

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 597 104**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **87 04824**

⑤1 Int Cl* : C 07 H 5/04, 1/06; A 61 K 31/70.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 6 avril 1987.

③0 Priorité : JP, 15 avril 1986, n° 61/087508.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 42 du 16 octobre 1987.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *NIPPON SHINYAKU CO., LTD.* — JP.

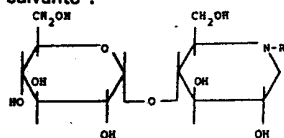
⑦2 Inventeur(s) : Yoji Ezure, Katsunori Miyazaki et Makoto
Sugiyama.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Novapat - Cabinet Chereau.

⑤4 Procédé de préparation de dérivés de la moranoline.

⑤7 La présente invention concerne un procédé de fabrication
de cristaux de dérivé de la glucosylmoranoline répondant à la
formule générale suivante :



dans laquelle R est l'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur.
Le groupe alkyle inférieur dans R, dans le composé de
l'invention, est de préférence un groupe alkyle ramifié ou non
ramifié ayant de 1 à 5 atomes de carbone.

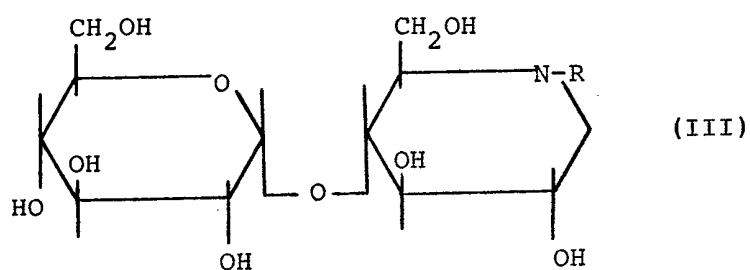
FR 2 597 104 - A1

1.

La présente invention concerne un nouveau procédé de
préparation de cristaux d'un dérivé de la glucosylmoranoline re-
présenté par la formule générale (III) :

5

10



15 (dans laquelle R est l'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur).

Le groupe alkyle inférieur dans R, dans le composé
(III) de l'invention est de préférence un groupe alkyle ramifié

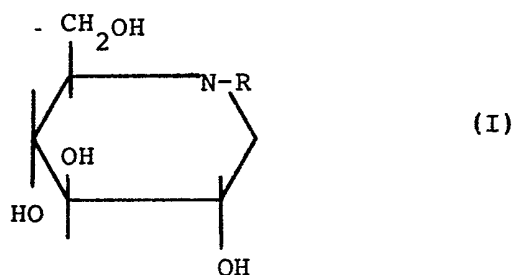
2.

ou non ramifié ayant de 1 à 5 atomes de carbone.

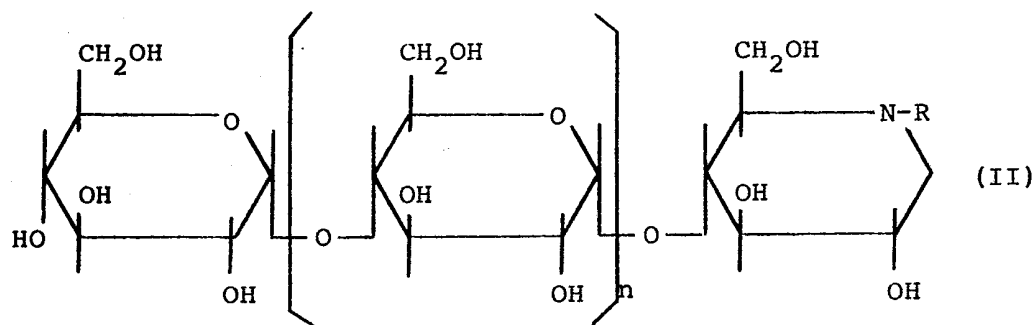
Le composé (III) de la présente invention présente une excellente action inhibitrice contre l'augmentation de la glycémie lorsque le sang est chargé de sucre, et il est très utile comme produits pharmaceutiques, par exemple comme remèdes contre le diabète sucré (voir brevet japonais n° 56/081595 etc.).

Dans la préparation du composé (III) de l'invention, on a utilisé le procédé suivant.

On fait d'abord réagir une solution aqueuse contenant un dérivé de la moranoline répondant à la formule générale (I)



(dans laquelle R est tel que précédemment défini) et de la cyclodextrine ou amidon soluble avec de la cyclodextrine glycosyltransférase (EC 2.4.1.19) pour préparer un mélange de (III) et d'une oligoglucosylmoranoline représentée par la formule générale (II)



3.

(dans laquelle R est tel que précédemment défini et n est un entier de 1 à 20).

En plus du composé (III) désiré, la solution réactionnelle obtenue contient habituellement les composés (I) et (II) n'ayant pas réagi. Le rapport de ces composés dans la solution réactionnelle varie évidemment en fonction des conditions de réaction utilisées et, comme la présence d'une substance unique est indispensable dans l'utilisation comme médicament, un procédé de purification sélective de (III) à partir du mélange est une opération essentielle.

La demanderesse a trouvé que (II) pouvait être transformé en (III) avec un rendement très élevé en traitant le mélange par la glucoamylase (α -1,4-glucaneglucosylhydrolase EC 3.2.1.3) (voir brevet japonais n° 57/058890). Bien qu'un tel procédé soit un procédé de préparation excellent, le produit obtenu après traitement par la glucoamylase contient toujours du (I) n'ayant pas réagi, et aussi, dans certaines conditions réactionnelles, une faible quantité de (II).

Pour préparer le composé désiré à partir de cette solution réactionnelle, il était nécessaire d'effectuer des fractionnements de masses moléculaires en utilisant du Sephadex etc. ou une chromatographie sur colonne du type à phase inversée en utilisant du Lichroprep CN (marque déposée; Merck Co.) ou du Micro Bondapak-NH₂ (marque déposée : Waters Co). Cependant, un tel stade d'isolement utilisant ces opérations sur colonne, était long et coûteux et il était difficile techniquement.

Les moyens de la présente invention dans lesquels (III) est obtenu sous forme cristalline à partir d'un mélange de (III) et de (I) ou d'un mélange de (III), de (II) et de (I) peuvent généralement être considérés comme identiques aux moyens permettant d'obtenir un sucre déterminé à partir d'un mélange d'oligosucres. Cependant, la cristallisation fractionnée des sucres est en général très difficile, et il est connu, par exemple, que la séparation du maltose d'un mélange de glucose, de maltose et de maltotriose est impossible.

4.

Pour séparer un sucre unique d'un mélange de sucres, on a proposé plusieurs procédés consistant par exemple à séparer des monosaccharides au moyen d'une chromatographie sur colonne de Séphadex, en effectuant la chromatographie sur une colonne de carbone ou un procédé utilisant une chromatographie sur colonne de résine échangeuse de cations fortement acide du type métal alcalin ou métal alcalino-terreux. En tout cas, il est inévitable d'effectuer des stades de traitement très fastidieux.

Compte-tenu de la technique antérieure indiquée ci-dessus, la demanderesse a effectué des études poussées en portant son attention sur les deux points suivants :

(1) purifier seulement (III) sélectivement à partir d'un mélange de (I), (III) et (II) avec un rendement élevé; et

(2) obtenir (III) avec une qualité constante dans la purification de (III)

et elle a réussi à obtenir certaines améliorations en appliquant une cristallisation fractionnée particulière utilisant des propriétés de solvants polaires, pour laquelle une demande de brevet a déjà été déposée (demande de brevet japonais n° 59/237326).

Même après avoir réalisé l'invention ci-dessus, la demanderesse a continué à améliorer les techniques concernant cette invention, et elle a eu la grande chance d'aboutir à la présente invention qui présente un effet remarquable.

En résumé, l'invention consiste à dissoudre un mélange des composé (I), (III) et (II) ci-dessus dans un solvant polaire, puis à y ajouter un acide arylsulfonique lui-même ou sa solution dans un solvant polaire approprié (tel que le méthanol), et à recueillir les cristaux qui s'en séparent.

Un tel procédé est basé sur une découverte physico-chimique de la demanderesse selon laquelle, lorsqu'on ajoute un acide arylsulfonique à ce solvant, le composé (III) de la présente invention cristallise le premier avant (I) et (II) qui co-existent dans le solvant polaire.

La présente invention sera illustrée plus en détail ci-dessous.

5.

Comme solvant polaire, on peut utiliser dans la présente invention tous les types de solvants, parmi lesquels l'eau, le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol ou d'autres solvants miscibles à l'eau, isolément ou conjointement.

5 Comme exemples de l'acide arylsulfonique utilisé dans la présente invention, on citera, en plus de l'acide benzènesulfonique substitué ou non substitué, des acides arylsulfoniques dicycliques ou tricycliques substitués par des groupes alkyle ou non substitués. L'utilisation d'un acide benzènesulfonique
10 substitué ou non substitué est particulièrement préférée.

Comme exemples des acides arylsulfoniques utilisables, on citera l'acide benzènesulfonique, l'acide p-toluènesulfonique, l'acide 2,4-diméthylbenzènesulfonique etc...

Lorsqu'on applique la présente invention, on peut
15 en atteindre l'objectif sans augmenter ni diminuer la température après dissolution dans le solvant, contrairement à la cristallisation fractionnée classique. En général, (III) est susceptible de se décomposer par chauffage en milieu acide pour donner (I) et en conséquence, le point ci-dessus est un des plus grands
20 avantages de la présente invention.

Lorsqu'on applique la présente invention, le mélange de (I), (III) et (II) est, par exemple, dissous ou mis en suspension dans le solvant polaire ci-dessus, en chauffant ou à la température ambiante, après quoi on ajoute l'autre solvant polaire
25 pour la dissolution de la suspension. Après dissolution, on ajoute la solution avec l'acide arylsulfonique ci-dessus à la température ambiante. Puis on laisse la solution reposer pendant un certain temps de telle sorte que des cristaux s'en séparent. Les cristaux peuvent être recueillis par exemple par filtration,
30 et ils peuvent si nécessaire être recristallisés.

Les cristaux obtenus sont traités par un procédé classique, par exemple en utilisant une résine échangeuse d'ions fortement basique, après quoi on peut en éliminer l'acide arylsulfonique.

35 Conformément à la présente invention, le taux de récupération, la pureté, etc. peuvent varier fortement en

6.

fonction des conditions utilisées, mais dans les conditions optimales, le composé (III) désiré peut être obtenu à partir d'un mélange de (I), (III) et (II) avec un taux de récupération non inférieur à 97,2 % et avec une pureté non inférieure à 98,7 % par une seule opération de cristallisation fractionnée. En conséquence, lorsqu'on répète ce procédé, il est possible d'obtenir des cristaux purs avec une pureté allant jusqu'à 99,97 à 100 %.

On a constaté que, dans la présente invention, le taux de récupération est meilleur lorsque R est un groupe méthyle que lorsque R est l'hydrogène dans (III). Par conséquent, le procédé de la présente invention est applicable lorsque, par exemple, le composé (III) dans lequel R est l'hydrogène est méthylé pour préparer le composé dans lequel R est un groupe méthyle.

La raison de l'effet particulier de la présente invention et le mécanisme par lequel il est obtenu ne sont pas encore élucidés. Cependant, dans le procédé de l'invention, les dérivés de la moranoline de la présente invention sont supposés former des sels d'amine quaternaire avec les acides arylsulfo- niques de la présente invention dans un solvant, et en conséquence, on suppose qu'il y a une différence spécifique dans les solubilités de ces sels dans un solvant et que ce résultat peut conduire à l'effet utile de la présente invention.

La présente invention présente cet effet très utile que le composé désiré est obtenu sous une forme cristalline de haute pureté. Ceci permet d'obtenir une substance chimique unique nécessaire pour l'utilisation comme médicaments.

La présente invention sera illustrée plus en détail au moyen des exemples de référence et des exemples de travail.

EXEMPLE DE REFERENCE 1

(1) On dissout de la moranoline (8,5 g) dans une faible quantité d'eau et on ajuste la solution à pH 5,7 avec de l'acide chlorhydrique 6N. Puis on y ajoute de l'eau pour faire 50 ml. On dissout de l'alpha-cyclodextrine (34 g) dans 2330 ml de solution d'enzyme brute à 1000 unités/ml de

7.

cyclodextrine glycosyltransférase , puis on y ajoute la solution aqueuse de moranoline pour réajuster le pH à 5,7. On agite à 40°C pendant deux jours pour effectuer la réaction. On centrifuge la solution ayant réagi et on fait passer le

5 liquide surnageant à travers une colonne de 100 ml de Dowex 50W x 2 (H^+) pour adsorber les substances basiques. On lave soigneusement la colonne à l'eau, on l'élue avec de l'ammoniaque 0,5N, et on concentre l'éluat à sec sous vide, ce qui donne 42,0 g d'une poudre d'oligoglucosylmoranolines mélangées.

10 (2) On dissout la poudre d'oligoglucosylmoranolines ci-dessus (42,0 g) dans une faible quantité d'eau et on agite la solution à pH 5,1 avec de l'acide chlorhydrique 6N. On amène le volume à 4370 ml par addition d'eau. On y ajoute 250 mg de glucamylase (fabriquée par Seikagaku Kogyo KK; 30 unités/mg) et on

15 fait réagir le mélange en agitant à 50°C pendant 24 heures. On filtre la solution réactionnelle et on fait passer le filtrat à travers une résine Dowex 50W x 2 (H^+) (100 ml) de telle sorte que la substance basique y soit adsorbée. Celle-ci est lavée soigneusement à l'eau, élue avec de l'ammoniaque 0,5N et

20 l'éluat est traité par du carbone activé, après quoi on concentre et sèche sous vide, ce qui donne 18,6 g de poudre.

Celle-ci est soumise à une analyse par chromatographie liquide à hautes performances, et se révèle être composée de 14 % de moranoline, 84 % de 4-O-alpha-D-glucosylmoranoline et 2 % de 4-O-alpha-D-maltosylmoranoline.

25

Les conditions utilisées pour la chromatographie liquide à hautes performances sont les suivantes :

Sumipax R 741 (Nucleosil 5NH₂, 5 microns, 4 mm de DI x 25 cm); éluant : acétonitrile-eau (65 : 35); débit :

30 1 ml/min; détection par RI (au moyen d'un ERC-7510 fabriqué par Elmer Kogyo KK); Machine de traitement de l'information (modèle 655-60 fabriquée par Hitachi Ltd.).

EXEMPLE DE REFERENCE 2

(1) De la N-méthylmoranoline (10 g) est dissoute

35 dans une faible quantité d'eau et la solution est ajustée à pH 5,7 avec de l'acide chlorhydrique 3N. De l'amidon soluble

8.

(640 g) est dissous dans 7550 ml d'eau chaude, la solution est refroidie à 40°C et la solution aqueuse de N-méthylmoranoline y est ajoutée. On mélange 400 ml de solution d'enzyme brute à 2000 unités/ml de cyclodextrine glycosyltransférase et on réajuste le mélange à pH 5,7. On agite le mélange à 40°C pendant 2 jours pour effectuer la réaction. Après la réaction, on ajuste la température à 50°C, puis on l'ajuste à pH 5,2 avec de l'acide chlorhydrique concentré et on ajoute 1 g de glucoamylase (Glucozyme AF6) puis on agite à 50°C pendant 24 heures pour effectuer la réaction. On centrifuge la solution réactionnelle et on fait passer le liquide surnageant à travers une colonne de Dowex 50W x 2 (H^+) (quantité de résine : 300 ml) de telle sorte que la substance basique est adsorbée sur celle-ci. Cette substance basique est lavée soigneusement à l'eau, éluée avec de l'ammoniaque 0,5N, l'éluat est concentré et séché sous vide, puis dissous dans du méthanol, la solution est traitée par du carbone actif et concentrée sous vide pour donner 16,7 g de poudre.

On analyse cette poudre par chromatographie liquide à hautes performances de la même manière que dans l'Exemple de Référence 1, et l'on trouve qu'elle est composée de 37,2 % de N-méthylmoranoline et de 62,8 % de 4-O-alpha-D-glucosyl-N-méthylmoranoline.

EXEMPLE DE REFERENCE 3

On dissout de l'amidon soluble (24 g) dans 280 ml d'eau chaude et on y ajoute une solution de 1146 mg de N-éthylmoranoline dans 5 ml d'eau (après quoi on ajuste le pH à 5,7). On refroidit à la température ambiante, on ajoute 15 ml de solution d'enzyme brute à 2000 unités/ml de cyclodextrine glycosyltransférase et on réajuste le mélange à pH 5,7. On le fait réagir en agitant à 40°C pendant 3 jours. Après la réaction, on l'ajuste à pH 5,2 avec de l'acide chlorhydrique concentré, puis on y ajoute 75 mg de glucoamylase (Glucozyme AF-6), et on fait réagir le mélange à 50°C pendant 24 heures. On centrifuge la solution réactionnelle et on fait passer le liquide surnageant à travers une colonne de Dowex 50W x 2 (H^+) (quantité de résine : 60 ml), de sorte que la substance basique est adsorbée sur celle-ci. On

9.

lave soigneusement cette substance à l'eau, on l'élue avec de l'ammoniaque 0,5N, on concentre l'éluat et on le sèche sous vide puis on le dissout dans du méthanol, on traite la solution méthanolique par du charbon actif, on la concentre et on la sèche sous vide, ce qui donne 2,3 g de poudre.

On analyse cette poudre par chromatographie liquide à hautes performances comme dans l'Exemple de Référence 1 et l'on trouve qu'elle est composée de 19 % de N-éthylmoranoline et de 81 % de 4-O-alpha-D-glucosyl-N-éthylmoranoline.

10 EXEMPLE 1

On dissout le mélange (18,6 g) obtenu dans l'Exemple de Référence 1 dans 125 ml d'éthanol chaud et on refroidit la solution à la température ambiante. On y ajoute 13,5 g d'acide p-toluènesulfonique ($p\text{-CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}\cdot\text{H}_2\text{O}$). On laisse reposer le mélange à 5°C pendant 3 jours après addition de 125 ml d'acétone. On recueille les cristaux obtenus par filtration et on les lave doucement avec de l'éthanol froid, après quoi on les sèche, ce qui donne 11,3 g de cristaux. Le taux de récupération est de 72,8 %.

On analyse les cristaux obtenus par chromatographie sur couche mince de gel de silice (article 5554 fabriqué par Merck & Co.; l'éluant est un mélange n-propanol : ammoniaque concentrée: eau dans un rapport 6 : 2 : 1; coloré par une solution aqueuse de permanganate de potassium) et l'on trouve que les cristaux sont composés uniquement de p-toluènesulfonate de 4-O-alpha-D-glucosyl-moranoline ($R_f = 0,26$).

On sèche ces cristaux à 70°C pendant 10 heures sous vide et on mesure leurs données physiques.

$F = 127\text{-}131^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{25} = +79,6^\circ$ ($c = 1,0 \%$, eau).

30 Analyse élémentaire : $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_9 \cdot \text{CH}_3\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-SO}_3\text{H}$

($\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{NO}_{12}\text{S}$)

Calculé C : 45,87 H : 6,28 N : 2,82

Trouvé C : 45,50 H : 6,71 N : 2,67

35 On dissout les cristaux dans de l'eau, on traite la

10.

solution par une résine échangeuse d'ions fortement basique, l'Amberlite IRA-410 (OH⁻), pour éliminer l'acide p-toluènesulfonique, et on l'analyse par chromatographie liquide à hautes performances dans les mêmes conditions que ci-dessus, ce qui confirme qu'ils sont constitués de 4-O-alpha-D-glucosylmoranoline à 99,2 % de pureté.

On sèche ces cristaux sous vide à 70°C pendant 10 heures pour mesurer leurs données physiques.

F = 189-192°C. $[\alpha]_D^{25} = +128,6^\circ$ (c = 1,0 %, eau).

10 Analyse élémentaire : C₁₂H₂₃NO₉ · 0,1H₂O

Calculé C : 44,06 H : 7,15 N : 4,28

Trouvé C : 44,17 H : 7,54 N : 4,31

EXEMPLE 2

On dissout le mélange (1 g) obtenu dans l'Exemple de référence 2 dans 30 ml d'éthanol chaud, on y dissout 1,1 g d'acide benzènesulfonique (C₆H₅SO₃H.H₂O) et on laisse reposer la solution à 5°C pendant 3 jours. On recueille les cristaux obtenus par filtration et on les lave doucement avec de l'éthanol froid, puis on les sèche, ce qui donne 650 mg de cristaux.

20 Le taux de récupération est de 70,7 %.

On analyse les cristaux obtenus par chromatographie sur couche mince de gel de silice (Article 554 fabriqué par Merck & Co.; l'éluant utilisé est un mélange n-propanol : ammoniacque concentrée : eau dans un rapport de mélange de 6 : 2 : 1; coloré par une solution aqueuse de permanganate de potassium) et l'on confirme que les cristaux sont uniquement composés de benzènesulfonate de 4-O-alpha-D-glucosyl-N-méthylmoranoline (R_f = 0,31).

On sèche ces cristaux sous vide à 80°C pendant 10 heures et on les soumet à une mesure des données physiques.

30 F = 142-145°C $[\alpha]_D^{25} = +59,9^\circ$ (c = 1,7 %, eau).

Analyse élémentaire : C₁₃H₂₅NO₉ ·  SO₃H

(C₁₉H₃₁NO₁₂S)

Calculé C : 45,87 H : 6,28 N : 2,82

35 Trouvé C : 45,78 H : 6,52 N : 2,88

11.

On dissout les cristaux dans de l'eau, on traite la solution avec de l'Amberlite IRA-410 (OH^-), une résine échangeuse d'ions fortement basique, pour éliminer l'acide benzoïque, et on l'analyse par chromatographie liquide à hautes performances dans les conditions indiquées ci-dessus ce qui confirme qu'il s'agit d'une 4-O-alpha-D-glucosyl-N-méthylmoranoline à 99,2 % de pureté.

On sèche ce composé à 70°C pendant 10 heures sous vide et on le soumet à une mesure des données physiques.

10 $F = 172,0^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{25} = +104,7^\circ$ ($c = 1,0$ %, eau).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NO}_9$

Calculé C : 46,01 H : 7,43 N : 4,13

Trouvé C : 45,74 H : 7,60 N : 4,08

EXEMPLE 3

15 On dissout le mélange (5 g) obtenu dans l'Exemple de référence 2 dans 200 ml de méthanol et on agite la solution avec une solution de 4,5 g d'acide p-toluènesulfonique dans du méthanol. Puis on laisse reposer le mélange pendant une nuit à 5°C. On recueille les cristaux obtenus, on les lave doucement avec du méthanol froid et on les sèche, ce qui donne 4,6 g de cristaux. Le

20 taux de récupération est de 97,2 %.

On dissout une partie (environ 100 mg) des cristaux dans de l'eau, on la fait passer à travers 5 ml d'Amberlite IRA-410 (OH^-), une résine échangeuse d'ions fortement basique, pour éliminer l'acide p-toluènesulfonique, on la lave à l'eau, puis on concentre sous vide à la fois la solution qui a traversé et le liquide de lavage et on les analyse par chromatographie

25 liquide à hautes performances dans les mêmes conditions que ci-dessus, ce qui confirme qu'il s'agit de la 4-O-alpha-D-glucosyl-N-méthylmoranoline à 98,7 % de pureté.

30 On fait passer le produit (4,2 g) à travers 70 ml d'Amberlite IRA-410 (OH^-), après quoi on le lave à l'eau. On réunit la solution qui a traversé et le liquide de lavage, on en élimine l'eau sous vide, et l'on obtient 2,7 g de solide. On dissout

35 ce solide dans 50 ml de méthanol, on l'agite avec une solution

12.

de 1,7 g d'acide p-toluènesulfonique dans 50 ml de méthanol, et on le laisse reposer une nuit à 5°C.

On recueille les cristaux obtenus et on les lave doucement avec de l'éthanol froid, après quoi on sèche, ce qui donne
5 3,9 g de cristaux.

On répète l'opération encore une fois, ce qui donne 3,6 g de p-toluènesulfonate de 4-O-alpha-D-glucosyl-N-méthylmoranoline.

On traite ce composé par l'Amberlite IRA-410 (OH⁻)
10 de la même manière que ci-dessus, on l'analyse par chromatographie liquide à hautes performances et l'on trouve que la pureté est de 99,97 %. On la sèche à 80°C pendant 10 heures sous vide et on mesure les données physiques.

F = 223-225°C. $[\alpha]_D^{25} = +74,5^\circ$ (c = 0,8 %, eau)
15 Analyse élémentaire : C₁₃H₂₅NO₉ · CH₃--SO₃H

(C₂₀H₃₃NO₁₂S)

Calculé C : 46,96 H : 6,50 N : 2,74

Trouvé C : 46,76 H : 6,84 N : 2,66

20

EXEMPLE 4

On dissout le mélange obtenu dans l'Exemple de Référence 2 (5 g) dans 50 ml de méthanol, on y ajoute une solution de 6,6 g d'acide 2,4-diméthylbenzènesulfonique dans 50 ml de méthanol, et on l'agite avec 100 ml supplémentaires d'éthanol. On le laisse
25 reposer à 5°C pendant 3 jours. On recueille les cristaux obtenus, on les lave doucement avec de l'éthanol froid et on les sèche, ce qui donne 3,5 g de cristaux. Le taux de récupération est de 72,0 %.

On traite une partie (100 mg) des cristaux par de l'Amberlite IRA-410 (OH⁻), comme dans l'Exemple 3, et on l'analyse par chromatographie liquide à hautes performances ce qui confirme qu'il s'agit de la 4-O-alpha-D-glucosyl-N-méthylmoranoline à 95,8 % de pureté.
30

En vue d'une analyse supplémentaire, on dissout le produit (500 mg) dans un mélange chaud de 7 ml de méthanol
35 et de 0,4 ml d'eau et on laisse reposer la solution pendant une

13.

nuît à la température ambiante. On recueille les cristaux obtenus et on les sèche, ce qui donne 330 mg de cristaux.

On les sèche à 70°C pendant 10 heures sous vide et on les soumet à une mesure des données physiques.

5 $F = 219-221^{\circ}\text{C. } [\alpha]_{\text{D}}^{25} = +69,6^{\circ} \text{ (c = 1,1 \% , eau).}$

Analyse élémentaire : $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NO}_9 \cdot \text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_3\text{H}$

$(\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{NO}_{12}\text{S})$

10 Calculé C : 47,99 H : 6,71 N : 2,67

Trouvé C : 47,88 H : 7,04 N : 2,65

Le résultat de l'analyse par chromatographie liquide à haute performance dans les mêmes conditions que ci-dessus révèle que sa pureté est de 99,8 %.

15 EXEMPLE 5

On dissout le mélange (2,3 g) obtenu dans l'Exemple de Référence 3 dans 20 ml de méthanol et 1,85 g d'acide p-toluènesulfonique et on y ajoute du méthanol. On en élimine le méthanol sous vide et on dissout à nouveau le résidu dans
20 un mélange chaud de 100 ml de méthanol et de 100 ml d'éthanol. On concentre la solution sous vide, après quoi des cristaux commencent à apparaître et, à ce stade, on arrête la concentration et on laisse reposer à 5°C pendant 2 jours. On recueille les cristaux, on les lave doucement avec de l'éthanol froid et
25 on les sèche, ce qui donne 2,6 g de cristaux. Le taux de récupération est de 76,0 %.

$F = 173-178^{\circ}\text{C. } [\alpha]_{\text{D}}^{25} = +63,6^{\circ} \text{ (c = 1,2 \% , eau)}$

Analyse élémentaire : $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_9 \cdot \text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_3\text{H}$

30

$(\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{NO}_{12}\text{S})$

Calculé C : 47,99 H : 6,71 N : 2,67

Trouvé C : 47,75 H : 7,08 N : 2,70

On traite une partie (100 mg) des cristaux par de
35 l'Amberlite IRA-410 (OH^-), une résine échangeuse d'ions fortement basique, de la même manière que dans l'Exemple 3, et on

14.

l'analyse par chromatographie liquide à hautes performances ce qui confirme qu'il s'agit d'une 4-O-alpha-D-glucosyl-N-éthylmoranoline à 99,0 % de pureté. On la sèche à 70°C pendant 10 heures sous vide et on mesure les données physiques.

5 $F = 118-120^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +83,3^{\circ}$ ($c = 1,0$ %, eau).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_9 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Calculé C : 43,18 H : 8,02 N : 3,60

Trouvé C : 43,61 H : 7,94 N : 3,93.

EXEMPLE DE REFERENCE 4

10 On dissout de la 4-O-alpha-D-glucosylmoranoline (5 g) dans 13,3 g de formaldéhyde à 35 % et on chauffe sous reflux la solution à 110°C pendant 3 heures. Après la réaction, on élimine l'eau et le formaldéhyde sous vide, on dissout le résidu dans 150 ml de méthanol, puis on ajoute 8,8 g de borohydrure de sodium
15 dans un bain de glace et on agite le mélange pendant une nuit à la température ambiante. Après la réaction, on ajoute 40 ml d'acide acétique, on concentre le mélange sous vide et on fait passer le concentré à travers 200 ml d'Amberlite IRA-410(OH⁻), une résine échangeuse d'ions fortement basique. On fait ensuite passer la solution qui a traversé à travers 200 ml de Dowex
20 50W x 2 (H⁺), une résine échangeuse d'ions fortement acide, pour provoquer l'adsorption. Celle-ci est soigneusement lavée à l'eau éluée avec de l'ammoniaque 0,5N, l'éluat est évaporé pour éliminer le solvant sous vide et le résidu est séché, ce qui donne
25 4,5 g de poudre.

On analyse cette poudre par chromatographie liquide à hautes performances de la même manière que dans l'Exemple 1 et l'on trouve qu'elle est composée de 32,9 % de 4-O-alpha-D-glucosylmoranoline n'ayant pas réagi et de 67,1 % de 4-O-alpha-D-glucosyl-N-méthylmoranoline.
30

EXEMPLE 6

On dissout la poudre (4,5 g) obtenue dans l'Exemple de Référence 4 ci-dessus dans 120 ml de méthanol et on la laisse reposer une nuit à la température ambiante, après addition de 4 g d'acide p-toluènesulfonique. On recueille les
35

15.

cristaux obtenus par filtration et on les sèche, ce qui donne 5,1 g de cristaux.

On analyse ces cristaux par chromatographie liquide à hautes performances comme ci-dessus et on trouve qu'ils sont composés de 1,8 % de 4,0-alpha-D-glucosylmoranoline n'ayant pas réagi et de 98,2 % de 4,0-alpha-D-glucosyl-N-méthylmoranoline.

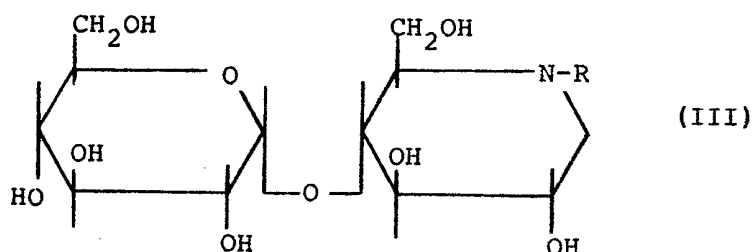
Pour obtenir un produit pur, on le dissout à nouveau dans de l'eau, on fait passer la solution à travers 50 ml d'Amberlite IRA-410(OH⁻), une résine échangeuse d'ions fortement basique, puis on la lave à l'eau, on réunit l'eau de lavage avec la solution qui a traversé, on en fait évaporer l'eau sous vide, on dissout le résidu dans du méthanol, on ajoute à la solution 2,3 g d'acide p-toluènesulfonique, on laisse reposer le mélange une nuit à la température ambiante, et on recueille les cristaux obtenus par filtration et on les sèche, ce qui donne 4,3 g du produit. On analyse ce produit par chromatographie liquide à hautes performances de la même manière que ci-dessus, et l'on trouve qu'il s'agit de la 4-O-alpha-D-glucosyl-N-méthylmoranoline pure.

La présente invention n'est pas limitée aux exemples de réalisation qui viennent d'être décrits, elle est au contraire susceptible de modifications et de variantes qui apparaîtront à l'homme de l'art.

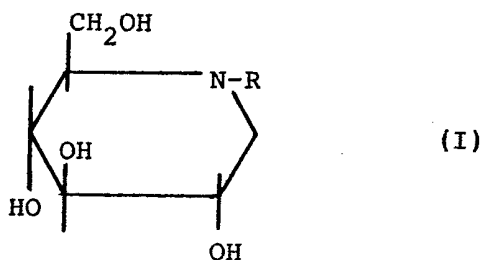
16.

REVENDICATION

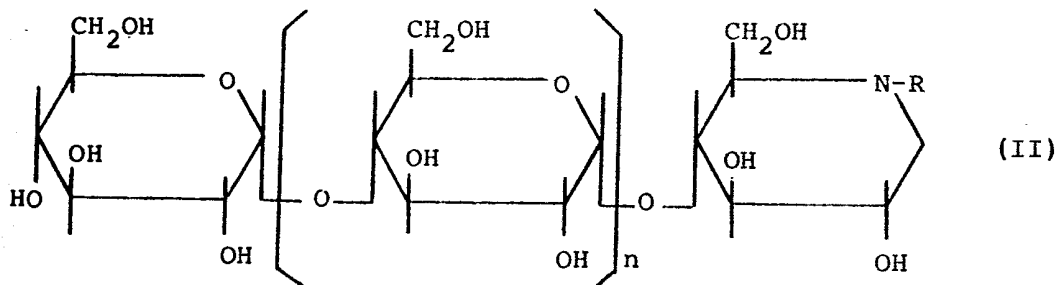
1 - Procédé de préparation de cristaux d'un dérivé de la glucosylmoranoline représenté par la formule générale (III)



(dans laquelle R est tel que défini ci-après), caractérisé en ce qu'on dissout un mélange d'un dérivé de la moranoline représenté par la formule générale (I)



25 (dans laquelle R est l'hydrogène ou un groupe alkyle inférieur), d'un dérivé de la glucosylmoranoline représenté par la formule générale (III), et d'un dérivé de l'oligoglucosylmoranoline représenté par la formule générale (II)



17.

(dans laquelle R est tel que défini ci-dessus et n est un entier de 1 à 20), ou un mélange de (I) et de (III), dans un solvant polaire, on y ajoute un acide arylsulfonique, et on recueille les cristaux qui se séparent.