

RAN 4104/5



MAY. 1964

300117

300117

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

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE RETROESTEROIDES
17-OXIGENADOS", a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE
& CIE. A.G., domiciliada en BASILEA (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un procedimiento para la preparación de retroesteroides 17-oxigenados, y en particular a un procedimiento para la preparación de retroesteroides de la serie androstánica que presentan en

5. posición 17 un grupo hidroxilo u oxo, procedimiento que consiste en someter un 20-cetoesteroide de la serie retropregnánica a la oxidación enzimática aerobia por medio del microorganismo *Fusarium solani*.

La expresión "retroesteroide" se usa en esta

10. descripción para denotar esteroides en los que el grupo

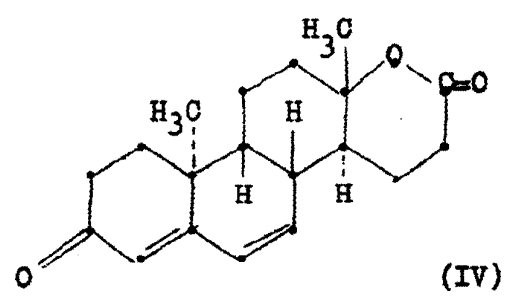
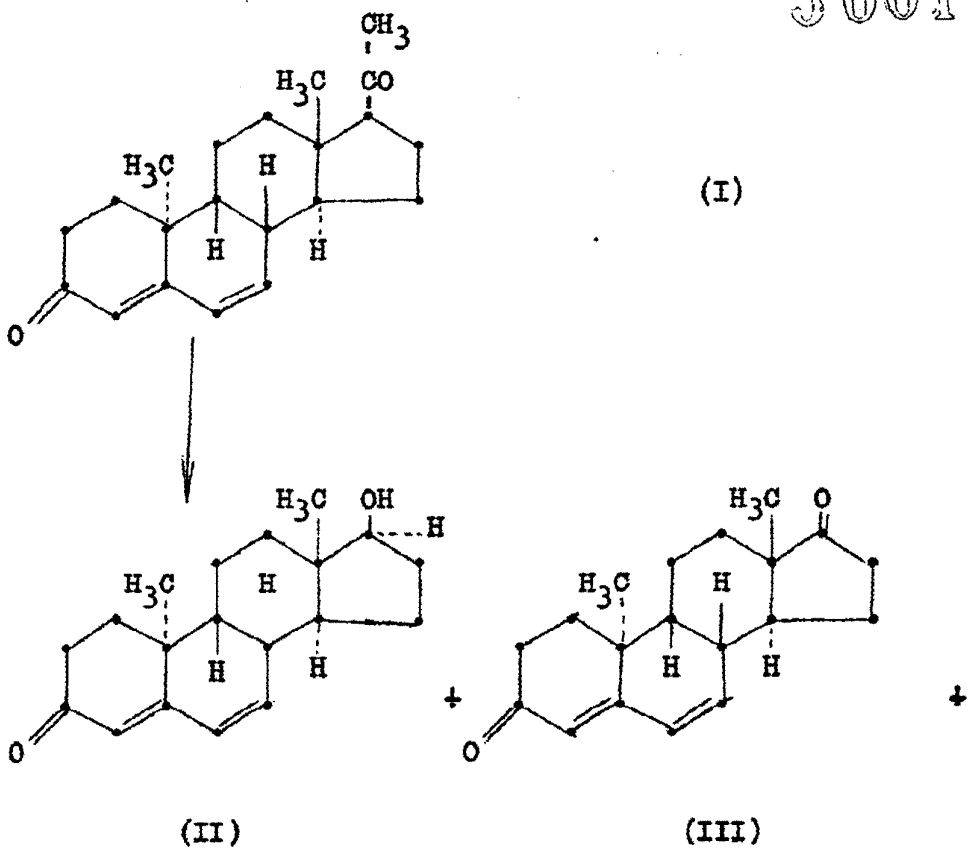


300117

- metílico en posición 10 tienen la configuración alfa y el átomo de hidrógeno situado en el átomo de carbono 9 (o un 9-substituyente) tiene la configuración beta. Los esteroides de la serie pregnánica que tienen configuración retro
5. se designan en consecuencia como retropregnanos o como 9beta,10alfa-pregnanos. Los retroesteroides preparados por el procedimiento aquí expuesto son conocidos en la especialidad. Véase, por ejemplo, la memoria de la patente belga N° 577 615.
10. La acción de las enzimas del *Fusarium solani* (por ejemplo, de la raza micósica registrada con el N° ATCC 12 823) sobre los 20-cetoesteroides de la serie retropregnánica ocasiona la degradación de la cadena lateral 17 para formar un grupo 17-hidroxi o un grupo,
15. 17-oxo. Con acción enzimática más prolongada, puede formarse un anillo delta-lactónico a partir del anillo D del esteroide inicial. Así, por ejemplo, a partir de la delta^{4,6}-9beta,10alfa-pregnadien-3,20-diona (I) (delta⁶-retroprogesterona) pueden obtenerse la delta^{4,6}-9beta-
20. 10alfa-androstadien-17beta-ol-3-ona (II), la delta^{4,6}-9beta,10alfa-androstadien-3,17-diona (III) y la delta⁶-9beta,10alfa-testolactona (IV) mediante incubación con *Fusarium solani*, según el esquema reaccional siguiente:



300117



Sorprendentemente, la oxidación enzimática de los esteroides de la serie retroprognónica que están



300117

hidrogenados en la posición 1,2 no ocasiona deshidrogenación apreciable en la posición 1,2, aún con incubación prolongada, a diferencia de lo que ocurre en la serie pregnánica normal.

5. Los 20-ceto-esteroides de la serie retropegnánica empleados como materiales de partida pueden estar saturados o contener una o más ligaduras dobles; por ejemplo, en una o más de las posiciones 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9(11) y 15, y de preferencia en la posición 4 por lo menos, por ejemplo en la posición 4 solamente o bien en la posición 4 y en una o más posiciones adicionales [como, por ejemplo, adicionalmente en la posición 1, 6, 1,6,9(11) o 6,9(11)]. Los materiales de partida pueden contener, además de un grupo 20-oxo, uno o más substituyentes adicionales en el sistema cíclico y/o en la cadena lateral 17. Ejemplos de tales substituyentes son: grupos oxo libres o protegidos, grupos hidroxil libres o protegidos, átomos de halógeno (como átomos de flúor o cloro) y grupos de alquilo inferior. Un grupo oxo protegido es de preferencia un grupo oxo cetilizado, como por ejemplo el grupo etilendioxo. Un grupo hidroxil protegido es, por ejemplo, un grupo hidroxil esterificado (que está esterificado, por ejemplo, con un ácido carboxílico alifático inferior, monocíclico, aromático o heterocíclico de 5 ó 6 miembros, como el ácido acético, el ácido propiónico, el ácido benzoico o el ácido



300117

- furancarboxílico) o un grupo hidroxilo esterificado, como el grupo tetrahidropirranilo, el bencilo o el grupo trifenilmetoxi. Materiales de partida preferidos son los 20-ceto-esteroides de la serie retropregnánica que presentan un grupo oxo o hidroxilo en la posición 3 y una ligadura doble en la posición 4, por lo menos, como la Δ^4 - 9β , 10α -pregnen-3,20-diona (retroprogesterona) y la $\Delta^{4,6}$ - 9β , 10α -pregnadien-3,20-diona (Δ^6 -retroprogesterona).
10. Como medios nutritivos para el cultivo del *Fusarium solani* pueden emplearse soluciones nutritivas ya de sí conocidas en la especialidad para la producción de este microorganismo; por ejemplo, soluciones nutritivas con un contenido de una fuente de nitrógeno y carbono,
15. lo mismo que de sales inorgánicas. Como fuente de nitrógeno cabe mencionar, a título de ejemplo; las peptonas, el agua de maceración de maíz, los productos de soja, los extractos de levadura, los aminoácidos, los hidrolizados de proteína, los nitratos y las sales amónicas. Los
20. hidratos de carbono asimilables (como la glucosa y la sacarosa) y asimismo los aminoácidos tienen importancia como fuente de carbono. Pueden emplearse también soluciones nutritivas sintéticas.
- El cultivo del microorganismo *Fusarium solani*
25. empleado para la degradación de la cadena lateral según



0117

este invento, se efectúa en condiciones anaerobias, de conveniencia por un procedimiento de sumersión; por ejemplo, en cultivo sacudido o en fermentadores con agitación y ventilación. El procedimiento preferido es el siguiente:

5. Después de la esterilización, se inocula la solución nutritiva, por ejemplo, con un cultivo en matraz agitado, preparado previamente, o una suspensión de esporos de micelio de *Fusarium solani* y luego se sacude o agita durante unas 6 a unas 72 horas, y de preferencia de unas
10. 24 a unas 48 horas, a temperatura de unos 15 a unos 40°C y de preferencia de unos 24 a unos 30°C, con ventilación. Después de este desarrollo previo, se efectúa en condiciones estériles la adición del retroesteroide que se ha de oxidar, en forma de una solución, por ejemplo en acetona,
15. metanol o etanol. El período de incubación puede ser de 1 a 8 días aproximadamente e aún más; por ejemplo, hasta de unos 25 días. El curso de la fermentación puede controlarse tomando muestras y analizándolas mediante cromatografía de capa delgada. El aislamiento de los productos
20. del proceso puede efectuarse de acuerdo con métodos conocidos, como cromatografía, distribución en contracorriente, cristalización fraccionada, etc.

Los productos del procedimiento son conocidos en la especialidad. Asimismo, los productos de este procedimiento son de por sí fisiológicamente activos, poseen actividad anabólica y antiandrógena y resultan útiles como agentes anabólicos y antiandrogénicos. Asimismo son úti-



300117

les como intermediarios para la preparación de otros retroesteroides con actividad fisiológica.

EJEMPLO 1.

5. En un recipiente sacudidor se esterilizan a 120°C, durante 45 minutos, 4 litros de una solución nutritiva que contiene 20 g de sacarosa, 3 g de extracto de levadura, 1 g de glicina, 1 g de nitrato sódico, 1 g de fosfato potásico primario, 0,5 g de sulfato de magnesio, 0,5 g de cloruro potásico y 10 mg de sulfato de hierro por 1000 cc de agua destilada. La solución, cuyo pH es de 5,0, se inocula seguidamente con una suspensión de esporas de micelio obtenida a partir de un cultivo oblicuo, en mosto de cerveza-agar, de *Fusarium solani*. Se sacude mecánicamente la mezcla de fermentación, a 10. 28°C y aireando. Al cabo de 48 horas se añaden 2 g de delta^{4,6}-9beta,10alfa-pregnadien-3,20-diona (delta⁶-retroprogesterona) en 40 cc de acetona. Luego se prosigue el desarrollo del cultivo durante 8 días manteniendo las mismas condiciones.
15. Se combinan dos de los cultivos obtenidos de la manera que se ha descrito y se separa del micelio el caldo de fermentación (en total, 8 litros). Se extrae el caldo de fermentación primeramente con 8 litros de éster acético y luego tres veces todavía con 4 litros de éster acético cada vez.
20. El micelio separado se agita con 3 litros de éster acético y
- 25.



300117

los extractos combinados se lavan con una solución acuosa de sal común al 10%, se secan luego sobre sulfato sódico y por último se concentran a presión reducida.

- El residuo oleoso de la concentración (en total,
5. 4,6 g) se disuelve en 100 cc de éster acético/benceno (1:1) y se trata con 5 g de carbón activado. Después de filtrar en un filtro de tierra de diatomáceas, se obtiene una solución límpida, de color amarillo claro, que a juzgar por el cromatograma de placa (sistemas benceno/acetona 7:3 y 4:1 sobre gel silícico) contienen principalmente delta^{4,6}-9beta,10alfa-androstadien-3,17-diona y delta^{4,6}-9beta,10alfa-androstadien-17beta-ol-3-ona.
- 10.

- El filtrado de color amarillo claro se concentra hasta sequedad, bajo presión reducida, y se comatografía en
15. el sistema benceno/acetona 9:1 sobre 300 cc de gel silícico (Merck, 0,05-0,2 mm). Se recogen 100 fracciones de 10 cc. Cada segunda fracción se examina por cromatografía de placa. Las fracciones coincidentes se combinan y se concentran hasta sequedad bajo presión reducida. Las fracciones 1 a 15 contienen impurezas en pequeña cantidad. Las fracciones 16 a 25 contienen 1,75 g de delta^{4,6}-9beta,10alfa-androstadien-3,17-diona casi pura. Después de dps cristalizaciones a partir de cloruro de metileno/metanol/éter isopropílico, se obtiene esta
20. substancia en estado de pureza analítica, con el punto de fusión 193-196°C; λ_{\max} (U.V.) = 285 milimicras; $\epsilon = 25.700$
- 25.



300117

Las fracciones 30 a 34 contienen 0,21 g de delta^{4,6}-9beta,10alfa-androstadien-17beta-ol-3-ona, de punto de fusión 169-171° (después de dos cristalizaciones a partir del cloruro de metileno/acetona/éster isopropílico). λ_{\max} .

5. (U.V.) = 285 milimicras: $\epsilon = 27.500$.

- De las fracciones 26 a 29 se obtienen, en forma de un aceite amarillo claro, 0,27 g de una mezcla de los compuestos 17-hidroxi y 17-ceto antes citados. Se disuelve el aceite de color amarillo claro en 200 cc de benceno y se le trata con
10. un equivalente de ácido crómico en ácido acético al 5%. Se sacude la mezcla durante 10 horas, se separa luego la fase orgánica, se lava ésta con agua, luego con solución saturada de bicarbonato y otra vez con agua, se seca por último sobre sulfato sódico y se concentra hasta sequedad bajo presión
15. reducida. Se obtienen así otros 0,19 g de delta^{4,6}-9beta,10alfa-androstadien-3,17-diona.

E J E M P L O 2.

20. Cuatro fermentadores provistos de dispositivos agitador se cargan con 6 litros cada uno del medio nutritivo descrito en el ejemplo 1, con adición de un agente antiespumante (aceite de silicona). Después de esterilizar, se inocula el medio nutritivo con un cultivo de *Fusarium solani* en matraz sacudi-
25. do, de 3 días de edad, y se deja desarrollar el cultivo a 28°



3 10117

- C durante 48 horas, con agitación y aireación. Se forma así ya una abundante cantidad de micelio. Se añaden entonces a cada fermentador 1,5 g de delta^{4,6}-9beta,10alfa-pregnadion-3,20-diona (delta⁶-retroprogesterona) en 40 cc de acetona. Cuando
5. la reacción se ha terminado, se interrumpe la fermentación (en este ensayo se requieren tiempos de incubación de 2 a 6 días para la reacción de las cargas individuales). Después de separar el micelio, los caldos de fermentación se extraen y se acaban de elaborar según el procedimiento descrito en el
 10. ejemplo 1 (los diversos extractos brutos no mostraron en el examen por cromatografía de placa ninguna diferencia de composición y por lo tanto fueron combinados). Se obtienen 10,05 g de un aceite amarillo, que se cromatografía en 600 cc de gel silícico. Como eluyente se utiliza benceno/acetona 4:1.
 15. Se recogen fracciones de 25 cc. Las fracciones 1 a 26 contienen impurezas. De las fracciones 28 a 53 se obtiene, por cristalización repetida a partir de cloruro de metileno/metanol/éter isopropílico, 495 mg de delta^{4,6}-9beta,10alfa-androstadion-3,17-diona pura, de punto de fusión 192-195°C. De las frac-
 20. ciones 90 a 105 pueden aislarse, por cristalización fraccionada a partir de cloruro de metileno/metanol y cloruro de metileno/metanol/éter isopropílico, 230 mg de delta^{4,6}-9beta,10alfa-androstadion-17beta-ol-3-ona pura, de punto de fusión 168-170°C. De las aguas madres de estas fracciones puede aislarse,
 25. por ulterior cristalización, la delta⁶-9beta,10alfa-testolac-



300127

tona. Punto de fusión, 192-194°C; $\lambda_{\text{max.}}$ (U.V.) = 286 milimicras; $E = 25.000$.

EJEMPLO 3.

5. 10 matraces de Erlenmeyer de 500 cc se cargan con 100 cc cada uno de una solución nutritiva de la composición indicada en el ejemplo 1, se cierran con tapones de guata y se esterilizan a 120°C durante 20 minutos. Luego se inoculan con una suspensión de esporos de micelio obtenidos de un
10. cultivo oblicuo en agar de *Fusarium solani* sobre mosto de cerveza/agar. Los matraces, provistos de chicanas para mejor aireación, se sacuden a 24-28°C en una máquina sacudidora rotativa. Al cabo de 66 horas de desarrollo, se añaden en condiciones asépticas 20 g por matraz de delta⁴-9beta, 10alfa-preg-
15. non-3,20-diona (retroprogesterona) en 1 cc de acetona. El control de la fermentación por cromatografía de capa delgada, al cabo de 24, 48 y 96 horas, muestra que la retroprogesterona utilizada está ya a las 24 horas desintegrada prácticamente
20. por completo y convertida en la delta⁴-9beta, 10alfa-androsten-3,17-diona.

Se logra el mismo resultado si, procediendo tal como se ha expuesto antes, se emplea en cambio una solución nutritiva que contiene 15 g de peptona, 3 g de residuo seco de agua de maceración de maíz y 50 mg de glucosa en 1000 cc

25. de agua corriente y se ajusta con hidróxido sódico a un pH de



300117

6,5.

EJEMPLO 4.

- 6 litros de una solución nutritiva (15 g de peptona, 3 g de residuo seco de agua de maceración de maíz y 50 mg de glucosa por 1000 cc de agua; ajustada con hidróxido sódico a pH = 6,5), en un fermentador aireado y provisto de agitador, se inoculan, en condiciones estériles y con adición de un antiespumante, con un cultivo de 3 días de *Fusarium solani* en matraz agitado. Al cabo de 46 horas de desarrollo a 28° C, se añaden 1,2 g de delta⁴-9beta,10alfa-pregnen-3,20-diona (retroprogesterona) disueltos en 40 cc de acetona. Después de 48 horas (pH final = 4,6) se filtra el caldo de fermentación y se extrae el filtrado de la manera que se ha expuesto en el ejemplo 1. Se disuelve el extracto bruto en 60 cc de acetona y se le trata en caliente el extracto bruto en 60 cc de acetona y se lo trata en caliente con 1,2 g de carbón activo. Después de filtrar y concentrar, se obtienen 2,28 g de un aceite amarillo. Se disuelve éste en un poco de benceno y se le cromatografía en 400 cc de gel silícico. Se recogen fracciones de 10 cc. Las fracciones 1 a 116 contienen en total 780 mg de impurezas. Las fracciones 117 a 170 (benceno/2% de acetona) contienen 490 mg de delta⁴-9beta,10alfa-androsten-3,17-diona, homogénea según cromatografía de placa. Punto de fusión, 155-



3-0117

156°C (después de recristalización repetida a partir de cloruro de metileno/éter isopropílico); λ_{max} (U.V.) = 241 milimicras; $E = 16.500$. De las fracciones 186 a 244 (benceno/acetona 9:1) se obtienen 540 mg de delta⁴-9beta,10alfa-androsten-17beta-ol-3-ona homogénea. Punto de fusión, 154-155°C (a partir de cloruro de metileno/éter/isopropílico); λ_{max} (U.V.) = 241 milimicras; $E = 16.000$.

E J E M P L O 5.

10.

Se someten a oxidación enzimática del modo expuesto en el ejemplo 4, pero prolongando el período de incubación hasta 7 días (después de añadir esteroide), 1,2 g de delta⁴-9beta,10alfa-pregnen-3,20-diona (retroprogesterona). Se obtienen así 1,12 g de delta⁴-9beta,10alfa-androsten-3,17-diona homogénea (del caldo de fermentación no puede aislarse en este ensayo nada de delta⁴-9beta,10alfa-androsten-17beta-ol-3-ona).

= . =



300117

N O T A

Hecha la descripción del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la demanda de patente suiza núm. 6407/63, depositada el 22 de Mayo de 1.963.

5. 1. Procedimiento para la preparación de retroesteroides 17-oxigenados, caracterizado porque consiste en someter un 20-ceto-esteroide de la serie retropregnánica a la oxidación enzimática aerobia por medio del microorganismo *Fusarium solani*.
10. 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el compuesto inicial de la serie retropregnánica está saturado en la posición 1,2 tiene un grupo ceto en cada una de las posiciones 3 y 20
15. y tiene una ligadura doble en la posición 4,5.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por usarse como material de partida la δ^4 -9beta, 10alpha-pregnen-3,20-diona.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20. 2, caracterizado por usarse como material de partida la



300117

delta^{4,6}-9beta,10alfa-prognadion-3,20-diona.

5. Procedimiento para la preparación de retrocosteroides 17-oxigenados.

5. Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de quince hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 21 de Mayo de 1.964

F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE. A.G.

p. a.

JAIMÉ ISERN
P. P.