

31 ENE 1956

226236



226236

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

ler. CERTIFICADO DE ADICION

en

ESPAÑA

a nombre de CHAS. FEIZER & CO., INC., entidad norteamericana, establecida en 11 Bartlett Street, Brooklyn, Nueva York, Estados Unidos de América, por:

"MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL" número 221.910, solicitada el 20 de Mayo de 1955, por: "Un procedimiento para la oxidación nuclear de un compuesto esteroide"

=====

Este invento se refiere a la oxidación de ciertos compuestos esteroídicos por medios microbiológicos, a ciertos nuevos productos por estos medios y a derivados de estos productos. En particular se refie-



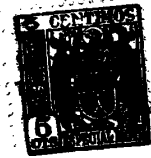
226236

re a la oxidación de compuestos esteroidicos 3-ceto-4-no-saturados por medio de ciertos microorganismos o enzimas elaboradas por estos microorganismos.

Esta solicitud se refiere a mejoras introducidas en el objeto de la Patente principal Nº 221.910 presentada el 20 de Mayo de 1955.

Según se expuso en aquella solicitud original, sometiendo compuestos esteroidicos 3-ceto-4-no-saturados a la acción de una variedad del género Mycobacteria, se produce un compuesto que tiene no-saturación en la posición 1, esto es, un doble enlace entre las posiciones 1 y 2. También tiene lugar alguna oxidación, y en algunos casos se forma también aparentemente un producto de reducción. Aunque no se conoce completamente la identidad de todos los productos, se sabe que en todos los casos en que un esteroide 3-ceto-4-no-saturado se somete a la actividad oxidante de Mycobacteria se produce un producto 3-ceto-1,4-no-saturado. Los organismos aparentemente tienen tendencia a favorecer la formación de productos que tienen este tipo de doble conjugación en el anillo A.

Por esto, este procedimiento es de gran valor para la producción de compuestos que contienen anillos A 3-ceto-1,4-no-saturados. Se ha encontrado que los nuevos productos de este tipo, descritos en lo que sigue, poseen gran actividad de tipo adrenocortical y son muy útiles en el tratamiento de una gran variedad de en-



226236

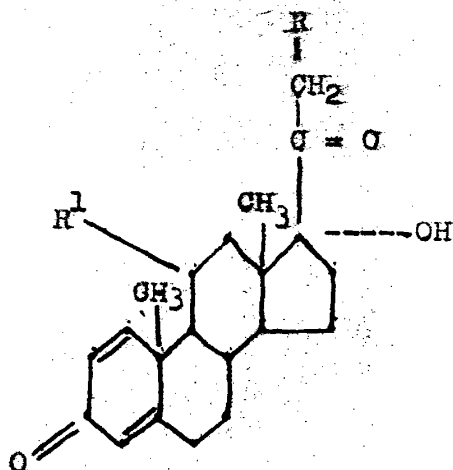
fermedades, especialmente del colágeno, como la artritis reumatoide.

5 Entre los esteroides que han sido utilizados como materiales de partida para este procedimiento están la hidrocortisona y la cortisona. Mediante este procedimiento han sido convertidas respectivamente en delta 1-dehidrohidrocortisona y delta 1-dehidrocortisona. Cada uno de estos nuevos productos es extraordinariamente activo como hormona adrenocortical. Una prueba de esto viene dada por el hecho de que ambos dan un ensayo muy positivo de involución del timo y una prueba muy positiva de glucógeno en el hígado. Además, estos delta 1-compuestos tienen ventajas sobre sus antecesoros en la falta de efectos secundarios cuando se administran a animales, incluyendo al hombre. Los efectos secundarios de formación de edema y androgenicidad se reducen grandemente.

15 Como el grupo hidroxilo en la posición 21 es el único grupo alcohol primario, tanto en la molécula de delta 1-dehidrohidrocortisona como en la de delta 1-dehidrocortisona, puede esterificarse y esterificarse fácilmente por métodos normales. Por ejemplo, se han formado los éteres metílico, etílico, bencílico, metoximetílico, como también una variedad de esteres de ácidos mono- y policarboxílicos, incluyendo los de cadena lineal, ramificada, saturados, no saturados y cíclicos. Esto dió lugar a un grupo de compuestos que poseen la fórmula general:



226236



en la que R se elige del grupo que comprende un grupo hidróxilo, un grupo éster y un grupo éter y en la que R<sup>1</sup> se elige del grupo que comprende β-hidróxilo y ceto.

5 Los ésteres de la posición 21 de estos alcoholes esteroídicos, pueden prepararse a partir de los alcoholes libres por cualquiera de los procedimientos de esterificación conocidos que no supongan el uso de agentes que afecten a la estabilidad del esteroide. Así, puede utilizarse el cloruro de ácido elegido, particularmente en presencia de una base orgánica como la 10 piridina, dimetilaminina y similares. Los nuevos ésteres del presente invento pueden prepararse también a partir de los alcoholes, por tratamiento de dichos esteroideos al menos con una proporción molecular aproximada de un ácido de un agente acilante ácido, como un anhídrido de ácido o un éster de un alcohol de bajo peso 15



226236

5 molecular. En el último caso, la esterificación del grupo hidroxilo en  $C_{21}$  tiene lugar por alcoholisis del ester por medio del alcohol esteroídico  $C_{21}$ . Como producto de partida en este proceso no solamente puede emplearse el alcohol esteroídico en  $C_{21}$  libre, sino que también pueden utilizarse ésteres del alcohol esteroídico y de ácidos alifáticos de peso molecular más bajo; así, por ejemplo, el acetato puede utilizarse con este objeto. El tratamiento de este compuesto, por ejemplo, 10 con un ácido policarboxílico o un ester de un ácido policarboxílico con un alcohol de bajo peso molecular da lugar a un intercambio que produce el ester de ácido policarboxílico del alcohol esteroídico en  $C_{21}$  deseado. El alcohol o ester formado como producto secundario debe separarse para completar la reacción. 15

El proceso de esterificación puede catalizarse por materiales como las resinas cambiadoras de iones, o pequeñas proporciones de ácidos o álcalis fuertes como HCl ó NaOH. El catalizador puede ser orgánico o inorgánico; sin embargo, debe tenerse cuidado 20 puesto que en la molécula están presentes ciertos grupos sensibles, como el grupo hidróxilo de la posición 11 en la configuración  $\beta$ . El empleo de cantidades catalíticas de un ácido o una base para acelerar el proceso de esterificación no es, desde luego, necesario cuando se utiliza para efectuar el proceso un agente acilante, tal como un anhídrido de ácido o un halogenuro de 25



28

# 226236

ácido. Los agentes de este último grupo pueden utilizarse en presencia de una base orgánica como la piridina, dimetilanilina, quinoleína, etc.

5                   Debe hacerse notar que para el presente  
procedimiento puede utilizarse una gran variedad de ácido,  
bien en forma de ácidos, bien como esteres de alcoholes de peso molecular inferior, o bien en forma de anhídridos de ácido o haluros de ácido. Tales reactivos incluyen compuestos como el anhídrido acético, los  
10                   halogenuros de ácido de los ácidos propáncico, butanoico,  
pentanoico, hexanoico, heptanoico, octanoico, nonanoico, decanoico, orto-toluico, benzoico, 1-etilciclohexancarboxílico, ciclohexancarboxílico y 1-metilciclopropan-carboxílico, anhídrido maleico, anhídrido glutárico,  
15                   anhídrido ftálico, cloruro de ftaloilo, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, anhídrido succínico, ácido piromelítico, etc. Según se hizo notar anteriormente, estos esteroides poseen en sus estructuras grupos sensibles, y es recomendable tener cuidado  
20                   de la esterificación de tales compuestos. El uso de un anhídrido de ácido o un haluro de ácido en una base orgánica es un método especialmente favorable. Debe hacerse notar que la reacción es selectiva, ya que solamente el grupo alcohol primario en la posición C<sub>21</sub> se  
25                   esterifica y otros grupos como el grupo 11- -hidrósi-  
lo no se esterifican en proporción apreciable en el procedimiento presente. Al efectuar el proceso, es aconsejable



226236

5  
10  
15  
sejable emplear un disolvente, si no se ha utilizado una base orgánica como la piridina para este objeto. Pueden utilizarse disolventes orgánicos inertes como el benceno, cloroformo, tolueno, etc. La aplicación de calor ayuda frecuentemente a favorecer la reacción para hacerla más completa; sin embargo debe utilizarse con cuidado y si, por ejemplo, se emplea un cloruro de ácido como agente de esterificación, debe tenerse precaución. Cuando se utilizan como productos reaccionantes un éster de un alcohol inferior y un ácido carboxílico, y alcohol esteroídico, o cuando se utiliza un proceso de transesterificación para la preparación de los ésteres, el producto secundario, que es volátil, puede ser separado de la mezcla reaccionante para hacer la reacción más completa. Esto puede efectuarse aplicando calor suave y vacío a la mezcla reaccionante.

20  
25  
Por estos métodos se han obtenidos ésteres en la posición 21 de delta 1-dehidrohidrocortisona y de delta 1-dehidrocortisona con ácidos monocarboxílicos que contienen solamente los elementos hidrógeno, oxígeno y carbono y un contenido de carbono de 1 a 10 átomos de carbono inclusive, y ésteres ácidos en la posición 21 de delta 1-dehidrohidrocortisona y de delta 1-dehidrocortisona con ácidos policarboxílicos que contienen solamente los elementos hidrógeno, oxígeno y carbono y que tiene un contenido en carbono



226236

de 2 a 10 átomos de carbono inclusive.

5 Cuando el delta 1-dehidrohidrocortisona o la delta 1-dehidrocortisona se esterifica con un ácido policarboxílico, por ejemplo, un ácido dibásico como el ácido succínico, se obtiene un éster ácido, esto es, un ester que tiene uno o más grupos carboxilo libres. Las sales de metales alcalinos y amónicas de estos compuestos, por ejemplo la sal sódica del succinato, tie-  
10 ne la ventaja de ser solubles en agua. Estas sales se obtienen por tratamiento del ester ácido con la cantidad equivalente de base o sales de ácidos débiles, como el bicarbonato sódico.

15 Cada uno de los compuestos del presente invento puede administrarse solo o en combinación con excipientes farmacéuticos aceptables. La dosificación es, en general, de aproximadamente el mismo orden de magnitud que en el caso de la hidrocortisona, pero existe un margen más amplio de dosificación. En algunos casos la actividad de estos compuestos es tal que una dosis menor  
20 puede ser suficiente, pero la falta de efectos secundarios permite la administración de dosis mayores cuando estas sean necesarias. La elección del excipiente está determinada por el camino elegido para la administración, la solubilidad del compuesto particular y la práctica farmacéutica normal. Excipientes como el almidón y la lactosa pueden utilizarse para preparar tabletas para la admi-  
25 nistración oral. Pueden utilizarse elixires que contengan



226236

5 agentes que comuniquen sabor o endulcen. Para inyección  
intraarticular puede usarse composiciones que contengan  
bastante suero salino para hacerlas isotónicas. Cuando  
se administran compuestos solubles en agua, como el suc-  
cinato de sodio y 1-dehidrohidrocortisona, pueden emplar-  
se soluciones acuosas. La filtración a través de un fil-  
tro Seitz es un método conveniente para esterilizar una  
solución semejante. Pequeñas cantidades de un agente de  
conservación como el clorobutanol pueden añadirse para  
10 mantener la esterilidad.

Para llevar a cabo la preparación de los  
compuestos de este invento, pueden utilizarse diversas  
especies del género Mycobacterium para efectuar la oxida-  
ción del núcleo esteroidico. Estas incluyen especies co-  
15 nocidas como Mycobacterium especie 607, M. berolinense,  
M. lacticola, M. thannophees, y , en particular, cepas  
de las especies M. smegmatis. Las diversas especies de  
Mycobacterium difieren considerablemente en la rapidez  
y facilidad en que se produce la oxidación por las célu-  
20 las de los organismos o por productos secundarios produ-  
cidos en su desarrollo. Hemos encontrado por ciertas ce-  
pas de M. smegmatis son particularmente activas para  
efectuar la reacción de este invento. Las distintas my-  
cobacterias varían un poco en sus exigencias de medios  
25 nutricios. Sin embargo, con un mínimo de experimenta-  
ción es posible determinar la composición de medios ade-  
cuados, así como las condiciones óptimas para la opera-



226236

ción, como el pH, grado de aireación, grado de agitación, etc.

5 Hay diversos procedimientos que pueden utilizarse en la oxidación de compuestos esteroidicos de acuerdo con este invento. En el primero de ellos, los medios nutricios se siembran a partir de cultivos inclinados de las micobacterias elegidas. Semajante medio puede consistir, por ejemplo, en una mezcla de una base de un caldo nutricio bacteriológico normal, junto con glicerina. Se ha encontrado que un agente neutro con actividad superficial, como un derivado polioxietilénico de un ester de un ácido graso con un alcohol de un azúcar (p.ej. Tween 80), es conveniente cuando se agrega al medio en una pequeña cantidad. También la adición del aminoácido asparaguina es conveniente. El cultivo de micobacterias ha sido descrito en muchas publicaciones con considerable detalle. Las soluciones nutricias sembradas y esteriles pueden pueden desarrollarse en frascos con agitación durante dos o tres días proporcionando inoculación para vasijas mayores, y a su vez las vasijas mayores aireadas y agitadas pueden utilizarse para la inoculación de recipientes de gran producción para la fermentación sumergida. El mismo medio del tipo descrito anteriormente puede utilizarse para la oxidación de esteroides en gran escala de acuerdo con este invento. Desde luego pueden hacerse variaciones considerables en el medio. En general se requiere un hidrato de carbono, una

10

15

20

25



226236

fuentes de nitrógeno orgánico, sales minerales y varios metales traza.

5 Según se indicó antes, mejor que llevar a cabo la oxidación del compuesto esteroídico elegido en presencia de todo el producto de fermentación, es separar las células de los cultivos en desarrollo y estas pueden ponerse de nuevo en suspensión en un medio, que ha sido designado mezcla de reacción enzimática. Una mezcla de reacción como esta puede consistir, por ejemplo, en una solución que es 0,01 molar en fumarato sódico u otro aceptor de hidrógeno y en sulfato magnésico y 0,03 molar en citrato sódico. Se ha encontrado que la presencia de una cierta cantidad de trifosfato de adenosina por ejemplo, 0,125%, es también muy conveniente, las células centrifugadas y lavadas del Mycobacterium elegido pueden ponerse en suspensión en este tipo de mezcla de reacción, que se ajusta a un pH de 6 aproximadamente, por ejemplo, con ácido cítrico. Después de la adición del compuesto esteroídico que se desea oxidar, la mezcla se incuba a unos 37°C., y pueden separarse muestras de vez en cuando para determinar el punto en el que tiene lugar la máxima conversión del esteroide. En general, esto tiene lugar después de uno a cuatro días. Hemos encontrado que las células contenidas en unos 100 mililitros cúbicos de cultivo de micobacterias aireado, y agitado, pueden ponerse en suspensión en unos 20 mililitros de una



226233

mezcla de reacción azimática, para obtener resultados convenientes. El compuesto esteroídico puede utilizarse una proporción de unos 25 a 200 mg/ 100 mls. de mezcla de reacción azimática. El compuesto se añade simplemente en forma sólida después de ajustar el pH. Los matraces se tapan con un tapón de algodón con lo cual se exponen al aire durante la incubación. Nosotros preferimos emplear un pequeño volumen en relación al volumen del matraz, por ejemplo, 20 centímetros cúbicos en un matraz Erlenmeyer de 125 centímetros cúbicos. La mezcla puede ser alternativamente agitada y aireada. En general se requieren en el medio por lo menos un aceptor de hidrógeno, un metal divalente particularmente magnesio y una solución tampón.

Mejor que separar las células de Mycobacterium y llevar a cabo la reacción de este invento en una mezcla de reacción enzimática, el compuesto esteroídico puede añadirse directamente a una porción esterilizada de medio nutricio, como se describió anteriormente, y el medio se siembra entonces con la micobacteria elegida. También en este caso puede utilizarse aproximadamente la misma proporción del compuesto esteroídico elegido. De vez en cuando, pueden separarse muestras de la mezcla aireada para determinar el grado de conversión del compuesto esteroídico en los productos oxidados. La mezcla se mantiene a entre 25-30°C durante el desarrollo de las células y la conversión del esteroide. En gene-





226236

mezcla se deja reposar a una temperatura de unos 20° a  
unos 50°,C. Al cabo de uno o varios días las células  
se desintegran y el residuo celular puede separarse por  
filtración, por ejemplo, a través de un filtro Seitz o  
5 de un filtro bacteriológico de vidrio sinterizado. Un  
tercer método para preparar productos de elaboración de  
las microbacterias libres de células, conveniente para  
la reacción de este invento, es por repetida congelación  
y descongelación del material celular. Todavía un méto-  
10 do utilizable con el mismo propósito es el empleo de un  
disolvente miscible con agua y en particular acetona.  
Cuando se colocan las células en un disolvente semejan-  
te, se rompe y se obtiene un extracto de las enzimas de-  
seadas. Las enzimas de las microbacterias pueden emplear-  
15 se para la oxidación de compuestos esteroidicos 3-ceto-  
4,5-no-saturados en medios similares a los empleados con  
las células en desarrollo, esto es, un medio que contenga  
un aceptor de hidrógeno como el fumarato, un tampón y,  
en algunos casos, un metal bivalente, particularmente  
20 magnesio, así como una pequeña cantidad de trifosfato de  
adenosina. Las enzimas oxidantes de las microbacterias,  
libres de células, pueden utilizarse en medios como los  
indicados antes a una temperatura de unos 20° a unos 40°C.  
En general, la oxidación de los compuestos esteroidicos  
25 deseados se lleva a cabo en un periodo desde unas pocas  
horas a tres días. El tiempo y temperatura óptimos y o-  
tras condiciones pueden determinarse fácilmente con un



226236

mínimo de experimentación. Descripciones detalladas de medios convenientes para ambos métodos, el uso de células aisladas y vueltas a poner en suspensión y el de productos de elaboración libres de células se dan en los textos "Manometric Technique in Tissue Metabolism" por W. W. Umbreit y otros, Burgess Publishing Company, Minneapolis (1949). y "Respiratory Enzymes" por H. Lardy, Burgess Publishing Company, Minneapolis (1949).

Los productos del nuevo método descrito en esta solicitud pueden aislarse de las soluciones acuosas por extracción con varios disolventes orgánicos inmiscibles con agua. Los hidrocarburos halogenados inferiores, como el cloroformo, son especialmente útiles. Después de la extracción, el disolvente puede separarse por destilación y se aísla entonces el producto sólido. Este material puede purificarse posteriormente por procedimientos de recristalización desde disolventes orgánicos o por cromatografía, por ejemplo sobre materiales adsorbentes sólidos adecuados. El uso de una columna de gel de sílice-etanol, con una mezcla de cloruro de metileno y etanol (95%) al 98% y 2% en volumen como revelador se ha encontrado particularmente ventajoso. En la bibliografía se han descrito previamente métodos para la separación de productos de esta naturaleza.

Los siguientes ejemplos se dan a modo de aclaración y no deben ser considerados como limitaciones de este invento. Como realmente pueden realizarse muchos



26236

modos diferentes de llevar a cabo el presente invento sin apartarse del espíritu y los límites de este, debe entenderse que este invento no está limitado, excepto como se describe en las reivindicaciones anejas.

5

Ejemplo I.

Un cultivo de Mycobacterium amegmatis ATCC 12,051, desarrollado en un medio de agar sólido, se lavó en una solución nutritiva que tenía la siguiente composición:

|    |                                   |                    |
|----|-----------------------------------|--------------------|
| 10 | Caldo nutritivo normal,<br>sólido | 8 gramos por litro |
|    | Glicerina                         | 20 mls./litro      |
|    | Tween 80                          | 0,2 mls./litro     |
|    | Asparaguina                       | 5 gramos/litro     |

15

Un litro de este medio inoculado se colocó en dos matraces de agitación de Fernbach. Después de tres días, se agregó medio gramo de hidrocortisona a cada matraz. La reacción se continuó durante cuatro días y al cabo de este tiempo se combinó el contenido de los matraces y se extrajo tres veces, cada una con un volumen igual de cloroformo. Los extractos clorofórmicos combinados se concentraron a un volumen de 150 mls. aproximadamente. Se añadió una pequeña cantidad de carbón activo (Nuchar) la mezcla se calentó suavemente y agitó durante unos minutos. El Nuchar se separó por filtración y el filtra-

20

28



226236

do se llevó sobre una columna cromatográfica de gel de sílice-etanol. La columna se reveló utilizando una mezcla de 97% en volumen de cloruro de etileno y 3% de etanol. Se recogieron fracciones de 50 cm<sup>3</sup>. Las primeras 37 no contenían esteroides. En las fracciones 38 a 66 se recuperó hidrocortisona sin reaccionar. Las fracciones 67 a 82 contenían hidrocortisona y delta 1-dehidrohidrocortisona. Las fracciones 83 a 115 contenían delta 1-dehidrohidrocortisona. Las fracciones 116 a 269 no contenían ningún esteroide. Las fracciones 270 a 332 contenían un esteroide cuya identidad no ha sido probada de manera concluyente.

Las fracciones 83 a 115 combinadas se evaporaron a sequedad en baño de vapor. El residuo de disolvió en acetato de etilo y se trató con una pequeña cantidad de carbón activo. El carbón se separó por filtración, y el filtrado se concentró a pequeño volumen y se enfrió. Los cristales que se formaron por enfriamiento se redisolviéron en la mínima cantidad de acetona. Se añadió entonces un volumen igual de hexano, seguido por adición de ciclohexano hasta que se inició enturbiamiento. Por nuevo enfriamiento, se formaron cristales blancos. Estos se han identificado como delta 1-dehidrohidrocortisona, que puede llamarse también delta 1,4-pregnadien-11  $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-triol-3,20-diona. Los cristales dieron un punto de fusión de 196°-198°C., una rotación específica  $[\alpha]_D^{25} + 108,22$  en etanol y una  $\lambda_{H_2SO_4}^{m_5x 4}$



226236

260, 280, 310, 358 mm.

Ejemplo II.

Se repitió el procedimiento del ejemplo I, pero utilizando cortisona en lugar de hidrocortisona.

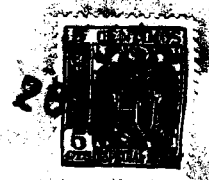
5 El producto delta 1-dehidrocortisona, que puede llamarse también delta 1,4-pregnadien-17 $\alpha$ ,21-diol-3,11,20-triona, se aisló en forma análoga.

Ejemplo III.

10 En un recipiente de vidrio pyrex de cuatro litros dispuesto para llevar a cabo la fermentación sumergida con aireación, se añadieron dos litros del siguiente medio (conocido como medio Turfitt):

|    |                                 |         |
|----|---------------------------------|---------|
|    | Nitrato amónico                 | 0,1%    |
|    | Fosfato ácido dipotásico        | 0,025   |
| 15 | Sulfato magnésico, heptahidrato | 0,25    |
|    | Cloruro sódico                  | 0,0005  |
|    | Sulfato ferroso, heptahidrato   | 0,00001 |
|    | Carbonato cálcico               | 0,5     |

20 El medio acuoso se esterilizó y se inoculó entonces con 100 centímetros cúbicos de un cultivo de Mycobacterium smegmatis ATCC 12,051, desarrollado en un matraz de agitación con caldo nutritivo. A los tres días se añadieron 0,25 gramos de hidrocortisona. La mezcla se agitó y aireó con aire esterilizado. Cuatro días después de  
25 la adición del esteroide, la mezcla total se extrajo con unos 2 litros de cloroformo. La cromatografía demostró



220236

la presencia de delta 1-dehidrohidrocortisona en el producto.

Ejemplo IV.

5 Se repitió el procedimiento del ejemplo III, pero empleando cortisona en lugar de hidrocortisona. De manera idéntica se preparó el producto delta 1-dehidrohidrocortisona.

Ejemplo V.

10 Se realizó una serie de experimentos utilizando los procedimientos descritos antes en los ejemplos I y II, pero en lugar de emplear Mycobacterium smegmatis, se utilizaron las siguientes especies de micobacterias:

- |    |                |                 |
|----|----------------|-----------------|
| 15 | M. phlei       | M. thamnopheos  |
|    | M. ranae       | M. lacticola    |
|    | M. butyricum   | M. friedmanni   |
|    | M. berolinense | M. tuberculosis |

20 Los productos se recuperaron de la mezcla de reacción por extracción y se sometieron a una valoración por el método de cromatografía en papel. En todos los casos se encontró que había tenido lugar deshidrogenación en la posición 1.

Ejemplo VI.

25 Delta 1-dehidrohidrocortisona se trató con un equivalente molecular de anhídrido acético en pi-



226236

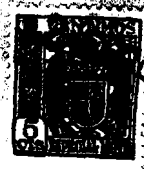
5           ridina a temperatura ambiente. Al cabo de 18 horas la  
mezcla se vertió en agua fría, se extrajo dos veces con  
cloroformo y se combinaron los extractos clorofórmicos.  
Los extractos combinados se lavaron con ácido sulfúri-  
co N, con solución acuosa saturada de bicarbonato só-  
dico y luego con agua. La solución clorofórmica se fil-  
10           tró entonces por un filtro de tierra de diatomáceas y  
se evaporó a sequedad. El residuo se trituró con éter  
y el material residual no disuelto se secó. Este pro-  
ducto seco se identificó como el ester acetato en posi-  
ción 21 de la delta 1-dehidrohidrocortisona. De idénti-  
ca forma se preparó el acetato en posición 21 de la del-  
ta 1-dehidrocortisona.

Ejemplo VII.

15           Se añadieron 0,5 gramos de delta 1-de-  
hidrohidrocortisona a 1 gramo de ácido fórmico anhidro  
en 15 cm<sup>3</sup> de benceno, y la mezcla se agitó durante dos  
horas a temperatura ambiente. Se enfrió entonces y se  
vertió en agua fría. Se separó la capa de benceno, se  
20           secó sobre sulfato magnésico anhidro y se evaporó a se-  
quedad. El residuo se purificó por recristalización y  
resultó ser el formiato en posición 21 de la delta 1-de-  
hidrohidrocortisona. De idéntica manera se preparó el  
formiato en posición 21 de la delta 1-dehidrocortisona.

Ejemplo VIII.

25



226236

5 Sa añadió cloruro de propionilo ( 7 milimoles ) a una solución de 5 milimoles de delta 1-dehidrohidrocortisona en 5 cm<sup>3</sup> de piridina. La solución se agitó y enfrió en hielo hasta que cesó el desarrollo de calor. La mezcla se dejó reposar entonces durante toda la noche a temperatura ambiente. Se vertió en 50 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico 3N enfriado en hielo. La mezcla se extrajo dos veces con dos porciones de 50 cm<sup>3</sup> de cloroformo. Los extractos combinados se lavaron con ácido 10 sulfúrico N, con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y después con agua. La solución cloroformica se filtró entonces a través de un filtro de tierra de diatomáceas y se evaporó a sequedad. El residuo se trituró con éter y el material residual no disuelto se 15 secó. Este producto seco, se identificó como el ester propionato en posición 21 de la delta 1-dehidrohidrocortisona.

20 Mediante reacciones similares, utilizando el cloruro o el anhídrido del ácido, se han preparado esteres de la delta 1-dehidrohidrocortisona con una gran variedad de ácidos carboxílicos orgánicos. Estos incluyen, por ejemplo, los esteres del ácido butírico, ácido valeriánico, ácido caproico, ácido heptoico, ácido caprílico, ácido moñílico y ácido caprínico.. Los ácidos 25 tenían tanto cadenas como ramificadas. También pueden ser no saturados. En todos los casos la reacción fué análoga a la indicada antes. Por este método se prepa-

285  
6

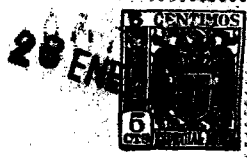
226236

raron fácilmente ésteres de delta 1-dehidrohidrocortisona y ácidos carboxílicos que contienen solamente los elementos hidrógeno, oxígeno y carbono, siendo el contenido de carbono de 2 a 10 átomos inclusive. Resultados idénticos se obtuvieron utilizando delta 1-dehidrohidrocortisona.

Ejemplo IX.

A una solución de 5,5 milimoles de delta 1-dehidrohidrocortisona, disueltos en 5 cm<sup>3</sup> de piridina, se añadió cloruro de orto-toluido (6,6 milimoles). La solución se agitó y enfrió con hielo hasta que cesó el desarrollo de calor. La mezcla se dejó reposar entonces 20 horas a 25°C. Se vertió en 50 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico 3N enfriado en hielo. La mezcla se extrajo dos veces con dos porciones de 50 cm<sup>3</sup> de cloroformo. Los extractos combinados se lavaron con ácido sulfúrico N, con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y luego con agua. La solución clorofórmica se filtró entonces a través de un filtro de tierra de diatomeas y se evaporó a sequedad. El residuo se trituró con éter y el material residual no disuelto se secó. Este producto seco se purificó entonces por recristalización desde alcohol isopropílico y se identificó como el orto-toluido de la delta 1-dehidrohidrocortisona.

Por procedimientos análogos, utilizando el correspondiente cloruro de ácido en cada caso, se

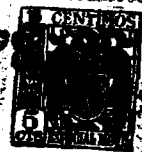


226236

han preparao también el benzoato, 1-etilciclohexan-carboxilato, ciclohexan-carboxilato y 1-metilciclopropan-carboxilato de la delta 1-dehidrohidrocortisona. Estos ésteres cíclicos, particularmente los formados a partir de ácidos en los que los átomos de carbono adyacentes al grupo carboxilo forman parte de un anillo hidrocarbonado que tenga de tres a seis átomos de carbono, son particularmente valiosos y tienen ventajas sobre los alcoholes libres, puesto que presentan prolongada actividad terapéutica. Idénticos resultados se obtuvieron con delta 1-dehidrohidrocortisona.

Ejemplo K.

Una solución de tres gramos de delta 1-dehidrohidrocortisona en 12 cm<sup>3</sup> de piridina se trataron con 1,2 g de anhídrido acético. La mezcla se dejó reposar a temperatura ordinaria durante 18 horas, y se vertió entonces sobre 150 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico 2N enfriado con hielo. Durante la adición sobre el ácido sulfúrico la mezcla se agitó rápidamente. Se separó un producto sólido blanco y se filtró de la solución acuosa. Se lavó repetidamente con pequeñas porciones de agua y después con una solución de metanol en agua. El producto se secó entonces en vacío y se purificó por recristalización desde etanol. El análisis demostró que era el éster ácido, hemifitalato de la delta 1-dehidrohidrocortisona.

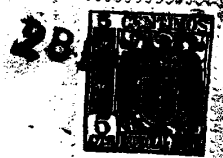


226236

5 Una solución de 3 gramos de delta 1-de-  
hidrohidrocortisona en 15 cm<sup>3</sup> de quinoleina se trató con  
un gramo de anhídrido succínico. Después de agitar to-  
da la noche a temperatura ambiente, la mezcla se vertió  
con agitación en 200 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico 2N enfriado  
con hielo. El precipitado se filtró, se lavó repetidas  
veces con agua y se secó en vacío. Se recrystalizó en-  
tonces desde alcohol. El análisis demostró que era el  
hemisuccinato de la delta 1-dehidrohidrocortisona. I-  
dénticos resultados se obtuvieron con la delta 1-dehi-  
dorocortisona.

Ejemplo XI.

15 Un gramo y medio del succinato de la del-  
ta 1-dehidrohidrocortisona se disolvieron en 15 cm<sup>3</sup> de  
agua que contenía una cantidad equimolecular de bicar-  
bonato sódico. La mezcla se agitó y calentó suavemen-  
te, poniéndola entonces en vacío durante un corto perio-  
do de tiempo, para separar el dióxido de carbono. La  
solución de la sal sódica se congeló y se secó en vacío  
20 desde este estado. El producto, la sal sódica del suc-  
cinato de delta 1-dehidrohidrocortisona, era muy solu-  
ble en agua y adecuado para su empleo en forma de solu-  
ción acuosa para inyecciones. Esto es una ventaja impo-  
sible con el alcohol libre o con los ésteres ordinarios.  
25 Puede utilizarse suero salino para formar una solución  
isotónica para este objeto, si se desea, y también puede



226236

usarse glucosa. Idénticos resultados se obtuvieron con la delta 1-dehidrocortisona.

Ejemplo XII.

5 Según se emcionó antes, los compuestos de este invento pueden administrarse solos o en combinación con otros materiales compatibles. Este ejemplo y los ejemplos siguientes aclaran algunas de estas composiciones terapéuticas en las que la delta 1-dehidrohídrocortisona o la delta 1-dehidrocortisona es el ingrediente activo principal.  
10

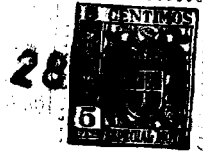
La siguiente es una composición típica de una tableta adecuada para la administración oral:

|                               | mg/ tableta |
|-------------------------------|-------------|
| Delta 1-dehidrohidrocortisona | 20          |
| 15 Fosfato cálcico (dibásico) | 150         |
| Lactosa                       | 60          |
| Fécula de patata              | 35          |
| Estearato magnésico           | 5           |
| Trisilicato magnésico         | 30          |

20 Composiciones similares pueden usarse también con delta 1-dehidrocortisona en vez de delta 1-dehidrohidrocortisona.

Ejemplo XIII.

25 A causa de su actividad anti-inflamatoria, los compuestos de este invento son útiles para tra-



226236

tar una gran variedad de enfermedades de la piel. Para tal tipo de tratamiento se emplea frecuentemente un unguento ordinario y la siguiente es una composición típica de un unguento semejante:

|    |   |      |
|----|---|------|
| 5  |   | mg.  |
|    | Acetato de la delta 1-dehidrohidrocortisona | 25   |
|    | Sulfato de sodio y laurilo U.S.P.           | 10   |
|    | Propilenglicol U.S.P.                       | 115  |
|    | Alcohol estearílico                         | 80   |
| 10 | Alcohol cetílico (N.F.)                     | 70   |
|    | Colesterina U.S.P.                          | 45   |
|    | Vaselina blanca U.S.P.                      | 190  |
|    | Aceite mineral U.S.P.                       | 50   |
|    | Agua  | 400  |
| 15 | Metil paraben                               | 1,0  |
|    | Propil paraben                              | 0,02 |

Composiciones similares pueden usarse también con delta 1-dehidrohidrocortisona en lugar de la delta 1-dehidrohidrocortisona.

20 Ejemplo XIV.

La siguiente es una composición típica de acetato de la delta 1-dehidrohidrocortisona, utilizada para inyección intra-articular:

|    |   |      |
|----|---|------|
|    |   | gms. |
| 25 | Acetato de la delta 1-dehidrohidrocortisona | 25   |
|    | Cloruro sódico U.S.P.                       | 9    |



226236

|  | gms. |
|--|------|
| Carboximetilcelulosa sódica                    | 5    |
| Methocel 15                                    | 1    |
| Tween 80 U.S.P.                                | 1,9  |
| Metil paraben                                  | 2,4  |
| 5 propil paraben                               | 0,26 |
| Agua, c.s. para completar 1000 cm <sup>3</sup> |      |

Composiciones similares pueden utilizarse también con delta 1-dehidrocortisona en lugar de delta 1-dehidrohidrocortisona.

10

Ejemplo XV.

15

A causa de su actividad anti-inflamatoria, los compuestos de esta invento son útiles para tratar una gran variedad de enfermedades del ojo. Para tal tipo de tratamiento se emplea frecuentemente una suspensión oftálmica y la siguiente es una composición típica de una suspensión como esta:

|   | gms.   |
|---|--------|
| Acetato de la delta 1-dehidrohidrocortisona | 25,00  |
| Carboximetilcelulosa sódica                 | 27,75  |
| 20 Polivinil pirrolidona                    | 3,00   |
| Alcohol bencílico                           | 9,00   |
| Polisorbato                                 | 0,46   |
| Agua  | 951,25 |

25

Composiciones similares pueden utilizarse también con delta 1-dehidrocortisona en vez de delta



226236

1-dehidrohidrocortisona.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de America con fecha 24 de Enero de 1955, bajo el número 483.842, se acoge a los beneficios establecidos por el artículo 51 del vigente Estatuto-Ley sobre Propiedad Industrial.

5

- N O T A -

Los puntos de invención, propia y nueva que se presentan para que sean objeto de este Certificado de Adición en España, son los siguientes:

10

18.- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente principal, o sea, en un procedimiento para la preparación de  $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-triol-3, 20-diona, que comprenden poner en contacto  $\Delta^4$ -pregnen-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-triol-3, 20-diona con la actividad oxidante de un organismo del género Mycobacterium

15

22.- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente principal, o sea, en un procedimiento para la preparación de  $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17 $\alpha$ , 21-diol-



226233

3,11,20-triona, que comprenden poner en contacto  $\Delta^4$ -pregnen-17 $\alpha$ , 21-diol-3,11,20-triona con la actividad oxidante de un organismo del género Mycobacterium.

5 3<sup>a</sup>.- Mejoras de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, según las cuales el organismo es de la especie Mycobacterium phlei.

4<sup>a</sup>.- Mejoras de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, según las cuales el organismo es de la especie Mycobacterium mageritensis.

10 5<sup>a</sup>.- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente principal número 221.910.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

15 La presente Memoria consta de veintinueve hojas escritas a máquina.

Madrid, 31 ENE. 1954

P. A.  
Alberto de Elzaburo  
Por Procn.  
*Alto*