

Caso 550K



223437

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO MICROBIOLÓGICO DE ESTEROIDES Y PRODUCTOS OBTENIDOS EN EL MISMO", a favor de SCHERING CORPORATION, de nacionalidad estadounidense, domiciliada en BLOOMFIELD, Essex County, New Jersey, U.S.A. Orange Street, 60.

• • •

MEMORIA DESCRIPTIVA



Caso 550X

El presente invento se refiere a la síntesis de 1-dehidrocortisona (1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona), 1-dehidrocortisol (1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona), sus derivados 9 α -halo y sus ésteres, y de los compuestos intermedios que pueden convertirse en tales dienos, lo mismo que a los nuevos compuestos así producidos y a las composiciones farmacéuticas que contienen compuestos terapéuticamente activos.

El invento se relaciona principalmente con la fabricación de los 10,13-dimetil esteroide 1,4-dienos que pueden considerarse como derivados del hidrocarburo pregnano, y a fin de facilitar la comprensión del invento en la fórmula I de la hoja 1 de fórmulas que se acompaña se indica la numeración corriente de los átomos de carbono del esqueleto del pregnano. Es costumbre omitir el grupo CH₃ que va unido a los carbonos 10 y 13, presentándose únicamente las líneas verticales. Las letras A, B, C, D representan la manera corriente de identificar los cuatro anillos.

Los productos finales principales del invento están representados por las fórmulas II (1-dehidrocortisona y sus ésteres 21), III (1-dehidrocortisol y sus ésteres 21), IV (9 α -halógeno-1-dehidrocortisona y sus ésteres 21) y V (9 α -halógeno-1-dehidrocortisol y sus ésteres 21), estando todas estas fórmulas combinadas en la fórmula compuesta VI. La fórmula VII representa 11-epi-1-dehidrocortisol y sus ésteres 21, es decir, 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona y sus ésteres 21, siendo estos compuestos intermedios valiosos para la preparación de 1-dehidrocortisona (II). De acuerdo con el invento es posible emplear una gran variedad de compuestos iniciales, es decir, de compuestos que sirven de punto de partida, para la preparación de los compuestos II a V, y en el curso del tratamiento



de los diferentes compuestos iniciales que se describen luego en detalle, se obtienen diversos nuevos compuestos intermedios, algunos de los cuales poseen de por sí valor terapéutico.

Al llevar a cabo nuestra síntesis de los 1,4-pregnadienos mencionados arriba se somete a uno o más tratamientos un pregnano saturado o un pregnano no saturado que tiene una función oxígeno en las posiciones 3 y 20, pero que carece de una o más de las siguientes características: (a) el enlace doble Δ^1 ; (b) el enlace doble Δ^4 ; (c) el grupo X; (d) el grupo 17 α -OH; (e) el grupo 21-OH; y (f) el grupo 9 α -halógeno, con lo que la característica o las características ausentes se introducen en la molécula.

En la práctica de nuestro invento se introduce un enlace doble en un carbono del anillo A, teniendo ya dicho anillo A un enlace doble ligado a un carbono del mismo. Así, pues, al llevar a cabo el invento se introduce en el compuesto que sirve de punto de partida un enlace doble en la posición 1,2, con o sin una o más de las siguientes modificaciones de tal compuesto que sean necesarias para producir cualquiera de los compuestos II a V, efectuadas en cualquier orden adecuado:

- (1) introducción de un doble enlace 4 ó 5 (pasando finalmente el enlace doble Δ^5 a la posición 4,5);
- (2) introducción de una función 11-oxígeno;
- (3) introducción de una función 17 α -oxígeno;
- (4) introducción de una función 21-oxígeno;
- (5) introducción de un 9 α -halógeno.

El grupo ceto en la posición 3 no se enumera como característica separada que se introduce en el compuesto inicial porque en un



procedimiento nuevo, según el invento, de introducir el enlace doble 1,2, se reemplaza un grupo hidroxilo o un grupo éster en la posición 3 simultáneamente por un oxígeno cetónico.

Los compuestos iniciales no saturados pueden tener un enlace doble ligado a una o más de las posiciones 4, 6, 9(11) y 16. En una modificación de nuestro método, los compuestos iniciales pueden, en verdad, poseer ya los dos enlaces dobles en el anillo A, característicos de los productos finales representados por las fórmulas II a V.

Pueden emplearse diversas vías para la síntesis de los compuestos II a V, según la naturaleza del compuesto inicial, teniendo todas estas vías el distintivo común de que utilizan procedimientos para introducir una o más de las características (a) a (f) antes enumeradas, y de dar productos finales en forma de 1,4-pregnadienos que tienen los sustituyentes en las posiciones 3, 11, 17, 20 y 21, indicadas por las fórmulas estructurales II a V y con el grupo 9 α -halógeno o sin él.

Las operaciones mediante las cuales pueden efectuarse los cambios necesarios en el compuesto inicial pueden ser todas microbiológicas, o todas químicas, o bien una combinación de procedimientos microbiológicos y químicos, según el carácter del compuesto inicial, o según se prefiera en determinados casos cuando ciertas conversiones pueden efectuarse cómodamente tanto con la ayuda de ciertos microorganismos o con reactivos puramente químicos.

Si bien algunas reacciones, tanto químicas como bioquímicas, que aquí se describen, se conocen de modo general en relación con la producción de otros compuestos, una de las transformaciones novedosas que se llevan



a cabo mediante el presente método entraña el empleo de cultivos de microorganismos deshidrogenantes que tienen la propiedad específica de introducir un enlace doble entre los carbonos 1,2 sin producir degradación simultánea del esqueleto del pregnano, tal como la división de la cadena lateral en el carbono 17 ó la apertura del anillo D. Los microorganismos deshidrogenantes son capaces también de hidrolizar los grupos éster, generalmente en las posiciones 3 y 21 y, con diferente rapidez o efecto de totalidad, efectuar también la oxidación de los grupos hidroxilo 3 y 20. Estos microorganismos son muy eficaces en lo que se refiere a introducir la insaturación Δ^1 , especialmente en compuestos que tienen un enlace doble que liga los carbonos 4,5 ó 5,6.

Los microorganismos deshidrogenantes actúan mejor en substratos (es decir, en el compuesto esteroide que se va a modificar) que tienen un enlace doble ligado al carbono 5 y que contienen, bien sea un grupo hidroxilo relativamente estable a la acción del organismo, esto es, que no se oxida rápidamente, formando un oxígeno cetónico, o un éster de tal grupo hidroxilo que es hidrolizado por el cultivo del microorganismo. Por eso, compuestos como la progesterona no son adecuados como compuestos iniciales, y lo mismo puede decirse de la pregnenolona (5-pregнено-3-ol-20-ona), puesto que su grupo hidroxilo 3 se oxida rápidamente formando un oxígeno cetónico, y produciendo progesterona.

Puede introducirse el grupo hidroxilo 11 en compuestos desprovistos de un sustituyente en el carbono 11 mediante el empleo de un cultivo de microorganismos hidroxilantes 11a o hidroxilantes 11b. Esa hidroxilación 11 puede efectuarse no solamente en los compuestos 4-pregнено o 5-pregнено,



sino también en los 1,4-pregnadienos, 1,4,16-pregnatrienos y en los 4,6-pregnadienos. Como los compuestos 11 α -hidroxilo generalmente tienen poca o ninguna actividad fisiológica, el 11 α -hidroxilo se oxida de preferencia por medio de un agente oxidante suave, tal como el ácido crómico en piridina a la temperatura ambiente o a temperaturas menores, y de preferencia después de acilar el hidroxilo 21, cuando este último grupo se halla presente.

Nuestra síntesis de los compuestos II a V comprende también la introducción de un grupo 17 α -hidroxilo cuando tal grupo está ausente en el compuesto inicial. Tal hidroxilación 17 α puede realizarse, ya sea químicamente, comenzando con un compuesto 16- dehidropregnano, por ejemplo, formando el correspondiente 16,17-epóxido, seguido ello de hidrólisis, o bien partiendo de compuestos que son saturados en el anillo D e introduciendo el grupo 17 α -hidroxilo con ayuda de cultivos de microorganismos 17 α -hidrolizantes.

Con respecto al grupo 21-hidroxilo, si bien tal hidroxilo puede introducirse en el grupo 21-metilo de una manera conocida por medios puramente químicos, preferimos lograr ese resultado por medio de un cultivo de un microorganismo 21-hidroxilante.

Como se ha indicado ya, puede introducirse la insaturación en el anillo A por medios puramente químicos, por ejemplo, por bromuración seguida de dehidrobromuración. En este procedimiento, el compuesto inicial es un pregnano saturado y se introducen dos enlaces dobles en el anillo A mediante dehidrohalogenación del compuesto 2,4-dibromo.

Sin embargo, es posible también formar un solo enlace doble en el anillo A de un compuesto pregnano que tiene ya una sola insaturación por



10 A

medios puramente químicos. Esto puede realizarse mediante substitución de una función oxigenada en la posición 2 de la cortisona y la hidrocortisona y sus ésteres. La función oxigenada es de preferencia un grupo éster que es reemplazado finalmente por un 2-hidroxilo. El compuesto 2-hidroxi-3-ceto-4-pregнено así obtenido se deshidrata luego, por ejemplo, con un ácido, para quitar el 2-hidroxilo junto con un átomo de hidrógeno en la posición 1, produciendo el correspondiente compuesto 3-ceto-1,4-pregnadieno.

Otra vía más que queda dentro de los fines del invento para la formación de la estructura 3-ceto-1,4-pregnadiense entraña el empleo, como punto de partida, de un 1-pregнено no saturado, análogo de la cortisona, hidrocortisona y sus ésteres. Primero se forma el 1,2-epóxido del compuesto inicial, después de lo cual el anillo oxido se abre para formar la halohidrina saturada (1-hidroxi-2-halógeno-3-ceto-pregnano). Después de la eliminación del halógeno y de la acilación del 1-hidroxilo, el compuesto saturado se halogena en la posición 4 y luego se dehidrohalogena, formando el 1-aciloxi-3-ceto-4-pregнено. Después de dividir el grupo 1-aciloxi, se introduce el enlace doble en la posición 1,2, formando el compuesto 1,4-pregnadieno.

El invento tiene también en mira la preparación de ciertos ésteres de los compuestos de las fórmulas II a V, que según se ha visto aumentan la duración de la actividad de los compuestos, de modo que se necesita una administración menos frecuente, y especialmente menos inyecciones.

El grupo 9 α -halógeno puede estar presente en el compuesto 11-ceto o en el 11 β -hidroxil inicial, o bien puede introducirse por medio de diversos procedimientos químicos en cualquier etapa de la fabricación de los compuestos II a V en la que esté presente el grupo 11 α -hidroxilo o el 11 β -hidroxilo.



dando por resultado en ambos casos un compuesto 9α -halógeno- 11β -hidroxi, que puede oxidarse, convirtiéndose en la forma 9α -halógeno- 11 -ceto.

Se ha determinado mediante pruebas clínicas que los compuestos 1-dehidrocortisona y 1-dehidrocortisol y sus 21-ésteres tienen una acción fisiológica extraordinariamente mejorada respecto de los compuestos corrientes que tienen una sola insaturación (cortisona, hidrocortisona y sus 21-ésteres, respectivamente). Así, por ejemplo, acusan una potencia varias veces mayor que la potencia de las correspondientes hormonas conocidas, tales como la cortisona y la hidrocortisona, en el tratamiento de la artritis reumatoide. Además, las reacciones secundarias inconvenientes de las hormonas conocidas aparecen tan sólo en un grado disminuído cuando se emplean los nuevos compuestos; y la intensidad de esas reacciones secundarias disminuyen todavía más por el hecho de que pueden emplearse dosis mucho más bajas de los nuevos compuestos, comparadas con las de los correspondientes compuestos conocidos que tienen una sola insaturación. Tanto las dosis iniciales como las dosis de sostén en el tratamiento de la artritis reumatoide se pueden reducir considerablemente mediante el empleo de los nuevos compuestos, comparadas con las dosis que se necesitan cuando se emplea la cortisona y la hidrocortisona. Aun con las dosis reducidas, los nuevos compuestos no exigen el empleo concomitante de codeína u otro analgésico para el alivio del dolor, mientras que tales analgésicos se han empleado con frecuencia junto con la cortisona y el Compuesto F.

Los dienos terapéuticamente activos del presente invento se administran de preferencia por la vía oral en forma de tabletas que contienen una dosis diaria completa, por ejemplo, 50 mg. o un submúltiplo de tal dosis, por



10

ejemplo, 25 ó 20 mg., o aun 10 mg., mezclados con un excipiente farmacéutico sólido que contiene uno o más de los ingredientes usuales, tal como almidón, azúcar, gomas, arcillas y otros análogos. Sin embargo, pueden administrarse también en forma de inyección intravenosa e intramuscular, disueltos o suspendidos en un vehículo líquido atóxico; o bien pueden administrarse en forma sólida mediante implantación subcutánea, o en forma de supositorios disueltos o suspendidos en un vehículo graso o de cera, que se derrite aproximadamente a la temperatura del cuerpo. Lo mismo que sus derivados 9 α -halógeno, puede hacerse una aplicación tópica en forma de un unguento o crema, disueltos en una base de unguento o crema de composición conocida.

Se ha visto que la introducción del segundo enlace doble en diversos compuestos intermedios conocidos, de una sola insaturación, mejora también la actividad de tales compuestos. Ejemplos de estos últimos son la corticosterona y la 11-dehidrocorticosterona.

Procedemos ahora a explicar con más detalles las diversas conversiones a que se ha hecho antes referencia sucinta.

A. Introducción del enlace doble Δ^1 por medio de un cultivo de un organismo hidrogenante.

Hemos visto que la modificación química de los compuestos pregneno, y, especialmente, la dehidrogenación del anillo A de los pregnenos que ya poseen un enlace doble ligado a un carbono del anillo A, con o sin una o más de las operaciones de oxidación, reducción e hidrólisis del éster, puede realizarse de manera eficaz y barata incubando o fermentando el esteroide inicial con un medio de cultivo que contiene un microorganismo deshidrogenante que no degrada o divide al mismo tiempo la molécula de pregnano. Los microorganismos de este tipo pertenecen a la familia Corynebactriaceae, de la



cual la especie Corynebacterium simplex (American Type Culture Collection 6946) y Corynebacterium hoagii (A.T.C.C. 7005) dan resultados muy satisfactorios. La primera de estas especies es una bacteria del suelo, mientras que la segunda se halla en la garganta humana (donde al parecer no produce ninguna afección patológica) y a veces como contaminante de cultivos expuestos a la atmósfera, aunque su habitat real u original no se conoce.

Los compuestos iniciales pueden tener grupos hidroxilo, ceto, halógeno y éster en diversas posiciones del núcleo o de la cadena lateral; así, por ejemplo, pueden hallarse presentes grupos hidroxilo en una o más de las posiciones 3,11,17,20 y 21; los grupos ceto pueden ocupar una o más de las posiciones 3,11 y 20; mientras que un halógeno, por ejemplo, flúor o bromo puede estar ligado al carbono 9, o hallarse en otros puntos del núcleo o de la cadena lateral. La presencia de un grupo hidroxilo libre parece facilitar la transformación química. Grupos éster de gran variedad, y, de preferencia, los ésteres de los ácidos que se emplean corrientemente en la síntesis de esteroides y en la preparación de hormonas esteroides de uso terapéutico, y especialmente los ésteres de ácidos alcanicos inferiores, como, por ejemplo, acetato, pueden situarse en una o más de las posiciones 3,11,17,20 y 21. El carácter específico del éster no es un factor decisivo en nuestro procedimiento, y pueden emplearse otros ésteres, tanto de ácidos orgánicos como de ácidos inorgánicos, tales como acetatos de ciclopentilo y ciclohexilo, propionatos y butiratos; lo mismo que fosfatos, polifosfatos y sulfatos; necesitándose únicamente que los ésteres sean atóxicos respecto del microorganismo. Los productos hidroxilados de nuestro método pueden, si se desea, convertirse en sus correspondientes ésteres mediante



10

procedimientos conocidos; por ejemplo, pueden convertirse en sus ésteres alcanolicos inferiores y especialmente en sus ésteres de ácido acético. Los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 11 pueden epímeros α ó β . Como se indicara con más amplitud luego, el éster, especialmente en la posición 21, puede ser un ácido que actúa prolongando la duración de la actividad de los compuestos terapéuticos.

Utilizando un microorganismo deshidrogenante de acuerdo con el invento, puede convertirse, por ejemplo, la 4-pregнено-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (cortisona, el Compuesto E de Kendall) en 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (1-dehidrocortisona); la 4-pregнено-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona (hidrocortisona o cortisol, el Compuesto F de Kendall) en 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona (1-dehidrocortisol); la 4-pregнено-17 α ,21-diol-3,20-diona (el Compuesto S de Reichstein) en 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona y 1,4-pregnadieno-17 α ,20 β ,21-triol-3-ona; el 5-pregнено-3 β ,20-diol en 1,4-pregnadieno-3,20-diona; la 4-pregнено-11 β ,21-diol-3,20-diona (corticosterona) en 1,4-pregnadieno-11 β ,21-diol-3,20-diona; la 4-pregнено-21-ol-3,20-diona (desoxicorticosterona) en 1,4-pregnadieno-21-ol-3,20-diona; la 4-pregнено-21-ol-3,11,20-triona (el Compuesto A de Kendall) en 1,4-pregnadieno-21-ol-3,11,20-triona; la 9 α -fluoro-4-pregнено-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona (fluoro-Compuesto F) en 9 α -fluoro-1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona; el 3,21-diacetato de 5-pregнено-3 β ,17 α ,21-triol-20-ona en 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona y 21-acetato de 4-pregнено-17 α ,21-diol-3,20-diona; la 4-pregнено-20-ol-3-ona en 1,4-pregnadieno-3,20-diona; la 5-pregнено-3,17 α ,20,21-tetrol-11-ona y sus ésteres 3 y (o) 21 en 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona y su 21-éster; y el 5-pregнено-3,11 α ,17 α ,



20,21-pentol y sus 3-ésteres y (o) 21-ésteres en 1,4-pregnadieno-11a,17a, 21-triol-3,20-diona y su 21-éster.

En lugar de los compuestos 3-ceto iniciales, pueden emplearse los correspondientes compuestos 3-hidroxi y sus 3-ésteres, como la 5-pregneno-3,11β,17a,21-tetrol-20-ona y la 5-pregneno-3,17a,21-triol-11,20-diona y sus 3-acetatos ó sus 3,21-diacetatos, para producir los mismos productos finales 3-ceto dienos, hidrolizándose el grupo 3-éster y oxidándose luego el 3-hidroxiilo para formar oxígeno cetónico. Los grupos éster en las posiciones 11 y 17 no se hidrolizan generalmente, al menos no en grado significativo; mientras que un grupo éster en la posición 21 puede o no hidrolizarse, según las condiciones de la reacción. Así, por ejemplo, cuando el compuesto inicial es un 3,21-diéster, el producto de reacción puede ser un compuesto 3-ceto-21-éster o un compuesto 3-ceto-21-hidroxi. Junto con el 3-hidroxiilo, suele oxidarse un 20-hidroxiilo, convirtiéndose en un grupo ceto. Se verá que los organismos deshidronizantes que se emplean en el presente invento son selectivos con respecto al paso de oxidación, limitándose ésta casi por completo a las posiciones 3 y 20; mientras que la hidrólisis puede quedar restringida a los grupos 3-éster.

Nuestro procedimiento es aplicable también al tratamiento de los epímeros 11a-hidroxi de los compuestos 11β-hidroxi iniciales antes mencionados, tales como la 4-pregneno-11a,17a,21-triol-3,20-diona, 4-pregneno-11a, 17a,20,21-tetrol-3-ona, 5-pregneno-3, 11a,17a,21-tetrol-20-ona, 5-pregneno-3,11a,17a,20,21-pentol y sus monoésteres y poliésteres, como los 3-acetatos, 3,21-diacetatos y 3,17a,21-triacetatos, produciendo estos compuestos iniciales 1,4-pregnadieno-11a,17a,21-triol-3,20-diona o un éster de la misma.



Los 11-epímeros del 1,4-dieno del Compuesto F (1-dehidrocortisol) y sus ésteres pueden convertirse en el 1,4-dieno de cortisona sus ésteres por oxidación del grupo 11 α -hidroxilo de una manera conocida, por ejemplo, empleando la cantidad teórica de ácido crómico, con o sin piridina o ácido acético, a la temperatura ambiente o inferior (5 a 15° C.), de preferencia después de esterificarse el grupo 21-hidroxilo, si está libre. Estos compuestos 11 α -hidroxi iniciales son relativamente fáciles de preparar con alto rendimiento, según se conoce en el arte, y por lo tanto representan compuestos iniciales convenientes para la preparación de la 1-dehidrocortisona y del 1-dehidrocortisol.

Pueden realizarse otras transformaciones por medio de los microorganismos deshidrogenantes, inclusive la conversión del 3,21-diacetato de 5-pregнено-3,17 α ,21-triol-20-ona en una mezcla de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona y 21-acetato de 4-pregнено-17 α ,21-diol-3,20-diona. Alterando el medio de fermentación puede hacerse que el Compuesto S dé no sólo 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona, sino también 1,4-pregnadieno-17 α ,20 β ,21-triol-3-ona, esto es, se efectúa una reducción en el grupo 20-ceto. Como se ha indicado ya, los microorganismos pueden también efectuar la oxidación de un grupo 20-hidroxilo secundario, como pasa con la conversión del 5-pregнено-3,20-diol en 1,4-pregnadieno-3,20-diona.

El procedimiento del invento es aplicable también a los esteroides 9 α -fluoro, cloro y bromo y éstos producen los correspondientes productos de reacción substituidos. Las diversas transformaciones pueden representarse por las ecuaciones (1), (2) y (3) en la Hoja 1, que ilustran la formación de los productos finales que se desean, así como los compuestos intermedios

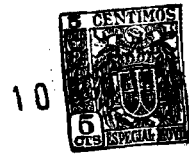


capaces de convertirse en aquellos.

En la ecuación (1) X corresponde a $H_2, = O, \delta \begin{matrix} H \\ \diagdown \\ OH \end{matrix}$ (α o β); Y representa $-CO \cdot CH_2OH$; y Z' es OH o H. En la ecuación (2) W es H, F, Cl or Br; X es $H_2, = O, \delta \begin{matrix} H \\ \diagdown \\ OH \end{matrix}$; Y es $-CO \cdot CH_2OH, -CO \cdot CH_2OOCR',$ o $-CHOH \cdot CH_2OH$; Z' es OH o H; y R' es un radical alcoholo inferior. En la ecuación (3), R es un grupo alcoholo inferior; Y es $-CO \cdot CH_2OH, -CHOH \cdot CH_3, -CO \cdot CH_2OOCR',$ o $CHOH \cdot CH_2OH$; Z' es H u OH, y R' es un radical alcoholo inferior.

A fin de obtener un crecimiento conveniente del microorganismo deshidrogenante, como el Corynebacterium simplex y el C. hoagii, para el proceso del invento se prepara un medio nutriente adecuado que contiene hidrato de carbono nitrógeno orgánico, cofactores y sales inorgánicas. Es posible omitir el empleo del hidrato de carbono sin afectar desfavorablemente por completo el desarrollo del organismo. Después de cultivar el microorganismo en el medio nutriente, puede recogerse la masa de células mediante centrifugación del caldo nutriente, decantando el líquido que sobrenada y suspendiendo la masa de células en suero fisiológico. Se inocula luego un volumen adecuado de la suspensión de células en un medio nutriente apropiado para sustentar el crecimiento del microorganismo. El medio nutriente que se emplea puede ser un extracto de levadura (Difco), hidrolizado de caseína (N-Z-Amina) (Tipo B Sheffield), líquido de maceración de maíz, extracto acuoso de harina de aceite de soja, hidrolizado de lactalbumen (Edamine-Sheffield Enzymatic), materias solubles de pescado y otras por el estilo.

El compuesto esteroide en forma sólida o disuelto o suspendido en etanol acetona o cualquier otro disolvente miscible con agua que no sea tóxico para el organismo, se agrega al microorganismo cultivado en el medio nutriente



(caldo) en condiciones de esterilidad. Este cultivo se agita luego, se airea o bien se airea y agita simultáneamente, a fin estimular el crecimiento del microorganismo y la conversión bioquímica del sustrato (esteroide). El esteroide puede agregarse al caldo e inocularse luego con la bacteria, o bien puede agregarse al esteroide el microorganismo cultivado en el caldo. En ciertos casos, según las condiciones del medio de reacción, puede ser más conveniente obtener el crecimiento óptimo del microorganismo antes de agregarse el esteroide. De modo alternativo, pueden emplearse preparados enzimáticos obtenidos de manera conocida de los cultivos de los microorganismos para efectuar el proceso.

Las sales inorgánicas son convenientes para mantener un pH en el medio de reacción de 6,8 a 7,2. Sin embargo, puede omitirse el empleo de sales inorgánicas para amortiguar la mezcla de reacción. La omisión de las sales inorgánicas hace que el pH aumente de un valor inicial de 6,8 a como de 7,7 a 8. Pero este pH permite siempre la formación de los productos esteroides finales que se persiguen. La temperatura óptima para el crecimiento del microorganismo es de 37°C., pero las temperaturas pueden variar entre 25° y 37°, y aun entre 20° y 40°C. El tiempo de reacción puede variar desde un mínimo de 3 horas hasta un máximo de 48 horas. La cantidad de tiempo que se emplea depende del esteroide que se está transformando. Puede emplearse cualquier disolvente miscible con agua que no sea tóxico para el organismo, a fin de disolver o suspender el esteroide. Se prefiere el empleo de etanol o de acetona en cantidades tales que la concentración de esos disolventes en la mezcla de reacción no sea mayor de 7% y puede ser de trazas apenas; a causa de la evaporación la concentración final del



10

disolvente orgánico puede ser hasta prácticamente de cero.

Después de terminado el proceso de oxidación o deshidrogenización, que puede ir acompañado de hidrólisis parcial o completa cuando se emplean monoésteres y poliésteres, los productos de reacción pueden obtenerse / de la mezcla mediante extracción por medio de un disolvente miscible con agua adecuado, por filtración, por adsorción en un adsorbente apropiado, o mediante cualquiera de los otros procedimientos comúnmente conocidos en el arte. Para la extracción son útiles los hidrocarburos inferiores clorados, las cetonas y los alcoholes. Entre éstos figuran el cloroformo, el cloruro de metileno, tricloroetano, bicloruro de etileno, butanol, dietilcetona y otros. Preferimos emplear el método de extracción para aislar los productos esteroideos. Después de la extracción los productos pueden aislarse por concentración de los extractos hasta un pequeño volumen o hasta la sequedad. La purificación de los residuos puede realizarse mediante simple recristalización de una solución con un disolvente adecuado o mezcla de disolventes, tales como acetona, cloruro de metileno, etanol, acetona-hexano, cloruro de metileno-hexano, etc., que producen el dieno deseado con excelente rendimiento y un alto estado de pureza.

Las transformaciones químicas que pueden efectuarse sometiendo los diversos pregnenos a la acción de un cultivo de microorganismos deshidrogenantes son, pues, de muy diversas clases, y pueden tener lugar separadamente o bien pueden ocurrir dos o más de esas transformaciones simultánea o sucesivamente. Las diversas reacciones no parecen ser afectadas por otros substituyentes presentes en el núcleo del esteroide o en la cadena lateral.

Resulta evidente por lo expuesto que no es esencial que el compuesto



inicial tenga su enlace doble en la posición 4 del anillo A; así, por ejemplo, el enlace doble puede estar en la posición 5. El compuesto que sirve de punto de partida puede tener también más de un enlace doble. Así, pues, los 4,6-pregnadienos pueden deshidrogenarse o transformarse de otra suerte de la manera antes descrita, dando 1,4,6-pregnatrienos, reduciéndose estos últimos fácilmente de manera conocida a 1,4-pregnadienos. A manera de ejemplo, el 21-acetato de 4,6-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona puede convertirse en 1,4,6-pregnatrieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona o su 21-éster. Los correspondientes compuestos 11 α -hidroxi u 11 β -hidroxi pueden convertirse de manera análoga en 1,4,6-trienos. Los trienos pueden reducirse mediante procedimientos conocidos a 1-dehidrocortisona o 1-dehidrocortisol o compuestos análogos. El compuesto inicial puede tener también un enlace doble en la posición 16, o en la posición 9(11), como se explicará luego.

Las materias solubles de pescado a que se ha hecho referencia pueden obtenerse actualmente en el comercio en forma de extracto de arenque, menhaden y diversas mezclas de los mismos, que se han sometido a hidrólisis enzimática. Esta sustancia puede agregarse directamente al caldo de cultivo para proporcionar la materia nutriente. Cuando se dispone de materias solubles de pescado (con un contenido de sólidos de 50%) que no se han sometido a hidrólisis enzimática, tales extractos deben diluirse con agua y tratarse con vapor durante unos 10 minutos a una temperatura de 90°C., y filtrarse a continuación, de preferencia con ayuda de Filter-Cel.

Otro ejemplo de un microorganismo deshidrogenizante que se ha comprobado efectúa las reacciones antes descritas es el Bacillus sphaericus,



10

variedad fusiformis (American Type Culture Collection 7055), que es capaz de introducir también un enlace doble en el anillo A sin provocar simultáneamente la degradación de la cadena lateral o dividir el anillo D. Los esteroides de anillo A no saturado resultantes son sumamente estables en un cultivo de este microorganismo y no hacen falta precauciones necesarias para impedir la destrucción del producto final que se desea. El tiempo de incubación puede ser de hasta 96 horas y los rendimientos son bastante altos, siendo con frecuencia casi cuantitativos.

Como ocurre con los otros microorganismos deshidrogenantes antes mencionados, en lugar de un cultivo en desarrollo del B. sphaericus, var. fusiformis pueden emplearse las enzimas separadas o el extracto enzimático de tal cultivo. De manera semejante los pregnenos iniciales pueden ser de una gran variedad, pero se prefiere emplear como punto de partida una sustancia que tiene un enlace doble en C-4 ó en C-5, como es el caso de un 3-ceto-4-pregнено o de un 3-hidroxi-5-pregнено.

En general, el B. sphaericus, var fusiformis efectúa la misma transformación química en los compuestos pregneno antes mencionados, que los organismos Corynebacterium, sólo que no hidroliza tan fácilmente, y en algunos casos no hidroliza del todo un grupo 3-éster, y por lo tanto recomendamos emplear con este organismo los 3-ceto pregnenos y los 3-hidroxi pregnenos, y no los correspondientes 3-ésteres. Los substratos esteroides pueden contener enlaces dobles nucleares fuera del enlace doble en C-4 o en C-5, y tales enlaces dobles adicionales pueden saturarse con un halógeno o con un haluro de hidrógeno, o mediante formación de aductos de dienófilos, como el ácido maleico y el anhídrido maleico. Con la salvedad de no emplear



3-ésteres, los diversos compuestos iniciales pueden convertirse en los mismos productos finales por medio del B. sphaericus, var. fusiformis, tanto como por medio del Corynebacterium simplex y hoagii.

El modo de cultivar el B. sphaericus, var. fusiformis y el método de inocular el medio nutriente, la naturaleza del medio nutriente, la manera de poner el substrato de esteroide en contacto con el cultivo en desarrollo del microorganismo pueden ser iguales que si se tratan de las especies Corynebacterium, sólo que, como se ha indicado ya, el período de incubación puede ser más largo, y generalmente es como de 24 a 96 horas. En todos los casos el cultivo que contiene el esteroide se somete a agitación y se airea.

Fuera de los medios nutrientes antes referidos, pueden emplearse también protopeptonas. El crecimiento del microorganismo se inicia de preferencia a un pH de como 6,6 a 7,2; las temperaturas óptimas para el desarrollo del B. sphaericus, var. fusiformis es como de 28°C., pero puede variar la temperatura entre 19° y 32° C.

Los productos de la reacción bioquímica se obtienen de preferencia mediante extracción con los disolventes y de la manera antes descrita, pero puede emplearse cualquier método adecuado conocido de los químicos.

Desde luego, en lugar de los microorganismos deshidrogenantes antes descritos pueden emplearse mutantes de los mismos que tienen una actividad deshidrogenante semejante, sin que actúen destructivamente en el esqueleto de carbonos del pregnano.

Ahora pasamos a describir síntesis más complicadas, partiendo de compuestos más sencillos, para la fabricación de los compuestos II a V, y también de compuestos intermedios que se convierten o pueden convertirse en



ellos, pero empleando un microorganismo deshidrogenante para introducir un enlace doble en el anillo A.

B. Fabricación de 1-dehidrocortisona y 1-dehidrocortisol de
17 α -hidroxi progesterona y 5-pregнено-3,17 α -diol-20-ona

De acuerdo con una modificación de nuestro método, la deshidrogenación del anillo A por medio de los microorganismos deshidrogenantes antes descritos puede combinarse, según hemos descubierto, con otras conversiones microbiológicas que son conocidas individualmente de modo general, y con un paso de oxidación química (cuando va a producirse 1-dehidrocortisona), para convertir la 17 α -hidroxi progesterona (4-pregнено-17 α -ol-3,20-diona) y 5-pregнено-3,17 α -diol-20-ona en derivados Δ^1 -dehidro, mucho más valiosos, de la cortisona y de la hidrocortisona, pudiendo emplearse tales operaciones en diferentes órdenes de sucesión, sólo que el paso de oxidación química debe seguir al proceso microbiológico que introduce un grupo hidroxilo en la posición 11. Los procesos microbiológicos corresponden básicamente a tres tipos, y son los siguientes:

- (1) introducción de una insaturación Δ^1 (es decir, un enlace doble en la posición 1,2) con oxidación simultánea de un 3-hidroxilo, cuando se halla presente, mediante la acción de un microorganismo deshidrogenante, como los antes descritos, para producir un sistema 1,4-dieno-3-ceto;
- (2) introducción de un grupo 11 α -hidroxilo o un grupo 11 β -hidroxilo mediante la acción de un microorganismo 11-hidroxilante del tipo del Rhizopus nigricans y Curvularia lunata; y
- (3) introducción de un grupo 21-hidroxilo mediante la acción de un



miembro del género Ophiobolus.

Los órdenes de sucesión de estas tres transformaciones microbiológicas pueden variarse y pueden ser, por ejemplo (1), (2), (3); (2), (1), (3); (1), (3), (2); ó (3), (1), (2).

Si se va a producir 1-dehidrocortisona, entonces en cualquier punto después de la introducción del grupo 11-hidroxilo se oxida el compuesto intermedio, por ejemplo, con ácido crómico en piridina, de preferencia a la temperatura ambiente o más baja, para convertir el 11-hidroxilo en oxígeno cetónico. Sin embargo, cuando el 11-hidroxilo tiene la configuración β , y se desea obtener un derivado 1-dehído de la hidrocortisona, puede omitirse el paso de oxidación.

La introducción de un 11 α -hidroxilo, como se ha indicado antes, se efectúa de preferencia mediante la acción de un cultivo (o de la sustancia enzimática separada) de Rhizopus nigricans, de la manera que describe la patente estadounidense No. 2.602.769, de fecha 8 de julio de 1952, concedida a Murray y otro inventor; si bien la introducción del grupo 11 β -hidroxilo se efectúa de preferencia con un cultivo (o la sustancia enzimática separada de un cultivo) de Curvularia lunata, según se describe en la patente estadounidense No. 2.658.023, de fecha 3 de noviembre de 1953, concedida a Shull y otro inventor. Sin embargo, pueden emplearse otros organismos 11 α -hidroxilantes, como el Aspergillus niger, Rhizopus arrhizus y otros organismos semejantes; aunque pueden emplearse también otros organismos β -hidroxilantes, como la Cunninghamella blakesleeana y otros análogos.

El grupo 21-hidroxilo se introduce en la molécula esteroide por medio de un organismo hidroxilante del género Ophiobolus, de preferencia, el



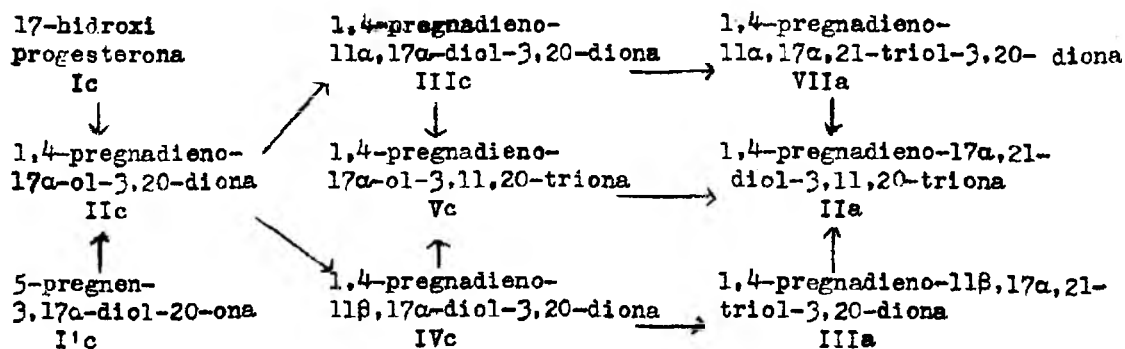
10

O. herbtrichus de la manera descrita por Meystre y otro investigador en *Helvetica Chim. Acta* **37**, 1948 (1954).

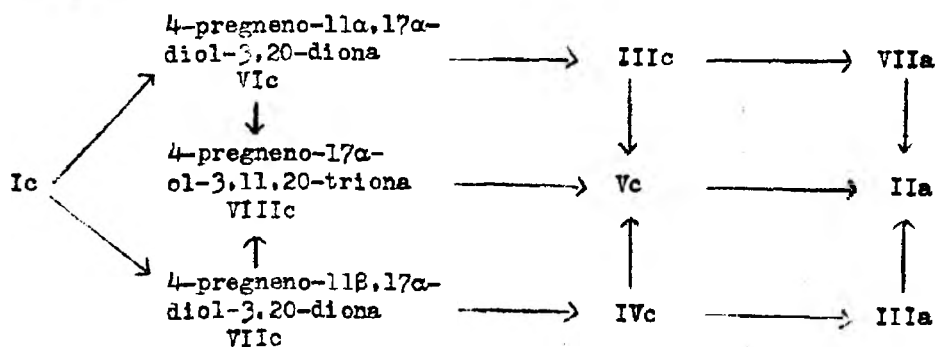
La deshidrogenación del anillo A del compuesto esteroide para introducir un enlace doble Δ^1 se realiza por medio de un organismo deshidrogenante, tal como uno de los antes descritos. Este paso de deshidrogenación puede aplicarse al compuesto inicial o en cualquier punto intermedio del proceso completo.

Los diversos órdenes de sucesión antes indicados pueden representarse por las siguientes ecuaciones:

VIA A:



VIA B:

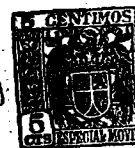




En el primer orden de sucesión (Vía A), 17 α -hidroxiprogesterona (Ic), o 5-pregнено-3,17 α -diol-20-ona (I'c) es transformada fácilmente por la acción del C. simplex o C. hoagii en 1,4-pregnadieno-17 α -ol-3,20-diona (IIc). La hidroxilación de IIc por el Rhizopus nigricans (de la manera descrita en la patente estadounidense No. 2.602.769) produce el compuesto IIIc. Por otra parte la hidroxilación de IIc con la Curvularia lunata (siguiendo el método descrito en la patente estadounidense No. 2.658.023) da el compuesto IVc.

Otros organismos 11 α -hidroxilantes, como el Aspergillus niger, Rhizopus arrhizus, etc., son igualmente eficaces para la transformación de IIc en IIIc; si bien pueden emplearse otros organismos 11 β -hidroxilantes, como la Cunninghamella blakesleeana, para convertir IIc en IVc. El IIIc ó el IVc puede oxidarse, convirtiéndose en Vc, mediante la acción de un agente oxidante suave, como el reactivo piridina-ácido crómico. La hidroxilación de IIIc, IVc, o Vc en la posición 21 se efectúa, por ejemplo, por medio del Ophiobolus herbotrichus, produciendo respectivamente VIIa, IVa o IIa (véase la Hoja 1). Tanto VIIa como IIIa (de preferencia en forma de sus 21-acetatos u otros 21-ésteres de alcanófilos inferiores) pueden convertirse en IIa por medio de oxidación suave con el reactivo piridina-ácido crómico. El grupo éster puede saponificarse subsiguientemente, por ejemplo sometiéndose a reflujó con una solución alcohólica de bicarbonato de potasio.

En el segundo orden de sucesión (Vía B), se invierte el orden de los pasos (1) y (a) (enumerados arriba), dando por resultado la producción de los tres nuevos compuestos intermedios, VIc, VIIc y VIIIc. Sin embargo, los pasos individuales son los mismos y los productos finales son asimismo



iguales.

Como se verá al punto por las ecuaciones arriba indicadas, los compuestos IIIc, IVc y Vc se producen en ambos órdenes de sucesión; estos compuestos representan productos intermedios importantes para la fabricación de los derivados Δ^1 -dehidro de la cortisona e hidrocortisona. Están comprendidos en la fórmula X (Hoja 2), en la que X es =O, β -OH,H o α -OH,H.

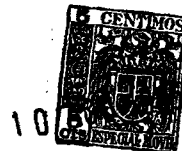
C. Conversión de desoxicorticosterona y 5-pregнено-3,21-diol-20-ona y sus ésteres en 1-dehidrocortisona y 1-dehidrocortisol

Los productos finales preferidos, a saber, 1-dehidrocortisona y 1-dehidrocortisol, y sus ésteres, pueden obtenerse también de la desoxicorticosterona (Id. abajo) (4-pregнено-21-ol-3,20-diona) y de la 5-pregнено-3,21-diol-20-ona, y sus ésteres, mediante una combinación de ciertos pasos que se describen a continuación, con el paso que consiste en introducir el 17 α -hidroxilo por medio de un microorganismo 17 α -hidroxilante, como, por ejemplo, un microorganismo escogido de entre el género Trichothecium, abarcando también el proceso el paso de oxidación de un 11 α -hidroxilo o un 11 β -hidroxilo, introducido durante el proceso, cuando el producto final que se desea es la 1-dehidrocortisona.

Los diversos pasos pueden emplearse en cualquier orden de sucesión que se desee, sólo que el paso de oxidación química debe efectuarse después del proceso microbiológico que introduce el 11-hidroxilo.

Las transformaciones microbiológicas corresponden a tres tipos, y son las siguientes:

(1) introducción de una insaturación Δ^1 (es decir, un enlace doble en la posición 1,2) con oxidación simultánea de un 3-hidroxilo, cuando se halla



presente, o hidrólisis de un 3-éster seguida de oxidación del 3-hidroxilo resultante, mediante la acción de un microorganismo deshidrogenizante;

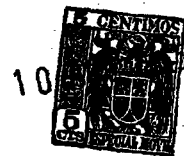
(2) introducción de un grupo 11 α -hidroxilo o un grupo 11 β -hidroxilo mediante la acción de un organismo del tipo Rhizopus nigricans o del tipo Curvularia lunata; y

(3) introducción de un grupo 17 α -hidroxilo por la acción de un cultivo de un microorganismo hidroxilante escogido de entre el género Trichothecium.

El orden de sucesión de estas tres transformaciones microbiológicas puede variarse a voluntad y puede ser (1), (2), (3); o (2), (1), (3); o (1), (3), (2); o (3), (1), (2). Si se va a producir 1-dehidrocortisona o los ésteres de la misma entonces en cualquier punto después de la introducción del grupo 11-hidroxilo se oxida el compuesto intermedio, de preferencia en la forma de su 21-éster, por ejemplo, con trióxido de cromo a bajas temperaturas, para convertir el 11-hidroxilo en oxígeno cetónico. Pero cuando el 11-hidroxilo tiene la configuración β , y se desea obtener el derivado Δ^1 de hidrocortisona, puede omitirse el paso de oxidación.

El grupo 17 α -hidroxilo se une por medio de un organismo hidroxilante escogido de entre el género Trichothecium, y de preferencia, el T. roseum, de la manera y con el aparato descritos por Meystre y otro investigador en Helvetica Chim. Acta, 37, 1548 (1954).

Después de completarse la deshidrogenación del anillo A, que puede efectuarse mediante hidrólisis parcial o completa cuando se emplean monoésteres o poliésteres, pueden obtenerse los productos de reacción de la mezcla mediante extracción con un disolvente inmiscible con agua adecuado, filtración, adsorción en un adsorbente adecuado o por uno de los demás

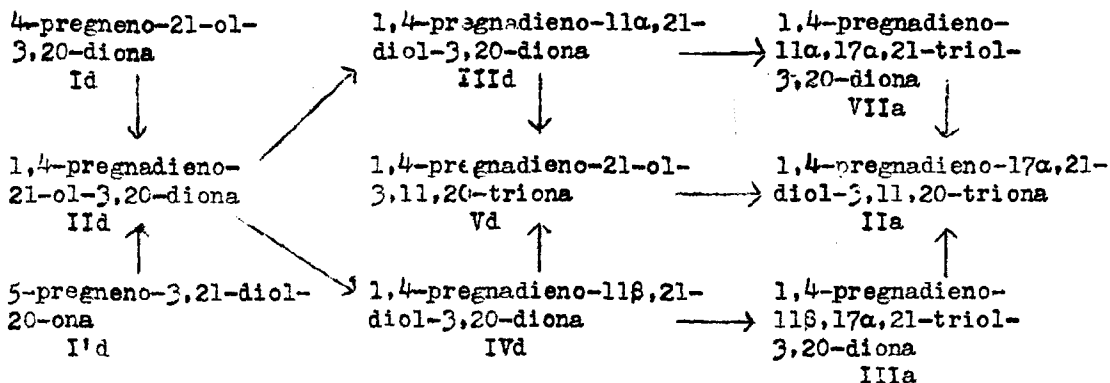


procedimientos comúnmente empleados en el arte, habiéndose indicado antes los disolventes adecuados para este fin.

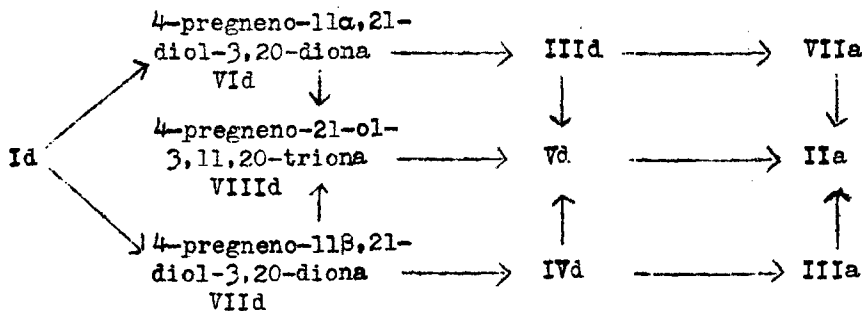
Los grupos éster pueden ser los mismos que se han indicado arriba. Los productos finales, si contienen un 21-hidroxilo libre, pueden convertirse en sus correspondientes ésteres por procedimientos conocidos, por ejemplo, pueden convertirse en ésteres alcanicos inferiores y especialmente en sus ésteres de ácido acético.

Los diferentes órdenes de sucesión en que puede llevarse a cabo esta modificación de nuestro procedimiento se ilustran por medio del siguiente plan:

VIA C:



VIA D:





10

En el plan arriba indicado, los compuestos III_d, IV_d, VI_d, VII_d, III_a y VII_a se han presentado, con fines de simplificación, como 21-alcoholes libres, pero en la práctica real preferimos esterificar el grupo 21-OH, por ejemplo, con un agente alcanoilante inferior, antes de oxidarlos para formar los compuestos V_d, VIII_d y II_a, hidrolizándose el grupo éster luego, en cualquier momento. En el caso de los compuestos VI_d y VII_d, la hidrólisis puede efectuarse simultáneamente con la introducción del enlace doble Δ^1 por medio del Corynebacterium u otro cultivo deshidronizante.

En el primer orden de sucesión (Vía C), la desoxicorticosterona (Id) se transforma fácilmente por la acción del C. simplex en 1,4-pregnadieno-21-ol-3,20-diona (II_d), que se forma también mediante tratamiento semejante de la 5-pregнено-3,21-diol-20-ona (I'_d). La hidrolización de II_d por medio del Rhizopus nigricans produce III_d. Por otra parte, la hidroxilación de II_d con Curvularia lunata produce IV_d. Uno u otro de estos procesos de hidroxilación puede llevarse a cabo con facilidad.

Como se ha indicado antes, los organismos 11 α -hidroxilantes, como el Aspergillus niger, Rhizopus arrhizus, etc. son igualmente eficaces para transformar II_d en III_d; mientras que otros organismos 11 β -hidroxilantes, tal como la Cunninghamella blakesleeana, puede emplearse para convertir II_d en IV_d. Ya sea el III_d ó el IV_d, o, de preferencia, sus 21-acetatos u otros ésteres alcanófilos inferiores pueden oxidarse, convirtiéndose en V_d o en su correspondiente éster, mediante la acción de un agente oxidante suave, tal como el reactivo piridina-ácido crómico. La hidrolización de III_d, IV_d o V_d en 17, se efectúa con el T. roseum, obteniéndose, respectivamente, VII_a, III_a o II_a. Tanto VII_a como III_a (o, de preferencia sus 21-acetatos) pueden



convertirse en IIA mediante oxidación moderada con el reactivo piridina-ácido crómico.

En el segundo orden de sucesión (Vía D), el compuesto inicial (Id) se 11-hidroxila primero y luego se deshidrogena en el anillo A, dando por resultado la producción de tres nuevos compuestos intermedios, VIId, VIIId y VIIIId. Sin embargo, el producto final sigue siendo igual, y lo mismo puede decirse de los procedimientos empleados.

D. Conversión de la 16-dehidropregnenolona y sus ésteres y la 16-dehidroprogesterona en 1-dehidrocortisona y 1-dehidrocortisol.

De acuerdo con el invento es posible también convertir la 16-dehidropregnenolona (Ia), que es relativamente barata y fácil de conseguir, y sus ésteres, lo mismo que la 16-dehidroprogesterona (IIIe) en las sustancias hormónicas corticales, de gran actividad: 1.4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona (1-dehidrocortisol) y 1.4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (1-dehidrocortisona) y sus ésteres, tales con sus ésteres de alcanolilos inferiores mediante un número relativamente pequeño de operaciones químicas y bioquímicas, en el curso de las cuales se obtienen nuevos compuestos intermedios. Estas operaciones comprenden:

- (a) conversión del sistema 3-hidroxi- Δ^5 en el sistema 3-ceto- Δ^4 (en el caso de la 16-dehidro-pregnenolona);
- (b) introducción de un 17 α -hidroxilo por conducto del 16,17-epóxido;
- (c) introducción de un grupo 21-hidroxilo por la acción de un miembro del género *Ophiobolus*, por ejemplo, *O. herbotrichus*;
- (d) introducción de un grupo 11 α -hidroxilo u 11 β -hidroxilo por la acción de un microorganismo apropiado, según se ha descrito antes; ;



(e) introducción del enlace doble Δ^1 por medio del Corynebacterium simplex u otros microorganismos deshidrogenantes que funcionan de modo análogo, según se ha descrito arriba.

La oxidación del grupo 3-hidroxilo de la 16-dehidropregnenolona (Ie) puede realizarse mediante la reacción de Oppenauer o por cuidadosa oxidación con ácido crómico a la temperatura ambiente o a una temperatura inferior a ésta, pero preferimos efectuar tal oxidación simultáneamente con la introducción del enlace doble Δ^1 mediante tratamiento con un cultivo de un microorganismo deshidrogenante o con un extracto enzimático de tal cultivo, según se ha descrito antes con más amplitud, pero tal tratamiento debe hacerse a continuación de la adición de un grupo hidroxilo en una o más de las posiciones 11, 17 y 21, pues de lo contrario los rendimientos son deficientes. Si se desea, pueden emplearse ésteres, tales como ésteres de alcanoflos inferiores de la 16-dehidropregnenolona, como compuestos iniciales para esta conversión microbiológica. La introducción del grupo 17 α -hidroxilo puede efectuarse mediante tratamiento con un perácido, tal como el ácido perftálico o el ácido perbenzoico, obteniéndose el 16,17-epóxido intermedio. Este último se somete de preferencia a la acción de yoduro de hidrógeno mezclado con ácido acético y anhídrido acético, obteniéndose el compuesto 16-yodo-17 α -hidroxi. Luego se quita el átomo de yodo mediante reflujo del compuesto disuelto en un alcohol alifático inferior, como el etanol, y que contiene una pequeña cantidad de un ácido orgánico, como el ácido acético, en presencia del catalizador de níquel de Raney. En esta reacción el hidrógeno adsorbido en el catalizador actúa reemplazando el grupo yodo con hidrógeno.



El grupo 21-hidroxilo se introduce de la manera ya descrita, sometiendo el compuesto 21-metilo a la acción de un cultivo de un miembro del género Ophiobolus; si bien la introducción del 11 α -hidroxilo o del 11 β -hidroxilo se efectúa también bioquímicamente, según se ha descrito en relación con otros compuestos indicados antes. Hemos descubierto que el grupo 11 β -hidroxilo puede introducirse en las posiciones deseadas aun en el caso de los 1,16-pregnadienos y 1,4-pregnadienos y de los 1,4,16-pregnatrienos y en el caso de los 1,4-pregnadienos, también el 11 α -hidroxilo, sin que se sature ninguno de los enlaces dobles.

El paso de deshidrogenación mediante el cual se introduce un enlace doble en la posición 1 del compuesto pregneno se efectúa sometiendo el compuesto inicial, de preferencia después de la hidroxilación antes indicada, a la acción de un organismo deshidrogenante, tal como se ha descrito arriba. Los cultivos de los microorganismos deshidrogenantes son capaces de introducir un enlace doble Δ^1 aunque la molécula del esteroide contenga ya un enlace doble en C₁₆, y también un enlace doble ligado al C₅. Como ocurre con los otros compuestos indicados antes descritos, el cultivo es capaz no sólo de introducir un enlace doble Δ^1 , sino también de oxidar un grupo 3-hidroxilo, convirtiéndolo en un grupo ceto con el traspaso simultáneo de un enlace doble 5,6 a la posición 4,5; y en ciertas condiciones se puede efectuar también la oxidación de un grupo 20-hidroxilo, convirtiéndolo en un grupo 20-ceto. Cuando el compuesto en que se opera tiene un grupo éster en las posiciones 3 ó 21, tal grupo éster se hidroliza, facilitándose generalmente la hidrólisis del grupo C₂₁-éster con un pH de 6,8 a 7,1, y una temperatura como de 26 a 29° C.



Cuando el producto final va a ser 1-dehidrocortisona preferimos introducir un grupo 11 α -hidroxilo en vez de un grupo 11 β -hidroxilo, pues el grupo 11 α -hidroxilo en general puede introducirse más fácilmente y oxidarse luego para convertirlo en un grupo 11-ceto. Cuando el 11 β -hidroxilo se introduce en la molécula esteroide, tal grupo puede retenerse inalterado en el producto final, dando el derivado Δ^1 -dehidro de la hidrocortisona, que es asimismo sumamente activo.

Los compuestos intermedios que abarca el presente invento para la preparación de los derivados Δ^1 de la cortisona, hidrocortisona y sus ésteres, y que se preparan de acuerdo con la modificación de nuestro método que ahora se describe, tienen las estructuras indicadas en las fórmulas VIII y IX (Hoja 2). En estas fórmulas, X corresponde a H₂, O o $\begin{matrix} \text{OH}(\alpha \text{ o } \beta) \\ | \\ \text{H} \end{matrix}$, mientras que R representa H, OH u O-acilo, siendo el grupo acílico en cada caso el de un ácido orgánico carboxílico, pero de preferencia un ácido alcanoico inferior, como el ácido fórmico, acético, propiónico, butírico, valérico o caproico, si bien tampoco se excluyen otros ácidos, como los ácidos alcanoicos y aromáticos sustituidos, v.g., el ácido ciclohexilacético, ciclopentilpropiónico y benzoico.

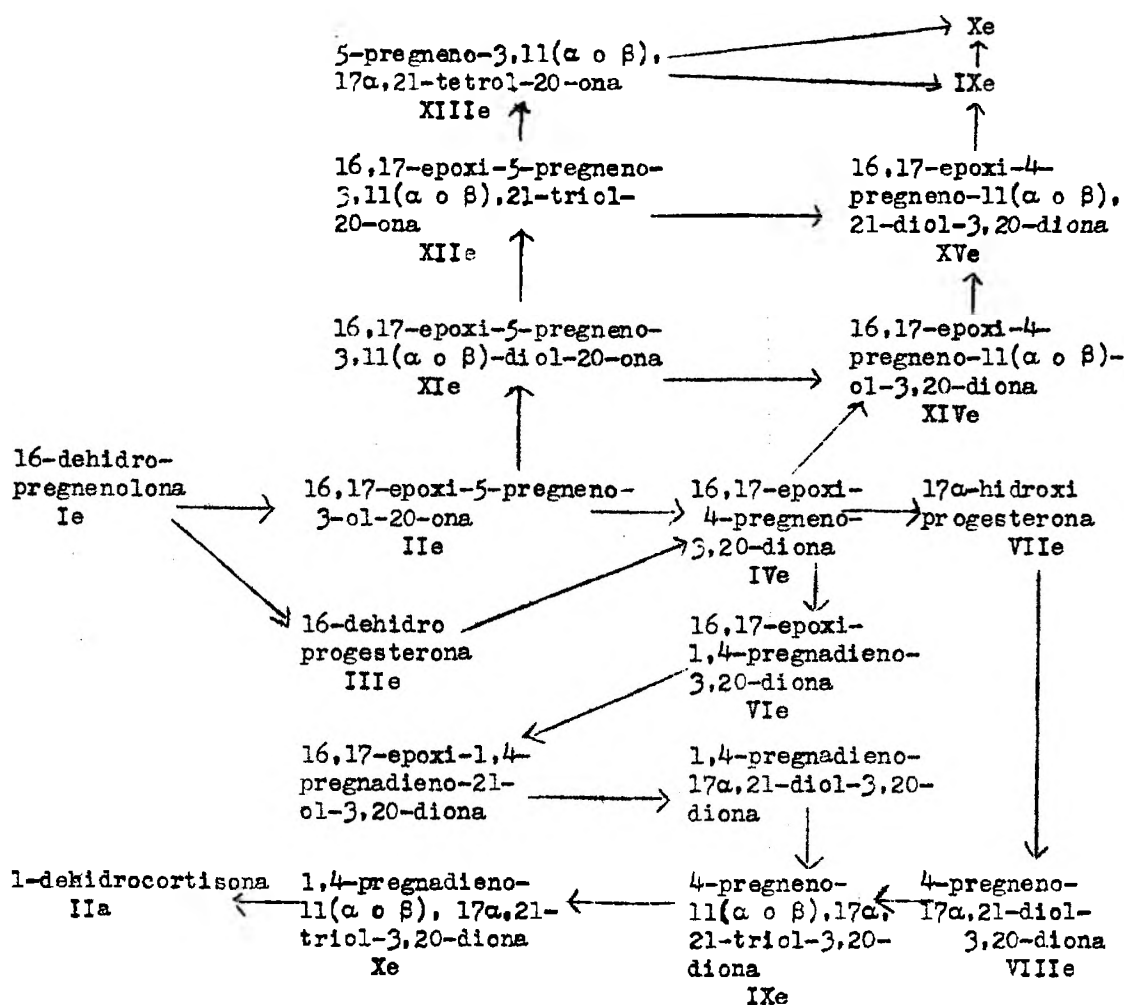
Los compuestos en que X representa un hidroxilo y R un grupo acilo se preparan esterificando la 16,17-oxido-1,4-pregnadieno-11,21-diol-3,20-diona para obtener el 21-éster como paso preliminar a la oxidación del 11-hidroxilo, después de lo cual se abre el anillo oxido con HI o HBr para formar la 16,17-halohidrina; el halógeno se quita luego con níquel de Raney o con hidrógeno en presencia de paladio en un catalizador de carbón vegetal. La hidrólisis del grupo 21-éster puede efectuarse en cualquier momento después de la



10

oxidación.

Como se ha indicado ya, los varios pasos que intervienen en esta forma de nuestro método pueden realizarse en diversos órdenes de sucesión, de los cuales se indican algunos en el siguiente plan:



La mayoría de estos pasos son completamente independientes uno de otro, de modo que el orden de sucesión de las operaciones puede cambiarse con éxito en diversidad de maneras. Pro ejemplo, el compuesto Ie puede convertirse



10

primero en 16,17-epoxi-pregnenolona (IIe), y luego en 16,17-epoxi-progesterona (IVe) o bien puede convertirse en 16-dehidroprogesterona (IIIe) y luego en IVe. Cualquiera de estos compuestos intermedios conocidos (IIe, IIIe, IVe) puede hidroxilarse en la posición 11 (ya sea α o β) y en la posición 21, y deshidrogenarse, convirtiéndose en el sistema 3-ceto- $\Delta^{1,4}$ -dieno, y estas tres transformaciones pueden efectuarse en cualquier orden de sucesión, sólo que la hidroxilación o epoxilación preferiblemente precede al tratamiento con el microorganismo deshidrogenante. El compuesto IIIe, que contiene un enlace doble Δ^{16} , se convierte en el 16,17-epóxido (IVe) mediante procedimientos usuales (ya sea empleando perácidos o peróxido de hidrógeno alcalino). El compuesto IVe se trata luego con un ácido para abrir el anillo oxido y formar 17 α -hidroxiprogesterona (VIIe). Esta última se trata con un cultivo de un microorganismo 21-hidroxilante, obteniéndose VIIIe; este compuesto puede 11-hidroxilarse para formar el compuesto IXe. El compuesto IXe se trata luego con un cultivo de un microorganismo deshidrogenante para formar el compuesto 1,4-pregnadieno (Xe), que se oxida después para transformarlo en 1-dehidrocortisona (IIa).

El compuesto Xe puede producirse 11-hidroxilando el compuesto 16,17-epoxi IIe, obteniéndose XIe, que luego se 21-hidroxila para producir el compuesto XIIe. El anillo epóxido de este último compuesto se abre para introducir el grupo 17 α -hidroxilo, como se indica en el compuesto XIIIe, que puede oxidarse químicamente para convertir el 3-hidroxilo en oxígeno cetónico, obteniéndose IXe, que luego se deshidrogena, convirtiéndose en Xe, o bien el compuesto XIIIe puede tratarse inmediatamente con el microorganismo deshidrogenante, produciendo Xe directamente.



IVe

Como indica además el diagrama, el compuesto/puede 11-hidroxilarse (XIVe) y 21-hidroxilarse para que dé el compuesto XVe. Este último se trata luego con el fin de abrir el anillo 16,17-epóxido y obtener el compuesto IXe, que luego se deshidrogena, convirtiéndose en Xe. El diagrama muestra además varias otras transformaciones que se comprenderán fácilmente por la descripción que antecede.

No importa en qué punto del proceso se abre el anillo 16,17-epóxido, por ejemplo, por medio de yoduro de hidrógeno (HI), dando el grupo 17 α -hidroxilo, o en qué punto se oxida el 11-hidroxilo para convertirse en 11-cetona, siempre que en el curso de estas reacciones cualesquiera hidroxilos presentes en las posiciones 3 y 21 estén protegidos por grupos éster que puedan quitarse posteriormente.

E. La conversión de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona y sus ésteres en 1-dehidrocortisona y 1-dehidrocortisol y sus ésteres.

Un ejemplo del empleo de un compuesto inicial que tiene ya la estructura 3-ceto-1,4-pregnadieno para la preparación de 1-dehidrocortisona y 1-dehidrocortisol y sus ésteres es la 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona (el derivado 1-dehidro del Compuesto S de Reichstein) que puede fabricarse con el Compuesto S, ya sea químicamente (véase la patente estadounidense No. 2.579.479, de 25 de diciembre de 1951, concedida a Djerassi y otros), o mediante tratamiento con un microorganismo deshidrogenante, según se ha descrito antes.

Hemos descubierto que los cultivos de microorganismos, o sus enzimas separadas, que poseen la conocida propiedad de introducir un grupo hidroxilo en la posición 11 de pregnanos saturados o que tienen una sola insaturación,



y en la posición 11 α a 11 β , son capaces de introducir tal grupo 11-hidroxilo también en los 1,4-pregnadienos, que no están substituídos en tal posición; y que el sistema conjugado de enlaces dobles del anillo A no es modificado por tales microorganismos. De ese modo pueden prepararse la 1-dehidrocortisona y el 1-dehidrocortisol de una manera simple cuando se dispone del derivado Δ^1 -dehidro del Compuesto S.

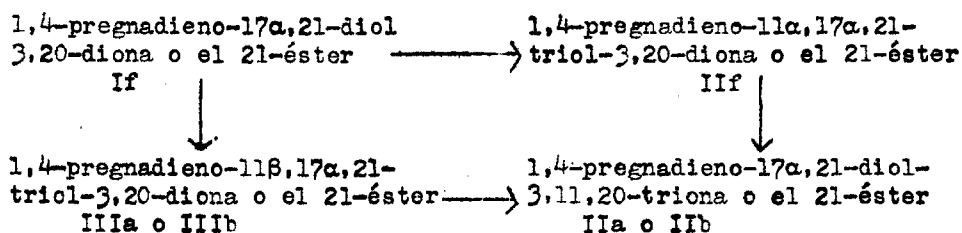
De acuerdo con la presente modificación de nuestro método, y según hemos descubierto, la 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona y sus 21-ésteres (If, que se indica luego) pueden convertirse, a pesar de la presencia de la insaturación doble en el anillo A, en el correspondiente compuesto 11-hidroxilo, mediante tratamiento con diversos microorganismos 11-hidroxilantes conocidos. Así, por ejemplo, el compuesto If puede 11 α -hidroxilarse por la acción de uno de los diversos organismos 11 α -hidroxilantes conocidos, como el Rhizopus arrhizus, Rhizopus delmar, Rhizopus nigricans, Rhizopus reflexus, Aspergillus niger, Phycomyces blakesleeanus, produciendo IIf; o bien puede 11 β -hidroxilarse mediante la acción de la Cunninghamella blakesleeana, Curvularia lunata o uno de los otros organismos 11 β -hidroxilantes conocidos, produciendo IIIa o IIIb. El producto de la 11 α -hidroxilación, IIf, en forma de su 21-éster, de preferencia el acetato, se oxida luego por la acción del ácido crómico en solución de piridina o por medio de otros agentes oxidantes moderados de potencial equivalente, convirtiéndose en 21-acetato de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (IIb), que puede hidrolizarse fácilmente, convirtiéndose en el compuesto 21-OH (1-dehidrocortisona) (IIa). El producto de la hidrólisis 11 β es el 21-éster de la 1-dehidrocortisona (IIIb), que puede oxidarse y convertirse en el 21-acetato de 1-dehidro-



10

cortisona, efectuándose a continuación la hidrólisis del 21-éster.

Las reacciones que intervienen en este procedimiento las indica el siguiente plan:



Si If está en forma del 21-alcohol libre, luego, después de la 11-hidroxiación, se convierte por intermediación en el 21-éster con anterioridad a la oxidación. El radical acilo, como se ha indicado antes, es de preferencia el del ácido acético, pero puede ser también el de otros ácidos grasos inferiores, como el ácido fórmico, propiónico, butírico, valérico o succínico, o el de ácidos aromáticos, como el ácido benzoico, salicílico, ftálico y verátrico. En el caso de los ácidos dibásicos, el éster está de preferencia en forma de un medio éster. Si se desea, el grupo acilo puede hidrolizarse, por ejemplo, mediante calentamiento con una solución alcohólica de bicarbonato de potasio.

F. Introducción de insaturación en el anillo A por medios químicos

Resulta evidente por la descripción que antecede que los microorganismos deshidrogenantes pueden efectuar una sola insaturación del anillo A o una insaturación doble, como en el caso de los compuestos 5-pregнено-3-ol (o sus ésteres, que se hidrolizan convirtiéndose en los compuestos 3-OH libres), en los que al oxidarse el grupo 3-OH y convertirse en un grupo ceto, se hace que el enlace doble 5,6 cambie a la posición 4,5. Sin embargo, pueden



introducirse también uno o los dos enlaces dobles en el anillo A por medios puramente químicos.

Por ejemplo, hemos visto que los 21-ésteres de la pregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (Ig. indicado abajo) y asimismo el 21-éster y los 11,21-diésteres de la pregnano-11(α o β),17 α ,21-triol-3,20-diona (compuesto IIg, 11 β -OH) puede halogenarse en las posiciones 2 y 4 mediante tratamiento con un halógeno que tenga un peso atómico superior al del flúor, para producir los correspondientes 2,4-dihalogenuros con rendimiento satisfactorio. La esterificación, especialmente del 11 β -hidroxilo, aumenta el rendimiento. La halogenación en las dos posiciones puede llevarse a cabo en uno o en dos pasos, y en este último caso, pueden emplearse halógenos diferentes, como el cloro y el bromo. El dihalogenuro se trata luego con un agente deshidrohalogenante a fin de introducir dos enlaces dobles en el anillo A en las posiciones 1,2 y 4,5, produciéndose IIb, IIIb (21-éster u 11 β ,21-diéster), o VIIb (Hoja 1). El éster dieno resultante, si se desea, puede hidrolizarse entences de manera conocida con un ácido o una base, a fin de producir el alcohol primario de los dienos (IIa, IIIa o VIIa).

Preferimos emplear el bromo como agente halogenante y por lo tanto esta modificación del invento se describirá más ampliamente en relación con el empleo de tal halógeno. Al reaccionar con el bromo, se obtienen los 2,4-dibromuros de los 21-ésteres de la pregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona y de la pregnano-11,17 α ,21-triol-3,20-diona. Preferimos efectuar la deshidrobromación mediante reflujo con colidina, seguida de separación cromatográfica o de otra clase del 21-éster de 1,4-dieno. En lugar de la colidina pueden emplearse otras bases orgánicas de alto punto de ebullición, como la

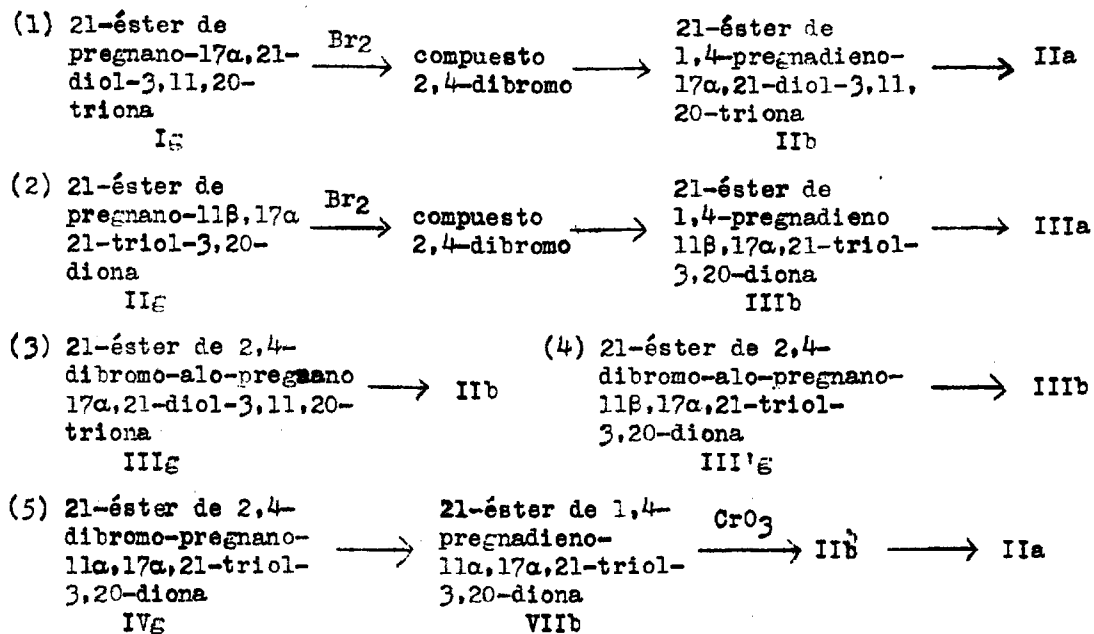


quinaldina y la dimetilanilina.

Nuestro método es aplicable a la serie del pregnano alo, así como a la serie normal. Así, por ejemplo, la dibromación del 21-acetato de la alo-pregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona y del 21-acetato de la alo-pregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona, produce los correspondientes dibromuros (IIIg y III'g) que al deshidrobromarse da los 21-acetatos de los dienos II y III respectivamente.

Los dienos de los esteroides 11 α -hidroxilados pueden prepararse de la misma manera. La dibromación del 21-acetato de la pregnano-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona da el correspondiente 2,4-dibromuro (IVg) que, al deshidrobromarse produce el 21-acetato de 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona (VIIb). La oxidación de VIIb da IIb (R = acétilo) con buen rendimiento. La hidrólisis de IIb produce IIa.

Las reacciones que intervienen en este procedimiento químico se ilustrar típicamente por medio de las siguientes ecuaciones:



Los nuevos compuestos intermedios obtenidos mediante este procedimiento químico están representados por la fórmula XI (Hoja 2), en donde X es =O, o OH(α o β) y R es H o un radical alcanófilo inferior. El núcleo del pregnano puede ser el normal o tener la configuración alo. Tanto los 11 α -hidroxilos como los 11 β -hidroxilos pueden oxidarse para formar oxígeno cetónico, antes o después de la hidrólisis. Si bien pueden emplearse diversos agentes oxidantes hemos visto que el ácido crómico es un agente eficaz y barato para este fin.

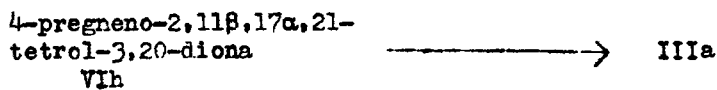
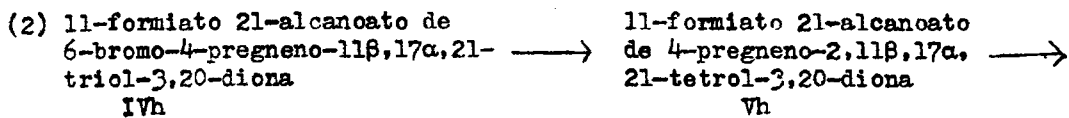
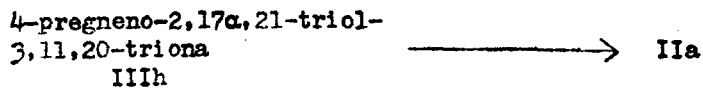
La bromación del compuesto inicial, que es de preferencia un 21-éster, se lleva a cabo en ácido acético u otro disolvente orgánico virtualmente anhidro, que sea inerte respecto del bromo. No es necesario purificar el dibromuro así formado antes de la reacción con el agente deshidrobromante que, como se ha indicado antes, es de preferencia una base orgánica de alto punto de ebullición, siendo la colidina la más adecuada por regla



general. El éster de doble insaturación resultante puede, si se desea, hidrolizarse entonces con una base de metal alcalina, como carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos de metal alcalino de manera conocida en un disolvente neutro adecuado, como el alcohol metílico y el alcohol etílico.

Hemos mostrado antes que el enlace doble 1,2 puede introducirse en las 4-pregнено-3-onas cuya molécula tiene un grupo hidroxilo en otra parte, mediante tratamiento con microorganismos deshidrogenantes. De acuerdo con otro distintivo del presente invento, tal enlace doble 1,2 puede también introducirse en los pregnenos no saturados por medios químicos; además, el enlace doble 4,5 puede también introducirse por reacciones puramente químicas en los 3-ceto pregnenos en los que el enlace doble está situado en la posición 1,2.

Para efectuar la introducción del enlace doble 1,2 en los 4-pregнено-3-onas, podemos partir de la 6-bromo-4-pregнено-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (Kendall et al., J. Biol. Chem., 197, 261 (1952)) y del 11-formiato 21-acetato de 6-bromo-4-pregнено-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona (de la bromación, de acuerdo con Kendall, del 11-formiato 21-acetato de 4-pregнено-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona) que se tratan con una sal de un metal alcalino de un ácido alcanoico inferior, de preferencia acetato de sodio o acetato de potasio. En esta forma se preparan los respectivos 2-alcanoatos. Puede emplearse una hidrólisis moderada con ácidos o bases en soluciones acuosas o alcohólicas para convertir los 2-alcanoatos en los 2-hidroxiesteroides. La deshidratación mediante eliminación del 2-hidroxilo junto con el hidrógeno en el carbono 1 efectúa la introducción del enlace doble 1,2. Las reacciones que intervienen se indican en la siguiente serie de ecuaciones:

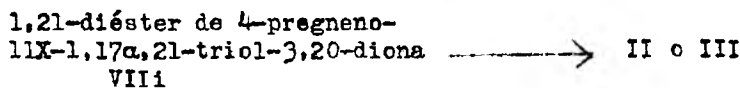
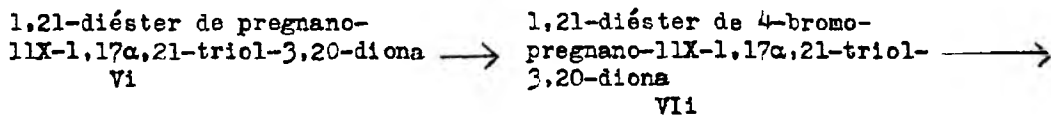
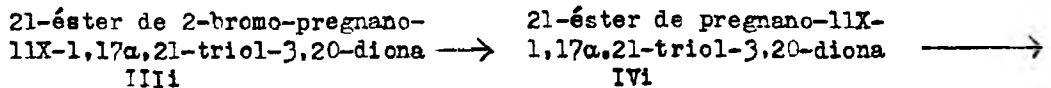
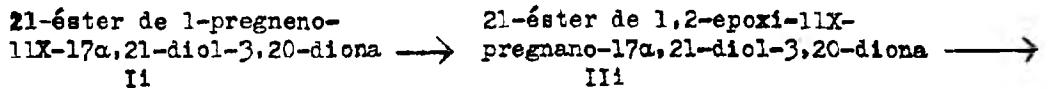


Las fórmulas estructurales de IIIh y VIh se indican en XII y XIII.

Hoja 2. En estas fórmulas, R representa hidrógeno o un radical alcánico inferior ácido. En la fórmula XIII, el grupo 11 β -OH puede reemplazarse por OR.

En lugar de deshidratar el compuesto IIIh o VIh, los 2,21-diésteres pueden someterse a la acción de un agente deshidratante. Así, por ejemplo, el 2,21-diacetato del compuesto IIIh puede tratarse con bromuro de hidrógeno en ácido acético, obteniéndose el 21-acetato de 1-dehidrocortisona.

También puede introducirse el enlace doble 1,2 por medio de un sustituyente hidroxilo o aciloxi en el carbón 1 de los 21-ésteres de la cortisona e hidrocortisona, por ejemplo. La estructura de estos compuestos se indica en XIV (Hoja 2), y los compuestos pueden prepararse a base de 1-pregnenos mediante la siguiente serie de reacciones, en las que X corresponde a =O o H,OH; y Y representa OH u O-acilo:



Los grupos éster de las ecuaciones arriba indicadas son de preferencia los de radicales alcanóicos inferiores. Por ejemplo, al convertir el 21-acetato de 1-pregнено-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (Mattox y Kendall, J.B.C., 188, 287 (1951)) en 4-pregнено-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona y el correspondiente 1,21-diacetato, el compuesto inicial (Ii) se epoxida por medio de uno de los bien conocidos agentes epoxidantes, tal como el ácido perbenzoico, el ácido monoperftálico, el ácido peracético, etc. En este paso se emplea de preferencia el ácido perbenzoico o el ácido monoperftálico en un medio inerte, tal como cloroformo o cloruro de metileno. El producto de epoxidación (IIIi) se trata luego con un ácido halohídrico anhidro, tal como el bromuro de hidrógeno en cloroformo, yoduro de hidrógeno en ácido acético glacial, etc. La halohidrina resultante (IIIi), de preferencia la yodohidrina, pero también la bromohidrina, se deshalogena luego con níquel de Raney en ácido acético, o con hidrógeno y un catalizador de paladio en carbonato de calcio, obteniéndose la pregnano-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona (IVi). El compuesto IVi se acila con un anhídrido de un ácido alcanóico



10

inferior o cloruro ácido, tal como el anhídrido acético en solución de piridina, para obtener VI. De modo alternativo puede prepararse el compuesto VI invirtiendo el orden de los últimos dos pasos. La bromación y deshidrobromación de VI produce el 1,2-diacetato de 4-pregнено-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona (VII i) deseado. La bromación se efectúa de preferencia con bromo en presencia de acetato de sodio para regular la acidez. La deshidrobromación se efectúa más cómodamente con la ayuda de semicarbazida. La semicarbazona resultante se convierte en VIIIi por la acción del ácido pirúvico.

De manera semejante puede convertirse el compuesto IVi en 21-acetato de 4-pregнено-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona (VIIIi), omitiendo el paso de acilación. La bromación en presencia de acetato de sodio, seguida del mismo procedimiento de deshidrobromación efectúa la transformación deseada.

Los compuestos 11 β -hidroxi correspondientes se preparan de la misma manera, partiendo del 21-acetato de 1-pregнено-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona.

Los compuestos VIIIi, VIIIi y los compuestos 11 β -hidroxi conexos pueden tratarse con un ácido o base, tal como alúmina, Triton B (hidróxido de tetrametilamonio), y otras sustancias semejantes, a fin de dividir el 1-substituyente, obteniéndose las poderosas sustancias antiartríticas II y III (Hoja 1).

G. Substitución del halógeno en la posición 9 α

No es necesario para la fabricación de los compuestos de las fórmulas IV y V que los compuestos iniciales contengan el átomo de halógeno (flúor, cloro o bromo) en la posición 9 α . Este substituyente puede introducirse en la molécula del esteroide después de la deshidrogenación del anillo A.



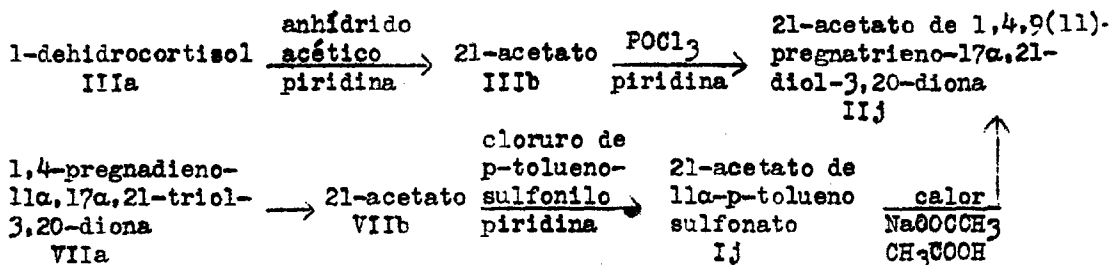
10

La sustitución se realiza comenzando con el compuesto 11(α o β)-hidroxi-1,4-pregnadieno y convirtiéndolo en 1,4,9(11)-pregnatrieno, que puede tratarse luego de diversas maneras para introducir el halógeno deseado en la posición 9 α y un 11 β -hidroxilo, al mismo tiempo. El 11-hidroxilo puede oxidarse entonces en condiciones moderadas para reemplazarlo con un oxígeno cetónico y formar la 9 α -halógeno-1-dehidrocortisona.

Preferimos emplear como compuesto inicial ya sea la 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona (III) o el correspondiente compuesto 11 α -hidroxi (VII) o sus 21-ésteres. El compuesto inicial se esterifica primero (IIIb) en la posición 21 (si no es ya un 21-éster) por tratamiento con un anhídrido ácido en piridina o bien utilizando el cloruro ácido a fin de producir, por ejemplo, un éster de alcanofilo inferior, tal como el 21-acetato o propionato o cualquier otro éster adecuado, como el 21-ciclopentilpropionato, 21-enactato y otros semejantes. La deshidratación para efectuar la introducción del enlace doble 9,11 se realiza cómodamente en el caso del compuesto IIIb por la acción del oxiclорuro de fósforo en piridina. Sin embargo, preferimos formar el 1,4,9(11)-trieno tratando el 21-éster del compuesto 11 α -hidroxi (VIIb) con cloruro de p-toluenosulfonilo en piridina, a fin de producir el 11 α -tosilato correspondiente (11 α -p-toluenosulfonato) (Ij). Tratando este último compuesto con un compuesto básico, tal como el acetato de sodio en ácido acético (o con acetato de potasio, propionato de litio y otros semejantes), se efectúa la eliminación del ácido p-toluenosulfónico, con introducción del enlace doble 9(11). En lugar del p-toluenosulfonato puede introducirse, como compuesto intermedio, el correspondiente metanosulfonato, bencenosulfonato u otros ésteres semejantes del ácido



sulfónico. Estas reacciones se indican en el siguiente esquema:



La estructura de los 1,4,9(11)-pregnatrienos, de los que es un ejemplo el compuesto IIj, se indica en XV (Hoja 2), en donde R representa H o acilo, de preferencia un alcanofilo inferior.

El trieno (IIj) se trata ahora con un compuesto que proporciona un bromión, tal como N-bromacetamida o N-bromosuccinimida en ácido perclórico u otro ácido fuerte, como el ácido sulfúrico. De ese modo se obtiene el derivado 9 α -bromo (IIIj). Si se desea introducir flúor o cloro, como sustituyente en la posición 9 α , el compuesto 9 α -bromo (la bromohidrina, IIIj) se deshalogena por la acción de una base débil, tal como el acetato de potasio o de sodio en un disolvente relativamente neutro, como la acetona o el alcohol, obteniéndose de ese modo el epóxido IVj. Este último se somete a la acción de fluoruro de hidrógeno anhidro, con lo cual se abre el anillo epóxido y se introduce un átomo de flúor 9 α , junto con un grupo 11 β -hidroxilo, obteniéndose el compuesto V (Z = F). Empleando cloruro de hidrógeno anhidro se forma el 9 α -cloro análogo. Este último se puede hidrolizar para dividir el grupo 21-acilo y producir el 21-alcohol, por medio de ácido acuoso.

El compuesto 9 α -fluoro puede someterse a oxidación moderada, por ejemplo con ácido crómico en piridina a la temperatura ambiente, para reemplazar



10 A

el 11 β -hidroxilo con oxígeno cetónico, obteniéndose el compuesto IVb, que puede hidrolizarse luego con ácido, para producir la 9 α -fluoro-1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona.

Se prefiere emplear la 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona, en vez del compuesto 11 β -hidroxi correspondiente como compuesto inicial, produciéndose este nuevo compuesto 11 α -hidroxi de la manera antes descrita. Importa que, con anterioridad al tratamiento con el cloruro de p-toluenosulfonilo, el 21-hidroxilo se proteja selectivamente antes de esterificarse el grupo 11 α -hidroxilo con un derivado del ácido sulfónico. Hemos visto que cuando no se protege el grupo 21-hidroxilo contra la acción de un haluro de sulfonilo, como el cloruro p-toluenosulfonilo, se producen mezclas no rectificables. En la esterificación de la posición 21 preferimos, además, emplear un agente acilante suave, como los anhídridos antes descritos, con lo cual se obtiene una verdadera selectividad y el 11-hidroxilo queda sin esterificar.

H. Fabricación de ésteres con aumento en la duración de su actividad.

El invento tiene también en mira la preparación de los compuestos de las fórmulas II a V en forma de 21-ésteres que no se metabolizan rápidamente en el cuerpo como los compuestos 21-alcohol libres, de modo que la actividad fisiológica de los compuestos se mantiene durante un período de tiempo más prolongado y de ese modo se disminuye considerablemente la frecuencia de las inyecciones.

Los ácidos cuyos ésteres poseen, según se ha visto, un período de actividad más largo, son el ácido ciclohexanocarboxílico, el ácido 4-metil-ciclohexanocarboxílico, el ácido 3-etil-ciclohexilacético, el ácido ciclo-



10

hexilpropiónico, el ácido ciclopentilpropiónico, el ácido fenilacético, el ácido trimetilacético, el ácido t-butilacético, el ácido butoxibutírico, el ácido etoxicaproico, el ácido metiltiovalérico, el ácido isopropiltioacético, el ácido feniltioacético, el ácido caproico, el ácido isobutírico, el ácido enántico, el ácido isocaprílico, el ácido ciclohexilcaproico, el ácido undecilénico, el ácido 2-etilbutírico, el ácido tólúico y el ácido etoxibenzoico.

Hemos visto en particular que los ácidos de los grupos de los ácidos ariloxialcanoico y furoico producen una duración de la actividad hormonal notablemente superior, proporcionando así una terapéutica más eficaz, cómoda y útil que la que puede obtenerse con las hormonas madres. Ácidos típicamente útiles de estos grupos son: el ácido fenoxiacético, el ácido p-clorofenoxiacético, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, el ácido 5-clorofuroico, el ácido 5-metilfuroico, el ácido 5-bromofuroico, el ácido 4-bromofenoxiacético, el ácido 4-metilfenoxiacético, el ácido 4-metoxifenoxiacético, el ácido 4-t-butilfenoxiacético, el ácido 5-t-butilfuroico, el ácido furoico y el ácido fenoxipropiónico.

Se ha visto que los ésteres de los ácidos mencionados arriba aumentan la duración de la actividad, no sólo de la 1-dehidrocortisona, 1-dehidrocortisol, dehidro-9 α -halógeno-cortisona y 1-dehidro-9 α -halógeno-cortisol (en los que el átomo del halógeno es cloro o bromo), sino también la de los compuestos intermedios fisiológicamente activos, como la 1-dehidrocorticosterona, 1-dehidro-11-desoxi-corticosterona, 1-dehidro-11-desoxicortisona, 1-dehidro-17-desoxicortisona y 1-dehidro-aldosterona.



Como ejemplos del aumento de la duración de la actividad, se ha visto que en ratones adrenalectomizados, una inyección de 0.25 mg. de 1-dehidrocortisona o de 1-dehidrocortisol o sus acetatos, causa eosipenia por espacio de dos a cuatro días. Una inyección similar de 21-(2',4'-diclorofenoxi-acetato) de 1-dehidrocortisona dura de 12 a 20 días; su 21-(5'-bromofuroato) dura de 10 a 18 días; el 21-furoato de 1-dehidrocortisol dura de 10 a 16 días; y su 21-(4'-t.-butilfenoxiacetato) dura de 14 a 20 días.

En otra prueba, una inyección de 21-(5'-clorofuroato) de 1-dehidrocortisona administrada a ratas hizo que el peso de la glándula timo disminuyera durante un período cinco a ocho veces más largo que con la hormona libre; mientras que el 21-(4'-terciario-butilfenoxiacetato) de 1-dehidrocortisol provocó la involución del timo un tiempo cuatro a seis veces más largo que la hormona libre. Estas pruebas son indicaciones normales de la actividad glucocorticoide (es decir, antiartrítica). De igual manera la actividad mineralo-corticoide de las hormonas se aumenta merced a la esterificación con estos ácidos. Así, por ejemplo, el 21-(4'-clorofenoxiacetato) de 1-dehidro-11-desoxicorticosterona mantiene la vida de ratones adrenalectomizados cinco a siete veces más tiempo que la hormona libre, y el 21-furoato de 1-dehidroaldosterona mantiene la vida por términos seis a diez veces más largos que la correspondiente hormona.

En la terapéutica humana, se observe la misma protección de la hormona contra la destrucción, con la prolongación concomitante de la duración del nivel de actividad terapéutica. Así, por ejemplo, una o dos inyecciones por semana de 21-furoato de 1-dehidrocortisona o de



21-(4'-t.-butilfenoxiacetato) de 1-dehidrocortisol reemplaza 7 medicaciones diarias con la hormona libre. De manera semejante, inyecciones de 50 a 100 mg. de 21-(5'-t.-butilfuroato) de 1-dehidrocortisol o de 21-(4'-clorofenoxiacetato) de 1-dehidrocortisona tiene una actividad que dura de 7 a 10 días, comparada con la eficacia de un día de la hormona libre.

Ejemplos específicos de 21-ésteres de derivados 9 α -halógeno de la 1-dehidrocortisona y del 1-dehidrocortisol son los 21-(2'-furoato), 21-[(5'-t.-butil)-2'-furoato], 21-fenoxiacetato y 21-(2',4',5'-triclorofenoxiacetato).

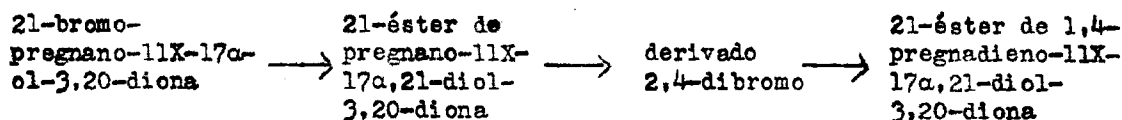
Los ésteres pueden administrarse de la manera usual en que se administran las hormonas corticales. Así, por ejemplo, pueden prepararse en forma de tabletas con material inerte para administración oral o sublingual. Otra forma comúnmente empleada es la de un unguento o loción para uso tópico. Generalmente el modo más eficaz de administración es mediante inyección intramuscular, subcutánea o intra-articular, de soluciones o suspensiones en aceite o medios acuosos.

Los ésteres pueden prepararse de varias maneras, siendo la más simple la esterificación de las correspondientes hormonas libres, por ejemplo, por tratamiento del hidroxisteroide con el correspondiente anhídrido ácido o cloruro en presencia o en ausencia de una base; o bien mediante tratamiento del hidroxisteroide con el ácido libre en presencia de un catalizador ácido en condiciones de deshidratación.

Los ésteres pueden prepararse también mediante esterificación de los compuestos intermedios en la preparación de las hormonas, empleando estos más bien que el acetato como grupos protectores. Así, por ejemplo, en la



preparación de la 1-dehidrocortisona y del 1-dehidrocortisol por los métodos químicos descritos, puede formarse a través de intermedios el 21-éster de uno de los ácidos antes mencionados que producen absorción retardada, antes de la introducción del halógeno (generalmente bromo) en la posición 2 y 4, llevándose a cabo este procedimiento cómodamente mediante reacción del compuesto 21-bromo del esteroide con una sal metálica del ácido. Esto se ilustra por medio de la ecuación siguiente, en la que ha de entenderse que el compuesto pregnano inicial puede ser de configuración normal o de configuración alo:



En esta ecuación, X representa O ó H.OH; mientras que el éster es el de cualquiera de los ácidos antes descritos que aumenta la duración de la actividad del dieno.

Con fines de ilustración se presentan procedimientos detallados para llevar a cabo las diversas realizaciones del invento en los ejemplos que se dan a continuación, describiéndose primero la deshidrogenación del anillo A con ayuda de microorganismos.

Ejemplo 1

Conversión del Compuesto E en 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona

De una solución de 30 g. de extracto de levadura (Difco) en 3,0 litros de agua del tubo que contiene 13,2 g. de fosfato monobásico de potasio y 26,4 g. de fosfato dibásico de sodio (pH de la solución, 6,9) se retiran 27 porciones de 100 ml. cada una, se colocan en frascos de Erlenmeyer de 300 ml. y se esterilizan en una autoclave durante 15 minutos a una presión de vapor de



1,055 kilogramo (120° C.) Después de poner el caldo en la autoclave y enfriarlo, se pone en cada frasco una suspensión de Corynebacterium simplex (A.T.C.C. 6046). Los frascos se agitan luego en una mesa agitadora a 220 revoluciones por minuto y a una temperatura de 28° C. durante 24 horas.

En cada uno de los 27 frascos de Erlenmeyer se colocan 150 mg. del Compuesto E de Kendall. Los frascos y sus contenidos se esterilizan luego a una presión de vapor de 1,055 kg. (120° C.). Se agregan luego a cada frasco 5,0 ml. de etanol. El cultivo bacteriano de 24 horas se traslada luego en condiciones asépticas y las suspensiones resultantes se agitan en una mesa agitadora a 220 revoluciones por minuto y a 28° C. durante 48 horas. El pH final es de 7,2.

Se reúnen los contenidos de todos los frascos y se hace la extracción con un total de 9,0 litros de cloroformo en tres porciones iguales. Los extractos reunidos se concentran hasta dejar un residuo, que se cristaliza de una solución de acetona y hexano. Se obtiene 1,1 g. de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona, con punto de fusión de 210 a 215° (desc.). Varias recristalizaciones más elevaron el punto de fusión a 230 - 232° (desc.);

$[\alpha]_D^{25} + 175,3^\circ$ (dioxano); $\epsilon_{238} 15,400$ (metanol).

Análisis calculado para C₂₁H₂₆O₅: C, 70,37; H, 7,31. Se encontró: C, 70,38; H, 7,67.

21-acetilación de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona

A una solución de 0,5 g. de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona en 5 ml. de piridina anhidra se agregaron 3 ml. de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en reposo de un día para otro a la temperatura ambiente, y luego se diluyó con hielo y agua. El precipitado resultante se



filtró y se volvió a cristalizar de una solución de acetona y hexano. Se obtuvieron 0,55 g. de 21-acetato de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona, con punto de fusión de 227 a 228° d. Después de varias recrystalizaciones de una solución de acetona y hexano, el producto tuvo un punto de fusión de 233 a 236° (desc.).

Ejemplo 2

Conversión del Compuesto F en 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona

Se trataron 150 mg. del Compuesto F de Kendall en cada uno de los 27 frascos de Erlenmeyer, según se describe en el Ejemplo 1. El pH al final del período de agitación fué de 7,0.

Se reunió el contenido de todos los frascos y se hizo la extracción con un total de 9,0 litros de cloroformo en tres porciones iguales. Se concentraron luego los extractos reunidos hasta quedar un residuo, que pesaba 3,75 g. El punto de fusión del residuo fué de 227 a 232°. De 2,75 g. de esta materia cruda al diluirse con 50 ml. de acetona y enfriarse se obtuvieron por filtración 1,35 g. de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona, con punto de fusión de 237 a 239° (desc.). Del agua madre puede obtenerse una cantidad adicional del producto. La recrystalización de una solución de acetona elevó el punto de fusión a 239 - 241° (desc.). $[\alpha]_D^{25} + 107^\circ$ (dioxano);

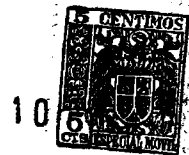
$E_{243}^{14.600}$ (metanol).

Análisis: Calculado para $C_{21}H_{28}O_5$; C, 69,97; H, 7,83.

Se encontró: C, 70,24; H, 8,13.

21-acetilación de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona

A una solución de 0,85 g. de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona en 5 ml. de piridina se agregaron 3 ml. de anhídrido acético. Se dejó reposar



la mezcla de reacción de un día para otro a la temperatura ambiente y luego se diluyó con agua helada. El precipitado resultante se filtró de la mezcla y se cristalizó nuevamente de una solución de acetona y hexano. Se obtuvieron 0,45 g. de 21-acetato de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona, con punto de fusión de 235-239°. Al recrystalizarse, el punto de fusión aumentó a 237-239°; $[\alpha]_D^{25} + 116^\circ$ (dioxano); ϵ_{243} 15.000 (metanol)

Análisis: Calculado para $C_{29}H_{30}O_6$: C, 68,63; H, 7,51.

Se encontró: C, 68,62; H, 7,78.

Ejemplo 3

Conversión del Compuesto S en 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona

Cien ml. de un concentrado al 1,0 % de extracto de levadura, que contenía 0,2 M de KH_2PO_4 y 9,0 ml. de 0,2 M de Na_2HPO_4 , se esterilizó en la forma antes indicada y se inoculó con una suspensión al 1,0 % de Corynebacterium simplex (A.T.C.C. 6946) procedente de un cultivo en caldo de 24 horas. El cultivo recién inoculado se incubó y se agitó (en una mesa agitadora) durante 20 horas a una temperatura de 28° C. Después de la incubación, se trasladó el cultivo en caldo, en condiciones asépticas, a un segundo frasco de Erlenmeyer, estéril, de 300 ml., que contenía 150,0 mg. del Compuesto S de Reichstein, estéril, (4-pregneno-17 α ,21-diol-3,20-diona) en 5,0 ml. de etanol o acetona. El pH de la mezcla de reacción era de 7,0. El cultivo bacteriano que contenía el esteroide y el disolvente se incubó y se agitó por espacio de 48 horas, a una temperatura de 28° C. El pH final de la mezcla de reacción fué de 7,2 a 7,4. Se hizo luego la extracción completa del cultivo con cloroformo. Se reunieron los extractos y la mezcla se concentró en baño de vapor hasta la sequedad. El extracto crudo pesaba 196,0 -



El extracto crudo total se diluyó con metanol y se obtuvieron 80 mg. de un sólido cristalino, con punto de fusión de 246 a 250°. Después de dos cristalizaciones de una solución acetona se obtuvo un producto con punto de fusión de 246 a 249° desc., $[\alpha]_D^{25} + 76^\circ$ (CHCl₃), $\epsilon_{245} 15.500$ (C₂H₅OH).

Análisis: Calculado para C₂₁H₂₈O₄: C, 73,22; H, 8,19

Se encontró: C, 73,56; H, 8,40.

El espectro infrarrojo y el análisis químico indicaron que el producto es 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona.

21-acetilación de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona

A una solución de 0,25 gramos de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona en 2 ml. de piridina se agregó 1 ml. de anhídrido acético. Se dejó reposar la mezcla de reacción de un día para otro a la temperatura ambiente y luego se diluyó con hielo y agua. El precipitado resultante se filtró y se cristalizó nuevamente de una solución de cloruro de metileno y hexano, obteniéndose 0,20 g. de 21-acetato de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona, con punto de fusión de 226,5 a 228°.

Ejemplo 4

Conversión del Compuesto S en 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona y 1,4-pregnadieno-17 α ,20,21-triol-3-ona

Cien ml. de un medio que consistía en 1 % de materias solubles de pescado, 0,1 % de extracto de levadura, 9,0 ml. de 0,2 M de KH₂PO₄ y 9,0 ml. de 0,2 M de Na₂HPO₄ se esterilizaron según se ha descrito antes y se inocularon con una suspensión de Corynebacterium simplex de un cultivo en caldo, de 24 horas. El cultivo recién inoculado se incubó y se agitó (en una mesa agitadora) durante 20 horas a una temperatura de 28° C. Después



de la incubación, el cultivo en caldo se trasladó en condiciones asépticas a un segundo frasco de Erlenmeyer, estéril, de 300 ml., que contenía 150 mg. del Compuesto S estéril en 5,0 ml. de etanol. El pH de la mezcla de reacción era de 6,9. El cultivo bacteriano que contenía el esteroide y el disolvente se incubó y se agitó durante 48 horas a una temperatura de 28° C. El pH final fué de 7,3. Se hizo la extracción del cultivo con 2 litros de cloroforno en 5 porciones iguales, se reunieron los extractos y la mezcla se concentró en baño de vapor.

El residuo crudo se absorbió en cloruro de metileno y se cromatografió sobre Florisil. Se aislaron del cromatograma: materia inicial (15 mg.), 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona (30 mg.) y 1,4-pregnadieno-17 α ,20,21-triol-3-ona (90 mg.). El triol se recrystalizó de una solución de acetona y tenía un punto de fusión de 195 a 196°, $[\alpha]_D^{25} + 33^\circ$ (metanol).

Análisis: Calculado para C₂₁H₃₀O₄: C, 72,80; H, 8,75.

Se encontró: C, 72,79; H, 9,08.

En lugar del etanol pueden emplearse otros disolventes orgánicos solubles en agua que no sean tóxicos para el microorganismo, tal como la acetona, mezclas de etanol y acetona, y otros por el estilo.

Ejemplo 5

Reacción del 5-pregнено-3 β ,20-diol

Cien ml. de concentrado de extracto de levadura al 0,1 %, que contenía 9,0 ml. de 0,2 M de KH₂PO₄ y 9,0 ml. de 0,2 M de Na₂HPO₄ se esterilizaron en una autoclave, en un frasco de Erlenmeyer de 300 ml. Después de estar en la autoclave durante 15 minutos a una presión de 1,055 kilogramos (120° C.) se dejó en reposo el frasco a la temperatura ambiente. El frasco se



inoculó luego con una suspensión de Corynebacterium simplex. El frasco inoculado se incubó y se agitó (en una mesa agitadora) durante 24 horas a una temperatura de 28° C.

Un segundo frasco de Erlenmeyer, de 300 ml., que contenía 150 mg. de 5-pregнено-3 α ,20-diol, se esterilizó en una autoclave durante 15 minutos a una presión de 1,055 kilogramos (120° C.). A este frasco se agregaron 5,0 ml. de acetona o etanol para disolver el esteroide. El cultivo de 24 horas de desarrollo de Corynebacterium simplex se trasladó en condiciones asépticas a un frasco que contenía el esteroide, y se agitó la mezcla de reacción (en una mesa agitadora) durante 36 horas a una temperatura de 28° C. Al final del período de transformación el pH era de 7,1 a 7,2.

Luego se hizo la extracción de la mezcla con cloroformo, se reunieron los extractos al cloroformo y la solución resultante se concentró hasta obtenerse un residuo (de 0,20 g.). El extracto crudo se cristalizó de una solución de éter, obteniéndose el producto en forma de prismas largos, con punto de fusión de 135 a 138°. Dos cristalizaciones de una solución de cloruro de metileno y hexano produjo 0,06 g. de 1,4-pregnadieno-3,20-diona, con punto de fusión de 152 a 153° C., $[\alpha]_D^{25} + 122^\circ$ (CHCl₃), $n_D^{25} 15,000$ (C₂H₅OH). El espectro infrarrojo indicaba la presencia de un sistema $\Delta^{1,4}$ -dieno-3-ona, otro carbonilo (anillo de 6 miembros o cadena lateral) y ausencia completa de hidroxilo.

Ejemplo 6

1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-dieno

Cien ml. de un cultivo en caldo, que contenía una concentración de extracto de levadura al 0,1%, 9,0 ml. de 0,2 M de KH₂PO₄ y 9,0 ml. de



0,2 N de Na_2HPO_4 se inoculó con 1 ml. de un cultivo en caldo de 24 horas de Corynebacterium simplex. El frasco se incubó durante 24 horas a una temperatura de 28°C .

Ciento cincuenta ml. de 3,21-diacetato de 5-pregneno- $3\beta,17\alpha,21$ -trio-20-ona en 50 ml. de acetona, en un frasco de Erlenmeyer de 300 ml. se inocularon con un cultivo de 24 horas y se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 28° a 30°C .

Se extrajeron los productos con cloroformo, se concentraron los extractos al cloroformo hasta un pequeño volumen y se cromatografiaron sobre Florisil. El orden de elución es el siguiente: primero, materia inicial sin reaccionar (75 mg.), luego 21-acetato del Compuesto S (15 mg.) y finalmente 1,4-pregnadieno- $17\alpha,21$ -diol-3,20-diona (30 mg.). Los productos se identificaron todos por comparación de los espectros infrarrojos de los mismos con los de muestras auténticas.

Mediante el empleo del mismo medio de reacción e igual organismo que en el Ejemplo 6, y con la misma proporción del substrato esteroide, la 4-pregneno- $11\beta,21$ -diol-3,20-diona (corticosterona) se convirtió en 1,4-pregnadieno- $11\beta,21$ -diol-3,20-diona. De manera análoga, la 4-pregneno- 21-ol-3,20-diona (desoxicorticosterona) produjo 1,4-pregnadieno- 21-ol-3,20-diona en forma de un sólido cristalino, mientras que la 4-pregneno- $21\text{-ol-3,11,20-triona}$ (11-dehidrocorticosterona) se transformó en 1,4-pregnadieno- $21\text{-ol-3,11,20-triona}$ cristalina.

Con respecto a la acetilación de los dienos descritos en los Ejemplos 1, 2 y 3, resulta evidente que pueden prepararse de modo semejante otros ésteres de los compuesto dienos, por ejemplo, mediante reacción con el anhídrido del ácido o con su cloruro, de una manera conocida, como formiatos, propionatos,



butiratos y valeriatos, y asimismo los ésteres de otros ácidos atóxicos, como los benzoatos, y también los ésteres neutros y ésteres ácidos de ácidos polibásicos, como el ácido succínico, maleico, málico, cítrico, tártrico, ftálico y hexahidroftálico. En el caso de los ésteres ácidos, las sales metálicas pueden formarse de la manera usual por reacción con el hidróxido, carbonato o bicarbonato del metal, por ejemplo de metales alcalinos y térreo-alcalinos.

En vez de formar los 1,4-dienos de cortisona e hidrocortisona y de la subsiguiente esterificación de los productos, los correspondientes ésteres de cortisona e hidrocortisona y sus compuestos intermedios pueden someterse al proceso del presente invento y hacer que produzcan los dienos de los ésteres. Así, en el Ejemplo 1, el Compuesto E puede reemplazarse por su 21-éster o por su 17 α ,21-diéster, o por el 21-acetato de 5-pregнено-3,17 α ,21-triol-11,20-diona o por el 17 α ,21-diacetato, o por el 3,17 α ,21-triacetato y otros ésteres; mientras que en el Ejemplo 2, el Compuesto F puede reemplazarse por su 21-acetato, o 17 α ,21-diacetato o por 11 β ,17 α ,21-triacetato; or por el 3,11 β ,17 α ,21-tetracetato 3,21-diacetato, 3,17 α ,21-triacetato, /de la 5-pregнено-3,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-ona. Esta último grupo de compuestos puede reemplazarse por los correspondientes epímeros 11 α -hidroxi, obteniéndose los 11-epímeros del dieno del Compuesto F y sus 21-ésteres y 17 α ,21-diésteres. Los poliésteres pueden ser, en todos los casos, ésteres mixtos, como el 3-propionato-21-acetato.

Por ejemplo, mediante el tratamiento descrito para la transformación del Compuesto F en el correspondiente dieno (Ejemplo 2), el acetato del Compuesto F puede convertirse en el 1,4-dieno o su 21-acetato, y el producto se aísla mediante extracción con cloroformo y recristalización de una solución



de acetona. De 1,0 g. del 21-acetato del Compuesto F se obtuvieron 0,22 g. de 1-hidrocortisol (IIIa), con punto de fusión de 239 a 241° (desc.).

Cuando se desea suprimir la reacción de desacetilación, se utilizan las mismas condiciones antes indicadas, sólo que la temperatura del ambiente para las fases de crecimiento y de reacción del proceso se eleva a 36° C. El producto se aísla de la manera usual. De 1,0 g. de 21-acetato del Compuesto F se obtienen 0,13 g. de 21-acetato de 1-dehidrocortisol (IIIb), con punto de fusión de 237 a 239° (desc.).

De manera análoga, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se convirtió 1,0 g. de 21-acetato de cortisona en 1-dehidrocortisona, del que se aislaron 0,17 g. con punto de fusión de 230 a 232° C. Si la temperatura del ambiente de las fases de crecimiento y de reacción se eleva a 36° C., entonces se obtiene de 1,0 g. de acetato de cortisona, 0,11 g. de 21-acetato de 1-dehidrocortisona, con punto de fusión de 230 a 233° C. (desc.).

Ejemplo 7

Conversión del Compuesto F en 1-dehidrocortisol

De una solución de 1 gramo de extracto de levadura (Difco) en 1,0 litro de agua del tubo que contenía 4,4 gramos de fosfato monobásico de potasio y 8,8 gramos de fosfato ácido disódico (pH de la solución, 6,9), se retiran 10 porciones de 100 ml. cada una, se colocan en frascos de Erlenmeyer de 300 ml. y se esterilizan en una autoclave durante 15 minutos a una presión de vapor de 1,055 kilogramos (120° C.). Después de esterilizar en autoclave y enfriar el caldo se coloca en cada frasco una suspensión de Corynebacterium hoagii (American Type Culture Collection 7005). Los frascos se agitan luego en una mesa agitadora a 220 revoluciones por minuto y a una temperatura de 28° C. durante



16-1/2 horas.

En cada uno de los 10 frascos de Erlenmeyer se agregan en condiciones asépticas 50 mg. del Compuesto F de Kendall disuelto en 1 ml. de metanol al 90%. Los frascos se colocan nuevamente en el agitador y se incuban durante 7 horas. El pH al final del período de agitación fué de 6,82.

Se reunieron los contenidos de todos los frascos y se hizo la extracción con un total de 3 litros de cloroformo en 3 porciones iguales. Los extractos reunidos se concentraron hasta dejar un residuo de 425 mg. La cristalización del residuo de una solución de acetona produjo 248 mg. de 1-4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona.

Ejemplo 8

Conversión del Compuesto F en 1-dehidrocortisol

De una solución de 0,5 gramo del medio de cultivo Basamin Busch (Anheuser-Busch) en 1 litro de agua del tubo, se retiran 10 porciones de 100 ml. cada una, se colocan en frascos de Erlenmeyer de 300 ml. y se esterilizan en una autoclave durante 15 minutos a una presión de vapor de 1,055 kilogramos (120°C.). Después de esterilizarse en autoclave y enfriarse el caldo, se echó en cada frasco 1 ml. de una suspensión de Corynebacterium simplex. Se agitaron luego los frascos en una mesa agitadora a 220 revoluciones por minuto y a una temperatura de 28° C. durante 24 horas.

A cada uno de los 10 frascos de Erlenmeyer se agregaron en condiciones asépticas 50 mg. del Compuesto F de Kendall disuelto en 0,8 ml. de metanol absoluto. Se volvieron a colocar los frascos en el agitador y se incubaron durante 4 a 7 horas más. Al final del período de agitación el pH era de 7,2 a 7,6.



Se reunieron los contenidos de todos los frascos y se hizo la extracción con un total de 3 litros de cloroformo en 3 porciones iguales. Los extractos combinados se concentraron hasta dejar un residuo de 490 mg. La cristalización del residuo de una solución de acetona produjo 403 mg. de 1,4-pregna-dieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona, con punto de fusión de 238 a 240°C. (desc.); $[\alpha]_D^{25} + 105^\circ$ (dioxano); $\epsilon_{243} 14.500$ (metanol).

Empleando el Compuesto E en vez del Compuesto F de este ejemplo y aumentando el período de conversión a 6 - 12 horas, se obtuvo 1-dehidrocortisona cruda con un rendimiento de 85%.

El Ejemplo 8 indica que el rendimiento aumenta con la reducción de la concentración del compuesto inicial.

Los otros compuestos 4-pregnenos que aquí se indican pueden tratarse de igual manera de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 8. Como ocurre con los otros ejemplos antes indicados, pueden emplearse los 21-ésteres como compuestos iniciales, y lo mismo puede decirse de los 5-pregnenos-3-hidroxi análogos.

Ejemplo 9

Conversión del Compuesto E en 1-dehidrocortisona

Se incubó el Bacillus sphaericus, var. fusiformis (A.T.C.C. 7055) en nutriente de agar compuesto de extracto de carne Bacto, 3 g.; Bacto-peptona, 5 g.; cloruro de sodio, 8 g.; agar, 15 g.; y agua del tubo, 1 litro, durante 24 horas a una temperatura de 28°C.

A 100 ml. de caldo nutriente estéril (compuesto de extracto de carne Bacto, 3 g.; Bacto-peptona, 5 g.; y con agua del tubo hasta formar 1 litro) en un frasco de 300 ml., se agregó el contenido de una gaza del cultivo incubado



y la mezcla de caldo se incubó durante 24 horas más a una temperatura de 28° en una máquina agitadora, en condiciones aerobias. El cultivo en caldo así obtenido se utilizó como inóculo al uno por ciento.

Se echó 1 ml. del inóculo en cada uno de los 10 frascos que contenían 100 ml. del caldo nutriente estéril. Los frascos se agitaron en un agitador giratorio en condiciones aerobias durante 8 horas a una temperatura de 28° a razón de 240 revoluciones por minuto. Después de este período de crecimiento se agregó una solución de 25 mg. de cortisona en 0,5 ml. de metanol, en condiciones asépticas, a cada uno de los frascos, que a su vez se agitaron de nuevo y se incubaron durante 24 horas más. El pH final fué como de 7,8. Se reunieron los contenidos de los frascos, se hizo la extracción con cloroformo y se efectuó el tratamiento de la manera usual, obteniéndose 1-dehidrocortisona.

En lugar del Compuesto E pueden emplearse como materia inicial 5-pregнено-3,17 α ,21-triol-11,20-diona, 5-pregнено-3,17 α ,20,21-tetrol-11-ona o sus 3-acetatos u otros ésteres que no sean tóxicos para los microorganismos ni inhibitorios respecto de su enzima; mientras que de modo semejante, pueden emplearse, en lugar del Compuesto F, 5-pregнено-3,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-ona, 5-pregнено-3,11 β ,17 α ,20,21-pentol, o sus 3-acetatos u otros ésteres. Como se ha indicado arriba, el grupo 20-hidroxilo se oxida convirtiéndose en un grupo ceto.

Ejemplo 10

Conversión del Compuesto F en 1-dehidrocortisol

Se preparó un medio de crecimiento con 30 g. de materias solubles de pescado condensadas (tratadas con enzima), 4,49 g. de KH₂PO₄ y 8,83 g. de Na₂HPO₄ · 7 H₂O, todo ello diluido con agua del tubo hasta formar un litro.



El pH de este medio es como de 6,8. En cada uno de diez frascos de 300 ml. se pusieron 100 ml. del medio de crecimiento y los frascos y su contenido se esterilizaron en una autoclave durante 15 minutos a una presión de vapor de 1,055 kilogramos. A cada frasco enfriado se agregó luego 1 ml. del inóculo descrito en el Ejemplo 9, y se dejó que procediera el crecimiento durante 12 horas. A cada frasco se agregaron luego, en condiciones asépticas, 25 mg. de hidrocortisona y se reanudó la incubación aerobia durante 24 horas más. La mezcla de fermentación se manipuló en la forma antes descrita con respecto a la obtención del 1-dehidrocortisol.

Los Ejemplos 9 y 10 pueden variarse, empleándose como medio nutriente extracto de levadura al 1% (Difco) en agua del tubo.

Ejemplo 11

Conversión del 21-acetato de 4,6-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona en 1-dehidrocortisona.

0,85 g. de 21-acetato de 4,6-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (conocido también con el nombre de acetato de 6-dehidrocortisona) obtenido de la manera descrita en J. Biol. Chem, 197, 261 (1952), se convirtió en 1,4,6-pregnatrieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona del modo arriba descrito por la acción de las enzimas de un cultivo de Corynebacterium simplex, con un rendimiento de como 18%. Esta nuevo trieno manifiesta propiedades de hormona adrenocortical, pero puede deshidrogenarse en parte, convirtiéndose en el correspondiente 1,4-dieno mediante reducción en condiciones relativamente moderadas, por ejemplo, por medio de zinc, ácido acético y ácido ascórbico, de la manera descrita en la publicación citada.

Pueden prepararse de la manera descrita otros 1,4,6-pregnatrienos,



partiendo de compuestos que tienen un sistema de enlaces dobles conjugados, distribuidos en los anillos A y B, y de modo semejante tales prenatrienos pueden hidrogenarse en parte, produciendo los correspondientes 1,4-pregnadienos. El sustituyente en la posición 3 puede ser también un grupo hidroxilo, y en ese caso los enlaces dobles conjugados se ligan generalmente a los carbonos 5,6 y 7,8. El sustituyente en la posición 11 puede ser un α -hidroxilo o un β -hidroxilo, o bien puede estar ausente por completo, y el grupo en la posición 21 puede ser metilo, en lugar de hidroximetilo o de aciloximetilo. Así, por ejemplo, la 4,6-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona y la 5,7-pregnadieno-3,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-ona puede convertirse por la acción de los cultivos antes referidos en 1,4,6-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona; mientras que la 4,6-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona puede convertirse en 1,4,6-pregnatrieno-17 α ,21-diol-3,20-diona. En cada caso puede emplearse el 21-éster, que puede o no hidrolizarse en el curso del proceso. Mediante hidrogenación parcial, según se ha descrito arriba, se obtienen los correspondientes 1,4-pregnadienos.

Ejemplo 12

Conversión de 4-pregneno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona en 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona.

La reacción procede exactamente como se ha descrito en relación con la transformación del Compuesto F en el correspondiente dieno, y el producto se aísla mediante extracción con cloroformo y se cristaliza de una solución de acetona y hexano. De 1,0 g. del 11-epi del Compuesto F se aislaron 0,25 g. de 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona en forma de un sólido cristalino, con punto de fusión de 245 a 246° C. (desc.).



La acetilación del dieno 11-epi del Compuesto F (1,0 g.) se realiza mediante solución en 15 ml. de piridina anhidra, seguida de la adición de 0,3 g. de anhídrido acético. La mezcla de reacción se deja en reposo de un día para otro a la temperatura ambiente y luego se vierte en agua helada. El precipitado resultante se separa por filtración y se recristaliza en forma de un sólido cristalino (21-acetato) de una solución de acetona y hexano.

Ejemplo 13

1,4-pregnadieno-9 α -fluoro-21-ol-3,11,20-triona.

En un frasco de Erlenmeyer de 300 ml. se echaron 100 ml. de extracto de levadura al 0,1% (Difco), que contenía 9,0 ml. de 0,2 M de fosfato monobásico de potasio y 9,0 ml. de 0,2 M de fosfato ácido disódico. El frasco y su contenido se esterilizó en una autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 120° C. y se agregó al medio estéril 1 ml. de una suspensión al 1% de Corynebacterium simplex. El frasco y su contenido se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 28° C.

A un segundo frasco de Erlenmeyer de 300 ml. se agregaron 2 ml. de etanol y 25 mg. de 9 α -fluoro-11-dehidrocorticosterona. El cultivo de 24 horas de crecimiento se trasladó en condiciones asépticas a un frasco que contenía el esteroide y se incubó la mezcla a una temperatura de 28° C., agitándose durante 10 horas. Al cabo de ese período se hizo la extracción completa de la mezcla de reacción con cloroformo y los extractos al cloroformo se concentraron hasta dejar un residuo. El residuo se cristalizó de una solución de acetona y hexano, obteniéndose 4 mg. de 9 α -fluoro-1,4-pregnadieno-21-ol-3,11,20-triona.

El 21-acetato del compuesto de este ejemplo se preparó haciendo reaccionar



0,3 g. de anhídrido acético con una solución de 1 g. del 21-ol en 20 ml. de piridina anhidra a la temperatura ambiente, de un día para otro, y a continuación se hizo la dilución con agua helada.

De modo semejante, mediante el procedimiento del Ejemplo 13, se obtiene la 9 α -fluoro-1,4-pregnadieno-11 β ,21-diol-3,20-diona, con un rendimiento de 5 mg. de una cantidad de 25 mg. de compuesto inicial con una sola insaturación. El 21-acetato se obtiene mediante acetilación corriente.

Empleando una suspensión al 1% de Corynebacterium hoagii, en vez del C. simplex del Ejemplo 13, siendo las condiciones por lo demás iguales, se convirtieron 25 mg. de 9 α -clorocorticosterona en 9 α -cloro-1,4-pregnadieno-11 β ,21-diol-3,20-diona con un rendimiento de 7 mg. El producto puede convertirse en el 21-propionato mediante reacción con anhídrido propiónico. Con el mismo cultivo (C. hoagii) se convierte el 21-acetato de 9 α -bromocorticosterona en 9 α -bromo-1,4-pregnadieno-11 β ,21-diol-3,20-diona.

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 13, pero empleando un período de incubación de 48 horas a una temperatura de 28 a 30° C., el derivado 9 α -fluoro del Compuesto F se convierte en el correspondiente 1,4-dieno. Con el mismo procedimiento, los derivados 9 α -fluoro, 9 α -cloro y 9 α -bromo del Compuesto E (cortisona) se convierten en los derivados 9 α -fluoro, 9 α -cloro y 9 α -bromo de la 1-dehidrocortisona, respectivamente. Los derivados 9 α -cloro y 9 α -bromo del Compuesto F se convierten de igual modo en los derivados 9 α -cloro y 9 α -bromo del 1-dehidrocortisol, respectivamente.

Los compuestos 17-desoxi pueden convertirse en los correspondientes compuestos 17 α -hidroxil (derivados 9 α -halógeno de 1-dehidrocortisol y 1-dehidrocortisona) por acción de un cultivo de Trichothecium roseum, según se describirá



luego.

También, con ayuda de un microorganismo deshidrogenante, pueden convertirse otros 1,4-pregnadienos, en los productos finales de alta potencia que se desea, mediante los procedimientos que se describen luego más ampliamente.

Ejemplo 14

1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona

Un ml. de un cultivo en caldo preparado como inóculo (1%), de acuerdo con el Ejemplo 9, se agrega a cada uno de diez frascos que contienen 100 ml. del caldo nutriente estéril que se describe en dicho ejemplo. Los frascos se agitan en un agitador giratorio durante 8 horas a una temperatura de 28° C. a 240 revoluciones por minuto. Al cabo de este período de crecimiento, se agrega una solución de 25 mg. del Compuesto S de Reichstein en 0,5 ml. de metanol en condiciones asépticas a cada frasco, que a su vez se agita y se incubaba durante 24 horas más. El pH final es de 7,8.

Se reúnen luego los contenidos de los frascos y se hace la extracción 3 veces con 2 litros de cloroformo por extracción. Los extractos al cloroformo reunidos se evaporan hasta la sequedad, dando 310 mg. de un producto crudo. El esteroide crudo se purifica mediante cromatografía según el sistema cromatográfico descrito por G. M. Shull, Resúmenes de las Monografías presentada en la Reunión 126 va. de la American Chemical Society, del 12 al 17 de diciembre de 1954, página 9, monografía 24. La evaluación cromatográfica muestra una conversión cuantitativa de la sustancia inicial en el dieno al emplearse una muestra auténtica del dieno del Compuesto S como término de comparación.

De modo alternativo el producto crudo se cristaliza nuevamente de una solución de acetona, produciendo 225 mg. de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-



3,20-diona, con punto de fusión de 246 a 248°.

Ejemplo 15

1-dehidrocortisol

De una solución de extracto de levadura (Difco) al 1% en agua del tubo, se retiraron 10 porciones de 100 ml. cada una, se colocaron en frascos de 300 ml. y se esterilizaron en una autoclave a una presión de vapor de 1,055 kilogramos durante 15 minutos. Después de esterilizarse en autoclave y enfriarse el caldo, se coloca en cada frasco 1 ml. de una cultura agitada de Bacillus sphaericus, var. fusiformis, desarrollado en el caldo nutriente descrito en el Ejemplo 14. Los frascos se agitan luego en una mesa agitadora durante 12 horas a la temperatura de 28° C., a razón de 240 revoluciones por minuto.

A cada frasco se agrega en condiciones acépticas una solución de 25 mg. del Compuesto F en 0,5 ml. de metanol y los frascos y su contenido se agitan e incuban durante 8 horas más.

Al reunir los contenidos de todos los frascos y hacer la extracción con cloroformo en la forma descrita en el Ejemplo 14, se obtuvieron 304 mg. del dieno crudo. La purificación se efectuó mediante recristalización de una solución de acetona, empleando carbón vegetal descolorante y en esa forma se obtuvieron 230 mg. de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dieno, con punto de fusión de 240 a 241°.

Empleando un total de 250 mg. del 21-acetato del Compuesto F, en lugar del Compuesto F mismo, se obtuvieron 220 mg. de 21-acetato de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona, con punto de fusión de 237 a 239° C., después de recristalización de una solución de acetona y hexano.



10

Ejemplo 16

1-dehidrocortisona

Se preparó un medio de crecimiento con 30 g. de materias solubles de pescado condensadas (tratadas con enzima), 4,49 g. de KH_2PO_4 y 8,83 g. de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, diluido con agua del tubo hasta formar 1 litro. (El pH de este medio era de como 6,8). En cada uno de los diez frascos de 300 ml. se pusieron 100 ml. del medio de crecimiento y los frascos y su contenido se esterilizaron en una autoclave durante 15 minutos a una presión de vapor de 1,055 kilogramos. Cada frasco se inoculó con 1 ml. de Bacillus sphaericus, var. fusiformis, como en el Ejemplo 15, y se dejó fermentar durante 12 horas. A cada frasco se agregó luego, en condiciones asépticas, una solución de 50 mg. del Compuesto E en 1 ml. de metanol, y se reanudó la agitación e incubación durante 24 horas más.

Se reunieron los contenidos de los frascos y se hizo la extracción con cloroformo, como se describe en el Ejemplo 14, obteniéndose 630 mg. del dieno crudo del Compuesto E. La purificación se efectuó mediante recristalización de una solución de acetona en presencia de carbón vegetal descolorante, con lo que se obtuvieron 420 mg. de 1-dehidrocortisona, con punto de fusión de 233 a 235°.

De manera semejante, de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 16, la corticosterona se convierte en 1,4-pregnadieno-11 β ,21-diol-3,20-diona. Utilizando el mismo medio de reacción y el mismo organismo descritos en el Ejemplo 14, la 9 α -fluoro-4-pregнено-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona se transforma en el correspondiente 1,4-pregnadieno, que se obtiene en forma de un sólido cristalino.

Con el cultivo descrito en el Ejemplo 16, el 5-pregнено-3 β ,20-diol se convierte en 1,4-pregnadieno-3,20-diona, con punto de fusión de 152 a 153°C., después de extracción con cloroformo, evaporación y recristalización del residuo



de una solución de éter.

De manera semejante puede convertirse la desoxicorticosterona en 1,4-pregnadieno-21-ol-3,20-diona con el cultivo descrito en el Ejemplo 14.

Como resulta manifiesto por lo expuesto, los microorganismos deshidrogenantes efectúan la introducción de un enlace doble en la posición 4,5 mediante oxidación del 3-hidroxilo de los 3-hidroxi-5-pregnenos con hidrogenación simultánea en los carbonos 1,2; y si bien los cultivos de microorganismos deshidrogenantes pueden hacerse actuar en los 3-hidroxi-pregnenos o en los 3-ceto-1-pregnenos, preferimos emplear compuestos iniciales que tengan un enlace doble ligado al carbón 5.

Los siguientes ejemplos, 17 a 19, ilustran diversas combinaciones del paso de introducción de un enlace doble 1,2 en la molécula del esteroide con ayuda de los microorganismos deshidrogenantes antes descritos, en combinación con otros procedimientos microbiológicos, mediante los cuales se introducen diversos substituyentes en la molécula para convertir diversos compuestos iniciales conocidos en los pregnadienos terapéuticamente activos, con la producción de compuestos intermedios que son en sí mismos terapéuticamente activos o pueden convertirse en 1-dehidrocortisona o 1-dehidrocortisol y sus ésteres.

Ejemplo 17

A. 1,4-pregnadieno-17 α -ol-3,20-diona (IIc)

Empleando el cultivo descrito en el Ejemplo 3, se deshidrogenan 150,0 mg. de 4-pregneno-17 α -ol-3,20-diona (17 α -progesterona) (Ic) en 5,0 ml. de etanol. El extracto crudo pesa 178 mg. El producto crudo se cristaliza de una solución de acetona y hexano, produciendo cristales puros de 1,4-pregnadieno-



17 α -ol-3,20-diona (IIc).

B. 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α -diol-3,20-diona (IIIc).

Esta conversión se efectúa con ayuda de un cultivo de Rhizopus nigricans de la manera descrita en detalle en J. Am. Chem. Soc., 74, 5933 (1952). A 6 litros de un cultivo de 24 horas de crecimiento de Rhizopus nigricans se agrega 1,0 g. de IIc en 200 ml. de etanol. Después de un período de transformación de 48 horas en el equipo y medio descritos en la publicación que acaba de citarse, se hace la extracción del cultivo con cloruro de metileno, se evapora el disolvente y el residuo crudo cristalino se cristaliza nuevamente de una solución de acetona y hexano, obteniéndose la 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α -diol-3,20-diona (IIIc).

C. 1,4-pregnadieno-17 α -ol-3,11,20-triona (Vc)

Se agrega una solución de 3,0 g. de IIIc en 30 ml. de piridina lentamente a una pasta aguada de 1,5 g. de ácido crómico en 15 ml. de piridina (Poos et al., J. Am. Chem. Soc., 75, 422 (1953)) y se agita la mezcla resultante de un día para otro a la temperatura ambiente. Se agregan luego a la mezcla de reacción 4,5 g. de sulfito de sodio en 45 ml. de agua y se continúa la agitación durante dos horas. La mezcla de reacción se vierte en 600 ml. de agua y se hace la extracción de la solución resultante con cloruro de metileno. Los extractos se lavan y neutralizan con ácido sulfúrico diluido, carbonato de sodio acuoso y agua, y se desecan sobre sulfato de magnesio. La concentración de la solución desecada y la cristalización del residuo de una solución de acetona y hexano producen la 1,4-pregnadieno-17 α -ol-3,11,20-triona (Vc).



D. 1-dehidrocortisona (IIa)

Se esterilizan 4 litros de extracto de levadura (Difco) al 1 % en un frasco agitador y se inocula con una cepa de Ophiobolus herbotrichus. Se incuba el cultivo durante tres días con agitación, a una temperatura de 27° C. Luego se echa en el frasco agitador en condiciones asépticas, 1,0 g. de Vc en 25 ml. de acetona (estéril) y se continúa la agitación durante otros tres días a 27° C. Se separa el micelio de la mezcla de reacción y se hace la extracción tanto del micelio como del filtrado acuoso con tres porciones de cloroformo. Se reúnen los extractos, se lavan con agua, se desecan y concentran. La solución concentrada se cromatografía sobre Florisil (30 g. y se lava la columna con cloruro de metileno. La elución con metanol en cloruro de metileno al 0,5 % y 1,0 % quita la 1-dehidrocortisona, que se cristaliza otra vez de una solución de acetona y hexano.

Ejemplo 18

A. Preparación de la 1,4-pregnadieno-11B,17a-diol-3,20-diona (IVc) de IIc.

Un cultivo de Curvularia lunata (QM 120h) se desarrolla en frascos que contienen el mismo medio descrito en el Ejemplo 17 (véase también la patente estadounidense No. 2.658.023). Cien mililitros de este inóculo se agregan en condiciones estériles a dos litros de un medio acuoso que contiene los siguientes ingredientes:

- Sacarosa 1
- Difco tryptone 1
- Nitrato de sodio 0,2
- Fosfato ácido dipotásico 0,1
- Sulfato de magnesio heptahidratado . 0,05
- Cloruro de potasio 0,05
- Sulfato ferroso heptahidratado . . 0,001

El pH de esta mezcla se ajusta a un índice de 7 con ácido sulfúrico y se



agrega 0,25 % de carbonato de calcio antes de esterificarse la mezcla. El medio inoculado se airea a razón de como un medio a un volumen de aire por volumen de solución por minuto a una temperatura de 27 a 28° C. durante 24 horas. Durante este tiempo se agita la mezcla en un agitador giratorio a una 1700 revoluciones por minuto. Se disuelve medio gramo de 1,4-pregnadieno-17 α -ol-3,20-diona (IIc) en 20 mililitros de etanol al 95 %. Se agrega la solución a la mezcla de fermentación en condiciones estériles. Se continúa luego la reacción durante 24 horas más, exactamente en las mismas condiciones que se han descrito arriba.

Se hace la extracción de mezcla de fermentación con tres porciones de cloruro de metileno y se desecan los extractos reunidos sobre sulfato de magnesio y se concentran hasta un pequeño volumen. La solución concentrada se agrega a una columna de Florisil (30 g.), preparada con hexano, y la columna se despoja con hexano que contiene éter en cantidades que varían de 1 a 99 %. El producto deseado se recoge de los eluados más polares (25 % de éter \longrightarrow 99 % de éter) y se cristaliza de una solución de acetona y hexano, obteniéndose la 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α -diol-3,20-diona (IVc).

B. Preparación de Vc de IVc

Esta reacción se manipula exactamente como la transformación de IIIc en Vc, sólo que se emplea IVc en vez de IIIc. El producto se convierte luego en IIa de la manera antes descrita.

Ejemplo 19

Preparación de la 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona (VIIa)

de IIIc

Se emplea el mismo procedimiento que para convertir Vc en IIa, sólo que



el substrato esteroide es IIIc y el producto, VIIa, se aísla mediante cromatografía sobre Florisil en los eluados de 1 % y 2 % de metanol en cloruro de metileno. La recristalización de VIIa de una solución de acetona da un producto cristalino, con punto de fusión de 243 a 245 °.

Mediante el mismo procedimiento empleado para convertir Vc en IIa, se convierte IVc en IIIa. La recristalización de IIIa de una solución de acetona produce cristales con punto de fusión de 238 a 240°.

La oxidación de IIIa o VIIa, de preferencia en forma de los 21-acetatos u otros ésteres de alcanofilos inferiores (IIIb y VIIb) se realiza de acuerdo con el procedimiento descrito para la conversión de IIIc en Vc. El grupo 21-acetato se hidroliza con bicarbonato de potasio en solución acuosa de metanol para obtener IIa.

La conversión de Ic en 4-pregneno-11 α ,17 α -diol-3,20-diona (VIc) (Vía B) se logra mediante el mismo procedimiento que se emplea en la conversión del compuesto Iic en compuesto IIIc (Ejemplo 17 B).

De manera análoga la 4-pregneno-11 β ,17 α -diol-3,20-diona (VIIc) se prepara de Ic del mismo modo que IVc de Iic. Los compuestos VIc y VIIc se oxidan ambos, convirtiéndose en 4-pregneno-17 α -ol-3,11,20-triona (VIIIc) por el procedimiento empleado para la transformación de los compuestos IIIc y IVc en el compuesto Vc.

El resto de las transformaciones según la Vía B siguen análogamente los procedimientos de la Vía A. Así, por ejemplo, el compuesto VIc se convierte en IIIc, y el compuesto VIIIc se convierte en Vc, mientras que el compuesto VIIc se convierte en IVc, de la misma manera que Ic se convierte en Iic, es decir, mediante tratamiento con un cultivo o extracto enzimático de un



cultivo de Corynebacterium simplex o de C. hoagii. De este punto en adelante las transformaciones son las mismas que en la Vía A.

Tal como se aplica específicamente a la conversión de la desoxicorticosterona (4-pregнено-21-ol-3,20-diona), 5-pregнено-3,21-diol-20-ona y sus ésteres en Δ^1 -dehidrocortisona y Δ^1 -dehidrocortisol (Δ^1 -dehidro Compuesto F) y sus ésteres, el método del invento puede aplicarse como se indica en los siguientes Ejemplos 20 y 21.

Ejemplo 20

A. 1,4-pregnadieno-21-ol-3,20-diona (IIId)

150,0 mg. de 4-pregнено-21-ol-3,20-diona (Id) estéril en 5,0 ml. de etanol se someten a fermentación en el mismo medio, con el mismo microorganismo y de la misma manera que en el Ejemplo 17A, obteniéndose un extracto crudo con peso de 137 mg. El producto crudo se cristaliza de una solución de acetona y hexano, obteniéndose 1,4-pregnadieno-21-ol-3,20-diona (IIId) cristalina.

B. 1,4-pregnadieno-11 α ,21-diol-3,20-diona (IIIId)

Se trata 1,0 g. de IIId en 200 ml. de etanol con un cultivo de Rhizopus nigricans de la manera descrita en el Ejemplo 17B. El residuo crudo cristalino se cristaliza nuevamente de una solución de acetona y hexano, produciendo 1,4-pregnadieno-11 α ,21-diol-3,20-diona (IIIId) cristalina.

C. 1,4-pregnadieno-21-ol-3,11,20-triona (Vd)

Una solución de 3,0 g. de IIIId en 30 ml. de piridina se oxida de la manera descrita en el Ejemplo 17C. La evaporación del extracto al cloruro de metileno y la cristalización del residuo de una solución de acetona y hexano producen la 1,4-pregnadieno-21-ol-3,11,20-triona (Vd) cristalina.



D. 1-dehidrocortisona (IIa)

Dos litros del medio Czapek-Dox se esterilizaron en un frasco agitador y se inocularon con una cepa de Trichothecium roseum. Después de agitarse tres días a una temperatura de 27° C. se agregaron al cultivo, en condiciones asépticas, 500 mg. de 1,4-pregnadieno-21-ol-3,11,20-triona (Vd) en 15 ml. de acetona. Se continuó la agitación durante 60 horas a 27° C. Se separó el micelio y se hizo la extracción completa tanto del micelio como del filtrado acuoso con cloruro de metileno. Los extractos reunidos se lavaron bien con agua, se desecaron y se concentraron. La solución concentrada se cromatografió sobre Florisil y se hizo la elución de la 1-dehidrocortisona (IIa) en las fracciones de 0,5 % y 1,0 % de metanol en cloruro de metileno, después de lo cual la columna se lavó con cloruro de metileno. La re-cristalización de las fracciones indicadas de una solución de acetona produjo cristales de IIa, con punto de fusión de 226-229° (desc.).

Ejemplo 21

A. 1,4-pregnadieno-11 β ,21-diol-3,20-diona (IVd)

Se desarrolla un cultivo de Curvularia lunata (QM 120h) en frascos que contienen el mismo medio descrito en el Ejemplo 1 de la patente estadounidense No. 2.658.023, concedida a Gilbert M. Shull y otro, y se emplea exactamente como se describe en el Ejemplo 16A para la transformación de 1,4-pregnadieno-21-ol-3,20-diona (IIId), disuelva igualmente en 20 mililitros de etanol al 95 %. De los eluados más polares (éter al 25 % \longrightarrow éter al 99 %) se obtiene la 1,4-pregnadieno-11 β ,21-diol-3,20-diona (IVd) que se cristaliza nuevamente de una solución de acetona y hexano.



y VIIId sigue los mismos procedimientos descritos antes para la conversi3n de IIId en IIIId, y de IIId en IVd, respectivamente. Los compuestos VIId y VIIId se oxidan convirti3ndose en el compuesto VIIId en condiciones oxidantes moderadas, tales como las antes descritas.

Como se ha indicado arriba, en lugar de la desoxicorticosterona



y sus ésteres, podemos emplear la 5-pregнено-3,21-diol-20-ona y sus 21-ésteres, tal como el acetato y otros ésteres de alcoholes inferiores, como compuestos iniciales, pues en el curso del tratamiento con un cultivo o enzima separada de un microorganismo deshidrogenante, tal como el C. simplex o el C. hoagii de la manera ya descrita, el 3-hidroxilo se oxida convirtiéndose en oxígeno cetónico, mientras que el enlace doble 5,6 pasa a la posición 4,5. De ese modo la 5-pregнено-3,21-diol-20-ona y sus 21-ésteres se convierten en IIa y sus 21-ésteres.

Se obtienen generalmente rendimientos mejores en la oxidación de los compuestos 11 α -OH y 11 β -OH y conversión en los correspondientes compuestos 11-ceto, y en condiciones menos críticas, si primero se esterifica el 21-hidroxilo según los procedimientos descritos en los Ejemplos 20C y 21B seguido ello de hidrólisis, si se desea. Se han descrito ya los métodos que son adecuados para la esterificación parcial de los 11,21-dioles y la hidrólisis de los 11-ceto-21-ésteres que se obtienen por oxidación.

El 21-acetato de Vd puede obtenerse mediante oxidación del 11-hidroxilo de los 21-acetatos de IIIId y IVd con ácido crómico en piridina, procedimiento ya descrito respecto de compuestos conexos. El 21-éster de Vd se hidroliza fácilmente mediante reflujo con carbonato de potasio en metanol acuoso.

Los compuestos VIId y VIIId pueden convertirse en sus 21-acetatos de la misma manera que IIIId y IVd. La oxidación del 21-acetato de VIId y del 21-acetato de VIIId para su conversión en el 21-acetato de VIIId sigue el mismo procedimiento de la oxidación del 21-acetato de IIIId para su conversión en 21-acetato de Vd. La hidrólisis del 21-acetato de VIIId para convertirlo en VIIId, cuando tal hidrólisis no se ha realizado o no ha sido terminada por el



microorganismo empleado para la introducción del enlace doble 1,2, como, por ejemplo, cuando se emplean temperaturas de fermentación más altas, sigue el mismo procedimiento que sirve para la hidrólisis del 21-acetato de Vd.

En uno de los diagramas que aparecen antes en esta memoria descriptiva se muestra la conversión de la 16-dehidropregnenolona (Ie) y 16-dehidroprogesterona (IIIe) en 1-dehidrocortisona (IIa) por medio de los 16,17-epóxidos y por diversas vías. Estas vías entrañan también la adición de un 11(α o β)-hidroxilo, la adición de un 21-hidroxilo la introducción de un 17 α -hidroxilo mediante apertura del anillo 16,17-epóxido, la introducción del enlace doble 1,2 y la oxidación del 11-hidroxilo para convertirlo en oxígeno cetónico. Si bien el orden de estas reacciones puede variarse dentro de ciertos límites (por ejemplo, el paso de oxidación debe seguir a la introducción del 11-hidroxilo), preferimos efectuar el tratamiento con el microorganismo deshidrogenante después de la introducción de un grupo hidroxilo por lo menos en una de las posiciones 11,17, y 21, o después de la formación del 16,17-epóxido. En los Ejemplos 22 y 23 se indican procedimientos que ilustran el modo de llevar a cabo diferentes órdenes de conversiones en los 4,16-pregnadienos y los 5,16-pregnadienos.

Ejemplo 22

1-dehidrocortisona

Se hizo reaccionar 1 g. de 16-dehidroprogesterona (IIIe) disuelta en 25 ml. de cloroformo a la temperatura ambiente durante unas 15 horas con la cantidad equivalente de ácido perbenzoico disuelto en cloroformo. Se agrega luego el agua a la mezcla de reacción, se lava la capa orgánica con una solución de sulfite de sodio, luego con una solución de bicarbonato de sodio,



agua, y se deseca después sobre sulfito de sodio. Se evapora el cloroformo y el residuo se cristaliza de una mezcla de acetona y hexano, obteniéndose la 16,17-epoxi-4-pregнено-3,20-diona (IVe).

Se mezcla una suspensión de 1 g. del 16,17-epóxido en 10 ml. de ácido acético glacial con una solución de 1,1 g. de yoduro de hidrógeno acuoso al 47%, 10 ml. de ácido acético y 4,1 g. de anhídrido acético. Se mantiene la temperatura a unos 15 a 20°C. durante la adición y luego por espacio de media hora. La mezcla se vierte luego en cinco volúmenes de agua, se filtra el precipitado, se lava con agua y se deseca. El producto crudo es 16-yodo-4-pregнено-17 α -ol-3,20-diona y éste se disuelve en 100 ml. de etanol y 1 ml. de ácido acético y se somete a reflujo durante unas 6 horas con 2,5 g. de catalizador de níquel de Raney. Se quita luego el catalizador por filtración, se concentra el filtrado, y al agregarse agua se obtiene un precipitado de 4-pregнено-17 α -ol-3,20-diona (17 α -hidroxi-progesterona, VIIe).

Se esterilizan 4 litros de extracto de levadura (Difco) al 1% en un frasco agitador y se inocula con una cepa de Ophiobolus herbotrichus. Se incuba el cultivo durante tres días, con agitación, a una temperatura de 27°C.; luego se agrega 1,0 g. de 17 α -hidroxi-progesterona en 25 ml. de acetona (estéril), en condiciones asépticas, al frasco agitador y se continúa agitando durante otros tres días a 27°C. Se separa el micelio de la mezcla de reacción y se hace la extracción completa tanto del micelio como del filtrado acuoso con tres porciones de cloroformo. Se reúnen los extractos, se lavan con agua, se desecan, se concentran y se cromatografían sobre Florisil. La materia obtenida por elución, por ejemplo, con 0,5 - 1,5% de metanol en cloruro de metileno, se cristaliza de una solución de acetona y hexano, obteniéndose la



4-pregнено-17 α ,21-diol-3,20-diona (VIIIe).

Se agrega una solución de 1,0 g. de VIIIe en 150 ml. de etanol a 1 litro de un cultivo de 24 horas de desarrollo de Rhizopus nigricans. Al cabo de un período de transformación de 48 horas, se hace la extracción de la mezcla con cloruro de metileno y se evapora el extracto orgánico hasta la sequedad. El producto crudo se cristaliza de una solución de acetona y hexano, dando la 4-pregнено-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona (IXe).

El compuesto IXe se somete ahora a la acción de un cultivo de un microorganismo deshidrogenante, tal como el Corynebacterium simplex. Después de incubarse durante unas 48 horas a una temperatura de 28°C., se obtiene la 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona (Xe, VIIa). Este compuesto se oxida luego, como se ha descrito arriba, transformándose en 1-dehidrocortisona (IIa).

Empleando un cultivo de Curvularia lunata, (GM 120h), según se describe en el Ejemplo 18A, en vez de un cultivo de Rhizopus nigricans, se obtiene de IXe el compuesto 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona (1-dehidrocortisol, IIIa), que puede oxidarse igualmente, convirtiéndose en 1-dehidroxicortisona.

Ejemplo 23

1-dehidrocortisona

La 16-dehidropregnenolona se convierte en el 16,17-epóxido mediante tratamiento con ácido perftálico. La 16,17-epoxi-5-pregнено-3-ol-20-ona (IIe) se convierte luego en el derivado 11 α -hidroxi (XIe) por tratamiento con un cultivo de Rhizopus nigricans. El compuesto XIe se somete luego a la acción de un cultivo de Ophiobolus herbotrichus para producir la 16,17-epoxi-5-pregнено-3,11 α ,21-triol-20-ona (XIIe). Luego se abre el anillo epóxido mediante trata-



miento con ácido yodihídrico, según se ha descrito arriba, produciendo la 5-pregнено-3,11a,17a,21-tetrol-20-ona (XIIIe). Al someter este último compuesto a la acción de un cultivo de un microorganismo deshidrogenante se obtiene la 1,4-pregnadieno-11a,17a,21-triol-3,20-diona (Xe), que luego se oxida, convirtiéndose en 1-dehidrocortisona.

Si se desea, la 16-dehidropregnenolona puede tratarse primero con un cultivo de Ophiobolus herbotrichus, obteniéndose la 5,16-pregnadieno-3,21-diol-20-ona, que luego se acetila de manera conocida para producir el diacetato. Al tratarse con un microorganismo deshidrogenante, el diacetato se convierte en la 1,4,16-pregnatrieno-21-ol-3,20-diona. Esta se convierte luego en el 16,17-epóxido por tratamiento con el ácido perftálico, después de lo cual se abre el anillo epóxido con ácido yodihídrico, y a continuación se somete a reflujo con el catalizador de níquel de Raney, obteniéndose la 1,4-pregnadieno-17a,21-diol-3,20-diona. Esta última se convierte luego en 1-dehidrocortisol por la acción de un cultivo de Curvularia lunata.

En lugar de perácidos, tales como los ácidos peracético, perbenzoico y perftálico para la formación del anillo oxido, puede emplearse peróxido de hidrógeno, junto con una base de un metal alcalino, de preferencia el hidróxido de sodio o de potasio. Esta mezcla puede contener una cantidad de un alcohol, como el metanol y t-butanol, a fin de ayudar a disolver el compuesto esteroide, pero generalmente tal alcohol no es absolutamente necesario.

Otros compuestos que sirven de punto de partida son la 5,16-pregnadieno-3,11-diol-20-ona y sus 3-ésteres, la 5,16-pregnadieno-3,21-diol-20-ona y sus 3-ésteres y 21-ésteres, la 5,16-pregnadieno-3,11,21-triol-20-ona y sus 3-ésteres y 21-ésteres, y la 4,16-pregnadieno-21-ol-3,11,20-triona y sus 21-ésteres,



que pueden someterse a la acción de un cultivo de un microorganismo deshidrogenante, para formar el sistema conjugado 3-ceto-1,4-dieno, y a la acción de un perácido, o de peróxido de hidrógeno, para formar el anillo 16,17-óxido, siguiendo uno u otro orden.

Un ejemplo de un compuesto que tiene ya la estructura 1,4-dieno-3-ceto, que puede convertirse en 1-dehidrocortisona y 1-dehidrocortisol es el derivado 1-dehidro del Compuesto 5. Las transformaciones necesarias pueden llevarse a cabo de acuerdo con los Ejemplos 24 y 25.

Ejemplo 24

(A) 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona (VIIa)

Siguiendo el procedimiento descrito en J. Am. Chem. Soc., 74, 5933 (1952) se agrega a 6 litros de un cultivo de 24 horas de desarrollo de Rhizopus nigricans. 1,0 g. de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona (que puede prepararse según se describe en los Ejemplos 3 y 6 antes citados o por medios químicos conocidos) en 200 ml. de etanol. Al cabo de un período de transformación de 48 horas, en el equipo y el medio que se describen en el referido artículo, se efectúa la extracción con cloruro de metileno y el residuo sólido crudo, cristalino, se lava tres veces con porciones de 5 ml. de cloroformo helado. El rendimiento de compuesto VIIa es de 0,9 g. El producto se vuelve a cristalizar de una solución de acetona y hexano.

(B) 1-dehidrocortisona (IIa)

A una solución de 0,4 g. de VIIa en 10 ml. de piridina anhidra se agregan 0,11 g. de anhídrido acético. Se deja en reposo la mezcla de reacción a la temperatura ambiente de un día para otro y luego se agrega a una mezcla de 0,15 g. de trióxido de cromo en 15 ml. de piridina (el reactivo de trióxido



de cromo y piridina se prepara según indica el artículo de Poos y compañeros en el J. Am. Chem. Soc., 75, 422 (1953). La mezcla resultante se deja en reposo de un día para otro a la temperatura ambiente y luego se vierte en 5 volúmenes de agua. Se hace la extracción del producto con cloruro de metileno y se lavan los extractos con agua con ácido sulfúrico diluido y luego nuevamente con agua. La solución en cloruro de metileno se deseca sobre sulfato de magnesio y se concentra al vacío. La cristalización del 21-acetato de IIa se efectúa de una solución de acetona y hexano, obteniéndose 0,21 g. del sólido cristalino (IIb).

A una solución de 0,12 g. del 21-acetato de IIa en 3,3 ml. de metanol químicamente puro se agregan 0,0315 g. de bicarbonato de potasio en 0,5 ml. de agua. La mezcla se somete a reflujo durante 3 minutos y se enfría rápidamente. Luego se diluye con agua, se neutraliza con ácido clorhídrico diluido y se hace la extracción con cloruro de metileno. Los extractos se desecan y se concentran. El residuo se cristaliza de una solución de acetona y hexano, obteniéndose 0,051 g. de 1-dehidrocortisona (IIIa).

Ejemplo 25

(A) 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona (IIIa)

La 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona (0,5 g.) se trata con un cultivo de Curvularia lunata (QM 120 h.) que se prepara de la siguiente manera. La Curvularia lunata se desarrolla durante dos días en frascos agitadores a una temperatura de 28° en un medio de maltosa, sacarosa y sales. Cien ml. del crecimiento resultante se utiliza para inocular 2000 ml. del mismo medio contenido en un fermentador provisto de un aireador sumergido. El medio inoculado se agita a 1700 revoluciones por minuto y se airea a razón de 0,5 volumen de



aire por volumen de medio por minuto durante 22 horas en baño maría a una temperatura de 28°. Cincuenta gramos de micelio húmedo, obtenido por filtración del caldo resultante, se agregan a 2000 ml. de agua y el referido esteroide en un fermentador semejante. Después que la suspensión de micelio y esteroide se agita de la manera antes descrita, durante 22 horas, se hace la extracción con cloroformo. Los extractos al cloroformo se desecan, se concentran hasta dejar un residuo, y se cromatografían sobre Florisil. Se prepara la columna de Florisil con hexano, se agrega la mezcla del esteroide en una solución de cloruro de metileno y se lleva a cabo la elución con cloruro de metileno y mezclas de cloruro de metileno y metanol. La materia inicial que ha quedado sin reaccionar se eluta en 0,5% de metanol en cloruro de metileno y el producto deseado IIIa se eluta en 1 a 2% de metanol en cloruro de metileno. De 0,5 g. del 1-dehidro del Compuesto S se obtienen 0,17 g. de IIIa en forma de un sólido cristalino, con punto de fusión de 237 a 239° C.

(B) 1-dehidrocortisona (IIa)

El compuesto IIIa se convierte en el compuesto IIa por el mismo procedimiento que se emplea para convertir el compuesto VIIa en compuesto IIa. De 0,400 g. de IIIa se obtuvieron 0,205 g. de IIa.

En los Ejemplos 26 y 27, que siguen se describe el procedimiento químico para la introducción del enlace doble 1,2.

Ejemplo 26

1-dehidrocortisona (IIa)

Una solución de 1 g. de 21-acetato de alopregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona en 15 ml. de ácido acético se broma mediante adición de 0,80 g. de bromo en 10 ml. de ácido acético. Al agregarse agua se precipita el 21-acetato de



2,4-dibromoalopregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona.

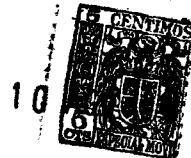
Sin purificarse el dibromuro (1,5 g.) se somete a reflujo en 50 ml. de 8-colidina durante 1 hora. Se agregan cloroformo y agua, se lava el extracto orgánico con ácido sulfúrico diluido, luego con agua, y se deseca y evapora. El producto crudo se cromatografía sobre Florisil, obteniéndose el 21-acetato de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (Ib. R = acetilo), con punto de fusión de 232 a 235^o (desc.)

De manera análoga, bromando el 21-acetato de pregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona con 2 equivalentes de bromo y deshidrobromándolo por medio de colidina : obtiene el 21-acetato de 1-dehidrocortisona. Bromando el 21-acetato de alopregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona en las posiciones 2 y 4 mediante tratamiento por bromo dehidrocortisol. seguido de deshidrobromación con colidina, se obtiene el 21-acetato de 1-

De manera semejante, dibromando el 21-acetato de pregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona con 2 moles de bromo y deshidrobromándolo a continuación con colidina, se obtiene el 21-acetato de 1-dehidrocortisol.

El 21-acetato de alopregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona empleado en esta modificación de nuestro método puede prepararse hidrogenando 2,00 g. de acetato de cortisona en 200 ml. de acetato de etilo con hidrógeno a la presión atmosférica y a la temperatura ambiente, empleando 0,20 g. de 5% de paladio en carbón vegetal como catalizador. Se deja proseguir la reacción de un día para otro. luego se quita el catalizador por filtración y el filtrado se evapora bajo presión reducida. El compuesto alopregnano se cristaliza nuevamente de una solución de acetona.

De modo análogo puede obtenerse el 21-acetato de alopregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona hidrogenando 5,0 g. de 21-acetato del Compuesto F en 750 ml.



de acetato de etilo con hidrógeno en presencia de 0,5 g. de 5% de paladio en carbón vegetal como catalizador.

El 21-acetato de IIa que se obtiene, y lo mismo puede decirse del IIIa, puede hidrolizarse mediante reflujo con bicarbonato de potasio en metanol acuoso, para obtener el alcohol libre.

Ejemplo 27

21-acetato de 1,4-pregnadieno-11a,17a,21-triol-3,20-diona

Una solución de 2,0 g. de 21-acetato de pregnano-11a,17a,21-triol-3,20-diona en 25 ml. de ácido acético se broma en las posiciones 2 y 4 mediante adición de 1,60 g. de bromo en 15 ml. de ácido acético. El 21-acetato de 2,4-dibromopregnano-11a,17a,21-triol-3,20-diona crudo se precipita al agregarse agua.

La deshidrobromación con 100 ml. de colidina durante 1 hora da, después de la cromatografía, 21-acetato de 1,4-pregnadieno-11a,17a,21-triol-3,20-diona (VIIb).

La hidrólisis con bicarbonato de potasio en metanol acuoso durante 10 minutos en reflujo da la 1,4-pregnadieno-11a,17a,21-triol-3,20-diona (VIIa).

La oxidación del acetato con CrO_3 , N-bromoacetamida o N-bromosuccinimida produce el compuesto IIb.

Los Ejemplos 28 a 32 ilustran los métodos de introducir el enlace doble 1,2 por medios químicos.

Ejemplo 28

A. 2,21-diacetato de 4-pregneno-2,17a,21-triol-3,11,20-triona
(IIb)

Se calienta una solución de 2,0 g. de 21-acetato de 6-bromo-4-



pregнено-17 α ,21-diol-3,11,20-triona en 100 ml. de ácido acético glacial, bajo reflujo, en una atmósfera de nitrógeno con 10 g. de acetato de potasio anhidro durante cuatro horas. La mezcla de reacción se diluye luego con agua y se extraen los productos con acetato de etilo. Los extractos se desecan, se concentran al vacío y se absorbe el residuo en un pequeño volumen de cloruro de metileno. La solución resultante se cromatografía sobre Florisil (silicato de magnesio) y la sustancia sólida que se eluta con 50% de éter y hexano se cristaliza nuevamente varias veces de una solución de acetona y hexano, obteniéndose el 2,21-diacetato de 4-pregнено-2,17 α ,21-triol-3,11,20-triona, con punto de fusión de 210 a 215° C. λ alcohol 238 (ϵ = 14.700).
max.

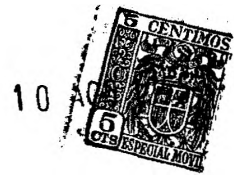
B. 4-pregнено-2,17 α ,21-triol-3,11,20-triona (IIIh)

A una solución en reflujo de 1,0 g. de IIIh en 100 ml. de metanol químicamente puro, bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregan 0,45 g. de bicarbonato de potasio disuelto en 10 ml. de agua. La mezcla se somete a reflujo durante 3 a 5 minutos y se ajusta luego el pH a 6,8 - 7,0 mediante adición de ácido acético. La mezcla resultante se concentra luego al vacío hasta que se forma un residuo sólido, se lixivia bien el residuo con acetato de etilo y se concentran los extractos. Luego se cristalizan los residuos de una solución de acetona y hexano, obteniéndose la 4-pregнено-2,17 α ,21-triol-3,11,20-triona.

Ejemplo 29

A. 11-formiato 21-acetato de 6-bromo-4-pregнено-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona (IVh)

A 160 ml. de clorobenceno se agregan 1,6 g. de 11-formiato 21-acetato de 4-pregнено-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona y se calienta la mezcla hasta que la solución del esteroide sea completa. Se añaden luego 180 ml. de tetracloruro de carbono seco y se hierve la mezcla para eliminar el agua. Luego se



10

agregan 4,2 ml. de una solución de piridina al 10% en tetracloruro de carbono y 0,79 g. de N-bromosuccinimida, se hace burbujear anhídrido carbónico por la mezcla, se ilumina la mezcla aplicando una bombilla esmerilada de 50 vatios, colocada en contacto con el frasco y se calienta la mezcla de reacción rápidamente hasta la ebullición. Al cabo de 10 a 20 minutos de calentamiento la N-bromosuccinimida ha reaccionado por completo; la solución se enfría, se lava con agua y se concentra al vacío. El residuo puede cristalizarse de una solución de cloruro de metileno y hexano, obteniéndose el compuesto IVh cristalino.

B. 11-formiato 2,21-diacetato de 4-pregнено-2,11β,17α,21-tetrol-3,20-diona

La reacción se lleva a cabo exactamente como se describe en el Ejemplo 2B, sólo que el esteroide que sirve de punto de partida es el compuesto IVh. El producto antes mencionado se cromatografía sobre Florisil y se reúnen las fracciones cristalinas (50% de éter y hexano y 100% de éter) y se recristalizan de una solución de acetona y hexano.

C. 4-pregнено-2,11β,17α,21-tetrol-3,20-diona (VIh)

Se trata una solución de 0,5 g. del triéster en 50 ml. de metanol químicamente puro con una solución de 0,165 g. de hidróxido de sodio en 5 ml. de agua en una atmósfera de argón. Se deja en reposo la mezcla de reacción de un día para otro a la temperatura ambiente y luego se neutraliza con ácido acético. La solución se concentra al vacío y se hace la extracción completa del residuo con acetato de etilo. Los extractos se concentran y se cristaliza el residuo de una solución de acetona y hexano, obteniéndose la 4-pregнено-2,11β,17α,21-tetrol-3,20-diona (VIh) cristalina.



10

Ejemplo 30

A. 21-acetato de 1,2-oxidopregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (III) de 21-acetato

A una solución de 0,4 g./da 1-pregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (II) en 100 ml. de cloroformo a una temperatura de 5° C. se agregan 0,14 g. de ácido perbenzoico en 25 ml. de cloroformo. La mezcla resultante se deja en reposo de un día para otro a 5° C. y luego se lava con bicarbonato de sodio acuoso diluído. La solución al cloroformo se seca luego y se concentra al vacío. El residuo se cristaliza de una solución de acetona y hexano, obteniéndose el compuesto III cristalino.

B. 21-acetato de 2-bromopregnano-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona (IIIi)

A una solución de 0,42 g. de IIIi en 100 ml. de cloroformo a una temperatura de 5° C. se agregan 0,08 g. de bromuro de hidrógeno anhidro disuelto en 100 ml. de cloroformo. Se deja en reposo la mezcla a 5° C. durante una hora y luego se concentra al vacío. El residuo se cristaliza de una solución de cloruro de metileno y hexano, obteniéndose el compuesto IIIi cristalino.

C. 21-acetato de pregnano-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona (IVi)

Se agita una solución de 1 g. de IIIi en 100 ml. de metanol con 10 g. de 10 % de paladio en carbonato de calcio, como catalizador, en una atmósfera de hidrógeno a la presión atmosférica. Después que se ha absorbido un equivalente de hidrógeno (al cabo de varias horas de agitación), se filtra el catalizador de la solución y se concentra el filtrado al vacío hasta obtenerse un residuo sólido (IVi).

D. 1,21-diacetato de pregnano-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona (Vi)

El producto IVi crudo se disuelve en una mezcla de 0,5 ml. de anhídrido acético y 5 ml. de piridina. Se deja proseguir la reacción de un día para



otro y luego se diluye la mezcla con agua helada. El precipitado resultante se filtra y se cristaliza de nuevo de una solución de cloruro de metileno y hexano, obteniéndose el 1,21-diacetato de pregnano-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona (VI) cristalino.

E. 1,21-diacetato de 4-bromopregnano-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona (VII)

A una solución de 0,46 g. de VI en 50 ml. de ácido acético glacial se agregan 0,5 ml. de bromuro de hidrógeno 0,28 N en ácido acético. Luego se agrega gota a gota, con buena agitación, una solución que contiene 0,16 g. de bromo, 0,08 g. de acetato de sodio y 15 ml. de ácido acético glacial a un grado tal que cada gota tenga oportunidad de reaccionar antes de que se agregue otra gota. Cuando la adición se ha terminado de hacer la mezcla de reacción se diluye con cinco volúmenes de agua y el compuesto VII precipitado se recoge por filtración.

F. 1,21-diacetato de 4-pregneno-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona (VIII)

A una solución de 0,54 g. de VII en 50 ml. de ácido acético glacial se agrega, bajo una atmósfera de anhídrido carbónico, una solución que contiene 0,25 g. de clorhidrato de semicarbazida, 180 mg. de acetato de sodio anhidro, 10 ml. de agua y 10 ml. de ácido acético glacial. La mezcla se agita durante diez minutos y se agregan 20 ml. de acetato de sodio 1 N en ácido acético glacial. Se continúa la agitación durante 10 minutos más, se agregan 2 ml. de ácido pirúvico y se somete la mezcla al reflujo durante diez minutos. La solución enfriada se diluye con agua y se hace la extracción con cloruro de metileno. Los extractos se lavan con agua para quitarles el ácido y se deseca la solución sobre sulfato de magnesio. La concentración de la solución seca y la adición de hexano provocan la cristalización de VIII.



El 21-acetato de pregnano-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona puede bromarse y deshidrobromarse por el procedimiento descrito en Ejemplo 30, E y F, produciendo el 21-acetato de 4-pregneno-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona.

Ejemplo 31

Conversión del 21-acetato de 1-pregneno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona en 1,21-diacetato de 4-pregneno-1,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona

Mediante la misma serie de reacciones indicadas en el Ejemplo 30 A a 30 F, y esencialmente en las mismas condiciones, el 21-acetato de 1-pregneno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona se transforma por los mismos pasos y por vía del 21-acetato de 1,2-oxidopregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona, 21-acetato de 2-bromopregnano-1,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona, 21-acetato de pregnano-1,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona, 1,21-diacetato de pregnano-1,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona y 1,21-diacetato de 4-bromopregnano-1,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona en 1,21-diacetato de 4-pregneno-1,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona.

El 21-acetato de pregnano-1,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona puede bromarse de manera análoga y deshidrobromarse mediante el procedimiento arriba descrito, dando el 21-acetato de 4-pregneno-1,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona.

Ejemplo 32

Eliminación del grupo 1-hidroxi con alúmina

A. Una solución de 0,1 g. de 21-acetato de 4-pregneno-1,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona en 100 ml. de cloroformo se pasa sobre una columna de alúmina activada (30 g. con tamaño de partícula que pasa por un tamiz de 100 a 200 mallas) y la columna se lava luego con metanol. Los eluados reunidos se concentran y el residuo, que cristaliza de una solución de acetona, es idéntico en todos sentidos al 21-acetato de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona



(21-acetato de 1-dehidrocortisol).

B. Una solución de 0,1 g. de 21-acetato de 4-pregneno-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona en 100 ml. de cloroformo se hace pasar de modo análogo sobre una columna de alúmina activada (30 g. de 100 a 200 mallas) y la columna se lava luego con metanol. Los eluados reunidos se concentran y se cristaliza el residuo de una solución de acetona. El producto es el 21-acetato de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona (21-acetato de 1-dehidrocortisona).

En los Ejemplos 33 a 35 se describen los métodos para la introducción del grupo 9 α -halógeno en los compuestos 1,4-pregnadieno-2-ol.

Ejemplo 33

21-acetato de 1,4,9(11)-pregnatrieno-17 α ,21-diol-3,20-diona (IIj)

La 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona (IIIa) se acetila con ácido acético en piridina, y a 1,22 g. de tal éster disuelto en piridina y enfriado en hielo se agregan 0,30 ml. de oxiclورو de fósforo y se deja reposar la mezcla de reacción de un día para otro a la temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo se concentra la solución al vacío a una temperatura de 25° C. hasta un volumen de 5 ml., y se agregan 50 ml. de agua. El aceite que se separa se absorbe en acetato de etilo y se lavan los extractos una vez con agua, con ácido clorhídrico 1 N hasta que queden exentos de piridina, con agua nuevamente y luego con una solución de bicarbonato de sodio al 5%. La solución de acetato de etilo se deseca luego y se concentra al vacío. El residuo se tritura con éter, lo que da lugar a la cristalización del 21-acetato de 1,4,9(11)-pregnatrieno-17 α ,21-diol-3,20-diona.



Ejemplo 34

9 α -fluoro-1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona

La 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona (VIIa) se 21-acetila; a una solución de 1,0 g. del acetato en 15 ml. de piridina anhidra a una temperatura de 0° se agrega 1,0 g. de cloruro de p-tolueno-sulfonilo. La mezcla de reacción se deja calentar a la temperatura ambiente, quedando en reposo de un día para otro. Luego se diluye con agua helada y el precipitado resultante del 21-acetato de sulfonato de 11 α -p-tolueno (Ij) se quita de la solución por filtración.

Una solución de 1,0 g. de Ij en 25 ml. de ácido acético que contiene 2,0 g. de acetato de sodio se somete a reflujo durante cuarenta y cinco minutos. La solución resultante se concentra al vacío y el residuo se lixivia con cloruro de metileno. El extracto al cloruro de metileno se lava con agua para quitarle el ácido acético y se deseca sobre sulfato de magnesio. La solución desecada se concentra y el residuo se tritura con éter. El producto (IIj) se cristaliza de una solución de acetona y hexano.

A una suspensión de 2,0 g. de IIj finamente dividido en 200 ml. de dioxano purificado y 20 ml. de agua se agrega 1,0 g. de N-bromacetamida y 10 ml. de ácido perclórico acuoso 1 N. La mezcla se agita de vez en cuando hasta que se haya disuelto todo el sólido suspendido. Al cabo de una hora se agrega sulfito de sodio acuoso para destruir el exceso de N-bromacetamida. Se hace luego la extracción completa de la solución resultante con cloruro de metileno y los extractos se lavan con agua para quitarles el ácido. Después de desecarse sobre sulfato de magnesio se concentra la solución al vacío y el residuo se cristaliza de una solución de acetona, obteniéndose



10

el 21-acetato de 9 α -bromo-1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona cristalino.

Una solución de 1,0 g. del compuesto 9 α -bromo el 100 ml. de metanol que contiene 2 g. de acetato de potasio anhidro se somete a reflujo durante una hora y se concentra hasta que quede un residuo. El sólido se lixivia bien con cloruro de metileno y los extractos se lavan bien con agua. Una vez secos los extractos se concentran y se cristalizan de una solución de acetona y hexano, obteniéndose el 21-acetato de 9,11-oxido-1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona cristalino.

Una solución de 1,0 g. del compuesto oxido en 50 ml. de cloroformo libre de alcohol se satura con fluoruro de hidrógeno anhidro a la temperatura de 0° C. Después de estar 5 horas a esta temperatura, el exceso de fluoruro de hidrógeno y el disolvente se quitan al vacío a la temperatura de 0° y el residuo se cristaliza de una solución de acetona y hexano, obteniéndose el 21-acetato de 9 α -fluoro-1-dehidrocortisol cristalino. Este último se hidroliza luego en una solución de metanol y cloroformo con ácido clorhídrico acuoso a una temperatura de 20 a 25° C. por espacio de unas 48 horas, obteniéndose el 21-ol (9 α -fluoro-1-dehidrocortisol) libre, que se cristaliza de una solución de acetona y hexano.

El 21-acetato puede oxidarse y convertirse en el 21-acetato de 9 α -fluoro-1-dehidrocortisona agregando a una solución de 162 mg. del primero en 10 ml. de ácido acético glacial, gota a gota, una solución de 30 mg. de trióxido de cromo en 0,5 ml. de agua y 2 ml. de ácido acético glacial. Al cabo de 6 horas la solución verde se diluye con 2 ml. de metanol y se concentra al vacío. El residuo se lixivia bien con cloruro de metileno y los extractos



se desecan sobre sulfato de magnesio anhidro. La concentración de la solución desecada produce el 21-acetato de 9 α -fluoro-1-dehidrocortisona cristalino, que puede hidrolizarse fácilmente convirtiéndose en el 21-ol libre (IV, Z = F).

Ejemplo 35

9 α -cloro-1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona

Una solución de 1,0 g. de 21-acetato de 9(11)-oxido-1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona en 50 ml. de cloroformo libre de alcohol se satura con cloruro de hidrógeno anhidro a una temperatura de 0°. Después de estar 5 horas a esta temperatura el exceso de cloruro de hidrógeno y el disolvente se eliminan al vacío a la temperatura de 0° y el residuo se cristaliza de una solución de acetona y hexano, dando el 21-acetato de 9 α -cloro-1-dehidrocortisol cristalino. Este último se hidroliza luego, dando el compuesto 21-ol libre.

Oxidando el acetato de la manera descrita en el ejemplo que antecede se obtiene el 21-acetato de 9 α -cloro-1-dehidrocortisona, que puede hidrolizarse luego, convirtiéndose en el 21-ol libre.

El éster del Ejemplo 33 puede hidrolizarse sometiendo a reflujo una mezcla de 1,0 g. del éster en 10 ml. de metanol bajo nitrógeno y agregándole 0,22 g. de bicarbonato de sodio en 1 ml. de agua. Se continúa el reflujo durante diez minutos, y la mezcla de reacción se neutraliza luego con ácido acético. Se quitan los disolventes al vacío, se lixivia el residuo con cloruro de metileno y se provoca la cristalización del 21-alcohol libre mediante adición de hexano a la solución de cloruro de metileno concentrada. Los ejemplos que siguen se refieren a la preparación de los ésteres de acción



prolongada de los 1,4-pregnadienos e indican en qué forma pueden utilizarse estos grupos estéricos para proteger el 21-hidroxilo en el curso de la síntesis de los pregnadienos.

Ejemplo 36

21-(5'-t-butilfuroato) de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona

Se disuelve 1 gramo de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona en 10 ml. de piridina, se enfría con agitación en un baño de hielo y se trata con 0,6 g. de cloruro de 5-t-butilfuroilo. Después de agitarse de un día para otro, se vierte la mezcla en ácido sulfúrico diluido y se hace la extracción del sólido con éter. El producto crudo se cristaliza de una mezcla de benceno y metanol, obteniéndose el producto puro que se funde con descomposición a una temperatura de 237 a 239° C.

Ejemplo 37

A. 21-(2', 4'-diclorofenoxiacetato) de pregnano-3 α ,17 α ,21-triol-11,20-diona

Se disuelven 100 gramos de pregnano-3 α ,17 α -diol-11,20-diona en un litro de cloroformo que contiene 1% de etanol, y la mezcla se enfría a una temperatura de 10° C. y se trata con 12 g. de bromuro de hidrogeno gaseoso. Después de enfriarse a una temperatura de -20° C., y mientras está a menos de -10° C., se trata la mezcla con una solución de 48 g. de bromo en 650 ml. de cloroformo por espacio de tres horas. La mezcla de reacción se concentra luego hasta 250 ml. al vacío a una temperatura inferior de 25° C. Se agregan a la solución 800 ml. de acetona y luego 200 g. de 2,4-diclorofenoxiacetato potásico (obtenido por evaporación al vacío de una solución metanólica de ácido 2,4-diclorofenoxiacético neutralizado con carbonato de potasio). La mezcla se trata con 200 ml. de agua, se mezcla bien y se somete a reflujo por espacio de 16 horas. Se quita



luego el disolvente por destilación a vapor, después de agregarse 500 ml. de agua y se calienta la mezcla 30 minutos a una temperatura de 100°C. El producto se recoge por filtración y se lava tres veces con agua caliente. Este se cristaliza de una solución acuosa de metanol, obteniéndose el 21-(2',4'-diclorofenoxiacetato) de pregnano-3 α ,17 α ,21-triol-11,20-diona puro.

B. 21-(2',4'-diclorofenoxiacetato) de pregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona

El residuo crudo húmedo del Ejemplo 37A se disuelve en 1170 ml. de acetona y 100 ml. de agua. Se enfría la solución a -5°C. y se ajusta el pH a 2,4 con ácido clorhídrico 6 N (0,2 a 1,0 ml.). Se agregan en la oscuridad 89,8 g. de N-bromosuccinimida y la mezcla se mantiene durante una hora a la temperatura de -5°C. A la solución roja se agrega suficiente solución de sulfito de sodio (123 g. de sulfito de sodio en 670 ml. de agua) para ajustar el pH a 4,5 - 5,0, y se destila la mezcla a vapor hasta que la temperatura llegue a 100°C., durante una hora. El producto se separa por filtración y se lava tres veces con agua caliente y se deseca. El 21-(2',4'-diclorofenoxiacetato) de pregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona crudo se purifica mediante cristalización de una mezcla de acetona y metanol.

C. 21-(2',4'-diclorofenoxiacetato) de 2,4-dibromopregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona.

Se disuelven 10 gramos del producto del Ejemplo 37B en 250 ml. de ácido acético glacial, se agitan y se tratan gota a gota con una solución de 5,85 g. de bromo en 50 ml. de ácido acético con tanta rapidez como se descarga el color (unos treinta minutos). La adición de agua precipita el dibromuro crudo, que se quita por filtración. La cristalización de una solución de acetona y metanol produce el 21-(2',4'-diclorofenoxiacetato) de 2,4-dibromopregnano-17 α ,



21-diol-3,11,20-triona puro.

D. 21-(2',4'-diclorofenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona

Se disuelven 5 gramos del producto del Ejemplo 37C en 25 ml. de quinaldina y se mantienen a una temperatura de 95 a 100° C. durante 16 horas. La mezcla se destila luego a vapor para quitar la quinaldina y se hace la extracción del éster con éter. Se lava la solución con ácido sulfúrico diluido y agua, se deseca y se evapora hasta dejar un residuo. La cromatografía de benceno sobre silicato de magnesio activado da el 21-(2',4'-diclorofenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona puro, que se eluta con benceno y que tiene una rotación específica de como $[\alpha]_D^{25} + 116$ (dioxano).

Ejemplo 38

A. 21-(4'-clorofenoxiacetato) de pregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona.

De la misma manera que en el Ejemplo 36, se tratan dos gramos de pregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona con 1,40 g. de cloruro de 4-clorofenoxiacetilo. El producto crudo se disuelve en metanol y se concentra, dando el 21-(4'-clorofenoxiacetato) de pregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona cristalino.

B. 21-(4'-clorofenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona

Un gramo del producto del Ejemplo 38A se bromó como en el Ejemplo 37A con 0,62 g. de brome en ácido acético. El dibromuro crudo, precipitado con agua, se desecó y disolvió en 10 ml. de tolueno y 5 ml. de 2,4,6-colidina. La mezcla se sometió a reflujo durante 16 horas y se destiló a vapor para quitar los disolventes. El producto crudo se manipuló y cromatografió como en el Ejemplo 37D, y el eluado de benceno se cristalizó de una solución de metanol, obteniéndose el 21-(4'-clorofenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-



3,20-diona, con punto de fusión de 184 a 186°C.

Ejemplo 39

A. 21-(4'-clorofenoxiacetato) de alopregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona

Se esterificaron 10 gramos de 4-pregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona como en el Ejemplo 36 con 7,0 g. de cloruro de 4-clorofenoxiacetilo. El producto crudo se cristalizó de una solución de etanol al 95%, obteniéndose el 21-(4'-clorofenoxiacetato) de 4-pregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona.

Se suspendieron 5 gramos de este éster en 150 ml. de acetato de etilo y se agregó 1 g. de paladio al 5% en carbón vegetal. Se agitó la mezcla con hidrógeno hasta que se absorbió un equivalente (231 cm³ a 25°C.) y se detuvo la absorción. La mezcla se filtró y se concentró la solución hasta 25 ml. El producto que cristalizó se separó por filtración y se desecó. Puede cristalizarse de nuevo de una solución de acetona, obteniéndose el 21-(4'-clorofenoxiacetato) de alopregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona. Este éster se puede preparar también mediante hidrólisis del 21-acetato de alopregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona y nueva esterificación. Diez gramos del 21-acetato se disuelven en 200 ml. de metanol y se tratan con una solución de 2,95 g. de bicarbonato de potasio en 25 ml. de agua. La mezcla se agita durante 24 horas con nitrógeno, que se le hace burbujear lentamente. Se agrega luego ácido acético para neutralizar, se agregan 50 ml. de agua y se concentra la mezcla al vacío hasta un volumen de 125 ml. El precipitado se recoge, se lava con agua y se cristaliza de una solución de metanol diluido, obteniéndose la alopregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona. Se esterifican 5 gramos de este último compuesto como en el Ejemplo 36 con 3,5 g. de cloruro de 4-clorofenoxiacetilo. El producto se cristaliza de una solución de benceno y metanol, para obtener el



21-(4'-clorofenoxiacetato) de alopregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona.

B. 21-(4'-clorofenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona

Dos gramos del producto del Ejemplo 39A se cubren con 25 ml. de ácido acético glacial, se agitan y se tratan gota a gota con 1,25 g. de bromo en 5 ml. de ácido acético. Después que desaparece el color se agrega agua y el dibromuro crudo se separa por filtración y se deseca.

Se suspende 1 g. del dibromuro en 5 ml. de dietilanilina y se calienta a una temperatura de 95 a 100° C. en baño de vapor, agitándose durante seis horas. Luego se vierte la mezcla en ácido sulfúrico diluido y se hace la extracción con cloruro de metileno. La solución se deseca y evapora y el residuo se cristaliza tres veces de una solución de metanol y acetona, obteniéndose el 21-(4'-clorofenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona, con punto de fusión de 184 a 186° C., que es el mismo producto del Ejemplo 38B.

Ejemplo 40

21-(2'-furoato) de 9 α -fluoro-1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona

Se disuelve 1,0 g. de 9 α -fluoro-1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona en 20 ml. de piridina seca y la solución resultante se enfría hasta una temperatura de 0° C. Luego se agregan gota a gota a la solución agitada 0,45 g. de cloruro de 2-furofílo. Se deja calentar lentamente la mezcla de reacción a la temperatura ambiente y se agita de un día para otro. Luego se vierte la mezcla en 200 ml. de ácido sulfúrico acuoso al 10%, frío. El precipitado resultante se filtra y se lava sucesivamente con agua, bicarbonato de sodio acuoso y agua. La recristalización de una solución de metanol y agua produce el éster 21-(2'-furoato) en forma de una sustancia cristalina.



De una manera semejante pueden obtenerse el éster 21-(2'-furoato) de 9 α -fluoro-1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona y los análogos 9 α -cloro de ambos compuestos. Empleando el cloruro de 5-t-butil-2-furoilo, el cloruro de fenoxiacetilo y el cloruro de 2,4,5-triclorofenoxiacetilo, se producen el 21- [(5'-t-butil)-2'-furoato], el 21-fenoxiacetato y el 21-(2',4',5'-triclorofenoxiacetato) de los derivados 9 α -fluoro y 9 α -cloro de 1-dehidrocortisol y 1-dehidrocortisona.

Haciendo reaccionar el correspondiente 21-alcohol libre con el cloruro del ácido, se han obtenido los siguientes ésteres adicionales:

- 21-(5'-bromofuroato) de 1,4-pregnadieno-21-ol-3,20-diona;
- 21-furoato de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona, que tiene un punto de fusión de 240 a 242° C. (con descomposición);
- 21-(4'-metilfenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-11 β ,21-diol-3,20-diona;
- 21-(5'-clorofuroato) de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona;
- 21-(4'-t-butilfenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona, que funde (con descomposición) a 203 - 206° C. ;
- 21-fenoxiacetato de 1,4-pregnadieno-21-ol-3,20-diona;
- 21-(4'-clorofenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona, con punto de fusión de 180 a 182° C. ;
- 21-(4'-metoxifenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona, que tiene un punto de fusión de 130 a 135° C. (con pérdida de solvato);
- 21-(5'-bromofuroato) de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona ;
- 21-fenoxiacetato de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona, con punto de fusión de 196 a 199° C. ;
- 21-(4'-bromofenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona;
- 21-furoato de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona, en dos formas, con puntos de fusión de 233-235° C. y 251-254° C. ;

10



21-(4'-terc. -butilfenoxiacetato) de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona, que tiene un punto de fusión de 130 a 135 ° C. (con pérdida de solvato);

21-fenoxiacetato de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona. con punto de fusión de 205 a 207° C.; y

21-(5'-terc. -butilfurcato) de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona, con punto de fusión de 241 a 243° C.

Estos ésteres se administran de las diferentes maneras que se han descrito arriba.

Como se comprenderá por lo expuesto, el orden de sucesión de las operaciones necesarias para producir un producto deseado partiendo de determinado producto inicial se escoge, de acuerdo con los principios del invento, tomando debidamente en cuenta el posible efecto de los grupos que intervienen o las configuraciones en los pasos subsiguientes del proceso y la presencia necesaria o la introducción previa de un grupo en el que actúa determinado paso del proceso.

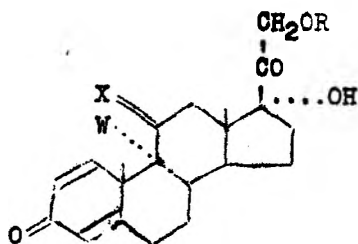
Por la expresión "función oxígeno", según aquí se emplea, ha de entenderse el oxígeno cetónico y los grupos capaces de convertirse en él.



10

REIVINDICACIONES

1. Un método de producir un compuesto de la fórmula



en la cual X representa O o (H, OH); R corresponde a H o acilo; y W es H, F, Cl o Br, caracterizado por el hecho de que un pregnano saturado o un pregnano no saturado desprovisto de una o más de las siguientes características:

(a) el enlace doble 1,2; (b) el enlace doble 4,5; (c) el grupo X; (d) el grupo 17 α -OH; (e) el grupo 21-OR; y (f) el grupo 9 α -fluoro, cloro o bromo, se somete a uno o más tratamientos mediante los cuales se introduce o introducen en la molécula la característica o las características ausentes.

2. Un método según la reivindicación 1, en el cual el compuesto que sirve de punto de partida tiene una función oxígeno en las posiciones 3 y 20.

3. Un método según la reivindicación 2, en el cual la función oxígeno es oxígeno cetónico, un grupo hidroxilo o un grupo éster.

4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual el compuesto inicial se somete a uno por lo menos de los siguientes pasos en cualquier orden;

- (a) introducción de un enlace doble 1,2;
- (b) introducción de un enlace doble ligado al carbono 5;
- (c) introducción de una función 11-oxígeno;
- (d) introducción de una función 17 α -oxígeno;



10

(e) introducción de una función 21-oxígeno;

(f) introducción de un grupo 9 α -fluoro, cloro o bromo;

comprendiendo dichos pasos en todo caso la introducción de un enlace doble 1,2.

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, en el cual el compuesto inicial tiene un enlace doble ligado por lo menos a uno, pero a no más de tres de las posiciones 1, 4, 6, 9(11) y 16.

6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el compuesto inicial tiene un enlace doble ligado a un carbono del anillo A.

7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el compuesto inicial tiene un grupo hidroxilo o un grupo éster en una, por lo menos, de las posiciones 11, 17 α , 20 y 21.

8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual se introduce un enlace doble en el anillo A mediante tratamiento del compuesto inicial con un cultivo de un microorganismo deshidrogenante que no degrada simultáneamente la molécula o con una materia enzimática separada de tal cultivo.

9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual la introducción de un enlace doble 1,2 se efectúa mediante tratamiento con un cultivo de un microorganismo deshidrogenante que no degrada simultáneamente la molécula o con la materia enzimática separada de tal cultivo.

10. Un método según la reivindicación 8 ó 9, en el cual el microorganismo es un miembro de la familia Corynebacteriaceae.

11. Un método según la reivindicación 10, en el cual el microorganismo es un miembro del género Corynebacterium.



12. El método según la reivindicación 11, en el cual el microorganismo es el Corynebacterium simplex.
13. Un método según la reivindicación 11, en el cual el microorganismo es el Corynebacterium hoagii.
14. Un método según la reivindicación 8 ó 9, en el cual el microorganismo es el Bacillus sphaericus, variedad fusiformis.
15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el cual el compuesto que sirve de punto de partida tiene un grupo 11-hidroxilo.
16. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el cual el grupo 11-hidroxilo se introduce microbiológicamente.
17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el cual se introduce el grupo 11 β -hidroxilo por medios químicos.
18. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el cual el grupo 21-hidroxilo se introduce microbiológicamente.
19. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el cual el grupo 17 α -hidroxilo se introduce microbiológicamente.
20. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el cual el grupo 17 α -hidroxilo se introduce por medios químicos.
21. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el cual se introduce el grupo 9 α -halógeno en un 1,4-pregnadieno.
22. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y 18 a 20, en el cual los grupos 9 α -halógeno y 11 β -hidroxilo se introducen en un 1,4-pregnadieno.
23. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 y 22, en el cual el grupo 11-hidroxilo se oxida subsiguientemente formando un oxígeno



cetónico.

24. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual se introduce el enlace doble 1,2 por medios químicos.

25. Un método según la reivindicación 24, en el cual se introduce una función oxigenada en la posición 1 y luego se le divide.

26. Un método según la reivindicación 24, en el cual se introduce una función oxigenada en la posición 2 y luego se le divide.

27. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual se introducen los dos enlaces dobles en el anillo A por medios químicos.

28. Un método según la reivindicación 27, en el cual el anillo A del compuesto inicial se satura y se broma en las posiciones 2 y 4, después de lo cual se deshidrobroma el compuesto.

29. Un método según la reivindicación 21, en el cual se introduce el átomo 9 α -halógeno en un 1,4,9(11) pregnatrieno.

30. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, 16, 17 y 21 a 24, en el cual la 4-pregneno-17 α ,21-diol-3,20-diona, o el éster de la misma, se hidroxila en la posición 11, y se deshidrogena para producir un enlace doble entre los carbonos 1,2, en uno u otro orden.

31. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y 16 a 24, en el cual se hidroxila la progesterona en la posición 11, en la posición 17 α , y en la posición 21, y se deshidrogena en el anillo A para introducir un enlace doble 1,2 después de la hidroxilación.

32. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, 18 a 21 y 24 a 28, en el cual se introduce un 11-hidroxilo en una 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,20-diona o su éster, y, si se desea, se oxida el 11-hidroxilo



formando un oxígeno cetónico o se hidroliza el grupo éster.

33. En un procedimiento adecuado para emplearse en la fabricación de los pregnadienos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 7, el paso que consiste en someter un compuesto pregneno que tiene un enlace doble ligado al carbono 5, y un grupo hidroxilo en una posición que no sea la posición 3, a la acción de un cultivo de un microorganismo deshidrogenante que no degrada simultáneamente la molécula o a la acción de una materia enzimática separada de tal cultivo, a fin de introducir un enlace doble en el anillo A, y separar el pregnadieno así formado.

34. Un método según la reivindicación 33, en el cual el compuesto inicial es 5-pregнено-3,20-diol.

35. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el cual el compuesto inicial es un 3-ceto-4-pregнено o un 3-hidroxi-5-pregнено o un éster de los mismos.

36. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en el cual el compuesto inicial es 5-pregнено-3,17 α ,21-triol-11,20-diona, 5-pregнено-3,17 α ,20,21-tetrol-11-ona, 5-pregнено-3,11(α o β),17 α ,21-tetrol-20-ona, 5-pregнено-3,11(α o β),17 α ,20,21-pentol, 4-pregнено-17 α ,21-diol-3,20-diona o un éster de los mismos.

37. En un procedimiento adecuado para emplearse en la fabricación de los compuestos que define la reivindicación 1, el paso que consiste en someter la 4-pregнено-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona, 4-pregнено-17 α ,21-diol-3,20-diona, corticosterona, desoxicorticosterona, 5-pregнено-3 β ,20-diol-17 α -hidroxi-progesterona, 4-pregнено-11 β ,21-diol-3,20-diona, 4-pregнено-21-ol-3,20-diona, 4-pregнено-21-ol-3,11,20-triona, 4-pregнено-11 α ,17 α ,20,21-



tetrol-3-ona, o 5-pregнено-3,11 α ,17 α ,21-tetrol-20-ona, a la acción de un microorganismo deshidrogenante según se define en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14.

38. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el cual el compuesto inicial es cortisona, hidrocortisona o un éster de las mismas.

39. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el cual el compuesto inicial es un pregnadieno que tiene un enlace doble ligado a cada uno de los carbonos 4 y 6, y que comprende el paso de hidrogenar en parte el 1,4,6-pregnatrieno a fin de saturar el enlace doble ligado al carbono 6.

40. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el cual el compuesto inicial contiene un grupo 9 α -fluoro, cloro o bromo.

41. Un método según la reivindicación 40, en el cual el grupo 9 α -halógeno es fluoro.

42. Un método según la reivindicación 40, en el cual el compuesto inicial es 9 α -halógeno-4-pregнено-21-ol-3,11,20-triona; 9 α -halógeno-4-pregнено-17 α ,21-diol-3,11,20-triona; 9 α -halógeno-4-pregнено-11 β ,21-diol-3,20-diona; o 9 α -halógeno-4-pregнено-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona.

43. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y 16 a 18, en el cual el compuesto inicial es 17 α -hidroxi-progesterona o 5-pregнено-3,17 α -diol-20-ona.

44. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, 16 y 19, en el cual el compuesto inicial es desoxicorticosterona o 5-pregнено-3,21-diol-20-ona, o uno de sus ésteres, efectuándose los tratamientos en cualquier orden.



45. Un método según la reivindicación 20, en el cual se hace reaccionar un 1,4,16-pregnatrieno con un perácido o con peróxido de hidrógeno a fin de formar el derivado 16,17-óxido, que se hidroliza subsiguientemente para introducir un grupo 17 α -hidroxilo.

46. Un método según la reivindicación 45, en el cual se forma el trieno hidrogenando un pregnadieno que tiene un enlace doble ligado al carbono 5 y un segundo enlace doble en la posición 16,17, formándose el grupo oxido con anterioridad a la deshidrogenación si no hay presente un hidroxilo en una posición distinta de la posición 3.

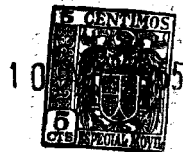
47. Un método según la reivindicación 45, en el cual el compuesto inicial tiene un grupo hidroxilo o un grupo aciloxi en la posición 21 o un grupo hidroxilo en la posición 11.

48. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, 16, 18 y 20, en el cual se oxigena primero un pregnadieno que tiene un enlace doble ligado al carbono 5 y un segundo enlace doble en la posición 16,17, y luego se deshidrogena en el anillo A.

49. Un método según la reivindicación 48, en el cual el compuesto inicial es 16-dehidropregnenolona o su éster o 16-dehidroprogesterona.

50. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, 16 y 20, en el cual la 5,16-pregnadieno-3 β ,21-diol-20-ona o un diéster de la misma, se convierte en el 16,17-epóxido, en uno u otro orden, y luego se hidroliza a fin de introducir un grupo 17 α -hidroxilo.

51. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y 18, en el cual se somete la 16-dehidropregnenolona a la acción de un cultivo de un microorganismo 21-hidroxilante, y luego a la acción de un microorganismo



deshidrogenante para producir 1,4,16-pregnatrieno-21-ol-3,20-diona.

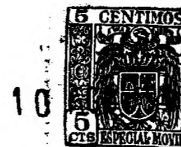
52. Un método según la reivindicación 27, en el cual el compuesto normal o el compuesto alo-pregnano-2,4-dibromo-11X-17 α ,21-diol-3,20-diona o su 21-éster se hace reaccionar con un agente deshidrobromante a fin de introducir dos enlaces dobles en el anillo A, correspondiendo X a 0 ó H, OH(α o β).

53. Un método según la reivindicación 52, en el cual se hace reaccionar el 21-acetato de pregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona con bromo para formar el 2,4-dibromuro, y se di-deshidrobroma el dibromuro para producir el 21-acetato de 1,4-pregnadieno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona y, si se desea, se hidroliza el grupo éster.

54. Un método según la reivindicación 27, en el cual el 21-acetato de pregnano-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona se hace reaccionar con bromo para formar el 2,4-dibromuro, di-deshidrobromándose el dibromuro para producir el correspondiente compuesto 1,4-pregnadieno y oxidándose el grupo 11 α -hidroxilo y convertirlo en un grupo ceto.

55. Un método según la reivindicación 27, en el cual el 21-acetato del compuesto normal o del compuesto alo-pregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona se hace reaccionar con bromo para formar el 2,4-dibromuro y se di-deshidrobroma el dibromuro para formar el correspondiente compuesto 1,4-pregnadieno.

56. Un método según la reivindicación 26, en el cual se convierte un 3-ceto-1-pregneno en el correspondiente compuesto 1,2-óxido, este último se hidroliza con un ácido halohídrico para producir un 1-hidroxi-2-halógeno-3-ceto-pregnano, el halógeno se divide, reemplazándose el grupo 1-hidroxi con un grupo aciloxi, se introduce un halógeno en la posición 4, se deshidro-



halogena el compuesto para producir un enlace doble, 4,5 y se divide sub-
siguientemente el grupo 1-aciloxi para introducir un enlace doble 1,2.

57. Un método según la reivindicación 56, en el cual el compuesto
inicial es un 1-pregneno-11X-17 α ,21-diol-3,20-diona, y sus 21-ésteres, en
la que X corresponde a O ó H,OH(α o β), y en la que el agente halogenante
es bromo, mientras que el ácido halohídrico es el bromuro de hidrógeno.

58. Un método según la reivindicación 25, en el cual se calienta un
3-ceto-6-bromo-1-pregneno con una sal de un metal alcalino de un ácido alca-
noico inferior para formar un 2-alcanoiloxi-3-ceto-1-pregneno, y luego se
divide el grupo acilo en la posición 2, a fin de introducir un enlace doble
1,2.

59. Un método según la reivindicación 58, en el cual el compuesto
inicial es una 1-pregneno-6-bromo-11X-17 α ,21-diol-3,20-diona, en la que X
representa O, H,OH o H,OR, siendo R un alcanóilo inferior.

60. Un método según la reivindicación 58, en el que el compuesto
inicial es 21-acetato de 6-bromo-4-pregneno-17 α ,21-diol-3,11,20-triona y en
la que la sal es la del ácido acético.

61. Un método según la reivindicación 58, en el que el compuesto
inicial es 11-formiato-21-acetato de 6-bromo-4-pregneno-11 β ,17 α ,21-triol-
3,20-diona, y en el que la sal es la del ácido acético.

62. Un método según la reivindicación 21 ó 22, en el cual se deshidrata
un 21-éster de 1-dehidrocortisol a fin de introducir un enlace doble 9(11),
y luego se hace reaccionar el trieno con un reactivo a fin de introducir un
grupo 9 α -bromo y un grupo 11 β -hidroxilo.



63. Un método según la reivindicación 62, en el cual se calienta el producto con una sal metálica de un ácido graso inferior para introducir un grupo 9(11)-óxido, y se abre el grupo óxido con fluoruro de hidrógeno, a fin de producir el compuesto 9 α -fluoro-11 β -hidroxi.

64. Un método según la reivindicación 62, en el cual el agente deshidratante es oxiclórico de fósforo.

65. Un método según la reivindicación 21 ó 22, en el cual se trata un 21-éster de 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona con un agente sulfonilante a fin de producir el 11 α -sulfonato, se calienta luego el diéster con una base débil a fin de dividir el grupo de ácido sulfónico e introducir un enlace doble 9(11) y luego se trata el trieno con un reactivo a fin de introducir un grupo 9 α -bromo y un grupo 11 β -hidroxilo.

66. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, en el cual se acetila cualquier 21-hidroxilo libre que haya en el producto.

67. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, en el cual se esterifica un 21-hidroxilo libre en los compuestos inicial, intermedio o final, con un agente ariloxi-alcanoilante o con un agente furoilante, o con un alcohol, alcohoxi o un producto de sustitución de halógeno del mismo.

68. Un método según la reivindicación 67, en el cual el éster que se forma es el 21-(2'-fuorato).

69. Un método según la reivindicación 67, en el cual el éster que se forma es el 21-[5'-(t-butil)-2'-fuorato].

70. Un método según la reivindicación 67, en el cual el éster que se forma es el 21-(2',4',5'-triclora)-fenoxiacetato.



71. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 66, en el cual se oxida un grupo 1 α -hidroxilo o un grupo 11 β -hidroxilo con un agente oxidante moderado para convertirlo en oxígeno cetónico.

72. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 y 23 a 28, en el cual se esterifica la 1-dehidrocortisona con cloruro de 5-t-butil furóilo.

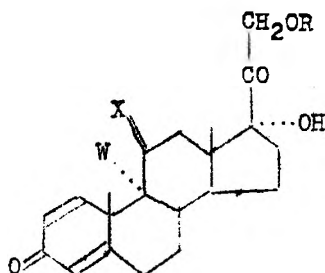
73. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 y 23 a 28, en el cual se esterifica el 1-dehidrocortisol con cloruro de 5-t-butil furóilo.

74. Un método para el tratamiento de la artritis reumatoide, que consiste en administrar 1-dehidrocortisona, 1-dehidrocortisol o un 21-éster de esos compuestos.

75. Los nuevos métodos que aquí se describen.



76. Un compuesto de la fórmula general



en la que X corresponde a O ó H, β -OH; R representa H o un acilo; y W es H, F, Cl o Br.

77. 1-dehidrocortisona.
78. 1-dehidrocortisol.
79. Los 21-ésteres de 1-dehidrocortisona y de 1-dehidrocortisol.
80. Los 21-acetatos de 1-dehidrocortisona y de 1-dehidrocortisol.
81. 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona y sus 21-ésteres.
82. Los derivados 9 α -fluoro-cloro y bromo de 1-dehidrocortisona y de 1-dehidrocortisol.
83. 9 α -fluoro-1-dehidrocortisona.
84. 9 α -fluoro-1-dehidrocortisol.
85. Los ésteres de las 1-dehidro hormonas corticales con ácidos ariloxi-alcanoicos y ácido furoico y los productos de sustitución alcohilo, alcohoxi y halógeno.
86. Los ésteres de los ácidos ariloxiacéticos, haloariloxiacéticos, alcohoxiariloxiacéticos y alchilariloxiacéticos de las 1-dehidro hormonas corticales.
87. Los ésteres de los ácidos furoicos, halofuroicos y alchilofuroicos de las 1-dehidro hormonas corticales.

10



88. Los compuestos según la reivindicación 85, en los cuales las hormonas corticales son 1-dehidrocortisona, 1-dehidrocortisol, 1-dehidro-corticosterona, 1-dehidro-11-desoxi-corticosterona, 1-dehidro-11-desoxi-cortisona, 1-dehidro-17-desoxi-cortisona, 1-dehidro-aldosterona y 1-dehidro-9 α -halocortisona y 1-dehidro-9 α -halo cortisol en las que el átomo del halógeno es flúor, cloro y bromo.

89. Los ésteres 21-(4'-t-butilfenoxiacetato), 21-(4'-clorofenoxiacetato), 21-(2',4'-diclorofenoxiacetato), 21-(2',4',5'-triclorofenoxiacetato), 21-(2'-furoato), 21-(5'-clorofuroato), 21-(5'-bromofuroato) y 21-[(5'-t-butil)-2'-furoato] de los compuestos de las reivindicaciones 76 a 88.

- 90. 21-[(5'-(t-butil)-2'-furoato)] de 9 α -fluoro-1-dehidrocortisol.
- 91. 21-[(5'-(t-butil)-2'-furoato)] de 9 α -fluoro-1-dehidrocortisona.
- 92. 21-(2',4',5'-triclorofenoxiacetato) de 9 α -fluoro-1-dehidrocortisona.
- 93. 21-(2',4',5'-triclorofenoxiacetato) de 9 α -fluoro-1-dehidrocortisol.
- 94. 21-(2'-furoato) de 9 α -fluoro-1-dehidrocortisol.
- 95. 1,4,16-pregnatrieno-3,20-dionas.
- 96. 1,4,16-pregnatrieno-21-ol-3,20-dionas y sus ésteres de alcoholes inferiores.

97. 1,4,16-pregnatrieno-11X-21R-3,20-dionas, en las que X corresponde a O; H,OH(α o β); o H,aciloxi(α o β), y R representa H,OH o aciloxi.

98. 1,4,16-pregnatrieno-3,11,20-trionas y sus derivados 21-ol.

99. 1,4,16-pregnatrieno-11,21-diol-3,20-dionas y sus ésteres de alcoholes inferiores.

100. 16,17-oxido-1,4-pregnadieno-11X-21R-3,20-dionas, en las que X corresponde a H₂, O, o H,OH(α o β), y R representa H, OH o un alcoholeoxi inferior.



101. 16,17-oxido-1,4-pregnadieno-3,20-dionas.
102. 16,17-oxido-1,4-pregnadieno-3,11,20-trionas.
103. 16,17-oxido-1,4-pregnadieno-21-ol-3,20-dionas y sus ésteres de alcanoflos inferiores.
104. 16,17-oxido-1,4-pregnadieno-21-ol-3,11,20-trionas y sus ésteres de alcanoflos inferiores.
105. 16,17-oxido-1,4-pregnadieno-11,21-diol-3,20-dionas y sus ésteres de alcanoflos inferiores.
106. 16,17-oxido-1,4-pregnadieno-11-ol-3,20-dionas y sus ésteres de alcanoflos inferiores.
107. Los derivados 2-hidroxi y 2-alcanoiloxi inferior de 4-pregneno-11X-17 α ,21-diol-3,20-dionas y sus 21-ésteres de alcanoflos inferiores, correspondiendo X a O, o H,OH(α o β).
108. 2,21-diacetato de 4-pregneno-2,17 α ,21-triol-3,11,20-triona.
109. 11-formiato 2,21-diacetato de 4-pregneno-2,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona.
110. Los derivados 1-hidroxi y 1-alcanoiloxi inferior de 4-pregneno-11X-17 α ,21-diol-3,20-dionas y sus ésteres de alcanoflos inferiores, correspondiendo X a O ó H,OH.
111. 1-acetato y 1,21-diacetato de 4-pregneno-1,17 α ,21-triol-3,11,20-triona.
112. 1-acetato y 1,21-diacetato de 4-pregneno-1,11 β ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona.
113. 1,4,9(11)-pregnatrieno-17 α ,21-diol-3,20-diona y sus 21-ésteres de alcanoflos inferiores.



114. 1,4-pregnadieno-11 α ,17 α -diol-3,20-diona.
115. 1,4-pregnadieno-11 β ,17 α -diol-3,20-diona.
116. 1,4-pregnadieno-17 α -ol-3,11,20-triona.
117. 1,4-pregnadieno-11X-17 α ,20,21-triol-3-onas y sus 21-ésteres de alcanoflos inferiores, en las que X representa H₂, O, H, OH(α o β).
118. 1,4-pregnadieno-11X-21R-3,20-dionas, en las que X representa H₂, O, o H, OH(α o β), y R corresponde a H, OH o un alcanoiloxi inferior.
119. 1,4-pregnadieno-17 α ,20,21-triol-3-ona y sus ésteres de alcanoflos inferiores.
120. 1,4-pregnadieno-3,20-diona.
121. 1,4-pregnadieno-11 β ,21-diol-3,20-diona y sus ésteres de alcanoflos inferiores.
122. 1,4-pregnadieno-21-ol-3,20-diona y sus ésteres de alcanoflos inferiores.
123. 1,4-pregnadieno-21-ol-3,11,20-triona y sus ésteres de alcanoflos inferiores.
124. 9 α -halógeno-1,4-pregnadieno-11X-21-ol-3,20-dionas, siendo el halógeno F, Cl o Br, y correspondiendo X a O ó H, β -OH, y sus 21-ésteres de alcanoflos inferiores.
125. 9 α -fluoro-1,4-pregnadieno-11X-21-ol-3,20-dionas, correspondiendo X a O ó H, β -OH, y sus ésteres de alcanoflos inferiores.
126. 21-acetato de 2,4-dibromopregnano-17 α ,21-diol-3,11,20-triona normal.
127. 21-acetato de 2,4-dibromopregnano-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona normal.



128. Preparados farmacéuticos que consisten en 1-dehidrocortisona o un éster de la misma, mezclados con un excipiente farmacéutico.

129. Preparados farmacéuticos que consisten en 1-dehidrocortisol o ésteres de la misma, mezclados con un excipiente farmacéutico.

130. Preparados farmacéuticos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 128 y 129, en los que el excipiente farmacéutico es un sólido y el preparado está en forma de tabletas.

131. Preparados farmacéuticos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 128 y 129, en los que el excipiente farmacéutico está constituido por una base cerosa, grasa o de crema.

132. Preparados farmacéuticos según cualquiera de las reivindicaciones 128 y 129, en los que el excipiente farmacéutico es un líquido atóxico.

133. Los nuevos productos que aquí se describen.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva, que consta de ciento dieciocho hojas, y dos láminas de fórmulas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 10 de Agosto de 1955.

SCHERING CORPORATION

p.a.

JAIME ISERN MIRALLES
P. P.

