

439100

2 OCT. 1975

P.- 60.762

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl.: C07J 1/061K

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de ROUSSEL-UCLAF

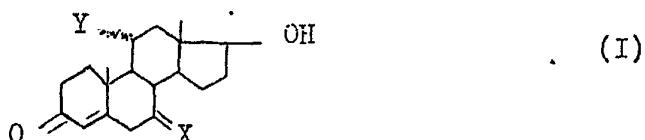
sociedad anónima francesa

establecida en 35 Bd. des Invalides, París 7^e, Francia.

por: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE NUEVOS HAPTENOS"

El presente invento tiene por objeto la preparación de nuevos haptenos derivados de la testosterona de fórmula general I:

5



10

en la cual o bien Y representa un grupo $-O-CO-R'-CO_2H$ en posición α o β , R' representa un grupo $-(CH_2)_a-$, siendo a un número entero que puede variar de 1 a 18 ó R' representa un grupo p-fenileno y X representa un grupo $\begin{matrix} H \\ \diagup \\ C \\ \diagdown \\ H \end{matrix}$ ó bien Y representa un átomo de hidrógeno y X representa bien un grupo $\begin{matrix} (CH_2)_bCO_2H \\ \diagup \\ C \\ \diagdown \\ H \end{matrix}$ ya sea un grupo $\begin{matrix} (CH_2)_bCO_2H \\ \diagup \\ C \\ \diagdown \\ H \end{matrix}$, siendo b un número entero que puede variar de 1 a 18, ya sea un grupo $=N-O(CH_2)_c-CO_2H$, siendo c un número entero que puede variar de 1 a 12, con la condición de que cuando X representa un grupo $\begin{matrix} H \\ \diagup \\ C \\ \diagdown \\ H \end{matrix}$, Y no representa el grupo $-O-CO-(CH_2)_2-COOH$ en posición α .

15

20

Los radicales $-(CH_2)_a-CO_2H$ y $-(CH_2)_b-CO_2H$ idénticos o diferentes representan preferiblemente el resto de un ácido alcanoico que contiene de 3 a 12 átomos de carbono como ácido propiónico, butírico, pentílico, undecílico o dodecílico.

25

El radical $-(CH_2)_c-CO_2H$ representa preferible-

2.7.75

mente el resto de un ácido carboxílico alifático que contiene de 2 a 5 átomos de carbono como ácido acético, propiónico, butírico o pentílico.

5 El invento se refiere más particularmente a la preparación de compuestos que responden a la fórmula general I, tal como la definida anteriormente en la cual X representa un grupo $\begin{matrix} & \text{H} \\ & \diagdown \\ & \text{C} \\ & \diagup \\ & \text{H} \end{matrix}$ e Y representa el grupo $-\text{O}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_a-\text{CO}_2\text{H}$ en posición α o β , con la condición de que Y no representa el grupo $-\text{O}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ en posición α , así como de los compuestos que responden a la fórmula general I, tal como la definida anteriormente en la cual X representa un grupo $\begin{matrix} & \text{H} \\ & \diagdown \\ & \text{C} \\ & \diagup \\ & \text{H} \end{matrix}$ e Y representa el grupo $-\text{O}-\text{CO}-(\text{C}_6\text{H}_4)-\text{CO}_2\text{H}$ en posición α o β , así como de los compuestos que responden a la fórmula general I, tal como la definida anteriormente en la que Y representa un átomo de hidrógeno y X un grupo $\begin{matrix} & (\text{CH}_2)_b-\text{CO}_2\text{H} \\ & \diagdown \\ & \text{C} \\ & \diagup \\ & \text{H} \end{matrix}$ ó $-\text{C}(\text{H})_2-\text{CO}_2\text{H}$, así como de los compuestos que responden a la fórmula general I tal como la definida anteriormente en la cual Y representa un átomo de hidrógeno y X un grupo $=\text{NO}-(\text{CH}_2)_c-\text{CO}_2\text{H}$.

15 Entre los compuestos, obtenidos por el procedimiento del invento, se pueden citar más particularmente los compuestos que responden a la fórmula general I cuyos nombres siguen:

25

2.7.75

- 11 β -hemisuccinoiloxi-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona
- 11 β -hemitereftaloiloxi-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona
- 11 β -hemitereftaloiloxi-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona
- 17 β -hidroxi-7 α -(ω -carboxi)-decil-androst-4-en-3-ona
- 5 - 17 β -hidroxi-7 β -(ω -carboxi)-decil-androst-4-en-3-ona
- 7-carboximetoxiimino-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona

El invento tiene por objeto igualmente la aplicación de los productos de fórmula general I en la preparación de antígenos.

10 El invento se extiende principalmente a la aplicación de los compuestos de fórmula general I caracterizada porque se transforma un compuesto de fórmula general I en anhídrido mixto con la ayuda de un haloformiato de alcoholo y particularmente con la ayuda de
15 cloroformiato de isobutilo y porque se fija este anhídrido sobre la albúmina de suero de vaca.

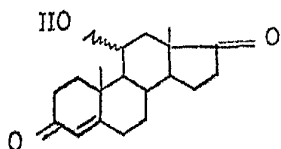
Un ejemplo de preparación de tal antígeno se da más adelante en la parte experimental. A partir de estos antígenos, es posible preparar anticuerpos según los métodos clásicos y principalmente el método de ERLANGER J. Biol. Chem. 228, 713. Los anticuerpos así obtenidos son
20 específicos de la testosterona. Esta especificidad se aplica según los métodos clásicos y principalmente el método de la diálisis en el equilibrio. Esta especificidad hace utilizables a los anticuerpos así obtenidos como
25

agentes de dosificación de la testosterona y se sabe el interés que tal dosificación presenta en terapéutica.

El invento se refiere principalmente a un procedimiento de preparación de lo compuesto de fórmula general I en la cual X representa un grupo $\begin{matrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{matrix}$ e Y el grupo $\text{O}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_a-\text{CO}_2\text{H}$ en posición α o β con la condición de que Y no represente el grupo $-\text{O}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ en posición α , caracterizado porque se hace reaccionar el compuesto de fórmula:

5

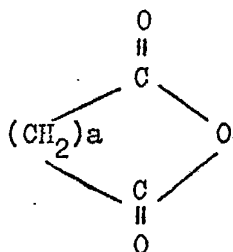
10



15

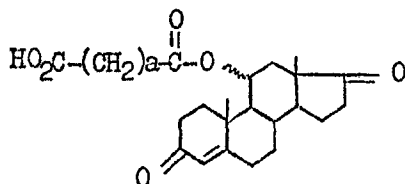
cuyo grupo hidroxilo está en posición α o β con un anhídrido de fórmula

20



para obtener el compuesto de fórmula:

25



2.7.75

cuyo grupo $-O-CO-(CH_2)_a-CO_2H$ está en posición α o β que se somete a la acción de un agente de reducción para obtener el compuesto deseado.

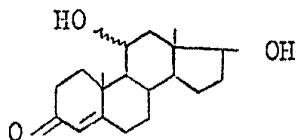
5 El agente de hidrogenación utilizado es preferiblemente un hidruro mixto, por ejemplo borohidruro de sodio o de litio.

En un modo de realización preferido:

- 10 - la reacción de esterificación se realiza en el seno de cloroformo en presencia de trietilamina o en piridina en presencia de dimetilaminopiridina.
- el agente de reducción utilizado es el borohidruro de sodio.

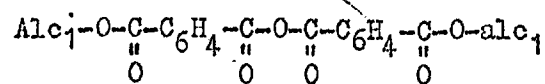
15 Los compuestos de partida utilizados para el procedimiento del invento son conocidos, pueden prepararse por ejemplo según los métodos indicados en las patentes de EE.UU. 2.656.370 y 3.072.684.

20 El invento tiene igualmente por objeto un procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula general I en la que X representa un grupo $\begin{matrix} H \\ \diagup \\ \diagdown \\ H \end{matrix}$ e Y representa un grupo $-O-CO-C_6H_4-CO_2H$ en posición α o β , caracterizado porque se somete el compuesto de fórmula:



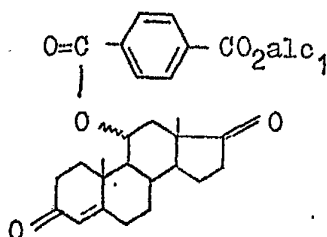
25
2.7.75

cuyo grupo hidroxilo está en posición α o β a la acción de un anhídrido p-carbalcoixibenzoico de la fórmula:



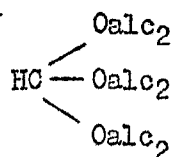
5 en la cual alc_1 representa un radical alcohilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, para obtener el compuesto 11^α u 11^β de la fórmula:

10



que se somete a la acción de un ortoformiato de alcohilo:

15

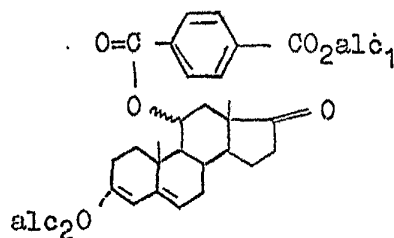


20

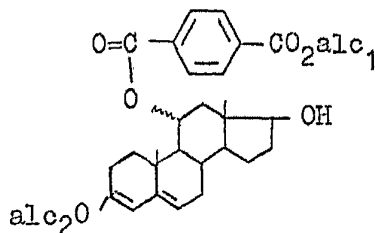
representando alc_2 un radical alcohilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, para obtener el compuesto 11^α u 11^β de fórmula:

25

2.7.75



se somete este compuesto a la acción de un agente de reducción para obtener el compuesto 11 α u 11 β de fórmula:



10 que se somete bien a la acción de un agente de saponificación y luego de un agente de hidrólisis ácida o bien a la acción de un agente de hidrólisis ácida y luego de un agente de saponificación, para obtener el compuesto deseado.

15 Como anhídrido p-carbalcoxibenzoico se utiliza preferiblemente el anhídrido p-carboximetilbenzoico o el anhídrido p-carboxietilbenzoico.

20 El ortoformiato de alcoholo utilizado es preferiblemente el ortoformiato de metilo, de etilo o de n-propilo y se trabaja preferiblemente en el seno de dioxano en presencia de ácido p-toluensulfónico.

El agente de reducción utilizado es preferiblemente el borohidruro de sodio o de litio.

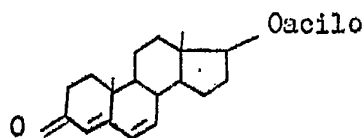
25 El agente de saponificación utilizado es preferiblemente una base alcalina como la sosa o la potasa, el amiduro de sodio, el terbutilato de potasio o el acetiluro de litio en etilendiamina y la reacción de sapo-

nificación se realiza preferiblemente en el seno de un alcohol inferior como el metanol o etanol.

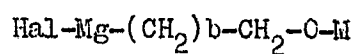
El agente de hidrólisis ácida utilizado es preferiblemente el ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, cítrico o para-toluensulfónico y se trabaja en el seno de uno o varios disolventes tales como un alcohol como el metanol, etanol o isopropanol.

Los compuestos de partida utilizados para el procedimiento del invento son conocidos; pueden prepararse por ejemplo según los métodos indicados en las patentes de EE.UU. 2.656.370 y 3.072.684.

El invento tiene también por objeto un procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula general I en la cual Y representa un átomo de hidrógeno y X un grupo $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{(CH}_2\text{)}_b\text{-CO}_2\text{H} \\ \diagup \\ \text{H} \end{matrix}$ o $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{(CH}_2\text{)}_b\text{-CO}_2\text{H} \\ \diagup \\ \text{H} \end{matrix}$, caracterizado porque se hace reaccionar un compuesto de fórmula general:

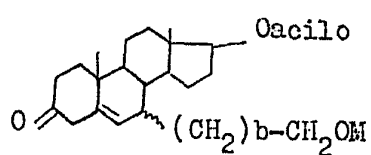


en la cual acilo representa el resto acilo de un ácido orgánico carboxílico que contiene de 1 a 18 átomos de carbono con un compuesto de fórmula:



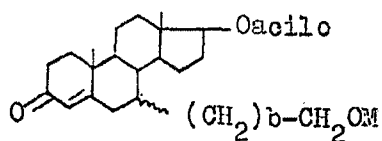
en la cual Hal representa un átomo de halógeno y OM un grupo hidroxilo bloqueado en forma de éter, obteniéndose así la mezcla de isómeros 7α y 7β de fórmula:

5



10

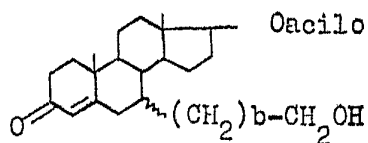
y de fórmula:



15

se somete la mezcla así obtenida a la acción de un agente ácido de ruptura de los éteres para obtener la mezcla de isómeros 7α y 7β de fórmula:

20



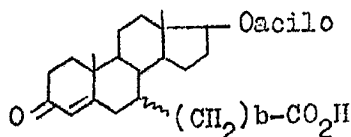
25

se somete esta mezcla a la acción de un agente de oxidación para obtener la mezcla de isómeros 7α y 7β de

2.7.75

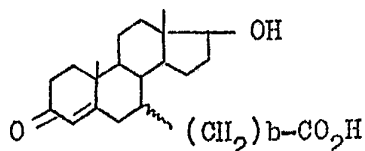
fórmula:

5



se somete esta mezcla a la acción de un agente de saponificación para obtener la mezcla de isómeros 7α y 7β de fórmula:

10



15

y se separa según los métodos usuales los isómeros 7α y 7β . Acilo representa el resto acilo de un ácido alifático o cicloalifático saturado o insaturado y principalmente el resto de un ácido alcanoico tal como ácido acético, propiónico, butírico, isobutírico o undecílico, de un ácido cicloalcoholcarboxílico o cicloalcoholalcanoico tal como por ejemplo el ácido ciclopropilcarboxílico, ciclo-pentilcarboxílico o ciclohexilcarboxílico, ciclo-pentilacético o ciclohexilacético o propiónico, del ácido benzoico o un ácido fenilalcanoico tal como el ácido fenilacético o fenilpropiónico, un aminoácido tal como el ácido dietilamini

25

2.7.75

noacético o aspártico o del ácido fórmico.

El organomagnesiano utilizado es preferiblemente un cloruro o un bromuro. M representa preferiblemente un radical bencilo o tetrahidropiranilo.

5 El agente ácido es preferiblemente el ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, cítrico o p-toluensulfónico y se trabaja en el seno de uno o varios disolventes tales como un alcohol como el metanol, etanol o isopropanol, una cetona como la acetona, un hidrocarburo como el benceno o el tolueno.

10 El agente de oxidación utilizado es preferiblemente el anhídrido crómico, el carbonato de plata, el silicato de plata o el tetraacetato de plomo.

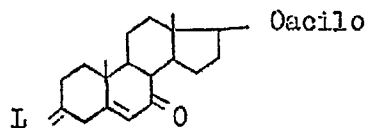
15 El agente de saponificación es preferiblemente una base alcalina como la sosa o la potasa, el amídro de sodio, el terbutilato de potasio el acetiluro de litio en etilendiamina.

20 Los dos isómeros 7α y 7β se separan por cromatografía. Los compuestos de partida utilizados para el procedimiento descrito anteriormente son en general conocidos, y pueden prepararse según el procedimiento indicado por CH. MEYSTRE y Col. Experientia p. 408 (1946).

25 El invento además tiene por objeto un procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula general I en la cual Y representa un átomo de hidrógeno y X

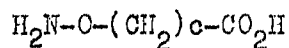
un grupo = N-O-(CH₂)_c-CO₂H, caracterizado porque se so-
mete un compuesto de fórmula:

5



en la cual L representa un grupo cetal y acilo el resto
acilo de un ácido orgánico carboxílico que contiene de
1 a 18 átomos de carbono y la acción de un compuesto
de fórmula:

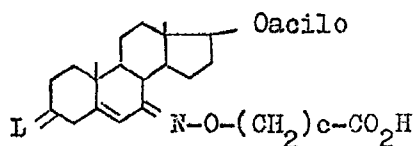
10



15

para obtener el compuesto de fórmula:

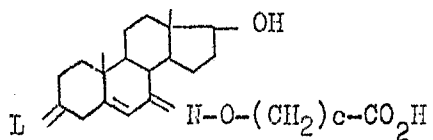
20



se somete éste a la acción de un agente de saponifica-
ción para obtener un compuesto de fórmula:

25

2.7.75



que se somete a la acción de un agente ácido para obtener el compuesto deseado.

L representa preferiblemente un grupo alcoholcetal cíclico que tiene de 2 a 4 átomos de carbono y principalmente el etilencetal o el propilencetal o bien un dialcoholcetal por ejemplo dimetilcetal o dietilcetal.

El compuesto de fórmula general $H_2N-O(CH_2)_c-CO_2H$ se utiliza preferiblemente en forma de clorhidrato.

El agente ácido se elige preferiblemente en el grupo constituido por ácido perclórico, ácido clorhídrico o ácido acético.

En un modo de realización preferido, el agente ácido es ácido perclórico y se trabaja en el seno de cloroformo.

Los compuestos de partida utilizados para el procedimiento del invento son en general conocidos; pueden prepararse según el procedimiento indicado en la patente de EE.UU. 2.934.545.

A continuación se dan ejemplos no limitativos de realización del invento.

Ejemplo 1 : 11 α -hemisuccinoiloxi-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona

Se disuelven 1,266 g de 11 α -hemisuccinoiloxi-androst-4-en-3,17-diona preparada según el método de Wataru y col. Chem. Pharm. Bull. 14 (2) 174 1966, en

215 cm³ de metanol y se añaden 0,234 g de borohidru-
de sodio. Se agita durante 1 hora y 30 minutos a 0°C
y luego se añaden 2 cm³ de ácido acético. Se extrae con
cloruro de metileno, se lavan los extractos con agua,
5 se secan y se concentra hasta sequedad.

Se obtienen 1,396 g del producto amorfo que
se purifica por cromatografía sobre gel de sílice elu-
yendo con el sistema: ciclohexano-acetato de etilo-ácido
acético (10-90-2). Se recogen 0,595 g de 11 α -hemisuccinoiloxi-
10 -17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona. P. de F. = 209-210°C.

Ejemplo 2 : 11 β -hemisuccinoiloxi-17 β -hidroxi-androst-4-
-en-3-ona

Etapa A: 11 β -hemisuccinoiloxi-androst-4-en-3,17-diona

15 Se mezclan 2 g de 11 β -hidroxi-androst-4-en-3,17-
-diona, 6,4 g de anhídrido succínico, 2 g de 4-dimetilami
nopyridina y 10 cm³ de piridina. Se calienta durante 23
horas a 100°C. Después de enfriamiento a temperatura am-
biente, se añade agua y se extrae con cloruro de metile-
no. Los extractos se lavan y se concentran a sequedad. Se
20 purifica el residuo por cromatografía sobre gel de síli-
ce eluyendo con el sistema ciclohexano-acetato de etilo-
ácido acético (5-95-1). Se recogen 1,368 g de 11 β -hemisuc-
cinoiloxi-androst-4-en-3,17-diona.

25 Etapa B: 11 β -hemisuccinoiloxi-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona

Se disuelven 1,039 g del producto obtenido en la Etapa A en 150 cm³ de metanol y se añaden 0,191 g de borohidruro de sodio. Se agita durante 1 hora y 30 minutos a 0°C; y luego se añade agua y se extrae con cloruro de metileno. Los extractos se lavan, se secan y se concentran hasta sequedad. Se purifica el residuo por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con el sistema ciclohexano-acetato de etilo-ácido acético (5-95-1). Se obtienen 0,4 g de 11β-hemisuccinoiloxi-17β-hidroxi-androst-4-en-3-ona. P. de F. = 218°C.

Ejemplo 3: 11α-hemitereftaloiloxi-17β-hidroxi-androst-4-en-3-ona

Etapa A: p-metoxicarbonil-benzoato de 11α-hidroxi-androst-4-en-3,17-diona

Se mezclan 0,71 g de 11α-hidroxi-androst-4-en-3,17-diona, 1,60 g de anhídrido p-metoxicarbonil-benzoico y 2,8 cm³ de piridina. Se agita durante 3 horas y 30 minutos a 100°C. Se extrae con cloruro de metileno, se lavan los extractos y se concentran hasta sequedad. El residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con la mezcla ciclohexano-acetato de etilo-ácido acético (60-40-2). Se obtienen 0,89 g de p-metoxicarbonil-benzoato de 11α-hidroxi-androst-4-en-3,17-diona. P. de F. = 168°C. y luego $176^{\circ}\text{C} \left[\frac{\alpha}{D} \right]^{20} = + 20^{\circ} \pm 2,5$ (c = 0,45%, cloroformo).

Etapa B: 11 α -p-metoxicarbonil-benzoiloxi-17 β -hidroxi-
-androst-4-en-3-ona

Se mezclan 2,4 g del producto obtenido en la
etapa A con 12 cm³ de dioxano, 3 cm³ de ortoformiato
5 de etilo y 0,096 g de ácido p-toluensulfónico. Se agi-
ta durante 35 minutos a 28°C bajo gas inerte. A conti-
nuación se añaden 0,6 cm³ de trietilamina, y luego 8 cm³
de agua. Se extrae con cloruro de metileno, se lavan los
extractos y se concentra hasta sequedad. Se obtienen 2,55
10 g de 11 α -(p-metoxicarbonil)-benzoiloxi-3-etoxi-androst-
-3,5-dieno-17 α -ona, que se disuelven en 25,5 cm³ de tetrahi-
drofurano y 25,5 cm³ de metanol. Progresivamente se aña-
de a 0°C una solución de 0,812 g de borohidruro de sodio
en 4,25 cm³ de agua. Se agita durante 45 minutos más a
15 0°C y luego se añaden 350 cm³ de agua y se aísla por fil-
tración el precipitado formado. Se obtiene 2,56 g de
11 α -(p-metoxi-carbonil)-benzoiloxi-3-etoxi-androst-3,5-
-diene-17 β -ol que se disuelven en 9,1 cm³ de etanol. Se
añaden 0,9 cm³ de ácido clorhídrico N, se agita durante
20 30 minutos y luego se añaden 50 cm³ de agua. Se separa
por filtración el precipitado formado. Se obtiene después
de recristalización en una mezcla de cloruro de metileno-
éter de petróleo (P. de Eb: 60-80°C), 2,221 g de 11 α -(p-
metoxicarbonil)benzoiloxi-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona.
25 P. de F. = 221°C.

2.7.75

Etapa C: 11 α -hemitereftaloiloxi-17 β -hidroxi-androst-
-4-en-3-ona

Se disuelven 2,16 g del producto obtenido en la etapa anterior en 216 cm³ de etanol. Se añaden gota a gota 6,5 cm³ de sosa N. Se agita durante 3 horas a 40°C. Después de enfriamiento a 0°C, se añade una solución normal de ácido clorhídrico hasta pH 2, y luego se añade progresivamente durante aproximadamente 1 hora, 1,8 l de agua. Se separa por filtración el precipitado formado que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con la mezcla ciclohexano-acetato de etilo-ácido acético (3-7-0,1). Se obtienen 0,726 g de 11 α -hemitereftaloiloxi-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona P. de F. = 278°C con descomposición, $[\alpha]_D^{20} = + 2,5^\circ \pm 2^\circ$ (C = 0,6% etanol).

Ejemplo 4: 11 β -hemitereftaloiloxi-17 β -hidroxi-androst-
-4-en-3-ona

Etapa A : 11 β -(p-metoxicarbonil)-benzoiloxi-androst-4-
-en-3,17-diona

Se mezclan 63 g de 11 β -hidroxi-androst-4-en-3,17-diona, 126 g de anhídrido p-metoxicarbonil-benzoico, 70 cm³ de trietilamina y 6,3 g de p-dimetilaminopiridina en 2 litros de cloruro de metileno. Se agita a reflujo durante cuatro días, añadiéndose 3 g de p-dimetilaminopiridina cada 24 horas. La mezcla reaccionante se vierte luego

en 3 litros de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrae con cloruro de metileno. Los extractos se lavan con agua y luego se concentra hasta sequedad a presión reducida. Se cromatografía el residuo sobre gel de sílice eluyendo con la mezcla benceno-acetato de etilo (8-2). Se obtienen 58 g de 11β -(p-metoxi carbonil)-benzoiloxi-androst-4-en-3,17-diona.

Etapa B: 11β -hemitereftaloiloxi- 17β -hidroxi-androst-4-en-3-ona

Se mezclan 2,28 g del compuesto obtenido en la etapa anterior, 12 cm³ de dioxano, 1,7 cm³ de ortoformiato de etilo y 0,115 g de ácido p-toluensulfónico y la mezcla se mantiene a 18°C durante 30 minutos bajo gas inerte. Se añaden 0,25 cm³ de trietilamina y luego se añade agua de forma que se obtenga una precipitación. Se separa por filtración el precipitado formado de 11β -(p-metoxicarbonil)benzoiloxi-3-etoxi-androst-3,5-dien-17-ona.

El precipitado se pone en suspensión en una mezcla de 20 cm³ de metanol y 10 cm³ de tetrahidrofurano. Se añade 1 g de borohidruro de sodio a la temperatura de +5°C, se agita durante 30 minutos y luego se añaden 10 cm³ de sosa N. Después de 2 horas a temperatura ambiente, se acidifica hasta pH 5 por adición de una solución de ácido clorhídrico 2N. Se separa por filtración el precipitado formado de 11β -hemitereftaloiloxi-3-etoxi-

5 -androst-3,5-dien 17-ol. Este precipitado se pone en
suspensión en 15 cm³ de etanol y 2 cm³ de ácido clor
hídrico 2N. Se calienta a aproximadamente 50°C hasta
disolución. Entonces se añade lentamente agua hasta
10 cristalización y luego se enfría a temperatura ambien-
te. Se separa por filtración el precipitado formado y
se recristaliza en etanol. Se obtienen 1,330 g de
11β-homitereftaloiloxi-17β-hidroxi-androst-4-en-3-ona.
P. de F. = 283°C, $[\alpha]_D^{20} = + 187^{\circ} \pm 3,5^{\circ}$ (c = 0,55%,
cloroformo).

Ejemplo 5: 17β-hidroxi-7α-(ω-carboxi)-decil-androst-
-4-en-3-ona y 17β-hidroxi-7β-(ω-carboxi)de-
cil-androst-4-en-3-ona

15 Se mezclan 5 g de magnesio y 40 cm³ de tetra
hidrofurano y se añade progresivamente una solución de
65 g de 11-tetrahidropiranioloxi-1-bromo-undecano en 200
cm³ de tetrahidrofurano, manteniendo la temperatura a
aproximadamente 45°C. Se añaden a 300 cm³ de la solución
de magnesiano obtenida, a -20°C, 0,6 g de cloruro cupro-
20 so y luego progresivamente una solución de 30 g de 17β-
-acetoxi-androst-4,6-dien-3-ona en 200 cm³ de tetrahidro
furano. Se deja más tiempo a -20°C 30 minutos después
de terminar la adición y luego se añade lentamente 300
cm³ de una solución de cloruro de amonio. La mezcla reac-
25 cionante se vierte en agua, se extrae con acetato de etilo

y se evapora hasta sequedad. Después de cromatografía sobre sílice eluyendo con la mezcla benceno-acetato de etilo (9-1), se fracciona en el orden: 11,5 g de 17 β -acetoxi-7-(ω -tetrahidropirani-
5 -loxi)-undecil-androst-5-en-3-ona y luego 25 g de 17 β -acetoxi-7-(ω -tetrahidro pirani-
loxi)-undecil-androst-4-en-3-ona. Se disuelven 11,5 g del primer producto en 60 cm³ de etanol y 5,5 cm³ de ácido clorhídrico N. Se deja en contacto durante 2 horas y 30 minutos a temperatura ambiente, y luego durante 1
10 hora a 45°C. La mezcla reaccionante se vierte en un litro de agua y se extrae con cloruro de metileno. Los extractos se evaporan hasta sequedad. El residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con la mezcla benceno-acetato de etilo (70-30). Se obtienen 6,8
15 g de 17 β -acetoxi-7-(ω -hidroxi)-undecil-androst-4-en-3-ona (Rf 0,19). La segunda fracción (compuesto Δ^4 -eno) se trata de la misma forma y se obtiene el mismo producto.

Se disuelven 6,8 g del producto anterior en 150 cm³ de acetona y se añade gota a gota, manteniendo la temperatura entre 0 + 5°C, 9 cm³ de la mezcla de la composición siguiente:

- CrO₃ 270 g
- H₂SO₄ 230 cm³
- H₂O c.s. para 1 litro

25

Después de terminar la adición, se agita durante

2.7.75

1 hora a una temperatura comprendida entre 0° y 5°C y luego se añaden 5 cm³ de metanol. Se elimina por filtración la parte insoluble, se concentra el filtrado a presión reducida a 30 cm³ y luego se diluye con agua y se extrae con cloruro de metileno. Los extractos se concentran hasta sequedad y se obtienen 17 β -acetoxi-7 ξ -(ω -carboxi)-decil-androst-4-en-3-ona. El producto se caracteriza por cromatografía sobre capa fina por Rf = 0,28 (sopORTE gel de sílice, eluyente benceno-acetato de etilo-ácido acético (70-30-2)). Se disuelven 5,8 g del producto así obtenido de 60 cm³ de metanol y luego se añaden 30 cm³ de sosa 2 N. Se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se añade ácido clorhídrico 2N hasta un pH ácido. La mezcla reaccionante se vierte en agua y se extrae con cloruro de metileno. Los extractos se evaporan hasta sequedad. Se cromatografía el residuo sobre gel de sílice eluyendo con la mezcla benceno-acetato de etilo-ácido acético (70-30-2). Así se separa la 17 β -hidroxi-7 α -(ω -carboxi)decil-androst-4-en-3-ona. P. de F. = 133°C, $[\alpha]_D^{20} = +47^\circ$ y $\pm 2^\circ$ (c = 0,5 %, cloroformo), y la 17 β -hidroxi-7 β -(ω -carboxi)decil-androst-4-en-3-ona. P. de F. = 98°C, $[\alpha]_D^{20} = +58,5^\circ \pm 4,5^\circ$ (c = 0,5%, cloroformo).

Ejemplo 6: 7-carboximetoximino-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona

25 Etapa A: 7-carboximetoximino-3,3-etilendioxi-androst-5-en-17 β -ol

5. Se mezclan 5 g de 3,3-etilendioxi-17 β -acetoxi-
-androst-5-en-7-ona, 250 cm³ de etanol, 5 g de clorhídrico
to de O-carboximetil-hidroxilamina y 44 cm³ de sosa II.
Se lleva a reflujo durante 4 horas. Se añaden 5 cm³ de
solución concentrada de sosa y se deja a reflujo de nuevo
durante 30 minutos. Se enfría a temperatura ambiente
y luego se añaden 50 cm³ de ácido clorhídrico 2N y 400
cm³ de agua. Se separa por filtración el precipitado
10 formado y se recristaliza en una mezcla de 50 cm³ de
acetato de etilo y 20 cm³ de metanol. Se obtienen 2,24
g de 7-carboximetoxi-imino-3,3-etilendioxi-androst-5-
-en-17 β -ol que se recristaliza en etanol. P. de F. =
216°C.

15 Etapa B: 7-carboximetoxiimino-17 β -hidroxi-androst-4-
-en-3-ona

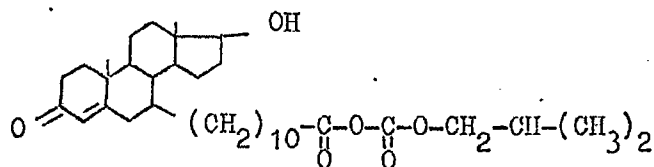
20 Se mezcla 1 g de 7-carboximetoxiimino-3,3-
-etilendioxi-androst-5-en-17 β -ol, 10 cm³ de cloroformo
y 10 cm³ de una solución acuosa al 70% de ácido perclórico.
Se agita durante 2 minutos a 20-25°C y luego la
mezcla reaccionante se vierte en 90 cm³ de una solución
acuosa saturada de bicarbonato de sodio. El cloroformo
se evapora bajo presión reducida a 25°C y luego se se-
para por filtración el precipitado formado. Se obtienen
0,794 g de 7-carboximetoxi-imino-17 -hidroxi-androst-4-
25 -en-3-ona. P. de F. = 162°C.

2.7.75

El espectro U.V. muestra que el producto se encuentra parcialmente en la forma enólica. (3-OH $\Delta^{3,5}$ aproximadamente 50%).

5 Aplicación : Conjugación de la 17 β -hidroxi-7 β -(ω -carboxi)-decil-androst-4-en-3-ona con la BSA (sueroalbúmina de ganado vacuno).

10 El conjugado de la 17 β -hidroxi-7 β -(ω -carboxi)-decil-androst-4-en-3-ona y la BSA se preparó por el método clásico que consiste en preparar en un primer tiempo el anhídrido mixto de fórmula:



y luego en un segundo tiempo condensarlo con la BSA.

20 Se mezclan 473 mg de 17 β -hidroxi-7 β -(ω -carboxi)-decil-androst-4-en-3-ona, 10 cm³ de dioxano y 0,246 cm³ de tri-n-butil-amina. Se añaden 0,132 cm³ de clorocarbonato de isobutilo y se agita durante 20 minutos a +12°C.

25 Se prepara una solución de BSA de la forma siguiente: se disuelven 1,38 g de BSA en 36 cm³ de agua helada, se añaden 36 cm³ de dioxano. Se obtiene una suspensión blanquecina que se vuelven a disolver totalmente por adición de 1,38 cm³ de solución de sosa N. A esta so-

lución se añade la solución de anhídrido mixto preparada anteriormente y se agita durante 1 hora a temperatura comprendida entre 0° y + 4°C. Entonces se añaden 0,655 cm³ de solución de sosa N y se prosigue la agitación durante 3 horas a pH 9,2 a la misma temperatura. La mezcla reaccionante se somete a una diálisis haciendo pasar con ayuda de una microbomba 15 litros de agua en 64 horas a una temperatura comprendida entre + 2 y + 5°C. A continuación se añade ácido clorhídrico 2N hasta pH 4,5. La suspensión coloidal de antígeno obtenida se lleva a -20°C durante 4 horas. Se deja volver a la temperatura ambiente. Se separa por decantación el precipitado, se disuelven en 120 cm³ de una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 1%. Se añade ácido clorhídrico 2N hasta un pH de 6,5 y se somete la solución a una diálisis como se ha hecho anteriormente durante 20 horas a 0, + 4°C. El producto buscado se aísla por liofilización. Se purifica de la forma siguiente: se disuelve 1,3 g del producto obtenido en 100 cm³ de agua helada, se extrae tres veces con 20 cm³ de cloroformo helado para eliminar el ácido libre en exceso y luego la fase acuosa se somete a liofilización. Se obtienen 1,060 g de un polvo blando que es el conjugado buscado.

Según el espectro U.V. el producto contiene 18% de ácido esteroide en peso (16,5 % de ácido unido y 1,5 %

2.7.75

de ácido libre).

Según las curvas de dicroísmo circular el producto contiene 22,5% en peso de ácido esteroide.

Microanálisis:

5 N % : 13,2 - 13,3

H₂O % : 5,6 después de secado a 80°C

% de cenizas: 4,6

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Francia, el 4 de Julio de 1974, bajo el nº 74-23281, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

2.7.75

1

$(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, siendo b un número entero que puede va-

riar de 1 a 18, ya sea un grupo $=\text{N-O-(CH}_2)_c\text{-CO}_2\text{H}$, siendo
 c un número entero que puede variar de 1 a 12, con la con-

5

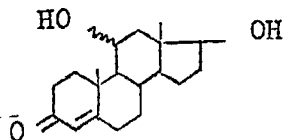
dicción de que cuando X representa un grupo $\begin{array}{l} \text{H} \\ \diagup \\ \text{---} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$, Y no repre-

sente el grupo $\text{O-CO-(CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$ en posición α , caracteriza-
 do porque, para preparar los haptenos que responden a la
 fórmula general I, en la cual X representa un grupo $\begin{array}{l} \text{H} \\ \diagup \\ \text{---} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$

10

e Y representa el grupo $-\text{O-CO-(C}_6\text{H}_4\text{)-CO}_2\text{H}$ en posición α o
 β , se somete el compuesto de fórmula:

15

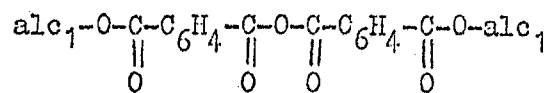


20

cuyo grupo hidroxilo está en posición α o β a la acción
 de un anhídrido p-carbalcoxi-benzoico de fórmula:

25

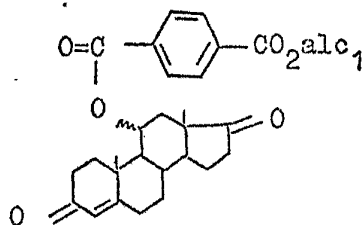
1



5

en la cual alc_1 representa un radical alcohilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, para obtener el compuesto $\text{II}\alpha$ u $\text{II}\beta$ de fórmula:

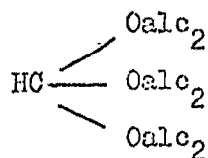
10



15

que se somete a la acción de un ortoformiato de alcohilo:

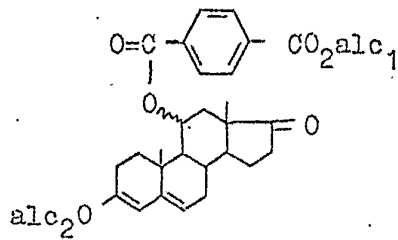
20



25

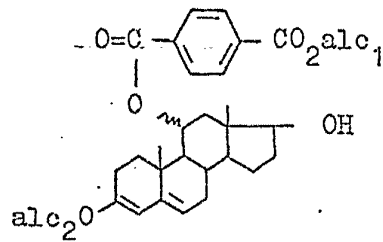
1 representando alc_2 un radical alcoholo que contiene de 1
a 6 átomos de carbono para obtener el compuesto 11α u 11β
de fórmula:

5



se somete este compuesto a la acción de un agente de re-
ducción para obtener el compuesto 11α u 11β de fórmu-
la:

15



que se somete ya sea a la acción de un agente de saponifi-
cación, y luego de un agente de hidrólisis ácida, ya sea
25 a la acción de un agente de hidrólisis ácida y luego de

1 un agente de saponificación, para obtener el compuesto deseado.

2ª.- PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE NUEVOS HAPTENOS.

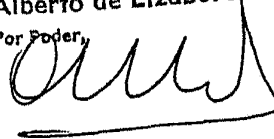
5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta y una hojas escritas a máquina por una sola cara.

10 Madrid, 01.FEB.1977

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder,

15 

20

25

27-1-77

RMB.