

PATENTE DE INVENCION
=====

CIBA. Case 2734/1 + 2.
=====

198022 198022

BALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL



25 MAY 1953

MEMORIA DESCRIPTIVA

sobre:

"Procedimiento para la introducción de oxígeno en esteroides".

=====

SOLICITANTE:

C I B A, Société Anonyme,
domiciliada en Basilea, Suiza.

=====

Forma objeto de la presente invención un procedimiento para la introducción de oxígeno en la posición "11" de esteroides.

- Los esteroides con oxígeno en posición "11" representan importantes compuestos. Así, por ejemplo, las hormonas córtico-suprarrenales poseen tales grupos en posición "11", como por ejemplo, la córticosterona, la 11-dehidrocórticosterona, la 17α -oxicórticosterona y la 17α -oxi-11-dehidrocórticosterona. Por tanto, un procedimiento para obtener tales compuestos tiene la máxima importancia.
- 5.
- 10.

198022

- 2 -

25 MAY



- Ya se conoce el hecho de obtener esteroides con oxígeno en posición "11". Corrientemente se parte en este caso de 12-oxi-compuestos, se desdobra de ellos, por ejemplo, agua y mediante una adecuada reacción intermedia, se fija agua sobre el enlace doble formado. Pero, este procedimiento resulta muy complicado y se desarrolla además con un rendimiento desfavorable. Ultimamente se ha intentado introducir por vía biológica en esteroides directamente un oxigrupo en posición "11" por medio de perfusión con glándulas suprarrenales supervivientes. Pero, para una realización técnica este procedimiento resulta apenas practicable. Por eso se sustituyeron las glándulas suprarrenales intactas, por cortes en las mismas u homogenisatos. Pero, en este caso no han podido obtenerse productos de oxidación cristalizados y se supuso la formación de los 11-oxi-compuestos tan solo por un test biológico.
- 15.
- 20.
- 25.

- Ahora bien; de acuerdo con la presente invención se puede introducir de una manera sencilla oxígeno en posición "11" de los esteroides, si se tratan en el ciclo "C" esteroides no-sustituídos con oxígeno o con agentes que desarrollan oxígeno, en presencia de enzimas y de substratos que les corresponden, aislando después los 11-oxi-esteroides formados.
- 30.

- Los esteroides no-sustituídos en el ciclo "C", empleados de acuerdo con el presente procedimiento, pueden estar saturados o bien podrán mostrar enlaces dobles, por ejemplo en posición "3", "4", "5", "6", "7", "8", "9", "11", "16" y/o "17". Especialmente se emplean materias primas que pertenecen a la serie de androstano, pregnano, esterina o sapogenina y que están sustituidas por ejemplo, en posición "3", "14", "16", "17", "20" y "21", por ejemplo por grupos
- 35.
- 40.



25

oxi u oxo libres o funcionalmente conjugados, como por grupos aciloxi, por ejemplo, acetoxi, propioniloxi, benzoiloxi, o tosiloxi; por grupos alcoxi, por ejemplo, metoxi o etoxi; por oxogrupos enolizados o acetalizados; por grupos carboxílicos libres o funcionalmente conjugados, por ejemplo grupos nitrilo o grupos carboxílicos esterificados; por grupos epoxi o por átomos de halógeno.

Las materias primas pueden ser de cualquier configuración estérica. Particularmente valiosos resultan por ejemplo Δ^4 -3,20-diceto-21-oxi-pregnenos; Δ^4 -3,20-diceto-17,21-dioxi-pregnenos ; $3\beta, 5\alpha$ - o bien 5β -endrosterones respectivamente sus ésteres y éteres, colessterinas o diogeninas. Caso de ser preciso, se protegen de una manera intermedia-
ria enlaces dobles existentes en los esteroides, durante la oxidación, en forma de por sí conocida, por ejemplo, mediante saturación con hidrohálgeno o mediante transformación en isosteroides pentacíclicos.

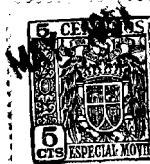
A los efectos del tratamiento con oxígeno, se conduce, por ejemplo, oxígeno por encima o a través de la mezcla de reacción. Como agentes que desarrollan oxígeno se emplea por ejemplo, peróxido de hidrógeno o compuestos que lo desarrollan, por ejemplo, en presencia de catalasa.

Se emplean las enzimas especialmente en forma de preparados orgánicos, tales como órganos desmenuzados, cortes de órganos, homogenisatos de órganos ricos en enzimas, por ejemplo glándulas suprarrenales, riñones o hígados, o bien mezclas de los mismos.

Se mantienen las enzimas activas mediante adición de substratos adecuados y manteniendo las correspondientes condiciones del ambiente. Se emplean en especial como



- substratos aquellos del sistema cicloforásico, y/o los compuestos que pertenecen, o son vecinos, al ciclo del ácido cítrico, por ejemplo, ácido cítrico, aconítico, isocítrico, oxalsuccínico, α -cetoglutárico, succínico, fumárico, málico, piro-racémico, oxalacético; pero también ácido malónico, glutárico, adipínico, glutamínico, asparagínico; asparagina, alanina, glicocola, serina; además ácido ascorbínico, láctico dioxitátrico, prolina, triosina, triptofano, respectivamente mezclas de los mismos.
- 75.
80. Con objeto de mantener ciertas condiciones del ambiente, se trabaja en medio acuoso, adicionando al mismo adecuadamente componentes de soluciones fisiológicas, tales como hidratos de carbono, sales inorgánicas y/u orgánicas, por ejemplo fosfato sódico, cloruros alcalinos, sulfato de
85. magnesio o acetato sódico. Por medio de las adiciones salinas se quiere en particular mantener el valor pH y la intensidad de iones de la solución de reacción dentro de la zona óptima. Se realiza la reacción preferentemente a un valor pH = 6'5 - 9'0 y una concentración salina de 0'5-0'01 molar. De acuerdo
90. con estos valores, se podrá también emplear como medio de reacción un líquido fisiológico, por ejemplo plasma. En tal caso se agrega ventajosamente un agente conservador, por ejemplo, penicilina. También podrán adicionarse al medio de reacción, agentes que facilitan la disolubilidad, tales
95. como glicol etilénico o propilénico, o bien agentes de dispersión, por ejemplo, fosfolipoides.
- Se aíslan los 11-oxisteroides de la mezcla de oxidación, según las materias primas o medios de reacción que se hayan empleado, de acuerdo con métodos de por sí
100. conocidos, por ejemplo, realizando procedimientos de separadores,



cromatografía, recristalización y análogos.

En los siguientes ejemplos se describe la invención más detalladamente, rigiendo entre parte en peso y parte volumétrica la misma relación existente entre el gramo y el centímetro cúbico. Las temperaturas se indican en centígrados.

105.

EJEMPLO 1.

Una solución de 1 parte en peso de desoxicórticosterona en 20 partes vol. de glicol etilénico, se adiciona a 980 partes vol. de una mezcla compuesta de 900 partes vol. de citrato de plasma bovino, 80 partes vol. de glicol etilénico y 1 parte en peso de ácido ascorbínico. El valor pH de esta solución se restablece mediante lejía de sosa cáustica 0'1 veces normal al valor primitivo pH del citrato de plasma antes de haber agregado el ácido ascorbínico.

115.

900 partes vol. de dicha mezcla se calientan en el termostato a 37° C., adicionando 60 partes en peso de cortes recién preparados de glándulas suprarrenales procedentes de reses vacunas que acaban de ser sacrificadas. Asimismo se cortan

120.

60 partes en peso de glándulas suprarrenales de buey en pequeños pedazos y se homogeneizan durante 2 minutos en un homogeneizador con 80 partes vol. de la solución antes mencionada de plasma de desoxicórticosterona. La papilla así obtenida se agrega a la solución en el termostato, ya

125.

provista de cortes, enjuagando ulteriormente con 20 partes vol. de plasma.

Se mantiene la mezcla durante $\frac{1}{2}$ hora a 37° C., moviéndola de vez en cuando un poco. Una vez igualada la temperatura, se agregan en el transcurso de 2 horas 100 partes vol. de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 1'03%

130.



que contiene un 10% de glicol etilénico. Al cabo de otras 2½ horas se enfria a la temperatura del ambiente y después se prensa la mezcla de reacción a través de un filtro de tela. Se clarifica la solución turbia que pasa por el filtro, 135. mediante centrifugación durante 1 hora, a 2000 rev.por minuto, uniendo el residuo obtenido por centrifugación con el residuo que quedó en el filtro de tela.

Por separado se trata con disolventes orgánicos la solución de plasma y el residuo de filtración, compuesto en su mayor parte de partes de órganos. Se extrae la solución de plasma con 140. éster acético hasta que éste aparezca incoloro. A los efectos de una separación clara de las capas se centrifugan las soluciones de extracción durante ¼ hora a 2000 rev.p.m., sacando siempre mediante sifón las capas de éster acético que se formen. De esta manera se 145. obtienen 3'9 partes en peso de extracto que se fracciona mediante distribución escalonada entre metanol y heptano. Las fracciones de metanol contienen los esteroides y se distribuyen nuevamente entre heptano y metanol, y después se acetilan a la temperatura del ambiente en piridina con anhídrido acético. El producto así 150. obtenido muestra en el examen papel-cromatográfico una mezcla de acetato de desoxicórticosterona y córticosterona. A los efectos de la separación se cromatografía en gel de sílice. Los eluatos de benzol-éter contienen principalmente desoxi- 155. córticosterona no transformada. En cambio, el producto de oxidación solo se separa de la columna cromatográfica por disolución con mezclas de éter-éster acético. Después de la saponificación mediante carbonato sódico en solución acuosa-alcohólica, se obtienen cristales que funden (después de concreción) a 179-181º C., mostrando un giro óptico de $[\alpha]_D = + 220^\circ$ (en alcohol), 160. dando con ácido sulfúrico concentrado la reacción de color

198022

- 7 -

25 MAY



característica para la córticosterona (fluorescencia amarillo-verdosa).

- Los residuos de órganos obtenidos a partir de la mezcla de reacción mediante separación y centrifugación, se extraen , durante 40 horas con acetona. La solución acetónica, que contiene el agua contenida en los órganos y en el plasma adherido, se libra de la acetona en el vacío por chorro de agua. El residuo acuoso se extrae varias veces con éter y después de evaporar el éter, se obtienen 4'3 partes en peso de extracto etérico que se sigue tratando en forma parecida al extracto de éster acético del plasma. Primero se procede a una distribución escalonada y repetida entre heptano y metanol. Nuevamente se acetilan las fracciones de metanol con anhídrido acético en piridina y se separa la mezcla de acetilación, después de eliminar por completo la piridina y el exceso de anhídrido acético, mediante cromatografía en gel de sílice. Saponificando los eluatos éster-éster acéticos y recristalizando, se obtiene el mismo compuesto como en la elaboración del extracto de plasma.
- 165.
- 170.
- 175.
180. EJEMPLO 2.
- 159 partes en peso de glándulas suprarrenales bovinas, finamente cortadas ,se homogeneizan durante 5 minutos en un homogeneizador con 900 partes vol. de una solución acuosa que contiene 6'4 partes en peso de fumarato sódico, 36 partes en peso de glucosa, 7'24 partes de cloruro sódico, 3'72 partes en peso de cloruro potásico, 7'14 partes en peso de fosfato secundario sódico y 1'98 partes en peso de sulfato de magnesio. A este homogeneizado se agrega 1 parte en peso de desoxicórticosterona y se homogeneiza durante 2 minutos a la máxima velocidad de vueltas p.m.
- 185.
- 190.



- la papilla formada se ajusta con 20 partes volumétricas de ácido clorhídrico 1 vez normal, a un valor pH de 6'62 (determinación de pH mediante electrodo de cristal) y se homogeneiza nuevamente, durante 2 minutos.
195. Se vierte la mezcla de reacción en un recipiente provisto de agitador y se aclara ulteriormente con 100 partes volumétricas de agua. El valor pH de la emulsión se lleva mediante 20 partes vol. de ácido clorhídrico 1 vez normal a un valor de 6'62 (determinación de pH mediante electrodo de cristal).
200. Se mantiene la mezcla de reacción a 27° C. y agitando continuamente, se agregan en el transcurso de 2½ horas, 150 partes vol. de una solución al 15% de peróxido de hidrógeno. Durante la hora siguiente se agregan todavía, a gotas, 15 partes volumétricas de una solución al 30% de peróxido de hidrógeno.
205. Tan pronto cede el desarrollo del oxígeno, se agregan en cada hora 0'05 partes en peso de un preparado comercial de catalasa, con objeto de conseguir con seguridad, al cabo de 4 horas, la descomposición de peróxido de hidrógeno eventualmente aun presente. Al cabo de un periodo total de reacción de 4 horas, se adicionan a la solución 30 partes volumétricas de ácido clorhídrico 1 vez normal, siendo ahora el valor de pH = 5'10 en la mezcla provista de un fuerte precipitado proteínico. Luego se agregan a la mezcla de reacción 800 partes vol. de éster acético y se agita bien durante 1 hora a 37° C. A continuación se centrifuga la mezcla. Se saca mediante sifón la capa superior de éster acético y se trata la fase acuosa y el precipitado durante la noche en la misma forma con 500 partes vol. de éster acético.
220. Al cabo de cada 2 horas se repite dicha extracción



por tres veces hasta que la capa éster-acética quede incolora.

Sobre sulfato sódico anhidro se secan las soluciones reunidas éster-acéticas y se evapora la solución filtrada en el vacío hasta secarla. El producto semi-sólido que

225. queda, se absorbe en metanol saturado con heptano, distribuyéndolo en 6 escalones entre una mezcla que cada vez contiene 400 partes vol. de heptano y 400 partes vol. de metanol. Se reúnen las soluciones de metanol de las fases 1 - 5 y se obtienen 5.82 partes en peso de una masa semi-sólida, pardo-amarilla. El análisis papel-cromatográfico de este extracto bruto muestra, aparte de desoxicórticosterona no-transformada, también córticosterona. Al objeto de aislar el producto de oxidación, se cromatografía el extracto bruto en forma conocida, en gel de sílice. Los eluatos de éter y
230. cloroformo contienen desoxicórticosterona, y los eluatos con cloroformo-éter acético y éster acético contienen la córticosterona, pudiendo reconocer ésta fácilmente con la reacción de ácido sulfúrico (fluorescencia verde-amarilla). Se acetila esta fracción de córticosterona en piridina con anhídrido acético, y, después de recrystalizar en acetona-éter, se obtiene el acetato de córticosterona que funde a
235. 143-149° C. De dicho acetato se obtiene la córticosterona en forma de finos cristales, después de saponificar con carbonato potásico y finalmente recrystalizar. Funde a
240. 179 - 182° C. y muestra un giro específico de $[\alpha]_D = 223^\circ$ (en alcohol).
- 245.

EJEMPLO 3.

- 113 partes en peso de glándulas suprarrenales bovinas, finamente cortadas, se homogeneizan durante 5 minutos en un homogeneizador con 250 partes vol. de una solución
- 250.



- acuosa que contiene 0'574 partes en peso de ácido fumárico, 4'5 partes en peso de glucosa, 0'91 partes en peso de fosfato secundario sódico, 0'25 partes en peso de sulfato de magnesio de sosa y 25 partes vol. de una lejía/caústica 0'1 veces normal. A
255. este homogenisato se agrega 1 parte en peso de desoxicórticos-terona y se vuelve a homogeneizar durante 2 minutos. El pH de esta emulsión es de 6'78. Se vierte en un recipiente provisto de agitador y tubo de introducción de gas y, agitando y metiendo oxígeno, se mantiene durante 5 horas a 37° C. Se aclara el homogeneizador con 50 partes vol. de agua. Se introduce el líquido de reacción en 1500 partes vol. de acetona y se aclara ulteriormente por dos veces, cada vez con 200 partes vol. de acetona. Mediante filtración por aspiración se separan las soluciones reunidas del precipitado. Se lava el residuo por tres veces, cada vez con 200 partes vol. de acetona caliente. Las soluciones de acetona reunidas se libran de la acetona en el vacío de chorro de agua. La solución acuosa que queda se aclara, junto con el precipitado formado al evaporar la acetona y con el aceite que se separa, mediante 400 partes vol. de cloroformo en un recipiente de extracción. Por 4 veces se repite, cada vez con 400 partes vol. de cloroformo, la extracción de la capa acuosa. Las últimas extracciones de cloroformo son casi incoloras, en cambio las primeras dos tienen un fuerte color amarillo-pardo. Se reúnen los extractos de cloroformo, se secan sobre sulfato sódico anhidro y se evapora la solución filtrada en el vacío hasta secarla. Como residuo de la evaporación quedan 14'5 partes en peso de un producto pardo oscuro. El análisis papel-cromatográfico muestra aparte de
265. la desoxicorticosterona no transformada, el producto oxidado
- 270.
- 275.
- 280.

198022



- 11 -

25 MAY. 1953

en posición "11" ,o sea la córticosterona.

- Se disuelve el extracto bruto en 250 partes vol. de éter y se extrae esta solución cada vez con 200 partes vol. de una solución saturada de carbonato sódico. La solución etérea clara, de color amarillo, se adiciona en
285. seguida con 50 partes vol. de ácido clorhídrico 0'1 veces normal y se lava por dos veces , cada vez con 50 partes vol. de agua. Las emulsiones así resultantes se rompen por medio de una adición de 5 partes vol. de metanol y se evapora la
290. etérea hasta secarla, obteniendo como residuo seco 4'2 partes en peso de una papilla amarillo-parda que se cromatografía en forma usual en gel de sílice. Los eluatos de éter y cloroformo se componen de desoxicórticosterona no transformada. Los extractos de cloroformo-éster acético
295. dán, después del análisis papelcromatográfico una mezcla de desoxicórticosterona y córticosterona, mientras los eluatos de éster acético contienen córticosterona y un producto de color amarillo. Se reúnen las fracciones que contienen córticosterona, cromatografiando nuevamente en gel de
300. sílice. Después de recrystalizar se obtiene la córticosterona que funde a 175° C. Este producto se acetila como en el Ejemplo 2 y se purifica el producto de acetilación mediante varias recrystalizaciones. Los cristales funden a 140-146° C. y su giro específico es de $[\alpha]_D = 219^\circ$ (en alcohol), dando
305. con ácido sulfúrico concentrado la reacción de color conocida. En el análisis papel-cromatográfico se vé que es un producto uniforme de acetato de córticosterona.

EJEMPLO 4.

- 53 partes en peso de glándulas suprarrenales
310. bovinas de reses recién sacrificadas se homogeneizan durante



- 3 minutos en un homogeneizador con 100 partes vol. de una solución acuosa que contiene 0'232 partes en peso de ácido fumárico, 1'8 partes en peso de glucosa, 0'362 partes en peso de cloruro sódico, 0'186 partes en peso de cloruro potásico, 0'356 partes en peso de fosfato secundario sódico, 0'099 partes en peso de sulfato de magnesio, ajustando con 4 partes vol. de lejía de sosa cáustica a un valor pH de 7'28. Después de la homogeneización se ajusta el homogenisato cuyo valor pH es de 6'73, a pH = 7'22 por medio de 0'5 partes vol.
315. de lejía de sosa cáustica 2 veces normal. A esta mezcla se agregan 20 partes en peso de glicol propilénico, se homogeneiza durante 1 minuto y se adicionan 25 partes vol. de glicol propilénico que contienen disueltas 0'1 partes en peso de la sustancia "S" (Δ^4 -3,20-diceto-17 α , 21-dioxi-pregнено),
320. se lava ulteriormente con 5 partes vol de glicol propilénico y se homogeneiza todavía durante 1 $\frac{1}{2}$ minutos. Se vierte la emulsión en un recipiente provisto de agitador y tubo para la entrada de gas y se hace pasar oxígeno en el termostato a 37 $^{\circ}$ C. agitando. Se evita un desarrollo demasiado intenso de espuma mediante estrangulación de la entrada de oxígeno o bien por medio de adición de algunas gotas de octanol. Al cabo de 30 minutos el valor del pH es de 7'27 y al cabo de 3 horas de 7'20. Adicionando 12 partes vol. de ácido clorhídrico 1 vez normal se ajusta el pH a 3'75 produciendose una fuerte precipitación proteínica y cambio de color de la solución hasta entonces rojo-parda a gris-pardo.
325. 330.

Se vierte la mezcla de reacción en 2000 partes vol. de acetona y se lava por tres veces el recipiente de reacción, cada vez con 100 partes vol. de acetona. Las soluciones de acetona reunidas se dejan reposar durante 15 horas a la

335.

198022

- 13 -

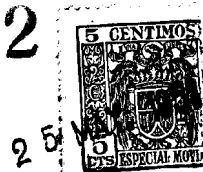


25 MAR

- temperatura del ambiente. Después se separa el precipitado mediante filtración por succión de la solución amarilla y se lava el residuo por tres veces, cada vez con 100 partes vol. de acetona caliente. En el vacío se elimina por completo la acetona de las soluciones acetónicas reunidas. La solución acuosa restante, así como las precipitaciones y aceites formados durante la evaporación se transfieren con 200 partes vol. de éster acético, a un recipiente de extracción. Se satura la fase acuosa mediante adición de 25 partes en peso de sal común y se extrae por 4 veces cada vez con 100 partes vol. de éster acético. Las soluciones de éster acético reunidas se lavan por dos veces, cada vez con 60 partes vol. de agua y se extraen, también por dos veces, cada vez por medio de 40 partes vol. de solución saturada de bicarbonato sódico. Se reúnen el agua de lavado y las soluciones de bicarbonato y se extraen con 100 partes vol. de éster acético. Se reúnen las soluciones éster acéticas y se lavan primero con 50 partes vol. de agua y después con 50 partes vol. de ácido clorhídrico 0'01 veces normal. Se seca la solución éster acética, de color amarillo naranja, sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se evapora en el vacío hasta secar. Quedan como residuo de extracto éster acético 3'4 partes en peso de una masa cristalina viscosa, de color pardo oscuro.
- 330.
- 335.
- 340.
- 345.
350. El análisis papel-cromatográfico de dicho extracto bruto muestra, aparte de substancia no transformada "S", la substancia "F" (Δ 4-3,20-diceto-11 β ,17 α ,21-trioxi-pregнено). La papilla cristalina de color pardo oscuro se disuelve en 10 partes vol. de una solución de 50 partes vol. de benzol y 50 partes vol. de éter, se cromatografía en forma usual sobre
- 355.

198022

- 14 -



gel de sílice y se elúe con éter, mezclas de éter-cloroformo, cloroformo, mezclas de cloroformo-éster acético, éster acético, mezclas de éster acético-metanol.

- De los eluatos de cloroformo cristaliza, después de evaporar, la sustancia "S" no transformada y de los eluatos de éster acético y éster acético-metanol se obtiene la sustancia "F". Recristalizando varias veces en una mezcla de éter-acetona-pentano y a continuación en éter-acetona, se separa en poca cantidad, de las fracciones de la elución, éster acético, un aceite amarillento, secundario, que dificulta grandemente la cristalización. El producto cristalizado, papelcromatográficamente uniforme, funde a 200-210° C. y ^{no}muestra ninguna depresión del punto de fusión en mezcla con sustancia "F" analíticamente pura. Pueden identificarse los cristales, a base de la reacción de color con ácido sulfúrico concentrado, resultando ser la sustancia "F" y mostrando un giro específico de $[\alpha]_D = +156^\circ$ (en alcohol). Los eluatos de cloroformo-éster acético, que aparte de la sustancia "F" contienen todavía sustancia "S", se separan en sus componentes mediante nueva separación cromatográfica en gel de sílice. Los demás eluatos de la cromatografía de gel de sílice, donde están presentes mezclas de sustancias "F" y "S" se reúnen con las lejías madres de la recristalización arriba mencionada, acetilando en forma usual con anhídrido acético en piridina. Los productos de acetilación se cromatografían sobre gel de sílice, obteniendo después de evaporar los agentes de elución, los acetatos en forma cristalina. Los cristales de fluorescencia amarillo-verdoso mediante ácido sulfúrico concentrado, representan el acetato de "F" puro. Funden a 218-225° C. y muestran en diclorano un
- 360.
- 365.
- 370.
- 375.
- 380.
- 385.



giro específico de $[\alpha]_D = + 167^{\circ}$.

EJEMPLO 5 - 31.

EJEMPLOS 5 - 24 .

- Exactamente en la misma forma que se describe detalladamente en el Ejemplo 4, se realiza en los siguientes ejemplos con los substratos indicados la reacción y elaboración de la mezcla de reacción. En concepto de órgano conteniendo enzimas, se emplean las glándulas suprarrenales bovinas y como materia prima para la oxidación del esteroide, en cada caso 0'1 parte en peso de la sustancia "S" (Δ^4 -3,20-diceto-17, α ,21-dioxi-pregнено). Caso de ser necesario, se rebaja el título del valor pH de la mezcla de reacción, mediante adición de lejía de sosa cáustica 2 veces normal/ con ácido clorhídrico 2 veces normal, en determinados intervalos, hasta volverlo al valor correspondiente al comienzo del ensayo. Como agente que facilita la disolución se adicionan en cada caso 50 partes vol. de glicol propilénico, en la forma detallada en el ejemplo 4. En estos ejemplos se utilizan en concepto de disolventes, en cada caso 100 partes vol. de una solución acuosa que, aparte de la sustancia del substrato, contiene además las siguientes adiciones: 1'8 partes en peso de glucosa. 0'362 partes en peso de cloruro sódico. 0'356 partes en peso de fosfato secundario sódico. 0'099 partes en peso de sulfato de magnesio y tanta lejía de sosa cáustica como resulta necesaria para conseguir una titración a un pH de 7'5. Y durante la reacción se hace siempre pasar oxígeno.

EJEMPLO 25.

- De una manera analoga como se realiza la sucesión de reacciones y los métodos de trabajo descritos en los ejemplos 4 - 24, se emplean en este caso como agentes para



facilitar la disolución, en lugar de glicol propilénico, 50 partes vol. de glicol etilénico, por lo demás en forma exactamente igual.

EJEMPLOS 26 - 31 .

420. En las mismas condiciones de ensayo como se observan en los ejemplos 4-25, se renuncia en los ensayos de los ejemplos 26 - 31 al empleo de un agente para facilitar la disolución, empleando en lugar de solo 100 partes vol. de solución salina conteniendo glucosa, 150 partes vol. como disolvente.
425. Se agrega en cada caso 0'1 parte en peso de la substancia a oxidar "S" (Δ^4 -3,20-diceto-17 α ,21-dioxi-pregnenó) en forma de polvo fino directamente al homogenisato y se homogeneiza todo nuevamente durante 3 minutos. A continuación, y siguiendo el procedimiento detalladamente descrito en el ejemplo 4,
430. se hace reaccionar mediante entrada de oxígeno, elaborando luego la mezcla de reacción en forma análoga. Finalmente se obtiene la substancia deseada "F" (Δ^4 -3,20-diceto-11 β ,17 α ,21-trioxi-pregnenó) en forma cristalina y se identifica papelcromatográficamente.
435. En la siguiente tabla se resumen los datos de ensayo característicos para los ejemplos 5 - 31:

Oxidación de substancia "S" a substancia "F"

Ejemplo N°	Substrato	Partes en peso.	Partes en peso de glándula suprarrenal.	Valor pH de la solución de reacción.	Al cabo de 30'	Elevado a	Final.	Horas que dura en total la reacción.	Extracto de éster acético, partes en peso.
5	ácido cítrico	0,420	47	6,58	6,81	6,85	7,00	3	2,23
6	ácido succínico	0,236	51	6,58	6,90	-	6,71	2	7,11
7	ácido fumárico	0,232	51	6,57	6,58	-	6,55	4	1,43
8	"	0,232	51	7,02	7,10	-	7,08	3	3,11
9	"	0,232	51	7,45	7,45	7,50	7,41	3	3,51
10	"	0,232	51	7,98	7,70	7,99	7,85	3	1,95
11	ácido d, l-málico	0,356	51	6,50	6,52	-	6,57	4	1,2
12	ácido malónico	0,208	50	7,20	7,20	-	7,10	3	1,88
13	ácido glutárico	0,264	50	7,04	7,19	-	7,09	3	1,91
14	ácido adipínico	0,292	50	7,20	7,15	-	7,05	3	1,80
15	ácido d, l-glutamínico	0,584	54	7,14	7,01	7,18	6,91	3	2,71
16	ácido d, l-glutamínico	0,584	35	7,28	7,12	7,18	7,18	2	2,27
17	ácido d, l-asparagínico	0,532	54	7,18	7,05	-	6,90	3	2,39
18	d, l-asparagina	0,528	54	7,22	7,11	7,09	6,99	3	2,90
19	d, l-alanina	0,356	54	6,92	6,58	-	7,01	3	1,92
20	ácido láctico	0,180	50	7,17	7,12	-	6,96	3	2,90
21	ácido dioxitátrico	0,364	51	7,04	7,02	-	6,91	3	1,90
22	ácido l-ascorbínico	0,352	50	7,03	7,06	-	6,91	3	2,90
23	ácido piro-racémico	0,166	47	6,49	6,69	7,20	6,63	3	2,13
24	"	0,166	50	7,37	7,15	-	7,10	3	3,15
25	ácido fumárico	0,232	53	7,29	7,11	-	7,11	3	3,53
26	ácido cis-aconítico	0,348	47,5	7,38	7,13	7,46	7,22	3	2,30
27	ácido α-cetoglutárico	0,292	47,5	7,48	7,28	7,45	7,27	3	1,13
28	glicodola	0,124	47,5	7,42	7,18	7,52	7,25	3	1,13
29	d, l-serina	0,210	47,5	7,42	7,05	7,42	7,28	2	1,97
30	l-triptofano	0,408	41	7,50	7,17	7,52	7,30	2	0,74
31	l-tirosina	0,362	41	7,62	7,23	7,60	7,35	2	1,27

193022



EJEMPLOS 32 - 35.

- En forma por lo demás exactamente igual como se indica en los ejemplos 4 - 31 se emplean en los ensayos de los
440. ejemplos 32 - 35 en cada caso 50 partes vol. de glicol propilénico como agente que facilite la disolución, y en cada caso 100 partes vol. de solución salina exenta de glucosa como disolvente, variando el tiempo de reacción de acuerdo con las condiciones de ensayo indicadas en la
445. siguiente tabla. También en la forma de trabajo que a continuación se indica, se puede obtener de la sustancia "S" (Δ^4 -3,20-diceto-17 α ,21-dioxi-pregнено) la sustancia "F" (Δ^4 -3,20-diceto-11 β ,17 α ,21-trióxi-pregнено) en forma cristalina. El punto de fusión del extracto bruto cromatografiado sobre gel de sílice, después de recristalizar una vez el eluato de éster acético/^{es} de 185-200° C. El análisis papelcromatográfico y la reacción de color con ácido sulfúrico concentrado, demuestran la identidad de esta fracción cristalizada con la sustancia "F".
- 450.

Oxidación de substancia "S" a substancia "F"

EJEMPLOS 32 - 35.

Ejemplo N°	Substrato	Partes en peso.	Glándula suprarrenal, partes en peso.	Disolventes Como en los ejemplos 5 - 31 pero	Partes vol.	Principio	Valor pH de la solución de reacción: Al cabo de 30'	Final	Horas que dura en total la reacción	Extracto de éster acético partes en peso.
32	ácido fumárico	0,232	51	sin glucosa	100	6,78	6,78	6,78	4½	1,49
33	ácido fumárico	0,232	53	sin glucosa	100	7,35	7,25	7,48	2½	3,14
34	ácido fumárico	0,232	34	sin glucosa	100	7,32	7,54	7,54	1	1,99
35	ácido fumárico	0,232	53	sin glucosa sin MgSO ₄	100	7,38	7,56	7,49	2½	3,13

198022



455. EJEMPLO 36.

- 121 partes en peso de hígado de ternera, recién obtenido en el matadero y cortado en cubitos, se homogeneiza durante 3 minutos en un homogeneizador con 100 partes vol. de una solución acuosa que contiene 0'232 partes en peso de ácido
460. fumárico. 1'8 partes en peso de glucosa. 0'362 partes en peso de cloruro sódico, 0'186 partes en peso de cloruro potásico, 0'356 partes en peso de fosfato secundario sódico, 0'099 partes en peso de sulfato de magnesio, ajustándose mediante 1'2 partes vol. de lejía de sosa cáustica 2 veces normal a un
465. valor pH de 7'42. Una vez homogeneizado, se lleva el pH del homogeneizado, que está en 6'74 por medio de 1'2 partes vol. de lejía de sosa cáustica 2 veces normal a pH = 7'42. A esta mezcla se agrega 0'1 parte en peso de sustancia "S" (Δ^4 -3,20-diceto-17 α ,21-dioxi-pregнено) y se homogeneiza
470. todavía durante 2 minutos. Se vierte la emulsión a un recipiente provisto de agitador y tubo para la entrada de gas y agitando, se hace pasar a 37° C., oxígeno por el termostato. Un exceso en el desarrollo de espuma se evita mediante estrangulación del oxígeno o bien mediante adición de pocas gotas se
475. octanol. Después de 30 minutos el valor de pH es de 7'10 y con 0'2 partes vol. de lejía de sosa cáustica 2 veces normal se ajusta a 7'27; al cabo de 120 minutos se adicionan nuevamente 0'2 partes en peso de lejía de sosa cáustica 2 veces normal con objeto de obtener un pH desde 7'12 hasta 7'26.
480. Al cabo de 3 horas el valor del pH es de 7'20. Adicionando se 30 partes vol. de ácido clorhídrico 1 vez normal/lleva el valor de pH a 3'30, produciéndose una intensa precipitación proteínica y un cambio de color de la solución hasta entonces parda, en gris-pardo.
485. Se vierte la mezcla de reacción en 3000 partes



- vol. de acetona y se aclara el recipiente de reacción por tres veces, cada vez con 250 partes vol. de acetona. Las soluciones acetónicas reunidas se dejan reposar durante 15 horas a la temperatura del ambiente. Después se separa
490. el precipitado mediante succión de la solución amarilla y el residuo se lava por tres veces, cada vez con 250 partes vol. de acetona caliente. De las soluciones acetónicas reunidas se elimina por completo la acetona en el vacío. La solución acuosa residual, así como las precipitaciones y los
495. aceites formados durante la evaporación, se transfieren con 300 partes vol. de éster acético a un recipiente de extracción. Se satura la fase acuosa mediante adición de 25 partes en peso de sal común y se extrae por 4 veces, cada vez con 100 partes vol. de éster acético. Se lavan las
500. soluciones éster acéticas reunidas por dos veces, cada vez con 60 partes vol. de agua y se extraen por 4 veces, cada vez con 50 partes vol. de solución saturada de bicarbonato sódico. Se reúnen el agua del lavado y las soluciones de bicarbonato y se extraen con 100 partes vol. de éster acético.
505. Se lavan las soluciones éster acéticas reunidas con 50 partes vol. de agua, luego con 50 partes vol. de ácido clorhídrico 0'1 veces normal y a continuación todavía por tres veces, cada vez con 50 partes vol. de agua. La solución éster acética de color amarillo-naranja se seca sobre sulfato sódico anhidro,
510. se filtra y se evapora en el vacío hasta secarla. Quedan como extracto éster acético 3'03 partes en peso de gelatina pardo-clara de la que se separan cristales durante la noche.

El análisis papel-cromatográfico de este extracto bruto indica, aparte de la substancia "S" no transformada,

515. la substancia "F" (Δ^4 -3,20-diceto-11 β ,17 α ,21-trioxi-pregнено).



La papilla cristalina, de color pardo-claro, se disuelve en 10 partes vol. de una solución compuesta de 75 partes vol. de benzol y 25 partes vol. de éter y se cromatografía en forma conocida sobre gel de sílice. Se elúe con éter, éter-cloroformo en mezclas, cloroformo, mezclas de cloroformo-éster acético, éster acético y mezclas de éster acético y metanol.

520. De los eluatos de éster acético y éster acético-metanol, cristaliza la sustancia "F". Mediante repetida recrystalización en una mezcla de éter-acetona-pentano y a continuación en éter-acetona, se obtiene de las fracciones de la elución éster acética el producto cristalizado, papel-cromatográficamente homogéneo que funde a 200-210° C.
525. Los cristales permiten su identificación a base de la reacción de color con ácido sulfúrico concentrado, como sustancia "F" (Δ^4 -3,20-diceto-11 β ,17 α ,21-trióxi-pregneno) y muestran un giro específico de $[\alpha]_D = +156^\circ$ (en alcohol). Los eluatos de la cromatografía de gel de sílice, en los que coexisten las sustancias "F" y "S" mezcladas, se reúnen con las lejías madres de la recrystalización arriba citada, acetilando en forma usual con anhídrido acético en piridina. Los productos de la acetilación se cromatografían sobre gel de sílice, y después de evaporar los agentes de elución, se obtienen los acetatos en forma cristalina. Los cristales que dan con ácido sulfúrico concentrado una fluorescencia amarillo-verdosa, funden a 218-225° C. y muestran en dioxano el giro específico de $[\alpha]_D = +167^\circ$, representando por lo tanto el acetato de la sustancia "F".
530. 535. 540.

EJEMPLOS 37 - 42.

545. En forma análoga como en las condiciones de ensayo del ejemplo 36, se trabaja en los ejemplos 37 - 42 con los



- substratos recopilados en la siguiente tabla, empleándose como disolvente en el ejemplo 37 las 100 partes vol. y en los ejemplos 38 - 42 para cada ejemplo 150 partes vol. de la solución salina que contiene glucosa. También en estas condiciones se consigue la introducción de oxígeno en posición "11" de la sustancia "S" (Δ^4 -3,20-diceto-17 α ,21-dioxi-preg-
 550. neno). El método de elaboración empleado según ejemplo 36 conduce al aislamiento de la sustancia "F" que funde a 200-210° C. (Δ^4 -3,20-diceto-11 β ,17 α ,21-trioxi-preg-
 555. neno). Se identifican los cristales mediante análisis papel-cromatográfico y reacción de color con ácido sulfúrico concentrado, mostrando en etanol el giro específico $[\alpha]_D = + 156^\circ$.

EJEMPLO 37.

- En este caso se homogeneizan 121 partes en peso de hígado de ternera, como en el Ejemplo 36.
 560.

EJEMPLOS 38 - 40.

Como órgano que contiene enzimas se introducen en estos ensayos, cada vez 55 partes en peso de hígado de conejo, por lo demás en forma análoga como en el ejemplo 36.

565. EJEMPLOS 41 y 42.

Como fuente enzimica se emplean en estos ensayos 83 partes en peso de riñones de ternera en lugar de los hígados, en condiciones por lo demás idénticas al ejemplo 36.

- Los demás datos de ensayo en que están basados los
 570. ejemplos 37 - 42 se encuentran recopilados en la siguiente tabla:

EJEMPLOS 37 - 42.

Oxidación de substancia "S" a substancia "P"

Ejemplo Nº	Substrato	Partes en peso	Valor pH de la solución de reacción.				Horas que dura en total la reacción	Extrac- to de éster acético partes en peso.			
			Principio	Al cabo de 20'	Al cabo de 40'	Elevado a: 70'			Final		
37	ácido cítrico	0,420	7,42	7,17	7,15	7,28	7,19	7,30	7,22	3,	2,05
38	ácido fumárico	0,232	7,45	7,32	7,25	7,40	7,33	7,62	7,44	3	1,47
39	ácido ascorbínico	0,352	7,47	7,30	7,22	7,37	7,32	7,52	7,30	3	1,64
40	ácido d-l-glutamí- nico	0,584	7,44	7,33	7,23	7,38	7,33	7,56	7,44	3	2,65
41	ácido fumárico	0,232	7,30	7,13	7,19	-	7,16	-	7,14	3	3,18
42	ácido cítrico	0,420	7,39	7,31	7,38	-	7,39	-	7,31	3	3,21

198022





N O T A

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse
575. constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una patente presentada en Suiza con fecha 26 de mayo de 1950, nº 56.861, acogándose a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, y
580. siendo lo que constituye su esencia y por lo que se solicita Patente de Invención, por 20 años en España: "Procedimiento para la introducción de oxígeno en esteroides"; caracterizándose por lo siguiente:
585. 1º.= Procedimiento para la introducción de oxígeno en esteroides, caracterizándose porque se tratan esteroides, no sustituidos en el ciclo "C", con oxígeno o agentes que lo desarrollan, en presencia de enzimas y substratos que les corresponden, aislando los 11-oxiesteroides formados.
590. 2º.= Procedimiento, según reivindicación 1ª, caracterizado porque se emplean como agentes que desarrollan oxígeno, el peróxido de hidrógeno o bien compuestos que forman peróxido de hidrógeno.
595. 3º.= Procedimiento, según reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizándose porque se emplean las enzimas en forma de preparados de órganos.
600. 4º.= Procedimiento, según reivindicaciones 1ª - 3ª caracterizado porque se emplean como preparados de órganos, cortes de órganos, homogenizados de órganos o bien mezclas de los mismos.



- 5º.= Procedimiento, según reivindicaciones 1ª - 4ª, caracterizado porque se emplean preparados de órganos procedentes de glándulas suprarrenales, riñones, hígados o mezclas de los mismos.
605. 6º.= Procedimiento, según reivindicaciones 1ª - 5ª, caracterizado porque se emplean como substratos enzimicos las sustancias que como substratos pertenecen al sistema cicloforásico.
610. 7º.= Procedimiento, según reivindicaciones 1ª - 5ª, caracterizándose porque se emplean como substratos enzimicos los compuestos pertenecientes al ciclo del ácido cítrico o vecinos al mismo.
515. 8º.= Procedimiento, según reivindicaciones 1ª - 5ª, caracterizado porque se emplea ácido ascorbínico como substrato enzimico.
- 9º.= Procedimiento, según reivindicaciones 1ª - 8ª, caracterizado porque se trabaja en condiciones de ambiente favorables para las enzimas.
520. 10º.= Procedimiento según reivindicaciones 1ª - 9ª, caracterizado porque se realiza la reacción en la zona del valor pH entre 6'5 y 9.
525. 11º.= Procedimiento para la introducción de oxígeno en esteroides; tal y como queda substancialmente descrito en la presente memoria, que consta de veintiseis hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 25 de mayo de 1951.

C I B A, Societé Anonyme.

P.P. de J. GOMEZ ACEBO y MODET