

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

10	ES	11	NÚMERO	16	AI
		21	459644		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			8-6-77		

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:		
51 NÚMERO	52 FECHA	53 PAIS
694,512	9-6-76	Estados Unidos
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C120/AGIK	
54 TITULO DE LA INVENCION		
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN COMPUESTO OXIGENADO.		
71 SOLICITANTE (S)		
ELI LILLY AND COMPANY		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
307 East McCarty. Street-Indianapolis, Indiana- ESTADOS UNIDOS		
72 INVENTOR (ES)		
David Shuichi Fukuda; Bernard John Abbott y Robert Allen Archer, todos de nacionalidad estadounidense.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

AA

1 Los 1-hidroxi-9-ceto-3-alkuil-dibenzo [b,d] piranos o 1,9-dihidroxi-3-alkuil-dibenzo [b,d] piranos se
oxigenan en el penúltimo carbono de la cadena lateral alqui
lica mediante fermentación con el microorganismo *Bacillus*
5 *cereus* NRRL B-8172, para formar nuevos compuestos.

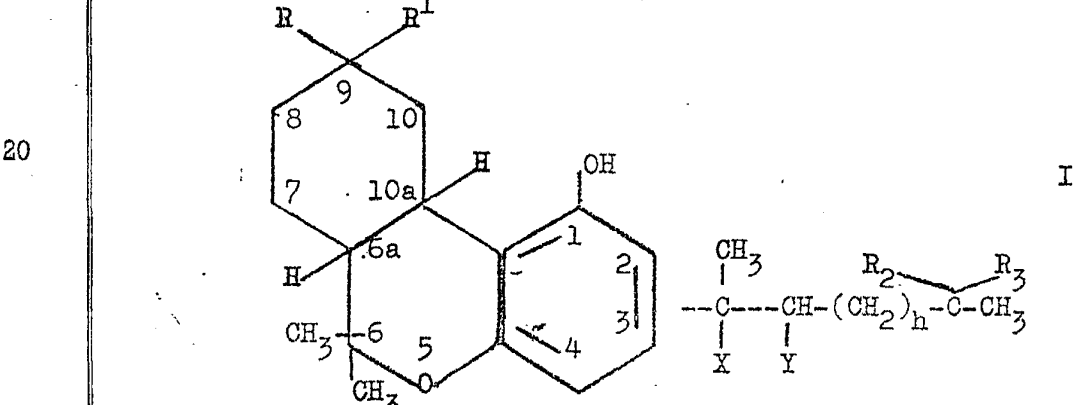
 Las Patentes de los Estados Unidos 3,822,188,
3,806,234 y 3,864,492 de Fager y otros, describen la fermen
tación de Delta⁹-THC (1-hidroxi-3-n-pentil-6,6,9-trimetil-
6a-,7,10,10a-tetrahidrodibenzo [b,d] pirano) con microor-
10 ganismos tales como *Cunninghamella blakesleeana*, *Streptomy-*
ces viridoilavus, *Mucor parasiticus*, *Aspergillus fonsecaeus*,
etc. para producir los derivados 4'-hidroxi correspondien
tes, esto es, los compuestos en los cuales la cadena late
ral de n-pentilo se oxida en su penúltimo carbono mediante
15 la acción del microorganismo. Los compuestos así producidos
se dice que son anti-depresores. Vidic y otros, en la Paten
te de los Estados Unidos 3,897,306, informó sobre la oxida
ción de un isómero (Delta⁸-THC) mediante *Streptomyces laven*
dulae o mediante *Pelicularia filamentosa* para producir un
20 compuesto muy diferente en donde el carbono en C-7 se hidro
xila para producir un derivado 7-hidroxi-Delta⁸-THC. Robert
son, y otros, en *Biomedical Mass Spectrometry*, 1975(2) 266-
271 encontraron que la exposición de Delta⁹-THC, Delta⁸-THC,
canabinol y canabidiol al hongo *Syncephalastrum racemasum*
25 da origen a productos que llevan un grupo hidroxilo en el
penúltimo átomo de carbono.

 Se ha encontrado por Archer que una serie de 1-
hidroxi-3-alkuil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo [b,d]
piran-9-onas son útiles como antidepresores, agentes contra
30 la ansiedad, sedantes y medicamentos analgésicos -- ver la

1 Patente de los Estados Unidos No. 3,928,598. Los compuestos
de esta estructura fueron sintetizados primero por Fahren-
holtz y otros. J.Am. Chem. Soc. 88 2078 (1966), 89, 5934
(1967), como intermediarios para la preparación de Delta⁸-
5 o Delta⁹-THC. (Ver también la Patente de los Estados Unidos
No. 3,507,885 y la Patente de los Estados Unidos 3,636,058).
Se describió el mismo grupo de compuesto de Delta⁸- y Delta⁹-
THC por Petrzilka en la Patente de los Estados Unidos
3,873,576.

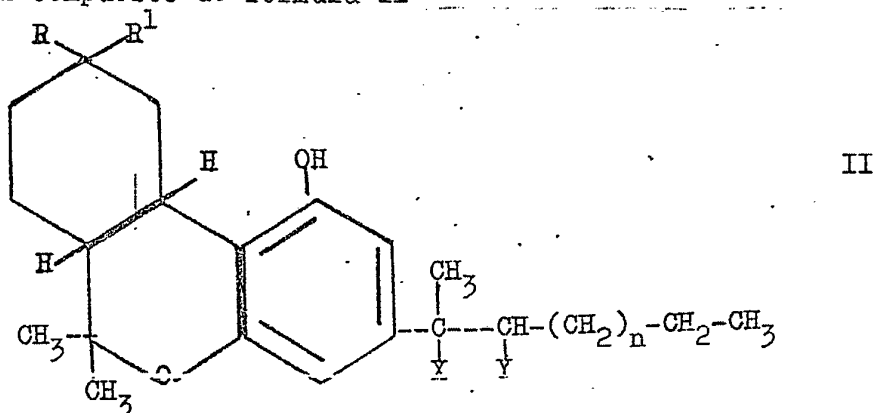
10 Sería extremadamente difícil hacer 1-hidroxi-9-
ceto-3-alkil-dibenzo [b,d] piranos o 1,9-dihidroxi-3-alk-
quil-dibenzo [b,d] piranos mediante un procedimiento quí-
mico. Es el objeto de esta invención llevar a cabo esta reac-
ción mediante el empleo de un microorganismo, Bacillus ce-
15 reus NRRL B-8172.

Esta Invención proporciona un procedimiento para
producir un compuesto oxigenado de fórmula I:



25 en donde X y Y son ambos hidrógeno o uno es hidrógeno y el
otro metilo;
en donde, cuando se toman individualmente, uno del par de R
y R¹ y uno del par de R² y R³ es hidrógeno y el otro es hi-
droxilo, y cuando se toman juntos, el par de R y R¹ y el par
30 de R² y R³ forman el oxígeno de un grupo de cetona; y en don

de n es 1, 2, 3 o 4, el cual se caracteriza por oxigenar un compuesto de fórmula II



en donde X y Y son ambos hidrógeno o uno es hidrógeno y el otro metilo, en donde n es 1, 2, 3 o 4, y en donde, cuando se toman individualmente, uno de R y R¹ es hidrógeno y el otro es hidróxilo, y cuando se toman juntos forman el oxígeno de un grupo de cetona, mediante la acción de una cepa del microorganismo Bacillus cereus.

La acción de oxigenación de la especie Bacillus Cereus en los substratos de dibenzopiran-1-ol-9-onas o dibenzopiran -1,9-dioles puede tener lugar bajo condiciones de fermentación en cultivo sumergido normales, o las células del microorganismo en desarrollo pueden cosecharse, resuspenderse y agregarse el substrato a la suspensión resultante.

Los nuevos productos de conformidad con la fórmula I anterior producidos durante la fermentación, fueron aislados mediante procedimientos de extracción normales y se purificarón mediante cromatografía en líquido de funcionamiento elevado y/o cromatografía en capa delgada preparatoria. Las estructuras se determinaron mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear, espectroscopia de masas, espectroscopia ultravioleta y espectroscopia infrarroja.

1 Los compuestos preparables mediante el procedimiento anterior, incluyen los siguientes:

5 A partir de trans-1-hidroxi-3-(1',2'-dimetilheptil) 6,6-dimetil-6-6a, 7, 8,10, 10a-hexahidro-9H-dibenzo \square b,d piran-9-ona.

a. trans-1,6',9-trihidroxi-3-(1', 2'-dimetil-heptil) 6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo \square b,d pirano.

10 b. trans-1,9-dihidroxi-3-(1',2'-dimetilheptil) 6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo \square b,d piran-6'-ona.

c. trans-1,6',dihidroxi-3-(1',2'-dimetilheptil)-6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo \square b,d piran-9-ona.

15 d. trans-1,6'-dihidroxi-3-(1',2'-dimetilheptil)-6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo \square b,d piran-6',9-diona.

20 A partir de trans-1-hidroxi-3-(1',1'-dimetiloctil) -6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo \square b,d piran-9-ona.

a. trans-1,7', 9-trihidroxi-3-(1',1'-dimetiloctil)-6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo \square b,d pirano.

25 b. trans-1,9-dihidroxi-3-(1',1'-dimetiloctil)- 6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo \square b,d piran-6'-ona.

c. trans-1,7'-dihidroxi-3-(1',1'-dimetiloctil)-6,6-dimetil-6,6a-7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo \square b,d piran-9-ona.

30 d. (\pm) -trans-1-hidroxi-3-(1',1'-dimetiloctil)-

1 6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\square_{b,d}$
piran-7'-9-diona.

A partir de cis-1-hidroxi-3-(1',1'-dimetilheptil)
5 -6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\square_{b,d}$
piran-9-ona.

a. cis-1,6',9-trihidroxi-3-(1',1'-dimetilheptil)
-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\square_{b,d}$ pirano

b. cis-1,6'-dihidroxi-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,
6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\square_{b,d}$ pirano-9-ona.

10 c. cis-1,9-dihidroxi-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,
6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\square_{b,d}$ pi-
ran-6'-ona.

d. (+) cis-1-hidroxi-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,
15 6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\square_{b,d}$ piran
-6',9-diona.

A partir de trans-1-hidroxi-3-(1',1'-dimetilpen-
til) 6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\square_{b,d}$
piran-9-ona.

20 a. trans-1,4',9-trihidroxi-3-(1',1'-dimetilpen-
til)-6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo-
 $\square_{b,d}$ pirano

b. trans-1,9-dihidroxi-3-(1',1'-dimetilpentil)-6,
6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\square_{b,d}$ piran-
4'-ona.

25 c. trans-1,4'-dihidroxi-3-(1',1'-dimetilpentil)-
6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\square_{b,d}$
piran-9-ona.

d. (+)-trans-1-hidroxi-3-(1',1'-dimetilpentil)-6,
30 6-dimetil,6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\square_{b,d}$ piran-
4',9-diona.

Otros compuestos que entran dentro del alcance de la fórmula I anterior, incluyen:

cis-1,5'-dihidroxi-1',1',2',6,6-pentametil-3-hexil,6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\Delta_{b,d}$ piran-9-ona

cis-1',2',6,6,-tetrametil-3-hexil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\Delta_{b,d}$ piran-1,5',9-triol.

cis-1',2',6,6-tetrametil-3-pentil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\Delta_{b,d}$ piran-1,4',9-triol.

cis-1',2',6,6-tetrametil-3-pentil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo $\Delta_{b,d}$ piran-1-4'-diol-9-ona y similares.

Los compuestos de conformidad con las fórmulas I ó II anteriores contienen centros asimétricos en 6a, y 10a y en 9, cuando uno de R ó R¹ es hidroxilo y el otro es hidrogeno. Además, pueden ser centros asimétricos en el grupo alquilo de cadena lateral, por ejemplo cuando el grupo es 1,2-dimetilheptilo, están presentes dos centros asimétricos en la cadena lateral en C₁' y C₂'. El procedimiento sintético de Fahrenholtz descrito anteriormente en donde el doble enlace se isomeriza desde la posición Delta ^{6a(10a)} a la posición Delta ^{10(10a)} produce un racemato en donde C_{6a} es asimétrico, estando el hidrógeno ya sea por arriba o por debajo del plano del sistema de dibenzopirano de anillo fundido. La hidrogenación del doble enlace Delta ^{10(10a)} por ejemplo con un metal activo en amoníaco líquido produce un segundo centro asimétrico en C_{10a}, pero el hidrogeno que se agrega a este carbono bajo las condiciones de hidrogenación o reducción, usualmente tomará la configuración trans más favorable con relación al hidrógeno en C_{6a}, produciéndose una cantidad menor de un compuesto de la configuración cis.

1 La reducción del grupo cetona en C₉ produce una mezcla de
isómeros en donde el grupo hidroxilo está en la configura-
ción axial (9 alfa) o ecuatorial (9 beta). De esta manera,
se presentará un compuesto en el cual la cadena lateral no
5 contiene centros asimétricos, por ejemplo 1,9-dihidroxi-3-
(1', 1'-dimetil-heptil)-6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahi-
dro-6H-dibenzo [b,d] pirano.

como cuatro racematos o pares racémicos para dar un total
de 8 estereoisómeros. Los compuestos tales como el 1,9-dihid-
10 droxi-3-(1',2'-dimetilheptil)-6,6-dimetil-6,6a-7,8,10,10a-
hexahidro,6H-dibenzo [b,d] pirano que contiene dos centros
asimétricos adicionales en la cadena lateral tendrá un total
de cinco centros asimétricos, aquellos en 6a, 9, 10a y en
C₁' y C₂' en la cadena lateral, produciendo también 32 isóme-
ros posibles que se presentan como 16 racematos.

15 Los compuestos que tienen un grupo cetona en C₉,
tendrán por supuesto un centro asimétrico menos. Por ejem-
plo, 1 a 1-hidroxi-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,6-dimetil-6,
6a,7,8,10,10a-hexahidro-6H-dibenzo [b,d] piran-9-ona se
20 presentará como 4 estereoisómeros en lugar de 8 con los ana-
logos 9-hidroxi.

Además, el procedimiento de esta invención me-
diante el cual se hidroxila el penúltimo átomo de carbono
de la cadena lateral alquílica produce un carbono asimétri-
co adicional. Esta hidroxilación se cree que es estereoselec-
25 tiva, esto es, uno de los dos isómeros posibles es predomi-
nantemente producido si no es que virtualmente es totalmente
producido.

30 Si el producto final del procedimiento de esta
invención es una cetona de cadena lateral, no habrá un áto-

1 mo asimétrico adicional y el número de estereoisómeros no
cambiará del número presente en el substrato. Los procedi-
mientos de fermentación de esta invención pueden producir
también un centro asimétrico en C₉ mediante reducción de una
5 cetona en C₉ empleada como un substrato, incrementando por
lo tanto uno del número de carbonos asimétricos. Nuevamen-
te, se cree que esta reducción es predominantemente estereo-
específica porque se produce únicamente uno de los isómeros
C₉ hidroxilados; a saber el isómero 9S hidroxilado.

10 Los compuestos de esta invención, de conformidad
con la fórmula I anterior, se preparan como sigue:

15 Se desarrolla un cultivo liofilizado de *Bacillus cereus*, NRRL B-8172 en un medio vegetativo que contiene glu-
cosa, minerales y extracto de levadura más otros ingredien-
tes. El cultivo se transfiere entonces a un matraz más gran-
de que contiene el mismo medio de desarrollo que antes, y
el organismo se incuba nuevamente durante un período de uno
o dos días. El substrato seleccionado puede agregarse al cul-
tivo en este momento o puede prepararse una suspensión de
20 células cosechando las células del medio de desarrollo y re-
suspendiéndolas en un tampón estéril. El substrato se agre-
ga usualmente como una solución de etanol y la fermentación
se lleva a cabo durante un período de 4 a 8 días. Se recu-
peran cualesquiera productos de la conversión más el mate-
25 rial de partida residual extrayendo el medio de cultivo an-
tes o después de la filtración de las células con un disol-
vente inmiscible con el agua tal como acetato de etilo. Los
extractos orgánicos así obtenidos se combinan, se lavan con
tampón, se secan se filtran y después se concentran a se-
30 quedad al vacío. Los productos de la fermentación aislados

1 en este residuo se separan entonces mediante cromatografía en columna.

5 Alternativamente, los sistemas de enzima de oxidación-reducción presentes en las células pueden aislarse mediante lisis de las células, separando los desechos de la celula, mediante filtración y recolectando las enzimas aisladas en el filtrado. Como antes, se agrega el substrato al sistema de conversión en cuyo caso se agita un sistema de enzima aislado en las concentraciones apropiadas y la mezcla de reacción hasta que se forman cantidades substanciales de los productos de conformidad con la fórmula I.

10 Esta invención se ilustra más completamente a través del siguiente ejemplo específico.

EJEMPLO

15 Se desarrolló un aislado de tierra designado como Bacillus cereus NRRL B-8172 (A36659) durante 48-96 horas en un cultivo al sesgo, a una temperatura en la escala de 25 a 30° C. utilizando el siguiente medio: Extracto de carne 1,5 g; peptona 6,0 g; extracto de levadura 3,0 g; agar 20 g; agua desionizada 1 litro. El medio se trató en autoclave durante 15 minutos a 121° C. (1,05 Kg/cm²) antes de empleo. El cultivo se mantuvo en estos sesgos a 4° C. Las células de un cultivo al sesgo de 48-96 horas de edad, se liofilizarón y se almacenarón a 4° C. Las células liofilizadas se utilizarón para inocular un matraz del siguiente medio:

25	Glucosa	30 g.
	Extracto de levadura	1,0 g.
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10g.
	Na ₂ SO ₄	0,5 g.
30	K ₂ HPO ₄	5,0 g.

1	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,4 g.
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,02 g.
	MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0,02 g.
	NaCl	0,02 g.
5	H ₃ BO ₃	0,5 mg.
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,04 mg.
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,2 mg.
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8,0 mg.
	CaCl ₂	0,05 mg.
10	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,2 mg.
	Aguá desionizada	1,0 l.

El pH del medio se ajustó a 7,0 con ácido clorhídrico acuoso concentrado, y se surtió en porciones de 50 a 100 ml. a matraces erlenmeyer de 250 a 500 ml, respectivamente, y cada matraz se tapó con un tapón de algodón. Cada matraz erlenmeyer que contiene el medio, se trató en autoclave como antes. Los matraces en autoclave se inocularon entonces. Después, de la inoculación con un cultivo liofilizado de NRRL B-8172, el matraz de cultivo se incubó a 30°C en un agitador rotatorio (250 rpm de 6,35 cm. de carrera) durante 24-48 horas.

Las células se cosecharon de las fermentaciones anteriores mediante centrifugación a 2300 rpm durante 20-30 minutos a 4°C. El sobrenadante se separó mediante decantación y las células empacadas se lavaron con tampón de fosfato 0,1 molar a un pH de 6-7. Las células lavadas se resuspendieron entonces en un pequeño volumen de tampón a un pH de 7,0 o un tampón similar que contiene 3 % de glucosa. La suspensión resultante se dividió en porciones de 100 ml. a 150 ml. en matraces erlenmeyer estériles de 500 ml. Se agre

1 gó dl-trans-1-hidroxi-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,6-dimetil-
6,6a-7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo [b,d] piran-9-ona
5 (80 mg). disuelta en 1,5 ml de etanol, a cada matraz de la
suspensión de células. Después de la adición, el cultivo se
10 incubó adicionalmente durante de 4 a 8 días. Los matraces
incubados se combinarón y las células y el medio combinados
se extrajerón cuatro veces, cada vez con medio volumen de
acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combi-
narón, se lavarón dos veces con una decima parte de volumen
15 de agua, se secarón y el acetato de etilo se separó median-
te evaporación al vacío. El residuo resultante contuvo cetona
de partida no modificada más una mezcla de cinco produc-
tos de oxidación inducidos a la fermentación de la cetona
de partida. El residuo se sometió a cromatografía líquida a
20 presión elevada, utilizando una columna preempacada de gel
de sílice Merck, equilibrada en cloroformo bajo 0,14-0,42
Kg/cm² de nitrógeno. El residuo se disolvió en un pequeño
volumen de cloroformo y se inyectó a esta columna, la cual
se cromatografió en cargas con mezclas de disolvente que con-
25 tienen concentraciones incrementadas de acetato de etilo.
Se combinarón las fracciones de la columna que mostrarón
contener el mismo producto de conversión del substrato de ce-
tona, por cromatografía en capa delgada. El producto de
conversión contenido ahí fue purificado adicionalmente me-
30 diante cromatografía en capa delgada preparatoria, como si-
gue: el material residual obtenido mediante evaporación de
las fracciones combinadas, a sequedad, se disolvió en aceta-
to de etilo. La solución de acetato de etilo hizo una man-
cha en la placa de capa delgada de gel de sílice utilizando
una muestra de 15-20 mg de placa. Las placas se revelarón en

1 un sistema disolvente de benceno; acetato de etilo 1:1, se-
cado al aire, y se observarán bajo luz ultravioleta para
5 marcar las áreas del producto de conversión. Estas áreas se
eluyeron con cloroformo y acetato de etilo para dar origen
a productos purificados

Las siguientes son operaciones típicas adicionales hechas de conformidad con el procedimiento anterior.

OPERACION 1

10 Substrato: dl-trans-1-hidroxi-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,6-
dimetil-6,6a-7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo [b,d] piran-
9-ona

Cantidad: 160 mg.

Tiempo de incubación: 5 días.

15 Separación: Cromatografía sobre gel de sílice.

Conversión:

<u>Productos</u>	<u>R_f</u>	<u>Disolvente de elución</u>	<u>Peso</u>
A	0,500	CHCl ₃	5,5 mg
C	0,232	CHCl ₃ , 2 % de EtOAc- 98 % de CHCl ₃	10,1 mg
20 D	179	10 % de EtOAc- 90 % de CHCl ₃	17,1 mg

25 Se aislaron también el substrato y dl-trans-1,9-dihidroxi-3-
(1',1'-dimetil-heptil)-6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-
-9H-dibenzo [b,d] pirano (productos de reducción-isómero
6aR, 10aR, 9R del grupo 9-ceto a un alfa-hidroxilo). Los
compuestos A, C y D se aislaron como aceites amarillos.

OPERACION II

Substrato: Igual en que I

30 Cantidad: 320 mg.

1 Tiempo de incubación: 5 días.
Separación: Igual que en I.
Conversión:

Productos

5 A, C, D- Ver I.

B, R_F- 348, eluido con CHCl₃, 17,5 mg

OPERACION III

Substrato: Igual que en I.

Cantidad: 800 mg.

10 Tiempo de incubación 5 días.

Separación Igual que en I.

Conversión:

Productos

15 A, B, C, D

También una cantidad del derivado 1,9-dihidroxi, el producto de reducción del substrato.

COMPUESTO A

20 (±)-trans-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-1-hidroxi-6,6-dimetil-9H-dibenzo[*b,d*]piran-6',9-diona

25 UV (EtOH) Lambda_{máx} 208.230 (resalto) y 280 nm (epsilon= 38 000, 10000 y 200); ir (CHCl₃) 3,04 (OH) y 5,88 micras (C=O); H RMN (CDCl₃) delta 6,77 (s, 1H, cambios con D₂O), 6,34, 6,30 (2d. 1H cada uno, J=2Hz, H₂ y H₄), 4,08 (amplio d, 1H, J=14 Hz, H₁₀ alfa), 3,03-1,02 (3OH) especialmente 2,35 (t, 2H, J=7Hz, H₅'), 2,07 (s. 3H, CH₃C=O), 1,47 (s, 3H, 6beta-CH₃), 1,20 (s, 6H, M gem di-CH₂' s) y 1,11 ppm (s, 3H, 6alfa-CH₃); una determinación de masa exacta dió m/e 386, 2461 (calculado para C₂₄H₃₄O₄, 386,2457).

30 COMPUESTO B

1 (+)-trans-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-1,6'-dihidroxil-6,6-dimetil-9H-dibenzo $\square_{b,d}$ piran-9-
ona UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 207,255 (resalto) y 280 nm (ep-
silon=1.68 00, 4200 y 80). ir (CHCl₃) 3,03 (OH) y 5,90 mi-
5 cras (C=O); ¹H RMN (CDCl₃) delta 6,34 (s, 2H, H₂ y H₄),
4,08 (amplio d, 1H, J= 14Hz, H₁₀ alfa), 3,74(m, 1H, H₆'),
3,02-1,02 (32H) especialmente 1,47 (s, 3H, 6beta-CH₃) 1,20
(s, 6H, gem di-CH₃ s), 1,15 (d, 3H, J=6Hz, CH₃-C-OH) y 1,11
10 ppm (s, 3H, 6alfa-CH₃); \square_{alfa} ²⁵D + 46,3 ω (C₃, CHCl₃);
y una determinación de masa exacta dió m/e 388,2614 (calcu-
lado para C₂₄H₃₆O₄, 388,2613).

COMPUESTO C

15 trans-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-1,
9-dihidroxil-6,6-dimetil-9H-dibenzo $\square_{b,d}$ piran-6'-ona
UV(EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 208,227 (resalto) y 280 nm (epsilon=
19000, 64600 y 80); ir (CHCl₃) 2,98 (OH) y 5,88 micras (C=
0); ¹H RMN (CDCl₃) delta 6,34, 6,28 (2d, 1H cada uno, J=2Hz,
H₂ y H₄); 4,29 (amplio s, 1H, H₉ ecuatorial), 3,27 (amplio
20 d, 1H, J=15Hz, H₁₀ ecuatorial), 3,0-1,02 (32H) especialmente
2,96 (amplio s, 1H, H_{10a}), 2,37 (t, 3H, CH₂-C=O), 2,08 (s,
3H, CH₃-C=O), 1,39 (s, 3H, 6 beta-CH₃) 1,19 (s, 6H, gem di-
CH₃ s), y 1,06 ppm (s, 3H, 6alfa-CH₃) una determinación de
masa-exacta dió m/e 388,2614 (calculado para C₂₄H₃₆O₄,
25 388,2613).

COMPUESTO D

30 trans-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,6a-7,8,10,10a-hexahidro-1,
6',9-trihidroxil-6,6-dimetil-9H-dibenzo $\square_{b,d}$ pirano
UV(EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 208, 225 (resalto) y 275 nm (epsilon=
32000, 7300 y 130); ir (CHCl₃) 2,98 micras (OH); ¹H RMN

1. (CDCl₃) 6,34, 6,31 (2d, 1H cada uno, J=2Hz, H₂ y H₄), 4,28
(amplio s, 1H, H₉ ecuatorial), 3,74 (m, 1H, H₆), 3,25 (am-
plio d, 1H, J=15Hz, H₁₀ecuatorial), 3,02-1,02(33H) especial-
mente 2,96 (amplio s, 1H, H_{10a}), 1,37 (s,3H, 6beta-CH₃),
5 1,19 (s,6H, gem di-CH₃ s), 1,15 (d, 3H, J=6Hz, CH₃CH-OH) y
1,06 ppm (s,3H, 6 alfa-CH₃); y una determinación de masa
exacta dió m/e 390,2769 (calculado para C₂₄H₃₈O₄, 390,2770).

CARACTERIZACION DE BACILLUS CEREUS NRRL B8172

10 Esta bacteria se clasifica como una cepa de Bacillus cereus Frankland y Frankland. Es un batón que forma es-
póras, grande, que promedia 4,7 micras x 1,6 micras y se
presenta en cadenas cortas. Es de gram positivo o gram varia-
ble y no parece ser móvil. Las endósporas son elipsoidales
y se presentan principalmente en forma central a paracentral.
15 Las espóras se producen fácilmente en el transcurso de 18-
24 horas en agar nutritivo. Las espóras son de 0,95 micras x
1,7 micras. Los esporáneos no se hinchan.

20 Las colonias son ligeramente rugosas, irregula-
res, blancuzcas-opacas, con márgenes ondulados. La superfi-
cie de la colonia es roma, careciendo de un lustre distinti-
vo.

25 La temperatura óptima para el desarrollo es de
30 °C. El desarrollo ocurre entre 8° y 37° C. No ocurre desa-
rrollo a 43 °C.

30 En un medio de sales de amonio se produce ácido
pero no gas, de D-glucosa y D-maltosa. No se producen ni el
ácido ni el gas con L-arabinosa, D-manitol y D-xilosa. Este
no produce ni indol ni H₂S. La gelatina se licúa rápidamen-
te en el transcurso de 24 horas, el almidón se hidroliza, la
peptonización de la leche y la producción de ácido son len-

1 tas (6 dias). El cultivo es positivo a la catalasa y pro-
duce acetilmetilcarbinol.

5 Este cultivo difiere de *Bacillus megaterium* por-
que produce acetilmetilcarbinol y porque no produce ácido
del manitol.

10 Según se estableció previamente, el empleo de
otros substratos de conformidad con la fórmula II anterior
por la (\pm)-trans-1-hidroxi-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,6-di-
metil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo \int b,d \int piran-
9-ona tal como (\pm)-trans-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,6-dimetil-
15 6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo \int b,d \int piran-1,9-diol
en la fermentación anterior, produce los cuatro productos
análogos; productos que tienen ya sea una cetona o hidroxilo
en el penúltimo carbono de la cadena lateral y ya sea una
cetona o un hidroxilo en la posición 9 del anillo de diben-
zo \int b,d \int pirano. Similarmente pueden emplearse otros or-
ganismos en lugar de *Bacillus cereus* NRRL B-8172 incluyen-
do organismos tales como *Cunninghamella blakeselleana*, *Cu-*
20 *nninghamella elegans*, *Streptomyces cinnamonus*, *Mucor para-*
siticus, etc.

25 Los compuestos de esta invención son útiles como
analgésicos. Su actividad analgésica se muestra por su capa-
cidad para inhibir la contorsión en los ratones, inducida
por la inyección intraperitoneal de ácido acético. La inhi-
bición de la contorsión analgésica es una prueba de labora-
torio normal para la actividad analgésica. Las DE₅₀ estima-
das (dosis suficientes para inhibir el 50 por ciento de las
contorsiones) para los compuestos anteriores, son las si-
30 guientes: Compuesto A, mayor que 20mg/kg; Compuesto B, 8,0
mg/kg; Compuesto C, 4,2 mg/kg y Compuesto D, 20 mg/kg.

1

Además de su utilidad como analgésicos, algunos de los compuestos de esta invención son útiles como intermediarios para producir otros compuestos de la invención mediante reducción u oxidación. Por ejemplo, el compuesto A, un compuesto que contiene funciones cetona en la posición 9 del sistema de anillo de dibenzo [b,d] pirano y en el penúltimo átomo de carbono, puede reducirse mediante borohidruro de sodio para producir el compuesto D, que contiene hidroxilos en los mismos dos carbonos. Similarmente, los compuestos C y B pueden reducirse para producir el compuesto D.

5

10

15

20

En el empleo de los compuestos de esta invención como analgésicos, el medicamento activo puede mezclarse con un diluyente farmacéuticamente aceptable y la mezcla introducirse en cápsulas de gelatina telescopiables, de manera que cada cápsula contenga una dosis analgésica del medicamento particular. Una persona que requiera de un efecto analgésico puede entonces tomar de una a cuatro de estas cápsulas de una a cuatro veces al día según lo que recete el médico. Pueden también emplearse otras formulaciones farmacéuticas tales como tabletas, suspensiones o similares.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

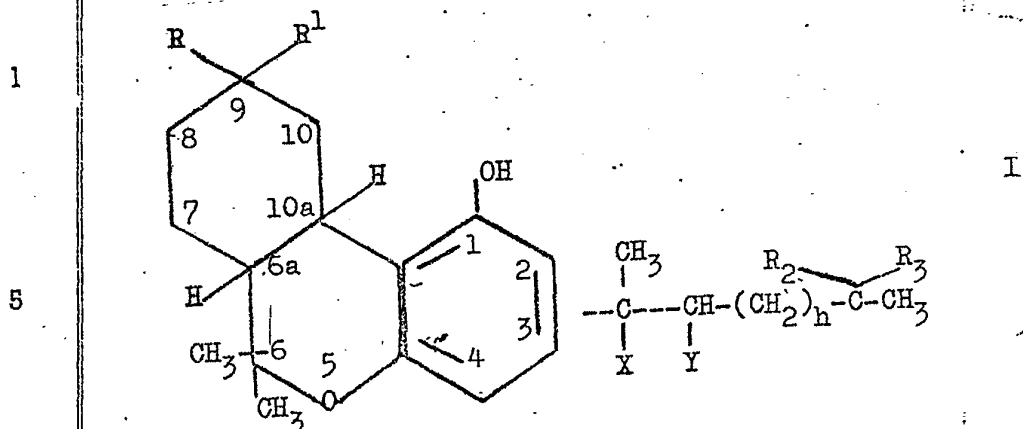
25

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la producción de un compuesto oxigenado de fórmula I

30

M/G

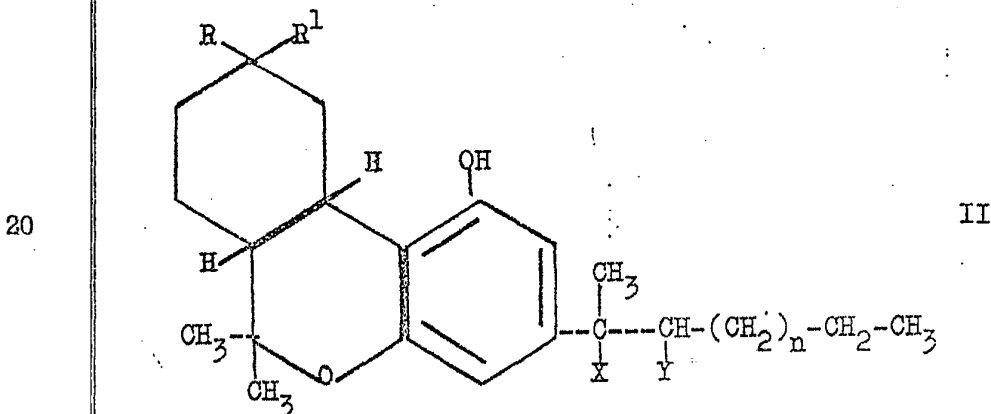


en donde X e Y son ya sea ambos hidrógeno, o uno es hidrógeno y el otro metilo;

10

en donde, cuando se toman individualmente uno del par de R y R¹ y uno del par de R² y R³ es hidrógeno, y el otro es hidroxilo, y cuando se toman conjuntamente, el par de R y R¹ y el par de R² y R³ forman el oxígeno de un grupo de cetona; y en donde n es 1, 2, 3 ó 4, caracterizado por oxigenar un compuesto de fórmula II

15



25

en donde X e Y son ya sea ambos hidrógeno o uno es hidrógeno y el otro metilo, en donde n es 1, 2, 3 ó 4, y en donde, cuando se toman individualmente, uno de R y R¹ es hidrógeno y el otro es hidróxilo y cuando se toman juntos, forman el oxígeno de un grupo cetona, mediante una cepa del microorganismo *Bacillus cereus* para producir un compuesto oxigenado.

30

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por la oxigenación del microorganismo *Bacillus*

MG

1 cereus NRRL B-8172.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el substrato es (+)-trans-1-hidroxi-3-(1',1'dimetilheptil)-6,6-dimetil-6,6a,7,8,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo [b,d] piran-9-ona.

4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el substrato es (+)-trans-3-(1',1'-dimetilheptil)-6,6a,7,9,10,10a-hexahidro-9H-dibenzo [b,d] piran-1,9-diol.

10 5.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN COMPUESTO OXIGENADO.

15 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de veinte páginas mecanografiadas.

Madrid, 8 junio 1.977

BERNARDO UNGRIA

P.P.



20

25

30

