



282577

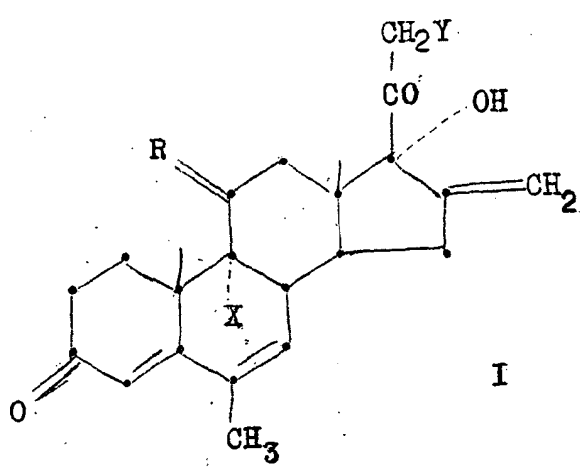
P A T E N T E  
D E  
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR 6-METIL-16-METILEN-ESTEROIDES INSATURADOS", a favor de la firma alemana E. MERCK AKTIENGESELLSCHAFT, residente en DARMSTADT (Alemania).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Se ha descubierto que los 16-metilen-3-ceto-esteroides insaturados de la fórmula I



10. en que

282577



R = H, OH o bien = O

X = H o bien F

Y = grupo hidroxil libre o esterificado,

282577

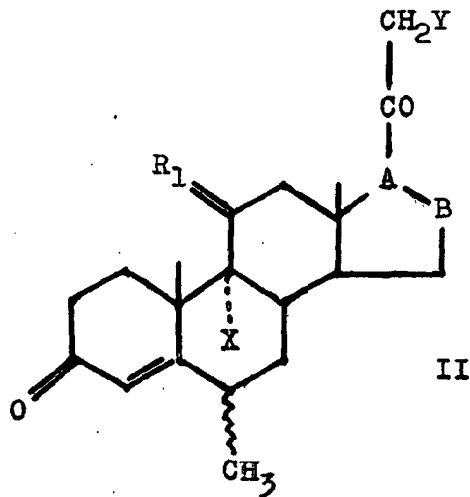
5.

así como sus derivados 1-dehidro, poseen excelentes propiedades corticoides. Sorprendentemente, los nuevos compuestos actúan más intensamente que los correspondientes 6-metil-16-metilen-esteroides insaturados en posición 6,7.

10.

Objeto de este invento es por lo tanto un procedimiento para preparar 16-metilen-3-ceto-esteroides insaturados de la fórmula I, que consiste en tratar con cloranilo un 6-metil-esteroide de la fórmula II

15.



20.

25.

en que

X e Y tienen el significado expuesto antes,

R<sub>1</sub> significa H,H o bien R y

A - B significa

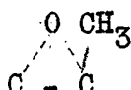
OH	CH <sub>2</sub>	
C	- C	

o bien



283

282577



5. y, siempre que R<sub>1</sub> signifique hidrógeno, introducir en posición 11 un grupo hidroxilo, por tratamiento con un microorganismo hidroxilante en 11, así como, para preparar los correspondientes derivados 1-dehidro, introducir adicionalmente en posición 1,2 un enlace doble, por tratamiento con 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona o con microorganismos deshidrogenantes en posición 1,2.
- 10.

La 6-deshidrogenación de un compuesto de la fórmula II con cloranilo se realiza ventajosamente en presencia de un disolvente inerte, como el benceno, el tolueno, el xileno, el cloroformo, el cloruro de metileno, la acetona, el metanol, el etanol, el dioxano, el éster etílico del ácido acético, el butanol terciario, el tetrahidrofurano o el ácido acético glacial. De conveniencia se actúa en caliente, eventualmente a la temperatura de ebullición del disolvente empleado. El cloranilo se utiliza por lo general en la proporción molecular de 1:1. El exeso no es nocivo. Por lo general, la reacción se termina al cabo de algunas horas. Si en concepto de material de partida se emplea un compuesto de la fórmula II que posee en posición 16 un grupo metilo y un anillo

25. 16alfa,17alfa-óxido, no sólo se produce, sorprendentemente,



282577

una deshidrogenación en la posición 6, sino que al mismo tiempo se disocia el anillo óxido con formación del grupo 17alfa-hidroxi- y del grupo 16-metileno.

De conveniencia se utilizan para esta reacción

5. compuestos de la fórmula II en que Y significa un grupo hidroxilo esterificado. Después de la 6-deshidrogenación, los ésteres así obtenidos pueden, como es lógico, saponificarse según los métodos normales corrientes, para formar los 21-alcoholes; por ejemplo, por tratamiento con una
10. solución acuosa de hidrocarbonato sódico, carbonato sódico o hidróxido sódico.

Los compuestos de las fórmulas I a II en que Y significa un grupo OH esterificado constituyen ésteres compatibles fisiológicamente, que se derivan, por ejemplo,

15. de los ácidos siguientes: ácidos carboxílicos como el ácido acético; el ácido propiónico, el ácido butírico, el ácido trimetilacético, el ácido ciclopentilpropiónico, el ácido fenilpropiónico, el ácido fenilacético, el ácido caprónico, el ácido caprílico, el ácido palmítico, el ácido undecilé-

20. nico, el ácido benzoico, el ácido hexahidrobenczoico, el ácido cloroacético, el ácido fosfórico, el ácido sulfúrico, el ácido succínico, el ácido oxálico o el ácido dietilaminoacético.

25. La introducción de un grupo hidroxilo en la posición 11 de los compuestos de la fórmula II en que R sig-



282577

- nifica hidrogéno se efectúa por vía microbiológica. Para esta reacción pueden emplearse todos los microorganismos que de ordinario se utilizan para ello, por ejemplo hongos de los géneros *Curvularia*, *Mucor*, *Stachylidium* y *Streptomyces* (hidroxilación en 11beta), así como *Absidia*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus* (hidroxilación en 11alfa). La hidroxilación se realiza por métodos normales conocidos. El material de partida se agrega
5. a un cultivo del microorganismo correspondiente, que se desarrolla en un medio nutritivo apropiado, a temperaturas óptimas y con buena aireación. Por lo general, la reacción se termina al cabo de 10 a 48 horas. Los esteroides hidroxilados se aíslan de la mezcla reaccional, de preferencia por extracción con un disolvente orgánico apropiado,
10. por ejemplo cloroformo o cloruro de metileno. El compuesto así obtenido, sobre todo los 11alfa-hidroxi-esteroides, pueden también convertirse en los correspondientes 11-ceto-esteroides por métodos conocidos, por ejemplo mediante tratamiento con una mezcla de anhídrido crómico y piridina.
15. Para la 1,2-deshidrogenación de un esteroide de la fórmula I pueden utilizarse todos los microorganismos que son usuales para ello, por ejemplo los de los géneros *Alternaria*, *Didymella*, *Calonectria*, *Colletotrichum*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Ophiobolus*, *Septomyxa*, *Vermoullaria*;
20. *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus* (en par-
- 25.



282577

5. ticular, el *Bacillus sphaericus*), *Corynebacterium* (en particular, el *Corinebacterium simplex*), *Erysipelothrix*, *Listeria*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. La fermentación requiere alrededor de 4 a 40 horas, según el microorganismo que se emplea. Especialmente aptos son los cultivos de *Bacillus sphaericus* var. *fusiformis* y *Corynebacterium simplex*. Para la deshidrogenación, el material de partida se añade a un cultivo sumergido del microorganismo correspondiente, que se desarrolla
10. en una solución nutritiva apropiada, a temperatura óptima y con aireación intensa, según los métodos corrientes de la técnica de la fermentación. En lugar de cultivos en desarrollo, cabe utilizar también, con la misma técnica en todo lo demás, suspensiones de los microorganismos en
15. solución tampón. La reacción se sigue cromatográficamente y la solución fermentativa se extrae, por ejemplo con cloroformo, después de la transformación completa del material de partida.

20. Los 6-metil-esteroides de la fórmula II para emplear como material de partida pueden prepararse a partir de los compuestos descritos en la patente belga 594.614, por ejemplo mediante una sencilla 21-acilación (verbigracia, por reacción con yodo y acetato potásico). Siempre que el material de partida contiene una función oxígeno en posición 11 y eventualmente también un substituyente 9alfa-
- 25.



282577

5. flúor, pueden introducirse estos substituyentes en los compuestos conocidos por métodos corrientes, por ejemplo mediante 11-hidroxilación microbiológica, eventualmente desdoblamiento consecutivo de agua, epoxidación del compuesto 9,11-dehidro originado y disociación del 9beta,11beta-epóxido con ácido fluorhídrico.

10. Los materiales de partida de la fórmula II que poseen un grupo 16-metilo y un anillo 16alfa,17alfa-óxido pueden prepararse por oxidación a partir de la 6,16-dimetil-16alfa,17alfa-óxido-5-pregnen-3beta-ol-20-ona, también descrita en la patente belga 594.614. La oxidación, con formación del sistema 3-ceto-4-eno, se efectúa de manera conocida, por ejemplo mediante incubación con *Flavobacterium dehydrogenans* o mediante una oxidación según Oppenauer.

15. Los nuevos compuestos pueden utilizarse en la medicina humana o veterinaria en mezcla con los excipientes ordinarios para medicamentos. Como substancias excipientes entran en consideración las materias orgánicas o inorgánicas que son aptas para la aplicación parentérica, entérica o tópica, como por ejemplo agua, aceites vegetales, polietilén glicoles, gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, vaselina, colestestina, etc. Para la aplicación parentética sirven en particular las soluciones, de preferencia las soluciones oleosas o acuosas, como suspensiones, emulsiones o implantados. Para la aplicación entérica pue-

20.

25.

7 NOV. 1962



282577

den emplearse además comprimidos o grageas, y para la aplicación tópica, pomadas o cremas, que eventualmente se esterilizan o se mezclan con materias auxiliares, como agentes de conservación, agentes de estabilización, humectantes, sales para influir la presión osmótica o sustancias amortiguadoras.

Siempre que los productos finales del invento aqui expuesto se apliquen en formas de confección sólidas, las dosis individuales son de 0,3 a 5 mg. Para la aplicación de soluciones inyectables, se emplean dosis individuales de 5 a 25 mg.

E J E M P L O 1

a) En 300 cc de éster etílico del ácido acético y 30 cc de ácido acético, se hierven en reflujo durante 10 horas, junto con 7 g de cloranilo, 10 g de 21-acetato de 6alfa-metil-16-metilen-4-pregnen-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona. Luego se enfría la mezcla reaccional, se la vierte en agua, se la extrae con cloroformo, se lava el extracto primeramente con agua, luego con solución de hidrocarbonato sódico (hasta que se ha eliminado todo el ácido acético), luego otra vez con agua y seguidamente se sacude con 225 cc de NaOH al 1%, se vuelve a lavar con agua y se seca con sulfato sódico. Después de la concentración,



282577

cristaliza del éster acético el 21-acetato de 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona.  $n_{\text{max}}$  288 milimicras,  $\epsilon = 24.100$ . Punto de fusión, 194-195°C;  $(\alpha)_D^{24} + 96^\circ$  (dioxano).

5. Por saponificación ordinaria puede obtenerse de este producto la 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona.  $n_{\text{max}}$  289 milimicras,  $\epsilon = 24.700$ . Punto de fusión, 225-227°C;  $(\alpha)_D^{24} + 72,3^\circ$  (dioxano).

10. b<sub>1</sub>) En un fermentador pequeño de 20 litros de capacidad se inoculan 15 litros de una solución nutritiva a base de 0,1% de extracto de levadura y pH 6,8 con 1,5 litros de cultivo agitado de *Corynebacterium simplex*. El cultivo se desarrolla con agitación constante y aireación intensa

15. a 28°C y recibe, al cabo de unas 4 a 8 horas, una adición de 75 g de 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona, disueltos en 300 cc de metanol. La deshidrogenación se sigue mediante cromatografía de papel y queda terminada, por lo general, al cabo de 14 horas. La

20. solución de cultivo se extrae tres veces con el mismo volumen de cloroformo y las soluciones clorofórmicas reunidas se evaporan. Cristalizando en acetona, se obtiene la 6-metil-16-metilen-1,4,6-pregnatrien-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona.  $n_{\text{max}}$  227, 254, 304 milimicras,  $\epsilon = 14.580,$

25. 9.840, 11.940; punto de fusión, 235-236°C;  $(\alpha)_D^{24} - 6,6^\circ$

17 NOV.



282577

(dioxano)

- b<sub>2</sub>) Se disuelven en 70 cc de dioxano 3,5 g de 21-acetato de 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-11beta, 17alfa, 21-triol-3, 20-diona y se mezclan con 3,5 g de 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona. Se hierve la mezcla reaccional en reflujo durante 6 horas, luego se diluye con cloroformo y consecutivamente se lava con 30 cc de solución 1-n de hidróxido sódico y varias veces con agua. Se seca la solución sobre sulfato sódico y se la evapora. El residuo, constituido por 21-acetato de 6-metil-16-metilen-1,4,6-pregnatrien-11beta, 17alfa, 21-triol-3, 20-diona, se recristaliza en acetona/éter.  $n_{max}^{20} = 227, 254, 304$  milimicras,  $n_D^{20} = 14.600, 9.800, 12.000$ ; punto de fusión, 226-229°C;  $(\alpha)_D^{20} + 21,3^\circ$  (dioxano).

### E J E M P L O 2

- a) Se hierven en reflujo, durante 7 horas, 5 g de 21-acetato de 6alfa-metil-16-metilen-4-pregnen-17alfa, 21-diol-3, 11, 20-triona en 100 cc de metiletilcetona, junto con 7 g de cloranilo. Se enfría la mezcla reaccional, se la vierte en agua y se la extrae con cloroformo. El extracto se sacude primeramente con agua, luego con 100 cc de NaOH al 1%, se lava otra vez con agua y se seca con sulfato



282577

sódico. Después de la concentración, cristaliza del metanol el 21-acetato de 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-17alfa, 21-diol-3,11,20-triona.  $n_{\text{max}} 287,5$  milimicras,  $E = 23.800$ . Punto de fusión,  $199-201^{\circ}\text{C}$ ;  $(\alpha)_{\text{D}}^{24} + 197,3^{\circ}$  (dioxano).

5.

Por saponificación ordinaria puede obtenerse de este producto la 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-17alfa, 21-diol-3,11,20-triona.  $n_{\text{max}} 287,5$  milimicras,  $E = 24.200$ .  $(\alpha)_{\text{D}} + 155^{\circ}$  (dioxano).

10.

b) En un fermentador pequeño se inoculan con 0,5 litros de cultivo sacudido de *Bacillus sphaericus* 15 litros de una solución nutritiva a base de 1% de extracto de levadura, con pH 6,8. El cultivo se desarrolla con agitación constante y aireación intensa a  $28^{\circ}\text{C}$  y recibe, al cabo de unas 10 horas, una adición de 7,5 g de 21-acetato de 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-17alfa, 21-diol-3,11,20-triona disueltos en 300 cc de metanol. La deshidrogenación se sigue por cromatografía de papel y queda terminada al cabo de 28 a 36 horas. La solución de cultivo se extrae por tres veces con el mismo volumen de cloroformo y se concentran las soluciones clorofórmicas reunidas. De la acetona cristaliza la 6-metil-16-metilen-1,4,6-pregnatrien-17alfa, 21-diol-3,11,20-triona.  $n_{\text{max}} 227, 254, 304$  milimicras.  $E = 13.400, 10.200, 10.800$ .

15.

20

25.



EJEMPLO 3

282577

5. a) 3 g de 21-acetato de 9alfa-fluoro-6alfa-metil-16-metilen-4-pregnen-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona se disuelven en 90 cc de alcohol amílico terciario y se hierven en reflujo durante 7 horas con 2 g de cloranilo. Después del enfriamiento, la solución, de color pardoclaro, se vierte en agua, se sacude con cloroformo y el extracto cloroformico se lava primeramente con agua, luego con 210 cc de lejía sódica 10-n y por último otra vez con agua, se seca con sulfato sódico y se destila. De acetona/éter cristaliza el 21-acetato de 9alfa-fluoro-6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-11beta,17 alfa,21-triol-3,20-diona.  $n_{D}^{20}$  max 287 milimicras,  $E = 22.800$
10. 15. Por saponificación ordinaria puede prepararse de este producto la 9alfa-fluoro-6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona.  $n_{D}^{20}$  max 286,5 milimicras,  $E = 22.900$ .
20. b) En un fermentador pequeño se inoculan con 0,5 litros de cultivo sacudido de Bacillus sphaericus 15 litros de una solución nutritiva a base de 1% de extracto de levadura, con pH 6,8. El cultivo se desarrolla con agitación constante y aireación intensa a 28°C y recibe, al
25. calco de unas 10 horas, una adición de 7,5 g de 9alfa-fluoro-



20577

- 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-11beta,17alfa,21-triol-3,20 diona, disueltos en 300 cc de metanol. La deshidrogenación se sigue por cromatografía de papel y queda terminada al cabo de 28 a 36 horas. La solución de cultivo se extrae por tres veces con el mismo volumen de cloroformo y se concentran las soluciones clorofórmicas reunidas. De la acetona cristaliza la 9alfa-fluoro-6-metil-16-metilen-1,4,6-pregnatrien-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona.
- 5.

10. EJEMPLO 4

- Después de añadirle 1,58 g de cloranilo, se hierve en reflujo durante 12 horas la solución de 2 g de 21-acetato de 6,16beta-dimetil-16alfa,17alfa-óxido-4-pregnen-11beta, 21-diol-3,20-diona en 60 cc de tetrahidrofurano. Seguidamente se diluye con agua la mezcla reaccional y se la extrae con cloroformo. Los extractos se lavan con lejía sódica diluída y luego con agua y se secan. De los extractos concentrados cristaliza con metanol el 21-acetato de 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona.  $\lambda_{\max}$  288 milimicras,  $\epsilon = 24.100$ . Punto de fusión,  $194-195^{\circ}\text{C}$  ( $\alpha$ )<sub>D</sub><sup>24</sup> +  $96^{\circ}$  (dioxano).
- 15.
- 20.



17 NO

EJEMPLO 5

282577

5. a) De manera análoga a la del ejemplo 1 a), se deshidrogenan 8 g de 21-acetato de 6-metil-16-metilen-4-pregnen-17alfa,21-diol-3,20-diona para convertirlo en el correspondiente 4,6-pregnadieno;  $\lambda_{\max}$  287 milimicras,  $\epsilon = 23.100$ .
10. b<sub>1</sub>) En un fermentador pequeño se inoculan con 800 cc de un cultivo sacudido de *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn 15 litros de una solución nutritiva a base de 5% de extracto de malta, 1% de sacarosa, 0,2% de nitrato sódico, 0,1% de fosfato bipotásico, 0,05% de sulfato magnésico, 0,05% de cloruro potásico y 0,005% de sulfato de hierro bivalente (pH ajustado a 7,0) y se incuba a 28°C con agitación y con aireación intensa. Después de 24 horas de desarrollo, se añaden 5 g de 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-17alfa,21-diol-3,20-diona o de su 21-acetato, disueltos en 40 cc de dimetilformamida. La reacción se
20. sigue mediante cromatografía de papel. Cuando ya no puede apreciarse en el cromatograma de papel ningún material de partida, se extrae la solución de cultivo, por tres veces, con el mismo volumen de cloroformo. Se concentran las soluciones cloroformicas reunidas y se filtra el residuo sobre gel de sílice. El eluato obtenido con cloroformo/éster
25. acético (1:3) contiene la 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-



282577

$\lambda_{\text{max}}$  289

11beta, 17alfa, 21-triol-3, 20-diona deseada.  $\lambda_{\text{max}}$  289 24  
milimicras,  $\xi = 24.700$ . Punto de fusión, 225-227°C; ( $\alpha$ )<sub>D</sub>  
+ 72,3° (dioxano).

5. b<sub>2</sub>) Se inocula con una suspensión de esporas de *Metarrhizium anisopliae* un fermentador pequeño de 10 litros, que contiene una solución nutritiva a base de 3% de sacarosa, 1% de extracto de malta, 0,1% de extracto de levadura y 0,2% de  $\text{NaNO}_3$ . El hongo se desarrolla como cultivo sacudido a 28°C y recibe al cabo de 30 horas una adición de 5 g de 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-17alfa, 21-diol-3, 20-diona en 200 cc de metanol. Al cabo de 20 horas de fermentación no puede apreciarse ya, por cromatografía en capa tenue, nada del material de partida; el cultivo se extrae entonces por tres veces con 8 litros de cloroformo cada vez. Se concentran los extractos reunidos y se recristaliza el residuo en éster acético. Se obtiene así la 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-11alfa, 17alfa, 21-triol-3, 20-diona pura.  $\lambda_{\text{max}}$  289 milimicras,  $\xi = 25.000$ .

20. E J E M P L O 6

- a) De manera análoga a la del ejemplo 2 a) se prepara el 21-acetato de 6-metil-16-metilen-4,6-pregnadien-17alfa, 21-diol-3, 11, 20-triona. Punto de fusión, 199-201°C.



282577

5. b) De manera análoga a la del ejemplo 1 b<sub>2</sub>) se deshidrogenan 4 g del compuesto obtenido según el ejemplo 6 a), convirtiéndolo en 21-acetato de 6-metil-16-metilen-1,4,6-pregnatrien-17alfa,21-diol-3,11,20-triona. ( $\alpha$ )<sub>D</sub> + 149° (dioxano);  $\lambda_{\max}$  226, 5, 250, 300 milimicras,  $\xi$  = 13.500, 10.050, 10.700.

E J E M P L O 7

10. De manera analoga a la del ejemplo 1a) se hacen reaccionar 4 g de 21-tercibutil acetato de 6alfa-metil-16-metilen-4-pregnen-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona convirtiéndolo en el correspondiente 4,6-pregnadieno.  $\lambda_{\max}$  288 milimicras,  $\xi$  = 24.900.

= . =

282577



N O T A

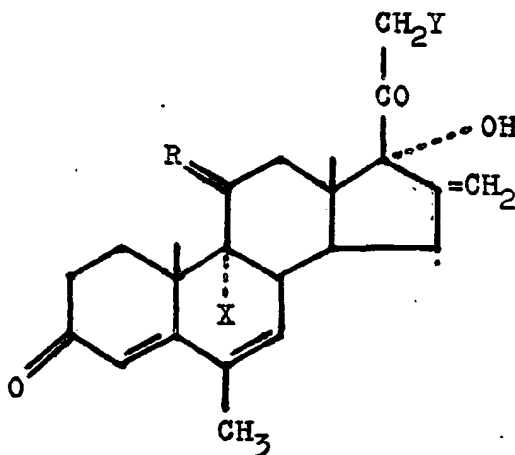
282577

5. Descrito el presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridades de las demandas de patentes alemanas N<sup>o</sup> M 50922 del 18 de noviembre de 1.961, N<sup>o</sup> M 50923 del 18 de noviembre de 1.961 y N<sup>o</sup> M 50991 del 25 de noviembre de 1.961, existiendo en todas ellas unidad de invención.

1. Procedimiento para preparar 6-metil-16-metilen-  
-esteroides insaturados de la fórmula general

10.

15.



en que

20.

X = H o bien F

Y = grupo hidroxí libre o esterificado

R = H, OH o bien = O

así como sus derivados 1-dehidro, caracterizado por el hecho



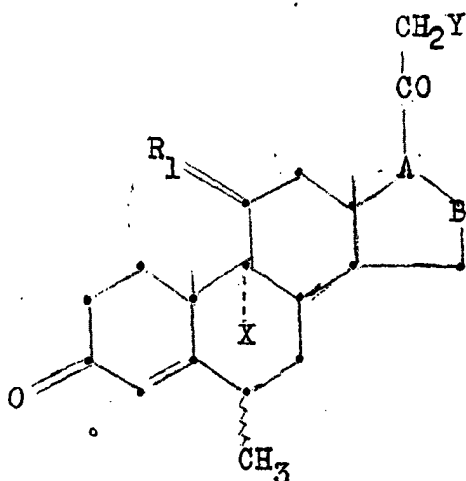
17 NOV. 1957

282577

de que se trata con cloranilo un 6-metil-esteroide de la fórmula

5.

10.



en que

15.

X e Y tienen el significado expuesto antes,

R<sub>1</sub> significa H, H o bien R y

A - B significa  $\begin{matrix} \text{OH} & \text{CH}_2 \\ | & || \\ \text{C} & - & \text{C} \end{matrix}$  o bien  $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{C} - \text{O} - \text{C} \end{matrix}$

20.

y, siempre que R<sub>1</sub> signifique hidrógeno. se introduce en posición 11 un grupo hidroxilo, por tratamiento con un microorganismo hidroxilante en 11, así como, para preparar los correspondientes derivados de 1-dehidro, se introduce adicionalmente en posición 1,2 un enlace doble, por tratamiento con 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona o con micro

25.

organismos deshidrogenantes en posición 1,2.



282577

2. Procedimiento para preparar 6-metil-16-metilen-  
-esteroides insaturados.

Según se describe y reivindica en la presente  
memoria descriptiva que consta de 19 hojas foliadas y  
escritas a máquina por una sola cara.

5.

Madrid a 17 de Noviembre 1962

E. MERCK A.G.

p.a.

JAIMÉ ISEÁN MIRALLES

P.P.