



262060

262060

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

PATENTE DE INVENCION

formulada el 28 de Octubre de 1.960, con el Núm. 262.060

en

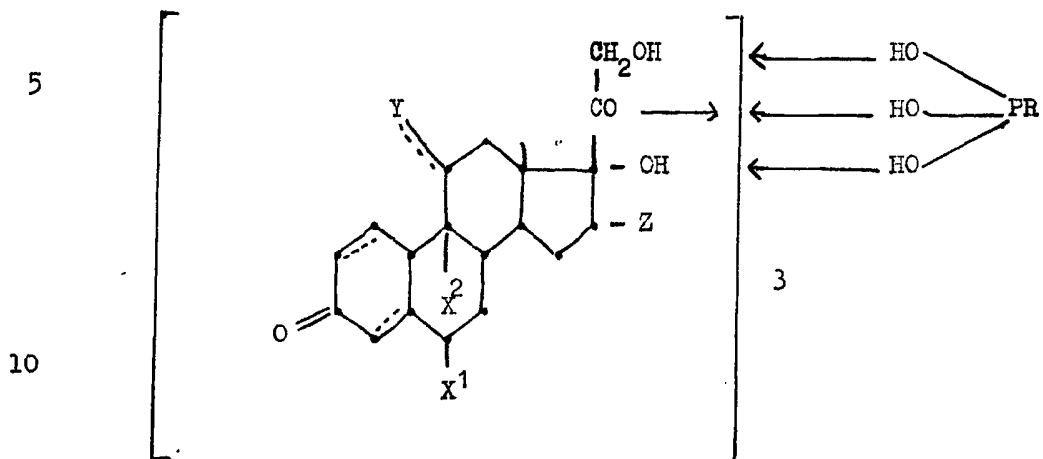
ESPAÑA

por VEINTE años

a nombre de CARL EMIL VERMEHREN y THOMAS LUDVIG MARTIN VERMEHREN,  
de nacionalidad danesa, residentes en 8, Wiedersvej, Dragør, Dinamarca, por:

"UN METODO DE PRODUCIR DERIVADOS DE HORMONA CORTICAL"

Este invento se refiere a derivados de hormonas corticales y más particularmente a los derivados de hormona cortical monómeros solubles en álcali, de fórmula general:



262060



en la que  $X^1$  y  $X^2$ , que pueden ser análogos o diferentes, son hidrógeno o halógeno, Y es hidrógeno, hidroxilo u oxígeno, representándose el enlace "extra" con el átomo de carbono por la línea de puntos, Z es hidrógeno o metilo, y R es oxígeno o azufre, o a las sales alcalinas de los mismos.

5 Como se indica por el enlace de puntos, el invento comprende derivados de hormonas corticales en los que los átomos de carbono en las posiciones 1 y 2 están conectados por un enlace simple, así como aquellos en los que dicha conexión es un doble enlace, y donde los sustituyentes pueden ser tanto sustituyentes alfa como beta, o bien alfa y beta.

10 Ejemplos típicos de hormonas corticales cuyos nuevos derivados son proporcionados de acuerdo con el invento, son corticosa, hidrocortisona, prednisona, prednisolona y dexametasona.

15 Es un objeto de este invento proporcionar los nuevos derivados de hormona cortical según se han definido anteriormente, y sus sales de metal alcalino, así como un procedimiento para su preparación. Otros objetos se deducirán evidentemente para los expertos en esta técnica.

20 Es sabido que, por esterificación de hormonas corticales que tienen un grupo hidroxilo en la posición 21, por medio de un ácido policarboxílico, de manera que solamente se esterifique un grupo carboxilo, se obtienen ésteres que forman sales acuosolubles con hidróxido amónico o alcalino, manteniendo dichas sales la actividad farmacológica de la hormona cortical misma. Los ésteres parciales de esta clase son útiles contra varias enfermedades, particularmente en el caso de condiciones alérgicas y de choque. En enfermedades de esta clase, es frecuentemente de importancia decisiva que el que el efecto del remedio se manifieste de un modo rápido o instantáneo por inyección intravenosa o intramuscular, como en el uso de

25

30



080

los ésteres parciales dichos.

Se ha encontrado ahora que pueden prepararse compuestos bien definidos y bien cristalizantes de ácido fosfórico con hormonas corticales, que tienen un grupo hidroxilo libre en la posición 21, conteniendo tres moléculas de hormona cortical ligadas a cada molécula de ácido fosfórico, siendo dichos compuestos mismos escasamente solubles en agua, pero formando sales alcalinas muy solubles.

Por administración parenteral en forma de las sales solubles de metal alcalino, los compuestos del invento no solamente ejercen un efecto instantáneo de hormona cortical sino que, además, dicho efecto es de duración relativamente prolongada.

Los compuestos del invento cristalizan bien y, por tanto, se purifican fácilmente por cristalización formando productos cristalinos, puros, cuyas sales alcalinas forman soluciones acuosas estables de composición bien definida y, por tanto, pueden venderse en forma terminada como composiciones estériles, inyectables.

En la manera preferida de preparar los nuevos derivados de hormonas cortical del invento, la hormona cortical en cuestión se hace reaccionar a temperatura ambiente, o por debajo de la misma, con un agente fosforilante, usando este último en proporciones que corresponden a 1/2-1 átomo de fósforo para cada molécula de la hormona cortical, después de lo cual se hidroliza el producto de reacción, y el precipitado obtenido se aísla.

Usando un agente fosforilante que contenga un isotopo de fósforo, los compuestos resultantes son particularmente adecuados como sustancias trazadoras en experimentos científicos y de diagnóstico debido a la composición bien definida de los derivados cristalinos,

Es sorprendente que los nuevos derivados que contienen 3 moléculas de la hormona cortical por molécula de ácido fosfórico son capaces de formar sales e incluso sales alcalinas solubles en agua,



252060

ya que era de esperar que el método de preparación daría como resultado un éster terciario de ácido fosfórico que no puede formar sales. Sin embargo, como se explicará más adelante, las propiedades indican que los derivados resultantes no son ésteres normales de ácido fosfórico, sino compuestos con grupos hidroxilo intactos en la posición 21 de las moléculas de hormona cortical, en las que el grupo hidroxilo en la posición 17 ha adquirido un carácter ácido que hace posible la formación de sal.

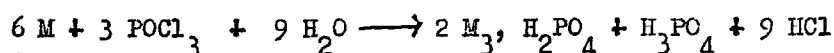
Como se desprende de lo anterior, los nuevos derivados se preparan a partir de hormonas corticales que tienen un grupo hidroxilo en la posición 17, un grupo ceto en la posición 20 y un grupo hidroxilo en la posición 21, mientras que no tiene importancia el que en la posición 11 haya hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo oxo, el que haya solamente un doble enlace en la posición 4,5, como en la cortisona y la hidrocortisona, o también en la posición 1,2 como en la prednisona y la prednisolona, y el que la molécula de hormona cortical contenga o no halógeno en la posición 6 o 9, y contenga o no un grupo metilo en la posición 16.

En un método preferido de preparación de los nuevos derivados la fosforilación se realiza en una fase homogénea usando un disolvente, tal como por ejemplo piridina, preferiblemente mezclado con benceno. Al hacer la reacción en una fase homogénea, las proporciones son preferiblemente de una molécula del agente fosforilante por dos moléculas de la hormona cortical, que, en las líneas que siguen, se considerará como la proporción teórica del agente fosforilante. Sin embargo, en este caso, puede recurrirse también al uso de un pequeño porcentaje en exceso, por ejemplo un exceso de 2-10% del agente fosforilante. Como agente fosforilante, se usa preferiblemente oxihaluro de fósforo, pentahaluro de fósforo o haluro de tiofosforilo. La clase de derivado que se forma directamente por fosforilación con los agentes fosfori-

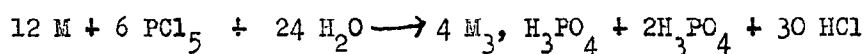


lantes dichos, no se conoce, pero la fosforilación en combinación con la hidrólisis subsiguiente puede ilustrarse por los siguientes esquemas de reacción, en los que la molécula de hormona cortical se representa por M:

5



Con pentacloruro de fósforo:



10

Sin embargo, la fosforilación puede realizarse también como una reacción en dos fases suspendiendo la hormona cortical en un medio que es inerte para el agente fosforilante, y al que se añade un disolvente para este último, y agitando durante la reacción. En esta realización, puede usarse también una mezcla de benceno y piridina, sirviendo el primero como medio de suspensión para la hormona cortical, y la última como disolvente para el agente fosforilante. También, se puede recurrir al uso de una mayor proporción del agente fosforilante, por ejemplo hasta el doble de la cantidad teórica.

15

A continuación, se ilustrará el invento por medio de ejemplos, y por dibujos a los cuales se refieren algunos de los ejemplos.

20

En los dibujos, las figuras 1, 2 y 3, representan tres series de cromatogramas sobre papel,

la figura 4 representa una curva de valoración y

25

la figura 5 representa un diagrama IR de un derivado de hidrocortisona de acuerdo con el invento.

#### Ejemplo 1

En un matraz de tres bocas con tubos de entrada y salida para el nitrógeno, un termómetro y un agitador cerrado se colocan 45 gr. de hidrocortisona, 796 ml. de piridina y 1060 ml. de benceno. Se hace

30



282000

5 pasar a través del matraz nitrógeno que se ha lavado con pirogalol y se ha secado con cloruro cálcico. El matraz se coloca en un baño refrigerante de agua y hielo y por reposo y agitación, se enfría el contenido del matraz a 5° C. Desde una bureta, se mezclan 6,3 ml. de oxiclорuro de fósforo recién destilado, durante unos 10 minutos para lo cual la temperatura de reacción se mantiene por debajo de 9° C. La agitación se continua durante media hora pasando nitrógeno durante todo el tiempo, y la mezcla de reacción se deja luego durante 1 hora a 8° C. Mientras tanto, un baño de hidrólisis constituido por 1008 ml. de ácido clorhídrico concentrado y 10 2375 ml. de agua se enfrían a 7° C. en otro matraz mayor, que está provisto también con medios para hacer pasar nitrógeno a través del mismo, un agitador y un termómetro. Se usa un baño de refrigeración constituido por hielo y agua.

15 Cuando se ha enfriado el baño de hidrólisis, se introduce lentamente la mezcla de reacción, por ejemplo durante 4-5 minutos manteniendo la temperatura del baño por debajo de 9° C. Precipita un producto de hidrólisis y se recoge por succión sobre un embudo de Büchner. La succión se continua hasta que se ha eliminado la mayor parte del benceno, después de lo cual, el residuo se lava con 20 dos porciones de 400 ml. de éter. La sustancia se introduce después en un matraz vacío y se seca a unos 60° C. en vacío, hasta que se han eliminado todos los indicios de éter, después de lo cual se agita con 100 ml. de etanol acuoso para retirar la hidrocortisona 25 que no ha reaccionado, y se seca durante 6 horas en alto vacío. El producto de reacción secado funde a 205-210° C.

Se disuelven 10 gr. del producto de reacción en 30 ml. de etanol y se dejan durante 24 horas a temperatura ambiente. Cristaliza un sólido blando, que se denominará en adelante R<sub>3</sub>, y que funde a 30 216-217° C. después de secar en alto vacío. El rendimiento de R<sub>3</sub>,

262060



calculado con relación a hidrocortisona, alcanza 50-60 %.

Recristalizando tres veces de etanol anhidro, el punto de fusión de  $R_3$  puede llevarse hasta 220° C.

### Ejemplo 2

5

Se suspenden 10 gr. de hidrocortisona en 3,7 ml. de piridina y 180 ml. de benceno. La temperatura se mantiene a 18° C., y se añaden 1,32 ml. de oxícloruro de fósforo. La mezcla de reacción se mantiene durante 2 días bajo una atmósfera de nitrógeno, mientras se agita. Luego se separa la masa de reacción dura del benceno y se seca en vacío. La sustancia seca se extrae con dos porciones de 100 ml. de etanol al 50 %. Evaporando el etanol acuoso, cristalizan unos 2 gr. de hidrocortisona que no ha reaccionado. El residuo aceitoso se lava con éter y se seca para dar un producto bruto que funde a 200-205° C.

10

25

El producto bruto se disuelve en 15 ml. de etanol caliente y se añaden 15 ml. de agua. Al cabo de algún tiempo, cristaliza una sustancia que funde a 212-214° C. después de recristalización de etanol anhidro. Después de una nueva recristalización, se recuperan unos 3 gr. de sustancia con punto de fusión 215-217° C., cuya sustancia tiene las propiedades de la sustancia  $R_3$  del ejemplo 1.

20

### Ejemplo 3

Se colocan 166 ml. de piridina seca y 240 ml. de benceno en un matraz de tres bocas con tubos de entrada y salida para nitrógeno, un agitador, un cierre de mercurio y un embudo de separación enfriando la mezcla a 7° C. por medio de un baño de enfriamiento. Después de hacer pasar una corriente de nitrógeno durante 5 minutos, se añaden 10 gr. de prednisolona que funde a 230° C. o más. La prednisolona se lava con 10 ml. de piridina seca. Después de

25

30



hacer pasar corriente de nitrógeno durante 10 minutos más, se añaden 1,4 ml. de oxiclорuro de fósforo recién destilado, en y periodo de 5 minutos. La mezcla se deja durante 1 hora a 7-8° C. y luego durante 30 minutos a 18° C.

- 5 Se colocan 200 ml. de ácido sulfúrico concentrado y 700 ml. de agua en un vaso de precipitados con agitador, y la mezcla se enfría a 5° C., después de lo cual el contenido de matraz se vierte sobre esta mezcla ácida en 3 porciones, añadiendo cada vez 50 gr. de hielo machacado. La adición se termina al cabo de 1 minuto, después de lo cual la mezcla de hidrólisis se deja durante 1 minuto mientras se agita enérgicamente. La temperatura, que puede aumentar hasta unos 14° C. durante la hidrólisis, se rebaja durante un minuto más hasta 7° C. por adición de hielo, y el producto de hidrólisis se recoge después sobre embudos Büchner por succión. La succión se continúa para eliminar el benceno por desecación, después de lo cual se lava dos veces sobre el filtro con agua y dos veces con éter. El residuo se coloca después en un matraz de vacío y se lava con 100 gr. de éter. El rendimiento del compuesto de ácido fosfórico recuperado es 65%, calculado sobre prednisolona. El punto de fusión es 212-214° C. El producto bruto se purifica por extracción con tres porciones de 100 ml. de etanol acuoso al 30% a temperaturas ambiente, y luego con dos porciones de etanol acuoso al 50 %, a 15° C. La extracción se realiza cada vez agitando durante 2 minutos con decantación y filtración subsiguiente. Después de las extracciones, la sustancia se seca durante 24 horas en alto vacío.
- 10
- 15
- 20
- 25

Rendimiento, 60%; punto de fusión 214-216° C.

El producto bruto así purificado está constituido todavía por varios componentes que puede separarse por cromatografía sobre una columna de alúmina.

- 30 La separación se describirá detalladamente a continuación con

262000



referencia a la descripción de algunos cromatogramas que se representan en los dibujos.

Ejemplo 4

5           Se disuelven 0,25 gr. de dexametasona en 4 ml. de piridina y 6 ml. de benceno. La temperatura se mantiene a 6-8° C., y se añaden gota a gota 0,03 ml. de oxiclорuro de fósforo. La mezcla de reacción ligeramente verdosa se deja durante 30 minutos a 15° C. La mezcla de reacción se vierte luego sobre una mezcla de 5 ml. 10 de ácido clorhídrico concentrado y 10 ml. de agua, después de lo cual el precipitado se recoge sobre un embudo Büchner, se lava con agua y se seca con éter, dando 120 mg. de una sustancia que funde a 160-200° C. Este producto se extrae con tres porciones de 2 ml. de etanol acuoso al 30% y se seca en vacío. El rendimiento es 70 mg. de una sustancia que funde a 218° C. 15

Un examen por cromatografía y electroforesis del producto bruto y del producto recuperado por extracción con etanol se describe más adelante en relación con una discusión de los cromatogramas representados en los dibujos.

20           Para ilustrar el carácter de los compuestos del invento, se menciona la siguiente relación con las realizaciones de los ejemplos 1, 3 y 4 con referencia a los dibujos.

Los cromatogramas representados en las figuras 1, 2 y 3 se realizan en un sistema con formamida como fase fija y cloroformo saturado con formamida como fase móvil. La cromatografía se 25 hizo a una temperatura de 27° C. sobre papel Whatman No. 1 durante un periodo de 90 minutos con una corriente descendente.

La figura 1 se refiere al ejemplo 1 y corresponde a la hidrocortisona.

La figura 2 se refiere al ejemplo 3 y corresponde a la prednisolona, 30

262060



la figura 3 se refiere al ejemplo 4 y corresponde a la desametonosona, y

las figuras 4 y 5 se refieren al ejemplo 1.

Las figura 1 comprende los siguientes cromatogramas:

- 5 1. Hidrocortisona.
2. El producto de reacción con punto de fusión 205-210° C. según el ejemplo 1.
3. R<sub>3</sub> con punto de fusión 220° C. recristalizado tres veces de etanol anhidro.
- 10 4. El licor originario derivado de la cristalización de R<sub>3</sub>.
5. Un extracto con agua que contiene 1 % de etanol del licor originario evaporado a sequedad.
6. El residuo de extracción derivado del extracto sobre 5.
7. El residuo de extracción derivado del extracto sobre 8.
- 15 8. Un extracto renovado de la sustancia sobre 6 con el mismo disolvente.

De los cromatogramas se desprenden que, ya en el cromatograma 2, que representa el producto de reacción con punto de fusión 205-210° C. solamente quedan indicios de la hidrocortisona que no ha reaccionado R<sub>2</sub>, mientras que el cromatograma muestra la presencia de impurezas R<sub>1</sub> y R<sub>4</sub>. En el cromatograma 3, que representa el producto cristalizado R<sub>3</sub> con punto de fusión 220° C., quedan solamente indicios de la impureza R<sub>1</sub> y no se observa nada de la impureza R<sub>4</sub>.

Para examinar el curso del proceso, el licor originario derivado de la cristalización se ha cromatografiado para dar el cromatograma 4, en el que pueden verse claramente las impurezas R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub>. El licor originario evaporado se extrajo dos veces con agua que contenía etanol, y el extracto y el residuo se representan por los cromatogramas 5 y 6, respectivamente, para el primer extracto y 7 y 8, respectivamente, para el segundo extracto. Se ve



200080

que la parte principal de la hidrocortisona que no ha reaccionado ( $R_2$ ) pasa a la fase acuosa que contiene etanol, mientras que la parte principal de  $R_4$  permanece sin disolver por la primera extracción. Por la extracción repetida, en la que se disuelve nuevamente algo de  $R_1$  sin que haya presentes cantidades sustanciales de  $R_2$  y  $R_4$ , hay posibilidad de cristalización de  $R_1$ . Se ha encontrado que esta sustancia forma agujas cristalinas que contienen nitrógeno y es probablemente un compuesto piridínico de hidrocortisona. Tales compuestos piridínicos, que no contienen ácido fosfórico, se forman también por la fosforilación de esteroides distintos del presente, pero frecuentemente son el producto principal como en el caso de la progesterona, la 17-hidroxiprogesterona y la nortestosterona. Por consiguiente, es sorprendente que estos compuestos piridínicos se presente únicamente en cantidades proporcionalmente inferiores por el método presente, permitiendo así la obtención de productos de fosforilación del tipo  $R_3$  con un rendimiento satisfactorio.

La cristalización de la impureza  $R_4$  no ha sido posible, pero debe mencionarse que el contenido de fósforo corresponde con bastante aproximación al de un di-éster. Sin embargo, como se vé por el cromatograma 2, esta última sustancia se presenta solamente en cantidades inferiores en el producto de hidrolisis.

Por medio de un macro-análisis, usando aproximadamente 0,5 gramos de sustancia, se ha encontrado que el producto de fosforilación cristalino  $R_3$  funde a  $220^\circ$  C. contiene 2,61 % de fósforo, mientras que un sub-micro-análisis ha dado 2,67 % de fósforo ambos por el método del molibdeno amónico. Mediante una análisis de carbono de acuerdo con Van Slyke, se encontraron 64,3 % de C, mientras que no pudo encontrarse nitrógeno, ni cualitativamente ni cuantitativamente. Se calcula que la constitución  $[M]_3, H_3PO_4$  da 2,61 % de P y 63,9% de C, en estrecha concordancia con el análisis indicado.

262080



$R_3$  es muy ligeramente soluble en agua y, según resulta del método de preparación es estable frente a los ácidos. Hirviendo la sustancia con una base etanólica al 50 % o acuosa, se produce una transformación, pero no se forma hidrocortisona, y, por consiguiente, la transformación no puede consistir en una saponificación de  $R_3$ . Valorando una solución de  $R_3$  en etanol anhidro con hidróxido sódico 0,1 N en agua a pH 7,4, se obtiene una solución que, mediante secado por congelación, da un sólido blanco, que es fácilmente soluble en agua (aproximadamente 20 % a temperatura ambiente).

En los dibujos, la figura 4 representa una curva de valoración que se ha obtenido añadiendo 26,00 ml. de hidróxido sódico 0,1 N y 200 ml. de agua sobre una solución de 1,0000 gr. de  $R_3$  en 200 ml. de etanol anhidro y valorando por retorno con ácido clorhídrico 0,1 N. Las abscisas representan NaOH 0,1 N, en ml., y las ordenadas el valor del pH. Partiendo del consumo de base correspondiente a los puntos de inflexión de la curva, es decir, 8,3 y 17,8 ml. de NaOH 0,1 n; respectivamente, se calculó el peso molecular bajo el supuesto de que, en el primer caso, se neutralizaba un ion hidrógeno dissociable, y, en el segundo caso, dos. Las cifras encontradas, 1205 y 1125, respectivamente, concuerdan bien con la fórmula bruta supuesta  $[M]_3, H_3PO_4$  correspondiente a un peso molecular de 1185.

Se ha tomado un espectro infrarrojo de  $R_3$ , según se representa en la figura 3. En esta figura, los números del eje de abscisas representan las longitudes de onda en cm.<sup>-1</sup>, y los del eje de ordenadas representan la absorción relativa. El espectro se ha tomado con una solución de 1,5 mg. de la muestra en 300 mg. de bromuro potásico. Este espectro no presenta enlaces del tipo éster, y un cálculo del contenido de grupos hidroxilo libres sobre la base del espectrograma indica la presencia de nueve grupos hidroxilo libres

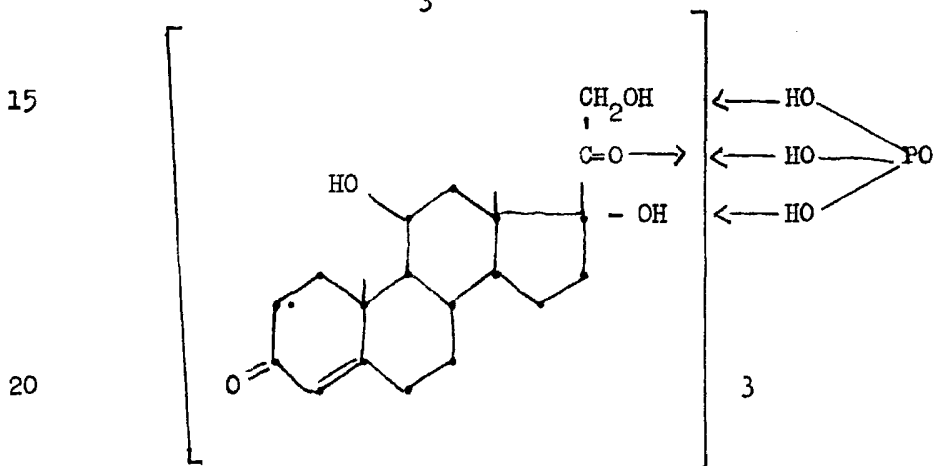


por molécula.

Por consiguiente, el compuesto  $R_3$  se supone que tiene la fórmula bruta dicha, sin ser un éster y que tiene los tres grupos hidroxilo en cada molécula de hidrocortisona intactos.

5 Las reacciones de color con azul de tetrazoilo y con cloruro de trifeniltetrazoilo están fuertemente empeoradas en comparación con las reacciones de color que puede obtenerse con la hidrocortisona misma por medio de estos reactivos de color. Igualmente con diamin-plata, una solución de  $R_3$  da una reacción más débil que la hidrocortisona, indicando que la reacción de alfa-cetona es fuertemente  
10 empeorada.

Teniendo en cuenta estas circunstancias, debe atribuirse la siguiente fórmula a  $R_3$ :



suponiendo que el enlace entre cada uno de los grupos hidroxilo del ácido fosfórico y el ceto grupo en la posición 20 es un enlace hidrógeno, debido a lo cual el átomo de hidrógeno en el grupo hidroxilo en la posición 17 puede suponerse que está suficientemente suelto para permitir que se formen sales de metal alcalino por intercambio  
25 de este átomo de hidrógeno con un átomo de metal alcalino.

Otros derivados de hormonas corticales comprendidos por el invento se supone que son de constitución análoga:

30 Así, pues, los cromatogramas representados en la figura 2 se

402036  
SOLIMAR S

refieren a las siguientes sustancias:

- 9. Prednisolona.
- 10. El producto de fosforilación de prednisolona resultante del método del ejemplo 3 y que tiene el punto de fusión 213-214° C.
- 5 11. El producto purificado con punto de fusión 214-216° C. obtenido por extracción con etanol de acuerdo con el Ejemplo 3.
- 12. Una fracción obtenida por cromatografía sobre alúmina del producto de 11.
- 13. Electroforesis de la sal sódica del producto R<sub>3</sub> de 12.
- 10 14. Electroforesis de la sal sódica de monofosfato de prednisolona.

Los cromatogramas 9-12 se prepararon por el mismo método que los cromatogramas 1-8. Sobre el cromatograma 10 se ve que, en el punto de admitancia P, hay presente una impureza R<sub>1</sub>, constituida por un complejo piridínico (véase la explicación de la figura 1).  
15 Se ve también un R<sub>2</sub> restante de prednisolona y dos esteroides que contienen fósforo R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>.

Del cromatograma 11 se ve que la prednisolona R<sub>2</sub> ha desaparecido por la purificación.

20 El cromatograma 12 representa un producto que se obtiene cromatografiando la sustancia del cromatograma 11 sobre una columna de alúmina de la manera siguiente.

Se disuelven 100 mg. de dicha sustancia en 0,5 ml. de etanol y se añaden 9,5 ml. de benceno, después de lo cual se filtra la  
25 solución. Una columna de alúmina, que contiene 6 gr. de alúmina, se lava con benceno, después de lo cual se vierten sobre la columna primeramente 15 ml. de benceno y luego la solución antes citada. Después de eluir con 40 ml. de etanol al 5 % en benceno, se toman 20 fracciones con los siguientes resultados:

30 Las fracciones 1-3 no tienen nada disuelto.



202069

Las fracciones 4-6 contienen una sustancia cristalina y están representadas por el cromatograma 12. Como se ve, la fracción  $R_4$  ha desaparecido, y dicho sustancia cristalina se comporta igual que la sustancia  $R_3$  casi pura.

5 Las fracciones 7-20 contienen cantidades variables de  $R_3$  junto con  $R_4$ .

La fracción  $R_3$  que se recuperó cromatografiando sobre alúmina se ha transformado en la sal sódica según se ha descrito anteriormente al hacer referencia al producto de fosforilación  $R_3$ , que se  
10 obtuvo por fosforilación de hidrocortisona, y se ha sometido después a electroforesis durante 75 minutos a 400 voltios en un amortiguador de borato que contenía 7,63 gr. de borato sódico y 0,62 gr. de ácido bórico por litro, dando el cromatograma 13. Comparando este último con 14, que presenta el resultado de la electroforesis  
15 de la sal sódica de monofosfato de prednisolona bajo las mismas condiciones se ve que el producto purificado no contiene monofosfato.

En la figura 3 se representan los cromatogramas de los siguientes productos:

20 15. Dexametasona.

16. El producto bruto del Ejemplo 4, con punto de fusión 160-200° C.

17. El producto bruto extraído con etano, con punto de fusión 218° C.

25 18. Electroforesis de la sal sódica de monofosfato de dexametasona.

19. Electroforesis de la sal sódica del producto purificado representado por 17.

30 Por el cromatograma 16 se ve que el producto bruto contiene todavía dexametasona que no ha reaccionado ( $R_2$ ), y, por 17 se ve



262060

que esta última desaparece por extracción con etanol. Por las dos electroforesis se ve que el producto purificado no contiene monofosfato. El compuesto A es un compuesto del esteroide y borato. Se deduce de esto que las diversas hormonas corticales, que representan el grupo abarcado por la presente solicitud, se comporta de un modo análogo en la fosforilación y la purificación, puesto que forman todas un compuesto con ácido fosfórico, que contiene tres moléculas del esteroide por molécula del ácido fosfórico y capaz de disolverse en álcali.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Dinamarca, con fecha 29 de Octubre de 1.959, bajo el Número 3892/59, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15

N O T A

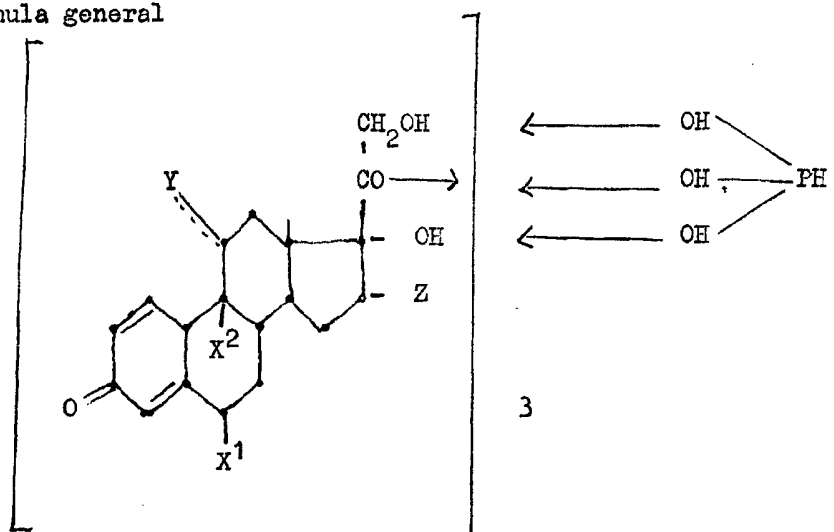
Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

20

1º.- Un método de producir derivados de hormona cortical de la fórmula general

25

30



262060

SECRET  
RECEIVED  
F. GENTILE

donde  $X^1$  y  $X^2$  son similares o diferentes y representan hidrógeno o halógeno, Y es hidrógeno, hidróxilo u oxígeno, Z es hidrógeno o metilo y R es oxígeno o azufre, caracterizado por hacer reaccionar la hormona cortical en cuestión a una temperatura que no excede de la ambiente, con un agente de fosforilación en proporciones dentro de la gama de media a una molécula del agente de fosforilación por una molécula de la hormona cortical, hidrolizar el producto de reacción, aislar el producto de hidrólisis precipitado, y purificarlo por cristalización.

5

10

2º.- Un método según el punto 1º, en el cual se usa oxocloruro de fósforo como agente de fosforilación.

15

3º.- Un método según el punto 1º, en el cual la reacción se realiza en una solución homogénea de los reactivos usando la cantidad teórica o ligeramente mayor que la teórica de agente de fosforilación.

4º.- Un método según el punto 3º, en el cual el disolvente es una mezcla de piridina y benceno.

20

5º.- Un método de producir derivados de hormona cortical. Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

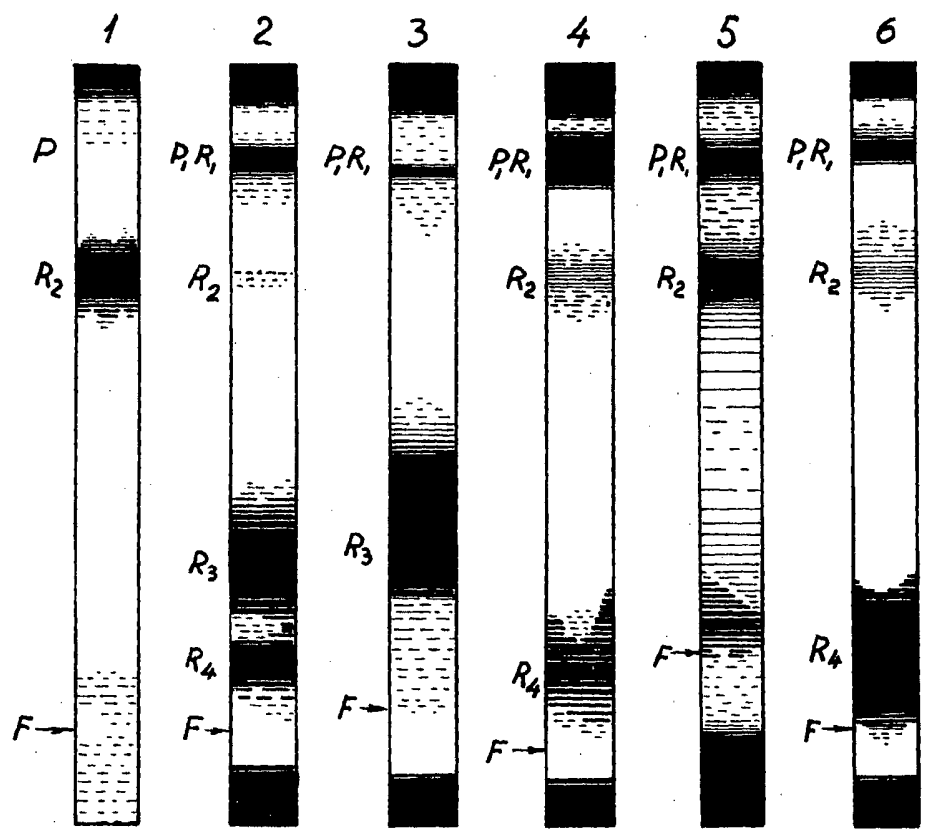
Esta Memoria consta de diecisiete hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 6 DICIEMBRE 1951

P. A.

MCR/.

Fig. 1.





252987

6

7

8

$P, R_1$

$P, R_1$

$P, R_1$

$R_2$

$R_2$

$R_2$

$R_4$

$R_4$

$F$

$F$

$F$

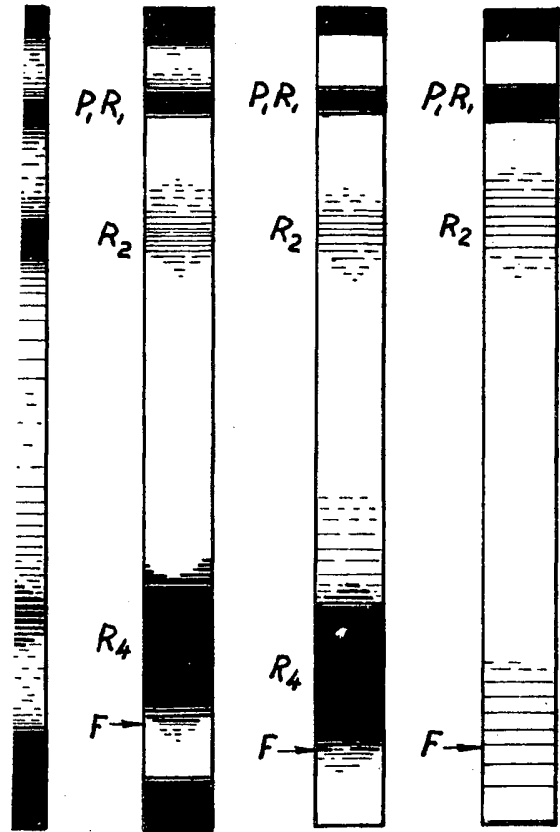


Fig. 2. 262060

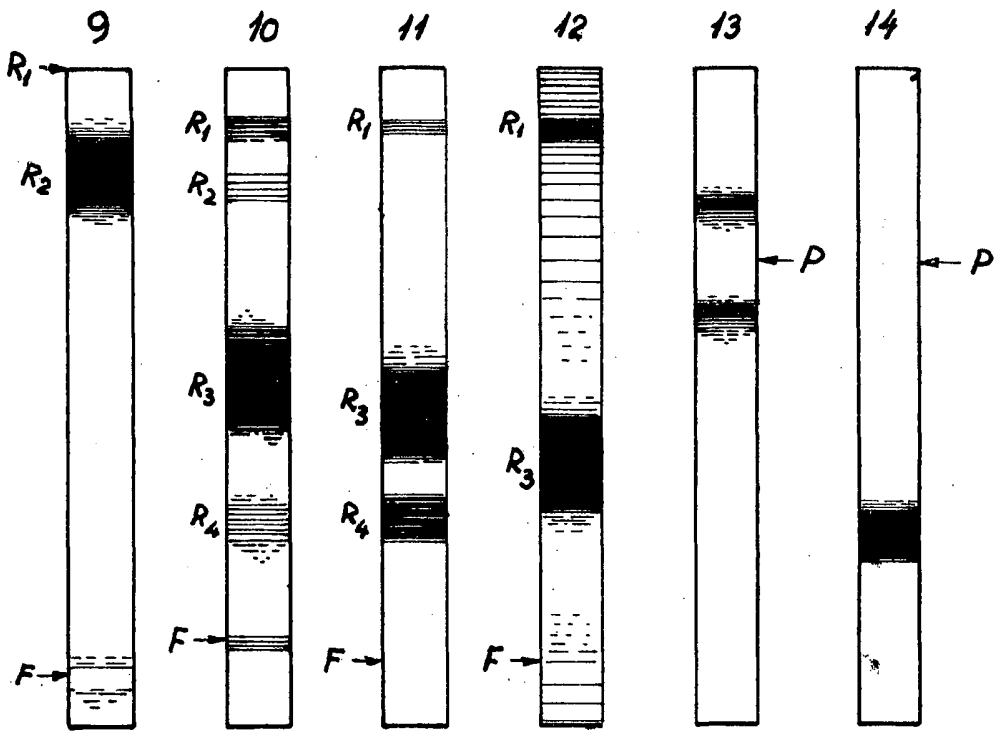
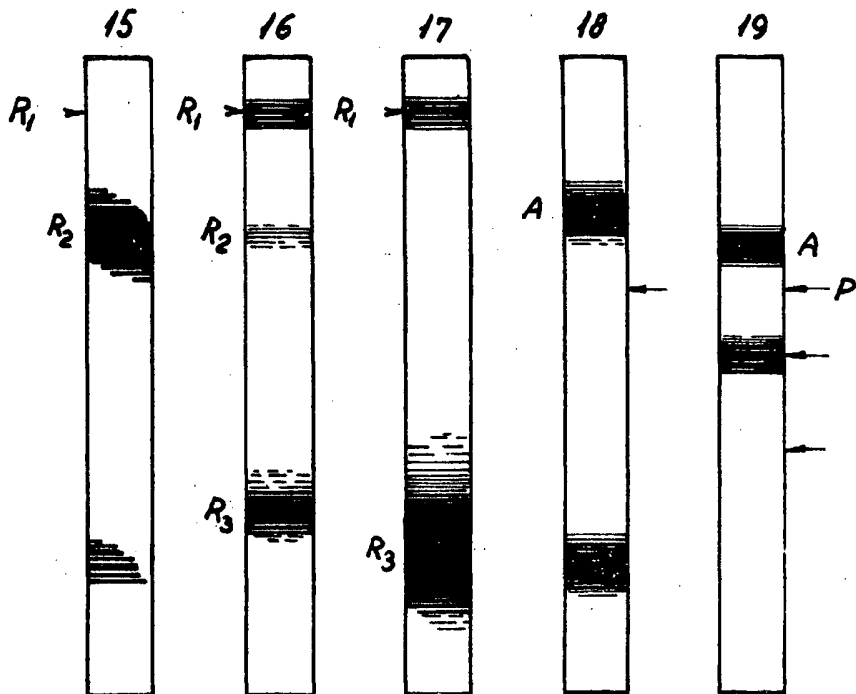


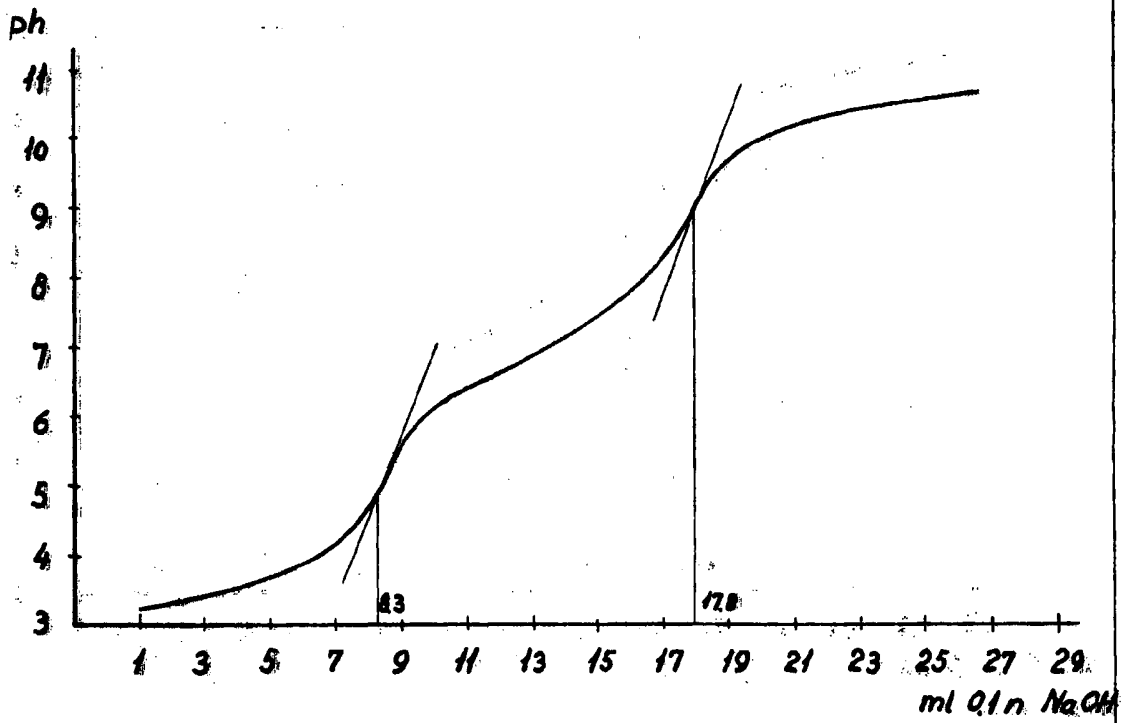
Fig. 3.





262960

Fig. 4.



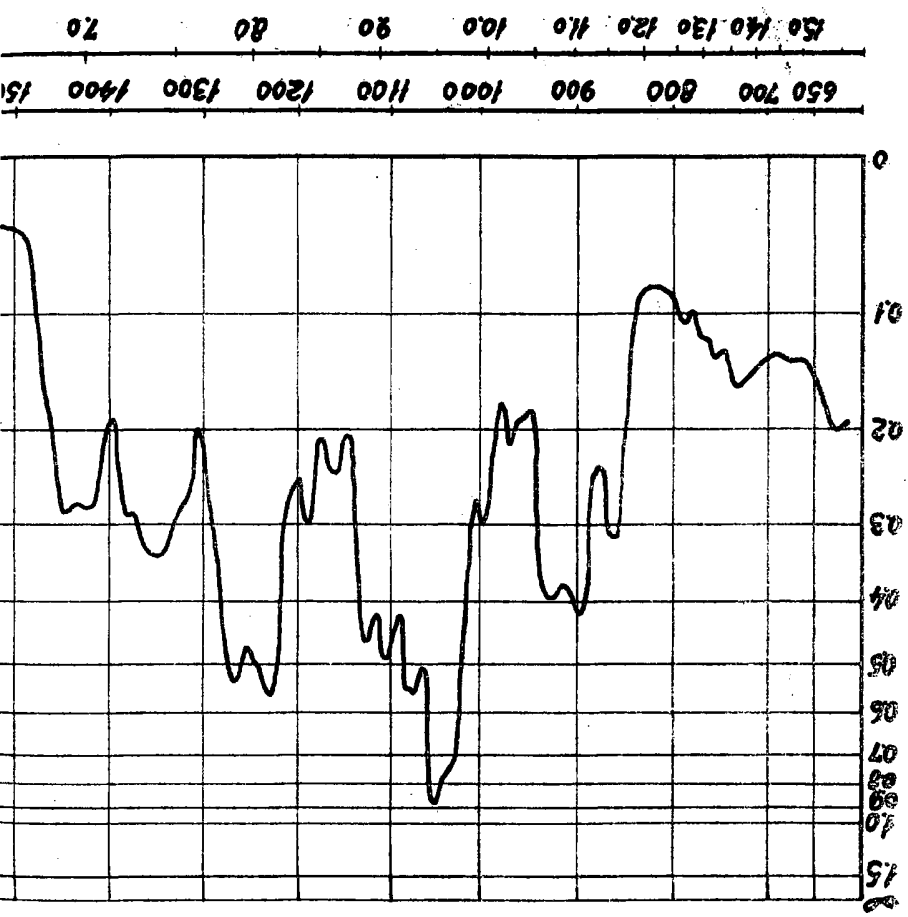


Fig. 5

