

AÑO 1959

Expediente núm. \_\_\_\_\_



249870

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL  
249870

PATENTE DE INTRODUCCION

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una PATENTE DE INTRODUCCION por DIEZ años, en España

a favor de

CLIN MATTHEWSON CHEMICAL CORPORATION, de nacionalidad norteamericana domiciliado en 460 Park Avenue, Nueva York, N.Y., E.U.A. núm.

por:

UN METODO DE CONVERTIR UN ESTERIDE EN UN 16 $\alpha$ -HIDROXI DERIVADO DEL MISMO

Nº 15180

Agente Sr. ELZABURU

P - 18.343.-

U S Ser N° 739.943

27 JUN 1956  
6561 NIP 12



249870

249870

MEMORIA DESCRIPTIVA  
para solicitar  
PATENTE DE INTRODUCCION  
e n  
E S P A Ñ A  
por DIEZ años

a nombre de OLIN MATHIESON CHEMICAL CORPORATION, entidad norteamericana, establecida en 460 Park Avenue, Nueva York, N.Y.

Estados Unidos de América, por:

•UN METODO DE CONVERTIR UN ESTEROIDE EN UN HIDROXI DERIVADO  
DEL MISMO•

5 Esta invención se refiere al mejoramiento de un método de producción de agentes medicinales (o productos intermedios para agentes medicinales) a partir de esteroides, por acción microbiológica, y a los agentes medicinales así producidos, y tiene por objeto dicho mejoramiento.

Antes de esta invención, se han hecho intentos para convertir los esteroides en sustancias útiles en medicina, utilizando la actividad de microorganismos en desarrollo pero, generalmente, con resultados poco satisfactorios desde el punto de vista de la



249870

utilidad de la sustancia obtenida y/o desde el punto de vista de la eficiencia de su producción. Así, por ejemplo, los primeros intentos condujeron bien sea a la oxidación de hidroxigrupos o cetogrupos (como en la transformación de deshidro-epi-  
5 androsterona en androstenodiona) o bien a la ruptura del núcleo esteroide, en vez de a la adición deseada de oxígeno al núcleo esteroide.

Se ha encontrado que los esteroides que tienen un grupo metileno en la posición 16, especialmente 3-ceto-esteroides o  
10 3-hidroxiesteroides, o los derivados protegidos de los mismos, tanto de la serie del androstano (incluyendo eticolano y androsteno) como de la serie del pregnano (incluyendo alopregnano y pregneno), prefiriéndose particularmente los 3,20-dicetoesteroides de la serie del pregnano, pueden convertirse en hidroxiderivados en posición 16 $\alpha$  útiles, sometiéndolos a la acción de enzi-  
15 mas de microorganismos especiales o a la acción de los mismos organismos, bajo condiciones oxidantes y preferiblemente aeróbicas.

Se ha descubierto además que los hidroxiderivados en posición 16 $\alpha$  así formados, que en muchos casos son ellos mismos com-  
20 puestos nuevos, son útiles como materiales de partida en nuevos procedimientos para la preparación tanto de derivados de esteroides ya conocidos como nuevos. Aparte de su uso como productos intermedios según se explica en la patente de E.U. n<sup>o</sup> 2.709.705,  
25 todos los 16 $\alpha$ -hidroxi esteroides producidos por el método de esta invención pueden oxidarse pasando a los correspondientes 16-cetoderivados útiles, según se explica en la solicitud de Patente de E.U. de Herz y colaboradores, N<sup>o</sup> de Serie 453.433 depositada el 31 de agosto de 1954. La 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona es  
30 útil además como material de partida en la preparación de los



249870

27

5 esteroides conocidos: alopregnano-3,6,20-triona y pregnano-3, 11,20-triona. La 16 $\alpha$ -hidroxi-11-desoxicorticosterona es un material de partida útil en la preparación de  $\Delta^4$ -androsteno-3, 16-diona, un nuevo esteroide que es un agente anabólico proteí-  
 10 La 16 $\alpha$ -hidroxi-  $\Delta^4$ -androsteno-3,17-diona y la 16 $\alpha$ -hidroxi tes-  
 tosterona formadas por el presente procedimiento son esteroides nuevos que poseen actividad androgénica; el primero es además útil como producto de partida en la obtención del dimatilester del ácido  $\Delta^4$ -3-cetoetiobiliénico, que es un nuevo derivado es-  
 15 teroide.

Entre los esteroides que pueden ser oxidados por el proce-  
 dimiento de esta invención están los esteroides insustituídos en  
 la posición 16 que son miembros de: la serie androstano, cuya se-  
 15 rie incluye la serie androsteno y eticolano; y la serie pregna-  
 no, cuya serie incluye la serie pregneno y alopregnano. Entre es-  
 tos, los esteroides de la serie pregnano y más particularmente  
 los 3,20-dicetoesteroides de la serie pregnano son preferidos.  
 Entre los ejemplos de esteroides adecuados de la serie pregnano  
 20 figuran: progesterona, pregnenolona, pregnanolona, progesterona  
 hidroxilada tal como 2 $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 7, 8, 9, 11 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 12 $\alpha$ ,  
 14, 15 $\alpha$  y 15 $\beta$ -hidroxiprogestero-  
 25 na; progesterona halogenada tal  
 como 21-cloroprogestero-  
 na; aldosterona, corticosterona, 11-deso-  
 xicorticosterona; 17 $\alpha$ -hidroxi- 11-desoxicorticosterona (compues-  
 to S de Reichstein); hidrocortisona (compuesto F); y los esteres  
 de los mismos, particularmente los esteres de ácido carboxílico,  
 tal como los esteres de ácido graso (por ejemplo, acetato, pnc-  
 pionato y butirato) y los esteres de ácido aromático (p. ej.  
 benzoato y naftoato). Sin embargo, como se ha indicado antes, aun-  
 30 que los materiales de partida preferidos son esteroides de la se-

249870

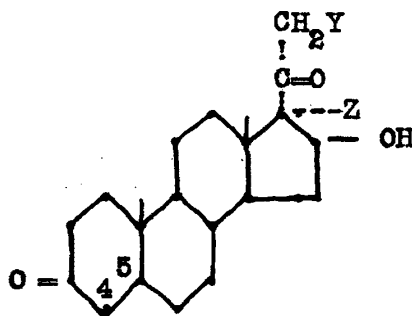


27

rie pregnano, el procedimiento de esta invención es de caracter general que puede emplearse para hidroxilar en posición  $16\alpha$ - otras clases de esteroides tales como los de la serie androstano, por ejemplo  $\Delta^4$ -androsteno-3,17-diona y testosterona.

5 Entre los esteroides formados por el procedimiento de esta invención están los  $16\alpha$ -hidroxiderivados de la serie pregnano, preferiblemente los de los  $16\alpha$ -hidroxi-3,20-dicetoesteroides de la serie pregnano. Son ejemplos de productos resultantes de la serie  $16\alpha$ -hidroxipregnano;  $16\alpha$ -hidroxiprogesteron; los  
 10  $16\alpha$ -hidroxiderivados de progesterona hidroxilada; los  $16\alpha$ -hidroxiderivados de progesterona halogenada;  $16\alpha$ -hidroxi-aldosterona;  $16\alpha$ -hidroxicorticosterona;  $16\alpha$ -hidroxi-11-desoxicorticosterona;  $16\alpha$ ,  $17\alpha$ -dihidroxi-11-desoxicorticosterona;  $16\alpha$ -hidroxi-hidrocortisona, y los esteres de los mismos. Si se hidroxila un esteroide de la serie androstano, se forma también el  
 15  $16\alpha$ -hidroxiderivado, según se ilustra por la  $16\alpha$ -hidroxi- $\Delta^4$ -androsteno-3,17-diona y  $16\alpha$ -hidroxitestosterona.

Como se ha dicho anteriormente, los productos finales preferidos son los  $16\alpha$ -hidroxi-3,20-diceto derivados de la serie pregnano que pueden representarse por la siguiente fórmula general.  
 20



249870



5 donde la posición 4,5 representa un doble enlace o saturado (se prefieren los esteroides con doble enlace 4,5) y donde Z es hidrógeno o  $\alpha$ -hidroxi; e Y es hidrógeno, hidroxi, halógeno o el grupo RO, en el que R es un radical acilo tal como un radical de ácido graso (por ejemplo, acetilo, propionilo, benzoílo y naftoílo) o un radical hidrocarbonado tal como un radical alquilo (p. ej. metilo, etilo y butilo) o un radical aralquilo (p. ej. bencilo y fenetilo).

10 Los microorganismos útiles para este procedimiento comprenden ciertos Streptomyces. Son representativos de los Streptomyces que se pueden emplear como oxidantes microbiológicos:

S. reseoehromogenus, S. viridis, S. olivaceus y Streptomyces argenteolus ATCC 11.009. Streptomyces argenteolus es una nueva especie de microorganismo que, cuando se desarrolla sobre agar, 15 tiene hifas vegetativas maduras cuyo diámetro varía desde 0,9 a 1,2 micrones. El micelio aéreo es hialino observado al microscopio, generalmente ramificado, sin formar rizos ni espirales. Los filamentos individuales raramente son septados (divididos) o no lo son en absoluto. El color de las colonias cuando se observan sobre agar sin aumento es blanco a gris gaviota claro 20 (Ridgway plate L III 10f). Las esporas son de forma que varía entre oval y oblonga. Las esporas maduras tienen un diámetro que varía desde 1,0 a 1,2 micrones y una longitud entre 1,0 y 1,2 micrones. Las esporas individuales son incoloras en la madurez pero 25 en masa aparecen de color entre blanco y gris cuando se observan sin aumento (Ridgway plate L III 10f).

30 El microorganismo licúa, la gelatina, peptoniza la leche al tornesol, reduce los nitratos a nitritos y produce ácido sulfhídrico cuando se desarrolla sobre agar de hierro Kligler. No produce indol cuando se desarrolla sobre agar triptoná. Se desarrolla

249870



sobre medios que contengan sulfato amónico o nitrato sódico o asparaguina o triptofano como única fuente de nitrógeno (medio basal:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,38 gr.;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5,65 gr.;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0gr.;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,0064 gr.;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0011 gr.;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,0079 gr.;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0015 gr.; agar (Difco), 15 gr.; glucosa, 10 gr.; agua hasta 1 litro; pH ajustado a 6,8). Cuando se utiliza el mismo medio basal sin carbohidrato pero con 0,106 gr. de N [como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] no se obtiene desarrollo. La adición de los siguientes azúcares (a 10 gr./l.) soporta el desarrollo; arabinosa, ramnosa, glucosa, galactosa, fructosa, manosa, lactosa, maltosa, dextrina, almidón, glicerol, manital, salicina. No se observa desarrollo cuando se añade al medio basal sacarosa, rafinosa, sorbosa, sorbitol o inositol. El acetato sódico y el citrato sódico soportan el desarrollo cuando se añaden al medio basal, pero el tartrato sódico no.

Streptomyces griseus es la especie más estrechamente relacionada con Streptomyces argenteolus. Desde el punto de vista morfológico, Streptomyces argenteolus se asemeja a Streptomyces griseus en su producción de esporoforos que son rectos, flexuosos o fasciculados (en tufos o mechones). El color de las esporas de Streptomyces griseus es verde agua; el de Streptomyces argenteolus es gris gaviota claro. Fisiológicamente, los cultivos se diferencian según se indica en la siguiente tabla.

	S. argenteolus	S. griseus 4 W (cepa Estreptomycina)
Color de spora	Gris gaviota claro	Verde agua
Utilización de carbono	Adonitol -, trehalosa + Acetato Na +	Adonitol +, trehalosa-, acetato Na+
Producción de antibiótico	M 2428, antibióticos solubles en BuOH	Estreptomycina
Sensibilidad fago	Resistente	Sensible

249870



La acción de los enzimas de estos microorganismos para producir derivados útiles de esteroides puede utilizarse bien sea incluyendo el esteroide en un cultivo aeróbico del microorganismo, o bien poniendo juntos, en un medio acuoso, el esteroide, aire y enzimas de células no-proliferantes del microorganismo. Así, por ejemplo, cuando se suplementa con progesterona, un cultivo del microorganismo forma el 16 $\alpha$ -hidroxiderivado útil del mismo, según se explica en la patente de E.U. Núm. 2.709.705. Análogamente, la acción de los organismos sobre desoxicorticosterona da el 16 $\alpha$ -hidroxiderivado.

En general, las condiciones de cultivo de *Streptomyces* para los fines de esta invención son (excepto para la inclusión del esteroide que se ha de convertir) las mismas que para el cultivo de varios *Streptomyces* para la producción de antibióticos y/o vitamina B<sub>12</sub>; es decir, el microorganismo se desarrolla aeróbicamente en contacto con (en o sobre) un medio de fermentación adecuado. Un medio adecuado comprende esencialmente una fuente de factores nitrogenados y promotores del desarrollo, y una fuente asimilable de carbono y energía. Esta última puede ser un carbohidrato y/o el esteroide mismo. Sin embargo, preferiblemente el medio contiene una fuente asimilable de carbono y energía además del esteroide; y preferiblemente también, esta fuente es, por lo menos en parte sustancial, un miembro del grupo constituido por (1) ácidos grasos que tienen por lo menos 14 átomos de carbono y (2) grasas. El uso de una fuente lípida de carbono y energía de esta naturaleza (especialmente un aceite graso) es ventajoso porque favorece la disponibilidad del esteroide para conversión.

Los materiales de la fuente de nitrógeno pueden ser orgánicos (por ejemplo, harina de soja, líquido de maceración del

249870

21



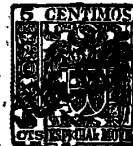
maiz, extracto de carne y/o solubles de destilerías) o sintéticos (es decir, compuestos de sustancias orgánicas e inorgánicas sencillas, sintetizables, tales como sales amónicas, nitratos alcalinos, aminoácidos, urea o tiourea).

5           En cuanto se refiere al material que sirve como fuente de energía, se prefieren los lípidos, especialmente (1) ácidos grasos que tienen por lo menos 14 átomos de carbono (2) grasas o (3) mezclas de los mismos. Ejemplos de tales grasas son aceite de manteca de cerdo, aceite de soja, aceite de linaza, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, sebo de cordero, 10           aceite de esperma, aceite de oliva, triestearina, tripalmitina, trioleína y trilaureína; y entre los ácidos grasos que pueden citarse figuran el estearico, palmítico, oléico, linoléico y mirístico.

15           Pueden emplearse también otros materiales carbonados. Por ejemplo: glicerol, glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, maltosa, dextrinas, almidones, suero, etc., son fuentes adecuadas de carbono. Estos materiales pueden emplearse bien sea en estado 20           puro o como concentrados; por ejemplo concentrado de suero, salvada de maiz, trigo o cebada, o mezclas de los mismos. Sin embargo, hay que advertir que el esteroide se añade al medio de fermentación esencialmente en calidad de precursor y no como fuente de energía.

25           Los medios pueden contener otros precursores además de los esteroides para obtener otros productos valiosos, por ejemplo, puede incluirse una fuente de cobalto asimilable cuando se desee una vitamina B-12, y entonces el subproducto se recupera por los métodos corrientes.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención:



249870 21

EJEMPLO I

Conversión de progesterona en 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona por fermentación con Streptomyces argenteolus ATCC 11.009

Se prepara un medio acuoso de la siguiente composición:

5	Aceite de soja .....	ml.	8,8
	Progesterona .....	gr.	0,25
	Harina de soja .....	gr.	30
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,005
	Agua .....	litro	1

10 Se distribuyen porciones de 100 ml. del medio en matraces Erlenmeyer de 500 ml. y se tapan los matraces con algodón y se esterilizan de la manera corriente (en autoclave). Después de

15 frios, cada uno de los matraces se inocula con 2 % de un inóculo vegetativo de Streptomyces argenteolus ATCC 11.009 que se ha desarrollado durante 48-75 horas sobre un medio de glucosa,

20 harina de soja, y los matraces se mantienen a 25° C. y se agitan mecánicamente. Después de tres días de incubación, el medio tiene un pH de aproximadamente 6,3; un contenido de vitamina B-12 de aproximadamente 0,15 microgramos/ml.; un contenido de progesterona de, aproximadamente 106 microgramos/ml., y un contenido de 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona de 115 microgramos/ml., aproximadamente. La presencia y la cantidad de 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y progesterona sin oxidar se determina extrayendo la muestra con cloroformo, separando el compuesto oxidado de la progesterona utilizando el método cromatográfico de reparto en papel

25 de filtro de Zaffaroni (Science III, 6, 1950, sistema propileno-glicol-tolueno) y determinando la cantidad de esteroide en cada mancha mediante un espectrofotómetro de cuarzo (240 m $\mu$ ). El esteroide oxidado parece que predomina en el filtrado exento de

30 células, mientras que el esteroide no oxidado está asociado con

249870



las células del microorganismo.

La 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona se recupera del filtrado del cultivo como se describe más adelante.

EJEMPLO 2

5 (a) Se prepara un medio acuoso de la siguiente composición, y se distribuye, se esteriliza, y se inocula con 2 % de un inoculum vegetativo de Streptomyces argenteolus ATCC 11.009 y se incuba como se ha descrito en el Ejemplo 1:

	Aceite de soja .....	ml.	2,2
10	Progesterona .....	gr.	0,25
	Glicina .....	gr.	2,6
	Glutamato ácido de sodio .....	gr.	2,2
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,025
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,03
15	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,012
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,005
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,016
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,05
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,5
20	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,5
	Agua .....	litros	1

(b) Al cabo de 3 días de incubación, se reúne el medio sin filtrar procedente de 700 matraces, y se centrifuga. El líquido claro se extrae con 13 porciones de 4 litros de cloroformo. El  
 25 extracto cloroformico se evapora a sequedad en vacío, y el residuo (unos 31 gr.) se mezcla con 400 ml. de metanol al 80%). La suspensión resultante se extrae con 7 porciones de 400 ml. de hexano (que elimina todos los lípidos y deja los esteroides oxidados prácticamente puros en la fase metanol acuoso). Se evapora  
 30 la fase metanol acuoso, dejando unos 8,7 gr. de una mezcla semi-

249870



cristalina; esta mezcla se disuelve en 50 ml. de cloroformo y  
 50 ml. de benceno y se cromatografía sobre una columna (7 cm.  
 de diámetro) que contiene 800 gr. de una mezcla de volúmenes  
 iguales de silicato de magnesio y un agente auxiliar de filtra-  
 5 ción (p. ej. Celite); y luego la columna (X) se lava con una  
 mezcla de volúmenes iguales de cloroformo y benceno. Primera-  
 mente se eluye progesterona residual, seguida de una pequeña  
 fracción de material cristalino (Y) y luego del producto prin-  
 cipal de la fermentación,  $16\alpha$ -hidroxiprogesterona, que se re-  
 10 recupera del eluato por evaporación de los disolventes y cristali-  
 zando luego desde acetona.

La  $16\alpha$ -hidroxiprogesterona forma cristales hexagonales  
 que funden a  $225-226^{\circ}$  C. Da una coloración azul con solución de  
 yodo y KI sobre papel de filtro  $[\alpha]_D^{23} + 158^{\circ}$ , (C, 0,38 en  
 15 cloroformo). U.V. :

$$\lambda \begin{array}{l} \text{alc.} \\ \text{max.} \end{array} 239 \text{ m}\mu$$

(e = 17.000). I.R.:

20  $\lambda \begin{array}{l} \text{Nujol} \\ \text{max.} \end{array} 3,04 \mu$

(hidroxilo);  $5,90 \mu$  (20-ceto);  $6,05 \mu$  y  $6,20 \mu$  (3-ceto- $\Delta^{4,5}$ ). Su  
 análisis (C, 76,61; H, 9,56) está en buena concordancia con el  
 calculado para  $C_{21}H_{30}O_3$ .

La acetilación de la  $16\alpha$ -hidroxiprogesterona con anhídri-  
 25 do acético y piridina da un mono acetato que, por cristaliza-  
 ción de acetona y hexano, funde a  $134-5^{\circ}$  C. y tiene un  $[\alpha]_D^{22} +$   
 $107^{\circ}$  C. y de las siguientes cifras en el análisis: C, 73,65;  
 H, 8,61 y acetilo 11,63. Pueden obtenerse de un modo análogo  
 30 esteres de la  $16\alpha$ -hidroxiprogesterona con otros ácidos orgáni-  
 cos (p. ej. ácido benzóico).

249870



5 El material cristalino Y obtenido a partir del segundo eluato por evaporación del disolvente y cristalización repetida de acetona funde a 199-200°C. y tiene las características siguientes:  $[\alpha]_D^{23} + 90,5^\circ$ , (C, 0,82 en cloroformo). U.V.:

$$\lambda \begin{matrix} \text{alc.} \\ \text{máx.} \end{matrix} 284m\mu$$

10 (e = 65). Análisis: C, 76,12; H, 9,73 (que concuerda bien con el calculado para  $C_{21}H_{32}O_3$ . El producto representa 16 $\alpha$ -hidroxipregnano-3,20-diona. Puede convertirse en su acetato (o en otro ester) de la misma manera que la 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona.

15 Una nueva elución de la columna X de silicato-agente auxiliar de filtración con cloroformo puro da una cantidad adicional de 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona. La columna se eluye después nuevamente con una mezcla de 3 partes de cloroformo y una parte de acetona; y el disolvente se elimina de este eluato por evaporación cristalizando el residuo de acetona. El producto funde a 215,5-216,5°C. y tiene las siguientes características:  $[\alpha]_D^{24-39^\circ}$  (cloroformo); U.V.,

$$\lambda \begin{matrix} \text{alc.} \\ \text{máx.} \end{matrix} 243m\mu$$

20 (e = 14.400). Su análisis (C, 73,09; H, 8,68) concuerda bien con el calculado para  $C_{21}H_{30}O_4$ . Se supone que el producto es una dihidroxi progesterona con uno de los grupos hidroxí en posición 16.

25 EJEMPLO 3

Se repite el Ejemplo 1, empleando un medio de la siguiente composición:

249870



	Aceite de soja .....	ml.	8,8
	Progesterona .....	gr.	0,25
	Levadura de cerveza seca .....	gr.	25,0
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,005
5	Agua .....	litros	1

10 Después de 2 días de incubación, el medio tiene un pH de aproximadamente 6,3, un contenido de vitamina B-12 de aproximadamente 0,20 microgramos/ml. y un contenido de 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona de aproximadamente 130 microgramos/ml. (aproximadamente 120 microgramos/ml. en el filtrado de cultivo).

EJEMPLO 4

15 Se repite el Ejemplo 1, empleando un medio de la siguiente composición:

	Aceite de soja .....	ml.	8,8
	Progesterona .....	gr.	0,25
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,005
	Líquido de maceración del maíz (neutralizado a pH7) .....	gr.	40
20	CaCO <sub>3</sub> .....	gr.	5
	Agua .....	litros	1

25 Después de 3 días de incubación, el medio tiene un pH de 6,5, aproximadamente; un contenido de vitamina B<sub>12</sub> de 0,21 microgramos/ml., aproximadamente y un contenido de 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona de 95 microgramos/ml., aproximadamente (unos 85 microgramos/ml. en el filtrado de cultivo).

30 Por incubación durante 4 días, aumentan de modo notable tanto el contenido de vitamina B-12 como el de 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona del medio. Así, al ampliar la incubación del ejemplo 3 hasta 4

249870 216



días, el contenido de vitamina B-12 sube a 0,43 microgramos/ml. y el contenido de 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona a 150 microgramos/ml. (140 microgramos/ml. en el filtrado de cultivo).

5 En algunos casos, puede conseguirse un nuevo incremento en el título por nueva ampliación del periodo de incubación. Así, por ejemplo, alargando la incubación indicada en el ejemplo 4, hasta un periodo de 7 días, aumenta el contenido de 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona a 180 microgramos/ml. (175 microgramos/ml. en el filtrado de cultivo).

10 En los ejemplos indicados arriba, el precursor esteroide es progesterona; pero otros precursores esteroideos pueden convertirse en derivados esteroideos útiles, según se explica por los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 5

15

Conversión del acetato del compuesto S en su derivado oxidado por fermentación con Streptomyces argenteoculus ATCC 11.009.

(a) Se agregan 3 gr. de acetato del compuesto S sobre 15 litros de un medio de aceite de soja que tiene la siguiente composición:

20

Glicina .....	gr.	2,6
Glutamato ácido de sodio .....	gr.	2,2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,5
25 ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,03
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,016
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,012
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,025
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O .....	gr.	0,05
30 Aceite de soja .....	gr.	2,2
Agua .....	litro	1

249870



5 Se inocula después el medio con Streptomyces argenteolus  
ATCC 11.009 y se incuba en un matraz de agitación según se ha  
descrito anteriormente, durante 4 días. El medio sin filtrar  
se extrae con tres porciones de 15 litros de cloroformo y el  
disolvente se evapora del extracto. El residuo se disuelve en  
4 litros de benceno y la solución bencénica (W) se extrae ocho  
veces con porciones de 8 litros de agua. La fase acuosa (Z) se  
extrae después con 6,4 litros de benceno (extracto W'); los  
extractos bencénicos W y W' se reúnen, se separa el benceno por  
10 evaporación y el residuo se recristaliza de alcohol, resultan-  
do aproximadamente 1,1 gr. de acetato del compuesto S bruto re-  
cuperado.

15 (b) La fase acuosa Z se extrae con cloroformo; se evapora  
el cloroformo separándole del extracto, y el residuo se disuel-  
ve en alcohol caliente de 95%. Por reposo, se forma un precipi-  
tado. El producto funde a unos 208-213°C. Resulta una cantidad  
adicional del producto al evaporar las aguas madres hasta volú-  
men mitad. La recristalización repetida de etanol da el produ-  
to en forma de placas características de forma de rombo, que  
20 funde a unos 224-227°C. La acetilación del producto en piridi-  
na-anhídrido acético da agujas que funden a 209-211°C.  $[\alpha]_D^{25} - 58^\circ$   
(0,53 % en cloroformo). Análisis: C, 67,5; H, 8,08. El producto  
parece estar constituido por un hidroxiderivado del compuesto S.

#### 25 EJEMPLO 6

Conversión de acetato de desoxicorticosterona en 16 $\alpha$ -hidro-  
xi-desoxi-corticosterona por fermentación con Streptomyces argen-  
teolus ATCC 11.009.

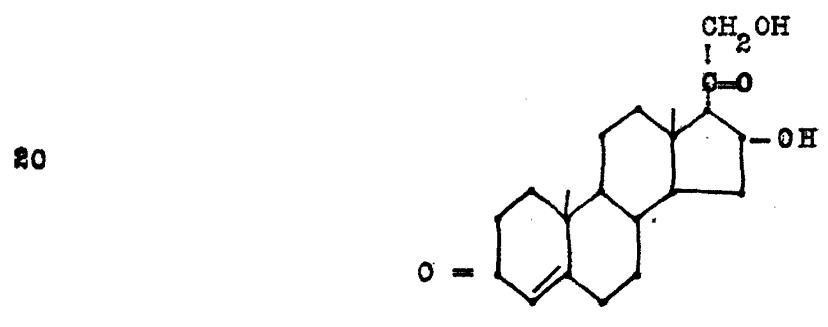
30 Se incorpora 1 gr. de acetato de desoxicorticosterona en 5  
litros del medio de aceite de soja que se ha descrito en el Ejem-



249870

5 plo 5 y se inocula y se incuba dicho medio como se ha descrito en el mencionado ejemplo, durante 5 días. El medio sin filtrar se extrae con tres porciones de 5 litros de cloroformo, el disolvente se evapora del extracto y el residuo se reparte entre benceno y agua. Por purificación posterior, la fase acuosa da un derivado oxidado de desoxicorticosterona, según se observa por la movilidad en la cromatografía de reparto en papel de filtro, utilizando los métodos de Zaffaroni.

10 El gramo de acetato de desoxicorticosterona citado da 685 mg., aproximadamente, de esteroides brutos. La cromatografía sobre 17 gr. de gel de sílice da en los eluatos de benceno-cloroformo 1:1, cloroformo y 5% de acetona en cloroformo un material amorfo. La elución con 10 % de acetona en cloroformo proporciona una fracción cristalina (aproximadamente 130 mg.) a partir de la cual se aísla 16 $\alpha$ -hidroxi-11-desoxicorticosterona pura, que tiene la fórmula de estructura



25 con un rendimiento aproximadamente de 4% (calculado sobre el material de partida). P. de f. 202-203 $^{\circ}$  C.;  $[\alpha]_D^{23} + 130^{\circ}$  (C, 0,40 en cloroformo). Su espectro infrarrojo es idéntico al de una muestra preparada por fermentación con *S. roseodromogenus* (Waksman No.3689) (ver ejemplo 14).

249870



La elución subsiguiente de la columna con acetona en cloroformo al 20 % da unos 150 mg. de material que, después de cristalización repetida de acetona funde a 215-217° C.;  $[\alpha]_D^{25} + 44^\circ$  (c, 0,23 en cloroformo). No hay absorción a 240 m $\mu$

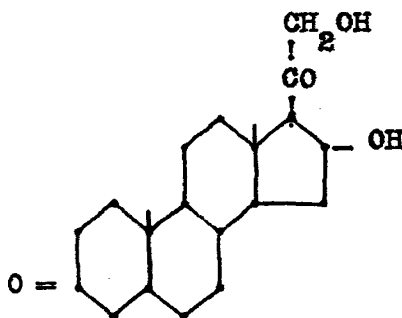
5

$$\lambda_{\text{máx.}}^{\text{Nujol}} 2,98 \mu$$

(OH), 5,88 $\mu$  (ceto-carbonilo).

La sustancia probablemente representa 4,5-dihidro-16 $\alpha$ -hidroxi-11-desoxicorticosterona, que tiene la fórmula de estructura

10



15

Se acetilan 10 mg. de este material con piridina-anhídrido acético. El producto de acetilación resultante después de cristalización desde éter-hexano funde a 130-132° C. y tiene  $[\alpha]_D^{25} + 55^\circ$  (c, 0,36 en cloroformo). Análisis: Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>: C, 69,42; H, 8,39. Encontrado: C, 68,96; H, 8,46.

20

#### EJEMPLO 7

Conversión de pregnenolona en su derivado oxidado por fermentación con Streptomyces argenteolus ATCC 11.009.

25

Se incorporan 100 mg. de pregnenolona en 500 ml. del medio de aceite de soja descrito en el Ejemplo 5 y se inocula e incuba dicho medio según se ha descrito en el mencionado ejemplo, durante 3 días. El medio sin filtrar se extrae una vez con 500 ml. de

249870

27 JUN 63

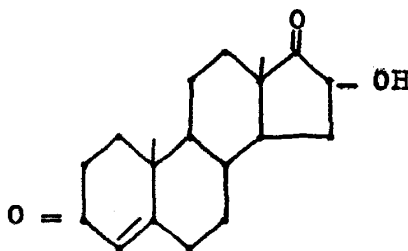


5 cloroformo y luego con 250 ml. del mismo disolvente, y el extracto se trate después dando una mezcla de derivados oxidados de pregnenolona; probablemente  $16\alpha$ -hidroxiprogesterona y progesterona (tomando como base la cromatografía de reparto sobre papel de filtro).

EJEMPLO 8

10 Conversión de androstenodiona en  $16\alpha$ -hidroxi- $\Delta^4$ -androsteno-3,17-diona por fermentación con *Streptomyces argenteolus* ATCC 11.009.

15 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 5, sustituyendo el acetato del compuesto S por  $\Delta^4$ -androsteno-3,17-diona, se obtiene  $16\alpha$ -hidroxi- $\Delta^4$ -androsteno-3,17-diona, que tiene la fórmula de estructura



20 Su espectro infrarrojo es idéntico al de la muestra preparada por fermentación con *S. roseochromogenus* (Waksman No.3689) (ver Ejemplo 17).

25 En los ejemplos antes indicados, el esteroide se incluye en el medio de fermentación antes de inoculación con el microorganismo; pero puede añadirse después de la inoculación, e incluso después de que ha tenido lugar un desarrollo sustancial del microorganismo, según se aclara por el Ejemplo siguiente. Cuando se desea una fase intermedia de oxidación, como por ejemplo progesterona en vez de  $16\alpha$ -hidroxiprogesterona, se favorece por un periodo  
30 de fermentación más breve.



249870

EJEMPLO 9

Se prepara un medio acuoso de la siguiente composición, y se distribuye, se esteriliza, se inocula y se incuba como se describió en el Ejemplo 1:

Harina de soja .....	gr.	15
Glucosa .....	gr.	10
Aceite de soja .....	gr.	2
Agua .....	litro	1

Después de incubar durante 1 día, se agrega pregnenolona a cada matraz en la proporción de 200 mg./litro de medio; y después se incuba el medio durante 6 horas y el medio reunido se extrae luego con 3 porciones de un litro de cloroformo. Los extractos clorofórmicos reunidos contienen aproximadamente 190 mg. de progesterona.

En los ejemplos indicados anteriormente, el esteroide se convierte por inclusión en un cultivo aeróbico del microorganismo; pero esta conversión puede realizarse también poniendo en contacto el esteroide y aire en una suspensión acuosa del microorganismo no-propagador (o juntando el esteroide, aire y enzimas del microorganismo en un medio acuoso exento de células), según se aclara por el ejemplo siguiente:

EJEMPLO 10

El cultivo de 2 días de Streptomyces argenteolus ATCC 11.009 descrito en el Ejemplo 1, se centrifuga, se suspende nuevamente en agua destilada, se vuelve a centrifugar y se pone nuevamente en suspensión en agua destilada. Se colocan partes alícuotas de 40 ml. de la suspensión en matraces Erlenmeyer de 125 ml., se agrega a cada frasco 10 mg./litro de un polioxietilenoéter de un ester parcial de ácido graso elevado de sorbitan (por ejemplo Tween) y 200 mg./li-

249870

27



tro de pregnenolona, y se agitan los matraces (en un agitador de vaivén), a 25° C. durante 24 horas. La pregnenolona añadida se transforma casi cuantitativamente en progesterona que puede recuperarse por extracción con cloroformo.

5 Los ejemplos que anteceden utilizan todos Streptomyces argenteolus ATCC 11.009 como organismo oxidante. Sin embargo, pueden utilizarse otros organismos, según se explica por los ejemplos siguientes:

EJEMPLO 11

10 Conversión de progesterona en 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona por fermentación con Streptomyces roseochromogenus (Waksman No. 3689).

Se prepara un medio acuoso de la siguiente composición:

15

Nutriente de harina de soja .....	gr.	15,0
Glucosa .....	gr.	10,0
Aceite de soja .....	gr.	2,2
Progesterona .....	gr.	0,5
CaCO <sub>3</sub> .....	gr.	2,5
Agua .....	litro	1

20 El pH del medio se adapta a  $7,0 \pm 0,1$ . Se distribuyen porciones de 100 ml. del medio en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Se tapan los matraces con algodón y se esterilizan del modo usual (en autoclave). Cuando están fríos, se inocula cada uno de los

25 matraces con 5-10 % de un inoculum vegetativo de S.roseochromagenus (Waksman No.3689). Se mantienen los matraces a unos 25° C. y se agitan mecánicamente. Después de 3 días de fermentación, se junta el contenido de 6 matraces, se acidifica a un pH  $4 \pm 0,2$  con ácido sulfúrico y se filtra en un embudo Buchner. El caldo

30 filtrado se extrae con cuatro porciones de 300 ml. de cloroformo,



249870

5 dando, después de eliminar el disolvente en vacío, unos 200 mg. de esteroides brutos, que cristalizan por reposo. La recristalización de etanol da unos 30 mg. de  $16\alpha$ -hidroxi-progesterona pura. P. de f.  $223-225^{\circ}$  C.;  $[\alpha]_D + 152^{\circ}$  (c, 0,5 en cloroformo) indican que es idéntico con una muestra auténtica por el punto de fusión mixto y por la comparación del espectro infrarrojo.

#### EJEMPLO 12

10 Conversión de progesterona en  $16\alpha$ -hidroxiprogesterona por fermentación con *Streptomyces viridis* (Waksman No. 3690)

15 Se sigue el procedimiento del Ejemplo 11, sustituyendo *S. roseochromogenus* por *S. viridis* (Waksman No. 3690). Partiendo de 300 mg. de progesterona resultan unos 115 mg. de esteroides brutos. La cromatografía sobre 2,3 gr. de alúmina da en el eluato de 10 % de cloroformo-90 % de benceno,  $16\alpha$ -hidroxiprogesterona que, después de recristalización de etanol, funde a  $224-226^{\circ}$  C;  $[\alpha]_D^{25} + 152^{\circ}$  (C, 0,50 en cloroformo). El rendimiento es aproximadamente 45 mg. Su espectro infrarrojo es idéntico al de una muestra auténtica.

#### EJEMPLO 13

20 Conversión de progesterona en  $16\alpha$ -hidroxiprogesterona por fermentación con *Streptomyces olivaceus* (Waksman No. 3688).

25 Las operaciones de fermentación y aislamiento son las mismas que en el Ejemplo 11, sustituyendo *S. roseochromogenus* por *S. olivaceus* (Waksman No. 3688).

30 Un gramo de progesterona da unos 440 mg. de esteroides brutos que cristalizan espontáneamente. La recristalización de acetona da unos 66 mg. que funden a  $218-220^{\circ}$  C. Este último punto de fusión se eleva a  $225-227^{\circ}$  por cristalizaciones sucesivas desde el

249870



mismo disolvente;  $[\alpha]_D^{24} + 158^\circ$  (c, 0,645 en cloroformo). El espectro infrarrojo de este material es idéntico al de una muestra auténtica de  $16\alpha$ -hidroxiprogesterona.

EJEMPLO 14

Conversión de desoxicorticosterona en  $16\alpha$ -hidroxi-11-desoxicorticosterona por fermentación con *Streptomyces roseochromogenus* (Waksman No.3689).

El medio acuoso es el mismo que el del ejemplo 11, sustituyendo la progesterona por 900 mg. de desoxicorticosterona. La operación de fermentación es la misma que en el Ejemplo 11. El filtrado de cultivo de 18 matraces se reúne y se extrae cuatro veces con 900 ml. de cloroformo. La evaporación del cloroformo deja unos 690 mg. de esteroides brutos que después de eliminar la grasa por distribución entre 20 ml. de hexano y 20 ml. de metanol acuoso al 80 %, da unos 630 mg. de esteroide exentos de grasa. La cristalización repetida desde acetona proporciona unos 220 mg. de  $16\alpha$ -hidroxi-11-desoxicorticosterona pura que funde a  $201-203^\circ$  C.;  $[\alpha]_D^{23} + 129^\circ$  (c, 0,39 en cloroformo);

$$\lambda \begin{array}{l} \text{alc. } 2,39 \mu \\ \text{máx.} \end{array}$$

$$(e = 18.700) 290 \mu (e = 148);$$

$$\lambda \begin{array}{l} \text{Nujol} \\ \text{máx.} \end{array} 2,91 \mu$$

y  $2,98 \mu$  (OH);  $5,80 \mu$  (20-cetona),  $6,04 \mu$  y  $6,07 \mu$  ( $\Delta^4$ -3-cetona).

Análisis: Calculado para  $C_{21}H_{30}O_4$  (346,45) C, 72,88; H, 8,73.

Encontrado: C, 72,85; H, 8,87.



21  
249870

EJEMPLO 15

Conversión de desoxicorticosterona en 16 $\alpha$ -hidroxi-11-desoxicorticosterona por fermentación con *Streptomyces viridis* (Waksman No.3690).

5 Siguiendo los procedimientos de fermentación y aislamiento del Ejemplo 14 pero sustituyendo *S. roseochromogenus* por *S. viridis* (Waksman No.3690), se obtiene un rendimiento de 34 %, aproximadamente, de 16 $\alpha$ -hidroxi-11-desoxicorticosterona, según se determina por comparación cromatográfica en papel cuantitativa con 16 $\alpha$ -hidroxi-11-desoxi-corticosterona en un sistema benceno-etanol-agua.

EJEMPLO 16

15 Siguiendo el procedimiento de fermentación y aislamiento del Ejemplo 14, se convierte desoxicorticosterona en 16 $\alpha$ -hidroxi-11-desoxicorticosterona con rendimiento de 20 %, empleando *S. olivaceus* (Waksman No.3688).

EJEMPLO 17

20 Conversión de androstenodiona en 16 $\alpha$ -hidroxiandrostenodiona (16 $\alpha$ -hidroxi- $\Delta^4$ -androsten-3,17-diona) por fermentación con *Streptomyces roseochromogenus*.

25 Utilizando el medio y el método del Ejemplo 1, sustituyendo la progesterona por androstenodiona, se fermentan 800 mg. de androstenodiona con *S. roseochromogenus* durante 66 horas.

30 El caldo filtrado se extrae con cloroformo y se aíslan aproximadamente 789 mg. de esteroides y lípidos. El producto bruto cristaliza. Se tritura con hexano para eliminar los lípidos. Se obtiene 16 $\alpha$ -hidroxiandrostenodiona (unos 200 mg.) por recristalización desde acetona-éter. P. de f. 185-187<sup>o</sup> C.  $[\alpha]_D + 194^o$



249870

(c, 0,42 en cloroformo)

$\lambda$   $\frac{\text{EtOH}}{\text{máx.}}$  239 m  $\mu$

(e = 17.000), 300 m  $\mu$  (e = 145).

5

$\lambda$   $\frac{\text{Nujol}}{\text{máx.}}$  3,01  $\mu$

5,72  $\mu$ , 6,08  $\mu$ , 6,22  $\mu$ . Este compuesto da positiva la reacción de Tollen y también da positiva la reacción con cloruro de 2,4,5-trifeniltetrazolio en KOH metanólico. Valorando con metaperyodato de sodio, se consumen 1,09 moles del reactivo. Esto indica la presencia de un grupo  $\alpha$ -cetal. Análisis:  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_3$  (302,40): C, 75,46; H, 8,67. Encontrado: C, 75,68; H, 8,59. Acetato: una solución de 16 $\alpha$ -hidroxi- $\Delta^4$ -androsteno-3,17-diona (27 mg.) en 1 ml. de piridina seca y 1 ml. de anhídrido acético se deja en reposo a la temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se evapora a sequedad en vacío y el residuo cristalino se recrystaliza de etanol-éter. P. de f. 177-180° C.,  $[\alpha]_D^{25} + 137^{\circ}$  (c, 0,39 en cloroformo) Análisis:  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4$  (344,44) C, 73,22; H, 8,19. Encontrado: C, 73,38; H, 8,09.

10

15

20

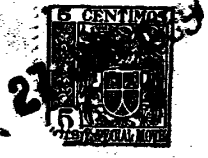
EJEMPLO 18

Siguiendo los procedimientos de fermentación y aislamiento del Ejemplo 17, se convierte androstenodiona en 16 $\alpha$ -hidroxi- $\Delta^4$ -androsteno-3,20-diona por los siguientes microorganismos:

25

Rendimiento por ciento

<u>S. Olivaceus</u> (Waksman No.3688) .....	< 1
<u>S. viridis</u> (Waksman No. 3690) .....	28



249870

La testosterona se ha convertido en  $16\alpha$ -hidroxitestosterona por fermentación con S. rosechromogenus, S. viridis, y S. olivaceus.

5 Pueden usarse para los fines de esta invención otros medios distintos de los explicados en los Ejemplos anteriores. Como es natural, el único requisito es que sean medios que soporten el desarrollo oxidante de Streptomyces. El contenido de vitamina B-12 del medio puede recuperarse por los procedimientos corrientes para recuperación a partir de Streptomyces. Hay que  
10 mantener un suministro adecuado de aire (estéril) durante la fermentación, que puede hacerse de la manera corriente para realizar las fermentaciones oxidantes, es decir, exponiendo una gran superficie del medio a la acción del aire o por cultivo aireado sumergido. El tiempo de incubación puede determinar el grado de  
15 oxidación. Así, por ejemplo, la pregnenolona parece que se oxida primero a progesterona y, por incubación posterior, esta última se convierte en  $16\alpha$ -hidroxiprogesterona. La incubación puede detenerse, como es natural, en un momento en que el medio contenga la concentración máxima de progesterona, si es este el producto  
20 que se busca.

La  $16\alpha$ -hidroxi-desoxicorticosterona producida en los ejemplos 6, 14, 15 y 16 puede convertirse en su correspondiente éster de ácido carboxílico acilando según se explica en los ejemplos siguientes:

25

EJEMPLO 19

Diacetato de  $16\alpha$ -hidroxi-desoxicorticosterona

Se prepara el diacetato de  $16\alpha$ -hidroxi-11-desoxicorticosterona tratando 10 mg. de dicho material con piridina y anhídrido acético. La recristalización del producto de acetilación bruto



249870

desde acetona-hexano da agujas de p. de f. 151-153° C.  $[\alpha]_D^{23} + 105^\circ$  (c, 0,46 en cloroformo). Análisis: calculado para:  $C_{25}H_{36}O_6$  (430,52): C, 69,74; H, 7,96. Encontrado: C, 69,53; H, 8,25.

EJEMPLO 20

5

21-mono-benzoato de 16 $\alpha$ -hidroxi-desoxicorticoesterona

10

15

20

25

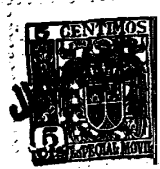
Se disuelven 166 mg. de 16 $\alpha$ -hidroxi-11-desoxicorticoesterona en 2 ml. de piridina seca, se enfría a 5° C. y se hace reaccionar con 80 mg. de cloruro de benzoilo (equivalentes 1:1) en 2 ml. de cloroformo. La mezcla se deja en reposo durante la noche en una nevera. El exceso de cloruro de benzoilo se destruye con hielo y, después de diluir con cloroformo, se lava la solución resultante con ácido clorhídrico diluído, bicarbonato sódico diluído y finalmente con agua. La evaporación del cloroformo en vacío deja unos 215 mg. de una mezcla constituida principalmente por el 21-benzoato deseado, así como pequeñas cantidades de materiales de partida inalterados y de su dibenzoato. Para eliminar el material de partida inalterado, se disuelve la totalidad de la mezcla en 10 ml. de dioxano y se añaden 200 mg. de  $HIO_4 \cdot 2H_2O$  en 2 ml. de agua. Después de reposo durante la noche, se destruye el exceso de  $HIO_4$  por adición de unas gotas de glicerina, la mezcla se recoge en 40 ml. de cloroformo y se separa la capa acuosa. La capa cloroformo-dioxano se extrae con una solución saturada de bicarbonato sódico, se lava con agua, se seca sobre sulfato sódico y se evapora a sequedad en vacío. El residuo (unos 187 mg.) después de recristalización de acetona-éter da el 21-benzoato puro, p. de f. 210-212°C.;  $[\alpha]_D + 129^\circ$  (c = 0,325 en cloroformo).

$\lambda$  Nujol máx. 2,90  $\mu$

30

5,78  $\mu$ , 5,82  $\mu$ , 6,06  $\mu$ , 6,23  $\mu$ , 6,33  $\mu$ , 14,04  $\mu$ . Análisis: calculado para  $C_{28}H_{34}O_5$  (450,55): C, 74,64; H, 7,61. Encontrado: C, 74,43; H, 7,81.

249870 21



EJEMPLO 21

21-mono-acetato de 16 $\alpha$ -hidroxi-desoxicorticoesterona

Sobre una solución de 270 mg. de 16 $\alpha$ -hidroxi-11-desoxi-  
 corticoesterona en 5 ml. de piridina seca, se agregan 125 mg. de  
 anhídrido acético en 5 ml. de piridina. Después de reposo a la  
 temperatura ambiente durante 4 horas se evapora la mezcla a se-  
 quedad en vacío dejando un residuo que pesa unos 407 mg. Este  
 residuo está constituido principalmente por el 16 $\alpha$ -hidroxi-  
 desoxicorticoesterona-21-acetato deseado [  $\Delta^4$ -pregneno-16 $\alpha$ , 21-  
 diol-3,20-diona 21-acetato ] contaminado por algo de material de  
 partida inalterado y algo de 16 $\alpha$ , 21-diacetato. Para eliminar  
 el material de partida inalterado, se disuelve la mezcla en 15 ml.  
 de dioxano y se oxida con 450 mg. del HIO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O en 5 ml. de agua.  
 Después de 12 horas a la temperatura ambiente, se destruye el ex-  
 ceso de ácido peryodico con unas pocas gotas de glicerina y la  
 solución se diluye con un volúmen igual de cloroformo. La capa  
 acuosa se separa y el cloroformo-dioxano se lava con bicarbonato  
 saturado y con agua. Después de evaporación de los disolventes,  
 se obtienen unos 294 mg. de acetatos cristalinos.

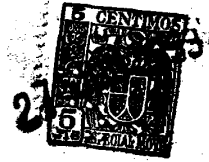
Una pequeña muestra de la mezcla anterior de 21-monoacetato  
 y de 16 $\alpha$ , 21-diacetato se recrystaliza tres veces de acetona-  
 hexano y da el monoacetato, p. de f. 206-208, 5° C. [  $\alpha$  ]<sub>D</sub> +112° (c, =  
 0,31 en cloroformo);

$\lambda$  etanol máx. 239 m $\mu$

(c = 18.200). Análisis: calculado para C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub> (388,49); C, 71,10;  
 H, 8,30. Encontrado: C, 71,30; H, 8,17.

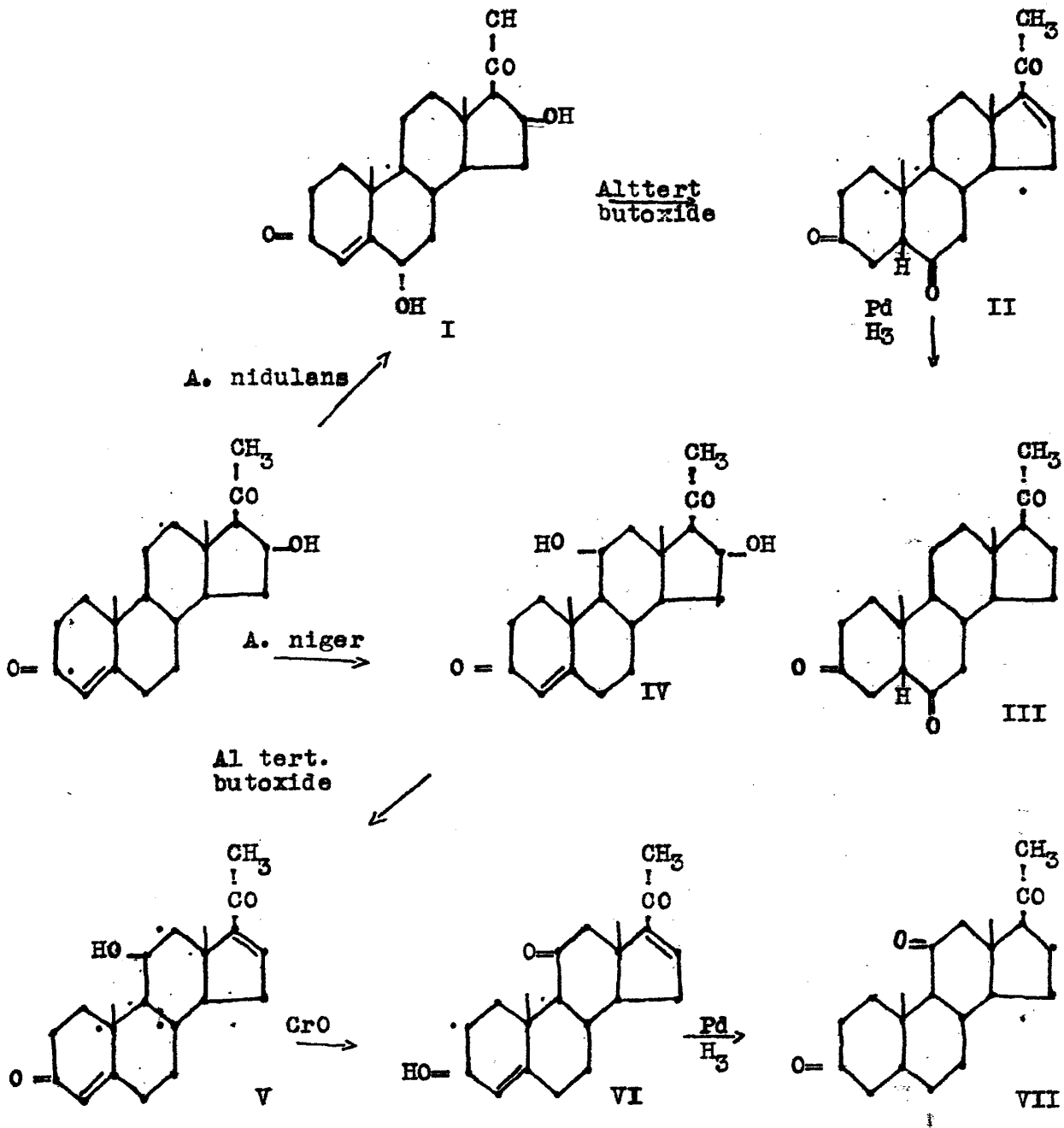
Puede oxidarse 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona por medio de un As-  
 pergillus, según se explica en la solicitud de patente de E.U. de  
 Fried y colaboradores, No. de Serie 296.256, depositada el 28 de

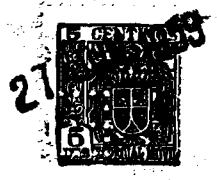
249870



junio de 1952, y los productos oxigenados así obtenidos pueden tratarse después para formar los esteroides conocidos: alopregna-  
no-3,6,20-triona (si el hongo es Aspergillus nidulans) y pregnano  
3,11,20-triona (11-ceto pregnanodiona) (si el hongo es Aspergillus  
niger), como se explica con más detalle por el siguiente esquema:

5





249870

EJEMPLO 22

6 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxiestero-3,20-diona (I) por fermentación de 16 $\alpha$ -hidroxiestero-3,20-diona con Aspergillus nidulans.

Se prepara un medio acuoso de la siguiente composición:

5	Sólidos de licor de maceración de maiz .....	gr.	3,0
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	gr.	3,0
	CaCO <sub>3</sub> .....	gr.	2,5
	Aceite de soja .....	gr.	2,2
	16 $\alpha$ -hidroxiestero-3,20-diona .....	gr.	0,3
10	Agua .....	litros	1

El pH del medio se ajusta a 7,0  $\pm$  0,1. Se distribuyen porciones de 100 ml. del medio en matraces Erlenmeyer de 500 ml., y los matraces se tapan con algodón y se esterilizan de la manera usual (en autoclave). Cuando están frios, se inocula cada uno de los matraces con 5-10 % de un inoculum vegetativo de Aspergillus nidulans, que se ha desarrollado durante 48-72 horas sobre un medio de azúcar moreno-sólidos de líquido de maceración de maiz, y se mantienen los matraces a 25<sup>o</sup> C., agitando mecánicamente. Después de 3 días de fermentación, se reúne el contenido de los matraces, se acidifica a pH 4  $\pm$  0,2 con ácido sulfúrico y se filtra, separando así el micelio del medio fermentado. Los esteroides se eliminan extrayendo el filtrado con cloroformo.

Partiendo de 850 mg. de 16 $\alpha$ -hidroxiestero-3,20-diona, se obtienen unos 827 mg. de esteroides brutos exentos de grasa. La cristalización desde acetona da 6 $\beta$ , 16 $\alpha$ -dihidroxiestero-3,20-diona (I) con rendimiento aproximado de 30 %. P. de f. 230-232<sup>o</sup> C.; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> 24 + 75<sup>o</sup> (c, 1,0 en cloroformo);



249870

$\lambda_{\text{alc.}}^{\text{alc.}}$  235 m $\mu$   
 $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{alc.}}$

( $n = 10.800$ )

$\lambda_{\text{máx.}}^{\text{Nujol}}$  2,91  $\mu$

5

(OH); 5,90  $\mu$  y 5,95  $\mu$  (20-cetona); 6,00  $\mu$ , 6,04  $\mu$  y 6,16  $\mu$  ( $\Delta^4$ -3-cetona).

Se obtiene una cantidad adicional de producto puro por cromatografía de las aguas madres sobre alúmina lavada con ácido sulfúrico.

10

EJEMPLO 23

$\Delta^{16}$ -alopregneno-3,6,20-triona (II)

15

Sobre una solución de 6 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxiprogesterona (102 mg.) en 15 ml. de tolueno y 3 ml. de ciclohexanona, que se ha secado a fondo expulsando por destilación unos 5 ml. de tolueno, se añaden 300 mg. de butóxido terciario de aluminio. La solución resultante se calienta a reflujo durante media hora. Sobre la mezcla enfriada se añade ácido clorhídrico 2 N y cloroformo. La fase clorofórmica se extrae sucesivamente con ácido 2 N, bicarbonato y agua y se seca sobre sulfato sódico. La evaporación del disolvente y el exceso de ciclohexanona en alto vacío deja un residuo (unos 594 mg.) que contiene todavía productos de ciclohexanona condensados de alto punto de ebullición. El aceite se disuelve en 15 ml. de benceno y 3 ml. de hexano y se cromatografía sobre alúmina lavada con ácido sulfúrico. Los 15 primeros ml. eluyen principalmente material aceitoso seguido de 360 ml. de una fracción cristalina (unos 60 mg.) que, después de recristalización de acetona-hexano, funde a 204-211 $^{\circ}$  C.  $[\alpha]_D^{24} + 33$  (c, 0,65 en cloroformo);

20

25



249870

$\lambda_{alc.}$   
 $\lambda_{m\acute{a}x.}$  237m $\mu$

( $e = 9500$ ). Análisis: calculado para  $C_{21}H_{28}O_3$  (328,43); C, 76,79, H, 8,59. Encontrado: C, 76,83; H, 8,46.

5

EJEMPLO 24

Alopregnano-3,6,20-triona (III)

Una solución de 21 mg. de  $\Delta^{16}$ -alopregneno-3,6,20-triona (II) en 2 ml. de ácido acético glacial se hidrogena en presencia de 15 mg. de negro de Pd. Después de 30 minutos han sido absorbidos 3,5 ml. (aproximadamente dos equivalentes molares) de hidrógeno. Para re-oxidar los grupos hidroxilo secundarios que puedan haberse formado en la reducción, se trata la solución en ácido acético con 5 mg. de  $CrO_3$  en 1 ml. de ácido acético durante 30 minutos. El exceso de  $CrO_3$  se destruye por adición de metanol y la mezcla de oxidación se concentra a pequeño volumen. El residuo se distribuye entre cloroformo y agua, la solución clorofórmica se extrae con bicarbonato diluido y agua y el disolvente se elimina en vacío. El residuo cristalino resultante después de re-cristalización de acetona funde a 223-228° C.

10

15

20

El punto de fusión no disminuye al mezclar alopregnano-3,6-20-triona auténtica de p. de f. 224-230° C. y el espectro infrarrojo de las dos muestras es idéntico.

EJEMPLO 25

11 $\alpha$ , 16 $\alpha$ -dihidroxiprogesterona (IV) por fermentación de 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona con *Aspergillus niger*.

25

Se repite el procedimiento del Ejemplo 22, empleando *Aspergillus niger* en lugar de *Aspergillus nidulans*. Se aumenta el tiempo de contacto a 4 días. Un gramo de 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona

30



249870

da unos 982 mg. de esteroides exentos de grasa. La digestión con acetona da una fracción cristalina (aproximadamente 483 mg.) que, después de recristalización de acetona, funde a 213-215° C.;  $[\alpha]_D^{23} + 128^\circ$  (c, 1,03 en cloroformo);

5

$\lambda_{\text{alc.}}^{\text{alc.}}$  240m $\mu$

(e = 14.400) ;

$\lambda_{\text{Nujol}}^{\text{Nujol}}$  2,98 $\mu$

10

(OH), 5,86 $\mu$  (20-cetona), 6,02 $\mu$  y 6,19 $\mu$  ( $\Delta^4$ -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, 73,11; H, 8,79.

La cristalización de las aguas madres de la digestión en acetona da algo de 16 $\alpha$ -hidroxiprogesterona inalterada.

15

EJEMPLO 26.-

11 $\alpha$ -hidroxi-16-deshidroprogesterona (V)

De una solución de 102 mg. de 11 $\alpha$ , 16 $\alpha$ -dihidroprogesterona (IV) en 20 ml. de tolueno seco, se separan por destilación 5 ml. del disolvente para eliminar los últimos vestigios de humedad. Después de adición de 300 mg. de butóxido terciario de aluminio, se calienta a reflujo la solución durante 30 minutos. Después de enfriar, se añade HCl 2N y cloroformo. El extracto cloroformo-tolueno se lava con ácido clorhídrico 2N, con agua, con bicarbonato diluido y otra vez con agua y luego se evapora a sequedad en vacío. El residuo (aproximadamente 96 mg.) por cristalización de acetona-hexano da racimos de agujas que funden a 169-174° C;  $[\alpha]_D^{24} + 138^\circ$  (c, 0,56 en cloroformo);

20

25



249870

$\lambda_{alc.}$  239m $\mu$   
 $\lambda_{m\acute{a}x.}$

(e = 21.900). Análisis: calculado para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> (328,43): C, 76,79; H, 8,59. Encontrado: C, 76,67; H, 8,59.

5

EJEMPLO 27

$\Delta^{4,16}$ -pregnadieno-3,11,20-triona (VI)

A una solución de 16,8 mg. de 11 $\alpha$ -hidroxi-16-deshidroprogesterona (V) en 1 ml. de ácido acético glacial se añade gota a gota una solución de 5 mg. de CrO<sub>3</sub> en 1,5 ml. de ácido acético. Después de reposo a la temperatura ambiente durante 15 minutos, se añade metanol (1,0 ml.) y la solución se trata según se ha descrito en el Ejemplo 24. El residuo semicristalino, después de recristalización de acetona-hexano, funde a 179-183° C.;  $[\alpha]_D^{24} + 246^{\circ}$  (c, 0,85 en cloroformo);

15

$\lambda_{alc.}$  235m $\mu$   
 $\lambda_{m\acute{a}x.}$

(e = 21.800)

20

EJEMPLO 28

Pregnano-3,11,20-triona (VII)

Una solución de 11 mg. de  $\Delta^{4,16}$ -pregnadieno-3,11,20-triona (V) en 2 ml. de ácido acético glacial se hidrogena en presencia de 9 mg. de negro de Pd. Al cabo de una hora han sido absorbidos 3,5 ml. (aproximadamente 4 equivalentes molares) de hidrógeno). Para re-oxidar cualesquiera grupos hidroxilo secundarios que puedan haberse formado en la reducción se trata la solución en ácido acético con 3 mg. de CrO<sub>3</sub> en 1 ml. de ácido acético durante 30 minutos. Se destruye el exceso de CrO<sub>3</sub> por adi-

25

249870 27 JUN



ción de metanol y la mezcla de oxidación se trata como se ha descrito en el Ejemplo 24.

5 El punto de fusión de la pregnano-3,11,20-triona auténtica no disminuyó cuando se mezcló con el residuo cristalino resultante después de haberse recristalizado de acetona y ambos espectros infrarrojos son idénticos.

10 La  $16\alpha$ -hidroxi- $\Delta^4$ -androsteno-3,17-diona producida en los ejemplos 8, 20 y 21, puede degradarse al dimetil ester del ácido  $\Delta^4$ -3-ceto-etibilienico (dimetilester del ácido  $\Delta^4$ -3-ceto-16,17-secoandrosteno-16,17-dicico) de acuerdo con el método del ejemplo siguiente:

#### EJEMPLO 29

15 Degradación de  $16\alpha$ -hidroxilandrostenodiona a dimetilester del ácido  $\Delta^4$ -3-ceto-etibilienico (dimetil ester del ácido  $\Delta^4$ -3-ceto-16,17-secoandrosteno-16,17-dicico).

20 Se disuelven 60 mg. de  $16\alpha$ -hidroxilandrostenodiona en 2 ml. de dioxano puro y se añaden 60 mg. de ácido peryódico, dihidrato, en 0,5 ml. de agua. Después de reposo a la temperatura ambiente durante la noche, se agrega una gota de glicerina seguida de 10 ml. de cloroformo. Se separa la capa acuosa y se lava la fase cloro-  
25 fórmica con agua. La evaporación del cloroformo da unos 67 mg. de un aceite. Este aceite, que representa ácido  $\Delta^4$ -3-ceto-16,17-secoandrosteno-16-al-17-cico, se disuelve en 2 ml. de ácido acético glacial y se añaden gradualmente 0,4 ml. de una solución de  $\text{CrO}_3$  en ácido acético glacial (50 mg./ml.). Después de 15 minutos, se destruye el exceso de  $\text{CrO}_3$  con etanol, se elimina el disolvente en vacío y el residuo se disuelve en cloroformo. La solución cloro-  
30 fórmica se extrae con  $\text{NaHCO}_3$  y este último extracto, después de acidificado con ácido diluido, se extrae con éter. La solución etérea, por evaporación, da unos 52 mg. de un aceite que se esteri-

249870



fica con diazometano en éter. Después de evaporar el éter, se  
 cromatografía el residuo aceitoso sobre 1 gr. de  $Al_2O_3$  (pH 4,5).  
 La columna se lava primero con 75 ml. de 10 % de benceno-hexano,  
 75 ml. de 20 % benceno-hexano y 100 ml. de 50 % benceno-hexano,  
 5 lo que eluye un total de unos 7 mg. de material aceitoso. Después,  
 150 ml. de benceno eluyen unos 15 mg. de material cristalino que,  
 después de recristalización desde hexano da agujas largas, p. de  
 f. 97-99° C.,  $[\alpha]_D + 27^\circ$  (c, 0,34 en cloroformo).

10  $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{EtOH.}}$  239  $m\mu$   
 (e = 17.850), 315  $m\mu$  (e = 92).

La sustancia se identifica como ester dimetílico del ácido  
 $\Delta^4$ -3-ceto-etiobiliénico (ester dimetílico del ácido  $\Delta^4$ -3-ceto-  
 16,17-secoandrosteno-16,17-dioico) por comparación con una mues-  
 15 tra auténtica de esta sustancia preparada como se describe en el  
 siguiente ejemplo.

#### EJEMPLO 30

20 Oxidación Oppenauer del ester dimetílico del ácido  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -  
 hidroxietiobiliénico.

Una solución de 150 mg. de ester dimetílico del ácido  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -  
 -hidroxietiobiliénico en 3 ml. de ciclohexanona y 10 ml. de to-  
 lueno se destila hasta que se ha recogido un total de 3 ml. de  
 destilado. Al residuo de destilación seco de esta manera se agre-  
 25 gan 100 mg. de butóxido terciario de aluminio y la mezcla se ca-  
 lienta a reflujo durante 15 minutos. La mezcla de reacción se re-  
 parte entre cloroformo y ácido clorhídrico diluido y el extracto  
 clorofórmico se lava con agua, bicarbonato diluido y nuevamente  
 con agua. La solución clorofórmica se seca sobre sulfato sódico  
 30 y se evapora a sequedad en vacío. El residuo, (unos 287 mg.) se



249870

5 disuelve en 2 ml. de benceno y 6 ml. de hexano y se cromatogra-  
fía sobre 3 gramos de alúmina lavada con ácido sulfúrico. Los  
20 ml. primeros de benceno-hexano 1:3 eluyen aproximadamente  
125 mg. de productos de condensación aceitosos de ciclohexanona,  
seguidos de en los siguientes 330 ml. por unos 63 mg. de material  
cristalino. La elución subsiguiente con benceno-hexano (1:1,  
110 ml.; 3:1, 100 ml.) y benceno (225 ml.) da cantidades adicionales  
de material cristalino. La recristalización de las fracciones  
cristalinas reunidas desde hexano da ester dimetílico del ácido  
10  $\Delta^4$ -3-cetoetobiliénico puro, p. de f. 100-101° C.,  $[\alpha]_D^{23} + 26^\circ$   
(c, 0,78 en cloroformo)

$\lambda_{alc.}^{alc.}$  238m $\mu$   
 $\lambda_{máx.}^{máx.}$

(e = 16.500),

15  $\lambda_{máx.}^{Nujol}$  5,79 $\mu$

6,03 $\mu$ , 6,20 $\mu$ . Análisis: calculado para C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>: C, 69,63; H,  
8,28. Encontrado: C, 69,67; H, 8,23.

20 La invención puede realizarse de distintas maneras incluí-  
das dentro del alcance de las reivindicaciones que figuran a con-  
tinuación.

N O T A

25 Los puntos de invención propia, no nueva, pero no estable-  
cida, practicada ni divulgada en España, que se presentan para que  
sean objeto de esta solicitud de Patente de Introducción en España  
por DIEZ años, son los siguientes:

249870



5 1.<sup>a</sup>.- Un método de convertir un esteroide en un hidroxiderivado del mismo en posición 16 $\alpha$ , que comprende someter un esteroide seleccionado del grupo constituido por un esteroide de la serie del pregnano y un esteroide de la serie del androstano a la acción de enzimas del microorganismo de la clase constituida por Streptomyces roseochromogenus, Streptomyces viridis, Streptomyces olivaceus y Streptomyces argenteolus, en condiciones oxidantes, y recuperar el 16 $\alpha$ -hidroxiesteroide formado.

10 2.<sup>a</sup>.- El método de la reivindicación 1 en el que el esteroide es de la serie del pregnano.

3.<sup>a</sup>.- El método de la reivindicación 1 en el que el esteroide es de la serie del androstano.

4.<sup>a</sup>.- El método de la reivindicación 1 en el que el esteroide es un 3-ceto-esteroide.

15 5.<sup>a</sup>.- El método de la reivindicación 1 en el que el esteroide es progesterona.

6.<sup>a</sup>.- El método de la reivindicación 1 en el que el esteroide se ha seleccionado del grupo constituido por desoxicorticosterona y sus esteres.

20 7.<sup>a</sup>.- El método de la reivindicación 1 en el que el esteroide es androstenodiona.

8.<sup>a</sup>.- El método de la reivindicación 1 en el que el esteroide es testosterona.

25 9.<sup>a</sup>.- Un método de convertir un esteroide en un hidroxiderivado del mismo.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta y siete hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

27 JUN 1959

P. A.

Alfredo de Elizaburu  
Por Poderes