

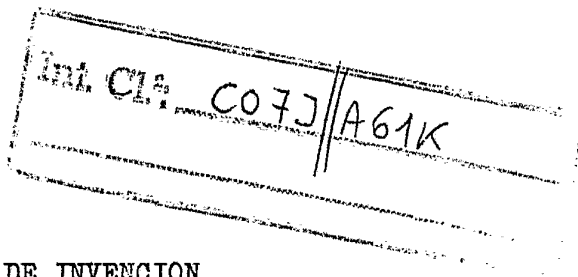
439 258

P.- 60.770

n/nº 1650 E



MEMORIA DESCRIPTIVA



para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de ROUSSEL-UCLAF

Sociedad anónima francesa

establecida en 35 Bd. des Invalides, París 7º, Francia

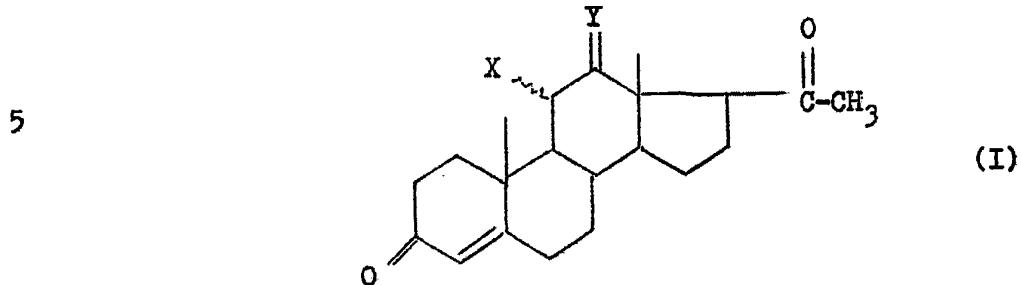
por: "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR NUEVOS HAPTENOS"

Prioridad reivindicada: Francia, 10 de Julio de 1,974

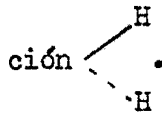
Nº 74-23937.



La presente invención se refiere a la preparación de nuevos haptenos de fórmula general I:

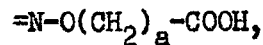


en la que o bien X representa un átomo de hidrógeno e Y una agrupación $=N-O-(CH_2)_a CO_2H$, representando a un número entero que puede variar entre 1 y 12, o bien X representa una agrupación hemitereftaloiloxi en posición α ó β , e Y una agrupación



15 El radical $-(CH_2)_a -CO_2H$ representa de preferencia el resto de un ácido carboxílico alifático que contiene 2 a 5 átomos de carbono, como el ácido acético, propiónico, butírico o pentílico.

Entre los compuestos de fórmula general I se pueden citar sobre todo aquéllos para los que X representa un átomo de hidrógeno e Y una agrupación



25 tal como la 12-carboximetoxiimino-pregn-4-en-3,20-diona.

21 AGO 1975

Entre los compuestos de fórmula general I se pueden citar, además:

- la 11 α -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona y
- la 11 β -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona.

5 La invención tiene igualmente por objeto la aplicación de los compuestos de fórmula general I, tal como ha sido definida anteriormente, en la preparación de antígenos, caracterizada porque se hace reaccionar un compuesto de fórmula general I con un halogenoformiato de alcoholo, y se obtiene así
10 un anhidrido mixto que se condensa con albúmina de suero de buey.

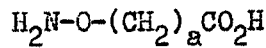
Un ejemplo de preparación de uno de tales antígenos se presenta más adelante en la parte experimental. A partir de esos antígenos, es posible preparar anticuerpos según los
15 métodos clásicos, y sobre todo el método de Erlanger, J. BIOL. CHEM. 228, 713.

Los anticuerpos así obtenidos son específicos de la progesterona. Esta especificidad se pone en evidencia según los métodos clásicos y sobre todo según el método de la diálisis en equilibrio. Esta especificidad hace utilizables a los
20 anticuerpos así obtenidos como agentes de dosificación de la progesterona, y es sabido el interés que esta dosificación presenta en terapéutica.

La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general I, en la que X re
25 presenta un átomo de hidrógeno e Y una agrupación =N-O-(CH₂)_{2a}-CO₂H,



caracterizado porque se somete la pregn-4-en-3,12,20-triona a la acción de un compuesto de fórmula:



5

para obtener el compuesto deseado.

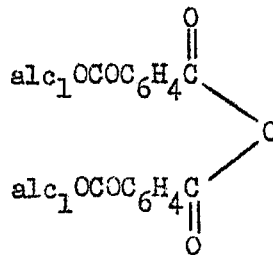
El reactivo de fórmula general $\text{H}_2\text{N}-\text{O}-(\text{CH}_2)_a-\text{CO}_2\text{H}$ se utiliza de preferencia en forma de clorhidrato.

La pregn-4-en-3,12,20-triona se puede preparar según el método indicado en Chem. Pharm. Bull. 12(8), págs. 859-865 (1964).

La invención se refiere igualmente a un procedimiento para la preparación de 11 α -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona y 11 β -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona, caracterizado porque se somete la 11 α -hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona o la 11 β -hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona a la acción de un anhídrido p-alcoxicarbonilbenzoico de fórmula:

15

20



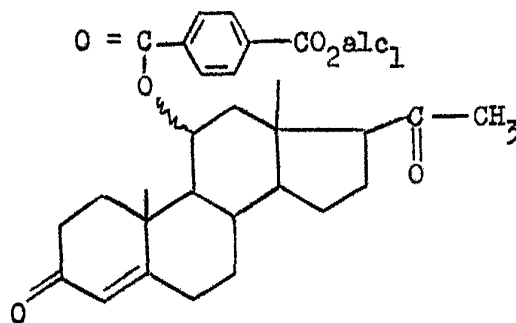
en la que alc_1 representa un radical alcoholilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, para obtener un compuesto de fórmula:

25

21
1953

mula:

5



10

que se somete a la acción de un agente de saponificación, para obtener el compuesto deseado, 11 α - u 11 β -, según el producto de partida empleado.

15

Como anhídrido p-alcóxicarbonilbenzoico se utiliza de preferencia el anhídrido p-metoxycarbonilbenzoico o el anhídrido p-etoxycarbonilbenzoico.

20

El agente de saponificación utilizado es de preferencia una base alcalina como sosa o potasa, amiduro sódico, tercbutilato potásico o acetiluro de litio, en etilendiamina, y la reacción de saponificación se realiza de preferencia en el seno de un alcohol inferior, tal como metanol o etanol.

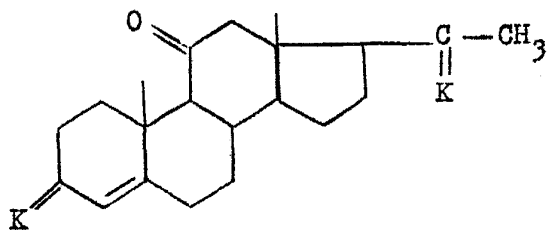
25

La invención se refiere igualmente a un procedimiento para preparar 11 β -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona, caracterizado porque se somete la pregn-4-en-3,11,20-triona a la acción de un agente de bloqueo de las funciones cetona

21 AGO 1975

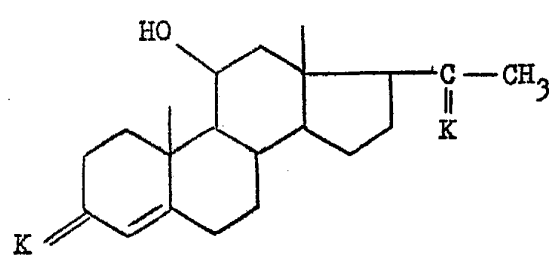
en 3 y 20, se obtiene el compuesto de fórmula general:

5



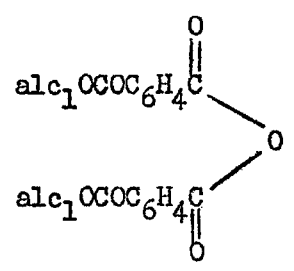
en la que K representa una agrupación protectora de cetona, se somete el compuesto obtenido a la acción de un agente de reducción, para obtener un compuesto de fórmula general:

15



se somete el compuesto así obtenido a la acción de un anhídrido p-alcoxicarbonilbenzoico de fórmula general:

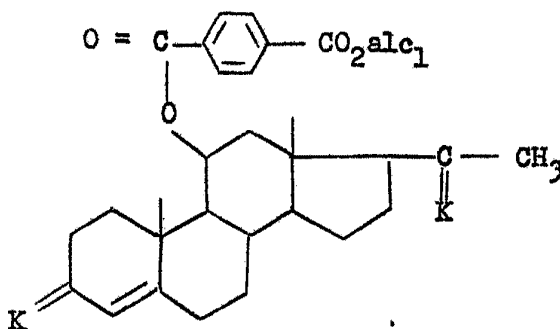
25





en la que alc₁ representa un radical alcoholo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, para obtener un compuesto de fórmula general:

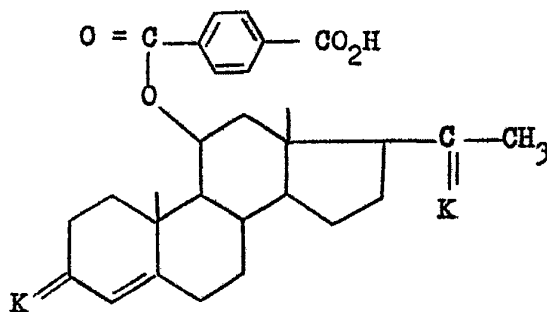
5



10

que se somete a la acción de un agente de saponificación, para obtener un compuesto de fórmula general:

15



20

que se somete a la acción de un agente de hidrólisis ácida capaz de liberar las agrupaciones cetónicas para obtener el compuesto deseado.

25

El agente de bloqueo de las funciones cetona en 3 y 20 es, por ejemplo, una O-(alcoholo inferior)-hidroxil-amina, como por ejemplo la O-metilhidroxilamina; puede ser igual



mente un alcohol inferior, un alcoholenglicol inferior o un dioxolano.

5 El agente de reducción utilizado es de preferencia un borohidruro alcalino, por ejemplo borohidruro sódico, de litio o potásico.

El anhídrido p-alcoxicarbonilbenzoico utilizado es de preferencia el anhídrido p-metoxicarbonilbenzoico o el anhidrido p-etoxicarbonilbenzoico.

10 El agente de saponificación utilizado es uno de los mencionados antes.

15 El agente de hidrólisis ácida es de preferencia el ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, cítrico o paratsluen-sulfónico, y se trabaja en presencia de agua, en el seno de uno o varios disolventes tales como un alcohol, como el metanol, etanol o isopropanol.

El 3,11,20-trioxo-pregn-4-eno es un compuesto conocido, y se puede preparar, por ejemplo, según el procedimiento indicado en la patente de los Estados Unidos de América 2.403.683.

20 A continuación se darán, a título no limitativo, ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1: 12-carboximetoxiimino-pregn-4-en-3,20-diona

25 Se introducen con agitación y bajo corriente de nitrógeno 2,3 g de pregn-4-en-3,12,20-triona en 58 cm³ de etanol.



5 Se calienta a reflujo la solución así obtenida, y se añade
en 6 h 45 una solución que contiene 765 g de hemiclорhidrato
del ácido aminooxiacético, 7 cm³ de sosa normal y 58 cm³ de
etanol. Se mantiene la agitación durante 1 hora tras el final
de la introducción. Se concentra la solución, se añade agua y
ácido acético, y se extrae. Se lava con agua, se seca y se lle
va a sequedad. Se obtiene un producto que se somete a una cro
matografía en eluyente con la mezcla benceno - acetato de eti
lo - ácido acético (50 - 50 - 0,2). Se obtiene tras cristali
zación la 12-carboximetoxiimino pregn-4-en-3,20-diona, que fun
de a 192°C.

Ejemplo 2: 11 α -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona

15 Etapa A: 11 α -(p-metoxicarbonil)-benzoiloxi-pregn-4-en-3,20-
-diona:

Se introducen 1,652 g de 11 α -hidroxi-pregn-4-en-
-3,20-diona y 2,500 g de anhídrido p-metoxicarbonilbenzoico en
5 cm³ de piridina. Se calienta la mezcla así obtenida a
100 ~ 105°C durante 3 horas. Se vierte la solución formada
en un baño de agua y de hielo. Se extrae con cloruro de metile
no, se lava la fracción soluble, y se destila a sequedad bajo
presión reducida. Se obtienen 3,050 g de un producto que se
cromatografía sobre sílice (eluyente benceno - acetato de eti
lo 5-5). Se aísla el producto de rf 0,45. Así se han obtenido



2 g de 11α -(p-metoxicarbonil)-benzoiloxi-pregn-4-en-3,20-diona, que funde a 190°C .

Etapa B: 11α -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona:

5 Se disuelven 0,098 g del producto obtenido en la etapa A en una solución que contiene 5 cm^3 de etanol y algunas gotas de cloruro de metileno. Se añaden luego $0,37\text{ cm}^3$ de una solución normal de sosa. Se mantiene bajo agitación durante 2 horas, y se añaden 10 gotas de agua. Se mantiene bajo
10 agitación durante 1 hora, se acidifica con ácido acético hasta descoloreación, se vierte en un baño de agua y de hielo, y se lava con cloruro de metileno y con agua. Se obtienen 0,109 g de un producto que se recristaliza en la mezcla de cloruro de metileno - éter isopropílico. Así se obtiene la 11α -hemi
15 tereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona, producto amorfo que funde en los alrededores de 220°C .

Ejemplo 3: 11β -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona

20 Etapa A: $2,20$ -bis-metiloxima- 11 -oxo-pregn-4-eno:

Se introducen bajo agitación 6,56 g de $3,11,20$ -trioxo-pregn-2-eno en 50 cm^3 de metanol. Se añaden 7,2 g de acetato
sódico anhidro y 6,52 g de clorhidrato de O-metilhidroxilamina. Se mantiene la mezcla así obtenida bajo agitación durante 18
25 horas a la temperatura ambiente, y se vierte en 500 cm^3 de agua,



se filtra con succión, se lava y se seca la mezcla obtenida. Así se obtienen 7,58 g de 3,20-bis-metiloxima-11- β -hidroxi-pregn-4-eno, que funde a 140°C.

5 Etapa B: 3,20-bis-metiloxima-11- β -hidroxi-pregn-4-eno:

Se introducen bajo agitación 5,7 g del producto obtenido en la etapa A en una solución que contiene 60 cm³ de tetrahidrofurano, 30 cm³ de agua y 3 cm³ de una solución de sosa 0,1 N. Se introducen entonces 1,8 g de borohidruro potásico. Se mantiene la mezcla obtenida durante 18 horas a la temperatura de 45 ± 2°C, y luego se añaden 0,9 g de borohidruro potásico. Se mantiene de nuevo la mezcla bajo agitación durante 5 horas, a la temperatura de 45°C ± 2°C. Se enfría la mezcla hasta la temperatura ambiente, se añaden 5,5 cm³ de una solución acuosa de ácido acético al 50%, y se concentra. Luego se añade una mezcla de agua y de hielo. Se filtra con succión el precipitado formado, se lava y se seca. Así se obtienen 5,4 g de un polvo blanco que se cromatografía sobre sílice, eluyendo con la mezcla benceno - acetato de etilo (85-15). Se aísla el producto, de rf 0,37. Así se obtienen 4 g de 3,20-bis-metiloxima-11- β -hidroxi-pregn-4-eno (forma E en 3), que funde a 184°C, También se aísla el producto de rf 0,20. Se obtienen así 0,6 g de 3,20-bis-metiloxima-11- β -hidroxi-pregn-4-eno (forma Z en 3), que funde a 158°C.

25



Etapa C: 3,20-bis-metiloxima-11 β -(p-metoxicarbonil)-benzoi-
loxi-pregn-4-eno (forma E):

5 Se introducen con agitación 2,8 g del compuesto obtenido en la etapa B (forma E) en 82 cm³ de cloruro de metileno. Se añaden 8,4 g de anhídrido p-metoxicarbonilbenzoico, 4,1 cm³ de trietilamina y 2,9 g de 4-dimetilaminopiridina. Se lleva la mezcla así obtenida a reflujo durante 70 horas. Se añaden 300 cm³ de benceno, y luego, lentamente, sulfato ácido potásico hasta la obtención de pH 1~2. Se lava con
10 agua, con una solución de bicarbonato de sosa, y luego de nuevo con agua hasta neutralidad. Se seca y se evapora. Se obtienen así 6,99 g de un producto que se cromatografía sobre sílice (eluyente: benceno - acetato de etilo 90-10). Se aísla el producto más móvil, se recoge en acetato de etilo, y
15 se obtiene así el 3,20-bis-metiloxima-11 β -(p-metoxicarbonil)-benzoi-loxi-pregn-4-eno (forma E), que funde a 90°C.

Etapa D: 3,20-bis-metiloxima-11 β -hemitereftaloiloxi-pregn-
-4-eno (forma E):

20 Se introducen 168 mg del compuesto obtenido en la etapa C en 4 cm³ de etanol. Se añaden gota a gota, y evitando el calentamiento, 4 cm³ de una solución acuosa de sosa N/2. Al cabo de media hora de agitación se añaden 8 cm³ de etanol acuoso. Se mantiene aún bajo agitación hasta que la
25 disolución sea prácticamente completa. Se añaden 60 cm³ de



5 agua y se somete a extracción con éter. Se filtra la parte acuosa y se lleva a pH 1~2. Se obtiene un precipitado. Se filtra con succión, se lava con agua y se seca el precipitado formado. Se obtienen así 139 mg de un producto que se recristaliza en acetato de etilo, y se obtiene así el 3,20-bis-
-metiloxima-11 β -hemitereftaloiloxi-pregn-4-eno, que funde a 250°C (forma E).

Etapa E: 11 β -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona:

10 Se introducen 88 mg del producto obtenido en la etapa D en 8 cm³ de una solución de ácido clorhídrico 2 N y 8 cm³ de acetona. Tras hidrólisis completa, eliminación de la acetona y filtración con succión, se obtienen 50 mg de 11 β -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona, que funde a 180°C.

15

Aplicación: Conjugado de albúmina de suero de buey y de 12-carboximetoxiimino-pregn-4-en-3,20-diona:

20 1) Condensación de 12-carboximetoxiimino-pregn-4-en-3,20-diona y cloroformiato de isobutilo:

25 Se introducen bajo agitación y bajo corriente de nitrógeno 201 mg de 12-carboximetoxiimino-pregn-4-en-3,20-diona en 5 cm³ de dioxano. Se añaden a 12-14°C 0,12 cm³ de tri-n-butilamina y 0,063 cm³ de cloroformiato de isobutilo. Se mantiene la solución obtenida bajo agitación durante 20 minutos.



2) Preparación de la solución de albúmina de suero de buey:

5 Se introducen bajo agitación y bajo corriente de nitrógeno a 0-5°C, 690 mg de albúmina de suero de buey en una solución que contiene 18 cm³ de agua y 2 cm³ de dioxano. Se mantiene la mezcla de reacción bajo agitación a 0-5°C hasta disolución completa.

10 3) Condensación del anhídrido obtenido en la 1ª parte del presente ejemplo con la solución de albúmina de suero de buey:

15 Se añaden a la solución de albúmina de suero de buey obtenida antes 16 cm³ de dioxano enfriado a 12~14°C. Se añaden luego 0,69 cm³ de sosa N, luego la solución de anhídrido obtenida precedentemente, y luego 2 cm³ de dioxano. Se mantiene la solución así obtenida bajo agitación durante 1 hora a 0~5°C. Se añaden 0,33 cm³ de sosa normal, y se ajusta el pH a 9. Se mantiene la solución bajo agitación a 0°C~5°C bajo atmósfera de nitrógeno. Se dializa la solución durante 20 horas a través de una membrana, a 0~5°C, y se precipita la solución con ayuda de ácido clorhídrico N a pH 4. Se deja durante una noche a -18°C. Se deja fundir lentamente el hielo obtenido. Se decanta la solución que sobrenada, y se disuelve el precipitado obtenido en 50 cm³ de una solución acuosa helada con 1% de bicarbonato. Se dializa de nuevo la solución

20

25

1 obtenida, a través de una membrana, durante 24 horas. Se
somete la solución a extracción con cloroformo, y se lio-
filiza la fase acuosa. Se obtienen 759 mg de conjugado de
5 albúmina de suero de buey y de 12-carboximetoximino-pregn-
-4-en-3,20-diona.

- REIVINDICACIONES -

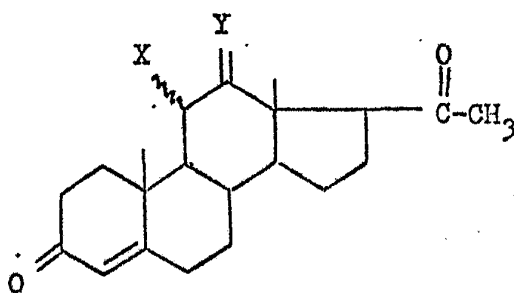
10

Los puntos de invención propia y nueva que se
presentan para que sean objeto de esta solicitud de Paten-
te de Invención en España, por VEINTE años, son los que se
recogen en las reivindicaciones siguientes:

15

1ª.- Procedimiento para preparar nuevos haptenos
de fórmula general I:

20



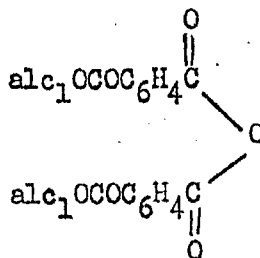
(I)

25

PS
27-1-77

1 en la que o bien X representa un átomo de hidrógeno e Y
una agrupación $=N-O-(CH_2)_a CO_2H$, representando a un número
entero que puede variar entre 1 y 12, o bien X representa
una agrupación hemitereftaloiloxi en posición α o β , e Y
5 una agrupación $\begin{matrix} & H \\ & / \\ & C \\ & \backslash \\ & H \end{matrix}$, caracterizado porque, para preparar

la 11 α -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona y la
11 β -hemitereftaloiloxi-pregn-4-en-3,20-diona, se somete
la 11 α -hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona o la 11 β -hidroxi-
10 -pregn-4-en-3,20-diona a la acción de un anhídrido p-alco-
xicarbonilbenzoico de fórmula:

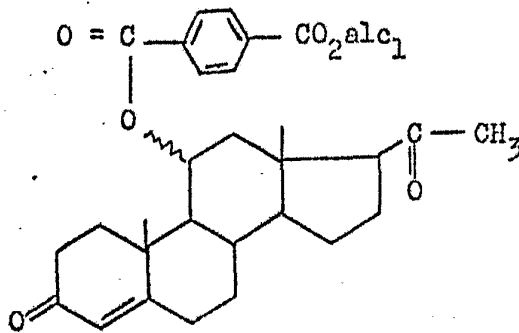


20 en la que alc_1 representa un radical alcohilo que contiene
de 1 a 6 átomos de carbono, para obtener un compuesto de
fórmula:

25

1

5



10

que se somete a la acción de un agente de saponificación para obtener el compuesto deseado, 11 α - u 11 β -, según el producto de partida empleado.

15

2ª.- Procedimiento para preparar nuevos haptenos.

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

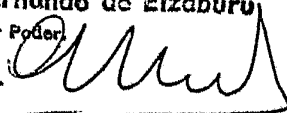
Esta Memoria consta de diecisiete hojas escritas a máquina por una sola cara.

20

Madrid, 01.FEB.1977

P.A.

25

Fernando de Elzaburu
 Por Poder.


27-1-77

RMB.

