

mc/

Caso 5624

227982

227982



-7

6

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

=====

a favor de

MERCK & C^o., INC. - de nacionalidad norteamericana -
domiciliada en RAHWAY (New Jersey, E. U.)

por:

" Procedimiento para la obtención de compuestos este-
roides por fermentación "

====:oOo:====

M e m o r i a D e s c r i p t i v a

Este invento se refiere en general a la producción
de compuestos esteroides valiosos por fermentación. Más
concretamente, atañe a un nuevo método microbiológico para



5 introducir un doble enlace en los átomos C1 y C2 de carbono del núcleo del esteroide, por medio de microorganismos del género Bacillus. De acuerdo con una forma preferida de realización del invento, Δ^4 -3-cetosteroides tales como Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-17 α , 21-diol y Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11 β -17 α , 21-triol se convierten en los correspondientes $\Delta^{1,4}$ -3-cetosteroides, $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,11,20-triona-17 α , 21-diol y $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona-11 β , 17 α , 21-triol, respectivamente. Estos últimos compuestos poseen actividad de cortisona, pero difieren de ésta por estar virtualmente exentos de efectos secundarios, tales como edema, por no producir retención apreciable de sodio o de agua.

10 La preparación de $\Delta^{1,4}$ -3-cetosteroides por medios químicos no ha sido satisfactoria, porque las reacciones químicas implicadas dan mezclas de varios compuestos. La separación de los productos intermedios y finales buscados, de tales mezclas resulta costosa, y proporciona rendimientos escasos de los compuestos $\Delta^{1,4}$ -3-cetosteroides que interesan.

20 Un objeto del presente invento era descubrir un método de un solo tiempo para introducir un doble enlace Δ^1 en compuestos esteroides.

25 Otro objeto era obtener esta desaturación Δ^1 por un método selectivo que produjera la formación de los Δ^1 -esteroides buscados no contaminados por subproductos inoportunos.

30 Otro objeto más era descubrir un método que permitiera producir directamente $\Delta^{1,4}$ -3-cetosteroides de la serie del pregnano, con gran rendimiento, a partir de los correspondientes compuestos Δ^4 -3-cetopregnenos.

Se ha descubierto ahora que la deshidrogenación se-



lectiva Δ^1 de compuestos esteroides se puede conseguir mediante un nuevo procedimiento bacteriológico de deshidrogenación que comprende poner en contacto un compuesto esteroide, en particular no saturado en C5 y oxigenado en 3, con la actividad deshidrogenante de microorganismos del género Bacillus, con preferencia microorganismos pertenecientes a la especie Bacillus sphaericus. Esta especie, según se define en el Manual de Bacteriología Determinativa de Berbey, 6ª edición, comprende diversas variedades, tales como rotans, fusiformis, etc., y, en algunas colecciones, estas variedades se incluyen como especies, B.rotans y B.fusiformis. Estos microorganismos de la especie B.sphaericus pueden obtenerse de fuentes conocidas, como la Colección de cultivos de tipo americano, Washington, D.C., o aislarse de fuentes naturales, por ejemplo, del suelo, por métodos conocidos.

La deshidrogenación se puede efectuar poniendo en contacto el compuesto esteroide con los mismos microorganismos B.sphaericus, o, si se prefiere, con sus sistemas enzimáticos, de modo que el hidrógeno ligado a los átomos de carbono C₁ y C₂ se elimina selectivamente para producir el Δ^1 -esteroide buscado, no contaminado en substancia por subproductos inoportunos. Cuando un compuesto Δ^4 -3-pregнено se somete a la actividad deshidrogenante de microorganismos B.sphaericus, se obtiene directamente y en gran cantidad el correspondiente compuesto $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno.

Aunque este nuevo método bacteriológico de deshidrogenación es aplicable para la deshidrogenación Δ^1 de compuestos 3-cetosteroides, generalmente con independencia de los sustitutos ligados a los anillos B, C y D, o del grado de saturación en los mismos, de ordinario se prefiere utilizar en este método como materias primas compuestos esteroides



no saturados en C5 y oxigenados en 3, de la serie del pregnano, como Δ^4 -3-cetopregnanos, por ejemplo, Δ^4 -pregnen-3,20-diona, Δ^4 -pregnen-3,20-diona-17 α -ol, Δ^4 -pregnen-3,20-diona-21-ol-21-acilato de Δ^4 -pregnen-3,20-diona-21-ol, 21-acetato de Δ^4 -pregnen-3,20-diona-21-ol, Δ^4 -pregnen-3,20-diona-17 α ,21-diol, 21-acilato de Δ^4 -pregnen-3,20-diona-17,21-diol, 21-acetato de Δ^4 -pregnen-3,20-diona-17 α -,21-diol, Δ^4 -pregnen-3,20-diona-17 α -ol-21-al, Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona, Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-17 α -ol, Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-21-ol, 21-acilato de Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-21-ol, 21-acetato de Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-21-ol, Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-17 α ,21-diol, 21-acilato de Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-17 α ,21-diol, 21-acetato de Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-17 α -ol-21-al, Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11 β -ol, Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11 β ,21-diol, 21-acilato de Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11,21-diol, 21-acetato de Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11 β ,21-diol, Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11 β -ol-21-al, Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11 β ,17 α -diol, Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11 β ,17 α ,21-triol, 21-acilato de Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11,17,21-triol, Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11 β ,17 α -diol-21-al, 21-acetato de Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11 β ,17 α ,21-triol; haloderivados en 9 de estos compuestos Δ^4 -3-cetopregnenos, tales como 9-halo- Δ^4 -pregnen-3,20-diona-17,21-diol, 9-fluoro- Δ^4 -pregnen-3,20-diona-17 α ,21-diol, 21-acilato de 9-halo- Δ^4 -pregnen-3,20-diona-17,21-diol, 21-acetato de 9-fluoro- Δ^4 -pregnen-3,20-diona-17 α ,21-diol, 9-halo- Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-17,21-diol, 9-fluoro- Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-17 α ,21-diol, 21-acilato de 9-halo- Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-17,21-diol, 21-acetato de 9-fluoro- Δ^4 -pregnen-3,11,20-triona-17 α ,21-diol, 9-halo- Δ^4 -pregnen-3,20-diona,11,17,21-triol, 9-fluoro- Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11 β ,17 α ,21-triol, 21-acilato de 9-halo- Δ^4 -pregnen-3,20-



diona-11,17,21-triol, 21-acetato de 9-fluoro- Δ^4 -pregnen-3,20-diona-11 β ,17 α ,21-triol, y sus análogos. En vez de Δ^4 -3-cetopregnenos, puedo emplear como materias primas otros compuestos esteroides no saturados en C5 y oxigenados en 3, por ejemplo, Δ^5 -3-hidroxipregnenos tales como Δ^5 -pregnen-20-ona-3-ol, Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17 α -diol, Δ^5 -pregnen-20-ona-3,21-diol, 21-acilato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,21-diol, 21-acetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,21-diol, Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17 α ,21-triol, 21-acilato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17,21-triol, 21-acetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17 α ,21-triol, Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3-ol, Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17 α -diol, Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,21-diol, 21-acilato de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,21-diol, 21-acetato de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,21-diol, Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17 α ,21-triol, 21-acilato de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17 α ,21-triol, 21-acetato de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17 α ,21-triol, Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11 β -diol, Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11 β ,21-triol, 21-acilato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11,21-triol, 21-acetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11 β ,21-triol, Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11 β ,17 α -triol, Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11,17,21-tetrol, 21-acilato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11,17,21-tetrol, 21-acetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11,17 α ,21-tetrol; haloderivados en 9 de estos Δ^5 -3-hidroxipregnenos, tales como 9-halo- Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17,21-triol, 9-fluoro- Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17 α ,21-triol, 21-acilato de 9-halo- Δ^5 -pregnen-20-ona-5,17,21-triol, 21-acetato de 9-fluoro- Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17 α ,21-triol, 9-halo- Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17,21-triol, 9-fluoro- Δ^5 -pregnen-11 β ,20-diona-3,17 α ,21-triol, 21-acilato de 9-halo- Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17,21-triol, 21-acetato de 9-fluoro- Δ^5 -pregnen-11 β ,20-diona-3,17 α ,21-triol, 9-



halo- Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11,17,21-tetrol, 9-fluoro- Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11 β ,17 α ,21-tetrol, 21-acilato de 9-halo- Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11,17,21-tetrol, 21-acetato de 9-fluoro- Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11 β ,17 α ,21-tetrol; y Δ^5 -3-pregnenos (con menos alcanoiloxi), tales como 3-(alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-20-ona-3-ol, 3-acetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3-ol, 3-(alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17-diol, 3-acetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17 α -diol, 3-(alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,21-diol, 3-acetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,21-diol, 3,21-bis (alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,21-diol, 3,21-diacetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,21-diol, 3-(alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17,21-triol, 3-acetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17 α ,21-triol, 3,21-bis (alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17,21-triol, 3,21-diacetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,17 α ,21-triol, 3-(alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3-ol, 3-acetato de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3-ol, 3-(alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17-diol, 3-acetato de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17 α -diol, 3-(alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,21-diol, 3-acetato de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,21-diol, 3,21-bis (alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,21-diol, 3,21-diacetato de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,21-diol, 3-(alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17,21-triol, 3-acetato de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17 α ,21-triol, 3,21-bis (alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17,21-triol, 3,21 diacetato de Δ^5 -pregnen-11,20-diona-3,17 α ,21-triol, 3-(alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11-diol, 3-acetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11 β -diol, 3-(alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11 β ,17-triol, 3-acetato de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11 β ,17 α -triol, 3-(alcanoato inferior) de Δ^5 -pregnen-20-ona-3,11,21-triol, 3-acetato



dos en C5 y oxigenados en 3, puedo utilizar asimismo como materiales de partida 3-cetopregnanos o 3-hidroxipregnanos, tales como pregnan-3,20-diona, pregnan-3,20-diona-17 α -ol, pregnan-3,20-diona-21-ol, pregnan-3,20-diona-17 α ,21-diol, pregnan-3,11-20-triona, pregnan-3,11,20-triona-17 α -ol, 5 pregnan-3,11,20-triona-21-ol, pregnan-3,11,20-triona-17 α ,21-diol, pregnan-3,20-diona-11 β -ol, pregnan-3,20-diona-11 β ,17 α -diol, pregnan-3,20-diona-11 β ,21-diol, pregnan-3,20-diona-11 β ,17 α ,21-triol, pregnan-20-ona-3-ol, pregnan-20-ona-3,17 α -diol, 10 pregnan-20-ona-3,21-diol, pregnan-20-ona-3,17 α ,21-triol, pregnan-11,20-diona-3-ol, pregnan-11,20-diona-3,17 α -diol, pregnan-11,20-diona-3,21-diol, pregnan-11,20-diona-3,17 α ,21-triol, pregnan-20-ona-3,11 β -diol, pregnan-20-ona-3,11 β ,17 α -triol, 15 pregnan-20-ona-3,11 β ,21-triol, pregnan-20-ona-3,11 β ,17 α ,21-tetrol, y para las materias primas enumeradas que contienen radicales hidróxido en las posiciones 3 y/o 21, ésteres 3 y/o 21 de los mismos con ácidos carboxílicos de menos hidrocarburos, tales como los ácidos acético, propiónico, butilacético terciario, benzoico y similares.

20 La deshidrogenación bacteriológica ahora inventada se realiza poniendo en contacto el compuesto esteroide oxigenado en 3 con la actividad deshidrogenante de microorganismos de la especie Bacillus sphaericus. Para ello se puede añadir el compuesto esteroide sólido, o disuelto en un 25 disolvente, por ejemplo, una dialquilcetona, como la acetona, una dialquilformamida, como la demetilformamida, o sus análogos, en condiciones estériles, a un cultivo del microorganismo en un medio nutritivo, y agitar la mezcla resultante, con lo que se desarrolla el microorganismo y se deshidrogena 30 el compuesto esteroide. El esteroide se puede agregar cuando el medio nutritivo se inocula con el cultivo de B.sphaeri-



-7 A B

5 cus, o bien se añadirá a un cultivo ya existente. En lugar de agregar el compuesto esteroide al cultivo existente en el medio nutritivo, la vegetación celular del mencionado cultivo se puede filtrar del caldo, lavar con agua destilada, y suspender en solución acuosa amortiguada que contenga el esteroide oxigenado en 3, y, al agitar la mezcla resultante, se deshidrogena el esteroide para formar el correspondiente Δ^1 -3-esteroide oxigenado en 3. Este último se recupera más fácilmente de este medio que de la
10 mezcla obtenida incubando el esteroide con el microorganismo en el medio nutritivo original. También se puede poner el esteroide oxigenado en 3 en contacto con preparaciones enzimáticas deshidrogenantes tomadas del cultivo de B.sphaericus, para formar así el correspondiente Δ^1 -esteroide oxigenado en 3.
15

Los medios nutritivos empleados para realizar esta deshidrogenación bacteriológica son los utilizados de ordinario en la propagación de microorganismos del género Bacillus. Estos medios comprenden una fuente de nitrógeno y
20 carbono, sales inorgánicas y factores auxéticos. El carbono puede ser suministrado por compuestos tales como acetatos, lactatos y similares. El B.sphaericus no consume en cantidad carbohidratos, que pueden ser incorporados al medio u omitidos sin afectar seriamente a la deshidrogenación de
25 esteroides. El nitrógeno se puede tomar de una sal amónica, aminoácidos o proteínas tales como judías de soya, avena, levadura, extractos de levadura, digestión triptica de caseína, extracto de carne, sangre molida, carne proteínica y
30 raeduras de hueso, harina de salmón, harinas de pescado, materias solubles de pescado y de destilerías, etc. Si se quiere, el bacilo puede propagarse empleando proteínas (o ami-



noácidos) sin ningún carbohidrato en el medio, y en este caso las proteínas o los aminoácidos sirven como fuente del carbono y del nitrógeno requeridos por los microorganismos.

5 Aunque, como se deja indicado, la deshidrogenación del compuesto esteroide oxigenado en 3 se puede efectuar empleando preparaciones enzimáticas deshidrogenantes tomadas del cultivo de B.sphaericus, o poniendo en contacto el esteroide con una suspensión de un cultivo ya existente en agua destilada, se prefiere comúnmente añadir el esteroide 10 oxigenado en 3 a un medio nutritivo que contenga un cultivo de 24 horas de B.sphaericus. La proporción del compuesto esteroide que se puede agregar al medio varía según los substratos sometidos a deshidrogenación, pero habitualmente se prefiere emplear una concentración aproximada de 0,005% a 0,2 15 % del esteroide oxigenado en 3, aunque pueden emplearse concentraciones más altas o más bajas, si se quiere. El cultivo que contiene el esteroide 3-oxigenado añadido se incuba entonces, mejor con agitación y aireación, durante un período adicional, que suele variar entre diez y cincuenta horas, 20 si bien pueden convenir lapsos de fermentación más breves o más largos para la deshidrogenación de determinados substratos de 3-cetoesteroides. Teniendo en cuenta que fermentaciones prolongadas pueden acarrear la destrucción del Δ^1 -3-cetosteroide, se prefiere comúnmente emplear un tiempo de 25 fermentación aproximado de 10 a 24 horas, que, según el substrato de esteroide, ha dado por resultado rendimientos máximos del esteroide de Δ^1 -deshidrogenado.

30 Después de terminado el proceso de deshidrogenación, el producto se recupera convenientemente del caldo fermentado mediante extracción con un disolvente no miscible con agua, por ejemplo, con un hidrocarburo clorado, como cloro-



5 formo, una cetona, que puede ser metilisobutilcetona, un
alcanoato de alquilo, como acetato de etilo, o sus análogos.
El extracto de esteroide Δ^1 -deshidrogenado y el material
de partida sin reaccionar, se purifica convenientemente
por cromatografía, empleando gel de sílice, alúmina
activada o sus similares, o, si se quiere, por medio de cromatogramas
descendentes sobre papel. Después de separar el producto
deshidrogenado del material de partida sin reaccionar,
el producto se puede purificar más, si se quiere,
10 por recristalización a partir de un disolvente como acetato
de etilo, acetato de etilo con éter de petróleo, y sus similares.

De conformidad con este método de deshidrogenación
bacteriológica, y utilizando los esteroides no saturados en
15 C5 y oxigenados en 3 ya enumerados, se obtienen $\Delta^{1,4}$ -3-
cetopregnadienos tales como $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona,
 $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona-17 α -ol, $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-
diona,21-ol, $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona-17 α ,21-diol, $\Delta^{1,4}$ -
pregnadien-3,20-diona-17 α -ol-21-al, $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,11,20-
20 triona, $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,11,20-triona-17 α -ol, $\Delta^{1,4}$ -pregna-
dien-3,11,20-triona-21-ol, $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,11,20-triona-
17 α ,21-diol, $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,11,20-triona-17 α -ol-21-al,
 $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona-11 β -ol, $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-
diona-11 β -ol-21-al, $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona-11 β ,21-diol,
25 $\Delta^{1,4}$,pregnadien-3,20-diona-11 β ,17 α -diol, $\Delta^{1,4}$,pregnadien-
3,20-diona-11 β ,17 α ,21-triol; 9-halo- $\Delta^{1,4}$ -pregnadienos,
tales como 9-halo- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona-17,21-diol,
9-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona-17 α ,21-diol, 9-halo-
 $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona-17,11,21-triol, 9-halo- $\Delta^{1,4}$ -
pregnadien-3,11,20-triona-17,21-diol, 9-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregna-
30 dien-3,11,20-triona-17 α ,21-diol, 9-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-
3,20-diona-11 β ,17 α ,21-triol, y otros análogos.



Los siguientes ejemplos ilustran métodos de llevar a la práctica el presente invento, pero debe entenderse que estos ejemplos son simplemente ilustrativos, y no limitativos.

EJEMPLO 1º.-

5

Se preparan 50 ml. de un medio nutritivo con la siguiente composición:

- Cerelesa 1 g.
- Edamina 1 g.
- Líquido de macerar maíz 0,25 ml.
- 10 Extracto de levadura 0,05 g.
- Agua destilada, c.s. para 50 ml.

15

Este medio se ajusta a un pH 6,5 con KOH, se esteriliza, y se inocular con unos 2,5 a 5 ml. de un cultivo obtenido incubando Bacillus sphaericus (MB431) en el mismo medio durante 24 horas a 28°C; el cultivo inoculado se incuba luego a una temperatura de 28°C, agitando, por espacio de 24 horas. Al cultivo resultante se añade una solución que contiene 10 mg. de hidrocortisona (Δ^4 -pregnen-11 β ,17 α ,21-

20

El cultivo que contiene el esteroide se incuba, agitando, durante otro lapso de unas diez horas a 28°C.

25

El caldo de fermentación se extrae con tres porciones de 50 ml. de acetato de etilo, y los extractos resultantes se combinan y evaporan en vacío hasta reducirlos a un volumen aproximado de 5 ml. La solución concentrada se emplea luego para preparar cromatogramas de papel listado, que se revelan con formamida como fase líquida estacionaria, y cloroformo como fase líquida móvil. Se obtienen dos ban-

30

das, una de ellas (correspondiente al componente más móvil), muestra la característica de adsorción máxima de rayos ultravioleta de la hidrocortisona, mientras que la otra indica



un máximo de adsorción ultravioleta a 242 mu. aproximada-
mente. El cromatograma sobre papel se seca, y la banda que
corresponde a la adsorción de 242 mu. se separa y se extrac-
ta con metanol. El material así extractado se somete de
5 nuevo a cromatografía en papel listado, utilizando papel
extractado durante 48 horas con metanol, y empleando el sis-
tema cloroformo-formamida utilizado antes. El cromatogra-
ma resultante muestra sólo una banda de indicios que corres-
ponde al material inicial de hidrocortisona, con la banda
10 mayor dotada de una adsorción ultravioleta máxima de 242 mu.
El cromatograma de papel se seca bien, y la banda que co-
rresponde al máximo de adsorción de 242 mu. se recorta y
se extracta con metanol. El extracto metanólico se evapora
hasta sequedad en vacío, para obtener $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β ,
15 17 α , 21-triol-3, 20-diona.

EJEMPLO 2º.-

Se preparan 20 litros de un medio nutritivo de la
siguiente composición:

	Cerelesa	400 g.
20	Edamina	400 g.
	Líquido de macerar maíz	100 ml.
	Extracto de levadura	20 g.
	Agua destilada, c.s. para	20 l.

Este medio se ajusta a un pH 6,5 con KOH, se este-
25 riliza, y se inocular con alrededor de 1 litro de un cultivo
de 24 horas del microorganismo B.sphaericus (MB431). El
cultivo inoculado se incuba a una temperatura de 28°C, con
agitación, por espacio de unas 24 horas, y al cultivo resul-
tante se agrega una solución de 4 g. de hidrocortisona en
30 40 ml. de dimetilformamida. El cultivo que contiene el es-
teroiide se incuba, agitando, por un lapso adicional de unas



diez horas a 28°C.

El caldo de fermentación se extracta repetidas veces con acetato de etilo, y los extractos resultantes se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. Una muestra del material remanente se disuelve en acetona, y con la solución se salpica un cromatograma sobre papel, que se revela empleando formamida como fase estacionaria y cloroformo como fase móvil. Se obtienen de este modo dos bandas distintas; la inferior, que corresponde a hidrocortisona no alterada, se separa, y la otra, que corresponde al Δ^1 -deshidroderivado, se separa igualmente y se elúe con metanol. El análisis de adsorción ultravioleta de este eluente metanólico muestra que la banda superior contiene una cantidad de $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11,17,21-triol-3,20-diona que corresponde a un rendimiento total aproximado de 1 g., basado en los 4 g. del material de hidrocortisona primitivo.

La parte principal del material remanente obtenida después de evaporar el extracto de acetato de etilo, se somete a reparto entre metanol acuoso al 70% y éter de petróleo, con lo que se eliminan impurezas oleosas de la fase éter de petróleo. El metanol se separa por evaporación de la fase de metanol acuoso en vacío, y el líquido turbio remanente se extracta con acetato de etilo. El extracto resultante se evapora hasta sequedad en vacío, y el residuo se disuelve en acetona y se somete a cromatografía sobre papel listado utilizando formamida como fase estacionaria y cloroformo como fase móvil. La banda superior, que corresponde al Δ^1 -deshidroderivado, se separa, se extracta con metanol, y el material así extractado se somete de nuevo a cromatografía sobre papel listado. Se recorta de nuevo la banda superior, se seca bien, se extracta con metanol, y el extracto



metanólico se evapora hasta sequedad en vacío. El material remanente se recristaliza en acetato de etilo y éter de petróleo, para obtener unos 200 mg. de $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β , 17 α , 21-triol-3, 20-diona substancialmente puro, con punto de fusión a 222-228°C.

EJEMPLO 3^a.

Se preparan 20 litros de un medio nutritivo de la siguiente composición:

	Cerelesa	400 g.
10	Edamina	400 g.
	Líquido de macerar maíz	100 ml.
	Extracto de levadura	20 g.
	Agua destilada, c.s. para	20 l.

Este medio se ajusta a un pH 6,5 con KOH, se esteriliza, y se inocula con alrededor de 1 litro de un cultivo de 24 horas del microorganismo Bacillus sphaericus (MB431). El cultivo inoculado se incuba a una temperatura de 28°C, agitando, por un período aproximado de 24 horas, y al cultivo resultante se añade una solución que contiene 4 g. de cortisona disueltos en 40 ml. de dimetilformamida. El cultivo que contiene el compuesto esteroide se incuba, agitando, durante otro lapso aproximado de diez horas a 28°C.

El caldo de fermentación se extracta repetidamente con acetato de etilo, y los extractos resultantes se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. El análisis de una muestra de este material remanente por cromatografía sobre papel, seguido de determinación de la adsorción ultravioleta del material contenido en las dos bandas distintas reveladas en el cromatograma, informan que el referido material contiene alrededor de 3 g. de cortisona no alterada, y aproximadamente 1 g. de $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17 α , 21-diol-



3,11,20-triona.

La mayor parte del material remanente obtenido después de evaporar el extracto de acetato de etilo se somete a reparto entre metanol acuoso al 70% y éter de petróleo, eliminando así las impurezas oleosas de la fase de éter de petróleo. El metanol se evapora de su fase acuosa en vacío, y el líquido turbio remanente se extracta con acetato de etilo. El extracto resultante se evapora hasta sequedad en vacío, y el material, que queda se somete a cromatografía sobre papel listado (empleando acetona como disolvente para transportar ese material en forma de rayas sobre papel), y se utiliza formamida como fase estacionaria y benceno como fase móvil para revelar el cromatograma. La banda superior, que corresponde al Δ^1 -deshidroderivado, se separa, se extracta con metanol, y el extracto metanólico se somete de nuevo a cromatografía sobre papel listado. La banda superior se separa de nuevo, se seca bien, se extracta con metanol, y el extracto metanólico se evapora hasta sequedad en vacío. El material remanente se recristaliza en acetato de etilo y éter de petróleo, para obtener unos 250 mg. de $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17 α ,21-diol-3,11,20-triona substancialmente pura, con punto de fusión a 232-236°C.

EJEMPLO 4º.-

Se preparan 20 litros de un medio nutritivo de la siguiente composición:

Cerelesa	400 g.
Edamina	400 g.
Líquido de macerar maíz	100 ml.
Extracto de levadura	20 g.
Agua destilada, c.s. para	20 l.

Este medio se ajusta a un pH 6,5 con KOH, se este-



riliza, y se incula con alrededor de 1 litro de un cultivo de 24 horas del microorganismo Bacillus sphaericus (MB431). El cultivo inoculado se incuba a una temperatura de 28°C, con agitación, por espacio de unas 24 horas, y al cultivo resultante se añade una solución de 4 g. de Δ^4 -pregnen-17 α ,21-diol-3,20-diona en 40 ml. de dimetilformamida. El cultivo que contiene el compuesto esteroide se incuba agitando, durante unas diez horas, a 28°C.

El caldo de fermentación se extrae repetidamente con acetato de etilo, y los extractos obtenidos se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. El material remanente se somete a reparto entre metanol acuoso al 70% y éter de petróleo, eliminando así impurezas oleosas solubles en la fase de éter de petróleo. El metanol se separa por evaporación de la fase de metanol acuoso, en vacío, y el líquido turbio que queda se extrae con acetato de etilo. El extracto resultante se evapora hasta sequedad en vacío, y el material que queda se disuelve en acetona y se raya sobre cromatogramas de papel, que se revelan empleando formamida como fase estacionaria y benceno como fase móvil. Las bandas superiores de cada cromatograma, que corresponden al Δ^1 -des-hidroderivado, se separan, se extractan con metanol, y el material así extraído se evapora hasta sequedad en vacío. El material remanente se recristaliza en acetato de etilo y éter de petróleo, para obtener $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17 α ,21-diol-3,20-diona substancialmente puro, que funde a 230-236°C.

EJEMPLO 52.-

Se preparan 20 litros de un medio nutritivo de la siguiente composición:

30	Cerelesa	400 g.
	Edamina	400 g.



Líquido de macerar maíz	100 ml.
Extracto de levadura	20 g.
Agua destilada, c.s. para	20 l.

5 Este medio se ajusta a un pH 6,5 con KOH, se esteriliza y se inocula con alrededor de un litro de un cultivo de 24 horas del microorganismo Bacillus sphaericus (MB431). El cultivo inoculado se incuba a una temperatura de 28°C, agitando, durante unas 24 horas, y al cultivo resultante se añade una solución de 4 g. de 9-fluoro- Δ^4 -pregnen-11 β ,17 α ,21-triol-3-,20-diona en 40 ml. de dimetilformamida. El cultivo
10 que contiene el compuesto esteroide se incuba con agitación, por espacio de diez horas, a una temperatura de 28°C.

El caldo de fermentación se extrae repetidamente con acetato de etilo, y los extractos obtenidos se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. El material remanente se reparte entre metanol acuoso al 70% y éter de petróleo, eliminando así impurezas oleosas solubles en la porción de éter de petróleo. El metanol se retira por evaporación de su fase acuosa en vacío, y el líquido turbio que queda se extrae
15 con acetato de etilo. El extracto resultante se evapora hasta sequedad en vacío, y el residuo se disuelve en acetona y se raya sobre cromatogramas de papel, que se revelan empleando formamida como fase estacionaria y cloroformo como fase móvil. Las bandas superiores de cada cromatograma, que corresponden al Δ^1 -deshidroderivado, se separan, se extractan
20 con metanol, y el extracto obtenido se somete de nuevo a cromatografía sobre papel rayado. Se separa de nuevo la banda superior, se seca bien, se extrae con metanol, y el extracto se evapora hasta sequedad en vacío. El residuo se re-
25 cristaliza en acetato de etilo y éter de petróleo, para obtener 9-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona
30



substancialmente pura; acetilando este material con anhídrido acético en piridina, se obtiene 21-acetato de 9-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona, con punto de fusión a 236°C.

5

EJEMPLO 6^o.--

Se preparan 20 litros de un medio nutritivo de la siguiente composición:

	Cerelesa	400 g.
	Edamina	400 g.
10	Líquido de macerar maíz	100 ml.
	Extracto de levadura	20 g.
	Agua destilada, c.s. para	20 l.

Este medio se ajusta a un pH 6,5 con KOH, se esteriliza, y se inocula con alrededor de un litro de un cultivo de 24 horas del microorganismo Bacillus sphaericus (MB431). El cultivo inoculado se incuba a una temperatura de 28°C, agitando, por espacio de unas 24 horas, y al cultivo resultante se añade una solución de 4 g. de Δ^4 -pregnen-11 β ,21-diol-3,20-diona en 40 ml. de dimetilformamida. El cultivo que contiene el compuesto esteroide se incuba, con agitación, durante unas diez horas, a una temperatura aproximada de 28°C.

El $\Delta^{1,4}$ -esteroide formado por la actividad deshidrogenante del Bacillus sphaericus se extrae del caldo de fermentación con acetato de etilo, y se purifica empleando en lo esencial el mismo método explicado en el ejemplo 4^o precedente, que comprende: 1^o, reparto entre éter de petróleo y metanol, para eliminar las impurezas oleosas solubles en el éter de petróleo; cromatografía de rayas sobre papel, utilizando formamida como fase estacionaria y benceno como fase fija; y 3^o, recristalización en acetato de etilo y éter

30



de petróleo, para obtener $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β ,21-diol-3,20-diona substancialmente pura, con punto de fusión a 231-234°C.

EJEMPLO 7º.-

5 Se preparan 20 litros de un medio nutritivo de la siguiente composición:

- Cerelesa 400 g.
- Edamina 400 g.
- Líquido de macerar maíz 100 ml.
- 10 Extracto de levadura 20 g.
- Agua destilada, c.s. para 20 l.

Este medio se ajusta a un pH 6,5 con KOH, se esteriliza, y se inocula con alrededor de un litro de un cultivo de 24 horas del microorganismo Bacillus sphaericus (MB431). El cultivo inoculado se incuba a una temperatura de 28°C, con agitación, por un período aproximado de 24 horas, y al cultivo resultante se añade una solución de 4 g. de Δ^4 -pregnen-21-ol-3,20-diona en 40 ml. de dimetilformamida. El cultivo que contiene el compuesto esteroide se 15 incuba con agitación, durante unas diez horas, a una temperatura de 28°C aproximadamente.

El caldo de fermentación se extracta repetidamente con acetato de etilo, y los extractos obtenidos se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. El residuo se somete 25 a reparto entre metanol acuoso al 70% y éter de petróleo, eliminando así impurezas oleosas solubles en la fase de éter de petróleo. El metanol se evapora de su fase acuosa en vacío, y el líquido turbio que queda se extracta con acetato de etilo. El extracto resultante se evapora hasta sequedad en vacío, y el residuo se disuelve en acetato y se 30 raya sobre cromatogramas de papel, que se revelan empleando



metanol al 50% con formamida como fase estacionaria y benceno al 50% con cliclohexano como fase móvil. Se separan las bandas superiores de cada cromatograma, que corresponden al Δ^1 -deshidroderivado, se extractan con metanol, y el extracto se vuelve a someter a cromatografía sobre papel rayado. Se vuelve a separar la banda superior, se seca bien, se extracta con metanol, y el extracto metanólico se evapora hasta sequedad en vacío. El residuo se recristaliza en acetato de etilo y éter de petróleo, para obtener $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-21-ol-3,20-diona substancialmente pura, que funde a 191-193°C.

EJEMPLO 8º.-

Se preparan 50 ml. de un medio nutritivo de la siguiente composición:

15	Cerelesa	1 g.
	Edamina	1 g.
	Líquido de macerar maíz	0,25 ml.
	Extracto de levadura	0,05 g.
	Agua destilada, c.s. para	50 ml.

Este medio se ajusta a un pH 6,5 con KOH, se esteriliza, y se inocula con unos 2,5 a 5 ml. de un cultivo obtenido incubando Bacillus sphaericus (MB431) en el mismo medio durante 24 horas, a 28°C; el cultivo inoculado se incubaba luego a una temperatura de 28°C, agitando, por espacio de 24 horas. Al cultivo resultante se añade una solución que contiene 10 mg. de Δ^4 -pregnen-11 β -ol-3,20-diona en 0,1 ml. de dimetilformamida. El cultivo que contiene el compuesto esteroide se incubaba, con agitación, durante unas diez horas a 28°C.

El caldo de fermentación se extracta con tres porciones de 50 ml. de acetato de etilo, y los extractos obte-



nidos se reúnen y evaporan en vacío hasta reducirlos a unos 5 ml. de volumen. La solución concentrada se emplea entonces para preparar cromatogramas de papel rayado, que se revelan empleando metanol al 50% con formamida como fase líquida estacionaria y 50% de benceno con ciclohexano como fase líquida móvil. Se obtiene así dos bandas, una de las cuales (que corresponde al componente más móvil) muestra la característica máxima de adsorción ultravioleta de la 11 β -hidroxiprogesterona, y la otra (el componente menos móvil) denota un máximo de adsorción ultravioleta a unos 241 mu. El cromatograma de papel se seca, y la banda que corresponde al componente menos móvil se separa y se extracta con metanol. El material así extraído se somete de nuevo a cromatografía sobre papel rayado, utilizando el sistema disolvente antes utilizado. El cromatograma resultante muestra sólo una banda de indicios que corresponde a la 11 β -hidroxiprogesterona de partida. El cromatograma de papel se seca bien; la banda superior, con un máximo de adsorción ultravioleta de 241 mu., se separa y se extracta con metanol, y el extracto metanólico se evapora hasta sequedad en vacío, para obtener $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β -ol-3,20-diona.

EJEMPLO 2º.-

Se preparan 20 litros de un medio nutritivo de la siguiente composición:

25	Cerelesa	400 g.
	Edamina	400 g.
	Líquido de macerar maíz	100 ml.
	Extracto de levadura	20 g.
	Agua destilada, c.s. para	20 l.

30 Este medio se ajusta a un pH 6,5 con KOH, se esteriliza, y se incula con alrededor de un litro de un cultivo



de 24 horas del microorganismo Bacillus sphaericus (MB431). El cultivo inoculado se incuba a una temperatura de 28°C, agitando, durante unas 24 horas, y al cultivo resultante se añade una solución de 4 g. de Δ^4 -pregnen-3,20-diona en 40 ml. de dimetilformamida. El cultivo que contiene el compuesto esteroide se incuba, con agitación, durante unas diez horas a 28°C aproximadamente.

El caldo de fermentación se extracta repetidamente con acetato de etilo, y los extractos obtenidos se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. El residuo se reparte entre metanol acuoso al 70% y éter de petróleo, eliminando así impurezas oleosas solubles en la fase de éter de petróleo. El metanol se evapora de su fase acuosa en vacío, y el líquido turbio remanente se somete a extracción con acetato de etilo. El extracto así obtenido se evapora hasta sequedad en vacío, y el residuo se disuelve en acetona y se raya sobre cromatogramas de papel, que se revelan empleando metanol al 50% con formamida como fase estacionaria y benceno al 50% con ciclohexano como fase móvil. Se separan las bandas superiores de cada cromatograma, que corresponde al Δ^1 -deshidroderivado, se extractan con metanol, y el material extraído se somete de nuevo a cromatografía sobre papel rayado. Se separa de nuevo la banda superior, se seca bien, se extracta con metanol, y el extracto metanólico se evapora hasta sequedad en vacío. El residuo se recristaliza en acetato de etilo y éter de petróleo, para obtener $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona substancialmente pura, que funde a 148-150°C.

EJEMPLO 10.-

Se preparan 20 litros de un medio nutritivo de la siguiente composición:



	Cerelesa	400 g.
	Edamina	400 g.
	Líquido de macerar maíz	100 ml.
	Extracto de levadura	90 g.
5	Agua destilada, c.s. para	20 l.

Este medio se ajusta a un pH 6,5 con KOH, se esteriliza, y se inocula con alrededor de un litro de un cultivo de 24 horas del microorganismo Bacillus sphaericus (MB431).

10 El cultivo inoculado se incuba a una temperatura de 28°C, agitando, por espacio de unas 24 horas, y al cultivo resultante se agrega una solución de 4 g. de Δ^5 -pregnen-3-ol-20-ona en 40 ml. de dimetilformamida. El cultivo que contiene el compuesto esteroide se incuba, con agitación, durante unas diez horas, a una temperatura aproximada de 28°C.

15 El caldo de fermentación se extrae repetidamente con acetato de etilo, y los extractos obtenidos se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. El residuo se reparte entre metanol acuoso al 70% y éter de petróleo, eliminando así impurezas oleosas solubles en la fase de éter de petróleo. 20 El metanol se evapora de su fase acuosa en vacío, y el líquido turbio remanente se extrae con acetato de etilo. El extracto obtenido se evapora hasta sequedad en vacío, y el residuo se disuelve en acetona y se raya sobre cromatogramas de papel, que se revelan empleando metanol al 50% con 25 formamida como fase estacionaria y benceno al 50% con ciclohexano como fase móvil. Se separan las bandas superiores de cada cromatograma, que corresponden al Δ^1 -deshidroderivado, se extractan con metanol, y el material extraído se somete de nuevo a cromatografía sobre papel rayado. Se separa nueva- 30 mente la banda superior, se seca bien, se extrae con metanol, y el extracto se evapora hasta sequedad en vacío. El



residuo se recristaliza en acetato de etilo y éter de petróleo, para obtener $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona substancialmente pura, con punto de fusión a 148-150°C.

EJEMPLO 11.-

5 Porciones de 50 ml. de siete diferentes medios nutritivos, con las composiciones expuestas en la adjunta tabla, se ajusta a un pH 7, se esterilizan calentando durante quince minutos en autoclave, a unos 120°C, y cada medio nutritivo se inocula con un cultivo de Bacillus sphaericus
10 (MB431). Los cultivos inoculados se incuban a una temperatura de 28°C, agitando, por espacio de unas 24 horas, y a cada uno de los cultivos resultantes se añade una solución de 10 mg. de hidrocortisona en 0,1 ml. de dimetilformamida. Los cultivos que contienen la hidrocortisona se incuban
15 luego, agitando, durante otro período aproximado de 24 horas, a 28°C.

Cada uno de los caldos de fermentación así obtenidos se extracta con tres porciones de 50 ml. de acetato de etilo, y los extractos resultantes que corresponden a cada caldo
20 y provienen de un medio nutritivo particular se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. Cada uno de los siete residuos se somete a análisis polarográfico, midiendo la semionda a 1,52 v., para determinar su contenido en $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona. La composición de los medios
25 utilizados, y la cantidad de este cuerpo (Δ^1 -hidrocortisona) obtenida con cada uno de los medios nutritivos, expresada en proporción a la obtenible en teoría de los 10 mg. de hidrocortisona primitiva, se expone en la tabla siguiente:



Núm.	Composición del medio	Rendimiento en Δ^1 -hidrocortisona (% del teórico)
	1 La misma del ejemplo 1 ^o	37%
	2 2% solubles de destilar	37%
5	3 2% de hidrolizado HCl de caseína	44%
	4 1% de líquido de macerar maíz 1% de harina de judías de soya	31%
	5 2% de harina de pescado	30%
	6 2% de líquido de macerar maíz	34%
10	7 2% de residuos de grasas	26%

EJEMPLO 12.-

Una porción de 10 mg. de Δ^4 -pregnen-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona se pone en contacto con la actividad deshidrogenante de microorganismos Bacillus sphaericus (MB431), y el producto deshidrogenado se aísla conforme al procedimiento descrito para deshidrogenar Δ^4 -pregnen-11 β -ol-3,20-diona en el ejemplo 6^o, obteniendo así $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona.

EJEMPLO 13.-

Una porción de 10 mg. de Δ^4 -androgen-3,20-diona se pone en contacto con la actividad deshidrogenante del Bacillus sphaericus (MB431), y el producto deshidrogenado se aísla de conformidad con el procedimiento descrito para deshidrogenar Δ^4 -pregnen-11 β -ol-3,20-diona en el ejemplo 8^o, obteniendo así $\Delta^{1,4}$ -androstadien-3,20-diona.

EJEMPLO 14.-

Una porción de 50 ml. del medio de edamina descrito en el ejemplo 8^o se ajusta a un pH 7, se esteriliza calentando durante quince minutos en autoclave a unos 120°C, y el medio esterilizado se inocula con Bacillus sphaericus (ATCC245). El cultivo inoculado se incuba a una temperatura



de 28°C, con agitación, por espacio de unas 24 horas, y al cultivo resultante se añade una solución de 10 mg. de hidrocortisona en 0,1 ml. de dimetilformamida. Los cultivos que contienen la hidrocortisona se incuban luego, agitando, durante otras diez horas aproximadamente, a 28°C.

El caldo de fermentación así obtenido se extracta con tres porciones de 50 ml. de acetato de etilo, y estos extractos se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. El residuo resultante se somete a análisis polarográfico para medir la semionda a 1,52 voltios, y da un contenido en $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β ,17 α ,21-triol, 3,20-diona que corresponde a un rendimiento de más de 50% del obtenido en teoría a partir de los 10 mg. de hidrocortisona primitivos.

EJEMPLO 15.-

Una porción de 50 ml. del medio de edamina descrito en el ejemplo 8^o se ajusta a un pH 7, se esteriliza calentando quince minutos en autoclave, a unos 120°C, y el medio esterilizado se inocula con Bacillus sphaericus (ATCC7054) var. fusiformis, denominada a veces Bacillus fusiformis. El cultivo inoculado se incuba a una temperatura de 28°C, con agitación, durante unas 24 horas, y al cultivo resultante se añade una solución de 10 mg. de hidrocortisona en 0,1 ml. de dimetilformamida. Luego se incuba el cultivo que contiene la hidrocortisona, agitando, durante otro período de unas diez horas, a 28°C.

El caldo de fermentación así obtenido se extracta con tres porciones de 50 ml. de acetato de etilo, y los extractos obtenidos se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. El residuo se analiza por polarografía, para medir la semionda a 1,52 volts, y resulta contener una cantidad de $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona que corresponde a un



rendimiento de más de 50% del teórico obtenible de los 10 mg. primitivos de hidrocortisona.

EJEMPLO 16.-

5 Una porción de 50 ml. del medio de edamina descrito en el ejemplo 8^o se ajusta a un pH 7, se esteriliza calentando por espacio de quince minutos en autoclave a unos 120°C, y el medio esterilizado se inocula con Bacillus sphaericus (ATCC7055) var. fusiformis, a veces denominada Bacillus fusiformis. El cultivo inoculado se incuba a una temperatura de 10 28°C, con agitación, por espacio de unas 24 horas, y al cultivo resultante se agrega una solución de 10 mg. de 9-fluoro- Δ^4 -pregnen-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona en 0,1 ml. de dimetilformamida. El cultivo que contiene el compuesto esteroide se incuba, con agitación, durante unas diez horas.

15 El caldo de fermentación así obtenido se extracta con tres porciones de 50 ml. de acetato de etilo, y los extractos se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. El residuo así obtenido se somete a análisis polarográfico, para medir la semionda a 1,52 volts., y resulta contener una cantidad de 9-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona 20 que corresponde a un rendimiento de más de 50% del obtenible en teoría de los 10 mg. iniciales de 9-fluoro- Δ^4 -pregnen-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona.

EJEMPLO 17.-

25 Trece porciones de 50 ml. del medio de edamina descrito en el ejemplo 8^o se ajustan a un pH 7, se esterilizan calentando durante quince minutos en autoclave a unos 120°C, y cada uno de los medios esterilizados se inocula con un cultivo de Bacillus sphaericus (MB834); este cultivo se había 30 aislado del suelo de un yacimiento petrolífero de Texas, y se designa por lote bacteriano 246E₂X. Los cultivos inocu-



5 lados se incuban a una temperatura de 28°C, con agitación, durante unas 24 horas, y a cada uno de los trece cultivos resultantes se añade una solución de 10 mg. de un compuesto 3-hidroxisteroide o 3-cetosteroide distinto en 0,1 ml. de dimetilformamida. Los cultivos que contienen los compuestos 3-cetosteroides se incuban luego, con agitación, durante otro lapso adicional de unas diez horas.

10 Cada uno de los caldos de fermentación así obtenidos se extracta por separado con tres porciones de 50 ml. de acetato de etilo, y los extractos resultantes de cada caldo, derivados de un substrato particular de 3-cetosteroide, se reúnen y evaporan hasta sequedad en vacío. Cada uno de los trece residuos se disuelve en acetona y se raya sobre cromatogramas de papel, que se revelan respectivamente empleando el sistema disolvente indicado para el substrato inicial en la

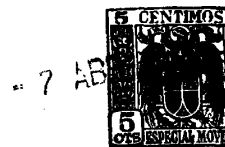
15 tabla que sigue. Se separan las bandas superiores de cada cromatograma, que corresponden a los Δ^1 -deshidroderivados, se extractan separadamente con metanol, y el material así extraído se somete de nuevo a cromatografía sobre papel rayado. Se separa de nuevo la banda superior, se seca bien, se extracta con metanol, y el extracto metanólico se evapora hasta sequedad en vacío, para obtener, por cada substrato empleado como material de partida, el respectivo compuesto $\Delta^{1,4}$ -3-cetosteroide indicado en la tabla siguiente:

25 Sistema disolvente empleado para cromatografía sobre papel listado

Exper. núm.	Substrato	Fase estacionaria	Fase móvil	$\Delta^{1,4}$ -3-cetosteroides obtenidos
30	Δ^4 -pregnen-21-ol-3,20-diona	Metanol-formamida 1:1	Benceno-ciclohexano 1:1	$\Delta^{1,4}$ -pregnadien-21-ol-3,20-diona



	2	Δ^4 -pregnen-3,20-diona	Metanol-formamida 1:1	Benceno-ciclohexano 1:1	$\Delta^1,4$ -pregnadien-3,20-diona
	3	Δ^5 -pregnen-3-ol-20-ona	Metanol-formamida 1:1	Benceno-ciclohexano 1:1	$\Delta^1,4$ -pregnadien-3,20-diona
5	4	Δ^4 -pregnen-17 α -21-diol-3,20-diona	Formamida	Benceno	$\Delta^1,4$ -pregnadien-17 α ,21-diol-3,20-diona
	5	Δ^4 -pregnen-17 α -21-diol-3,20-diona (21 acetato de)	Formamida	Benceno	$\Delta^1,4$ -pregnadien-17 α ,21-diol-3,20-diona
10	6	Δ^4 -pregnen-17 α -21-diol-3,11,20-diona	Formamida	Benceno	$\Delta^1,4$ -pregnadien-17 α ,21-diol-3,11,20-diona
	7	Δ^4 -pregnen-11 β -17 α ,21-triol-3,20-diona	Formamida	Benceno	$\Delta^1,4$ -pregnadien-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona
15	8	9 α -fluoro- Δ^4 -pregnen-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona	Formamida	Cloroformo	9 α -fluoro- $\Delta^1,4$ -pregnadien-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona
	9	Δ^4 -androsen-3,17-diona	Metanol-formamida 1:1	Benceno-ciclohexano 1:1	$\Delta^1,4$ -androstadien-3,17-diona
20	10	Pregnen-3,17 α ,21-triol-11,20-diona (21 acetato de)	Formamida	Benceno	$\Delta^1,4$ -pregnadien-17 α ,21-diol-3,11,20-triona
	11	pregnen-17 α -21-diol-3,11,20-triona (21 acetato)	Formamida	Benceno	$\Delta^1,4$ -pregnadien-17 α ,21-diol-3,11,20-triona
25	12	Pregnen-3,17 α -21-triol-20-ona (21 acetato de)	Formamida	Benceno	$\Delta^1,4$ -pregnadien-17 α ,21-diol-3,20-diona
	13	Pregnen-17 α ,21-diol-3,20-diona (21 acetato de)	Formamida	Benceno	$\Delta^1,4$ -pregnadien-17 α ,21-diol-3,20-diona
30					



N O T A

Se reivindica como objeto de esta patente:

1.- Procedimiento para la obtención de compuestos esteroides por fermentación, que comprende la Δ^1 -deshidrogenación de un esteroide, por el contacto de este compuesto con la actividad deshidrogenante de microorganismos del género Bacillus.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende cultivar Bacillus en un medio nutritivo acuoso, en presencia de un esteroide cuyos átomos C_1 y C_2 están unidos por un simple enlace; a fin de obtener un Δ^1 -esteroide.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 para la producción de un Δ^1 -esteroide, que comprende el contacto entre un esteroide con enlace sencillo entre los átomos C_1 y C_2 , y enzimas deshidrogenantes producidas por Bacillus sphaericus.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende el contacto entre un esteroide oxigenado en 3 de la serie del pregnano, con un enlace sencillo entre los átomos C_1 y C_2 , y la actividad deshidrogenante de microorganismos Bacillus sphaericus.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende el cultivo de Bacillus sphaericus en un medio nutritivo acuoso, en presencia de un esteroide oxigenado en 3, de la serie del pregnano, con un enlace sencillo entre los átomos C_1 y C_2 , con lo que se elimina selectivamente el hidrogeno ligado a estos dos átomos, a fin de obtener un esteroide Δ^1 -3-oxigenado.

6.- Procedimiento según la reivindicación 1, que



comprende el contacto entre un esteroide 3-oxigenado de la serie del pregnano, con un enlace sencillo entre los átomos C₁ y C₂, y un doble enlace en C₅ y la actividad deshidrogenante del Bacillus sphaericus, a fin de obtener un compuesto $\Delta^{1,4}$ -3-cetosteroide.

7.- Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende el contacto entre un compuesto Δ^4 -3-cetopregneno y la actividad deshidrogenante del Bacillus sphaericus, a fin de formar un compuesto $\Delta^{1,4}$ -3-cetopregnadieno.

8.- Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende el contacto entre un compuesto Δ^5 -3-hidroxipregneno y la actividad deshidrogenante del Bacillus sphaericus, a fin de formar un compuesto $\Delta^{1,4}$ -3-cetopregnadieno.

9.- Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende el cultivo aeróbico de microorganismos de la especie Bacillus sphaericus en un medio nutritivo acuoso, en presencia de un Δ^5 -3-alcanoiloxipregneno, para formar un compuesto $\Delta^{1,4}$ -5-cetopregnadieno.

10.- Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende el cultivo aeróbico de Bacillus sphaericus en un medio nutritivo acuoso, en presencia de un Δ^4 -3-cetopregneno, a fin de formar un compuesto $\Delta^{1,4}$ -3-cetopregnadieno.

11.- Procedimiento para la obtención de compuestos esteroideos por fermentación.

Esta memoria consta de treinta y dos páginas, escritas por una sola cara.

BARCELONA, 7 de abril de 1956.

P. A.
JOSE MARIA BOLLAN