



229220

229220

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 nacionali-
dad norteamericana, residente en 460 Park Avenue, NEW YORK
22 (N.Y. - EE.UU.), por: "UN METODO PARA PRODUCIR UN ESTE-
ROIDE DEL GRUPO QUE CONSISTE EN $\Delta^{1,4}$ -PREGNANDIONA-11 β .17a,
21-TRIOL-3,20-DIONA Y 21-ESTERES DEL MISMO".

Prioridad: Solicitud de patente norteamericana Ser. número
522.850, del 18 de Julio de 1955.

Inventores: Don Richard William Thoma, Don John Royal Ger-
ke y Don Josef Fried, norteamericanos.

229220

- 5.- La presente invención se refiere a un método biosintético para la preparación de 11β -hidroxi-esteroides de la serie pregnana (incluyendo la pregnona y pregnandiona), en especial para la preparación de $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona- 11β ,17a, 21-triol-3,20-diona y 21-ésteres del mismo, que implica la oxidación microbiológica del correspondiente 11 -desoxi-esteroide, en particular $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,21-diol-3,20-diona y 21-ésteres del mismo.
- 10.- Más particularmente, el método de esta invención implica someter $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,21-diol-3,20-diona o 21-ésteres del mismo a la acción de una encima (o encimas, o sistema de encimas) a un microorganismo del género *Coniothyrium* (preferentemente *Coniothyrium halleborina*) en un medio acuoso en presencia de oxígeno, y recuperar el $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona- 11β ,17a,21-triol-3,20-diona ó un 21-éster del mismo formado. La acción de la encima puede ser utilizada bien sea por incluir el esteroide en un cultivo aereado del microorganismo en o sobre un medio nutriente conveniente, o bien por unir en un medio acuoso el esteroide, oxígeno, y la encima de células no proliferantes del microorganismo, prefiriéndose la primera alternativa.
- 15.- Los esteroides utilizables en el método de esta invención incluyen, inter alia, $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,21-diol-3,20-diona y 21-ésteres del mismo. Entre los ácidos esterificantes convenientes, al utilizar un 21-éster, son los ácidos carboxílicos orgánicos, en particular, los ácidos carboxílicos de hidrocarburo con menos de 10 átomos de carbono, o sea como los ácidos alcancoicos inferiores (v.g., ácidos acético, propiónico, butírico y enántico), los ácidos alcanedioicos inferiores (v.g., ácido succínico), los ácidos aromáticos de hidrocarburo (v.g., ácido benzoico), y los ácidos aralcancoicos de hidrocarburo (v.g., ácidos fenilacético y beta-fenilpropiónico).
- 20.- Un medio nutriente conveniente comprende esencialmente una fuente de factores nitrogenados y una fuente asimilable de carbono y energía. Este último puede ser un carbohidrato (como sacarosa, melaza, glucosa, maltosa, almidón o dextrina), un ácido graso, una grasa y/o el esteroide mismo. Sin embargo, preferentemente el medio incluye una fuente
- 25.-
- 30.-
- 35.-

229220

40.- te asimilable de carbono y energía además del esteroide. Entre las grasas utilizables para el objeto de esta invención se encuentran: aceite de manteca de cerdo, aceite de soja, aceite de linaza, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuete, 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, trilaurina. Entre los ácidos grasos utilizables para el objeto de esta invención se encuentran: ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido mirístico.

50.- La fuente de factores nitrogenados puede ser orgánica (v.g., harina de soja, licor de remojo de maíz, extracto de carne y/o solubles de destilería) o sintética (v.g., constituidos de compuestos simples sintetizables orgánicos e inorgánicos, como sales de amonio, nitratos de álcali, aminoácidos o urea).

55.- Se deberá mantener un conveniente suministro de aire esterilizado durante la fermentación, por ejemplo, por los métodos convencionales de exponer una gran superficie del medio al aire o por la utilización de un cultivo aereado sumergido.

60.- El esteroide se puede agregar al cultivo durante el periodo de incubación, o bien incluirse en el medio previamente a la esterilización o inoculación. El grado preferido (pero no limitativo) de concentración del esteroide en el cultivo es de aproximadamente 0.01 a 0.10%. El periodo de cultivo (o bien el tiempo en que se somete el esteroide a la acción de la encima) puede variar considerablemente, siendo factible el alcance de aproximadamente 6 a 96 horas, pero no limitativo.

65.- El 11 β -hidroxi esteroide formado, se puede recuperar del cultivo en el que se ha formado por extracción con un disolvente orgánico (v.g., cetona, metil-isobutílico, cloroformo y dicloruro metilénico), seguida de la concentración del extracto y cristalización a partir de un disolvente orgánico conveniente.

70.- Los siguientes Ejemplos ilustran la presente invención:

75.-



229220

80.-

Ejemplo 1

$\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-diona

(a) Fermentación:

Se prepara un medio de fermentación de la siguiente composición:

85.-	Almidón	20 gr.
	Jarabe de extracto de cereales malteado	10 gr.
	Peptona	20 gr.
	d-glucosa	44 gr.
	NaNO ₃	3 gr.
	KH ₂ PO ₄	1 gr.
90.-	KCl	0.5 gr.
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 gr.
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0183 gr.
	Agua	para completar 1 litro

El pH del medio se ajusta a 7.0 ± 0.1 con solución 2 N NaOH y porciones de 50 ml. del medio se distribuyen en matraces Erlemmeyer de 250 ml., taponándolos con algodón, y se esteriliza en autoclave durante 30 minutos a 120°C. Una vez en friados, cada matraz se inocula con un 5% de una suspensión de esporas de Coniothyrium helleborine (asequible, inter alia, del Department of Botany, Kansas State College).

95.- (El cultivo esporulado se obtiene por crecimiento del microorganismo sobre maíz quebrado durante 2 a 3 semanas para que se presente la máxima esporulación. La suspensión, preferentemente, se efectúa en solución Duponal acuosa al 0.01%. 2.5 ml. de suspensión, que contiene aproximadamente 1/16 de las esporas de 15 gr. de maíz, se utilizan para inocular 50 ml. de la etapa de la primera agitadora de matraz.)

100.- Los matraces, a continuación, se agitan mecánicamente durante 66 horas sobre una agitadora giratoria de 280 ciclos por minuto a 25°C., efectuándose luego la transferencia de un 6% por volumen a 40 matraces (250 ml.) que contienen porciones de 50 ml. del siguiente medio:

110.-	Glucosa	40 gr.
	NaNO ₃	3 gr.
	KH ₂ PO ₄	1 gr.
115.-	Agua	para completar 1 litro

La incubación se efectúa a continuación durante 48 horas a 25°C. por agitación mecánica sobre una agitadora giratoria de 280 ciclos por minuto, después de lo cual se agregan 500 mg. de $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17 α ,21-diol-3,20-diona en 20 ml.

120.-

de metanol. La incubación se prosigue durante otras 48 horas. El contenido de los matraces se recoge, filtra en un separador de Seitz y se lava bien con aproximadamente el 10% de agua. El volumen del filtrado y lavado es de 1875 ml.

125.-

(b) Aislamiento del $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-11 β ,17a,21-triol-3,20-diona.

130.-

El filtrado de cultivo así obtenido se extrae con tres porciones de 1 litro de cloroformo, y la resultante solución de cloroformo se evapora hasta quedar seca in vacuo. El residuo (aproximadamente 238 mg.) se tritura con cloroformo, y el resultante precipitado cristalino (aproximadamente 146 mg.), que consiste en una mezcla de material inicial, y el producto hidroxilado deseado, es acetilado con 2 ml. de piridina anhídrida y 2 ml. de anhídrido acético a la temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla de acetatos obtenida por evaporación de los reactivos, se cristaliza cuatro veces de alcohol al 95%, produciendo $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-11 β ,17a,21-triol-3,20-diona 21-acetato puro, p.g. aproximadamente 237-239°C. (a)_D²³ + 112° (dioxano); λ_{max}^{Nujol} 2.97 μ , 3.07 μ , 5.72 μ , 5.81 μ , 6.16 μ , 6.24 μ , 6.30 μ (cuyo espectro infrarrojo es idéntico al de una muestra auténtica).

135.-

La saponificación del referido 21-acetato con carbonato potásico en metanol proporciona $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-11 β ,17a,21-triol-3,20-diona auténtico, p.f. aproximadamente 139-140°C.

140.-

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

145.-

150.-

N O T A

En resumen: la Patente de Invención cuyo registro se solicita recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

155.-

1) Un método para producir un esteroide del grupo que consiste en $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-11 β ,17a,21-triol-3,20-diona y 21-ésteres del mismo, caracterizado porque se somete un esteroide seleccionado del grupo que consiste en $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,21-diol-3,20-diona y 21-ésteres del mismo a la acción de una enzima de un microorganismo del género



160.-

Coniothyrium en un medio acuoso en presencia de oxígeno, y recuperar el esteroide formado.

2) Un método, según la Reivindicación 1), caracterizado porque el organismo es Coniothyrium helleborine.

165.-

3) Un método, según la Reivindicación 2), caracterizado porque el esteroide es un 21-éster de $\Delta^{1,4}$ -pregnandiona-17a,21-diol-3,20-diona con un ácido carboxílico de hidrocarburo de menos de 10 átomos de carbono.

4) Un método, según la Reivindicación 3), caracterizado porque el ácido es un ácido alcanico inferior.

170.-

5) Un método, según la Reivindicación 3), caracterizado porque el ácido es ácido acético.

6) Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN METODO PARA PRODUCIR UN ESTEROIDE DEL GRUPO QUE CONSISTE EN $\Delta^{1,4}$ -PREGNANDIONA-11 β ,17a,21-TRIOL-3,20-DIONA Y 21-ESTERES DEL MISMO".

175.-

Todo conforme queda descrito en la presente Memoria, que consta de seis páginas escritas a máquina.

Madrid, a 14 de Junio de 1956

ALFONSO UNGRIA