



CONFEDERAZIONE SVIZZERA  
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑪ CH 651 015 A5

⑤① Int. Cl.4: C 07 C 101/30

// - (C 07 C 101:30, C 07 D 241/06)

**Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein**  
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

## ⑫ FASCICOLO DEL BREVETTO A5

②① Numero della domanda: 560/81

②② Data di deposito: 28.01.1981

③③ Priorità: 29.01.1980 IT 47749/80

②④ Brevetto rilasciato il: 30.08.1985

④⑤ Fascicolo del  
brevetto pubblicato il: 30.08.1985

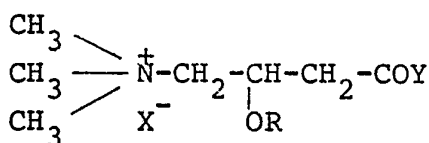
⑦③ Titolare/Titolari:  
Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite  
S.p.A., Roma (IT)

⑦② Inventore/Inventori:  
De Witt, Paolo, Roma (IT)  
Tinti, Maria Ornella, Roma (IT)

⑦④ Mandatario:  
A. Braun, Braun, Hérítier, Eschmann AG,  
Patentanwälte, Basel

### ⑤④ Carnitinammidi di amminoacidi otticamente attivi e procedimenti per la loro preparazione.

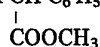
⑤⑦ Ammidi della carnitina o di acil-carnitine di formula generale:



in cui:

X è un anione alogeno, ad esempio cloro;  
R è idrogeno o acile, quale acetile, propionile o butirri-  
le; e

Y è il residuo di un amminoacido esterificato ottica-  
mente attivo (ad esempio il residuo dell'estere meti-  
lico della L-fenilglicina,  $-\text{NH}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ )



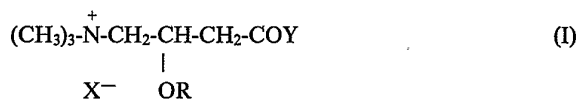
vengono preparate (a) condensando direttamente la D,L-carnitina (o acil-D,L-carnitina) con un estere di un amminoacido otticamente attivo, oppure (b) preparando l'alogenoacido di carnitina o di una acil-D,L-carnitina e successivamente condensandolo con un estere di amminoacido otticamente attivo. La miscela di ammidi diastereoisomere così ottenuta viene risolta per cristallizzazione

frazionata da solventi organici, nei rispettivi diastereoisomeri separati.

Tali ammidi otticamente attive, oltre essere utili agenti terapeutici nella cura di disturbi cardiaci, dislipidemie e iperlipoproteinemie, possono venir idrolizzate, con procedure note, in L-carnitina, rispettivamente D-carnitina.

## RIVENDICAZIONI

## 1. Ammide della carnitina di formula generale



in cui:

X è un anione alogeno;

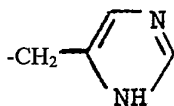
R è idrogeno o acile scelto nella classe comprendente acetile, propionile e butirile;

Y è il residuo di un amminoacido esterificato otticamente attivo, di formula generale



in cui:

R<sub>1</sub> è: -CH<sub>2</sub>COOR<sub>2</sub>  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOR<sub>2</sub>  
 -CH<sub>2</sub>S<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOR<sub>2</sub>  
 -CH<sub>3</sub>  
 -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
 -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
 -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>  
 -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>  
 -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>  
 -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>

R<sub>2</sub> è un radicale alifatico a 1-4 atomi di carbonio.2. Ammide secondo la rivendicazione 1, in cui il radicale alifatico R<sub>2</sub> della formula generale II è un radicale metile, etile o propile.

3. Ammide secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il residuo di amminoacido esterificato otticamente attivo è quello di un L-amminoacido.

4. Ammide secondo la rivendicazione 3, in cui il residuo di L-amminoacido esterificato è quello del diestere isopropilico dell'acido L-glutammico, del diestere metilico e del diestere etilico dell'acido L-aspartico, e della L-cistina; dell'estere metilico e dell'estere etilico della L-asparagina, L-fenilalanina, L-glutammina, L-fenilglicina, L-leucina, L-isoleucina, L-metionina, L-istidina, L-valina e L-alanina.

5. Procedimento per la preparazione dell'ammide di formula (I) comprendente gli stadi di:

(a) far reagire carnitina idrocloruro o acil carnitina idrocloruro con un agente alogenante in eccesso a 25-60°C per 0,3-24 ore ed eliminare l'eccesso di agente alogenante, ottenendo il corrispondente alogenuro acido di carnitina o di acil carnitina;

(b) disciogliere l'alogenuro acido di carnitina o di acil carnitina dello stadio (a) in un solvente anidro inerte;

(c) condensare detto alogenuro acido di carnitina o di acil carnitina con un amminoacido otticamente attivo esterificato con alcoli alifatici inferiori aventi da 1 a 4 atomi di carbonio disciolto in un solvente anidro inerte, mantenendo la miscela risultante sotto agitazione a temperatura ambiente, per 3-48 ore, con ottenimento dell'ammide di formula (I) (miscela dei diastereoisomeri); e

(d) isolare l'ammide di formula (I) concentrando la miscela dello stadio (c) e purificando per ripetute cristallizzazioni.

6. Procedimento per la preparazione dell'ammide di formula (I), comprendente gli stadi di:

5 (a') condensare carnitina o acil carnitina in soluzione acquosa con un amminoacido otticamente attivo esterificato con alcoli alifatici inferiori aventi da 1 a 4 atomi di carbonio in soluzione di solventi organici, quali acetone o diossano in presenza di una soluzione, nello stesso solvente organico, di dicicloesil carbodiimide, mantenendo la miscela così ottenuta sotto agitazione a 15-40°C per 20-48 ore con formazione dell'ammide di formula (I) (miscela dei diastereoisomeri) e di un precipitato di dicicloesil urea; e

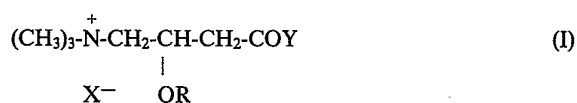
10 (b') separare per filtrazione il precipitato di dicicloesil urea e isolare l'ammide di formula (I) concentrando il filtrato, essiccando e cristallizzando ripetutamente da solventi organici.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 6, in cui il rapporto molare carnitina o acil carnitina: estere di amminoacido otticamente attivo: dicicloesil carbodiimide è circa 1 : 1 : 2.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 5 o 6, per la risoluzione di una miscela di ammidi diastereoisomere di formula (I) nei rispettivi diastereoisomeri separati, comprendente il sottoporre a cristallizzazione frazionata detta miscela di ammidi con una miscela agente solvente-agente precipitante scelta nel gruppo comprendente acetone-acetato di etile e metanolo-acetone, con ottenimento di una fase solida comprendente uno degli isomeri ottici, e di una fase liquida comprendente l'altro isomero ottico.

La presente invenzione riguarda una nuova classe di ammidi della carnitina e di acil carnitina e i procedimenti per la loro preparazione. Queste carnitinammidi possono essere utilizzati sia quali agenti terapeutici sia come intermedi nello smistamento di antipodi ottici per ottenere idrocloruro di L-carnitina e idrocloruro di D-carnitina.

Più particolarmente, la presente invenzione riguarda ammidi della carnitina e di acil carnitine, in cui il residuo ammidico è derivato da un amminoacido esterificato otticamente attivo, ammidi rappresentate dalla formula generale:

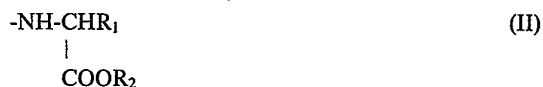


in cui:

X<sup>-</sup> è un anione alogeno, preferibilmente Cl<sup>-</sup>;

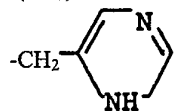
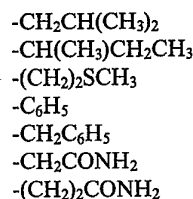
R è idrogeno o acile, preferibilmente acetile, propionile, butirile;

55 Y è il residuo di un ammino-acido esterificato otticamente attivo, di formula generale



in cui:

R<sub>1</sub> è: -CH<sub>2</sub>COOR<sub>2</sub>  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOR<sub>2</sub>  
 -CH<sub>2</sub>S<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOR<sub>2</sub>  
 -CH<sub>3</sub>  
 -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>



$R_2$  è un radicale alifatico a 1-4 atomi di carbonio, preferibilmente metile, etile o isopropile.

Va inteso che le ammidi della presente invenzione rappresentate dalla formula (I) comprendono sia le miscele di diastereoisomeri sia gli antipodi ottici separati ottenibili dalle miscele mediante procedure che verranno descritte in seguito.

Ammidi di formula generale (I) particolarmente preferite sono quelle in cui il residuo ammidico è quello del diestere (metilico, etilico o isopropilico) dell'acido L-aspartico, L-glutammico, e della L-cistina; dell'estere (metilico o etilico) della L-asparagina, L-fenil-alanina, L-glutamina, L-fenilglicina, L-leucina, L-isoleucina, L-metionina, L-istidina, L-valina e L-alanina.

Le ammidi di formula (I) vengono preparate a partire dalla D,L-carnitina cloridrato o rispettivamente da una acil-D,L-carnitina cloridrato, che per semplicità verranno nel seguito indicate come «carnitina» e «acil-carnitina».

Le ammidi di formula (I) vengono preparate, secondo l'invenzione seguendo due distinte vie di sintesi a seconda che la carnitina o l'acil carnitina venga trasformata nel corrispondente alogenuro acido e questo venga condensato con il desiderato estere di amminoacido otticamente attivo (Procedimento A), oppure la carnitina o l'acil carnitina venga direttamente condensata con l'estere di amminoacido otticamente attivo in presenza di un opportuno agente condensante (Procedimento B).

Più dettagliatamente, il procedimento A comprende i seguenti stadi:

- (a) far reagire la carnitina o l'acil carnitina cloridrato con un agente alogenante in eccesso a 25-60°C per 0,3-24 ore ed eliminare l'eccesso di agente alogenante, ottenendo il corrispondente alogenuro acido di carnitina o di acil carnitina;
- (b) disciogliere l'alogenuro acido di carnitina o di acil carnitina dello stadio (a) in un solvente anidro inerte;
- (c) condensare detto alogenuro acido di carnitina o di acil carnitina con un amminoacido otticamente attivo esterificato con alcoli alifatici inferiori aventi da 1 a 4 atomi di carbonio disciolto in un solvente anidro inerte, mantenendo la miscela risultante sotto agitazione a temperatura am-

biente, per 3-48 ore, con ottenimento dell'ammido di formula (I) (miscela dei diastereoisomeri); e

- (d) isolare l'ammido di formula (I) concentrando la miscela dello stadio (c) e purificando per ripetute cristallizzazioni.
- Il procedimento B, comprende i seguenti stadi:
- (a') condensare carnitina o acil carnitina in soluzione acquosa con un amminoacido otticamente attivo esterificato con alcoli alifatici inferiori aventi da 1 a 4 atomi di carbonio in soluzione di solventi organici, quali acetone o diossano in presenza di una soluzione, nello stesso solvente organico, di dicicloesil carbodiimide, mantenendo la miscela così ottenuta sotto agitazione a 15-40°C per 20-48 ore con formazione dell'ammido di formula (I) (miscela dei diastereoisomeri) e di un precipitato di dicicloesil urea; e
  - (b') separare per filtrazione il precipitato di dicicloesil urea e isolare l'ammido di formula (I) concentrando il filtrato, essiccando e cristallizzando ripetutamente da solventi organici. Nello stadio (b') il solvente organico è preferibilmente acetone. Il rapporto molare carnitina o acil carnitina: estere di amminoacido otticamente attivo: dicicloesil carbodiimide è preferibilmente 1 : 1 : 2.

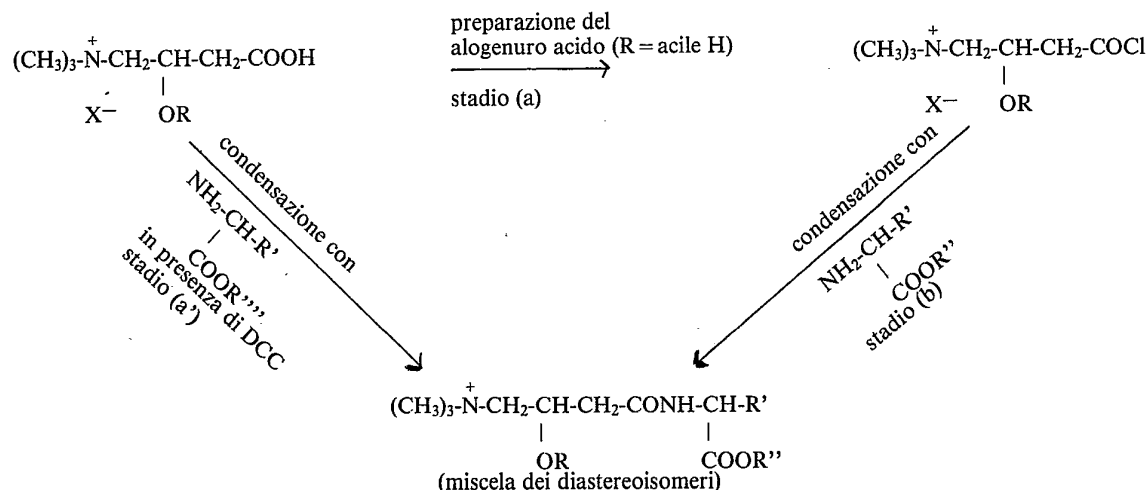
L'estere di amminoacido otticamente attivo precedentemente menzionato viene ottenuto esterificando l'amminoacido otticamente attivo preferibilmente con alcool metilico, etilico o isopropilico in presenza di HCl gassoso.

L'estere viene quindi isolato come estere cloridrato.

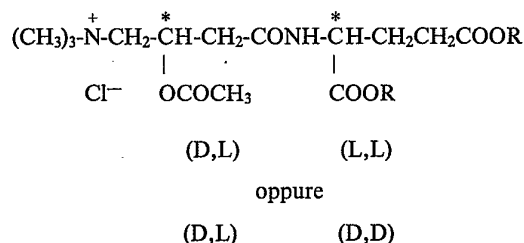
Successivamente:

- i) l'estere cloridrato viene sciolto in  $\text{H}_2\text{O}$ , il pH è portato a neutralità con una soluzione basica satura ad esempio da  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , la soluzione così ottenuta viene estratta ripetutamente con cloruro di metilene o cloroformio o etere etilico, la fase organica viene essiccata, concentrata e l'estere dell'amminoacido otticamente attivo viene isolato come base libera e utilizzato tal quale per la reazione con l'alogenuro dell'acilderivato di carnitina (procedimento A), rispettivamente con la carnitina o l'acilcarnitina (procedimento B); oppure:
- ii) l'estere cloridrato viene sospeso in etere etilico, si aggiunge trietilammina o piridina in quantità equimolecolare, a temperatura di 0°C; si filtra quindi il cloridrato di trietilammina o piridina formatosi, si concentra la soluzione eterea e l'estere dell'amminoacido otticamente attivo, isolato come base libera, viene utilizzato tale quale per la condensazione con l'alogenuro della carnitina e dell'acilderivato di carnitina [stadio (c) del procedimento A] oppure con la carnitina o acil-carnitina [stadio (a') del procedimento B].

I procedimenti A e B per la preparazione delle ammidi di formula (I) sono illustrati nel seguente schema di sintesi:



L'ammide di formula (I), come ottenuta con i procedimenti precedentemente menzionati, è in realtà una miscela di ammidi diastereoisomere. Ad esempio, facendo reagire l'acetil D,L-carnitina con una delle due forme otticamente attive dell'acido glutammico (diestere), si otterranno i seguenti diastereoisomeri (ove gli atomi di carbonio asimmetrici sono stati contrassegnati con l'asterisco):



a seconda che l'acido glutammico (diestere) impiegato sia nella forma levo oppure nella forma destro.

Per risolvere la miscela di ammidi di formula generale (I) nei rispettivi diastereoisomeri si sottopone la miscela a cristallizzazione frazionata impiegando una miscela di agente solvente-agente precipitante. Opportune miscele sono costituite da acetone-acetato di etile e metanolo-acetone.

La fase solida che si separa per precipitazione è sostanzialmente costituita da uno dei diastereoisomeri, mentre la fase liquida contiene sostanzialmente l'altro diastereoisomero. Per ripetute cristallizzazioni si possono isolare gli isomeri sostanzialmente puri.

La quantità relativa dell'agente solvente rispetto all'agente precipitante varia a seconda della particolare ammido e della concentrazione relativa degli isomeri. Tali quantità relative di solvente e precipitante verranno facilmente determinate da ogni esperto, tenendo presente che sarà opportuno impiegare, volendosi ottenere una separazione ottimale, la quantità minima di solvente necessario e la minima quantità di precipitante che determina la formazione di una leggera opalescenza.

Gli esempi non limitativi che seguono servono ad illustrare la preparazione di alcune ammidi secondo l'invenzione.

### Esempio 1

*Preparazione della acetil-carnitinammide dell'acido l-glutammico diestere isopropilico (Procedimento A).*

a) Preparazione del cloruro acido della D,L acetil carnitina.

Ad acetil carnitina idrocloruro (1,2 g; 0,005 moli) si aggiunge ossalil cloruro (2,5 ml; 0,029 moli) e si mantiene la miscela risultante sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore. Quindi si portò a secco sotto vuoto, si lavò il residuo per 3 volte con etere etilico anidro, così ottenendo il cloruro acido dell'acetil carnitina che si adoperò tal quale nello stadio successivo.

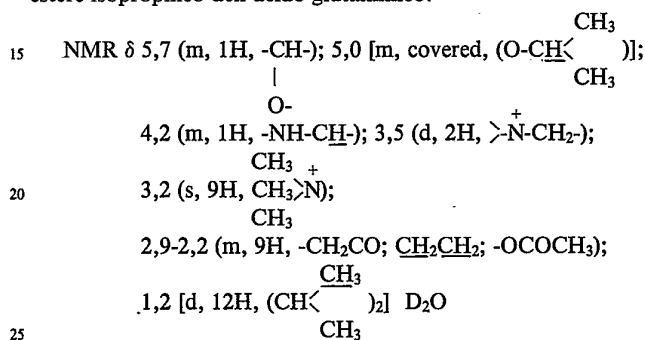
(b) Condensazione del cloruro acido della D,L-acetil carnitina con il diestere isopropilico dell'acido L glutammico.

Una sospensione del cloruro acido precedentemente preparato (0,005 moli) in 20 ml di cloruro di metilene anidro venne aggiunto lentamente sotto agitazione al diestere isopropilico dell'acido L(+) glutammico base libera  $[\alpha]_D = +19$  (1,3 g; 0,005 moli) sciolto in 20 ml di cloruro di metilene anidro. Si mantenne a temperatura ambiente sotto agitazione per 3 ore. Si portò a secco e il residuo fu ripreso con alcool isopropilico anidro e si precipitò l'acetil carnitina non reagita con etere etilico anidro. Si concentrò la soluzione e il risultante residuo fu lavato con H<sub>2</sub>O precedentemente raffreddata a 0°C per eliminare il diestere isopropilico dell'acido glutammico non reagito. Il resi-

duo (presumibile miscela dei due diastereoisomeri) esaminato mediante TLC (gel di silice; eluente CHCl<sub>3</sub> 55, CH<sub>3</sub>OH 35, NH<sub>4</sub>OH 5, H<sub>2</sub>O 5 sviluppo I<sub>2</sub> o reattivo di Dragendorff) risultava costituito da 2 macchie: una ad R<sub>f</sub> = superiore ed una ad R<sub>f</sub> = inferiore.

(c) Smistamento dei diastereoisomeri

Ripetute cristallizzazioni con acetone-acetato d'etile consentirono di isolare il prodotto ad R<sub>f</sub> inf. con  $[\alpha]_D = -10$  (c = 10% H<sub>2</sub>O). Le acque madri si arricchivano nel prodotto ad R<sub>f</sub> superiore. L'analisi NMR del prodotto ad R<sub>f</sub> inferiore confermò che il composto isolato di acetil carnitina ammido del diestere isopropilico dell'acido glutammico.



Un campione di confronto di L acetil carnitina ammido del diestere isopropilico dell'acido L glutammico venne preparato con lo stesso procedimento descritto sopra, utilizzando L acetil carnitina idrocloruro pura  $[\alpha]_D = -27$  (c = 1% H<sub>2</sub>O).

Il prodotto ottenuto presentava  $[\alpha]_D = -17$  (c = 1% H<sub>2</sub>O).

(d) Idrolisi del legame ammidico sul diastereoisomero isolato.

Il diastereoisomero isolato come precedentemente descritto nello stadio (b) venne sciolto in H<sub>2</sub>O e a questa soluzione venne aggiunto acido ossalico nel rapporto di 1 : 3 (ammide : ac : ossalico). La soluzione venne mantenuta a ricadere per circa 7 ore, quindi filtrata e il filtrato concentrato a secchezza. Il residuo, costituito da L-carnitina venne passato su resina IRA 402 (attivata in forma OH) per eliminare tracce di acido ossalico. la soluzione eluita venne acidificata fino a pH 2 con HCl conc. e successivamente liofilizzata. Il liofilizzato costituito da L carnitina (TLC e NMR rispondenti) aveva  $[\alpha]_D = -20$  (c = 1% H<sub>2</sub>O).

### Esempio 2

*Preparazione carnitinammide dell'acido L (+) aspartico dimetil estere. (Procedimento B)*

(a') Condensazione carnitina/acido L (+) aspartico dimetil estere in presenza di DCC.

Ad una soluzione di acido L (+) aspartico dimetilestere 55 HCl (6 g; 0,03 moli) in acetone (200 ml) venne aggiunta trietilammina (4,2 ml; 0,03 moli). La miscela venne tenuta 1/2 ore sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente. Si separò come precipitato la trietilammina HCl che si eliminò per filtrazione. Alla soluzione filtrata, sotto agitazione magnetica ed a 60 temperatura ambiente venne aggiunta una soluzione di dicicloesil-carbodiimide (7 g; 0,03 moli) in acetone (100 ml) e D,L-carnitina idrocloruro (6 g; 0,03 moli) sciolta in 10 ml di H<sub>2</sub>O. La miscela di reazione venne tenuta sotto agitazione per una notte.

(b') Isolamento della miscela dei diastereoisomeri

Il precipitato formatosi (dicicloesilurea) venne eliminato per filtrazione. Il filtrato si concentrò sotto vuoto fino a totale

evaporazione dell'acetone. La soluzione acquosa residua venne lavata per 3 volte con piccoli volumi di  $\text{CHCl}_3$  (per eliminare l'eventuale residuo di estere di partenza e trietilamina ancora presenti). Quindi la fase acquosa venne evaporata a secchezza. Il grezzo, mediante TLC ( $\text{CHCl}_3$ , MeOH,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  55 : 35 : 5 : 5, gel di silice), risultava costituito da due macchie ad  $R_f$  vicini, come prevedibile.

$[\alpha]_D$  (grezzo) =  $-8,2$  ( $c = 1\%$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) [miscela dei due diastereoisomeri].

L'analisi NMR (DMSO) mostrò un duplice doppietto nell'intervallo  $\delta$ : 9,15-8,72 di cui uno rappresentava il 70% (calcolato sull'integrale).

#### (c') Smistamento dei diastereoisomeri

I due diastereoisomeri vennero smistati per cristallizzazione frazionata da metanolo-acetone. Cristallizzò per primo il prodotto ad  $R_f$  inferiore, mentre le acque madri si arricchivano del prodotto ad  $R_f$  superiore. Dopo una serie di quattro cristallizzazioni si riuscì ad ottenere il diastereoisomero ad  $R_f$  inferiore puro, sostanza estremamente igroscopica, deliquescente.  $[\alpha]_D = -13,5$  ( $c = 1\%$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ).

NMR (DMSO),  $\delta$ : 9,00 (1H, d,  $-\text{NHCO}-$ ); 5,60 (1H, m,  $\text{OCOCH}_3$ ); 4,66 (1H, m,  $-\text{CH}-$ ); 3,70 (6H, s,  $(-\text{COOCH}_3)_2$ ); 3,70 (6H, s,  $(-\text{COOCH}_3)_2$ ); 3,23 (9H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,90-2,46 (4H, m,  $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ ); 2,10 (3H, s,  $-\text{OCOCH}_3$ ).

Sulla base di questi risultati, per verifica, da un campione puro di L (—) carnitina idro-cloruro si preparò seguendo lo stesso procedimento di sintesi già descritto, l'ammide con l'acido L (+) aspartico dimetilestere. Il prodotto ottenuto presentava le stesse caratteristiche chimico-fisiche del diastereoisomero ad  $R_f$  inferiore da noi isolato con  $[\alpha]_D = -15$  ( $c = 1\%$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ).

#### (d') Idrolisi della funzione ammidica sul diastereoisomero isolato

Una soluzione dell'ammide precedentemente preparata (2 g; 0,006 moli) in 15 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  ed acido ossalico (1,8 g; 0,02 moli) venne tenuta 6 ore alla temperatura di riflusso, quindi raffreddata e lasciata una notte in frigorifero. La miscela di reazione venne filtrata ed il filtrato lavato tre volte con  $\text{CHCl}_3$ , quindi evaporato a secchezza.

Il residuo, ripreso con MeOH, filtrato e precipitato con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fornì L (—) carnitina grezza. Questa, sciolta in  $\text{H}_2\text{O}$ , venne passata su resina IRA 402 (resina anionica forte) ed eluita con  $\text{H}_2\text{O}$ , quindi acidificata con HCl 6N e liofilizzata.

La L (—) carnitina liofilizzata mostrava un  $[\alpha]_D = -23$  ( $c = 1\%$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ).

#### Esempio 3

##### Preparazione dell'acetil carnitinammide della fenilglicina etilestere (Procedimento A)

10 g di fenilglicina vennero aggiunti a 150 ml di etanolo assoluto. Nella risultante miscela fu fatto gorgogliare HCl gassoso, a temperatura ambiente, sotto agitazione, finché tutta la fenilglicina non si sciolse. La soluzione venne tenuta a ricadere per tutta la notte, quindi raffreddata ed avaporata sotto vuoto. Il residuo venne ridisciolti in  $\text{H}_2\text{O}$  e neutralizzato con  $\text{NaHCO}_3$ . La fenilglicina etilestere base libera venne estratta con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Ad una soluzione di 1,8 g (10 m moli) di fenilglicina etilestere base libera, sciolta in 10 ml di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  venne aggiunta una

soluzione di cloruro di acetil carnitina preparato come indicato nell'esempio 1 (10 m moli in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). La miscela venne mantenuta sotto agitazione tutta la notte a  $50^\circ\text{C}$  e quindi raffreddata e addizionata di etere etilico (50 ml).

L'olio formatosi venne disciolto in una miscela di etanolo: acetone (5 : 1) e riprecipitato con etere.

NMR (DMSO)  $\delta = 1,1$  (t, 3H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 2,0 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ); 2,8 (d, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ); 3,2 (s, 9H,  $-(\text{CH}_3)_3\text{N}$ ); 3,5 (d, 2H,  $-\text{NCH}_2-$ ); 4,0 (q, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ );

5,2 (s, 1H,  $-\text{CH}-$ ); 5,5 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{CH}-$ ); 7,5 (s, 5H,  $-\text{C}_6\text{H}_5$ ); 9,2 (d, 1H,  $\text{CO}-\text{NH}-$ ).

Analisi elementare:

calcolato	C 56,92	H 7,29	N 6,99	Cl 8,84
trovato	C 56,84	H 7,31	N 6,89	Cl 8,72

#### Esempio 4

##### Preparazione dell'acetil carnitinammide della leucina metil estere

L'ammide dell'acetil carnitina con la leucina metil estere venne preparata seguendo la procedura dell'esempio 1. L'analisi NMR del prodotto ottenuto forniva il seguente risultato:

$\delta$  8,8 (d, 1H,  $-\text{NHCO}-$ ); 5,5 (m, 1H,  $-\text{CH}-$ );

4,4 (m, 1H,  $-\text{NHCH}_2-$ ); 3,8 (m, 5H,  $-\text{NCH}_2-$ ,  $-\text{OCH}_3$ ); 3,2 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ); 2,9 (d, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ); 2,2 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ );

1,5 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}-$ ); 1,0 (d, 6H,  $\text{CH}-$ ); DMSO  $\delta$  8,8 (d, 1H,  $-\text{NHCO}-$ ); 5,5 (m, 1H,  $-\text{CH}-$ ); 4,4 (m, 1H,  $-\text{NHCH}_2-$ ); 3,8 (m, 5H,  $-\text{NCH}_2-$ ,  $-\text{OCH}_3$ ); 3,2 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ); 2,9 (d, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ); 2,2 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ); 1,5 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}-$ ); 1,0 (d, 6H,  $\text{CH}-$ );

L leucina  $[\alpha]_D = +12$  (2,5% HCl 1N)

L leucina metil estere cloridrato  $[\alpha]_D = -13,4$  ( $c = 5\%$  in  $\text{H}_2\text{O}$ )

#### Esempio 5

##### Preparazione dell'acetil carnitinammide della isoleucina metil estere

L'ammide dell'acetil carnitina con isoleucina metil estere venne preparata seguendo la procedura dell'esempio 2. L'analisi NMR del prodotto forniva il seguente risultato:

$\delta$  8,7 (d, 1H,  $-\text{NHCO}-$ ); 5,5 (m, 1H,  $-\text{CH}-$ ); 4,3 (m, 1H,  $-\text{NHCH}_2-$ ); 3,9 (s, 9H,  $-\text{NCH}_2-$ ); 3,7 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ );

3,2 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ); 2,7 (covered,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ); 2,1 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ );

1,4 (m, 3H,  $\text{CH}-\text{CH}-$ ); 0,9 (m, 6H,  $\text{CH}-\text{CH}_2-$ );

DMSO  $\delta$  8,7 (d, 1H,  $-\text{NHCO}-$ ); 5,5 (m, 1H,  $-\text{CH}-$ ); 4,3 (m, 1H,  $-\text{NHCH}_2-$ ); 3,9 (s, 9H,  $-\text{NCH}_2-$ ); 3,7 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ );

3,2 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ); 2,7 (covered,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ); 2,1 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ );

1,4 (m, 3H,  $\text{CH}-\text{CH}-$ ); 0,9 (m, 6H,  $\text{CH}-\text{CH}_2-$ );

L isoleucina  $[\alpha]_D = +35$  ( $c = 5\%$  HCl 1N)

L isoleucina metil estere cloridrato  $[\alpha]_D = +26,6$  ( $c = 2\%$  in  $\text{H}_2\text{O}$ )

#### Esempio 6

##### Preparazione dell'acetil carnitinammide della valina metil estere

L'ammide dell'acetil carnitina con valina metil estere, venne

preparata seguendo la procedura dell'esempio 2. L'analisi NMR del prodotto forniva il seguente risultato:

5,7 (m, 1H, -CH-); 4,4 (m, 1H, NH-CH-);

3,8 (m, 5H,  $\text{>N-CH}_2\text{-}$ , OCH<sub>3</sub>); 3,2 (s, 9H, CH<sub>3</sub>>N);

2,8 (d, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-); 2,2 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>);

1,3-0,9 (m, 7H,  $\text{CH<}$ ); D<sub>2</sub>O

L valina metil estere cloridrato [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +15,5 (c = 2% H<sub>2</sub>O)  
L valina [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +24 (c = 5% HCl 1N)

#### Esempio 7

##### Preparazione della carnitinammide della L metionina metil estere (Procedimento B)

L metionina metil estere base libera venne preparata dal suo cloridrato sciolto in acetone per aggiunta di una quantità equivalente di trietil amina (come descritto per il dimetil estere dell'acido aspartico).

La metionina metil estere base libera (1,95 g; 0,01 moli) venne sospesa in una miscela di acetone diossano 1 : 1 (50 cc) e addizionata di una soluzione di dicicloesil cardodiimide (7 g; 0,03 moli) in diossano (100 cc) e di una soluzione di D,L carnitina idrocloruro (1,97 g; 0,01 moli) in H<sub>2</sub>O (5 cc).

La miscela di reazione venne tenuta sotto agitazione per 24 ore a temperatura ambiente. La dicicloesil urea formatasi precipitò e venne eliminata per filtrazione. La soluzione venne concentrata a secchezza, il residuo esaminato su TLC CHCl<sub>3</sub> : MeTOH : CH<sub>3</sub>COON a 0,01M; 40 : 40 : 10 risultava costituito da due prodotti ad R<sub>f</sub> molto vicino (sviluppo: Iodio).

Si cristallizzò ripetutamente con acetone-acetonitrile e si separò il prodotto ad R<sub>f</sub> inferiore costituito dalla L-carnitinammide della L metionina metil estere.

NMR (DMSO)  $\delta$  8,8 (d, 1H, -CONH-); 4,5 (m, 1H, -CH-);

4,3 (t, 1H, -CH-); 3,8 (m, 5H, -COOCH<sub>3</sub>,  $\text{>N-CH}_2\text{-}$ );

3,2 (s, 9H, CH<sub>3</sub>>N);

2,7 (coperto da DMSO, -CH<sub>2</sub>CO-, -CH<sub>2</sub>S-);

2,2 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH); 2,1 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>-S-)

##### Idrolisi del legame ammidico del diastereoisomero isolato

L'ammide precedentemente isolata (3,4 g; 0,01 moli) venne sciolta in una soluzione di acido ossalico in H<sub>2</sub>O 2M (15 cc). La soluzione venne riscaldata a 55°C per 10 ore. Successivamente si raffreddò, si aggiunsero 50 cc di alcool etilico e si mantenne a 0°C per una notte. Si allontanò per filtrazione il precipitato formatosi e si concentrò la soluzione acquosa per eliminare l'alcool. Si riprese in acqua e si passò su resina Amberlite IRA 402 (anionica forte). L'eluato venne liofilizzato.

Il liofilizzatore esaminato su TLC e NMR risultava essere costituito da L carnitina sale interno [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -20 (c = 1% H<sub>2</sub>O).

#### Esempio 8

##### Preparazione della carnitinammide della L (+) alanina etil estere (Procedimento A)

Una soluzione di L (+) alanina etil estere cloridrato in H<sub>2</sub>O venne passata su resina anionica debole (Amberlite IR 45).

L'eluato venne liofilizzato per ottenere la L (+) alanina etil estere base libera [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +4 (c = 2% in HCl 5N).

La L (+) alanina etil estere base libera (1,5 g; 12,5 m moli) venne sciolta in cloruro di metilene, a questa soluzione si aggiunse lentamente sotto agitazione a temperatura ambiente una soluzione del cloruro acido della D,L acetil carnitina (preparata come descritto precedentemente; 12,5 m moli). La soluzione venne mantenuta a 40°C per una notte. Dopo raffreddamento a 0°C si filtrò e al filtrato si aggiunse etere etilico con ottenimento di un olio.

Questo residuo oleoso venne purificato sciogliendolo in H<sub>2</sub>O, trattando la soluzione acquosa con Amberlite XAD<sub>2</sub> e liofilizzando. Il liofilizzato, probabile miscela dei due diastereoisomeri, esaminato su TLC (CHCl<sub>3</sub> 55, CH<sub>3</sub>OH 55, NH<sub>4</sub>OH 5, H<sub>2</sub>O 5, sviluppo; reattivo di Dragendorff) risultava costituito da due prodotti a R<sub>f</sub> superiore e R<sub>f</sub> inferiore. NMR in DMSO  $\delta$  9-8,8 multipletto dovuto alla presenza delle due ammidi.

Si effettuò una serie di cristallizzazioni con una miscela di solventi: cloruro di metilene, acetone, acetato di etile e si isolò il prodotto ad R<sub>f</sub> inferiore [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -8.

NMR DMSO  $\delta$  8,9 (d, 1H, -CONH-); 5,5 (m, 1H, -CH-);

4,3-3,5 (m, 5H,  $\text{>N-CH}_2\text{-}$ , -CH-);

3,2 (s, 9H, CH<sub>3</sub>>N); 2,7 (coperto dal DMSO, -CH<sub>2</sub>CO);

2,1 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>); 1,5 (t, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-)

L'idrolisi del legame ammidico dell'estere sul diastereoisomero isolato e l'isolamento della L carnitina venne condotta come descritto precedentemente per la ammido dell'acetil carnitina con il diestere isopropilico dell'acido glutammico.

La L carnitina isolata (TLC e NMR rispondente) presentava [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -19 (1% H<sub>2</sub>O).

Come già precedentemente menzionato, le ammidi di formula generale (I) sono utili agenti terapeutici nel trattamento di disturbi carciaci, dislipidemie e iperlipoproteinemie.

Esse possono inoltre venir impiegate per ottenere, a partire da D,L-carnitina o da una acil-D,L-carnitina (ad esempio acetil D,L-carnitina) gli isomeri separati D e L, rispettivamente. L'opportunità di separare gli isomeri ottici della carnitina è determinata dal fatto che la forma L e la forma D presentano diverse, e talvolta opposte, azioni terapeutiche.

Un procedimento per la preparazione della L-carnitina idrocloruro e della D-carnitina idrocloruro è descritto nel brevetto belga 660 039. Secondo tale procedimento, la D,L-carnitina idrocloruro viene trasformata in D,L-carnitinammide idrocloruro, che è fatta reagire con D-canforato d'argento, con formazione del D-canforato della D,L-carnitinammide. Da una soluzione alcoolica, preferibilmente isopropanolica, di D-canforato di D,L-carnitinammide si ottiene per cristallizzazione frazionata il D-canforato della L-carnitinammide che è la prima frazione a cristallizzazione dalla soluzione. Dal D-canforato della L-carnitinammide si ottiene infine, mediante procedure convenzionali di idrolisi, la L-carnitina idrocloruro.

Tale procedimento presenta il grave inconveniente, che lo rende di scarsa applicabilità industriale, della necessità di impiegare il D-canforato d'argento, che si ottiene facendo dapprima reagire acido D-canforico con ammoniaca e quindi reagendo il D-canforato d'ammonio così ottenuto con nitrato d'argento. Poiché la D,L-carnitinammide è sotto forma di idrocloruro, la formazione del sale d'argento serve ad eliminare lo ione cloruro. In conseguenza dell'uso del nitrato d'argento, tale procedimento è costoso e complicato industrialmente poiché i vari stadi devono venir effettuati lontano dalla luce onde evitare l'annerimento dei recipienti di reazione, a causa delle grandi quan-

tità di cloruro d'argento che si formano. Il composto finale può inoltre risultare inquinato per la presenza di ioni argento.

Per superare tali notevoli inconvenienti e in particolare allo scopo di eliminare totalmente l'uso dei sali di argento, nella domanda di brevetto italiana n. 50222A/78 è stato descritto un procedimento nel quale la D,L-carnitinammide base libera (ottenuta facendo passare una soluzione di D,L-carnitinammide idrocloruro attraverso una colonna di resina scambiatrice di ioni) viene fatta reagire direttamente con l'acido D-canforico, con ottenimento del D-canforato di D,L-carnitinammide. Pur costituendo un notevole miglioramento rispetto al procedimento del precitato brevetto belga, anche secondo

il procedimento della domanda italiana 50222A/78 è necessario far reagire l'ammide della carnitina con un opportuno agente risolvente (l'acido D-canforico), che deve successivamente venir separato, ciò che costituisce una complicazione operativa.

Le ammidi della presente invenzione presentano invece il vantaggio di poter venir direttamente risolte, per cristallizzazione frazionata da solventi alcoolici, nei rispettivi diastereoisomeri. Tali ammidi consentono cioè di conseguire la separazione della L-carnitina dalla D-carnitina non solo evitando l'uso dei sali d'argento, ma anche senza ricorrere ad alcun agente risolvente quale l'acido D-canforico.