

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 267**

51 Int. Cl.:
C07H 17/04 (2006.01)
C07H 15/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06744211 .1**
96 Fecha de presentación: **15.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1891086**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2008**

54 Título: **MÉTODO PARA LA SÍNTESIS DE ANTOCIANINAS.**

30 Prioridad:
15.06.2005 GB 0512206

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.12.2011

73 Titular/es:
**BIOSYNTH AS
HANAVEIEN 4-6
4327 SANDNES, NO**

72 Inventor/es:
BAKSTAD, Einar

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 371 267 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la síntesis de antocianinas

5 La presente invención se refiere a un método de preparación de antocianinas, y a un método de preparación de un precursor de antocianinas.

10 Las antocianinas son glucósidos de sales de flavilio. De esta manera, cada antocianina comprende tres partes componentes: el núcleo hidroxilado (la aglicona), la unidad sacárida y el contraión. Los antocianinas son pigmentos naturales presentes en muchas flores y frutos y las antocianinas individuales se encuentran disponibles comercialmente en forma de sales cloruro, por ejemplo de Polyphenols Laboratories AS, Sandness, Noruega.

15 Como compuestos individuales, las antocianinas han sido propuestas para la utilización como antioxidantes (por ejemplo como secuestradores de radicales libres) para el tratamiento del sistema vascular.

20 Los usos de las antocianinas en la reducción de los niveles de proteína C-reactiva, el tratamiento o prevención de la diabetes de tipo 2, el tratamiento o prevención de problemas cardiovasculares y la reducción del riesgo de efectos secundarios adversos de la terapia de sustitución hormonal, se dan a conocer en la solicitud publicada de patente internacional nº WO 04/096240.

25 Las antocianinas se encuentran presentes naturalmente en diversas frutas y hortalizas. Son fuentes particularmente adecuadas de antocianinas frutas tales como las cerezas, arándanos negros y azules, grosellas negras y rojas, uvas, arándanos rojos, fresas y manzanas, y verduras tales como la col roja. Los arándanos negros, en particular *Vaccinium myrtillus*, y las grosellas negras, en particular *Ribes nigrum*, resultan especialmente adecuadas. Las bayas de *V. myrtillus* contienen quince antocianinas monosacárido-antocianinas, es decir las combinaciones aglicona:sacárido de cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina con glucosa, galactosa y arabinosa. Las grosellas de *R. nigrum* contienen cuatro antocianinas, es decir los 3-glucósidos y 3-rutinósidos de cianidina y delfinidina.

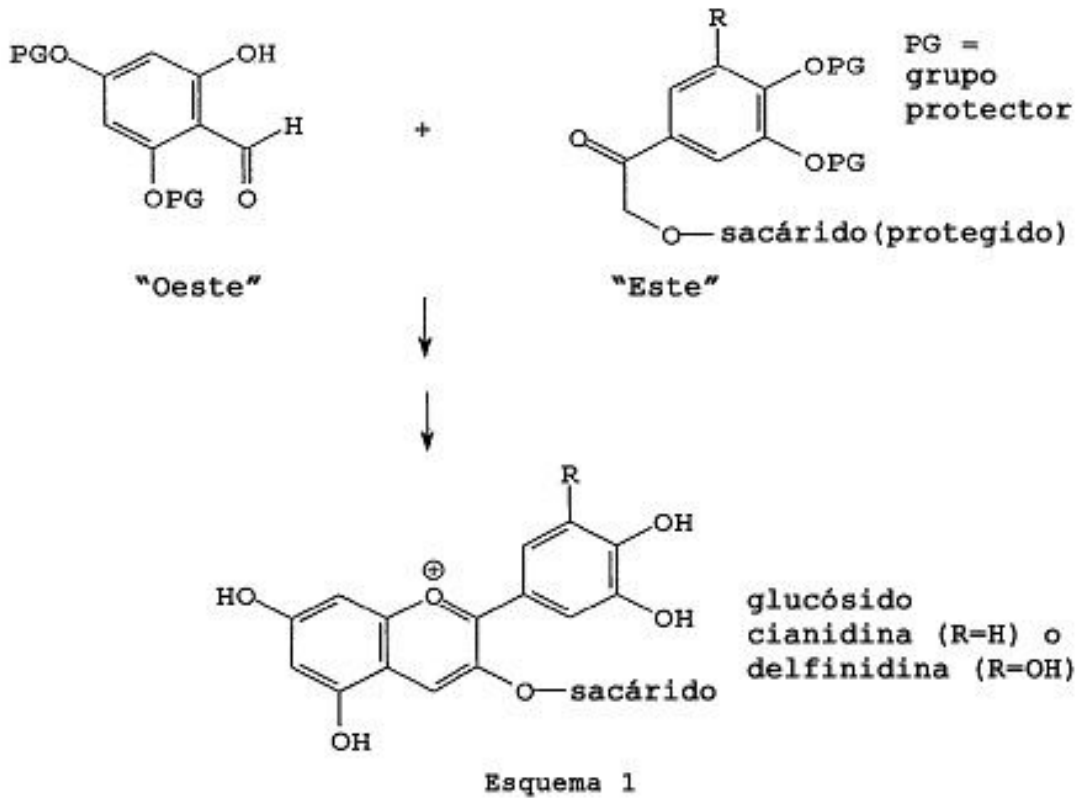
30 Los productos que contienen antocianina pueden prepararse a partir de dichas fuentes naturales. La publicación de solicitud de patente internacional WO nº 03/039569 da a conocer un método de preparación de productos que contienen antocianina. Este método puede aplicarse a extractos de frutas u hortalizas.

35 En lugar de obtener antocianinas o composiciones que contienen antocianina de fuentes naturales, pueden prepararse mediante métodos sintéticos. Los métodos sintéticos proporcionan una ruta alternativa para la extracción de fuentes naturales y pueden resultar preferibles para la producción de grandes cantidades de antocianinas específicas. La síntesis de antocianinas también puede facilitar el proceso regulador y/o evitar problemas de suministro en el caso de que deba utilizarse como medicamento una antocianina específica o una mezcla de las mismas. De esta manera, una ruta sintética podría permitir un mayor control de la pureza o composición exacta de un producto potencial farmacéuticamente activo.

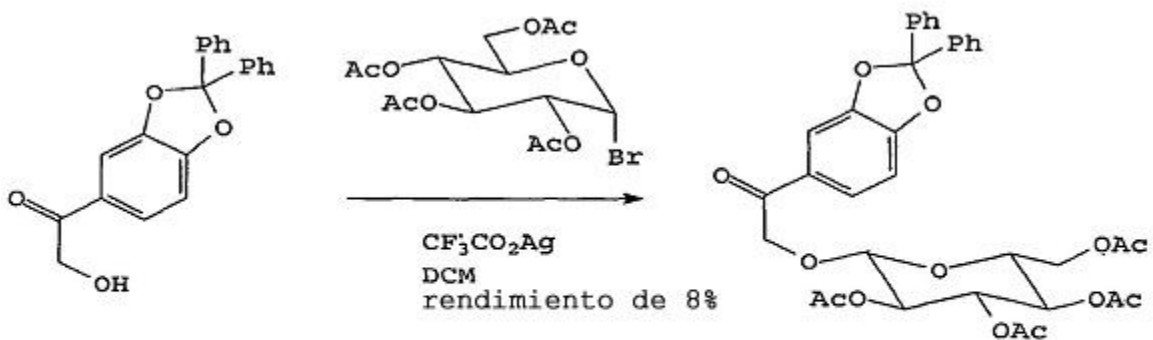
45 Las rutas sintéticas conocidas a los iones flavilio pueden implicar el acoplamiento de dos mitades, las denominadas partes "este" y "oeste" de la molécula (ver, por ejemplo, D.D. Pratt, R. Robinson, J. Chem. Soc. 745, 1923; T.J. Nolan, D.D. Pratt, R. Robinson, J. Chem. Soc. 1926, 1968; S. Murakami, R. Robinson, J. Chem. Soc. 1537, 1932; W. Bradley, R. Robinson, J. Chem. Soc. 1541, 1932; L. Reichel, H.W. Doering, Justus Liebigs Ann. Chem 606, 137, 1957; A. R. Katrizky, P. Czerney, J. R. Levell, W. Du, Eur. J. Org. Chem. 2623, 1998; C. Michaelidis, R. Wizinger, Helv. Chim. Acta 34, 1761, 1951; K. Kokkinos, R. Wizinger, Helv. Chim. Acta 56, 983, 1973; K. Kokkinos, R. Wizinger, Helv. Chim. Acta 56, 985, 1973; K. Kokkinos, R. Wizinger, Helv. Chim. Acta 56, 987, 1973; F. Herstein, S. Von Kostanecki, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 32, 318, 1899; A. Roque, C. Lodeiro, F. Pina, M. Maestri, R. Ballardini, V. Balzani, Eur. J. Org. Chem. 2699, 2002 y R. A. McClland, G. H. McGall, J. Org. Chem. 47, 3730, 1982; O. Dangles, A. El Hajji, Helv. Chim. Acta 77, 1595, 1994).

55 Las partes "este" y "oeste" de las antocianinas son términos de la técnica para el experto en química orgánica sintética.

60 Por ejemplo, las antocianinas pueden prepararse mediante el método general siguiente, tal como se ilustra en el Esquema 1 según el trabajo pionero de Sir Robert Robinson (la primera síntesis total de la cianidina cloruro de 3-O-β-glucopiranosido tal como se informa en S. Murakami, A. Robertson, R. Robinson, J. Chem. Soc. 2665, 1931; y la primera síntesis total de la definidina cloruro de 3-O-β-glucopiranosido, tal como se informa en T.M. Reynolds, R. Robinson, J. Chem. Soc. 1039, 1934. La primera antocianina que se sintetizó mediante síntesis total fue la pelargonidina cloruro de 3-O-β-glucopiranosido (A. Robertson, R. Robinson, J. Chem. Soc. 1460, 1928). Según los conocimientos del inventor, la última síntesis total de antocianinas fue informada por O. Dangles, A. El Hajji, Helv. Chim. Acta 77, 1595, 1994.



5 Sin embargo, los métodos conocidos de preparación de antocianinas resultan en rendimientos pobres. Robinson utilizó la reacción de Koenigs-Knorr para preparar intermediarios "este". Esta reacción requiere la utilización de condiciones extremadamente secas, resulta en rendimientos bajos y no resulta fácilmente adaptable a la utilización a gran escala. Un intento del inventor de la presente invención de sintetizar un intermediario "este" similar al preparado por Robinson presentó un rendimiento de únicamente el 8% (Esquema 2). Lo anterior implicó el acoplamiento de 2-hidroxi-3',4'-difenílmetilendioxiacetofenona con bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosilo.

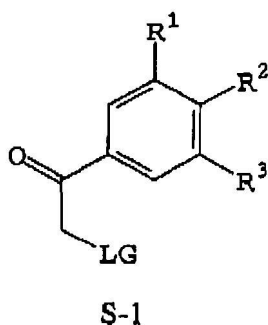


10 Otros métodos conocidos para preparar antocianinas adolecen de diferentes desventajas. Por ejemplo, la reducción de Clemmensen de la rutina, que proporciona la antocianina correspondiente, la cianidina cloruro de 3-rutinoso (queracianina), requiere la utilización de amalgama de cinc tóxica (M. Elhabiri, P. Figuereido, A. Fougerousse, R. Brouillard, Tetrahedron Lett. 36:4611, 1995).

15 Por lo tanto, todavía existe una necesidad de rutas sintéticas alternativas para las antocianinas, en particular una ruta que permite la preparación de antocianinas particulares a alto rendimiento y a gran escala. La presente

invención proporciona un método mejorado de preparación de un intermediario "mitad este" clave, proporcionando de esta manera una síntesis mejorada de antocianinas.

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación de una parte este de una antocianina, comprendiendo: reaccionar un material de partida cetona α -funcionalizada de fórmula general S-1:

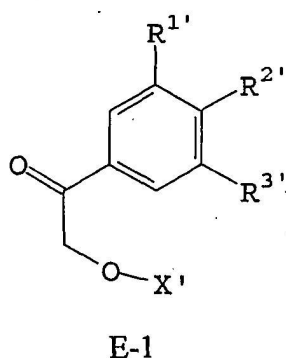


10 en la que LG es un grupo saliente seleccionado de entre bromo, yodo, tosilato, brosilato, triflato, mesilato o amonio cuaternario,

R^1 es H, OMe u OPG; R^2 es OPG; y R^3 es H, OMe u OPG; y cada PG independientemente se refiere a un grupo protector; (en toda la presente memoria, PG se refiere a un grupo protector y, de esta manera, OPG se refiere a un grupo hidroxil protegido,

15 en el que PG se encuentra presente en diferentes partes de un compuesto, puede, aunque no necesariamente, referirse al mismo grupo protector, y dos grupos OPG contiguos opcionalmente pueden formar conjuntamente una fracción cíclica), con un anión sacárido de fórmula general:

20 XO, en la que XO^- es un anión formado mediante la eliminación de un protón de un átomo de oxígeno anomérico de un monosacárido o disacárido, protegiendo cualquier otro grupo hidroxil del sacárido mediante grupos protectores adecuados, y opcionalmente eliminando algunos o todos los grupos protectores, proporcionando un intermediario mitad este de fórmula general E-1:

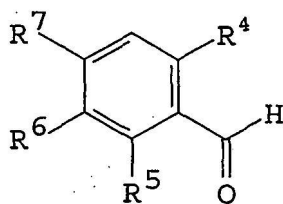


25 en la que $R^{1'}$, $R^{2'}$, $R^{3'}$ y X' son, independientemente cada uno, iguales a R^1 , R^2 , R^3 y X, respectivamente, o son los análogos desprotegidos de los mismos.

30 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una antocianina, que comprende el método anteriormente descrito para preparar una parte este de una antocianina, seguido de:

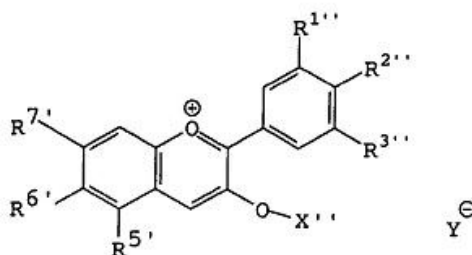
opcionalmente, en el caso de que cualquiera de entre $R^{1'}$, $R^{2'}$, $R^{3'}$ o X' sean los análogos desprotegidos de R^1 , R^2 , R^3 o X, respectivamente, proteger nuevamente uno o más de entre $R^{1'}$, $R^{2'}$, $R^{3'}$ y X' , y después

35 hacer reaccionar el intermediario mitad este de fórmula general E-1 o su derivado protegido nuevamente, con un intermediario mitad oeste de fórmula general W-1:



W-1

5 en la que R⁴ es OH, R⁵ es OPG, R⁶ es H y R⁷ es OH u OPG, o R⁴ es OH, R⁵ es H, R⁶ es OH u OPG, y R⁷ es H, acoplando de esta manera los intermediarios E-1 y W-1, y opcionalmente eliminado uno, varios o todos los grupos protectores, proporcionando un producto antocianina de fórmula general P-1:



P-1

10 en la que R^{1''}, R^{2''}, R^{3''}, X'', R^{5'}, R^{6'} y R^{7'} son, cada uno independientemente, iguales a R^{1'}, R^{2'}, R^{3'}, X', R⁵, R⁶ y R⁷, respectivamente, o son sus análogos desprotegidos, e

Y es un contraión, preferentemente un contraión fisiológicamente aceptable.

15 Se cree que algunos de los compuestos de fórmula S-1 son nuevos. Los compuestos en los que LG es Br o I y en los que R¹, R² y R³ se refieren, cada uno, a benciloxi, o en los que R¹ se refiere a H y R² y R³ conjuntamente se refieren a difenilmetilendioxo, forman un aspecto adicional de la invención.

20 Los compuestos antocianina en los que ninguno de los grupos hidroxilo se encuentra protegido o derivatizado muestran propiedades deseables. Sin embargo, la etapa final de desprotección es opcional, debido a que las antocianinas protegidas mismas pueden resultar útiles. Opcionalmente, pueden llevarse a cabo etapas posteriores, por ejemplo para sustituir los grupos protectores que se han perdido y/o para intercambiar grupos. Por ejemplo, los grupos hidroxilo en P-1 seguidamente pueden derivatizarse en grupos farmacológicamente aceptables que pueden eliminarse fácilmente *ex vivo* o en el cuerpo. En algunos casos, puede resultar ventajoso eliminar o cambiar los grupos protectores, por ejemplo por motivos de estabilidad o de toxicidad o de otra manera. En particular, los

25 compuestos en los que algunos o todos los grupos hidroxilo se derivatizan en grupos acetilo pueden mostrar propiedades deseables. Sin embargo, pueden utilizarse grupos acetilo como grupos protectores dentro del alcance del método de la presente invención, con independencia de si se encuentran presentes en el producto P-1 o en cualquier producto posterior.

30 Las definiciones de R^{1''}, R^{2''}, R^{3''}, R^{5'}, R^{6'} y R^{7'} son tales que los productos antocianina de fórmula general P1 incluyen compuestos que comprenden núcleos aglicona de antocianinas naturales y de sus derivados. Sin embargo, los compuestos P-1 pueden ser antocianinas naturales o antocianinas de origen no natural ("no naturales"). Las definiciones de R^{1''}, R^{2''}, R^{3''}, R^{5'}, R^{6'} y R^{7'} para los núcleos de algunas de las antocianinas naturales son las siguientes:

aglicona	R ^{1''}	R ^{2''}	R ^{3''}	R ^{5'}	R ^{6'}	R ^{7'}
cianidina	H	OH	OH	OH	H	OH
peonidina	H	OH	OCH ₃	OH	H	OH
delfinidina	OH	OH	OH	OH	H	OH
petunidin	OH	OH	OCH ₃	OH	H	OH

malvidina	OCH3	OH	OCH3	OH	H	OH
pelargonidina	H	OH	H	OH	H	OH

Las definiciones de R^1 , R^2 , R^3 , R^1 , R^2 , R^3 , R^5 , R^6 y R^7 preferentemente son tales que las antocianinas cianidina o delfinidina o sus derivados pueden prepararse mediante el método de la presente invención.

5 La presente invención permite la producción de antocianinas mediante un método conveniente y con un alto rendimiento, debido al nuevo y ventajoso método para preparar los intermediarios mitad oriental de fórmula general E-1.

10 Dicho método proporciona compuestos de fórmula E-1 y P-1 con un alto rendimiento y mediante una ruta conveniente y suave que evita problemas de toxicidad asociados a los métodos conocidos. Resulta inesperada la obtención de elevados rendimientos de los compuestos de fórmula E-1, en vista de la presencia de dos centros electrofílicos en el material inicial α -funcionalizado S-1.

15 El acoplamiento de un compuesto de fórmula general S-1 con un anión sacárido de fórmula general XO^- según la presente invención es una reacción de glucosilación. En general, las reacciones de glucosilación pueden resultar en la formación de una mezcla de anómeros tanto α como β o pueden permitir el acceso a sólo un anómero con respecto al enlace sacárido. Sin embargo, una ventaja adicional de la etapa de glucosilación de la presente invención, en comparación con la mayoría de métodos de glucosilación, es que pueden controlarse para que resulte en la formación del anómero α o β .

20 El grupo saliente LG en el compuesto de fórmula S-1, es bromo, yodo, tosilato, brosilato, triflato, mesilato o amonio cuaternario (por ejemplo NR_3^+ , en el que cada R es, independientemente, H o alquilo C^{1-10}), preferentemente bromo o yodo, más preferentemente yodo. El grupo saliente se selecciona por su reactividad y compatibilidad, y la reacción funciona particularmente bien al utilizar bromo o yodo.

25 La fracción sacárida XO^- puede ser un monosacárido o un disacárido. Entre los ejemplos de los monosacáridos adecuados se incluyen glucosa, galactosa y arabinosa. Un ejemplo de un disacárido adecuado es la rutinosa (es decir, la 6-ramnosil-glucosa). Los monosacáridos, tales como la glucosa, resultan preferentes, debido a la actividad y perfil de incorporación de las antocianinas resultantes. Los monosacáridos generalmente también resultan más fáciles de utilizar. Durante el método de la presente invención, todos los grupos hidroxilo en la fracción sacárida deberían portar grupos protectores para evitar reacciones secundarias no deseadas. Cualquier otro grupo funcional en la fracción sacárida también puede requerir una protección adecuada. La presente invención cubre la utilización de enantiómeros tanto D como L del sacárido, aunque resulta preferente la utilización del enantiómero natural. Entre los sacáridos particularmente preferentes se incluyen D-glucosa, D-galactosa, D-arabinosa y 6-L-ramnosil-D-glucosa.

35 El anión sacárido XO^- puede encontrarse presente en forma de sal con cualquier catión adecuado que no evite el ataque nucleofílico de XO^- sobre el material de partida de cetona α -funcionalizada de fórmula general S-1. La sal puede prepararse mediante la reacción del sacárido XOH correspondiente con una base, por ejemplo con un reactivo hidruro. Entre los cationes adecuados se incluyen los cationes de metales del grupo I, tales como Na^+ , en los que la reacción del sacárido XOH con hidruro sódico es una manera conveniente de obtener el anión deseado. El hidruro sódico resulta ventajoso debido a que es económico y se encuentra fácilmente disponible. Entre otros cationes adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, potasio y litio.

45 La preparación de la fracción XO^- *in situ* (es decir, en presencia de la cetona α -funcionalizada S-1) reduce la posibilidad de reacciones secundarias no deseadas.

50 La presente invención permite la preparación de tanto α -estereoisómeros como β -estereoisómeros con respecto al enlace sacárido. Las antocianinas naturales generalmente presentan un enlace β -(ecuatorial), y la preparación de (β)-estereoisómeros unidos ecuatorialmente utilizando el método de la invención resulta preferente. La preparación del anión XO^- mediante la utilización de una base fuerte, tal como hidruro sódico, resulta en que el intermediario este presente la misma configuración que el precursor XOH (es decir, se forma el producto cinético). De esta manera, resulta necesario utilizar un β -estereoisómero de un precursor XOH y preparar el anión XO^- mediante la utilización de una base fuerte, tal como hidruro sódico *in situ*, proporcionando el β -estereoisómero del intermediario E-1. La utilización del α -anómero del precursor XOH con una base fuerte conducirá a la formación del intermediario α -unido E-1.

60 La utilización de una base débil para generar el anión XO^- tenderá a producir la formación de una mezcla de anómeros α y β . En el caso de que se permita que el anión XO^- se equilibre, predominará el anómero termodinámico (generalmente el anómero α).

La utilización de un compuesto de fórmula S-1 que sea un electrófilo potente también favorece la generación de producto cinético. La utilización de un electrófilo pobre resulta en tiempos de reacción más largos, estimulando la apertura de anillos del sacárido y favoreciendo la formación del producto termodinámico. De esta manera, el producto cinético se obtiene a rendimientos más altos (que el producto termodinámico) mediante la utilización de una base fuerte, tal como el hidruro sódico, y un electrófilo potente, tal como un compuesto de yodo (es decir, compuestos de fórmula S-1 en la que LG se refiere a I).

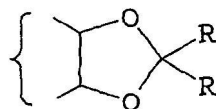
Y puede ser cualquier contraión adecuado, preferentemente un contraión fisiológicamente aceptable, tal como cloro, ascorbato, sulfato, fosfato, succinato, fumarato, malato, maleato o citrato. Preferentemente, el contraión es un anión ácido de fruta, en particular un citrato, debido a que estos presentan beneficios de sabor notables. Los iones cloro también resultan preferentes. Entre los procedimientos conocidos para el acoplamiento de intermediarios este y oeste se incluyen la utilización de un ácido para, entre otras cosas, desactivar la reacción y/o para eliminar los grupos protectores, y puede seleccionarse un ácido apropiado de manera que se incorpore el contraión deseado en el producto. Opcionalmente, puede llevarse a cabo el intercambio aniónico si se desea.

Los métodos para acoplar los intermediarios de mitad este tales como E-1 con intermediarios de mitad oeste tales como W-1 son conocidos de la técnica y se describen en, por ejemplo, Robertson, R. Robinson, J. Chem. Soc. 1460, 1928; S. Murakami, A. Robertson, R. Robertson, J. Chem. Soc. 2665, 1931; A. Leon, A. Robertson, R. Robinson, T. R. Seshadri, J. Chem. Soc. 2670, 1931; L. F. Levy, T. Posternack, R. Robinson, J. Chem. Soc. 2701, 1931; L. F. Levy, R. Robinson, J. Chem. Soc. 2715, 1931; K. E. Grove, R. Robinson, J. Chem. Soc. 2722, 1931; E. L. Fonseka, R. Robinson, J. Chem. Soc. 2730, 1931; A. Leon, R. Robinson, J. Chem. Soc. 2732, 1931; L. F. Levy, R. Robinson, J. Chem. Soc. 2738, 1931; R. Robinson, A. R. Todd, J. Chem. Soc. 2488, 1932; T. M. Reynolds, R. Robinson, J. Chem. Soc. 1039, 1934; O. Dangles, A. El Hajji, Helv. Chim. Acta 77:1595, 1994.

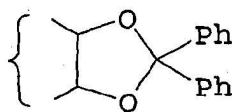
Tal como se ha indicado anteriormente, se utilizan grupos protectores en la presente invención, en algunos de los grupos hidroxilo en los anillos este y oeste y en la fracción sacárida. La utilización de grupos protectores es bien conocida de la técnica (ver, por ejemplo, T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3a edición, John Wiley & Sons). El experto en la materia podrá concebir grupos particulares disponibles para proteger grupos hidroxilo y otros grupos funcionales, y las condiciones bajo las que puede producirse la desprotección y la desprotección. Puede utilizarse cualquier grupo protector adecuado en el procedimiento de la invención. Cualquiera de dichos grupos protectores debería quedar en los grupos hidroxilo durante por lo menos parte de la primera etapa del procedimiento (preparación de intermediario este), de manera que el ataque nucleofílico del oxianión sacárido (XO⁻) en la cetona α -funcionalizada puede producirse sin excesivas reacciones secundarias no deseadas. En la medida en que los grupos protectores utilizados en la primera etapa se pierdan o resulten inadecuados para la segunda etapa (acoplamiento de intermediarios este y oeste), los grupos protectores deberían incorporarse de manera que pueda producirse el acoplamiento sin excesivas reacciones secundarias no deseadas. Evidentemente resulta preferible utilizar los mismos grupos protectores para ambas etapas, de manera que se minimice la complejidad de la síntesis. Los grupos protectores deberían poder eliminarse durante la segunda etapa o después de la misma, si se desea.

Entre los grupos protectores adecuados para los grupos hidroxilo en el método de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los grupos acilo (por ejemplo acetilo o benzoilo), que pueden eliminarse fácilmente bajo condiciones básicas, y los grupos bencilo, que pueden eliminarse mediante hidrogenación. La utilización de los grupos protectores bencilo resulta particularmente preferente para la síntesis a gran escala debido a su fácil eliminación mediante hidrogenación. En todos los casos, las condiciones para eliminar los grupos protectores deben permitir que el producto antocianina P-1 no resulte indebidamente dañado.

Los dioles vecinos pueden protegerse mediante la formación de grupos cíclicos tales como acetales, cetales y ortoésteres. Entre los grupos cíclicos preferentes se incluyen los mostrados a continuación:



en los que cada R se refiere independientemente, por ejemplo, a H, alquilo (por ejemplo alquilo C₁-C₆), arilo (por ejemplo fenilo) o alcoxi (por ejemplo alcoxi C₁-C₆). Por ejemplo, la protección de dioles vecinos tales como el derivado difenilmetilendioxi:



puede llevarse a cabo mediante la reacción del diol vecino con diclorodifenilmetano, por ejemplo bajo reflujo de tolueno. Tras el acoplamiento, dichos grupos protectores pueden eliminarse mediante reacción con ácido acuoso.

5

Debido a que los métodos de acoplamiento de intermediarios occidentales y este habitualmente implican una etapa de reacción ácida, pueden resultar preferentes los grupos protectores que no son lábiles a ácidos, o que son sólo ligeramente lábiles a ácidos. Por ejemplo, algunos grupos protectores acetato pueden perderse durante el acoplamiento debido a su labilidad a ácidos, mientras que los ésteres de benzoilo son más resistentes a la hidrólisis ácida. Sin embargo, pueden utilizarse grupos protectores lábiles a ácidos. Por ejemplo, tal como se ejemplifica posteriormente, algunos de los grupos hidroxilo en el intermediario mitad oeste y el sacárido pueden convertirse en un grupo difenilmetilendioxi. A continuación, los grupos protectores pueden simplemente hidrolizarse durante o después del acoplamiento de los intermediarios mitad este y mitad oeste, liberando los grupos hidroxilo libres.

15

$R^{2'}$ o $R^{2''}$ preferentemente se refieren a un grupo hidroxilo o a un grupo que resulta hidrolizado bajo condiciones básicas, liberando un grupo hidroxilo. El inventor ha encontrado que lo anterior incrementa la estabilidad del producto antocianina P-1 y evita reacciones secundarias bajo condiciones básicas. $R^{2'}$ o $R^{2''}$ pueden, por ejemplo, referirse a OH o OCOCH_3 .

20

Resulta ventajoso proteger el diol vecino en el anillo aromático de la mitad este de la antocianina (es decir, los sustituyentes R^2 y R^3) mediante la conversión de este diol vecino en un grupo difenilmetilendioxi. Dicho grupo protector presenta un nivel apropiado de estabilidad frente a ácidos para resistir las condiciones de reacción pero además siendo eliminable bajo condiciones suaves.

25

Entre las combinaciones preferentes de las fracciones en el material inicial S-1 se incluyen las siguientes (Ac se refiere a acetilo, Bn se refiere a bencilo, y Bz se refiere a benzoilo, de acuerdo con las abreviaturas normales de la química orgánica):

combinación nº	R^1	R^2	R^3
1	H	OCPh(Ph)O	
2	H	OAc	OAc.
3	H	OBn	OBn
4	H	OBz	OBz
5	OAc	OCPh(Ph)O	
6	OAc	OAc	OAc
7	OBn	OBn	OBn
8	OBz	OBz	OBz

30

Entre las combinaciones preferentes de las fracciones del intermediario oeste W-1 se incluyen las siguientes:

combinación nº	R^4	R^5	R^6	R^7
1	OH	OBz	H	OBz
2	OH	OBz	H	OH
3	OH	OAc	H	OAc
4	OH	OAc	H	OH
5	OH	OBn	H	OBn
6	OH	OBn	H	OH

7	OH	H	OH	H
8	OH	H	OBz	H
9	OH	H	OAc	H
10	OH	H	OBn	H

Entre los grupos protectores preferentes para los grupos hidroxilo en XO^- se incluyen acetilo, bencilo y benzoilo.

Las antocianinas cianidina pueden, en una realización, prepararse mediante la utilización de grupos protectores acetilo en la mitad oeste y sacárido, y la utilización de la protección de difenilmetilendioxi en la mitad este.

5 Las antocianinas delfinidina pueden, en una realización, prepararse mediante la utilización de grupos protectores acetilo en la mitad oeste y sacárido, y la utilización de la protección de bencilo en la mitad este.

10 La reacción del material inicial de fórmula general S-1 con el anión sacárido XO^- para formar el intermediario mitad este de fórmula general E-1 preferentemente se lleva a cabo bajo las condiciones siguientes. El tiempo de reacción y la temperatura permiten que la reacción transcurra a un nivel elevado de conversión. Por ejemplo, los tiempos de reacción de entre 0 y 30 horas, preferentemente de entre 5 y 20 horas, y temperaturas de entre 0°C y 500°C , más preferentemente de entre 10°C y 35°C , más preferentemente de aproximadamente la temperatura ambiente, se ha encontrado que resultan adecuados.

15 Preferentemente, el material inicial de fórmula S-1 y el sacárido de fórmula XOH se disuelven en un solvente y se añade una base (por ejemplo un reactivo hidruro, preferentemente hidruro sódico) a dicha solución, preferentemente en partes, de manera que la reacción se produzca de una manera controlada, preferentemente bajo agitación. La reacción preferentemente se lleva a cabo en un solvente razonablemente polar, bajo condiciones secas. Entre los solventes adecuados se incluyen, por ejemplo dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF), 1,2-dimetoxietano (DME) y diclorometano (DCM). Los solventes que son polares o semipolares, pero que no se desprotonan en presencia de una base fuerte, resultan preferentes debido a los rendimientos más altos obtenibles en estos solventes. Por ejemplo, se debe prestar cuidado en el caso de que se utilice un exceso de NaH en DCM, debido a que NaH puede causar la descomposición del DCM. Dicha descomposición puede minimizarse mediante el mantenimiento de una temperatura de reacción baja (por ejemplo la temperatura ambiente o inferior). Bajo las condiciones de reacción indicadas en la parte experimental, no se observó ninguna descomposición significativa del diclorometano a pesar de la utilización de un exceso de NaH.

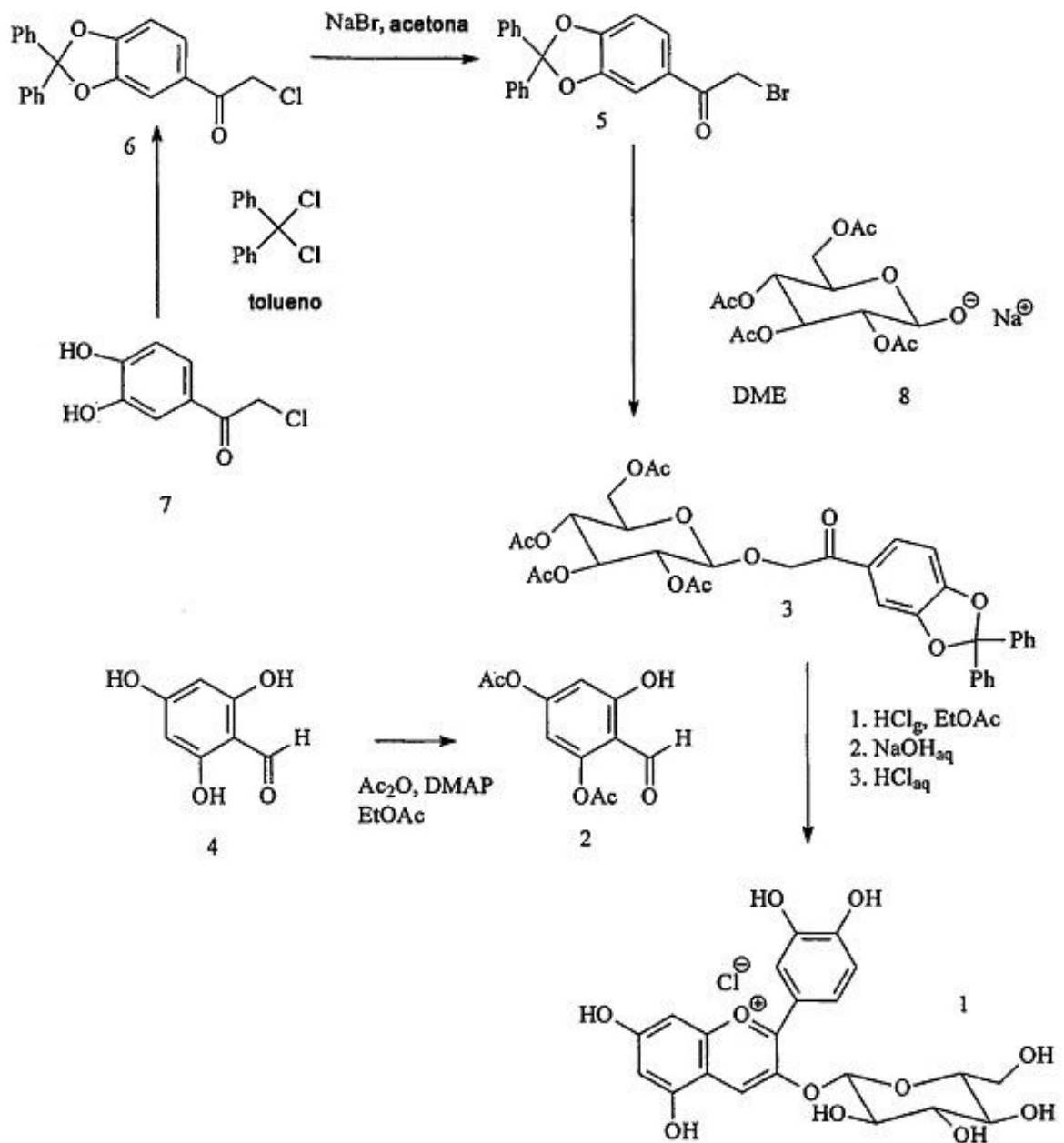
30 En la reacción de acoplamiento, se ha encontrado que los compuestos de fórmula S-1 en la que LG es Br o I son los materiales iniciales más preferibles, siendo los compuestos de I particularmente preferentes. Preferentemente se utilizan DME, THF y DMC como solventes al utilizar compuestos de Br, más preferentemente THF y DME, siendo DME el solvente más preferente. La utilización de THF y DME como solventes resultó en rendimientos más altos durante la reacción de acoplamiento utilizando compuestos de Br (la utilización de DCM resultó en la formación de productos secundarios, resultando en rendimientos más bajos). La reactividad de los compuestos de I en la reacción de acoplamiento se ha encontrado que es en gran medida independiente del solvente, aunque preferentemente se utiliza DCM por razones de costes y debido a que resulta más fácil de secar que THF o DME. Sin respaldo teórico, se cree que el yodo es un mejor grupo saliente que el bromo, y que por lo tanto no resulta necesario un solvente altamente polar para estimular la reacción de acoplamiento.

40 Los materiales iniciales de fórmula general S-1, los intermediarios mitad oeste de fórmula general W-1, los intermediarios mitad este de fórmula general E-1 y los aniones sacáridos de fórmula general XO^- se encuentren disponibles comercialmente o son obtenibles mediante métodos estándares de síntesis orgánica.

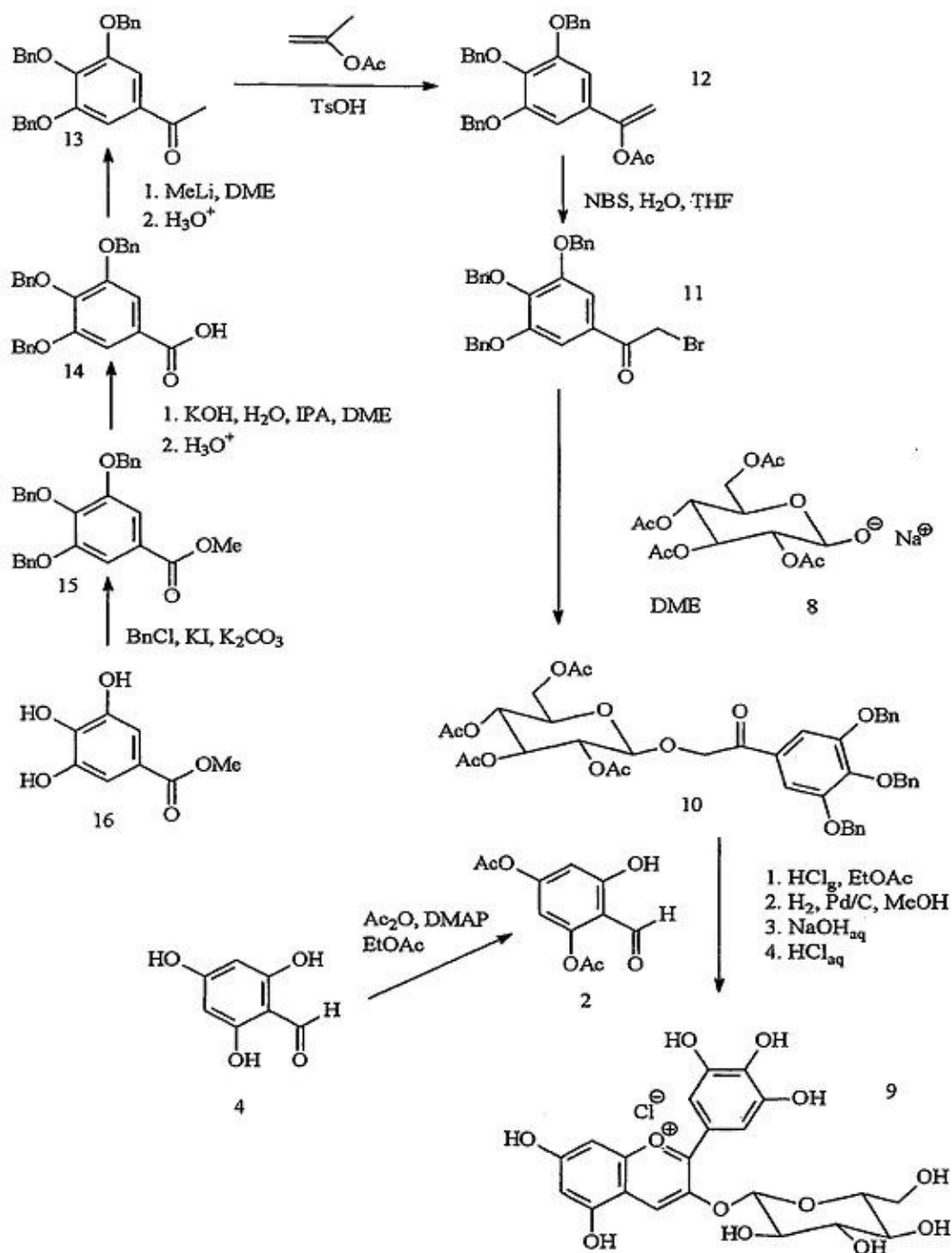
45 Por ejemplo, el material inicial de fórmula S-1, en la que R^1 es H, puede prepararse a partir de la α -cloroacetona correspondiente que se encuentre disponible comercialmente. Una manera de obtener el material inicial S-1 en el que R^1 es hidroxilo protegido se inicia a partir de compuestos disponibles comercialmente basados en el ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico). Los compuestos XOH protegidos se encuentran comercialmente disponibles o pueden prepararse fácilmente, por ejemplo mediante reacción de los compuestos XBr correspondientes con carbonato de plata (C.M. McCloskey, G.H. Coleman, Organic Syntheses, Coll. vol. 3:434).

50 Según realizaciones preferentes de la presente invención, se prepararon cloruro de cianidín-3-O- β -glucopiranosido (1) y cloruro de delfinidín-3-O- β -glucopiranosido (9) según los esquemas de reacción (Esquemas 3 y 4) y método experimental siguientes. Se cree que los compuestos (5) y (11) utilizados en dichos esquemas son nuevos y forman un aspecto adicional de la invención.

55



Esquema 3

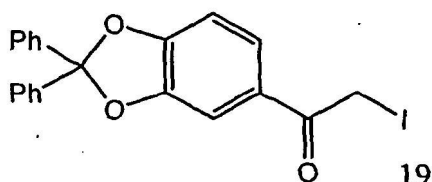


Esquema 4

En el Esquema 4, la desprotección que proporciona el compuesto final (9) implica la eliminación de los grupos protectores bencilo y acetilo presentes en los compuestos (2) y (10). Se ha encontrado que el orden de eliminación de los grupos protectores resulta importante para optimizar el rendimiento del producto. La eliminación de los grupos protectores acetato puede llevarse a cabo utilizando hidróxido sódico acuoso, mientras que los grupos bencilo se desprotegen mediante hidrogenación. La eliminación de los grupos protectores acetato en primer lugar, antes de la eliminación de los grupos bencilo, tiende a conducir a la descomposición del producto, mientras que la eliminación de los grupos bencilo en primer lugar seguido del tratamiento con hidróxido sódico para eliminar los grupos acetato proporciona buenos rendimientos del producto (9). Se postula que dicha diferencia se debe a las diferentes tendencias de los diversos intermediarios parcialmente desprotegidos implicados en la descomposición bajo

condiciones básicas.

A modo de alternativa, la ruta sintética preferente que conduce al cloruro de cianidín-3-O-β-glucopiranosido (1) utiliza el yodo como grupo saliente en la reacción de acoplamiento, formando el compuesto (3). En dicho método, el compuesto (6) se convierte en el yoduro correspondiente (19). El yoduro (19) es inestable a temperaturas más altas, de manera que las condiciones de reacción deben seleccionarse para minimizar cualquier descomposición del producto. Las condiciones de reacción adecuadas comprenden la agitación con yoduro sódico en acetonitrilo seco a temperatura ambiente durante la noche.



10

A continuación, se hace reaccionar el compuesto (19) con compuesto (8) en DCM, proporcionando compuesto (3) a un rendimiento significativamente más alto que el acoplamiento de (5) con (8). Globalmente, la ruta sintética a través del compuesto de yodo (19) resulta preferente debido al elevado rendimiento de la etapa de acoplamiento entre compuesto (19) y compuesto (8).

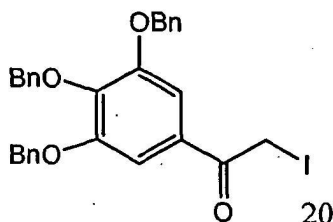
15

También resulta posible sintetizar compuesto (1) utilizando grupos protectores bencilo para los grupos OH en los compuestos S-1 en lugar del grupo protector difenilmetileno mostrado en el Esquema 3. La utilización de grupos protectores bencilo resulta particularmente preferente para la síntesis a gran escala debido a su fácil eliminación mediante hidrogenación (por ejemplo utilizando gas hidrógeno con un catalizador de Pd/C).

20

Se ha encontrado que la síntesis de cloruro de delfinidín-3-O-β-glucopiranosido (9) a través del compuesto de yodo (20) también resulta en mejores rendimientos que la utilización del compuesto de bromo (11), tal como se muestra en el Esquema 4.

25



30

El compuesto (20) puede sintetizarse a partir del compuesto (11) mediante intercambio de haluro, por ejemplo mediante tratamiento con NaI en acetonitrilo a temperatura ambiente. Al igual que con el compuesto (19), deben seleccionarse las condiciones de reacción para minimizar la descomposición del producto de yodo (20), que es inestable a temperaturas elevadas. Alternativamente, y preferentemente, el compuesto (20) puede sintetizarse directamente a partir del compuesto (12) utilizando N-yodosuccinamida (NIS) en THF seco. A continuación, se hace reaccionar el compuesto (20) con compuesto (8) en DCM, formando compuesto (10) a altos rendimientos. Se ha encontrado que el rendimiento global de cloruro de delfinidín-3-O-β-glucopiranosido (9) puede mejorarse convirtiendo en primer lugar el compuesto (11) en el compuesto (20), y después acoplado posteriormente este compuesto de yodo con el compuesto (8) para formar el compuesto (10), a pesar del hecho de que ello requiere una etapa sintética adicional. La mejora del rendimiento se debe a la eficiente reacción de acoplamiento entre el compuesto (20) y el compuesto (8). Los rendimientos se mejoran adicionalmente mediante conversión del compuesto (12) directamente en compuesto (20) utilizando NIS.

35

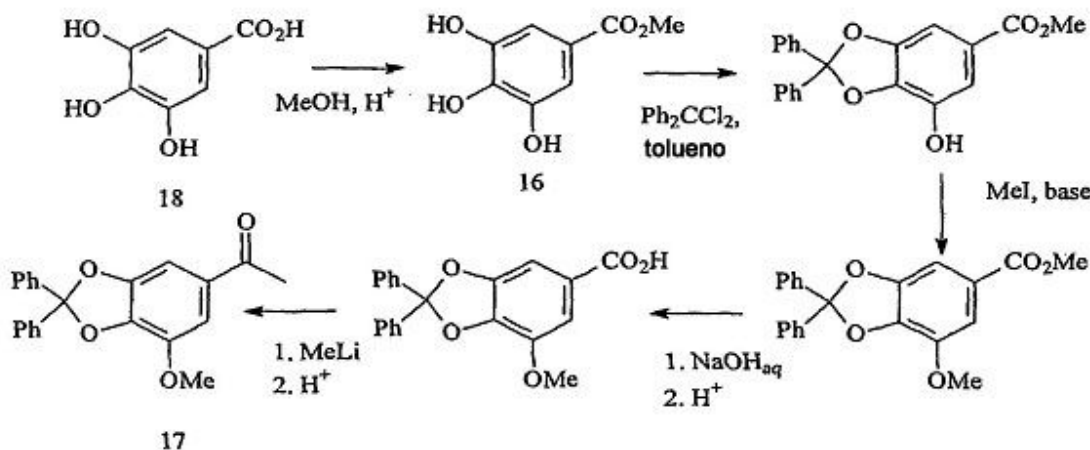
El análogo tosilato de los compuestos (11) y (20) también puede utilizarse como intermediario en el Esquema 4. Éste puede formarse directamente a partir del compuesto (13) utilizando reactivo de Koser. A continuación, el tosilato puede utilizarse en la reacción de acoplamiento con el compuesto (8) para formar el compuesto (10).

40

Las antocianinas que comprenden otros núcleos de aglicona pueden prepararse utilizando una metodología análoga a la mostrada en los Esquemas 3 y 4. Por ejemplo, pueden sintetizarse antocianinas pelargonidina a partir del material inicial disponible comercialmente 4-hidroxiacetofenona, las antocianinas peonidina a partir del material

inicial comercialmente disponible 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona y las antocianinas malvidina a partir del material inicial comercialmente disponible 3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona. Las antocianinas petunidina pueden sintetizarse a partir de una forma protegida de 3,4-dihidroxi-5-metoxiacetofenona (17), que puede sintetizarse ella misma a partir del material inicial comercialmente disponible ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (18), tal como se muestra a continuación (Esquema 5).

5



Se dan a conocer específicamente cualquiera y todas las combinaciones de las características preferentes a la que se hace referencia en la presente memoria forman parte de la invención, se den a conocer específicamente o no dichas combinaciones.

10

Los Ejemplos siguientes son ilustraciones no limitativas de la invención.

15

Datos experimentales

Se registraron los espectros de RMN-¹H a 300 MHz de resonancia magnética nuclear y espectros de RMN-¹³C a 75 MHz en un espectrómetro Varian de 300 MHz. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se informan los desplazamientos químicos de espectros de RMN-¹H campo abajo de TMS, en ppm. Se proporcionan los espectros de ¹³C-RMN en ppm respecto al deuteriocloroformo ($\delta=76,9$ ppm) o a DMSO-d₆ ($\delta=39,5$ ppm) o a MeOH-d₄ ($\delta=49,0$ ppm). Se llevaron a cabo análisis de cromatografía líquida de alta presión/rendimiento (HPLC) en un Waters 2695 (módulo de separación) conectado a un Waters 996 (detector de matriz de fotodiodos). La columna utilizada era una Hewlett Packard, HP ODS Hypersil (4,6 x 200 mm, tamaño de partícula: 5 μ m). El eluyente era agua-acetonitrilo. Se llevaron a cabo análisis de espectrometría de masas (MS) en un espectrómetro de masas Micromass Platform LCZ utilizando la ionización por electropulverización en modo positivo. Se llevó a cabo una cromatografía flash seca con gel de sílice (Fluka: gel de sílice 60, tamaño de partícula: 0,040 a 0,063 mm (malla de 230-400)). Se creó un vacío con un aspirador de agua. Se llevó a cabo una cromatografía en capa fina (TLC) utilizando placas de gel de sílice de Fluka (gel de sílice/dc-alufolien-kieselgel con indicador fluorescente, prod. n° 60778). Las manchas se detectaron mediante UV (extinción a $\lambda=254$ nm o fluorescencia a $\lambda=366$ nm) en un gabinete de UVP-UV y/o mediante tinción con MOP (molibdato-ácido fosfórico (14 g) en etanol (125 ml)) o CERMOP (molibdato-ácido fosfórico (5 g), sulfato de cerio (IV) (2 g) y H₂SO₄ al 98% (16 ml) en agua (180 ml)), y se revelaron mediante calentamiento con una pistola térmica hasta la aparición de las manchas. Se llevó a cabo una cromatografía en capa fina de las antocianinas en hojas de celulosa (Merck, 1,05565, celulosa F) utilizando FHW (ácido fórmico al 98%-HCl al 37%-agua, 4:1:8) como eluyente. Se obtuvieron compuestos químicos disponibles químicamente de Fluka, Aldrich, Acros, Merck and Lancaster. En caso necesario, se aplicaron métodos estándares de purificación. Además, se obtuvieron de Fluka, acetona seca, acetonitrilo, DCM, DMSO, THF, DME y EtOAc seco.

20

25

30

35

40

45

2,4-Diacetoxi-6-hidroxibenzaldehído (2): se sometieron a reflujo durante la noche 2,4,6-trihidroxibenzaldehído (4) (4,62 g, 30 mmoles), anhídrido acético (6,13 g, 60 mmoles) y una cantidad catalítica de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) en acetato de etilo seco (EtOAc). Se filtró la mezcla de reacción, se añadió agua (50 ml) y se extrajo la fase acuosa con EtOAc (4x25 ml). Las fases orgánicas agrupadas se lavaron con agua (2x25 ml) y se secaron (MgSO₄). El producto crudo se recrystalizó a partir de 1,2-dimetoxietano (DME), proporcionando el compuesto del título en forma de cristales blancos, p.f.: 103°C a 105°C. Rendimiento: 4,3 g (60%). RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): $\delta= 2,29$ (3H, s), 2,36 (3H, s), 6,61 (1H, s), 6,63 (1H, s), 10,04 (1H, s), 11,77 (1H, s); RMN ¹³C (75 MHz): $\delta=20,6$ (CH₃), 21,0 (CH₃),

107,6 (CH), 108,1 (CH), 111,0 (C), 153,5 (C), 157,2 (C), 163,9 (C), 169,7 (C=O), 168,1 (C=O), 191,8 (HCO).

2-cloro-3',4'-difenilmetilendioxiacetofenona (6): se disolvió 2-cloro-3',4'-dihidroxiacetofenona (7) (9,33 g, 50 mmoles) en tolueno (125 ml) y se añadió α,α -diclorodifenilmetano (11,86 g, 50 mmoles). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 24 horas, se enfrió a la temperatura ambiente y se lavó con agua (6x20 ml). La fase acuosa se extrajo con tolueno (3x50 ml) y las fases orgánicas agrupadas se secaron (MgSO_4). La filtración y evaporación del solvente dejó un sólido amarillo que era esencialmente producto puro. La recristalización a partir de una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo proporcionó el compuesto del título en forma de cristales blancos, p.f.: 100°C a 101°C. Rendimiento: 15,7 g (89%); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 4,55 (2H, s), 6,89 (1H, d, J= 8,7 Hz), 7,34-5,57 (12H, m); RMN ^{13}C (75 MHz): δ =45,5 (CH_2), 108,1 (2 x CH), 108,2 (C), 118,4 (C), 124,9 (CH), 126,0 (2 x CH), 128,2 (4 x CH), 128,8 (C), 129,3 (4 x CH), 139,2 (2 x C), 147,8 (C), 151,8 (C), 189,0 (C=O).

2-Bromo-3',4'-difenilmetilendioxiacetofenona (5): se disolvió 2-cloro-3',4'-difenilmetilendioxiacetofenona (6) (7,02 g, 20 mmoles) en acetona seca (150 ml) y se añadió bromuro sódico (2,26 g, 22 mmoles). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante la noche. La filtración y evaporación del solvente dejó un sólido amarillo que era esencialmente producto puro. La recristalización a partir de una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo proporcionó el compuesto del título en forma de cristales blancos, p.f.: 78°C a 79°C. Rendimiento: 7,71 g (97 %); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 4,34 (2H, s), 6,93 (1H, d), 7,34-7,52 (12H, m); RMN ^{13}C (75 MHz): δ =30,5 (CH_2), 108,1 (2 x CH), 108,6 (C), 118,4 (C), 125,5 (C), 126,0 (2 x CH), 128,1 (4 x CH), 128,4 (C), 129,3 (4 x CH), 139,3 (2 x C), 147,9 (C), 151,9 (C), 189,4 (C=O).

2-Yodo-3',4'-difenilmetilendioxiacetofenona (19): se disolvieron 2-cloro-3',4'-difenilmetilendioxiacetofenona (6) (52,62 g, 0,15 moles) y yoduro sódico (34,47 g, 0,23 moles) en acetonitrilo seco (400 ml) y se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. La solución se filtró y se eliminó el acetonitrilo bajo vacío. Se añadió agua (200 ml) y la solución se extrajo con éter dietílico (4x150 ml). Se secó la fase orgánica (MgSO_4) y se eliminaron los solventes al vacío. La recristalización a partir de metilciclohexano proporcionó el compuesto del título en forma de cristales amarillos, p.f.: 105°C a 107°C. Rendimiento: 65,0 g (98%). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ =4,26 (s, 2H), 6,91-7,04 (m, 2H), 7,26-7,30 (m, 5H), 7,42-7,50 (m, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =1,3 (CH_2), 108,1 (2 x CH), 108,7 (C), 118,4 (C), 125,5 (C), 126,1 (2 x CH), 128,0 (C), 128,3 (4 x CH), 129,3 (4 x CH), 139,3 (2 x C), 147,9 (C), 151,7 (C), 191,0 (C=O).

2-(2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-3',4'-difenilmetilendioxiacetofenona (3):

Método A: se disolvieron 2-bromo-3',4'-difenilmetilendioxiacetofenona (5) (1,98 g, 5 mmoles) y β -D-glucosa-2,3,4,6-tetraacetato (8) (C.M. McCloskey, G.H. Coleman, Organic Syntheses, Coll. vol. 3 434) (1,74 g, 5 mmoles) en DCM seco (50 ml) y se añadió hidruro sódico (0,18 g, 7,5 mmoles (0,3 g, suspensión de NaH al 60% en aceite) en partes pequeñas. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua (50 ml) y se extrajo la fase acuosa con DCM (3x25 ml). Se agruparon las capas orgánicas y se lavaron con agua (2x50 ml), se secaron (MgSO_4) y se evaporaron, proporcionando un aceite amarillo. Se aisló el producto crudo mediante cromatografía flash seca (PE/EtOAc 6:4) (PE=éter de petróleo), proporcionando 1,22 g (37%) de un aceite viscoso amarillo que se solidificó lentamente al dejarlo en reposo. La repetición de la reacción utilizando tetrahidrofurano seco (THF) como solvente en lugar de DCM resultó en un rendimiento de 51%. La repetición de la reacción utilizando DME seco como solvente resultó en un rendimiento de 63%. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ =1,90 (3H, s), 1,92 (3H, s), 1,94 (3H, s), 1,95 (3H, s), 4,01-4,07 (2H, m), 4,61-4,75 (5H, m), 5,01-5,10 (1H, m), 5,15-5,25 (1H, m), 6,80 (1H, d, J= 8,4 Hz), 7,27-7,48 (12H, m); RMN ^{13}C (75 MHz): δ =20,4 (4 x CH_3), 61,5 (CH_2), 68,0 (CH_2), 70,1 (CH), 70,7 (CH), 71,6 (CH), 72,3 (CH), 99,9 (CH), 107,8 (2 x CH), 108,0 (C), 118,4 (C), 124,3 (CH, C), 125,9 (2 x CH), 128,1 (4 x CH), 128,2 (C), 129,2 (4 x CH), 139,2 (2 x C), 147,5 (C), 151,4 (C), 169,1 (C=O), 169,4 (C=O), 169,8 (C=O), 170,3 (C=O), 192,6 (C=O).

Método B: se disolvieron 2-yodo-3',4'-difenilmetilendioxiacetofenona (19) (6,63 g, 15 mmoles) y β -D-glucosa-2,3,4,6-tetraacetato (8) (6,27 g, 18 mmoles) en DCM seco (50 ml) y se añadió hidruro sódico (0,72 g, 30 mmoles (1,2 g de suspensión al 60% de NaH en aceite) en partes pequeñas. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El exceso de hidruro sódico se descompuso mediante adición de una cantidad adecuada de agua. Se eliminó el diclorometano al vacío. Se añadió agua (100 ml) y la fase acuosa se extrajo con éter dietílico (4x75 ml). Se agruparon las capas orgánicas y se lavaron con agua (2x50 ml), se secaron (MgSO_4) y se evaporaron, proporcionando un aceite oscuro. Se aisló el producto crudo mediante cromatografía flash seca (PE/EtOAc 6:4), proporcionando 7,26 g (73%) de un sólido amarillo pálido.

3-O- β -glucopiranosido cloruro de cianidina (1): se disolvieron 2,4-diacetoxi-6-hidroxibenzaldehído (2) (0,38 g, 1,58 mmoles) y 2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-3',4'-difenilmetilendioxiacetofenona (3) (1,05 g, 1,58 mmoles) en EtOAc seco (75 ml) y se burbujeó HCl seco (g) (generado mediante la acción de H_2SO_4 al 98% sobre NaCl sólido) a través de la solución durante varias horas. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche, y el color de la mezcla de reacción cambió de incoloro a rojo profundo tras algunas horas. La TLC demostró que todos los materiales de partida se habían consumido y que se habían formado dos productos. La coelución con

benzofenona confirmó la identidad del producto menos polar y demostró que se había producido la desprotección. Se evaporó el EtOAc y se disolvió el producto crudo en una cantidad reducida de MeOH acidificado. Se llevó a cabo la desacetilación completa mediante tratamiento con NaOH (2 M). La solución adquirió un color azul verdoso. Tras completarse la hidrólisis, se añadió HCl (2 M) hasta tornarse nuevamente la solución de color rojo. Se evaporó el MeOH y se disolvió el producto en HCl_{aq} (al 0,1%) y se extrajo con EtOAc para eliminar la benzofenona. Se concentró la fase acuosa al vacío y se eluyó el residuo con agua por una columna Amberlite XAD-7 para eliminar el ácido acético formado durante la reacción de hidrólisis. Finalmente se eluyó la antocianina con MeOH acidificado. La evaporación cuidadosa del solvente dejó un sólido rojo negruzco que era esencialmente producto puro. Rendimiento: 0,73 g (95%). La molécula diana era idéntica según los criterios habituales (TLC, HPLC, MS, RMN-¹H, RMN-¹³C) a una muestra auténtica. RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, CF₃COOD al 10%): δ=3,45-3,88 (6H, m), 5,26 (1H, d, J = 7,7 Hz), 6,58 (1H, s (ancho)), 6,80 (1H, d, J= 1,8 Hz), 6,89 (1H, d, J= 8,7 Hz), 7,89 (1H, d, J= 2,3 Hz), 8,09 (1H, dd, J= 2,3 Hz, J= 8,7 Hz), 8,85 (1H, s); RMN ¹³C (75 MHz): δ= 62,8 (CH₂), 72,5 (CH), 75,3 (CH), 77,5 (CH), 78,6 (CH), 95,5 (CH), 103,7 (CH), 103,9 (CH), 113,4 (C), 116,1 (CH), 118,1 (CH), 121,3 (C), 127,5 (CH), 136,6 (CH), 145,7 (C), 147,4 (C), 155,9 (C), 158,9 (C), 159,4 (C), 163,8 (C), 170,6 (C). ESI-MS: m/z=449 [MCl-Cl]. RMN-¹H, RMN-¹³C concordaban con T. Fossen, Ø. M. Andersen, D. O. Øvstedal, A. T. Pedersen, A. Raknes, J. Food Sci. 61:703, 1996.

3,4,5-Tribenciloxibenzoato de metilo (15)

Método A: se agitaron en acetona seca (600 ml) bajo reflujo durante 12 horas 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo (16) (55,24 g, 0,3 moles), cloruro de bencilo (113,93 g, 0,9 moles), carbonato potásico seco (124,39 g, 0,9 moles) y yoduro potásico (cantidad catalítica). Tras enfriar, se evaporó la acetona y se disolvió la solución en agua (250 ml). Se extrajo la fase acuosa con éter dietílico (4x100 ml), se lavó la fase orgánica con solución hipersalina (2x50 ml), se secó (MgSO₄) y se eliminó el solvente al vacío. La recrystalización a partir de éter de petróleo y acetato de etilo proporcionó el compuesto del título en forma de cristales blancos, p.f.: 102°C a 103°C. Rendimiento: 121,4 g (89%). Los datos espectroscópicos concordaban con los de la literatura (J. Barbera, R. Iglesias, J. L. Serrano, T. Sierra, M. R. de la Fuente, B. Palacios, M. A. Perez-Jubindo, J. T. Vazquez, J. Am. Chem. Soc. 120:2908, 1998).

Método B: se agitaron mecánicamente en DMSO seco (200 ml) a temperatura ambiente durante la noche 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo (16) (55,24 g, 0,3 moles), cloruro de bencilo (113,93 g, 0,9 moles), carbonato potásico (124,39 g, 0,9 moles) y yoduro potásico (cantidad catalítica). Se añadió agua (200 ml) y se aisló el producto crudo mediante filtración. La evaporación de los solventes residuales en un desecador de vacío dejó un sólido amarillo pálido que era esencialmente producto puro. Rendimiento: 128,2 g (94%).

Ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico (14): a una mezcla de 3,4,5-tribenciloxibenzoato de metilo (15) (20,60 g, 45,30 mmoles) en 2-propanol (200 ml) se añadió una solución de hidróxido potásico (3,50 g, 85%, 53,00 mmoles) en 2-propanol (25 ml). La mezcla se sometió a reflujo durante 1 hora, se enfrió y se añadió agua (250 ml). Apareció un precipitado blanco y se filtró la mezcla. La recrystalización a partir de acetato de etilo proporcionó el compuesto deseado en forma de cristales blancos, p.f.: 194°C a 195°C. Rendimiento: 17,2 g (86%). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ=5,05 (2H, s), 5,18 (4H, s), 7,24-7,50 (17H, m), 13,4 (1H, s, ancho); RMN ¹³C (75 MHz): δ=70,3, 74,3, 108,3, 126,1, 127,7, 128,0, 128,2, 128,3, 128,5, 136,9, 137,5, 141,0, 152,1, 167,0.

3,4,5-Tribenciloxiacetofenona (13): a una solución de ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico (14) (11,01 g, 25,0 mmoles) en DME seco (1 l), se añadió metil-litio (36,6 ml, 1,5 M, 55,0 mmoles) a 0°C. La mezcla se agitó durante 1 hora y después se añadió agua (150 ml). La mezcla se extrajo con éter dietílico (2x250 ml), se lavó la fase orgánica con solución hipersalina (2x50 ml), se secó (MgSO₄) y se eliminaron los solventes al vacío. La recrystalización a partir de éter de petróleo y acetato de etilo proporcionó el compuesto del título en forma de cristales blancos, p.f.: 116°C a 117°C. Rendimiento: 10,2 g (93); RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ= 2,49 (3H, s), 5,14 (6H, s), 7,23-7,48 (17H, m); RMN ¹³C (75 MHz): δ= 26,3, 71,3, 75,1, 108,2, 127,4, 127,8, 127,9, 128,1, 128,4, 132,3, 136,5, 137,2 (C) 142,8, 152,5, 196,7.

1-Acetoxi-1-(3',4',5'-tribenciloxi)feniletano (12): se disolvieron 3,4,5-tribenciloxiacetofenona (13) (4,38 g, 10,0 mmoles) y ácido p-toluenosulfónico (cantidad catalítica) en acetato de isopropenilo (100 ml) y se calentaron hasta la aparición de un destilado. Se continuó con el calentamiento de la mezcla hasta la eliminación de toda la acetona generada en la reacción. A continuación, se añadió agua (50 ml). Se separó la fase orgánica de la fase acuosa, y ésta última se extrajo con éter dietílico (3x50 ml). Las fases orgánicas agrupadas (MgSO₄) se secaron y se eliminaron los solventes al vacío. La recrystalización a partir de una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo proporcionó el compuesto del título en forma de cristales marrón pálido, p.f.: 99°C a 100°C. Rendimiento: 4,50 g (87 %); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ=2,14 (3H, s), 4,93 (1H, d, J= 2,1 Hz), 5,06 (2H, s), 5,11 (4H, s), 5,29 (1H, d, J= 2,1 Hz), 6,73 (2H, s), 7,20-7,50 (15H, m). RMN ¹³C (75 MHz): δ=20,7, 71,3, 75,1, 101,7, 105,1, 127,2, 127,4, 127,7, 127,8, 127,9, 128,0, 128,4, 128,5, 129,8, 136,8, 152,7, 168,8.

2-Bromo-3',4',5'-tribenciloxiacetofenona (11): se disolvieron 1-acetoxi-1-(3',4',5'-tribenciloxi)feniletano (12) (4,80 g, 10,0 mmoles), N-bromosuccinimida (2,67 g, 15 mmoles) y agua (0,27 g, 15 mmoles) en THF (100 ml) y se

agitaron durante la noche. A continuación, se añadió agua (50 ml). Se separó la fase orgánica de la fase acuosa, y ésta última se extrajo con éter dietílico (3x50 ml). Las fases orgánicas agrupadas (MgSO_4) se secaron y se eliminaron los solventes al vacío. La recrystalización a partir de una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo proporcionó el compuesto del título en forma de cristales blancos, p.f.: 112°C a 113°C. Rendimiento: 4,91 g (95 %).

5 RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ =4,29 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 5,16 (s, 4H), 7,24-7,46 (m, 17H). RMN ^{13}C (75 MHz) δ =30,3, 71,3, 75,1, 108,9, 127,4, 127,9, 128,0, 128,1, 128,4, 128,5, 128,9, 136,3, 137,1, 152,4, 152,6, 190,0.

2-Yodo-3',4',5'-tribenciloxiacetofenona (20):

10 **Método A:** se disolvieron 2-bromo-3',4',5'-tribenciloxiacetofenona (5,17 g, 10,0 moles) (11) y yoduro sódico (2,25 g, 15 mmoles) en acetonitrilo seco (50 ml) y se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. La solución se filtró y se eliminó el acetonitrilo bajo vacío. Se añadió agua (30 ml) y la solución se extrajo con éter dietílico (4x25 ml). Se secó la fase orgánica (MgSO_4) y se eliminaron los solventes al vacío. La recrystalización a partir de metilciclohexano proporcionó el compuesto del título en forma de cristales amarillos, p.f.: 110°C a 112°C. Rendimiento: 3,6 g (64%).

15 RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ =4,21 (2H, s), 5,15 (6H, s), 7,22-7,48 (17H, m); RMN ^{13}C (75 MHz): δ =1,0, 71,3, 75,1, 109,0, 127,4, 127,9, 128,0, 128,1, 128,3, 128,4, 128,5, 136,3, 137,1, 143,4, 152,6, 191,5.

20 **Método B:** se disolvieron 1-acetoxi-1-(3',4',5'-tribenciloxi)-feniletano (12) (4,80 g, 10,0 mmoles), N-yodosuccinimida (2,25 g, 10 mmoles) en THF seco (100 ml) y se agitaron durante la noche. Se añadió más N-yodosuccinimida (2,25 g, 10 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que la TLC mostró que se había consumido todo el acetato de vinilo. Se eliminó el tetrahidrofurano al vacío. A continuación, se añadió agua (75 ml). Se separó la fase orgánica de la fase acuosa, y ésta última se extrajo con éter dietílico (4x50 ml). Las fases orgánicas agrupadas (MgSO_4) se secaron y se eliminaron los solventes al vacío. La recrystalización a partir de una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo proporcionó el compuesto deseado en forma de cristales blancos, p.f.: 110°C a 112°C. Rendimiento: 5,2 g (92%).

25 110°C a 112°C. Rendimiento: 5,2 g (92%).

2-(2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-3',4',5'-tribenciloxiacetofenona (10):

30 **Método A:** se disolvieron 2-bromo-3',4',5'-tribenciloxiacetofenona (11) (2,59 g, 5 mmoles) y β -D-glucosa-2,3,4,6-tetraacetato (8) (1,74 g, 5 mmoles) en DME seco (50 ml) y se añadió hidruro sódico (0,18 g, 7,5 mmoles) (0,3 g de suspensión al 60% de NaH en aceite) en partes pequeñas. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua (50 ml) y se extrajo la fase acuosa con DCM (3x25 ml). Se agruparon las capas orgánicas y se lavaron con agua (2x50 ml), se secaron (MgSO_4) y se evaporaron, proporcionando un aceite viscoso oscuro. Se aisló el producto mediante cromatografía flash seca (PE/EtOAc 6:4) (PE=éter de petróleo). La

35 recrystalización a partir de una mezcla de metilciclohexano y acetato de etilo proporcionó el compuesto deseado en forma de cristales blancos, p.f.: 156°C a 158°C. Rendimiento: 0,51 g (13%). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ =1,98 (3H, s), 2,00 (3H, s), 2,02 (3H, s), 2,06 (3H, s), 3,63-3,73 (2H, m), 4,08-4,30 (5H, m), 4,62-4,94 (1H, m), 5,02-5,34 (7H, m), 7,20-7,56 (17H, m); RMN ^{13}C (75 MHz): δ =20,5, 20,6, 61,6, 68,2, 70,5, 70,8, 71,2, 71,8, 72,4, 75,0, 100,1, 107,9, 127,4, 127,9, 128,0, 128,1, 128,4, 128,5, 129,6, 136,4, 137,1, 143,2, 152,6, 169,3, 169,5, 170,0, 170,5, 193,4.

40 **Método B:** se disolvieron 2-yodo-3',4',5'-tribenciloxiacetofenona (20) (5,64 g, 10 mmoles) y β -D-glucosa-2,3,4,6-tetraacetato (8) (4,18 g, 12 mmoles) en DCM seco (50 ml) y se añadió hidruro sódico (0,48 g, 20 mmoles) (0,8 g de suspensión al 60% de NaH en aceite) en partes pequeñas. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El exceso de hidruro sódico se descompuso mediante adición de una cantidad adecuada de agua. Se eliminó el diclorometano bajo vacío con el fin de simplificar el tratamiento final. Se añadió agua (100 ml) y la fase acuosa se extrajo con éter dietílico (4x75 ml). Se agruparon las capas orgánicas y se lavaron con agua (2x50 ml), se secaron (MgSO_4) y se evaporaron, proporcionando un aceite viscoso oscuro. Se aisló el producto mediante cromatografía flash seca (PE/EtOAc 6:4). La recrystalización a partir de una mezcla de metilciclohexano y acetato de etilo proporcionó el compuesto deseado en forma de cristales blancos, p.f.: 156°C a 158°C. Rendimiento: 5,1 g (65%).

50 (65%).

55 **3-O- β -glucopiranosido cloruro de delfinidina (9):** se disolvieron 2,4-diacetoxi-6-hidroxibenzaldehído (2) (0,38 g, 1,58 mmoles) y 2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-3',4',5'-tribenciloxiacetofenona (10) (1,24 g, 1,58 mmoles) en EtOAc seco (75 ml) y se burbujeó HCl seco (g) (generado mediante la acción de H_2SO_4 al 98% sobre NaCl sólido) a través de la solución durante varias horas. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche, y el color de la mezcla de reacción cambió de incoloro a rojo profundo tras algunas horas. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente hasta que la TLC mostró que todos los materiales iniciales se habían consumido. Se evaporó el EtOAc y se disolvió el producto crudo en una cantidad reducida de MeOH acidificado. Se eliminaron los grupos bencilo mediante hidrogenación (H_2 , 1 atm. Pd/C al 10%) a temperatura ambiente. Se realizó un seguimiento del curso de la reacción mediante TLC. Se eliminó el catalizador mediante filtración y se mantuvo la mezcla de reacción en MeOH acidificado bajo nitrógeno. Se llevó a cabo la desacetilación completa mediante tratamiento con NaOH (2 M). La solución adquirió un color azul verdoso. Tras completarse la hidrólisis, se añadió HCl (2 M) hasta tornarse nuevamente la solución de color rojo. Se evaporó el MeOH y se disolvió el producto en HCl_{aq} (al 0,1%) y se extrajo con EtOAc para eliminar las trazas de tolueno. Se concentró la fase acuosa al vacío y se

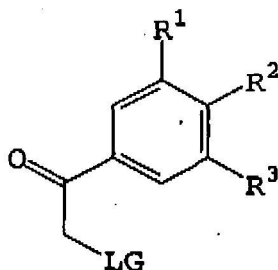
60 un seguimiento del curso de la reacción mediante TLC. Se eliminó el catalizador mediante filtración y se mantuvo la mezcla de reacción en MeOH acidificado bajo nitrógeno. Se llevó a cabo la desacetilación completa mediante tratamiento con NaOH (2 M). La solución adquirió un color azul verdoso. Tras completarse la hidrólisis, se añadió HCl (2 M) hasta tornarse nuevamente la solución de color rojo. Se evaporó el MeOH y se disolvió el producto en HCl_{aq} (al 0,1%) y se extrajo con EtOAc para eliminar las trazas de tolueno. Se concentró la fase acuosa al vacío y se

- eluyó el residuo con agua por una columna Amberlite XAD-7 para eliminar el ácido acético formado durante la reacción de hidrólisis. Finalmente se eluyó el producto (9) con MeOH acidificado. La evaporación cuidadosa del solvente dejó un sólido rojo negruzco que era esencialmente producto puro (9). Rendimiento: 0,65 g (82 %). La molécula diana era idéntica según los criterios habituales (TLC, HPLC, MS, RMN-¹H, RMN-¹³C) a una muestra auténtica. RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, CF₃COOD al 10%; δ=3,45-3,88 (6H, m), 5,32 (1H, d, J= 7,6 Hz), 6,61 (1H, d, J= 2,0 Hz), 6,81 (1H, ancho d, J= 2,0 Hz), 7,70 (2H, s), 8,90 (1H, s); RMN ¹³C (75 MHz): δ=62,7 (CH₂), 71,0 (CH), 75,1 5 (CH), 77,9 (CH), 79,1 (CH), 95,6 (CH), 102,8 (CH), 104,0 (CH), 112,6 (2 x CH), 113,6 (C), 121,0 (C), 136,4 (CH), 145,0 (C) 146,6 (C), 147,9 (2 x C), 158,0 (C) 159,3 (C), (C), 121,0 (C), 136,4 (CH), 145,0 (C) 146,6 (C), 147,9 (2 x C), 158,0 (C) 159,3 (C), 164,0 (C), 170,2 (C). EST-MS: m/z=465 [MCl-CI]. RMN ¹H, RMN ¹³C concuerdan con T.
- 10 Tsuda, K. Ohshima, S. Kawakishi, T. Osawa, J. Agric. Food Chem. 42:248, 1994.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar una parte este de una antocianina, que comprende:

5 hacer reaccionar un material de partida de cetona α -funcionalizada de fórmula general S-1:



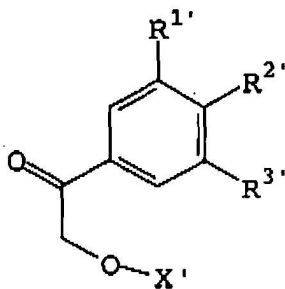
S-1

10 en la que LG es un grupo saliente seleccionado de entre bromo, yodo, tosilato, brosilato, triflato, mesilato o amonio cuaternario; R^1 es H, OMe u OPG; R^2 es OPG; R^3 es H, OMe u OPG, y cada PG se refiere independientemente a un grupo protector, de manera que, en el caso de que PG se encuentre presente en diferentes partes de un compuesto, puede, aunque no necesariamente, referirse al mismo grupo protector, y dos grupos OPG contiguos opcionalmente pueden formar conjuntamente una fracción cíclica, con un anión

15 sacárido de fórmula general:

XO

20 en la que XO^- es un anión formado mediante eliminación de un protón de un átomo de oxígeno anomérico de un monosacárido o disacárido, encontrándose protegido cualquier otro grupo hidroxilo del sacárido por grupos protectores adecuados, y eliminando opcionalmente algunos o todos los grupos protectores, proporcionando un intermediario mitad este de fórmula general E-1:



E-1

25 en la que R^1 , R^2 , R^3 y X' son, cada uno independientemente, iguales a R^1 , R^2 , R^3 y X, respectivamente, o son los análogos desprotegidos de los mismos.

2. Método según la reivindicación 1, en el que LG es Br o I.

30 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el sacárido del que se deriva XO^- es glucosa o rutinosa.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que XO^- se prepara *in situ* mediante la reacción de XOH con un reactivo hidruro.

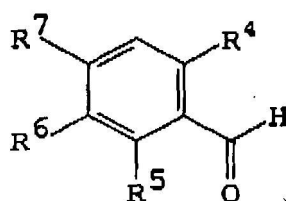
35 5. Método según la reivindicación 4, en el que el reactivo hidruro es hidruro sódico.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada grupo PG se selecciona independientemente de entre acetilo, bencilo y benzoilo y/o dos grupos OPG contiguos conjuntamente se refieren a difenilmetilendioxi.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el solvente en el que se lleva a cabo la reacción es THF, DME o DCM.

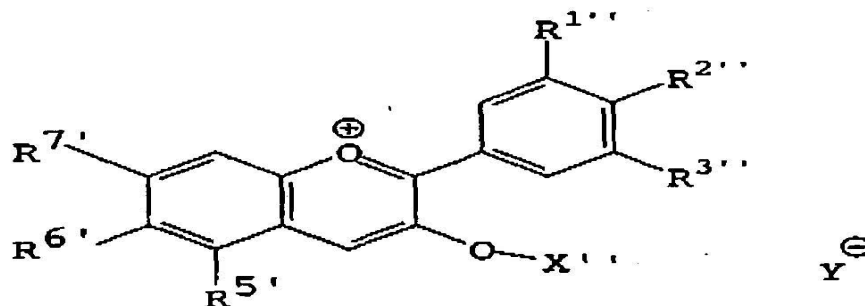
5 8. Método para preparar antocianina, que comprende el método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la preparación de una parte este de una antocianina, seguido de:

10 opcionalmente, en el caso de que cualquiera de entre R¹, R², R³ o X' sean análogos desprotegidos de R¹, R², R³ o X, respectivamente, proteger nuevamente uno o más de entre R¹, R², R³ y X'; y después hacer reaccionar el intermediario mitad este de fórmula general E-1 o el derivado nuevamente protegido del mismo, con un intermediario mitad oeste de fórmula general W-1:



W-1

15 en la que R⁴ es OH, R⁵ es OPG, R⁶ es H y R⁷ es OH u OPG; o R⁴ es OH, R⁵ es H, R⁶ es OH u OPG, y R⁷ es H; acoplado de esta manera los intermediarios E-1 y W-1, y opcionalmente eliminando uno, varios o todos los grupos protectores, proporcionando un producto antocianina de fórmula general P-1:



P-1

20 en la que R^{1''}, R^{2''}, R^{3''}, X'', R^{5'}, R^{6'} y R^{7'} son, cada uno independientemente, iguales a R^{1'}, R^{2'}, R^{3'}, X', R⁵, R⁶ y R⁷, respectivamente, o son los análogos desprotegidos de los mismos, e Y⁻ es un contraión, preferentemente un contraión fisiológicamente aceptable.

25 9. Método según la reivindicación 8, en el que el producto antocianina de fórmula general P-1 es una antocianina cianidina o delfinidina natural.

30 10. Compuesto de fórmula general S-1 según la reivindicación 1, en el que LG es Br o I, y en el que R¹, R² y R³ se refieren, cada uno, a benciloxi, o en el que R¹ se refiere a H y R² y R³ conjuntamente se refieren a difenilmetilendioxo.