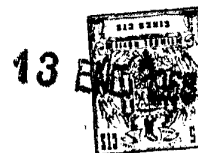


PATENTE DE INVENCION

=====  
Ref: Your ref: Ip. 324.

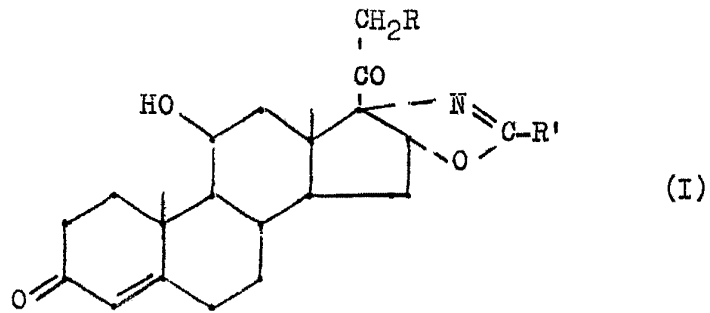


*Memoria Descriptiva* 349266  
*sobre:*

"Procedimiento para la preparacion de  
esteroideo-oxazolinas".

=====  
*Solicitante:* LEPETIT S.p.A. Gruppo per la Ricerca Scientifica e  
la Produzione Chimica Farmaceutica, entidad italiana,  
residente en Via Roberto Lepetit 8, MILAN, Italia.

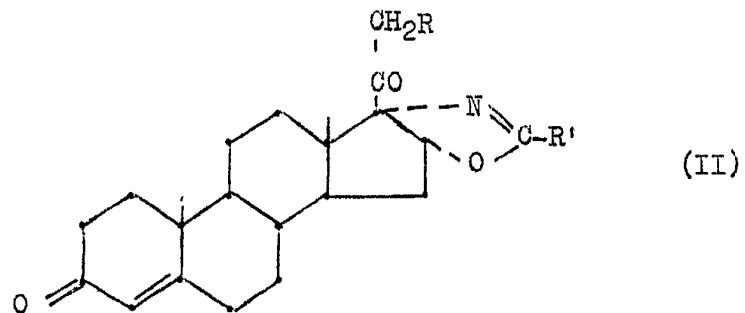
=====  
Este invento se refiere a nuevos esteroides.  
De una forma más particular, los esteroides a los  
que se refiere este invento son esteroideo-oxazolinas  
de la fórmula



en la que R representa hidrógeno, hidroxilo o un radical acilo, R' representa hidrógeno, alquilo inferior o fenilo.

5. Los nuevos compuestos demuestran poseer un elevado grado de actividad farmacológica como agentes antiinflamatorios y tipo hormonas.

El procedimiento para la preparación de las nuevas esteroïdoxazolininas consiste en someter una esteroïdo-oxazolinina de la fórmula:



10. en la que R y R' tienen los significados arriba indicados, a la acción de un hongo elegido de las clases Fungi imperfecti y Phycomycetes.



- Para llevar a cabo el procedimiento según el presente invento, se cultiva aeróbicamente un hongo del género Curvularia, Cunnighamella y Absidia, como puede ser la Curvularia lunata, Cunnighamella blackesleeana, o Absidia orchidis y otras especies, en un medio nutritivo apropiado y se deja que actúe sobre una esteroideo-oxazolina de la fórmula dada anteriormente y se engloban las sustancias de partida. Durante el desarrollo del microorganismo se introduce un grupo hidroxilo en undécima posición de la esteroideo-oxazolina debido a la actividad oxidante de las enzimas producidas por el microorganismo.
- 5.
- 10.

- Un medio nutritivo apropiado debe contener una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y elementos minerales. Las fuentes útiles de carbono comprenden la dextrosa de almidón, sacarosa, galactosa, xilosa, glicerol y otros carbohidratos y polialcoholes, así como otras fuentes naturales de carbohidratos, como son el licor macerado de maíz, nutrimento de semilla de algodón y otros. Las fuentes útiles de nitrógeno comprenden algunos de los materiales citados, como es el licor macerado de maíz nutrimento de semilla de algodón, otras sustancias tales como el extracto de carne de vaca, levadura, peptonas, aminoácidos, proteínas digeridas en general y otros materiales proteínicos. También son útiles las fuentes inorgánicas de nitrógeno como son la urea, nitratos, sales amónicas y otras por el estilo.
- 15.
- 20.
- 25.

- Los minerales necesarios se encuentran presentes en los mismos materiales relacionados anteriormente, cuando se emplean en estado crudo, o se hallan presentes en el agua empleada para la preparación del medio. Cuando se
- 30.



5. desee suplementar el medio, se añade una cierta cantidad de sustancias inorgánicas apropiada para dotar al medio de cationes y aniones, tales como fosfato, sulfato, cloruro, metales alcalinos y alcalinotérreos, hierro, manganeso, cobalto y otros.

El esteroide que se ha de someter a 11-hidroxilación puede añadirse antes o después de la inoculación del medio con el cultivo de microorganismos.

10. Entonces se continúa con la fermentación por espacio de 12 a 120 horas a una temperatura comprendida entre 26 y 32°C. Al final de la fermentación, si se desea, se filtra el medio del micelio y el esteroide 11-hidroxilado se extrae con un disolvente orgánico insoluble en agua en el que se disuelve el esteroide, y se evapora el extracto orgánico in vacuo hasta sequedad o a un volumen pequeño. En el último caso, la adición a la solución concentrada del esteroide de un disolvente miscible con el disolvente empleado para la extracción, pero en el que el esteroide es insoluble, causa la precipitación del producto. Este puede entonces purificarse cromatográficamente o mediante cualquier procedimiento idóneo, como es la recristalización.

20. Alternativamente, después que se ha obtenido un buen desarrollo del micelio en un medio de la composición anteriormente citada, se recoge una cantidad del micelio y se traslada a una solución tampón o amortiguadora de fosfato a un pH comprendido entre 7,0 y 7,5 y se pone en contacto con el esteroide que se ha de transformar. Después se aísla el esteroide del líquido mediante extracción según se ha indicado anteriormente.

25.

30.



5. Los compuestos del invento exhiben una elevada actividad antiinflamatoria en comparación con otros conocidos esteroides, dotados de las mismas propiedades farmacológicas, que la hidrocortisona por ejemplo. En la tabla 1 se exponen los resultados de esta actividad, evaluados a través del nódulo de granuloma en las ratas. Los productos, disueltos o en suspensión en goma arábiga al 10 %, se administraron por vía oral a ratas Wistar machos, que pesaban de 120-150 gramos.

TABLA 1

<u>Compuesto del ejemplo</u>	<u>Dosis mg/kg p. os</u>	<u>No. de animales</u>	<u>% de disminución de granuloma</u>
1	5	7	-39,6
2	5	7	-34
3	5	7	-38,4
Hidrocortisona	5	7	-25

10. También se descubrió que el compuesto del ejemplo 3 poseía actividad gluconeogénica. Los experimentos se realizaron, empleando ratas machos Wistar surrectomizadas, según el método descrito por Olson y otro, en Endocrinol 35, 40, 1944. Comparando los resultados del compuesto del invento con los obtenidos con hidrocortisona, en las mismas condiciones experimentales, resulta evidente la mayor actividad de aquel. La tabla 2 que sigue resume los resultados obtenidos en ambos casos.

15.



TABLA 2

<u>Compuesto del ejemplo</u>	<u>Dosis <math>\mu</math>g./rata</u>	<u>No. de ratas</u>	<u>Glicogeno hepático <math>\pm</math> S.E. <math>\mu</math>g. glucosa/100 gms de rata</u>
3	500	10	12,84 $\pm$ 1,14
	2000	10	33,79 $\pm$ 2,34
Hydrocortisona	500	10	7,04 $\pm$ 0,97
	2000	10	20,05 $\pm$ 1,43
Contrastación	-	10	1,18 $\pm$ 0,06

Lo que sigue son ejemplos de los procedimientos reivindicados.

Ejemplo 1

5. 21-acetato de Pregn-4-eno-11 $\beta$ ,21-diol-3,20-diona- $\Delta$ 17 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -  
- $\Delta$ 7-2'-metiloxazolina,

Se inocularon varios matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían cada uno 100 ml. del medio que sigue:

Dextrosa	10,0 gms
Nutrimiento de soja	5,0 gms
Peptona	5,0 gms
Basamin Busch	3,0 gms
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0 gms
NaCl	5,0 gms
Silicona	0,1 ml.

10. Agua destilada, cantidad suficiente hasta 1 litro (se ajustó el pH a 6,8 con NaOH antes de la esterilización) con un cultivo de 4 días de duración de Curvularia lunata NRRL 2380. Al cabo de 24 horas de incubación en batidora rotativa (250 r.p.m.) a 28°C se obtuvo un buen desarrollo del micelio.



- Se inocularon 4 litros de medio de la composición anterior en un recipiente de prefermentación con un 5 % en volumen del cultivo arriba obtenido e incubado en las condiciones que siguen: aire 1,5 l/min.; agitación 800 r.p.m.; temperatura 28°C; tiempo 24 horas.
5. Se emplearon 200 ml del caldo de la anterior fermentación para inocular un nuevo recipiente de fermentación que contenía 4 litros del mismo medio anterior. La fermentación se llevó a cabo en idénticas condiciones que en la etapa precedente. Al cabo de 24 horas se recogió el micelio mediante filtración.
10. Se preparó una suspensión del micelio húmedo aislado en 4 litros de solución tampón de fosfato M/15 de pH 7,3 en un recipiente de fermentación y se agitó la suspensión a 800 r.p.m. durante 10 minutos. Se introdujo aire a una velocidad de 1,5 litros por litro de líquido por minuto y se ajustó la temperatura a 28°C.
15. Se disolvió 21-acetato de pregn-4-eno-21-ol-3,20-diona- $\alpha$ ,16 $\alpha$ -di-2'-metiloxazolina en una cantidad correspondiente al 0,5 % (peso/volumen) del medio, en 40 ml. de acetona, se añadió al medio y se mantuvo la masa en las condiciones arriba descritas de agitación, introducción de aire y temperatura por espacio de 24 horas. Se detuvo la conversión en este punto añadiendo cloroformo.
20. Se filtró la mezcla, se lavó repetidamente el micelio con cloroformo y se extrajo con cloroformo. Se evaporaron in vacuo los lavados y extractos combinados de cloroformo hasta un pequeño volumen y se añadió éter de petróleo causando la formación de un precipitado. Se purificó el producto crudo por separación en contracorrien-
- 25.
- 30.



te con una mezcla de metanol:agua:cloroformo:ligroina 2:1:2:1, rendimiento 0,5 gms de pregn-4-eno-11 $\beta$ ,21-diol-3,20-diona- $\Delta^{17\alpha}$ , 16 $\alpha$ - $\Delta^7$ -2'-metiloxazolina, que con anhídrido acético en piridina dió el 21-acetato, p.f. 224-225°C,  $[\alpha]_D^{20} + 108^\circ$  (c = 0,5, CHCl<sub>3</sub>).

5. Se confirmó la identidad del compuesto obtenido sometándolo a la actividad de la enzima producida durante la fermentación de Corynebacterium simplex SCH 214.1 en las condiciones normalmente empleadas para introducir un doble enlace en posición 1(2) del núcleo del esteroide. Mediante dicho procedimiento se obtuvo el conocido 21-acetato de pregn-1,4-dieno-11 $\beta$ ,21-diol-3,20-diona- $\Delta^{17\alpha}$ , 16 $\alpha$ - $\Delta^7$ -2'-metiloxazolina, p.f. 256-257°C,  $\lambda_{max}$  241-243 (CH<sub>3</sub>OH).

10. El compuesto de partida necesario para llevar a cabo el procedimiento descrito en este ejemplo se preparó por medio de las etapas que siguen:

15. A una mezcla de 5 gms de pregn-5-eno-3 $\beta$ -ol-20-ona- $\Delta^{17\alpha}$ , 16 $\alpha$ - $\Delta^7$ -2'-metiloxazolina, 40 ml de tetrahidrofurano, 40 ml de metanol, 7,5 gms de óxido de calcio y 0,11 gms de azo-di-isobutironitrilo se añadió gradualmente una solución de 5 gms de iodo en 25 ml. de tetrahidrofurano y 15 ml de metanol con agitación vigorosa. Después se filtró la mezcla, se evaporó el filtrado hasta la sequedad in vacuo y se disolvió el residuo en 80 ml de diclorometano. Se lavó la solución orgánica con tiosulfato sódico, después con agua, y luego se evaporó hasta sequedad in vacuo.

20. Este residuo (el 21-iododerivado del esteroide) se disolvió en 40 ml de acetona y se añadió a una solución,

25.

30.



calentada a 50-60°C, de 28 ml de ácido acético, 14 ml de acetona y 50 ml de trietilamina, y después se reflujo la mezcla durante 90 minutos.

- Se destiló la acetona, luego se añadieron 350 ml de agua templada gradualmente. Después de enfriarse se recogió y lavó el precipitado formado. Rendimiento 4,8 gms de 21-acetato de pregn-5-eno-3 $\beta$ , 21-diol-20-ona- $\Delta^{17\alpha}$ , 16 $\alpha$ - $\underline{\Delta}^7$ -2'-metiloxazolina, p. f. 232-234°C,  $\Delta_{D}^{20} + 20,4^{\circ}$  (c = 0,5, CHCl<sub>3</sub>).
10. Se llevo a cabo una oxidación Oppenauer en el esteroide obtenido según procedimientos bien conocidos, empleando isopropóxido de aluminio y ciclohexanona en tolueno. De 35 gms de pregn-5-eno de partida, se obtuvieron 30 gms (rendimiento 86 %) de 21-acetato de pregn-4-eno-21-ol-3,20-diona- $\Delta^{17\alpha}$ , 16 $\alpha$ - $\underline{\Delta}^7$ -2'-metiloxazolina, p. f. 204-206°C,  $\Delta_{D}^{20} + 86^{\circ}$  (c = 0,5, CHCl<sub>3</sub>),  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} 401,8$ ,  $\lambda_{\text{max}} 240 \mu$  (CH<sub>3</sub>OH).

#### Ejempló 2

Pregn-4-eno-11 $\beta$ -ol-3,20-diona- $\Delta^{17\alpha}$ , 16 $\alpha$ - $\underline{\Delta}^7$ -oxazolina.

20. Preparada exáctamente según se describe en el Ejemplo 1, a partir de pregn-4-eno-3,20-diona- $\Delta^{17\alpha}$ , 16 $\alpha$ - $\underline{\Delta}^7$ -oxazolina y empleando como organismo de fermentación Cunninghamella blackesleeana NRRL 8688A.

25. La esteroide-oxazolina obtenida tenía un p. f. de 198-200°C.

#### Ejemplo 3

Pregn-4-eno-11 $\beta$ , 21-diol-3,20-diona- $\Delta^{17\alpha}$ , 16 $\alpha$ - $\underline{\Delta}^7$ -2-metiloxazolina.

30. Preparada según se describe en el Ejemplo 1, a partir de pregn-4-eno-21-ol-3,20-diona- $\Delta^{17\alpha}$ , 16 $\alpha$ - $\underline{\Delta}^7$ -2'-me



tiloxazolina y empleando como organismo de fermentación Absidia orchidis ATCC 6647. La esteroideo-oxazolina tenia un p.f. de 235 °C.

- NOTA -

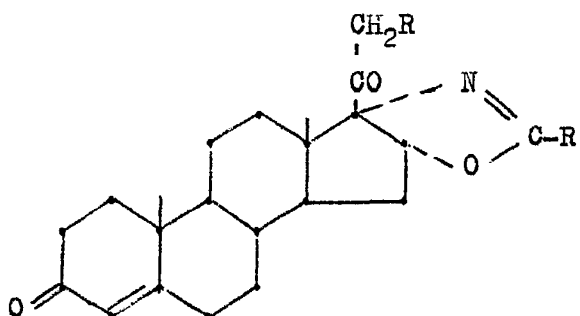
5. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento, corresponde a una solicitud de Patente presentada en Inglaterra, con fecha 13 de enero de 1967, bajo el número 1900/67; acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento, y por lo que se solicita Patente de Invención, por 20 años en España, sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ESTEROIDO-OXAZOLINAS"; caracterizándose por lo siguiente:

- 1a.- "Procedimiento para la preparación de esteroideo-oxazolinás", de fórmula general,





5. en la que R es un miembro de la clase consistente en hidrogeno, hidroxilo y aciloxi, R' es un miembro de la clase consistente en hidrogeno, alquilo inferior y fenilo, caracterizado porque una esteroideo-oxazolina, de fórmula general,



- en la que R y R' tienen los significados arriba indicados, se somete a la actividad enzimática producida por la fermentación de un hongo elegido del grupo consistente en Fungi imperfecti y Phycomycetes.
10. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el hongo se elige del género *Curvularia*, *Cunninghamella* y *Absidia*.
- 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el hongo se elige del grupo consistente en *Curvularia lunata*, *Cunninghamella blackesleeana* y *Absidia orchidis*.
- 15.



4a.- "Procedimiento para la preparaci3n de esteroideo-oxazolinass", tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

5. Esta memoria, consta de 12 hojas escritas a miquina por una sola cara.

Madrid

13 ENE 1960

LEPETIT S.p.A.

Gruppo per la Ricerca Scientifica  
e la Produzione Chimica Farmaceutica.

J. GONZALEZ GONZALEZ Y MODELL  
Ingeniero de Quimica