



S.E.-

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

153287

MEMORIA DESCRIPTIVA

para una patente de invención por veinte años, a favor de la r.s.
SCHERING A.G., residente en Berlin (Alemania), Mullerstrasse, 170/172.-

p o r

" PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE CETOSTEROIDES "

999999999999999999999999

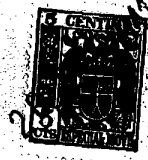
El objeto del presente invento es un procedimiento para preparar cetosteroides, el cual consiste en que esteroides que contienen grupos hidróxilo deshidrogenables, se someten a la acción de medios bioquímicos deshidrogenadores.

5 Para realizar la deshidrogenación bioquímica se ha utilizado el auxilio de ciertos microorganismos, por ejemplo de las bacterias del grupo de las acetobacterias o de los hongos del mohó o el de las enzimas obtenibles de ellos.

10 Se ha comprobado ser especialmente ventajoso el empleo de los llamados fermentos "empobrecidos", como los que se pueden obtener -según Wieland "Anales de Química" t. 492, p. 183 ss. agitando suspensiones de fermentos en agua itoluel con oxígeno.

De los fermentos pueden aislarse mezclas bacterianas deshidrogenantes y de estas mezclas puede cultivarse una especie bacte-

153287 - 2 -



riana que permite la deshidrogenación bioquímica con un efecto especialmente bueno. Esta especie bacteriana se obtiene por ejemplo del siguiente modo:

5 En una mezcla bacteriana deshidrogenante de fermentos milaneses predominan las formas de bacilos o bastoncillos. Estas pueden cultivarse sobre agua de fermentos. En el cultivo puro mediante placas sobre agua de fermentos y agar a 37° (temperatura óptima) junto con grandes colonias blancas superficiales con prolongaciones rizadas se encuentran numerosas colonias más pequeñas, de color amarillo
10 limón, de bordes lisos, en relieve de fuerte brillo hasta de 2 mm de diámetro. Los cultivos puros obtenidos de estas colonias amarillas en agua de fermentos se capacitaron para la hidrogenación, mientras que las colonias grandes blancas contenían esporuladores del tipo bacillus subtilis, que siempre resultaron ineficaces.

15 Los gérmenes obtenidos de las colonias amarillas aparecieron al microscopio como bacilos cortos muy pequeños reunidos parcialmente en cadenas cortas. Nunca pudo observarse la formación de esporas ni movimiento propio. Las propiedades fisiológicas de los gérmenes inducen a contar estos organismos probablemente en la clase de los corynebacterium L. et N. La especie puede colorearse claramente según Gram, aunque no han podido observarse filamentos algo largas, verdadera ramificación, abultamientos esféricos y similares siempre se tenían que apreciar filamentos cortos y ciertas irregularidades de forma. También muchas veces pudieron verse ciertas
25 estrías en la coloración en bandas bien y mal colorables. La especie presenta buen crecimiento en agua de fermentos y en los correspondientes substratos nutritivos de agar y gelatina. Resulta menos conveniente el caldo peptónico preparado con extracto de carne. Es sorprendente el consumo pronunciado de aire de las bacterias y su fuerte poder peptonizante en leche que se coagula sólidamente
30 a 38°C después de tres días. El coágulo se diluye después comenzan-

1 532 87 - 3. -



5 do por arriba y después de unos 14 días se convierte prácticamente por completo en un líquido amarillento casi claro. Los cultivos aerobios en gelatina presentan en el canal aerobio un crecimiento solo moderado, mientras que en la superficie se forma una capa amarilla. La licuación de la gelatina comienza a la temperatura del local después de unos 6 a 7 días y progresa lentamente. Los cultivos agitados en agar y caldo peptónico con 2% de glucosa o de lactosa presentan buen crecimiento en la superficie pero no forman gases. En substratos nutritivos de autolizado de fermentos solo se puede comprobar al principio un pequeño crecimiento o absolutamente ninguno. El cultivo en patata análogamente a los cultivos de agar inclinados, presenta una sedimentación fuerte, amarilla y muy brillante.

15 Todas las indicadas propiedades hablan en favor de una especie de la clase corynebacterium, a saber del corynebacterium helvolum L. et N., de suerte que en lugar de la especie bacteriana obtenida del fermento milanés pueden emplearse especies de corynebacterium helvolum L. et N. cultivadas de otro modo y manera.

20 La deshidrogenación bioquímica se realiza preferentemente en condiciones aerobias o en presencia de aceptores de hidrógeno, como azul de metileno, quinona o similares.

25 A las combinaciones esteroídicas utilizadas como materiales de partida para la deshidrogenación bioquímica pertenecen por ejemplo las esterinas y ácidos gálicos que contienen grupos hidróxilo deshidrogenables y también sus productos de desintegración, combinaciones del tipo de la cortina que contienen grupos hidróxilo deshidrogenables y de los tóxicos cardiacos animales y vegetales. Pueden emplearse además como material de partida combinaciones de la serie del pregnano que contienen grupos hidróxilo deshidrogenables, y también combinaciones de la serie del estrano y del andros-
30 tano que contiene dichos grupos hidróxilo deshidrogenables. De las



combinaciones últimamente señaladas exentas de cadenas laterales señalaremos especialmente las combinaciones como el estradiol, octahidroestrona y las combinaciones no saturadas de la serie del androstano, las combinaciones del androsteno, la dehidroandrosterona y el androstenediol.

Si en el material de partida, además del grupo o de los grupos hidróxilo que se han de deshidrogenar se contienen otros grupos hidróxilo deshidrogenables entonces éstos se pueden proteger en caso necesario del ataque de los medios bioquímicos deshidrogenantes.

El procedimiento de la deshidrogenación bioquímica según el invento resulta especialmente ventajoso en la serie del androsteno, si se le combina con el procedimiento bioquímico de hidrogenación, como se describe por ejemplo en los Berichten, t. 70 p. 470 ss. Así se puede de esta forma llegar por ejemplo en una operación desde la dehidroandrosterona por la androstenediona a la testosterona.

Para este objeto la dehidroandrosterona con auxilio de los fermentos empobrecidos se somete primeramente a la oxidación bioquímica para convertirla en androstenediona y luego a la mezcla de oxidación bioquímica que contiene la androstenediona se agrega un substrato que permite que la reacción bioquímica se realice ahora en el sentido de una reducción. Para esto se prestan por ejemplo aditamentos de hidratos de carbono, productos de desintegración de estos hidratos, como ácido glicerofosfórico y otros muchos.

Para realizar el procedimiento según el invento pueden servir de guía los siguientes ejemplos:

EJEMPLO 1

8 g de fermentos (fermentos floculosos milaneses) se suspenden en 30 cm de agua y se tratan con 10 cm³ de una disolución m/5 de Na₂HPO₄ y 10 cm³ de una disolución m/5 de KH₂PO₄. La suspensión se agita durante 20 horas a 32°C en atmósfera de oxígeno. Luego se

1 532 875. - 2



agregan 190 mg de androstenódiol suspendido en 30 cm³ de agua e inmediatamente la mezcla se sigue agitando otras 47 horas en atmósfera de oxígeno. A continuación la mezcla de reacción se extrae con éter, la disolución etérea se lava con agua, lejía de sosa caústica, ácido clorhídrico n/1 y nuevamente con agua. Después de secar sobre sulfato sódico se evapora a sequedad la disolución etérea.

El residuo se disuelve en 30 cm³ de alcohol, se trata con 3 g de ácido acético cristalizante y 1,5 g de P. reactivo (Girard Helv. Chem. Acta 19, 1095 (1936)) y se calienta a ebullición durante una hora con reflujo. Después de enfriar el conjunto se vierte en 140 cm³ de agua, 60 g de hielo y la cantidad de hidróxido sódico necesaria para neutralizar 2,7 g de ácido acético cristalizante. Luego se extrae tres veces con éter para eliminar la porción privada de grupos ceto.

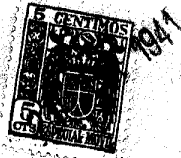
A la disolución acuosa se agregan 20 g de ácido sulfúrico al 50% con lo que se origina un enturbiamiento. Se deja reposar la disolución una hora y se la extrae luego 3 veces con éter, se lava con agua la disolución etérea, se la seca sobre sulfato sódico y se evapora el éter. Si el residuo se mezcla nuevamente con un poco de éter, se le puede obtener en forma cristalina.

Después de recrystalizar el residuo en acetona diluida se obtiene una sustancia con F 168-169°, que se comprueba ser idéntica a la androstenodiona.

EJEMPLO 2

8 g de fermentos (fermentos floculosos milaneses) se suspenden en 30 cm³ de agua, se tratan con 10 cm³ de una disolución m/5 de Na₂ HPO₄ y 10 cm³ de una disolución m/5 de KH₂ PO₄ y durante 20 horas se agitan a 32° en atmósfera de oxígeno. Se agregan luego 200 mg de dehidroandrosterona suspendidos en 30 cm³ de agua y la mezcla se sigue agitando inmediatamente otras 48 horas en atmósfera de oxígeno.

153287-



A continuación se incorpora un disolución de 25 g de invertasa o azúcar invertido en 150 cm³ de agua y la mezcla de reacción se deja reposar durante 3 días a la temperatura del local en un frasco de fermentación.

5 Luego la mezcla de reacción se extrae con éter y la disolución etérea se lava con agua, lejía de sosa caústica, ácido clorhídrico n/l y nuevamente con agua. Después de secar sobre sulfato sódico, se evapora la disolución etérea. El residuo remanente se re-
10 cristaliza en acetona y éter de petróleo. Se obtienen 120 mg de una sustancia de F. 151^a que se comprueba ser idéntica a la testosterona.

Por los métodos de deshidrogenación o de deshidrogenación e hidrogenación según el invento, se logra de modo relativamente sencillo y obteniendo rendimientos relativamente elevados, preparar ce-
15 tosteroides valiosos, a los que hasta ahora sólo se podía llegar por métodos relativamente complicados o con un rendimiento relativamente pequeño.

EJEMPLO 3

20 60 cm³ de agua estéril, de fermentos se amortiguan agregando 10 cm³ de fosfatos sódicos secundarios m/5 y 10 cm³ de fosfato potásico primario m/5, se tratan con 200 mg de dehidroandrosterona finamente pulverizada y durante una hora se esterilizan en la autoclave. Después de enfriar se infecta con algunas gotas de una mezcla bacteriana oxidante recién cultivada en agua de fermentos, como
25 la que puede aislarse del fermento floculoso milanés. La mezcla de reacción se agita luego durante 48 horas a 32° bajo oxígeno. Después se interrumpe el ensayo y se filtra la suspensión. El residuo que queda sobre el filtro se disuelve en alcohol y por filtración se priva de las bacterias. La disolución alcohólica se completa a 20 cm³
30 y poco a poco y agitando se incorpora a un fermento Becker en plena fermentación (elementos: 20 g de fermento Becker, 40 g de sacarosa y

1 532 87 7. -



300 cm³ de agua de cañería). Después de dos días el cultivo se trata con otros 20 g de sacarosa y después de una fermentación continuada en total durante 4 días, se extrae con éter hasta agotamiento. La disolución etérea se lava con lejía de sosa caústica n/l, ácido clorhídrico diluido y agua, se seca sobre sulfato sódico y se concentra por evaporación. El residuo después de redissolver en acetona diluida, proporcionó 162 mg de testosterona pura (punto de fusión de la mezcla) = 155° el cual tampoco varió en el ensayo del punto de fusión de la mezcla.

EJEMPLO 4

60 cm³ de agua estéril de fermentos se amortiguan agregando 10 cm³ de disolución secundaria m/5 de fosfato sódico y 10 cm³ de disolución primaria m/5 de fosfato potásico, se tratan con 200 mg de pregnenolona finamente pulverizada y durante una hora se esterilizan en la autoclave. Después de enfriar se infecta con unas gotas de la mezcla bacteriana recién cultivada en agua de fermentos. Luego la mezcla de reacción se agita bajo oxígeno durante 6 días a 32°. Después se interrumpe el ensayo y se filtra la suspensión. Del residuo remanente sobre el filtro se extrae el producto de reacción hirviéndolo con acetona y luego se separa cristalizado por evaporación. El cristalizado representa una mezcla de pregnenolona y progesterona. La separación de esta mezcla se realiza por ejemplo del modo conocido según Butenandt y Westphal (Berichte de la Sociedad Química Alemana, t. 69, p. 443, 1936).

Para este objeto la mezcla se disuelve con 3 cm³ de cloroformo y 1 1/2 cm³ de piridina absoluta. Después de enfriar la disolución por bajo de 0° se incorpora una mezcla también enfriada de 0,5 cm³ de ácido clorosulfónico y 2 cm³ de cloroformo. El producto de reacción se calienta y luego durante media hora se hierve al baño maría. Después de enfriar se agregan unos 40 cm³ de éter y 20 cm³ de carbonato sódico 2n y se agita fuertemente. La sal sódica

153287.



5 del sulfato ácido de la pregnenolona se precipita, se filtra y se vuelve a lavar con éter. Se reúnen las disoluciones etéreas, se lavan con ácido sulfúrico diluido y agua y luego se evaporan. El residuo se disuelve en alcohol diluido y proporciona 80 mg de pregnenedio-
na.

De la sal sódica del sulfato ácido de pregnenolona se vuelve a obtener unos 80 mg de pregnenolona por disociación con alcohol y ácido sulfúrico 5n (2:1).

EJEMPLO 5

10 60 cm³ de agua estéril de fermentos se amortiguan con 10 cm³ de m/5 Na₂ HPO₄ y 10 cm³ de KH₂ PO₄ primario m/5 y se tratan con 200 g de metilandrostenodiol finamente pulverizado y al baño de va-
por se esteriliza durante una hora. Después de enfriar se infecta con unas gotas de la mezcla bacteriana recién cultivada en agua de
15 fermentos. La mezcla de reacción se agita luego a 32° bajo oxígeno durante 5 días. Después se interrumpe el ensayo y se filtra la sus-
pensión. El residuo remanente sobre el filtro se recoge en acetona y por filtración se priva de las bacterias. La separación de la mez-
cla obtenida después de evaporar la acetona en porciones que contie-
20 nen cetona y en otras que no la contienen, se efectúa por ejemplo mediante el reactivo Girard. Para este objeto se disuelve el residuo en 30 cm³ de alcohol absoluto y se agregan 3 g de ácido acético
cristalizable y 1,5 g de reactivo Girard y después se hierve duran-
te una hora con refrigerante de reflujo. Después de enfriar, la mez-
25 cla de reacción se vierte en 200 cm³ de agua que contenga una cantidad de Na OH calculada para neutralizar 2,7 g de ácido acético. Se extrae luego tres veces con éter y se lava con agua la disolu-
ción etérea, que contiene la porción sin cetona, se seca después con sulfato sódico y se evapora el éter. Por cristalización en ace-
30 tona diluida se obtienen 20 mg de metilandrostenodiol inalterado.

La disolución acuosa del producto obtenido con el reactivo

1 532.87



5 Girard se trata con 10 gr de H_2SO_4 concentrado y después de dos horas se extrae repetidas veces con éter. La disolución etérea se lava luego con agua, se seca con sulfato sódico y se evapora el éter. El residuo después de recristalizado en metanol y acetona diluidos da 150 mg de una sustancia con punto de fusión 163-164° (sin corregir). En mezcla con metiltestosterona no presenta descenso en el punto de fusión.

 N O T A

10 La presente patente de invención consta de las siguientes reivindicaciones:

1.- Un procedimiento para la obtención de cetosteroides, caracterizado porque esteroides que contienen grupos hidróxilo deshidrogenables se someten a la acción de deshidrogenadores bioquímicos.

15 2.- Un procedimiento según lo reivindicado en el punto 1, caracterizado porque como materiales de partida se emplean combinaciones de esteroides privadas de cadenas laterales.

3.- Un procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 y 2, caracterizado porque como materiales de partida se emplean combinaciones no saturadas de la serie del androstano.

20 4.- Un procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 a 3, caracterizado porque la deshidrogenación bioquímica se realiza en condiciones aerobias.

25 5.- Un procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 a 4, caracterizado porque para realizar la deshidrogenación bioquímica se emplean fermentos "empobrecidos".

6.- Un procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 a 4, caracterizado porque para realizar la deshidrogenación bioquímica se emplea una especie bacteriana de la clase de las bacterias coryne, deshidrogenadora y cultivada de fermentos.

153287²⁰



7.- Un procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 a 5, caracterizado porque a continuación de la deshidrogenación bioquímica se realiza una hidrogenación bioquímica.

8.- Un procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 a 6, caracterizado porque la hidrogenación bioquímica se realiza de modo que a una mezcla reaccionante obtenida por deshidrogenación bioquímica mediante fermentos "empobrecidos", se agregue un substrato que permita efectuar ahora la reacción bioquímica en el sentido de una hidrogenación bioquímica.

9.- Un procedimiento según lo reivindicado en el punto 7, caracterizado porque como substrato se agrega un hidrato de carbono.

10.- Un procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 a 8, caracterizado porque como material de partida se emplea dehidroandrosterona.

11.- Un procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 a 8, caracterizado porque en el material de partida, además del grupo o de los grupos hidróxilo que hay que deshidrogenar, se protegen también otros grupos hidróxilo deshidrogenables, convirtiéndolos intermediariamente, por ejemplo mediante esterificación, ete-
rificación, halogenación o similares, en grupos que permiten volver-
se a transformar en grupos hidróxilo.

12.- " PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE CETOESTEROIDES ".-
Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva.

Consta esta memoria de diez hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 20 de Junio de 1941.

153287