

21 DIC. 1976

441.783

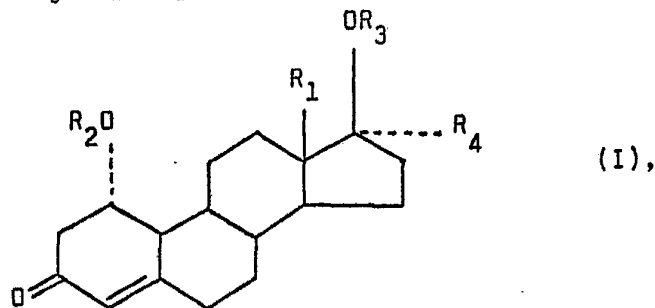
# CONCEDIDA

MEMORIA DESCRIPTIVA  
de una Patente de Invención a nombre de:  
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, de naciona-  
lidad alemana, domiciliada en l Berlin -  
65, Müllerstrasse 170-172 y 4619 Bergk-  
men, Waldstrasse 14, (ALEMANIA); por: -  
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE -  
1 $\alpha$ -HIDROXISTEROIDES".

Int. Cl.: C07J/A61K  
-----ooo000ooo-----

El invento concierne a un procedimiento para la pre-  
paración de nuevos 1 $\alpha$ -hidroxiesteroides farmacológicamente ac-  
tivos, para medicamentos que contienen estos compuestos.

Los nuevos 1 $\alpha$ -hidroxiesteroides obtenidos por el pro-  
cedimiento de acuerdo con el invento están caracterizados por  
la fórmula general I



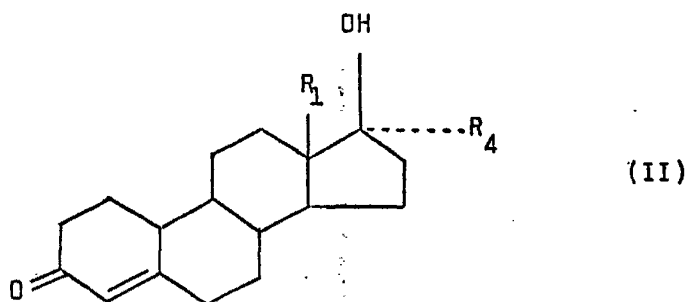
en donde R<sub>1</sub> significa un grupo metilo o un grupo etilo, R<sub>2</sub> y

$R_3$  significan átomos de hidrógeno o grupos alcanóilo con 1 a 8 átomos de carbono y  $R_4$  significa un átomo de hidrógeno o un hidrocarburo con 1 a 4 átomos de carbono.

5 De acuerdo con el invento, los grupos  $R_2$  y  $R_3$  pueden ser iguales o diferentes entre sí. Como grupos alcanóilo apropiados  $R_2$  y  $R_3$  se mencionarán a modo de ejemplo: el grupo formilo, el grupo acetilo, el grupo propionilo, el grupo butirilo, el grupo pentanoílo, el grupo hexanoílo, el grupo heptanoílo y el grupo octanoílo.

10 Como un radical hidrocarbonado  $R_4$  debe entenderse, - por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo vinilo o un grupo etinilo.

15 El procedimiento de acuerdo con el invento para la - preparación de los nuevos  $1\alpha$ -hidroxiesteroides de la fórmula - general I esté caracterizado porque se fermenta un compuesto - de la fórmula general II



20 en donde  $R_1$  y  $R_4$  tienen los significados arriba mencionados, con un cultivo de hongos de los géneros *Rhizoctonia*, *Calonectria*, *Glomerella*, *Aspergillus*, *Corticium*, *Septomyxa*, *Mucor*, *Isaria*, *Irpex* o *Fusarium*, y en caso deseado se esterifican grupos hidroxilo libres.

El procedimiento de acuerdo con el invento puede llevarse a cabo por ejemplo utilizando las siguientes cepas de hongos:

	<i>Rhizoctonia solani</i>	(ATCC	10154)
	<i>Glomerella glycines</i>	(ATCC	11871)
	<i>Glomerella fusaroides</i>	(ATCC	9552)
	<i>Colonectria decora</i>	(ATCC	14767)
	<i>Aspergillus clavatus</i>	(ATCC	9598)
	<i>Aspergillus fumigatus</i> mt. <i>helvola</i>	(CBS	11046)
10	<i>Aspergillus carneus</i>	(CBS	49465)
	<i>Aspergillus terreus</i>	(ATCC	10020)
	<i>Aspergillus conicus</i>	(IFO	4047)
	<i>Corticium sasakii</i>	(Univ.Tokio	9005)
	<i>Septomyxa affinis</i>	(ATCC	6737)
15	<i>Mucor griseocyanus</i>	(ATCC	1207b)
	<i>Mucor genevensis</i>	(ATCC	8976)
	<i>Mucor spinosus</i>	(CBS	29563)
	<i>Isaria farinosa</i>	(DUT	4098)
	<i>Irpex lacteus</i>	(IFO	5367)
20	<i>Fusarium ciliatum</i>	(CBS	13235)

Preferiblemente apropiados son *Colonectria decora*, *Aspergillus clavatus* y *Mucor spinosus*.

La realización de la hidroxilación se efectúa de acuerdo con métodos que se utilizan usualmente para la hidroxilación microbiológica de esteroides con cultivos de hongos.

Así, en primer término, se determinan en general con

ayuda de ensayos previos usuales las condiciones de fermentación más favorables, tales como por ejemplo la selección del medio nutritivo más favorable, del disolvente apropiado del -  
substrato, de la concentración del substrato, de las condicig  
5 nes técnicas - tales como temperatura, aireación, pH - y de los  
tiempos óptimos para germinación, adición de substrato y con -  
tacto del substrato con la enzima del microorganismo, por me -  
dios analíticos, especialmente por cromatografía en capa delga  
da.

10 En este caso se ha mostrado que es conveniente em -  
plear concentraciones de aproximadamente 50 a 1.000 mg de subs  
trato por litro de medio nutritivo. El valor del pH es ajustado  
preferiblemente a un valor dentro del margen de 5 a 7. La tem-  
peratura de cultivo se encuentra en general en el margen de 20  
15 a 40°C, preferiblemente de 25 a 35°C. Para la aireación se in-  
troduce aproximadamente 1 litro de aire por minuto y por litro  
de caldo de cultivo. La transformación del substrato se vigila  
convenientemente mediante análisis por cromatografía en capa -  
delgada de extractos de muestra. En general, después de 20 a  
20 120 horas se han formado ya cantidades suficientes de esteroi-  
de hidroxilado.

En el caso de la hidroxilación microbiológica se for-  
man con frecuencia, además de los 1 $\alpha$ -hidroxiesteroides de la -  
fórmula general I de acuerdo con el invento, también los 1 $\beta$ -  
25 hidroxiesteroides isómeros.

El aislamiento y la purificación de los productos del  
procedimiento se efectúa de manera en sí conocida. Por ejemplo,

se pueden extraer los productos del procedimiento con un disolvente orgánico, tal como metilisobutilcetona, se pueden concentrar el extracto por evaporación y se pueden separar y purificar los productos del procedimiento mediante cromatografía en columna.

5

Con ayuda del procedimiento de acuerdo con el invento se pueden preparar, por ejemplo, los siguientes  $1\alpha,17\beta$ -dihidroxiesteroides de la fórmula general I:

- la  $1\alpha,17\beta$ -dihidroxi-4-estren-3-ona;
- 10 la  $1\alpha,17\beta$ -dihidroxi-18-metil-4-estren-3-ona;
- la  $1\alpha,17\beta$ -dihidroxi-17 $\alpha$ -metil-4-estren-3-ona;
- la  $1\alpha,17\beta$ -dihidroxi-17 $\alpha,18$ -dimetil-4-estren-3-ona;
- la  $1\alpha,17\beta$ -dihidroxi-17 $\alpha$ -etinil-4-estren-3-ona y
- la  $1\alpha,17\beta$ -dihidroxi-18-metil-17 $\alpha$ -etinil-4-estren-3-ona.

15

La esterificación de los grupos hidroxilo libres, que eventualmente se efectúa a continuación, se lleva a cabo de acuerdo con los métodos que usualmente se utilizan en la química de los esteroides para la esterificación de grupos hidroxilo secundarios y terciarios. Como método apropiado de esterificación se mencionará por ejemplo la reacción de los esteroides con anhídridos de ácidos o con cloruros de ácidos en presencia de catalizadores básicos - tales como bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, carbonato de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, piridina, lutidina, colidina, o 4-dimetilaminopiridina -.

20

25

Los nuevos  $1\alpha$ -hidroxiesteroides de la fórmula general I son sustancias farmacológicamente activas. Estos mues -

tran un espectro de efectos similar al de los esteroides no hidroxilados en posición 1, a partir de los cuales son preparados aquellos, es decir, los nuevos compuestos tienen un efecto gestágeno muy intenso. En comparación con los compuestos no hidroxilados en posición 1, sin embargo, está claramente debilitado el efecto secundario andrógeno. Además de ello, en el caso de los compuestos según el invento aparece un efecto estrógeno. Por razón de estas propiedades los nuevos compuestos son sustancias activas muy valiosas.

Para el uso terapéutico los nuevos compuestos son transformados con los aditivos usuales en la farmacia galénica, con sustancias excipientes y agentes correctores del sabor, según métodos en sí conocidos, en las formas medicamentosas usuales. Para la administración por vía oral entran en consideración especialmente tabletas, grageas, cápsulas, píldoras, suspensiones o soluciones, y para la administración por vía parenteral entran en consideración en especial soluciones oleosas, tales como por ejemplo aceite de sésamo y soluciones en aceite de ricino que eventualmente contienen adicionalmente también un agente diluyente, tal como por ejemplo benzoato de bencilo o alcohol bencílico. La concentración de la sustancia activa en los medicamentos formulados de este modo es dependiente de la forma de administración.

Los nuevos medicamentos son apropiados como anti-conceptivos orales, para la terapia de las irregularidades del ciclo y como preparados para menopausias. Pueden ser utilizados como anticonceptivos por vía oral también sin ninguna adi

ción de agentes estrógenos. Evidentemente se pueden emplear también combinaciones de los nuevos gestágenos con estrógenos conocidos.

Los siguientes ejemplos de realización sirven para explicar el procedimiento de acuerdo con el invento.

#### EJEMPLO 1

Un matraz Erlenmeyer de 2 litros, que contiene 500 ml de una solución nutritiva, esterilizada en un autoclave a 120°C durante 30 minutos, a base de 5% de glucosa, 0,5% de líquido de maceración de maíz, 0,2% de nitrato de sodio, 0,1% de dihidrógenofosfato potásico, 0,05% de cloruro de potasio, 0,05% de sulfato de magnesio y 0,002% de sulfato de hierro divalente, es inoculado con un cultivo liofilizado de *Calongotria decore* (ATCC 14767) y es agitado durante 5 días a 30°C sobre un agitador rotatorio. Con este cultivo previo se inocula luego un fermentador de 20 litros, que está lleno con 15 litros de un medio esterilizado a 121°C y 1,1 atmósferas manométricas con la misma composición que la del cultivo previo. Con adición de Silicon SH como agente antiespumante se germina a 29°C con aireación y agitación durante 24 horas. 1 litro del caldo de cultivo es transferido en condiciones estériles a 14 litros de un medio nutritivo, esterilizado como arriba se indica, con la misma composición y es cultivado en las mismas condiciones. Después de 12 horas se añade una solución filtrada de modo estéril de 7,5 g de 17β-hidroxi-17α-etinil-4-estren-3-ona en 75 ml de dimetilformamida y se con-

tinúa incubando.

Después de conversación completa del substrato empleado (38 horas de tiempo de contacto), el contenido del fermentador es extraído por agitación dos veces, cada vez con 5 10 litros de metilisobutilcetona, y el extracto es concentrado por evaporación en vacío a una temperatura del baño de 50°C. El residuo, para la eliminación del agente antiespumante, es lavado varias veces con hexano y finalmente es cromatografiado sobre una columna de gel de sílice mediante el gradiente de cloruro de metileno - cloruro de metileno/acetona 10 8 + 2. Después de cristalización en acetona/isopropiléter se obtiene la 1 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-17 $\alpha$ -etinil-4-estren-3-ona de punto de fusión 207 a 208°C.

### EJEMPLO 2

15 100 mg de 1 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-17 $\alpha$ -etinil-4-estren-3-ona son mezclados con 3 ml de piridina y 0,3 ml de anhídrido de ácido acético y son agitados durante 20 horas a 30 hasta 35°C. La mezcla se concentra en alto vacío, el residuo se recoge en acetato de etilo, la fase en acetato de etilo se 20 va, se seca, se concentra en vacío, y se obtiene la 17 $\beta$ -hidroxi-1 $\alpha$ -acetoxi-17 $\alpha$ -etinil-4-estren-3-ona en forma de aceite incoloro.

### EJEMPLO 3

Un matraz Erlenmeyer de 2 litros, que contiene 500

ml de una solución nutritiva, esterilizada en un autoclave a 12°C durante 30 minutos, a base de 3,0% de glucosa, 1,0% de líquido de maceración de maíz, 0,2% de  $\text{NaNO}_3$ , 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05% de  $\text{MgSO}_4$ , 0,002% de  $\text{FeSO}_4$  y 0,05% de KCl, es inoculado con un cultivo liofilizado de la cepa *Aspergillus clavatus* (ATCC 9598), y es agitado durante 2 días a 30°C sobre un agitador rotatorio. Con este cultivo previo se inocula un fermentador de 50 litros, que está lleno con 30 litros de un medio esterilizado a 121°C y 1,1 atmósferas manométricas con la misma composición que la del cultivo previo. Con adición de Silicon SH como agente antiespumante se germina a 29°C, con aireación y agitación durante 72 horas.

900 ml del caldo de cultivo son transferidos en condiciones estériles a 14 litros de un medio nutritivo, esterilizado tal como arriba se indica, con la misma composición y es cultivado en las mismas condiciones. Después de 24 horas se añade una suspensión esterilizada, finísimamente molida en presencia de Tween<sup>®</sup> 80 acuoso, de 7,5 g de 17 $\alpha$ -etinil-17 $\beta$ -hidroxi-18-metil-4-estren-3-ona en agua destilada, y se continúa germinando.

El transcurso de la transformación es vigilado mediante análisis por cromatografía en capa delgada de los extractos en metilisobutilcetona de muestras del fermentador. Después de un tiempo de contacto de aproximadamente 90 horas esté completada la conversión. El micelio de hongo es separado por filtración y el producto filtrado del cultivo es extraído dos veces, cada vez con 10 litros de metilisobutilce-

tona. Paralelamente a ello el micelio separado por filtración es agitado varias veces con una mezcla de metilisobutilcetona, acetona y agua y de este modo es extraído.

5 Las soluciones orgánicas del extracto son reunidas y concentradas hasta sequedad por evaporación en vacío a una temperatura del baño de 50°C. El residuo remanente se lava - varias veces con hexano y finalmente se cromatografía sobre una columna de gel de sílica. Para la purificación adicional se recristaliza el producto en cloruro de metileno/benceno y  
10 el solvato en benceno, para la eliminación del benceno, se disuelve y precipita una vez más en etanol/agua. La 17 $\alpha$ -etininil-1 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-18-metil-4-estren-3-ona pura funde a - 180°C.

#### EJEMPLO 4

15 500 mg de 17 $\alpha$ -etininil-1 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-18-metil-4-estren-3-ona son disueltos en 10 ml de piridina, se añaden 0,5 ml de anhídrido de ácido acético y se deja reposar durante 30 horas en la nevera. Para completar la reacción se agita a continuación durante algunas horas más a la temperatura ambiente. Después de ello la mezcla de reacción es concentrada  
20 por evaporación en alto vacío, el residuo es recogido en acetato de etilo y es lavado a neutralidad con agua destilada. Después del secado sobre sulfato de sodio y de concentración de la solución en acetato de etilo se obtiene 1 $\alpha$ -acetoxi-17 $\alpha$ -  
25 etininil-17 $\beta$ -hidroxi-18-metil-4-estren-3-ona.

EJEMPLO 5

650 mg de  $17\alpha$ -etinil- $1\alpha,17\beta$ -dihidroxi-18-metil-4-estren-3-ona son recogidos en 15 ml de piridina, se añaden 2 ml de anhídrido de ácido enántico y se agita durante 16 horas a la temperatura ambiente. A continuación la mezcla se concentra en alto vacío, el residuo se recoge en acetato de etilo y se lava a neutralidad con agua destilada. Después de la concentración de la fase en acetato de etilo secado queda como residuo  $17\alpha$ -etinil- $1\alpha$ -heptanoiloxi- $17\beta$ -hidroxi-18-metil-4-estren-3-ona en forma de aceite débilmente amarillento.

EJEMPLO 6

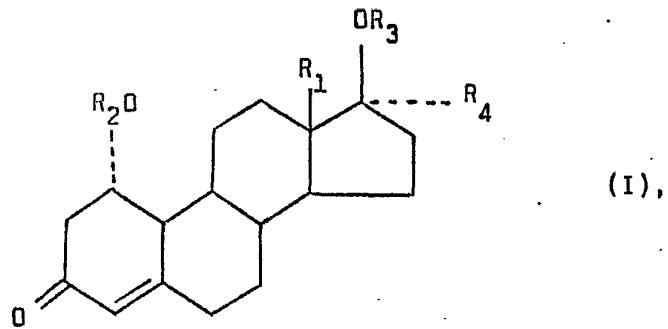
300 mg de  $17\alpha$ -etinil- $1\alpha,17\beta$ -dihidroxi-4-estren-3-ona son mezclados con 10 ml de piridina y 1,5 ml de anhídrido de ácido acético y agitados bajo nitrógeno a la temperatura ambiente durante 4 días. Después de ello la mezcla de reacción es concentrada por evaporación en alto vacío, el residuo es recogido en acetato de etilo y es lavado a neutralidad con agua destilada. Después del secado sobre sulfato de sodio y de concentración en vacío de la solución en acetato de etilo se obtiene  $17\alpha$ -etinil- $1\alpha,17\beta$ -diacetoxi-4-estren-3-ona.

Análogamente se obtiene  $17\alpha$ -etinil- $1\alpha,17\beta$ -diacetoxi-18-metil-4-estren-3-ona a partir de  $17\alpha$ -etinil- $1\alpha,17\beta$ -dihidroxi-18-metil-4-estren-3-ona.

N O T A

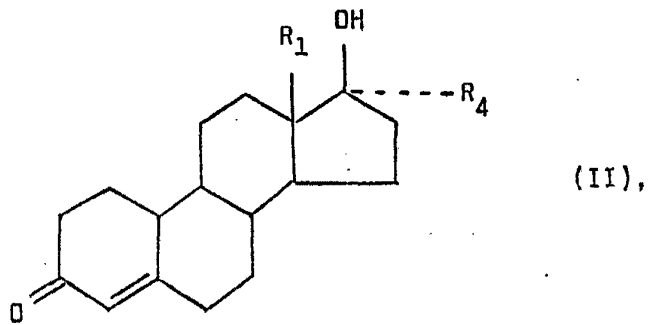
Se reivindica como nuevo y de propia invención.

1.- Procedimiento para la preparación de  $1\alpha$ -hidroxiesteroides de la fórmula general I



5 en donde R<sub>1</sub> significa un grupo metilo o un grupo etilo; R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> significan átomos de hidrógeno o grupos alcanóilo con 1 a 8 átomos de carbono; y R<sub>4</sub> significa un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado con 1 a 4 átomos de carbono, caracterizo porque se fermenta un compuesto de la fórmula general II

10



15 en donde R<sub>1</sub> y R<sub>4</sub> poseen los significados arriba mencionados, con un cultivo de hongos de los géneros Rhizoctonia, Calonectria, Glomerella, Aspergillus, Corticium, Septomyxa, Mucor, Isaria, Irpex o Fusarium y en caso deseado se esterifican grupos hidroxí libres.

2.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE  $1\alpha$ -HIDRO

XIESTEROIDES".

Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva, que consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 14 OCT. 1975.

CARLOS FERNANDEZ CANDELAS

