

226 237

P.- 14.170.-

A-15827- P.C. 850.C

226237

22 FEB. 1956



1956

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

2º CERTIFICADO DE ADICION

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de CHAS. PFIZER & 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 relaciona con la oxidación de ciertos compuestos esteroídicos por medios microbiológicos, con ciertos nuevos productos producidos por este medio y con derivados de estos productos. En particular



226237

se relaciona con la oxidación de compuestos esteroidicos
3-ceto-4no-saturados por medio de ciertos microorganismos
o enzimas oxidantes elaboradas por estos microorganismos
de acuerdo con el proceso descrito en general en nuestra
5 solicitud núm. 221.910.

Como se describió en la citada solicitud
previa, al someter un compuesto esteroidico 3-ceto-4-no-
saturado a la acción de una especie del género Mycobacte-
rium, se produce un compuesto que presenta no saturación
10 en la posición 1, esto es, un doble enlace entre las posi-
ciones 1 y 2. Tiene lugar también alguna oxigenación y en
algunos casos se forma también aparentemente un producto
de reducción. Aunque la identidad de todos los productos
no se conoce completamente, se sabe que en todos los ca-
15 sos en que un esteroide 3-ceto-4 no saturado se somete a
la actividad oxidante de Mycobacterias se produce un pro-
ducto 3-ceto-1,4-no saturado. Los organismos tienden apa-
rentemente a favorecer la formación de productos que ten-
gan este tipo de doble conjugación en el anillo A.

20 Este procedimiento es por esto muy valioso
para la producción de compuestos que contengan anillos A
3-ceto-1,4-no saturados. Se ha encontrado que los nuevos
productos de este tipo, descritos más adelante, poseen
gran actividad de tipo adrenocortical y son muy útiles en
25 el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, par-
ticularmente enfermedades del volágeno, como la artritis
reumatoide.



226237

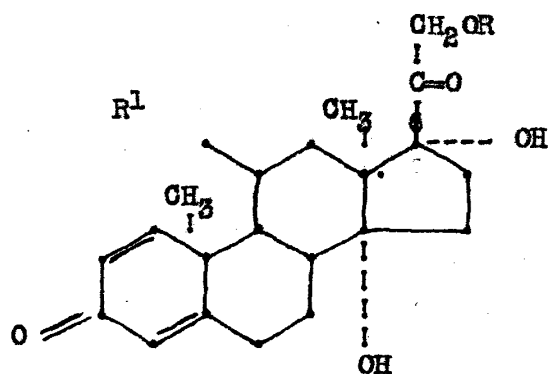
De acuerdo con el presente invento los esteroides que se utilizan como productos de partida para el mencionado proceso de la solicitud anterior son delta 4-pregnen-11 β , 14 α , 17 α , 21-tetraol-3,20-diona y
5 delta 4-pregnen-14 α , 17 α , 21-triol-3,11,20-triona. Cuando cada uno de estos compuestos se somete a la actividad oxidante del Mycobacterium, tiene lugar una deshidrogenación en las posiciones 1 y 2 y se forma un doble enlace entre estas posiciones. Los productos respectivos son del-
10 ta-1,4-pregnadien-11 β , 14 α , 17 α , 21-tetraol-3,20-diona en lo que sigue denominado Compuesto I, y delta 1,4-pregnadien-14 α , 17 α , 21-triol-3,11,20-triona, en lo que sigue denominado Compuesto II. Se producen también otros esteroides hasta ahora no identificados.
15 Como el grupo hidroxilo en la posición 21 es el único grupo alcohol primario presente en la molécula de cada uno de estos compuestos, puede esterificarse selectivamente con facilidad por los procedimientos normales, por ejemplo, tratamiento con un anhídrido de ácido o
20 haluro de acilo en presencia de una base orgánica como la piridina. Se han utilizado de este modo anhídrido acético, anhídrido succínico, anhídrido ftálico, cloruro de propionilo, cloruro de benzoilo, etc. La esterificación y transesterificación de Fischer son también de utilidad. Cuando
25 el agente acilante es el de un ácido polibásico, por ej., ácido succínico, se forman esteres ácidos. Estos tienen la ventaja de que sus sales de metales alcalinos, p.ej., las

22
5 CENTIMOS 1956
5 CENTIMOS
5 CENTIMOS

226237

sales sódicas de estos esteres ácidos son solubles en agua. Estas sales se forman fácilmente del ester ácido por tratamiento con una cantidad equimolecular de una base débil como el bicarbonato sódico.

5 Los nuevos compuestos del presente invento tienen la fórmula general:



10 en donde R se elige del grupo que consta del hidrógeno y acilo y R¹ se escoge del grupo que forman β -hidróxilo y ceto. Desde luego, cuando R¹ es un hidroxilo, hay también un átomo de hidrógeno en la posición 11.

15 Estos compuestos son muy valiosos a causa de su actividad como hormonas adrenocorticales. Son muy útiles en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades, particularmente las enfermedades del colágeno, como la artritis reumatoide. Son también útiles en el tratamiento de enfermedades como el asma y, a causa de su acción antiinflamatoria, son también de utilidad para tratar ciertos tipos de enfermedades de la piel y ciertos tipos de irritaciones de los ojos. Su ventaja principal reside en el hecho



226237

de que combinan una elevada actividad con un mínimo de efectos secundarios.

Los compuestos del presente invento pueden administrarse solos o en combinación con excipientes farmacéuticos aceptables. La dosificación es de aproximadamente el mismo orden de magnitud que en el caso de la hidrocortisona, aunque existe un intervalo de dosificación más amplio. En algunos casos la actividad de estos compuestos es tal que una dosis menor es suficiente, aunque la falta de efectos secundarios permite la administración de dosis mayores cuando son requeridas. La elección del excipiente está determinada por la vía elegida de administración, la solubilidad del compuesto particular y por la práctica farmacéutica normal. Para la preparación de tabletas para la administración oral pueden utilizarse excipientes como almidón y lactosa. También pueden emplearse elixires conteniendo agentes que le den sabor u olor. Para inyección intra-articular pueden utilizarse composiciones que contengan bastante suero salino para hacerlas isotónicas. Cuando se administran compuestos solubles en agua, como los succinatos sódicos del Compuesto I y Compuesto II, pueden emplearse soluciones acuosas. La filtración por un filtro de Seitz es un método conveniente de esterilizar una solución como esta. También pueden añadirse pequeñas cantidades de un agente de conservación como el clorobutanol para mantener la esterilidad.

Los ejemplos siguientes se dan a modo de aclaración y no deben considerarse como limitaciones de es-



220237

te invento. Realmente, puesto que pueden llevarse a cabo muchas formas en apariencia muy diferentes del presente invento, sin salirse del espíritu y límites del mismo, debe entenderse que este invento no está limitado excepto en la forma definida en las reivindicaciones finales.

EJEMPLO I.

A 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 de Turfitt):

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

El medio acuoso se esterilizó y se inoculó entonces con 100 c.c. de un cultivo de Mycobacterium smegmatis ATCC 12,051, desarrollado en un matraz de agitación sobre caldo nutritivo. Después de tres días, se añadieron 0,25 g de 14 α -hidroxi Compuesto F. La mezcla se agitó y aireó con aire estéril. Cuatro días después de la adición del esteroide, la mezcla total se extrajo con aprox. 2 litros de cloroformo. El extracto clorofórmico se trató con carbón activo, se filtró y se redujo a un pequeño volumen por evaporación y se puso entonces en una columna cromatográfica gel de sílice-etanol. La columna se eluyó con mezclas



226237

de cloruro de etileno y etanol del 95%, partiendo de mezclas que contengan alrededor del 2% en volumen de etanol y aumentando gradualmente el porcentaje de etanol. El Compuesto I se recuperó de este modo.

5

EJEMPLO II.

Se repitió el procedimiento del ejemplo I, excepto que el esteroide utilizado fué 14 α -hidroxi cortisona. El Compuesto II se recuperó por un método similar.

EJEMPLO III.

10

Se llevaron a cabo una serie de experiencias utilizando los procedimientos descritos anteriormente en los ejemplos I y II, pero en vez de utilizar Mycobacterium smegmatis, se usaron las siguientes especies de Mycobacterias:

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 de papel. En todo caso se encontró que tiene lugar deshidrogenación en la posición 1.

EJEMPLO IV

25

El Compuesto I se trató con un equivalente molecular de anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente. Después de 18 horas, la mezcla se vertió en agua

226237
22F
5 CENTIMOS
5
ESPECIAL MOTO

226237

fría, se extrajo dos veces con cloroformo y se combinaron los extractos clorofórmicos. Los extractos combinados se lavaron con ácido sulfúrico 1N, con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y después con agua. La solución clorofórmica 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 restante sin disolver se secó. El producto seco se identificó como el acetato del Compuesto I en posición 21. De idéntica forma se preparó el acetato del Compuesto II en posición 21.

EJEMPLO V

Se añadieron 0,5 g del Compuesto I a 1 g de ácido fórmico anhidro en 15 c.c. de benceno y la mezcla se agitó durante dos horas a temperatura ambiente. Se enfrió entonces y se vertió en agua fría. La capa de benceno se separó, se secó sobre sulfato magnésico anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por recristalización y resultó ser el ester formato del compuesto I en la posición 21. De idéntica manera se preparó el ester formato del compuesto II en posición 21.

EJEMPLO VI.

Se añadió cloruro de propionilo (7 milimoles) a una solución de 5 milimoles de Compuesto I disueltos en 5 c.c. de piridina. La solución se agitó y enfrió en hielo hasta que desaparece el desarrollo de calor. La mezcla se dejó estar entonces durante toda la noche a temperatura ambiente. Se vertió en 50 c.c. de ácido sulfúrico 3N helado



226237

La mezcla se extrajo dos veces con dos porciones de 50c.c. de cloroformo. Los extractos combinados se lavaron con ácido sulfúrico 1N, con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y después con agua. La solución clorofórmica 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 producto residual no disuelto se secó. Este producto seco se identificó como el propionato en posición 21 del Compuesto I.

Por reacciones similares, utilizando el cloruro de ácido o el anhídrido ácido del ácido se han preparado esteres del Compuesto I y una gran variedad de ácidos carboxílicos. Estos incluyen, por ejemplo, los esteres del ácido butírico, ácido valerianico, ácido caprónico, ácido heptoico, ácido caprilico, ácido nonílico y ácido cáprico. Los ácidos tenían tanto cadenas lineales como ramificadas. Pueden ser también no saturados. En todos los casos la reacción fué análoga a la indicada anteriormente. Idénticos resultados se obtuvieron utilizando al Compuesto II.

20

EJEMPLO VII

Se añadió cloruro de orto-toluido (6,6 milimoles) a una solución de 5,5 milimoles de compuesto I disueltos en 5 c.c. de piridina. La solución se agitó y enfrió con hielo hasta que desapareció el desarrollo de calor. La mezcla se dejó estar 20 horas a 25°C. Se vertió en 50 c.c. de ácido sulfúrico 3N helado. La mezcla se extrajo con dos porciones de 50 c.c. de cloroformo. Los extractos combinados

25



226237

se lavaron con ácido sulfúrico 1N, con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y después con agua. La solución clorofórmica 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 producto residual sin disolver se secó. Este producto seco se purificó entonces por recristalización de alcohol isopropílico y se identificó como el orto-toluoato del Compuesto I.

Por procedimientos análogos, utilizando el correspondiente cloruro de ácido en cada caso se prepararon también el benzoato, 1-etil-ciclohexancarboxilato, ciclohexancarboxilato y 1-metilciclopropanocarboxilato del Compuesto I. Estos esteres cíclicos, particularmente aquellos formados de ácidos en los que los átomos de carbono adyacentes al grupo carboxilo son miembros de un anillo hidrocarbonado, que tenga de tres a seis átomos de carbono, son particularmente valiosos y tienen ventajas sobre el alcohol libre, puesto que presentan actividad terapéutica prolongada. Resultados idénticos se obtubieron con el compuesto II.

ENEMPLO VIII

Una solución de 3 gramos de compuesto I en 12 c.c. de piridina se trató con 1,2 g de anhídrido ftálico. La mezcla se dejó estar a temperatura ambiente durante 18 horas y se vertió entonces en 150 c.c. de ácido sulfúrico 2N helado. Durante la adición sobre el ácido sulfúrico, la mezcla se agitó rápidamente. Se separó un producto



226237

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 a vacío y se purificó por recristalización de etanol. El análisis demostró que se trataba del ester ácido, el hemifitalato del Compuesto I. Idénticos resultados se obtuvieron con el Compuesto II.

Una solución de 3 gramos del Compuesto II en 15 c.c. de quinoleina se trataron con 1 g de anhídrido succínico. Después de agitar durante toda la noche a temperatura ambiente, la mezcla se vertió con agitación en 200 c.c. de ácido sulfúrico 2N helado. El precipitado se filtró, se lavó repetidas veces con agua y se secó a vacío. Se recristalizó entonces de alcohol. El análisis demostró que era el hemisuccinato del Compuesto I. Idénticos resultados se obtuvieron con el Compuesto II.

EJEMPLO IX

Un gramo y medio del succinato del Compuesto I se disolvió en 15 c.c. de agua que contenía una cantidad equimolecular de bicarbonato sódico. La mezcla se agitó y se calentó suavemente, y se tuvo entonces a vacío un poco tiempo para separar el dióxido de carbono. La solución de la sal sódica se congeló y se secó a vacío en el estado congelado. El producto, la sal sódica del succinato del Compuesto I, era muy soluble en agua y adecuada para usarla en solución acuosa para inyecciones. Esta es una ventaja que no es posible con el alcohol libre o con



226237

los esteres ordinarios. El suero salicio puede utilizar-
se para formar soluciones isotónicas con este objeto, y
también la glucosa. Idénticos resultados se obtuvieron
con el Compuesto II.

5

EJEMPLO X

Según se mencionó anteriormente, los com-
puestos de este invento pueden administrarse solos o en
combinación con otros materiales compatibles. Este y los
siguientes ejemplos aclaran algunas de estas composicio-
nes terapéuticas en las que el Compuesto I o el Compuesto
10 II es el principal ingrediente activo.

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

	mg/tableta
15 Compuesto I	20
Fosfato cálcico (dibásico)	150
Lactosa	60
Fécula de patata	35
Estearato magnésico	5
20 Trisilicato magnésico	30

Composiciones similares pueden utilizarse
también con el Compuesto II en vez del Compuesto I.

EJEMPLO XI

Debido a su actividad anti-inflamatoria,
25 los compuestos de este invento son útiles para tratar una
gran variedad de enfermedades de la piel. Para este tipo
de tratamiento se emplea frecuentemente un unguento tópi-



226237

oo y la composición siguiente es típica para tal unguento:

		mg
	Acetato del Compuesto I	25
	Lauril-sulfato sódico U.S.P.	10
5	Propilenglicol U.S.P.	115
	Alcohol estearílico	80
	Alcohol cetílico (N.F.)	70
	Colesterina U.S.P.	45
	Vaselina U.S.P.	190
10	Aceite mineral U.S.P.	50
	Agua	400
	Metil paraben	1,0
	propil paraben	0.02

15 Composiciones similares pueden utilizarse también con el Compuesto II en vez del Compuesto I.

EJEMPLO XII

La siguiente es una composición típica del acetato del Compuesto I. utilizada para inyección intra-articular:

		gms.
20	Acetato del compuesto I	25
	Cloruro sódico U.S.P.	9
	Carboximetilcelulosa sódica	5
	Methocel 15	1
	Tween 80 U.S.P.	1,9
25	Metil paraben	2,4
	Propil paraben	0,26
	Agua c.s. para hacer 1 litro	



22

226237

Composiciones similares pueden usarse también con el Compuesto II en vez del Compuesto I.

EJEMPLO XIII

Debido a su actividad anti-inflamatoria, los compuestos de este invento son útiles para tratar una gran variedad de enfermedades de los ojos. Para este tipo de tratamiento se emplea generalmente una suspensión oftálmica y la siguiente es una composición típica de una suspensión semejante:

	gms.
10	
Acetato del compuesto I	25,00
Carboximetilcelulosa sódica	27,75
Polivinil-pirrolidona	3,00
Alcohol benéfico U.S.P.	9,00
15	
polisorbato U.S.P.	0,46
Agua	951,25

Composiciones similares pueden emplearse también con el Compuesto II en lugar del Compuesto I.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos el 28 de Enero de 1955, bajo el número 484.828, se acoge a los beneficios del artículo 51 del Vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

22F



226237

NOTA

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

5 1ª.- Una mejora introducida en el objeto de la Patente principal número 221.910 o sea en un procedimiento para la preparación de $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β , 14 α , 17 α , 21-tetrol-3,20-diona, cuyo proceso comprende poner en contacto Δ^4 -pregneno-11 β , 14 α , 17 α , 21-tetrol-3,20-diona con la actividad oxidante de un organismo del género Mycobacterium.

10 2ª.- Una mejora introducida en el objeto de la Patente Principal número 221.910 o sea en un procedimiento para la preparación de $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-14 α , 17 α , 21-triol-3,11,20-triona, cuyo proceso comprende poner en contacto Δ^4 -pregneno-14 α , 17 α , 21-triol-3,11, 20-triona con la actividad oxidante de un organismo del género Mycobacterium.

15 3ª.- Mejoras de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, según las cuales el organismo es de la especie Mycobacterium phlei.

20 4ª.- Mejoras de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, según las cuales el organismo es de la es-



22
220237

pecie Mycobacterium smegmatis.

5ª.- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente principal número 221.910.

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

Esta Memoria consta de quince hojas y la presente escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 22 FEB. 1956

P.A.

Carls