

229219



229219

MEMORIA DESCRIPTIVA

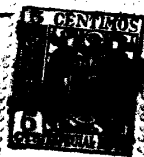
que se acompaña a  
la solicitud de

una PATENTE de INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA, a fa-  
vor de OLIN MATHIESON CHEMICAL CORPORATION, de nacionalidad  
norteamericana, residente en 460 Park Avenue, NEW YORK 22  
(N.Y. - EE.UU.), por: "PROCEDIMIENTO PARA LA SINTESIS DE  
ESTEROIDES".

Prioridad: Solicitud de patente norteamericana Ser. número  
522.849, del 18 de julio de 1955.

Inventores: Don Richard William Thema y Don Josef Fried, am-  
bos de nacionalidad norteamericana.

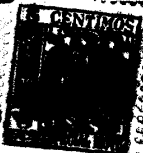
229219



- 5.- La presente invención se refiere a la conversión microbiológica de esteroides, y tiene por objeto un procedimiento para convertir el Compuesto S de Reichstein o un 21-éster del mismo en un derivado 1,2-dehidro (v.g.  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,21-diol-3,20-diona ó un 21-éster del mismo) mediante ciertos microorganismos (en lo sucesivo, al Compuesto S de Reichstein, o sea  $\Delta^4$ -pregnona-17a,21-diol-3,20-diona, se referirá para mayor brevedad como "Compuesto S" ó "S").
- 10.- Más especialmente, la esencia de esta invención comprende someter el Compuesto S o un 21-éster del mismo a la acción de hongos (o encimas de ellos) del orden de los moniliales, familia de las tuberculariaceae, preferentemente del género cylindrocarpon y fusarium, y recuperar el esteroide 1,2-dehidro así formado. Ha sido comprobado que los hongos Cylindrocarpon raditicola ATCC 11011, Fusarium sp. ATCC 11599 y Fusarium javanicum var. ensiforme QM 524 (Quartermaster Culture Collection, Quartermaster General Laboratories, Filadelfia, Pennsylvania) poseen un elevado grado de actividad en la dehidrogenación microbiológica de esta invención, formando cada uno de estos organismos, inter alia, el conocido esteroide 1,2-dehidro-S, de conocido valor como intermediario en la preparación de 1,2-dehidrohidrocortisona y otros derivados de esteroide fisiológicamente activos. Los organismos también forman, bajo ciertas condiciones,  $\Delta^1$ -testololactona y  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,20 $\beta$ ,21-triol-3-ona, siendo este último un nuevo esteroide susceptible de ser oxidado tras 21-monoacilación formando un 21-éster de 1,2-dehidro-S.
- 15.-
- 20.-
- 25.-
- 30.- En la práctica de esta invención, se puede realizar la dehidrogenación en cultivo creciente, bien sea por agregación de Compuesto S ó un 21-éster del mismo al cultivo durante el periodo de incubación, o por su inclusión en el medio nutriente previamente a la inoculación. En cualquier caso, deben hallarse presentes en el medio de cultivo fuentes asimilables de materias nitrogenadas (promotoras del crecimiento) y materias saturadas de carbono (como fuente de energía). Asimismo se deberá mantener durante la oxidación un conveniente suministro de aire esterilizado, v.g.
- 35.-

- 40.- por la técnica convencional (1) exponiendo una gran superficie del medio al aire ó (2) por cultivo sumergido.
- Como substrato de esteroide se puede utilizar bien sea el mismo compuesto S o un 21-éster del mismo. Esteres convenientes incluyen los ésteres ácidos alifáticos (v.g., los ésteres ácidos alcanóicos, y en especial los ésteres ácidos alcanóicos inferiores, o sea el acetato, propionato, butirato y enantato), los ésteres ácidos aromáticos (v.g. los ésteres ácidos aromáticos de hidrocarburo, o sea como el benzoato), los ésteres ácidos aralifáticos (v.g. los ésteres ácidos aralcanóicos de hidrocarburo, o sea como fenil acetato y  $\beta$ -fenilpropionato). Los ésteres especialmente preferidos son los de ácidos carboxílicos de hidrocarburo que poseen menos de 10 átomos de carbono.
- 45.-
- 50.-
- 55.- Las fuentes de factores promotores del crecimiento nitrogenados son las que normalmente se emplean en tales procedimientos. Pueden ser orgánicos naturales (v.g. harina de soja, licor de remojo de maíz, extracto de carne y/o solubles de destilería) o sintéticos como nitratos o compuestos de amonio.
- 60.- Conveniente material para fuente de energía, susceptible de ser utilizado en el procedimiento de esta invención, incluye: (a) lípidos, especialmente (1) ácidos grasos con al menos 14 átomos de carbono, (2) grasas, o (3) mezclas de los mismos, o sea grasas tales como aceite de manteca de cerdo, aceite de soja, aceite de linaza, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuet, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de ricino, aceite de sésamo, aceite de palma crudo, sebo de carnero, aceite de esperma, aceite de oliva, tristearina, tripalmitina, trioleína y trilaurina; y ácidos grasos como esteárico, palmítico, oleico, linoleico y mirístico; y (b) otros materiales saturados de carbono, como glicerol, glucosa, fructosa, dextrosa, sacarosa, lactosa, maltosa, dextrinas, almidones y suero de leche. Estos materiales pueden ser utilizados bien sea en su estado purificado o como concentrados, como concentrado de suero de leche, licor de remojo de maíz o amasijos de grano (v.g. de maíz, trigo o cebada), pudiéndose emplear, desde luego, mezclas de los mismos. Sin embargo, ha de hacerse notar que el substrato de esteroide se agrega al me-
- 65.-
- 70.-
- 75.-

2292184



80.- dio de fermentación esencialmente como precursor, y no como fuente de energía.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitarla en manera alguna.

Ejemplo 1

85.- (a) fermentación: Se prepara un medio de la siguiente composición: licor de remojo de maíz, 6.0 gr.;  $NH_4H_2PO_4$ , 3.0 gr.;  $CaCO_3$ , 2.5 gr.; aceite de soja, 2.2 gr.; extracto de levadura, 2.5 gr.; dextrosa, 10.0 gr. y agua destilada para completar 1 litro. El medio se ajusta a un pH de  $7.0 \pm$

90.- 0.1. A continuación se distribuyen 50 ml. en matraces Erlenmeyer de 250 ml., taponándolos con algodón y se esterilizan de la manera convencional (v.g. en autoclave durante 30 minutos a  $120^\circ C.$ ). Una vez enfriados, cada matraz se

95.- inocular con una apropiada suspensión de esporas de Cylindrocarpum radicolata ATCC 11011; v.g., aproximadamente una quinta parte del crecimiento de superficie suspendible de un cultivo sesgado de agar Sabouraud de 7 a 10 días. Después de 65 horas de incubación a  $25^\circ C.$  sobre una agitadora

100.- giratoria de 280 ciclos por minuto, se transfiere el 10% por volumen al medio fresco de la mencionada composición. Se prosigue la incubación durante 48 horas, agregando luego 1.013 gr. de compuesto S en 40.5 ml. de metanol absoluto en la cantidad de 0.5 ml. por matraz. Después de un periodo adicional de 47 horas, los cultivos se filtran por

105.- un separador Seitz. El micelio se lava sobre el embudo con aproximadamente 400 ml. de agua para dar un volumen total de filtrado de aproximadamente 4.1 litros.

(b) extracción: 4 litros del filtrado de cultivo (1 gr. de Compuesto S) se extraen con cuatro porciones de 1 litro de cloroformo. La evaporación del cloroformo in vacuo proporciona aproximadamente 596 mg. de residuo cristalino. La

110.- trituración de este residuo con acetona produce aproximadamente 460 mg. de materia cristalina, la cual, por recristalización de etanol del 95%, produce aproximadamente 300 mg. de  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,21-diol-3,20-diona (1,2-dehidro

115.- Compuesto S) pura, con las siguientes propiedades: p.f. aproximadamente  $240-242^\circ C.$ ;  $(a)_D^{25} + 57^\circ$  (c; 0.70 en cloroformo);  $\lambda_{alc.}^{max.}$   $244 \mu$  ( $\epsilon$  16,800);  $\lambda_{Najol}^{max.}$   $3.00-3.06 \mu$  (OH),  $5.81 \mu$  (20-Keto),  $6.00 \mu$ ,  $6.18 \mu$ ,  $6.23 \mu$  ( $\Delta^{1,4}$ -3-

229219

120.- cetona).

Anal.: calc. para  $C_{21}H_{28}O_4$  (344.43): O, 73.22; H, 8.19  
enc. O, 73.14; H, 8.08

Esta sustancia no se distingue de una muestra auténtica de 1,2-déhidro Compuesto S.

125.-

Ejemplo 2

La etapa (a) del Ejemplo 1 se repite substituyendo el Compuesto S 21-acetato por el Compuesto S. Después de la extracción del filtrado de cultivo según la etapa (b) se obtiene  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,21-diol-3,20-diona que no

130.-

se distingue del producto formado en el Ejemplo 1 o de una muestra auténtica.

Ejemplo 3

135.-

(a) fermentación: Se prepara un medio de la siguiente composición: sólidos de licor de remojo de maíz, 3.8 gr.;  $NH_4H_2PO_4$ , 3.0 gr.;  $CaCO_3$ , 2.5 gr.; aceite de soja, 2.2 gr.; Compuesto S, 0.5 gr. y agua destilada para completar 1 litro. El medio se ajusta a un pH de  $7.0 \pm 0.1$ . A continuación se distribuyen porciones de 100 ml. del medio en matraces Erlenmeyer de 500 ml., taponándolos con algodón y

140.-

se esterilizan de la manera convencional (v.g., en autoclave durante 30 minutos a  $120^\circ C$ .). Una vez enfriados, cada matraz se inocula con 5-10% de inóculo vegetativo de Cylindrocarpum raditicola ATCC 11011 (cultivándose el inóculo vegetativo de cultivos concentrados -ampolla liofilizada o sesgado de agar- durante 48-72 horas en un medio de la

145.-

siguiente composición: sólidos de licor de remojo de maíz, 15 gr.; azúcar terciado, 10 gr.;  $NaNO_3$ , 6 gr.;  $ZnSO_4$ , 0.001 gr.;  $OH_2SO_4$ , 1.5 gr.;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 gr.;  $CaCO_3$ , 5 gr.; aceite de manteca de cerdo, 2 gr.; agua destilada para completar 1 litro). Los matraces se colocan ahora en una agitadora oscilante (de 120 ciclos de pulgada y media por minuto), y se agita mecánicamente a  $25^\circ C$ . durante 3 días. El contenido de los matraces se enfría luego y, tras de haber

150.-

ajustado el pH del cultivo a aproximadamente  $4 \pm 0.2$  con ácido sulfúrico, se filtra por separadores de Seitz para separar el micelio del medio fermentado.

155.-

(b) extracción: El filtrado de cultivo (4 litros) obtenido en (a) se extrae con 4 porciones de 1 litro de cloroformo y el resultante extracto de cloroformo se evapora hasta que-



220219

160.-

dar seco in vacuo. El residuo (aproximadamente 1.5 gr.) se disuelve en benceno, y se agrega hexano hasta la turbidez incipiente. La solución resultante se cromatografía sobre 30 gr. de gel de sílice. Los primeros eluados producen

165.-

$\Delta^1$ -testololactona, p.f. aproximadamente 216-218°C., con un espectro infrarrojo idéntico al de una muestra auténtica. La elución subsiguiente con cloroformo proporciona, como producto mayor,  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17 $\alpha$ ,21-diol-3,20-diona, p.f. aproximadamente 242-244°C.; (a)<sub>D</sub><sup>23</sup> + 57° (cloroformo).

170.-

Ejemplo 4

(a) fermentación: Como en el Ejemplo 1, con excepción de que el Fusarium javanicum var. ensiforme QM 524 es el organismo; la incubación adicional, después de la agregación de esteroide, es de 26 horas, y el volumen, incluido el lavado, es de 3.95 litros.

175.-

(b) extracción: El filtrado de cultivo obtenido en (a) se extrae como en el Ejemplo 3, y el residuo resultante de la evaporación del cloroformo (aproximadamente 822 mg.) cristaliza fraccionalmente de etanol del 95%. Esto proporciona un total de aproximadamente 438 mg. de  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17 $\alpha$ ,21-diol-3,20-diona pura; p.f. aproximadamente 242-244°C. idéntica a una muestra auténtica. Las aguas madres procedentes de la referida cristalización se evaporan hasta quedar secas in vacuo (aproximadamente 320 mg.), se disuelven

180.-

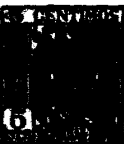
3 ml. de cloroformo y 15 ml. de benceno, y se cromatografían sobre 1 gr. de gel de sílice. La materia cristalina (aproximadamente 59 mg.) se elúa con cloroformo (1650 ml.), que se identifica por  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17 $\alpha$ ,21-diol-3,20-diona en virtud de su punto de fusión (aproximadamente 242-244°C.) y espectro infrarrojo.

185.-

Una elución continua con acetona al 5% en cloroformo (300 ml.) y acetona al 100% en cloroformo (700 ml.) proporciona un segundo componente, el cual, después de la cristalización de acetona, posee las siguientes propiedades: p.f. aproximadamente 193-194°C.; (a)<sub>D</sub><sup>23</sup> + 27° (0, 0.40 en cloroformo);  $\lambda$ <sub>alc.</sub><sup>alc.</sup> 245 m $\mu$  ( $\epsilon$  = 17,100);  $\lambda$ <sub>max.</sub><sup>Nujol</sup> 2.85  $\mu$ , 3.00  $\mu$  (OH), 6.01  $\mu$ , 6.21  $\mu$ , 6.26  $\mu$  ( $\Delta^{1,4}$ -3-cetona). Análisis calculado para C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub> (346.45) : C, 72.80; H, 8.73. Encontrado: C, 72.66; H, 8.58. Las precitadas propiedades in

190.-

195.-



200.-

dican que esta substancia representa  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a, 20 $\beta$ ,21-triol-3-ona.

205.-

(c) acilación de  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,20 $\beta$ ,21-triol-3-ona: 38 mg. de  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,20 $\beta$ ,21-triol-3-ona es acetilada con 1 ml. de piridina y 1 ml. de anhídrido acético. El

210.-

resultante diacetato tiene las siguientes propiedades: p.f. aproximadamente 174-176°C.; (a)<sub>D</sub> + 101° (0, 0.43 en cloroformo);  $\lambda_{\text{max.}}^{\text{alc.}}$  244  $\mu$  ( $\epsilon = 17,200$ );  $\lambda_{\text{max.}}^{\text{Nujol}}$  2,85  $\mu$  (OH), 5.75  $\mu$  (acetil); 6.02  $\mu$ , 6.15  $\mu$ , 6.23  $\mu$  ( $\Delta^{1,4}$ -3-keto). Análisis calculado para C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub> (430.52): C, 69.74; H, 7.96. Encontrado: C, 69.49; H, 7.72.  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,20 $\beta$ ,21-triol-3-ona puede ser convertida en  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,

215.-

21-triol-3,20-diona-21-acetato por acetilación con un mol de anhídrido acético para formar el 21-monoacetato, seguido por oxidación con ácido crómico en ácido acético. El grupo 21-acetil puede ahora ser separado por hidrólisis con carbonato potásico en metanol para dar 1,2-dehidro S.

De manera análoga,  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,20 $\beta$ ,21-triol-3-ona puede ser mono- y/o diacetilada utilizando anhídridos ácidos de éter o hálidos de acilo.

220.-

Ejemplo 5

225.-

(a) fermentación: Como en el Ejemplo 1, con excepción de que Fusarium sp. ATCC 11599 es el organismo. La incubación, después de la agregación de esteroide, es de 48 horas; se fermenta 0.513 gr. de Compuesto S, y el volumen final es 1.974 litros.

230.-

(b) extracción: El filtrado se extrae como en el Ejemplo 3 y el residuo del extracto de cloroformo (aproximadamente 269 mg.) se cristaliza de alcohol a 95°. Esto resulta en el aislamiento de aproximadamente 210 mg. de  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,21-triol-3,20-diona pura, p.f. aproximadamente 244-246°C., teniendo un espectro infrarrojo idéntico al de una muestra auténtica.

235.-

Se comprenderá que la invención puede llevarse a cabo de distintas maneras dentro del alcance de las reivindicaciones que se acompañan.

N O T A

En resumen: la Patente de Invención cuyo registro se



229219

240.-

solicita recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

1) Procedimiento para la síntesis de esteroides, caracterizado porque comprende someter un esteroide seleccionado del grupo que consiste en  $\Delta^4$ -pregnona-17a,21-diol-3,20-diona y 21-ésteres del mismo a la acción de las encimas de hongos de la familia Tuberculariaciae en un medio acuoso que contiene fuentes asimilables de carbono y nitrógeno, y recuperar el 1,2-dehidroesteroide formado del medio.

245.-

2) Procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque los hongos se seleccionan del género que consiste en *Cylindrocarpon* y *Fusarium*.

250.-

3) Procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque el hongo es *Cylindrocarpon raditicola*.

4) Procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque el hongo es *Fusarium sp.* ATCC 11,599.

255.-

5) Procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque el hongo es *Fusarium javanicum* var. *ensiforme* QM 524.

260.-

6) Procedimiento, según la Reivindicación 2), caracterizado porque el 1,2-dehidroesteroide recuperado es  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,21-diol-3,20-diona.

7) Procedimiento, según la Reivindicación 5), caracterizado porque el 1,2-dehidroesteroide recuperado es  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,20 $\beta$ ,21-triol-3-ona.

265.-

8) Procedimiento, según la Reivindicación 7), caracterizado porque incluye las etapas adicionales de monoacilación de  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,20 $\beta$ ,21-triol-3-ona y la oxidación del derivado 21-acilo así formado a un 21-acilato de  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,21-diol-3,20-diona.

270.-

9) Procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque el esteroide es  $\Delta^4$ -pregnona-17a,21-diol-3,20-diona.

275.-

10) Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende un esteroide seleccionado del grupo que consiste en  $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,20 $\beta$ ;21-triol-3-ona y ésteres del mismo.

11) Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "PROCEDIMIENTO PARA LA SÍNTESIS DE ESTEROIDES".

Todo conforme queda descrito en la presente Memoria,



280.-

que consta de nueve páginas escritas a máquina.

Madrid, a 14 de Junio de 1956

ALFONSO UNGRIA

229219