

AÑO 1958

Expediente núm. 245587



REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCION, 245587

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una PATENTE DE INVENCION por 20 años, en España

a favor de

MERCK & CO. Inc., de nacionalidad
norteamericana domiciliado en RAHWAY (New Jersey) E. U.
calle de East Lincoln Avenue núm. 126

por:

Procedimiento para la obtención de esteroides,

Nº 10708

Agente Sr. BOLIBAR,

ML/.

Caso:6405

15 NOV.



245587

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

a favor de

MERCK & CO. Inc. - de nacionalidad norteamericana - domiciliada en RAHWAY (New Jersey, E.U.) 126 East Lincoln Avenue.

por:

"procedimiento para la obtencion de esteroides"

---:::oOo:---

M e m o r i a d e s c r i p t i v a

Este invento concierne en general a un procedimiento para obtener nuevos compuestos esteroides. Más concretamente se refiere a una procedimiento para preparar nuevas 16α -alquil- 11α , 17α -dihidroxi-4-pregnen-3,20-dionas, a partir



245587

de 16α -alquil-4-pregnen-3,20-dionas.

Los nuevos compuestos de 16α -alquil- 11α , 17α -dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona, preparados conforme a este invento pueden convertirse fácilmente en 16α -alquil- 17α ,21-dihidroxi-4-pregnen-3,11,20-trionas y 16α -alquil- 11β , 17α ,21-trihidroxi-4-pregnen-3,20-dionas, compuestos dotados de extraordinaria actividad antiflogística, y especialmente eficaces para el tratamiento de artritis y enfermedades afines.

Al preparar los nuevos compuestos químicos del presente invento, empleamos como material de partida el conocido compuesto 16α -alquil-4-pregnen-3,20-diona, de la estructura representa por la Formula 1 de la hoja de formulas anexa a esta memoria, en la cual R es un alquilo.

De conformidad con el presente invento, este material de partida, 16α -alquil-4-pregnen-3,20-diona, se somete a la acción de una enzima oxidante producida por una cepa oxigenante de Dactylium dendroides en condiciones aeróbicas, para obtener 16α -alquil- 11α , 17α -dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona, compuesto de la estructura representada por la Formula 2, en la que R tiene el mismo significado de antes.

La 16α -alquil- 11α , 17α -dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona obtenida puede bromarse en la posición 21, con bromo y cloroformo, para formar 16α -alquil-21-bromo- 11α , 17α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona. Por reacción de este último compuesto con acetato potásico, se obtiene 21-acetato de 16α -alquil- 11α , 17α ,21-trihidroxi-4-pregnen-3,20-diona, el cual se oxida fácilmente con dicromato sódico en ácido acético, para formar 16α -alquil- 17α ,21-dihidroxi-4-pregnen-3,11,20-triona.

Este último compuesto se puede convertir en la bis-semicarbazona y reducir con borohidruro sódico, y, por hidró-

15 NOV



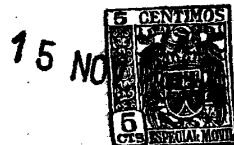
245587

lisos de la semicarbazona, se forma 16α -alquil- 11β , 17α , 21 -trihidroxi-4-pregnen-3,20-diona.

Se ha comprobado que tanto la 16α -alquil- 11α , 17α -dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona como la 16α -alquil- 11β , 17α , 21 -trihidroxi-4-pregnen-3,20-diona poseen una intensa actividad anti-inflamatoria.

Al realizar el procedimiento del presente invento, pueden obtenerse de colecciones conocidas de cultivos, cepas de Dactylum dendroides capaces de efectuar la oxigenación de 16α -alquil-4-pregnen-3,20-diona. Por ejemplo, facilitan uno de tales cultivos, Dactylum dendroides núm. NRRL 2574, los Laboratorios de Investigación Regionales del Norte, Peoria, Illinois, EUA. El microorganismo se cultiva en condiciones aeróbicas en un medio nutritivo adecuado, en inmediato contacto con la 16α -alquil-4-pregnen-3,20-diona que ha de oxigenarse; la fermentación o vegetación de los microorganismos se continúa hasta que se haya producido la oxigenación deseada. Así, la 16α -alquil-4-pregnen-3,20-diona que ha de oxigenarse puede ser incorporada directamente a un medio adecuado, que se inocula luego con una cepa oxigenante de Dactylum dendroides, y se incuba en condiciones aeróbicas, con lo que se produce la oxigenación buscada. En general, nuestro procedimiento se efectúa con preferencia cultivando primero el microorganismo en un medio de fermentación apropiado, añadiendo seguidamente la 16α -alquil-4-pregnen-3,20-diona, y continuando el cultivo del microorganismo en condiciones aeróbicas durante un lapso suficiente para realizar la oxigenación deseada.

El procedimiento del presente invento se puede efectuar en cultivos fijos y sumergidos de Dactylum dendroides que

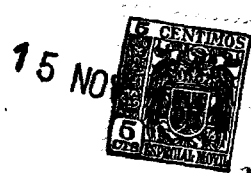


245587

vegeten en condiciones aeróbicas, aunque, por razones prácticas, lo mejor es cultivar los microorganismos sumergidos en un medio acuoso de fermentación adecuado que contenga el esteroide. La cantidad de éste que puede oxigenarse convenientemente por nuestro método depende en parte del medio particular empleado.

Los medios nutritivos acuosos adecuados para el cultivo de cepas oxigenantes de Dactylium dendroides deben contener fuentes de carbono y nitrógeno asimilables, así como cantidades pequeñas de sales inorgánicas. Para la práctica del procedimiento conforme al invento sirve cualquiera de las fuentes usuales de carbono asimilable, como dextrosa, cerelesa, glucosa, melazas invertidas y sus análogas. Similarmente, son satisfactorias para uso en los medios de fermentación fuentes complejas de nitrógeno habitualmente empleadas en procedimientos comerciales de fermentación, tales como digestión de lactalbúmina ("Edamina") y líquido de macerar maíz, o una fuente inorgánica de nitrógeno, como nitrato sódico, nitrato amónico o sus análogos. Pequeñas cantidades de sales inorgánicas, tales como sales solubles adecuadas de magnesio, potasio, sodio, y hierro, existen generalmente en fuentes complejas de carbono y nitrógeno, o pueden añadirse muy bien al medio de fermentación en proporciones reducidas, para provocar el crecimiento máximo del microorganismo oxigenante.

El siguiente es un ejemplo de medio nutritivo acuoso adecuado para uso en nuestro procedimiento para oxigenar esteroides:



Medio núm. 1.

245587

5

Dextrosa	50,0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	7,5
K_2HPO_4	1,0
KCl	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01

10

Se añade agua destilada hasta 1 litro de volumen total de medio nutritivo, y se ajusta el pH a 6,5 con hidróxido sódico.

15

La adición de cantidades mínimas de antiespumosos no es esencial, pero sí conveniente con algunos medios de fermentación, a fin de obtener rendimientos máximos de producto oxigenado que interesa. Hemos comprobado que la adición a ciertos medios de fermentación de una oxazalina substituída, que es un agente de actividad superficial catiónica y de tipo amina no volátil, disponible en el comercio con el nombre de Alkaterge C, resulta particularmente eficaz para reducir la cantidad de espuma, aunque se pueden emplear asimismo otros antiespumosos de utilidad conocida para objeto.

20

Por ejemplo, puede oxigenarse 16 α -metil-4-pregnen-3,20-diona procediendo como sigue:

25

Primero se inocular un medio de cultivo estéril, como los indicados antes, introduciendo una pequeña cantidad de suspensión de esporas en una vegetación de una cepa oxigenante de Dactylium dendroides. El medio nutritivo inoculado se incuba luego a unos 27-28°C, mientras se agita en presencia de oxígeno durante unas 24-48 horas. Seguidamente se añade al me-

30

15 NO



- 6 -

245587

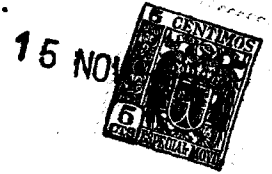
dio de fermentación una solución de 16α -metil-4-pregnen-3,20-diona en propilenglicol, y se sigue aireando el medio nutritivo durante unas cinco a treinta horas, o hasta que termine la reacción de oxigenación.

5 Terminada la oxigenación, el esteroide oxigenado se puede recuperar del caldo de fermentación extrayendolo con un disolvente organico adecuado, no miscible en agua, que disuelva estos esteroides. Son disolventes apropiados que merecen mencionarse el cloroformo, el cloruro de metileno, los ésteres
10 de ácidos orgánicos, los hidrocarburos aromaticos y sus similares. La solución de disolvente que contiene el esteroide oxigenado puede evaporarse luego, para obtener el producto deseado, que se puede purificar más por recristalización u otros procedimientos corrientes en este dominio.

15 La 16α -alquil- 11α , 17α -dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona así obtenida puede bromarse en la posición 21 con bromo y cloroforma, para formar 16α -alquil-21-bromo- 11α , 17α -dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona. Por reacción de este compuesto con acetato potásico, se produce 21-acetato de 16α -alquil- 11α , 17α , 21-
20 trihidroxi-4-pregnen-3,20-diona, que se puede oxidar con dicromato sódico en ácido acético glacial para obtener 16α -alquil- 17α ,21-dihidroxi-4-pregnen-3,11,20-triona.

Este último compuesto puede convertirse en la bis-semicarbazona, reducirse con borohidruro sódico, e hidrolizarse para obtener 16α -alquil- 11β , 17α ,21-trihidroxi-4-pregnen-3,
25 20-diona.

El siguiente ejemplo ilustra un método de llevar a la práctica el procedimiento del presente invento.



245587

EJEMPLO

Unos 3,2 litros del medio nutritivo núm, 1 antes ex-
puesto, y la mínima cantidad de una oxazalina substituída (Al-
katerge C) requebida para evitar la formacion de espuma, se es-
5 terilizaron durante media hora a 100°C. Después de esterilizar,
se inculó el medio con unos 250 ml. de una vegetación de una
cepa oxigenante de Dactylium dendroides, cultivo NRRL 2574 de
la coleccion de los Laboratorios de investigación Regionales
del Norte, Peoria, Illinois, EUA. La mezcla se agitó luego,
10 empleando un agitador de turbina, a 560 rpm., y se hizo pasar
aire a razón de 3 litros por minuto, manteniendo la tempera-
tura a 28°C durante unas 24 horas.

Al final de este lapso, se añadieron al medio fer-
mentado 1,28 g. de 16 α -metil-4-pregnen-3,20-diona disueltos
15 en 160 ml. de propilenglicol, y continuó agitándose el medio
a ritmo igual. Siguió aireándose a 3 litros minuto durante seis
horas, y se interrumpió luego la aireación por espacio de seis
horas, Esto se prolongó durante un periodo de 36 horas, a con-
tar desde la adición del esteroide.

20 Del medio fermentado se aisló 11 α ,17 α -dihidroxi-16 α -
metil-4-pregnen-3,20-diona cristalina, mediante extracción con
acetato de etilo, evaporación del disolvente orgánico en vacío,
y recristalización del residuo en acetato de etilo.

25

-----: N O T A :-----

Se reivindica como objeto de esta patente:

1.- Procedimiento para la obtencion de esteroides,
especialmente de 16 α -alquil-11 α ,17 α -dihidróxi-4-pregnen-3,20-
diona, el cual comprende someter 16 α -alquil-4-pregnen-,3,20-
30 diona a la acción de una enzina oxidante producida por una ce-



245587

pa oxidante de Dactylium dendroides en condiciones aeróbicas.

2.- Procedimiento para la obtencion de esteroides, especialmente de 16α -metil- 11α , 17α -dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona, el cual comprende someter 16α -metil-4-pregnen-3,20-diona a la acción de una enzima oxidante producida por una cepa oxidante de Dactylium dendroides en condiciones aeróbicas.

3.- Procedimiento para la obtencion de esteroides que comprende el cultivo de una cepa oxigenante de Dactylium dendroides en un medio acuoso que contiene fuentes de carbono asimilable y nitrógeno, en condiciones de inmersión aeróbica, en contacto íntimo con 16α -alquil-4-pregnen-3,20-diona, para producir 16α -alquil- 11α , 17α -dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona.

4.- Procedimiento para la obtencion de esteroides que comprende el cultivo de una cepa oxigenante de Dactylium dendroides en un medio acuoso que contiene fuentes de carbono asimilable y nitrógeno en condiciones de inmersión aeróbicas, en contacto íntimo con 16α -metil-4-pregnen-3,20-diona, para producir 16α -metil- 11α , 17α -dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona.

5.- Procedimiento para la obtencion de esteroides.

Esta memoria consta de ocho paginas escritas por una sola cara.

BARCELONA, 15 NOV. 1958

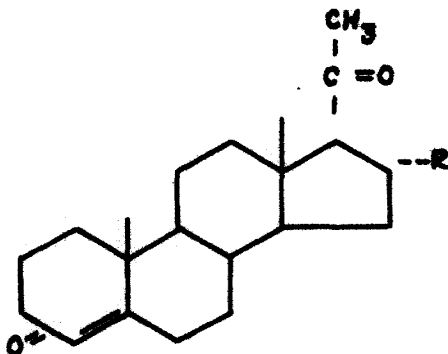
P.A.



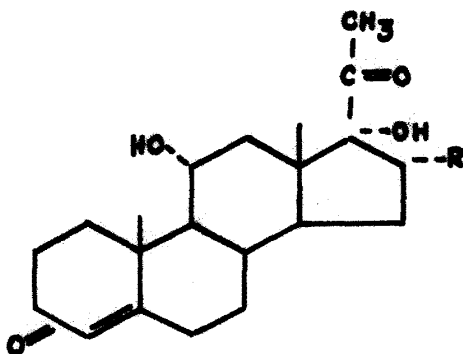
6405

FORMULA 1

245587



FORMULA 2



P.A.