-acetil-L-arabino-hexopiranosse (7)



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

Dissolve-se 1,2,3,4,6,6'-hexa-O-acetil-5-C-hidroxi-metil-alfa/beta-L-arabino-hexapiranosse (74 gramas) em complexo de HF-piridina frio (0°C) (200 gramas). Retira-se o banho de arrefecimento e continua-se a agitação até que a análise de cromatografia em camada fina mostra o completo desaparecimento do material de partida (cerca de três a quatro horas). Dilui-se a mistura reaccional com cloreto de metileno (1,5 litros) e lava-se a solução com solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 300 ml) e com salmoura (300 ml). Seca-se a solução sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtra-se e concentram-se os dissolventes até cerca de 500 ml. Em seguida, adiciona-se trietilamina (22 ml) e anidrido acético (15 ml), seguidos de 4-dimetilamino-piridina (50 mg) e agita-se a mistura á temperatura ambiente durante cerca de uma hora. Em seguida, dilui-se a mistura com cloreto de metileno (1 litro), lava-se com solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 300 ml) e salmoura (300 ml), seca-se sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e filtra-se. Eliminam-se os dissolventes in vacuo e cristaliza-se o produto bruto (etanol) para se obter 5-C-acetoximetil-1-flúor-2,3,4,6-tetracetil-L-arabino-hexapira-

Mod. 71 - 20.000 ex. - 10/00

-1.FEV.80  
*al*

nósido (46,5 gramas).

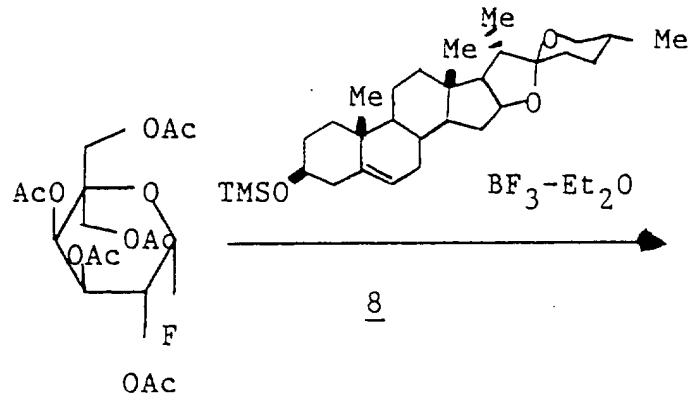
1

EXEMPLO V

5

Diosgenina-5-C-acetoximetil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-arabino-hexopiranosido (9)

10

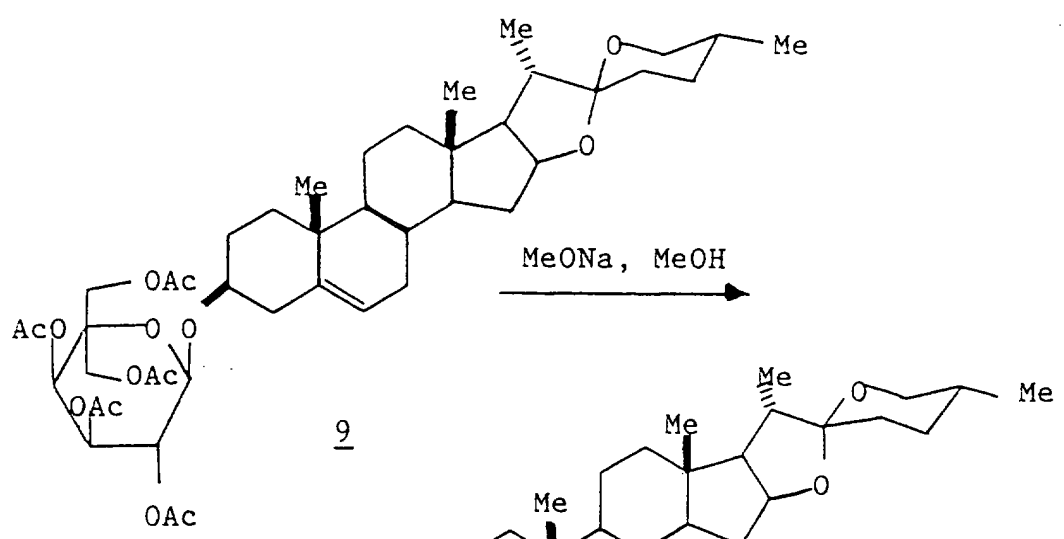


15

7

8

20



25

9

11

30

35

OH

27

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

11 FEB 1993

Case:4491 X

1 A uma solução fria (0°C) de 5-C-acetoxime-  
til-2,3,4,6-tetracetoxi-1-flúor-L-arabino-hexopiranosídeo  
(12,7 gramas) e trimetil-silil-diosgenina (15 gramas) em  
1,2-dicloro-etano (300 ml) isento de água adiciona-se  
5 complexo de  $BF_3 \cdot Et_2O$  (19,5 ml). Retira-se o banho de arrefecimento e agita-se a mistura durante uma hora, depois do que a análise de cromatografia em camada fina mostra o complexo desaparecimento do fluoreto.

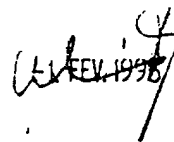
10 Dilui-se a mistura reaccional com cloreto de metileno (300 ml), transfere-se para uma ampola de decantação e lava-se com solução aquosa saturada de  $NaHCO_3$  (2 x 100 ml) e com salmoura (100 ml). Seca-se a solução sobre  $Na_2SO_4$ , filtra-se e concentra-se o dissolvente até se obter um volume de cerca de 100 ml. Adiciona-se então trietilamina (4 ml) e anidrido acético (2,5 ml), seguidos de 4-dimetilamino-piridina (10 mg) e agita-se a mistura á temperatura ambiente durante cerca de uma hora. Em seguida, dilui-se a mistura com cloreto de metileno (200 ml), lava-se com solução aquosa saturada de  $NaHCO_3$  (2 x 100 ml) e com salmoura (100 ml), seca-se sobre  $Na_2SO_4$  e filtra-se. Em seguida, elimina-se os dissolventes em vácuo e purifica-se o produto bruto por cromatografia em gel de sílica para se obter diosgenina-5-C-acetóxi-metil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-beta-D-arabino-hexapiranosídeo (11,8 gramas) sob a forma de sólido branco.

25 Hidrólise para obtenção de diosgenina-5-C-hidróxi-metil-beta-D-arabino-hexapiranosídeo

30 Suspende-se este produto em metanol (400 ml) e adiciona-se metóxido de sódio (2 ml de uma solução a 25% em metanol). Depois de se agitar durante vinte horas á temperatura ambiente, filtra-se a mistura e lava-se cuidadosamente com metanol. Neutraliza-se as lixívias de lavagem metanólicas depois de combinadas com Amberlite<sup>®</sup> IR-120 e

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/08

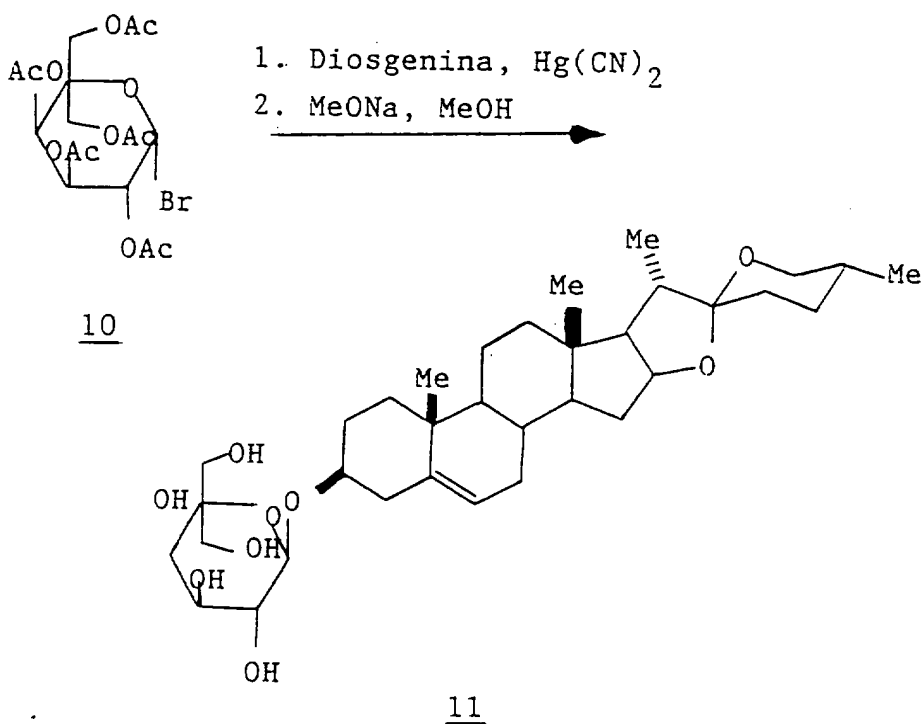
35



evaporar-se o dissolvente. Combinam-se os sólidos com o  
 filtrante e seca-se em vácuo para se obterem 8.22 gramas de  
 diosgenina-5-C-hidroximetil-beta-D-arabino-hexapiranósido.

EXEMPLO VI

Síntese de diosgenina-5-C-hidroximetil-L-arabino-hexapira-  
nósido



Misturou-se 2,3,4,6-tetracetil-5-C-acetoxi-  
 metil-1-bromo-L-arabino-hexapiranósido, preparado a partir  
 de per-O-acetil-5-C-hidroxi-metil-L-arabino-hexapiranósido  
 (18 gramas) de acordo com o método corrente, com diosgenina  
 (12,3 gramas), cianeto mercúrio (14,5 gramas) em 1,2-diclo-  
 ro-etano (250 ml) isento de água, a 50°C durante vinte  
 horas. Lavou-se a mistura reaccional sucessivamente com  
 água (1.000 ml), solução aquosa a 10% de hidreto de sódio

REV. 1963

Case:4491 X

(2 x 200 ml), solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (200 ml) e água (200 ml). Em seguida, secou-se a fase orgânica e evaporou-se. Purificou-se o resíduo bruto e hidrolisou-se como se descreveu no Exemplo V.

Avaliação como agentes hipocolesterolémicos

Compararam-se quatro materiais utilizando celulose como controlo negativo e colesteramina como controlo positivo. As saponinas ensaiadas foram diosgenina-galactósido (DG), diosgenina-5-C-hidroximetil-L-arabino-hexapiranósido (DHG), colesterol-galactósido (CG) e 5-C-hidroximetil-arabino-hexapiranósido-colesterol (CHG).

Dieta

A dieta de base consistiu em 0,2% (em peso/peso) de colesterol (Byron Chemical Co., Long Island City, NY, Estados Unidos da América), misturado com uma mistura contendo 10% de gordura de comida moída (NIH-07), preparada por Research Diets, Inc.. Utilizaram-se resina de colesteramina (Sigma Chemical Co.) e celulose microcristalina Avicel PH-101 (FMC Corp.). A concentração final de cada um dos produtos de ensaio das dietas era igual a 0,75% em peso.

Animais e Concepção do Estudo

Cricetos "hamsters" do sexo masculino da espécie Golden Syrian com cerca de sessenta dias de idade (90 a 100 gramas) foram obtidos em Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, MA, estados Unidos da América. Os animais foram guardados aos pares em gaiolas de plástico com o fundo elevado para evitar a coprofagia. Depois da chegada, os animais foram alimentados com uma comida comer-

Mod. 71 - 20.000 ex. - 20/68

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

1 cial moída (Purina Rodent Laboratory Chow HQ. 5001) e foram  
acimados a um ciclo de luz de doze horas invertido (luz  
das 12:30 p.m. às 12:30 a.m. Os animais foram distribuídos  
aleatoriamente por seis grupos de estudo com oito animais  
5 cada um e foram colocados em dietas de ensaio. Um animal do  
grupo de ensaio de DG foi subsequentemente utilizado para  
estudo. Registou-se o consumo de alimentos e de água e os  
pesos corporais pelo menos duas vezes por semana durante a  
realização do estudo. A aleatorização designou duas datas  
sucessivas de início (sete a oito dias de adaptação ao  
10 local) e datas de necropsia. Iniciou-se a recolha das fezes  
durante sete dias depois de dois dias a seguir ao início  
das dietas de ensaio. Depois de catorze dias de dieta, os  
cricetos foram individualmente anestesiados por ordem  
aleatória numa câmara de dióxido de carbono. Recolheu-se  
15 sangue da veia cava para realizar ensaios dos teores dos  
lípidos do sangue. Estas amostras de sangue foram conserva-  
das em frigoríficos durante não mais de uma hora antes de  
se isolar o plasma. Isolou-se o plasma por centrifugação em  
condições muito frias.

#### Determinação dos Lípidos do Plasma

Quantificou-se o colesterol no plasma e o  
HDL (método de precipitação) e o triglicérido do plasma  
25 (corrigida relativamente ao glicerol livre) por ensaios  
enzimáticos, utilizando um analisador de química clínica  
automatizado (Hitachi 705). Calculou-se o colesterol de  
não-HDL por diferença.

#### Determinação do Esterol Neutro na Fezes

Homogeneizaram-se as fezes recolhidas acumu-  
ladas durante sete dias em cada gaiola em água fria por  
meio de um homogeneizador Polytron, congelou-se, liofili-

6 FEB 1977

1 course e pulverizou-se. A seguir à extracção com clorofórmio e metanol na proporção de 2 : 1 (Soxhlet), recuperaram-se os lípidos da fase clorofórmica, secaram-se até peso constante e em seguida redissolveram-se em clorofórmio. Repicaram-se alíquotas dos extractos com 5-alfa-colestano (padrão interno) e secaram-se sob atmosfera de azoto. Transformaram-se os esteróis em derivados de éter trimetilsilílico (TMS) (Sylon RTZ, Suelco, Bellefonte, pA, Estados Unidos da América) e quantificaram-se por GC/FID. Confirmou-se a identificação do colesterol, do coprostanol e da diosgenina nos extractos das fazes por espectrometria de massa. A coprostanona foi um metabólito mínimo do colesterol consistentemente e portanto não foi quantificado. A excreção de esterol neutro total portanto refere-se à soma de colesterol das fezes e de coprostanol.

#### Análises Estatísticas

Realizaram-se análises estatísticas utilizando software SAS. Os dados foram analisados como bloco completo aleatório usando o dia da necropsia como um factor de bloqueio. O ensaio da diferença mínima significativa de Fischer (LSD) foi empregado para comparações múltiplas quando se observaram efeitos do tratamento significativos (alfa = 0,05). As relações estrutura da saponina/actividade foram exploradas por análise de duas vias de variância (diosgenina-saponina em comparação com colesterol-saponina e hidroximetil-saponina em comparação com saponina). Os resultados indicados nos Quadros são expressos como valor médio  $\pm$  desvio padrão.

#### Resultados

Em todos os tratamentos, os cricetos tinham uma aparência saudável e ganharam peso. Não houve diferen-

11 FEB. 1993

Case:4491 X

cas no consumo de alimentos ou de água, aumento de peso ou  
1 eficiência de alimentação nos vários grupos. A dose média  
foi igual a 600 mg/kg/dia.

O teor de colesterol do plasma foi signifi-  
cativamente menor em todos os quatro grupos tratados com  
5 saponinas relativamente a ambos os controlos (Quadro 1).  
Enquanto o tratamento com colestiramina baixou significati-  
vamente os níveis de colesterol no plasma em 12% em compa-  
ração com a celulose, o efeito das saponinas foi maior,  
estando compreendido entre 31,6% de diminuição (para CG) e  
10 57% (para DHG). O DHG foi mais efectivo do que todos os  
outros tratamentos na diminuição do colesterol do plasma e  
de não HDL; CHG foi mais eficaz do que CG. CG era a saponi-  
na menos eficaz.

As saponinas aumentaram significativamente a  
15 excreção dos esteróis neutros derivados de colesterol nas  
fezes, enquanto a colestiramina não teve qualquer efeito  
sobre a excreção de esterol relativamente à celulose (Qua-  
dro 2). O DHG causou uma excreção de colesterol signifi-  
cativamente maior em comparação com todos os outros grupos de  
20 tratamento. A excreção total neutra de esterol era direc-  
cionalmente maior com DHG relativamente a DG, embora a  
diferença não atingisse significância estatística.

Estudou-se a estabilidade conferida à liga-  
ção glicosídica pela presença do grupo 5-hidróxi-metilo no  
25 açúcar medindo a diosgenina livre nas fezes. A quantidade  
de diosgenina livre foi determinada nas preparações de  
saponina e nos extractos de lípidos neutros das fezes  
provenientes de todos os grupos de tratamento. Não se  
detectou diosgenina livre nas preparações de saponina que  
30 foram incorporadas nas dietas. A absorção de saponina foi  
calculada a partir do consumo de comida. A hidrólise apa-  
rente in vivo foi então calculada dividindo a excreção  
molar da diosgenina livre das fezes pela absorção molar de  
saponina. Com excepção dos quatro extractos das fezes do

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/08

35

U. G.  
FEL 1993

1 grupo de DG e de um extracto do grupo de saponina derivati-  
zada, as concentrações de diosgenina nos extractos estavam  
abaixo da curva padrão. A análise completa do varrimento do  
espectro, a determinação da pureza positiva dos picos de  
5 diosgenina das fezes só foram possíveis para os extractos  
das fezes do grupo de DG. Supondo que as pequenas concen-  
trações de diosgenina encontradas nas três saponinas dife-  
rentes de DG representam diosgenina e são rigorosas e  
usando o valor médio da excreção de diosgenina observado  
nos grupos de CG e de CHG como linha de base, a hidrólise  
10 aparente in vivo foi em média igual a 12,5% para DG em  
comparação com 0,5% para DHG.

Pela análise de duas vias de variância, verificou-se que as 5-C-hidroximetil-saponinas foram signi-  
ficativamente mais eficazes do que as saponinas não deriva-  
15 tizadas para baixar o colesterol do plasma ( $p < 0,0001$ ) e  
colesterol de não-HDL ( $p < 0,002$ ). As saponinas contendo  
diosgenina foram também mais eficazes do que as saponinas  
contendo colesterol. A superior estabilidade da ligação  
20 glicosídica conferida pelo grupo 5-C-hidroximetilo podia  
razoavelmente supor-se que contribuisse para o superior  
comportamento da diosgenina-saponina em comparação com  
colesterol-saponina devido ao facto de a hidrólise de CG  
dever libertar colesterol.

Em conclusão, as 5-C-hidroximetil-saponinas  
25 apresentaram superior eficácia em comparação com as saponi-  
nas correspondentes não derivatizadas. Com base nas medi-  
ções da diosgenina livre nas fezes, o grupo 5-C-hidroxime-  
tilo melhora substancialmente a estabilidade da ligação  
glicosídica. Esta estabilidade aumentada tem como resultado  
30 a descoberta da eficácia superior das saponinas derivatiza-  
das.

21. FEV. 1993

35  
30  
25  
20  
15  
10  
5

QUADRO I

Lípidos do Plasma

<u>Variáveis</u>	<u>DG</u>	<u>DHG</u>	<u>CG</u>	<u>CHG</u>	<u>CSTYR</u>	<u>CELL</u>
Plasma-C (mg/DG)	125 ± 13	102 ± 11	162 ± 15	134 ± 17	208 ± 16	237 ± 23
Non HDL-C (mg/dL)	44 ± 5	26 ± 4	60 ± 9	45 ± 9	114 ± 18	136 ± 22
HDL-C (mg/dL)	81 ± 2	76 ± 7	102 ± 18	89 ± 10	94 ± 7	102 ± 16
Trig (mg/dL)	123 ± 12	105 ± 34	141 ± 44	112 ± 36	162 ± 65	142 ± 44

## QUADRO II

Lípidos Neutros das fezes

Variáveis	Saponinas				
	Cell	CSTYR	DG*	CG	CHG
Peso seco das fezes (g/criceto/dia)	1,57 ± 0,29	1,41 ± 0,34	1,53 ± 0,07	1,62 ± 0,28	1,58 ± 0,32
Lípidos das fezes (% peso seco)	8,2 ± 0,8	8,2 ± 0,3	12,1 ± 0,2	12,5 ± 0,3	11,3 ± 1,6
Coprostanol (mg/criceto/dia)	2,0 ± 0,2	2,2 ± 0,7	4,8 ± 0,5	1,20 ± 0,4	2,9 ± 1,0
Colesterol (mg/criceto/dia)	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,3	9,2 ± 1,5	8,6 ± 1,0	13,2 ± 3,7
Esterol neutro total (mg/criceto/dia)	3,1 ± 0,4	3,0 ± 1,0	14,0 ± 1,1	9,8 ± 1,0	16,2 ± 4,6
Diosgenina livre (mg/criceto/dia)	0,15 ± 0,08**	0,21 ± 0,06**	5,88 ± 0,61	0,60 ± 0,08**	0,74 ± 0,10**

\* Para uma caixa do grupo de DG, as medições por dia baseiam-se em dez cricetos por dias em comparação com catorze para todas as outras caixas dos animais.

\*\* Estes valores para a diosgenina são estimados visto que os seus valores são inferiores à curva padrão.

CEL. FEV. 1993

Case:4491 X

1

Nos Quadros I e II, utilizam-se as seguintes abreviaturas:

CSTYR = colestiramina

CELL = celulose

DG = diosgenina-galactósio

5

DHG = diosgenina-5-C-hidroximetil-L-arabino-hexapiranosido

CG = colesterol-galactósio

CHG = colesterol-5-C-hidroximetil-L-arabino-hexapiranosido

10

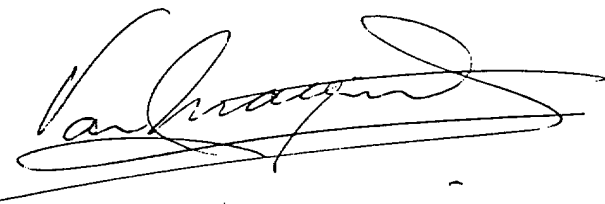
15

Lisboa, 1 FEV. 1993

20

Por, THE PROCTER & GAMBLE COMPANY

25

  
**VASCO MARQUES LEITE**  
Agente Oficial  
da Propriedade Industrial  
Cartório - Arco da Condição, 3, 1.º-1100 LISBOA

30

35

*Witch 1993*

## - D E S C R I Ç Ã O -

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1

5

1a. - Processo para a preparação de derivados de 5-C-hidroxi metil-hexose de esteróis, caracterizado por compreender as operações que consistem em

(1) acilar-se uma 5-C-hidroxi metil-hexose segundo um método de acilação em duas fases que compreende

10

(a) a reacção de um anidrido de ácido com a referida hexose na presença de uma base, em que preferivelmente o mencionado anidrido de ácido é um anidrido de ácido carboxílico que tem 2 a 6 átomos de carbono;

15

(b) a reacção do produto obtido na fase (a) com um anidrido de ácido e uma quantidade catalítica de um ácido forte para se formar um derivado hexacilado de hexose; e

20

(2) preparar-se o derivado -fluorado da 5-C-hidroxi metil-hexose hexacilada fazendo reagir a hexose acilada com ião fluoreto na presença de eterato de trifluoreto de boro; e

(3) fazer-se reagir o produto obtido na fase (2) com um esteroi.

25

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os grupos acilo serem substancialmente hidrolisados usando um catalisador de alcoolato de metal alcalino.

30

3a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por a citada base ser piridina e o referido ácido ser escolhido do grupo formado por ácido sulfúrico, ácido fosfórico e ácido trifluorometanossulfónico.

35

4a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado por em primeiro lugar se transformar

EL FEB 1993

mar o esterol no derivado de trimetilsililo.

1                    5a. - Processo de acordo com a reivindicação  
4, caracterizado por se escolher a 5-C-hidroxi-  
metil-hexose do grupo que consiste em derivados de 5-C-hidroxi-  
metilo de galactose, glucose, manose, frutose, sorbose, e taqatose e  
5 o mencionado esterol ser escolhido do grupo que consiste  
em colesterol, diosgenina, sitosterol, ergosterol, campe-  
sterol, estigmastanol e tigogenina.

6a. - Processo para a preparação de deriva-  
dos de 5-C-hidroxi-  
metil-hexose de esteróis, caracterizado  
10 por compreender as operações que consistem em

- (1) acilar-se uma 5-C-hidroxi-  
metil-hexose segundo um  
método de acilação em duas fases que compreende
- (a) a reação de um anidrido de ácido com a citada  
hexose na presença de uma base em que preferi-  
15 velmente o referido anidrido de ácido é um  
anidrido de ácido carboxílico que tem 2 a 6  
átomos de carbono; e
  - (b) a reação do produto obtido na fase (a) com um  
anidrido de ácido e uma quantidade catalítica  
20 de um ácido forte para se formar um derivado de  
hexose hexacilada; e
- (2) preparar-se o derivado 1-bromado da 5-C-hidroxi-  
metil-hexose hexacilada fazendo reagir a hexose acilada  
com o ião brometo na presença de ácido acético; e
- 25 (3) fazer-se reagir o produto obtido na fase (2) com um  
esterol na presença de cianeto de mercúrio.

7a. - Processo de acordo com a reivindicação  
6, caracterizado por os grupos acilo serem subsequentemen-  
te hidrolisados usando um catalisador de alcoolato de metal  
30 alcalino.

8a. - Processo de acordo com a reivindicação  
6 ou 7, caracterizado por a mencionada base ser piridina e  
o citado ácido ser escolhido do grupo formado por ácido  
sulfúrico, ácido fosfórico e ácido trifluorometanossulfóni-  
35

21 FEB 1993

co.

1 9a. - Processo para a preparação de deriva-  
dos de 5-C-hidroxiometil-hexose de esteróis, caracterizado  
por compreender as operações que consistem em

5 (1) acilar-se uma 5-C-hidroxiometil-hexose segundo um  
método de acilação em duas fases que compreende

(a) a reacção de anidrido ácido com a referida  
hexose na presença de uma base; e

10 (b) a reacção do produto da fase (a) com um anidrido  
de ácido e uma quantidade catalítica de um ácido  
forte; e

(2) fazer-se reagir a hexose acilada com um estero1 sob  
condições anidras na presença de trimetilsilil tri  
fluormetanossulfonato.

15 10a. - Processo de acordo com as reivindica-  
ções anteriores, caracterizado por se obter estero1-5-C-  
aciloximetil-2,3,4,6-tetracil-arabino-hexopiranósidos.

20 11a. - Processo de acordo com as reivindica-  
ções anteriores, caracterizado por se obter, diosgenina-5-  
-C-hidroxiometil-arabino-hexopiranósido ou tigogenina-5-C-  
hidroxiometil-arabino-hexapiranósido ou colesterol-5-C-  
hidroxiometil-arabino-hexapuranósido.

25 12a. - Processo de acordo com as reivindica-  
ções anteriores, caracterizado por se obter halogeno-5-C-  
aciloximetil-2,3,4,6-tetracil-arabino-hexopiranósidos, em  
que preferivelmente o halogéneo é bromo ou flúor.

13a. - Processo de acordo com as reivindica-  
ções anteriores, caracterizado por se obterem derivados de  
5-C-hidroxiometil-hexose de esteróis.

30 14a. - Composto de acordo com a reivindica-  
ção 13, caracterizado por o grupo de hexose ser escolhido  
do grupo que consiste nos isómeros D ou L de galactose,  
glucose, manose, frutose, sorbose e tagatose em que prefer-  
rivelmente o grupo galactose é galacto-piranoose e galacto-  
furanos, mencionado estero1 ser escolhido do grupo que

35

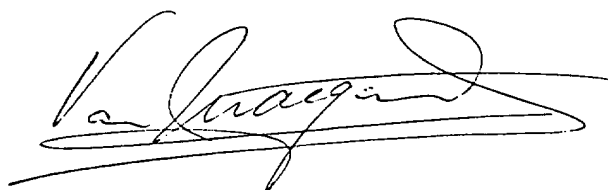
Case:4491 X

1  
consiste em espiro-estanois, diosgenina, colesterol, cito-  
esterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, tigogeni-  
na, ácido oleanóico, sapogenóis de soja, protoscigenina,  
protopanaxadióis e protopanaxadióis.

5  
15a. - Composto de acordo com as reivindica-  
ções 13 ou 14, caracterizado por a citada hexose ser 5-C-  
hidroximetil-L-arabino-hexopiranosido e o referido estero-  
l ser diosgenina, tigogenina ou colesterol.

Lisboa, 11 FEB 1953

10  
Por THE PROCTER & GAMBLE COMPANY

15  


20  
**VASCO MARQUES LEITE**  
Agente Oficial  
de Propriedade Industrial  
Galeria - Arco de Conceição, 3, 1.º-1100 LISBOA

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/58

25

30

35