



### PATENTE DE INVENCION

que por veinte años, para España y sus Posesiones, se solicita a favor de la firma K N O L L A.G.; CHEMISCHE FABRIKEN, entidad alemana, residente en LUDWIGSHAFEN (ALEMANIA), por: "PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE PRODUCTOS DE DESINTEGRACION DE  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> - BU-FATRIENOLIDOS".-

### Memoria Descriptiva

Reacciones de disociación en glicósidos que contienen como aglucción  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> - bufatrienolidos, conducen en dependencia de las condiciones de reacción elegidas a diferentes productos de desintegración, porque el aglucción liberado del glicosido sufre por las reacciones secundarias fácilmente unas variaciones. En muchos casos se presenta por lo tanto, después de la disociación de la parte de azúcar una mezcla de distintos productos de desintegración. Además de ello la mezcla de la reacción puede contener material base invariable, por lo que es hecho difícil además la preparación.

10

De los dos isómeros de la escilaremina el Sr. A. Stoll y sus colaboradores han obtenido de proscillaridina mediante separa-



15 ción enzimática la forma  $-\beta$  [Helv. Chim. Acta 34, 2301 (1951)]. -  
 Propias investigaciones demostraban que la separación ácida de —  
 proscillaridina conduce al  $3\alpha$ ,  $14\beta$  - dihidroxi -  $\Delta^{4,20,22}$  - bufatrienolido no descrito anteriormente.

20 El producto de transformación escillaridina se forma según  
 A. Stoll y sus colaboradores en hidrólisis ácida de proscillaridina -  
 a las condiciones indicadas en Helv. Chim. Acta 16, 703 (1933). Ade-  
 más las propias investigaciones daban por resultado el que, en ca-  
 so de una separación ácida de bufadienolidos que contienen escilla-  
 renina, puede originarse el  $5\beta$ ,  $14\beta$  - dihidroxi -  $\Delta^{3,20,22}$  - bufatrienolido no descrito todavía. Finalmente se encontró que  $\Delta^{4,20,22}$  - bufatrienolidos que en posición - 19 - poseen un grupo oxoico  
 25 o hidroxico, producen igualmente en reacciones de separación mez-  
 clas de productos de desintegración correspondientes.

La separación de tales mezclas posee interés práctico —  
 porque los productos puros así aislados son de interés para la te-  
 rapia y pueden servir de material base para medicinas cardioactivas.

30 Objeto de la invención son productos de desintegración -  
 de  $\Delta^{4,20,22}$  - bufatrienolidos y un procedimiento para su separa-  
 ción. El mismo se refiere especialmente a la obtención de fraccio-  
 nes puras de  $3\alpha$ ,  $14\beta$  - dihidroxi -  $\Delta^{4,20,22}$  - bufatrienolido,  $3\beta$ ,  
 $14\beta$  - dihidroxi -  $\Delta^{4,20,22}$  - bufatrienolido y  $5\beta$ ,  $14\beta$  - dihidroxi -  
 35  $\Delta^{3,20,22}$  - bufatrienolido de mezclas que pueden contener además -  
 escillaridina y material básico invariable, por ejemplo, proscillari-  
 dina. El procedimiento se refiere además a la obtención de fraccio-  
 nes puras de productos de desintegración de  $\Delta^{4,20,22}$  - bufatrieno-  
 lidos que en posición - 19 - poseen de las mezclas de los mismos -  
 un grupo oxico y un grupo hidroxico. El procedimiento se adapta —  
 40 además para la separación de mezclas sintéticas y mezclas parcia-  
 les de dichos componentes tal como pueden producirse en la sinte-  
 sis de glicósidos cardioactivos. Debido a su íntimo parecido es—

10 - 418  
2001 1968  
SECRET  
447 619

45 tructural no se podían aislar según experiencia apenas fracciones puras de tales mezclas naturales o sintéticas.-

El procedimiento según invención puede ser realizado en dos variantes. Según el método (a) son absorbidas las mezclas que se han de separar sobre gel de sílice, siendo eluidas con disolventes orgánicos, preparadas las sendas fracciones de modo corriente y cromatografiada una fracción de mezcla que se produce eventualmente de  $\beta$ -escilarenina y  $5/\beta$ ,  $14/\beta$  - dihidroxi -  $\triangle^3$ ,  $20,22$  - bufatrienolido o sus derivados sustituidos en la posición 19 de nuevo después de una acetilación parcial.-

55 Para la realización de la separación cromatográfica la mezcla es disuelta en una cantidad reducida de disolvente orgánico, por ejemplo, en un tetracloruro de carbono adsorbida sobre gel de sílice y eluida con disolventes orgánicos.-

60 Es conveniente emplear como medio de elución primero disolventes no polares y posteriormente disolventes polares o las mezclas de los mismos. Una forma de realización preferida del procedimiento consiste en el empleo de un tetracloruro de carbono al que se añaden cantidades en descenso de un hidrocarburo aromático y cantidades en ascenso de una cetona o un alcohol.

65 Como tetracloruro de carbono puede aplicarse cloroformo o tricloruro de etileno, como hidrocarburo aromático benzol, toluol o xilol, como cetonas acetona o metil-etil-cetona y como alcoholes metanol, etanol o propanol. La elección del disolvente es ampliamente variable para ambos métodos.

70 Las fracciones de disolvente obtenidas son preparadas de tal manera que se separa el disolvente al vacío, purificando el resto eventualmente por recristalización.

Según el método (b) las mezclas de los productos de desintegración primero son acetilados parcialmente de manera conocida y a continuación cromatografiadas.



75

La acetilación parcial es efectuada de manera conocida - eventualmente en presencia de disolventes organicos con cloruro de acetilo o anhídrido acético a temperaturas de 20°C hasta 150°C. De las posibles partes componentes de una mezcla que se ha de separar

80

son esterificados a estas condiciones solamente  $3\alpha, 14\beta$ -dihidroxi- $\Delta_{4,20,22}$  - bufatrienolido  $3\beta, 14\beta$ -dihidroxi- $\Delta_{4,20,22}$  -bufatrienolido y proscillaridina o, respectivamente, sus derivados de 19-oxo mientras que  $5\beta, 14\beta$ -dihidroxi- $\Delta_{3,20,22}$  -bufatrienolido y escilaridina o respectivamente sus derivados de 19-oxo quedan inva- riables. Si los bufatrienolidos que se han de separar poseen en la

85

posición 19 un grupo de hidroxil, forma a estas condiciones de re- acción el  $3\alpha, 14\beta, 19$ -trihidroxi- $\Delta_{4,20,22}$  -bufatrienolido los dieters, mientras que el  $5\beta, 14\beta, 19$ -trihidroxi- $\Delta_{3,20,22}$  -bufa- trienolido y el 19-hidroxi-escilaridina forman solamente un monoes- ter.-

90

Combinaciones de acetil asi obtenidas pueden ser trans- formadas de manera conocida fácilmente mediante saponificación con bases debiles o ácidos en la combinación desacetilada.-

De los productos de desintegración que fuerón obtenidos según el proceso de la invención mediante separación cromatografi- ca, no fuerón descritos hasta el presente en la literatura, los si- guientes:

95

- $3\alpha, 14\beta$ -dihidroxi- $\Delta_{4,20,22}$  -bufatrienolido;
- $5\beta, 14\beta$ -dihidroxi- $\Delta_{3,20,22}$  -bufatrienolido;
- $3\alpha, 14\beta$ -dihidroxi-19-oxo- $\Delta_{4,20,22}$  -bufatrienolido;
- $5\beta, 14\beta$ -dihidroxi-19-oxo- $\Delta_{3,20,22}$  -bufatrienolido;
- $3\alpha, 14\beta$ -19-trihidroxi- $\Delta_{4,20,22}$  -bufatrienolido;
- $5\beta, 14\beta, 19$ -trihidroxi- $\Delta_{4,20,22}$  -bufatrienolido;
- $5\beta, 14\beta, 19$ -trihidroxi- $\Delta_{3,20,22}$  -bufatrienolido;
- 19-hidroxi-escilaridina.-

100

Estas combinaciones son en sus características terapéuti-



cas parecidas a la proscillaridina y aparecen interesante para la -  
terapia de la insufidencia cardiaca. Además son algunas de ellas -  
valiosas materias básicas para la síntesis de otros medicamentos -  
cardioactivos.

110

EJEMPLO 1º

50 gr de mezcla de escilarenina en bruto obtenida por separación -  
ácida de proscillaridina son disueltos en 200 cm<sup>3</sup> de cloroformo y -  
dados a una columna cromatografica junto con 3300 gr de gel de si-  
lice. La columna es desarrollada con cloroformo que para la mejor  
separación contiene cantidades en reducción de toluol y cantidades  
en aumento de acetona (cloroformo: Toluol = 80 : 20 hasta clorofo-  
rmo / acetona = 80 : 25). Se obtienen varias fracciones en la suce-  
sión descrita a continuación:

115

Fracción 1ª : 2,6 gr de escillaridina;

120

Fracción 2ª : 21,1 gr de 3α,14β-dihidroxi-Δ<sup>4,20,22</sup> -bufatrieno-  
lido. F 195 - 200°C [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 82,5º (en cloroformo),  
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 62º (en metanol) ext.<sub>355</sub> 46 080.

125

Fracción 3ª : 1,0 gr de 3α,14β-dihidroxi-Δ<sup>4,20,22</sup> -bufatrienoli-  
do y mezcla de 3β,14β-dihidroxi-Δ<sup>4,20,22</sup> -bufa-  
trienolido

Fracción 4ª : 3,0 gr de 3β,14β-dihidroxi-Δ<sup>4,20,22</sup> -bufatrienoli-  
do, F 228-236°C (de Alcohol)  
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 16.5º (en metanol) ext.<sub>355</sub> 46 080

130

Fracción 5ª : 2,6 gr de 5β,14β-dihidroxi-Δ<sup>3,20,22</sup> -bufatrienoli-  
do, F 128 - 130°C (de alcohol/agua)  
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 58,5º ext.<sub>355</sub> 44 500.

Fracción 6ª : 7,7 gr. de proscillaridina (material base invariable),

EJEMPLO 2º

135

Para la disolución de 7,7 gr de una mezcla procedente de 5β,14β-  
dihidroxi-Δ<sup>3,20,22</sup> -bufatrienolido y 3β,14β-dihidroxi-Δ<sup>4,20,22</sup>  
-bufatrienolido en 35 cm<sup>3</sup> de piridina se añaden 35 cm<sup>3</sup> de anhídri-



do acetico, dejando en reposo durante 20 horas a 20°C, separando el disolvente por destilación al vacío, introduciéndose el residuo de la destilación en agua. El precipitado formado es absorbido en acetato etílico y la solución de acetato etílico lavada primero con solución de bicarbonato sódico y luego con agua. Una vez secada la fase orgánica sobre sulfato sódico y separado el disolvente por destilación, se obtienen 7,6 gr de residuo que es cromatografiado sobre 400 gr de gel de sílice junto con toluol y acetona en la proporción de 85 % 15 como elemento de elución. Una vez separado el disolvente por destilación se obtienen 4,3 gr de 5/β,14/β-dihidroxi- $\Delta^{3,20,22}$ -bufatrienolido en bruto. Volumen de producción neto: 2,45 gr. F 128-130°C (de alcohol/agua).

El 3/β-acetil-14-hidroxi- $\Delta^{4,20,22}$ -bufatrienolido que se encuentra en el primer producto puede ser desacetilado según el método de A von Wartburg [Helv. Chim. Acta 47, 1232 (1964)]. Se obtienen de esta manera 2,3 gr de 3/β,14/β-dihidroxi- $\Delta^{4,20,22}$ -bufatrienolido.

Según el mismo método puede descomponerse una fracción mezclada de 3/β,14/β-dihidroxi- $\Delta^{4,20,22}$ -bufatrienolido y 5/β,14/β-dihidroxi- $\Delta^{3,20,22}$ -bufatrienolido, como puede originarse según ejemplo 1ª.-

EJEMPLO 3ª

4,7 gr de mezcla en bruto de 19-oxo-escilarenina obtenidos por disociación ácida de 3/β-ranósido - 14/β-hidroxi - 19 - oxo- $\Delta^{4,20,22}$ -bufatrienolido con ácido sulfúrico diluido son disueltos en 20 gr de cloroformo o cromatografiados sobre 420 gr de gel de sílice con cloroformo.

Se obtienen varias fracciones en la sucesión descrita a continuación:

Fración 1ª: 0,37 gr. de 19 - oxo - escilaridina F 230ª [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> - - 185ª (en metanol),



170 Fracción 2<sup>a</sup>: 1,14 gr de 3 $\alpha$ ,14/ $\beta$ -dihidroxi - 19 - oxo  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -bufatrienolido F 202<sup>a</sup> C (de etanol)  
 $[\alpha]_D^{20} + 100^{\circ}$  (en metanol)

Fracción 3<sup>a</sup>: 1,20 gr de mezcla de 3 $\alpha$ ,14/ $\beta$ -dihidroxi - 19 - oxo  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -bufatrienolido y 3/ $\beta$ ,14/ $\beta$ -dihidroxi - 19 - oxo  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> - bufatrienolido

175 Fracción 4<sup>a</sup>: 1,05 gr. de 3/ $\beta$ ,14/ $\beta$ -dihidroxi - 19 - oxo -  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -bufatrienolido, F 238<sup>a</sup> C (de etanol)  
 $[\alpha]_D^{20} + 54^{\circ}$  (en metanol)

Fracción 5<sup>a</sup>:  $\frac{0,78 \text{ gr}}{4,54 \text{ gr}}$  impurezas polares

180 Despues de la separación por cristalización de la combinación para unas aguas madre adecuadas son acetiladas y cromatografiadas. Asi se obtiene por ejemplo de 0,915 gr de mezcla de acetato 0,128 gr. de 5/ $\beta$ , 14/ $\beta$ -dihidroxi - 19 - oxo -  $\Delta$ <sup>3,20,22</sup> -bufatrienolido. F 125 - 130<sup>a</sup> C (de etanol).  
 $[\alpha]_D^{20} + 69^{\circ}$  (en cloroformo)

EJEMPLO 4<sup>a</sup>

185 5 gr de 19 - hidroxi - proscilaridina son disueltos en 1 litro de agua y reaccionados con 1 litro de ácido sulfurico al 2%. Se deja durante una hora en reposo a temperatura ambiente, neutralizando con 1 n lejia de sosa y extrae una vez con 1 litro y cinco veces cada vez con 0,5 litros de ester de etil acetico. La solución produce despues del lavado, secado y la concentración por vaporización 2, - 190 853 gr de residuo. Si se concentra por vaporización, la fase acuosa hasta secarla, puede recuperarse de esto por extracción con ester etilico de ácido acetico 1,62 gr de la materia base.

195 2,85 gr de la mezcla de hidrolisis obtenida son disueltos en 10 com de cloroformo y dados a una columna cromatografiada con 100 gr de gel de silice. La columna es desarrollada con ester etilico de ácido acetico acetona (85 : 15). Se obtienen varias fracciones de las que pueden separarse en forma pura las siguientes combinacio



- nes:
- 200 a)  $3\alpha, 14\beta, 19$ -trihidroxi- $\Delta^{4,20,22}$  -bufatrienolido 0,863 gr;  
La recrystalización en metanol produce 0,635 gr. de la combinación  
pura F 227 - 230°C;  $[\alpha]_D^{20} + 49^\circ$  (en metanol)
- b)  $3\beta, 14\beta, 19$ -trihidroxi- $\Delta^{4,20,22}$  -bufatrienolido 0,608 gr;  
La recrystalización en metanol produce 0,196 gr. de la combinación  
205 pura F 208°C  $[\alpha]_D^{20} - 14^\circ$  (en metanol)
- c)  $5\beta, 14\beta, 19$  - trihidroxi -  $\Delta^{3,20,22}$  -bufatrienolido.  
Disolución y precipitación de ester etílico de ácido acético /hexa-  
no produce la combinación pura. F 138 - 142°C.  
 $[\alpha]_D^{20} + 20^\circ$  (en metanol)  $c = 0,5$ .
- 210 d) 19 - hidroxiescilaridina  
Recrystalización en tetrahidrofurano produce la combinación pura.  
F 226 - 300°C  $[\alpha]_D^{20} - 41^\circ$  (en tetrahidrofurano):

215 Descrita suficientemente la naturaleza y alcance de la pre-  
sente invención se hace constar que en la misma podrán ser varia-  
bles los materiales, dimensiones y en general aquellos otros deta-  
lles accesorios o secundarios que no alteren, cambien ni modifiquen  
la esencialidad propuesta.

220 Los términos en que queda redactada ésta memoria son cier-  
tos y fiel reflejo del objeto descrito, debiéndose tomar en un sen-  
tido más amplio y nunca en forma limitativa.

#### REIVINDICACIONES

Se reivindica como de la propia y nueva invención la propiedad y -  
explotación exclusiva de:

- 225 1ª.-Procedimiento para la separación de productos de desintegración  
de  $\Delta^{4,20,22}$  - bufatrienolidos, caracterizado porque
- a) se adsorbe tales mezclas sobre gel de sílice, eluyendo con disol-  
ventes orgánicos, preparando las fracciones individuales obtenidas  
de manera corriente y cromatografiando nuevamente sobre gel de sili-  
ce y después de una acetilación parcial la fracción mezclada, que -

20 OCT 1968

- 9 -

- 230 eventualmente se produce, de  $3/\beta, 14/\beta$ -dihidroxi -  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -bufa--  
 $3,20,22$  trienolido y  $5/\beta, 14/\beta$ -dihidroxi- $\Delta$  -bufatrienolido y son de  
rivados de 19 - oxo o sus derivados de 19-hidroxido o  
b) que se acetila tales mezclas primero parcialmente, cromatogra--  
fiandolas a continuación, desacetilandose eventualmente las frac--  
ciones obtenidas.--
- 235 2ª.-Procedimiento para la separación de productos de desintegración  
de  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -bufatrienolidos, según reivindicación 1ª, caracteriza  
do por su aplicación a una mezcla de  $3\alpha, 14/\beta$ -dihidroxi- $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -  
bufatrienolido,  $3/\beta, 14/\beta$ -dihidroxi- $\Delta$ <sup>3,20,22</sup> -bufatrienolido y  $5/\beta,$   
240  $14/\beta$ -dihidroxi- $\Delta$  -bufatrienolido que puede obtenerse me--  
diante disociación ácida de proscilaridina y que contiene eventual  
mente además materia básica invariable y escilaridina.--
- 3ª.-Procedimiento para la separación de productos de desintegración  
de  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -bufatrienolidos, según reivindicación 1ª, caracteriza  
245 do por ser aplicable a una mezcla de  $3\alpha, 14/\beta$ -dihidroxi-19-oxo --  
 $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -bufatrienolido,  $3/\beta, 14/\beta$ -dihidroxi-19-oxo- $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -  
bufatrienolido y  $5/\beta, 14/\beta$ -dihidroxi-19-oxo- $\Delta$ <sup>3,20,22</sup> -bufatrieno  
lido que puede obtenerse mediante disociación ácida de  $3/\beta$ -ramnósí  
do- $14/\beta$ -hidroxi - 19-oxo  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -bufatrienolido y que contiene  
250 eventualmente además materia base invariable y 19-oxo-escilaridina.
- 4ª.-Procedimiento para la separación de productos de desintegración  
de  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -bufatrienolidos, según reivindicación 1ª, caracteriza  
do por ser aplicable a una mezcla de  $3\alpha, 14/\beta, 19$ -trihidroxi- $\Delta$ <sup>4,20,22</sup>  
255 -bufatrienolido,  $3/\beta, 14/\beta, 19$ -trihidroxi- $\Delta$ <sup>3,20,22</sup> -bufatrieno-  
lido, y  $5/\beta, 14/\beta, 19$ -trihidroxi- $\Delta$  -bufatrienolido obteni--  
ble mediante disociación ácida de  $3/\beta$ -ramnósido -  $14/\beta, 19$ -dihidro  
xi -  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -bufatrienolido y que contiene eventualmente además  
materia base invariable y 19 -hidroxi -escilaridina.
- 5ª.-Procedimiento para la separación de productos de desintegración  
260 de  $\Delta$ <sup>4,20,22</sup> -bufatrienolidos, según reivindicación 1ª, caracteriza

20 091 1968

do porque se utiliza como medio de elución tetracloruros de carbono y/o hidrocarburos, eventualmente en mezcla con acetonas y/o alcoholes.-

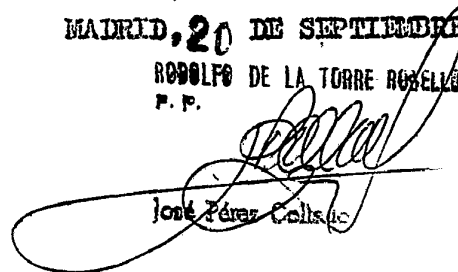
- 265 6ª.-Procedimiento para la separación de productos de desintegración de  $\Delta_{4,20,22}$  -bufatrienolidos, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque queda efectuada la separación cromatografica de seguir con las formulas indicadas al principio,  $3\alpha,14\beta$ -dihidroxi- $\Delta_{4,20,22}$  -bufatrienolido,  $5\beta,14\beta$ -dihidroxi- $\Delta_{4,20,22}$  -bufatrieno lido,  $3\alpha,14\beta$ -dihidroxi - 19 - oxo -  $\Delta_{4,20,22}$  -bufatrienolido, -  $5\beta,14\beta$ -dihidroxi - 19 - oxo -  $\Delta_{3,20,22}$  -bufatrienolido,  $3\alpha,14\beta$  19 -trihidroxi -  $\Delta_{4,20,22}$  -bufatrienolido,  $5\beta,14\beta,19$ -trihidroxi- $\Delta_{3,20,22}$  -bufatrienolido, 19 -hidroxiesclalaridina.-
- 270

7ª.- PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE PRODUCTOS DE DESINTEGRACION DE  $\Delta_{4,20,22}$  - BUFATRIENOLIDOS.-

Consta la presente memoria descriptiva de diez hojas numeradas y mecanografiadas por una sola cara.-

MADRID, 20 DE SEPTIEMBRE DE 1.968.-

RODOLFO DE LA TORRE ROSELLA  
P. P.



José Pérez Colls, Sr.