

317705



CAS G.222

317705

P A T E N T E
D E
I N V E N C I Ó N

por "UN PROCEDIMIENTO MICROBIOLÓGICO PARA LA PREPARACIÓN DE 3-CETO- $\Delta^{1,4}$ -ESTEROIDES", a favor de la firma italiana SOCIETÀ FARMACEUTICI ITALIA, domiciliada en MILANO (Italia), Largo G. Donegani, 1-2.

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

- Este invento se refiere a un nuevo método para la preparación de 3-ceto- $\Delta^{1,4}$ -esteroides. Más particularmente, el objeto de este invento es un procedimiento microbiológico para introducir un enlace doble en la posición 1 de la molécula de un 3-ceto- Δ^4 -esteroide de la serie del androstano y del pregnano, por medio del nuevo microorganismo Nocardia lucida n. sp. El Nocardia lucida n. sp. se ha depositado en el Institute of Microbiology of the Rutgers University (EE.UU), con el número de clasificación I.K. 3890 y en el Commonwealth Mycological Insti-
- 5.
- 10.

317705



tute, de Ferry Lane, Kew, Surrey (Gran Bretaña) con el número de clasificación I.M.I.

Se sabe que muchos microorganismos del género

Nocardia son capaces de introducir un enlace doble en

5. la posición 1 del núcleo del esteroide (patente inglesa nº 874.188; patente alemana nº 1,093.792; patente francesa nº 1,270.506; y patente india nº 62.483), pero sin embargo no puede concluirse que todos los microorganismos pertenecientes a dicho género sea capaces de esta deshidrogenación, porque se ha comprobado que las razas de *Nocardia rugosa*, *N. brasiliensis*, *N. caprae* y *N. frabosae* no pueden introducir un enlace doble en la posición 1 de la molécula del esteroide.
- 10.

El nuevo microorganismo que se ha empleado en el

15. procedimiento de este invento se llama *Nocardia lucida* n. sp. y pertenece al género *Nocardia trevisan*; es capaz de producir enzimas activas en la deshidrogenación de la posición 1 del núcleo de un 3-ceto- Δ^4 -esteroide para obtener, con gran rendimiento, el correspondiente 3-ceto- $\Delta^{1,4}$ -esteroide.
- 20.

Además, el nuevo microorganismo tiene la sorprendente propiedad de utilizar como fuente de carbono, además de los hidratos de carbono usuales, mezclas de hidrocarburos, de preferencia de los que contienen en la molécula



de 12 a 18 átomos de carbono.

317705

Aspecto microscópico

5. En agar-patata-glucosa en nuevo microorganismo N. lucida forma inicialmente un micelio con hifas muy largas (25-30 micras x 1,0-1,5 micras), aseptatas, con frecuencia ligeramente incurvadas y a veces ramificadas. Al cabo de unas 24 horas, el micelio se fragmenta en células baculiformes de 0,8 por 3 micras.

10. La fragmentación completa en elementos coccoides de 1 micra aproximadamente de diámetro se obtiene tan sólo hacia la 40ª hora de edad. Estos elementos coccoides suelen aparecer característicamente alineados. No se observa micelio aéreo en ningún terreno de cultivo. El micelio es grampositivo y no ácido-resistente.

15. El microorganismo se desarrolla bien a temperatura de 28-30°C y no produce pigmentos solubles en los terrenos de cultivo usuales.

Aspecto macroscópico

20. En la Tabla nº I se reseñan las propiedades culturales observadas en los terrenos que en ella se indican; las observaciones se efectuaron después de 7 días de incubación a 28-30°C.



= 4 =

317705

T A B L A I

	Terreno de cultivo	Desarrollo	Color	Observaciones
5.	Agar Czapek (1)	escaso	de blanqueado a rosa pálido	
	Agar Bennet (1)	abundante, liso y brillante, con bordes netos	rosa salmón	
10.	Agar-glicero-glicina (1)	ninguno	---	
	Agar-patata-peptona-glicerol (1)	muy escaso	rosa salmón muy claro	
15.	Agar-Emerson (1)	abundante, brillante y liso	rosa salmón	
	Agar-almidón-sales (2)	ninguno	---	
20.	Agar-glucosa-extracto de levadura (1)	abundante, liso y brillante	rosa salmón	
	Agar-patata-glucosa (3)	abundante, liso y brillante	rosa salmón	



T A B L A I (continuación)

	Terreno de cultivo	Desarrollo	Color	Observaciones
	Agar-nutricio (1)	cscaso	rosa salmón pálido	
5.	Agar-almidón- -peptona-ex- tracto de buey (1)	discreto	rosa salmón muy claro	no hidroliza el almidón
	Agar-gelatina (1)	discreto	rosa salmón muy claro	no licua la gelatina
10.	Caldo de levadura (1)	Bueno, caldo turbio con precipitado rosa salmón en el fondo	rosa claro	
	Leche (1)	cscaso	incolore	alcaliniza la leche, no hay coagu- los
15.	<p>(1) Waksman S.A. "The Actinomyces", vol. II, pág. 328-334</p> <p>(2) Pridham T.C. Antibiotics Annual 1956-57, pág. 947-953</p> <p>(3) Agar-patata-glucosa: 200 g de patatas peladas, 20 g de glucosa, 20 g de agar y 1000 cc de agua destilada, a</p>			
20.	pH 7,2.			



Propiedades bioquímicas

Almidón: no lo hidroliza

Gelatina: no la licua

5. Nitratos: los reduce a nitritos; buena utilización de los nitratos para el desarrollo

Leche: la alcaliniza ligeramente; no la coagula

Melanina: Producción débil

Indol: no lo produce

10. Tirosina: la descompono

Sulfuro de hidrógeno: positivo

Producción de ácidos: positiva a partir de glucosa, fructosa, sorbitol, glicerol y manitol; negativa a partir de xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, arabinosa e inositol.

- 15.

Utiliza bien para el desarrollo los hidrocarburos antes mencionados. No utiliza el fenol.



= 7 =

317705

Identificación de la especie

- La descripción del microorganismo en examen corresponde a la del género Nocardia Trevisan que figura en Bergey's Manual of Determination Bacteriology (séptima edición, 1957, página 713-715), por lo que puede concluirse que el microorganismo de este invento pertenece al género Nocardia Trevisan. La clave analítica de la especie del género Nocardia de Waksman y Henrici (Waksman S.A.: The Actinomycetes, vol. II, 1961) indica para el microorganismo en examen una posición sistemática cercana al Nocardia rubra, del que difiere por diversas características. A continuación se exponen los datos obtenidos de una comparación entre las propiedades del Nocardia lucida n. sp. y las de las especies conocidas.
- 5.
- 10.
15. La nueva especie Nocardia lucida difiere de:



5. 1) Nocardia rubra a) porque no forma un micelio áspero y opaco de color rojo vivo
- b) porque forma hifas más largas de 10-15 micras
- c) porque produce ácidos a partir del sorbitol
10. 2) N. opaca a) porque en agar-patata-glicerol el micelio no es seco, áspero, arrugado, de color de cuero
- b) porque no forma mechones de hifas aéreas
- c) porque no utiliza el fenol
- d) porque forma hifas mucho más largas (hasta 25-30 micras)
15. 3) N. polychromogenes
- a) porque no forma micelio aéreo blancuzco
- b) porque no forma filamentos ondulados, muy ramificados, de 70 a 100 micras de longitud
20. c) porque no hidroliza el almidón

= 9 =

317705



- 4) N. globerula a) porque no forma filamentos de
1 x 2-9 micras
- b) porque el micelio no es de color
anaranjado a pardo-anaranjado
- c) porque reduce los nitratos
5. 5) N. coeliaca a) porque no forma báculos cortos de
0,8 x 5 micras
- b) porque en agar-patata-glicetol no forma
micelio seco, arrugado y de color ana-
ranjado
10. c) porque reduce los nitratos
- d) porque produce ácidos a partir de la
glucosa y el glicerol
- 6) N. Blackwellii
- a) porque no forma micelio aéreo blanco
15. b) porque en agar-patata no forma colonias
incoloras
- c) porque produce ácidos a partir del
manitol y el sorbitol
- d) porque reduce los nitratos



= 10 =

317705

- 5.
- 7) N. asteroides a) porque no forma micelio amarillo o anaranjado
- b) porque no produce micelio aéreo blanco
- c) porque produce ácidos a partir del manitol
- d) porque descompone los cristales de tirosina
- 10.
- 8) N. leishmanii a) porque no forma micelio aéreo
- b) porque no coagula la leche
- c) porque no es ácido-resistente
- 15.
- 9) N. formica a) porque las hifas del micelio se fragmentan en formas coccoides
- b) porque no forma micelio aéreo
- c) porque no forma pigmento soluble color pardo
- d) porque utiliza la parafina



= 11 =

317705

- 10) N. gardneri a) porque no licua la gelatina
- b) porque produce ácidos a partir de la glucosa y del manitol
- c) porque no presenta micelio de color crema
- 5. d) porque no produce micelio aéreo
- 11) N. crythropolis a) porque presenta hifas más largas de 11 micras (hasta 25-30 micras)
- 10. b) porque forma fragmentos coccoides
- c) porque en agar patata-glicerol no forma micelio seco, áspero y anaranjado
- d) porque produce nitritos a partir de los nitratos
- 15. e) porque produce ácidos a partir de la glucosa y el glicerol



= 12 =

317705

- 12) N. rugosa a) porque no forma película espesa, áspera y plegada, de color crema
- b) porque no coagula la leche
- c) porque no licua la gelatina
5. d) porque reduce los nitratos
- e) porque no produce ácidos a partir de la arabinosa, pero los produce a partir del sorbitol
10. 13) N. brasiliensis
- a) porque no produce micelio aéreo de color de cuero
- b) porque no hidroliza la gelatina
15. c) porque no produce ácidos a partir del inositol
- d) porque en agar-glucosa-extracto de levadura no forma micelio plegado y
20. amarillo



- 14) N. caprae a) porque no forma micelio aéreo
b) porque no produce substancia soluble parda
c) porque no coagula la leche
5. d) porque utiliza la parafina
- 15) N. petroleophila a) porque no forma micelio aéreo blanco
b) porque en agar nutricio no forma colonias amarilloblancuzcas
10. c) porque se desarrolla en la patata
- 16) N. corallina a) porque en agar-patata-glicerol no forma micelio realzado, arruga, seco y de color amarillo pardusco a rojo coral
15. b) porque forma hifas más largas de 10 micras (hasta 25-30 micras)
c) porque no utiliza el fenol
d) porque no forma en la leche una película rojiza
20. c) porque produce ácidos a partir de la glucosa
- 17) N. salmonicolor a) porque en agar nutricio-glucosa no presenta micelio plegado, de color amarillo que vira a rojo anaranjado profundo
25. b) porque produce ácidos a partir de la glucosa y el glicerol
c) porque en patata no forma micelio realzado, verrugoso, friable, brillante, de color de cuero que vira al anaranjado y por último al rojo sangre.
30.



Por lo tanto, se concluye el microorganismo en examen Nocardia lucida n. sp. no se ha aislado ni descrito antes, por lo cual se le debe considerar perteneciente a una especie distinta de las conocidas hasta ahora.

5. Los cultivos de N. lucida pueden guardarse mediante liofilización, utilizando como medio suspensor la leche o el suero de leche. El microorganismo puede conservarse también por cultivos sucesivos sobre slant de agar-patata-glucosa. El invento proporciona un procedimiento microbiológico para preparar 3-ceto- $\Delta^{1,4}$ -esteroides de la serie del androstano y el pregnano, que consiste en tratar un 3-ceto- Δ^4 -esteroide con un cultivo producido por fermentación del nuevo microorganismo Nocardia lucida n. sp. en un medio nutritivo líquido esterilizado que contenga fuentes asimilables de carbono, de nitrógeno y de sales minerales y en extraer luego el 3-ceto- $\Delta^{1,4}$ -esteroide producido de manera conocida. Como fuente de carbón pueden utilizarse el almidón, la dextrina, la malaza, la sacarosa, la glucosa, la maltosa, el glicerol, los aceites vegetales, la harina de cereales o de leguminosas, el corn steep liquor y otras sustancias que suelen emplearse. La fuente de nitrógeno, además de las sustancias complejas que contienen nitrógeno mencionadas antes, pueden ser caseína, sales amónicas, peptonas, harina de carne y de pescado u otras sustancias empleadas de ordinario.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.



Las sales inorgánicas pueden ser sulfatos, fosfatos, nitratos, cloruros de potasio, magnesio, hierro, cobalto, sodio y carbonato de calcio. También es útil añadir sustancias surfactantes, como el emulgente Tween 80 (marca registrada de monooleato de polioxietilensorbitán).

Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que las fuentes de carbono citadas antes pueden substituirse completamente por mezcla de gasoil-parafina bruta. El microorganismo aprovecha preferentemente los hidrocarburos contenidos en la mezcla que tienen de 12 a 18 átomos de carbono en la molécula. Se desarrolla en condiciones de inmersión y agitación en frascos sacudidores o en fermentadores, a temperatura de 24 a 34°C. y preferentemente a 30°C, en un período que va de 30 a 50 horas. el pH del medio debe ser de 7 a 8, y preferentemente de 7,5 a 7,6. Durante la fermentación, el pH se mantiene prácticamente constante.

El esteroide de partida puede añadirse a los cultivos del microorganismo ya sea en forma sólida, ya sea disuelto en un disolvente orgánico apropiado, como alcohol metílico, alcohol etílico, acetona, dimetilformamida y análogos. La incubación se efectúa en las condiciones que se han descrito antes y en un período de 20 a 50 horas.



= 16 = 317705

- La transformación del 3-ceto- Δ^4 -esteroide de partida en el correspondiente 3-ceto- $\Delta^{1,4}$ -esteroide puede seguirse por cromatografía en capas delgadas, tal como han descrito en la literatura Egon Stahl (Pharmac. Weekblad 92, 1957, pág. 829; Chemiker Ztg. 82, 1958, pág. 323) y N.J.O. Van Dam y colaboradores (J. Chromatography 4, 1960, pág. 26). La extracción puede efectuarse por las técnicas conocidas, de preferencia tratando el caldo del cultivo con un disolvente apropiado, como metilisobutilcetona, cloroformo, cloruro de metileno, tricloroetileno y análogos.
- 5.
- 10.

Los ejemplos que siguen ilustran el invento sin limitarlo.



EJEMPLO 1.

$\Delta^{1,4}$ -Pregnadien-17 α ,21-diol-3,11,20-triona

Un cultivo de N. lucida de 3 días de edad sobre agar-patata-glucosa se utiliza para inocular 2 matraces de Erlenmeyer de 300 cc, cada uno de los cuales contiene 50 cc del medio siguiente:

- | | | |
|-----|---|-------|
| | Cloruro potásico | 1 g |
| | Nitrato sódico | 6 g |
| 10. | Sulfato magnésico seco | 0,3 g |
| | Monohidrato de hidrofosfato cálcico | 4,0 g |
| | Heptahidrato de sulfato de hierro | 20 mg |
| 15. | Heptahidrato de sulfato de zinc | 5 mg |
| | Hexahidrato de cloruro de cobalto | 5 mg |
| | Mezcla de gasoil (gravedad específica a 15°C/4°C = 0,8203; punto de inflamación = 72°C) - parafina bruta (densidad a 15°C = 0,891; densidad a 80°C = 0,772; punto de solidificación, 46°C) (1:1) 15 cc. | |

20.

Agua del grifo hasta 1000 cc.



= 18 = 317705

El pH se ajusta a 7,5-7,6 con solución diluida de hidróxido sódico.

Esterilización: 120°C durante 30 minutos.

5. La mezcla de gasoil-parafina bruta se esteriliza previamente por separado y se añade en condiciones estériles al terreno de cultivo. Los matraces se incuban a 30°C, durante 40 horas, en un sacudidor giratorio, que gira a 220 r.p.m. con 60 mm de excentricidad.

10. Luego se añaden a cada matraz 25 mg de Δ^4 -pregnen-17alfa,21-diol-3,11,20-triona disueltos en 1 cc de alcohol etílico y se incuban durante 24 horas más en las condiciones antes descritas. Un examen cromatográfico (sobre capas tenues de gel de sílice, empleando como sistema cromatográfico benceno/acetato de etilo 70:30) muestra

15. la desaparición casi completa del producto de partida y la formación de un producto que tiene un Rf igual al de la $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17alfa,21-diol-3,11,20-triona. La extracción, la cristalización y la identificación se efectúan como sigue: Se combina el contenido de los dos

20. matraces y se los sacude primeramente en un embudo separador, con 50 cc de éter de petróleo; el éter de petróleo se separa y entonces es apartado. Se vuelve a extraer el caldo con metilisobutilcetona, se seca la capa orgánica sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se evapora



= 19 =

317705

- hasta sequedad. El residuo seco se cromatografía en 1 g de gel de sílice y, por elución con 5% de acetato de etilo/éter, se obtiene un producto cristalino, que funde a 230--234°C; $[\alpha]_D^{20} = 170^{\circ}$ (1% en dioxano),
5. λ max 238 milimicras, $E_1^{1\%}$ cm 435, y que es idéntico, cromatográficamente y según el IR, a una muestra de $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17alfa,21-diol-3,11,20-triona. Una prueba cromatográfica demuestra que la transformación es completa y el rendimiento elevado.

10. EJEMPLO 2.

$\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17alfa,21-diol-3,11,20-triona

- Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia de que el medio de fermentación contiene glucosa (60 g/litro) en vez de la mezcla de gasoil-parafina bruta.
15. Una prueba cromatográfica demuestra la desaparición casi completa del producto de partida. Se forma un producto que tiene un R_f igual al de la $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17alfa,21-diol-3,11,20-triona.

= 20 =

317705



EJEMPLO 3.

$\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17alfa,21-diol-3,11,20-triona

5. Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia de que el medio de fermentación tiene la composición siguiente:

Glucosa	20 g
Peptona	5 g
10. Triptona	5 g
Extracto de levadura	5 g
Carbonato cálcico	2,5 g
Agua destilada hasta	1000 cc.

15. Una prueba cromatográfica demuestra la desaparición casi completa del producto de partida y la formación de un producto que tiene un Rf igual al de la $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17alfa,21-diol-3,11,20-triona.

EJEMPLO 4. $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona

5. 500 cc del terreno de cultivo de la composición que se ha expuesto en el ejemplo 1 se esterilizan en matraces de 2000 cc, provistos de 3 entrantes cortacorriente. Se inocula con una suspensión de micelio correspondiente al lavado de medio cultivo de 3 días de edad en Roux de agar-patata-glucosa.
10. Se incuban los matraces a 28°C durante 36 horas en un agitador giratorio a 120 r.p.m. y con excentricidad de 70 mm.
15. 300 cc de este cultivo sirven para inocular 3 litros de medio de la composición que se ha descrito antes, esterilizados en fermentadores de laboratorio de 5 litros.
- La fermentación se efectúa a 30°C y agitando con una hélice de dos palas a la velocidad de 300 r.p.m. y con una aireación de 11 litros por minuto.
20. Al cabo de 48 horas, se añaden 1,5 g de Δ^4 -pregnen-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona disueltos en 60 cc de alcohol metílico y se incuba durante 40 horas más en las condiciones antes descritas. Una prueba cromatográfica en capa delgada de gel de sílice, empleando como sistema



- cromatográfico cloroformo/metanol/agua 92,5:7,5:0,5 muestra la desaparición del material de partida y la formación de un producto que tiene un Rf igual al de la prednisolona. Existe además, en vestigios, un producto con un Rf igual al del derivado 20beta-hidroxi ($\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta, 17alfa,20beta,21-tetrol-3-ona). Se extrae el caldo con metilisobutilcetona, se seca la fase orgánica sobre sulfato sódico y luego se la evapora hasta sequedad. El residuo seco se distribuye entre 500 cc de éter de petróleo de punto de ebullición 60-80°C y 600 cc de metanol acuoso al 80%. Se separa el extracto metanólico, se le evapora en vacío hasta volumen reducido, se extrae luego con 600 cc de metilisobutilcetona, se lava con un poco de agua y por último se evapora el extracto orgánico hasta volumen de unos 5 cc.
- 5.
- 10.
- 15.

Se añaden 20 cc de éter etílico y se deja cristalizar en el refrigerador.

- Se obtienen 1,3 g (rendimiento, 87%) de $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona, fundente a 240-241°C $\frac{\alpha_D^{20}}{D} + 100g$ (1% en dioxano), λ_{max} 242 milimicras, $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 415; la prueba cromatográfica de este producto demuestra que es igual $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta, 17alfa,21-triol-3,20-diona y distinto de la Δ^4 -pregnen-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona.
- 20.



317705

EJEMPLO 5.

9alfa-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta, 17alfa, 21-triol-
-3, 20-diona.

5. Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia de que cuando el cultivo tiene 48 horas de edad, se añaden 25 mg de 9alfa-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnen-11beta, 17alfa, 21-triol-3, 20-diona disueltos en 1 cc de metanol, en presencia de 0,1 cc de solución acuosa al 20% de Tween 80 (monocoleato de polioxietilensorbitan).

10. Al cabo de 40 horas de incubación, el examen cromatográfico, efectuado como en el ejemplo 4, demuestra la desaparición completa del material de partida y la formación de un producto que tiene un Rf igual al de la 9alfa-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta, 17alfa, 21-triol-3, 20-diona.

15. Se extrae con metilisobutilcetona, se distribuye entre metanol acuoso al 80% y éter de petróleo, se evapora el metanol y luego se extrae con metilisobutilcetona como en el ejemplo 4.

20. Se obtiene 9alfa-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta, 17alfa, 21-triol-3, 20-diona, fundente a 274-275°C; $\angle_{\text{alfa}}^{\text{D}} 20 + 94\text{E}$ (en dioxano), λ_{max} 238 milimicras, $E_1^{1\%}$ 404. Rendimiento, 71%.



317705

EJEMPLO 6.

9alfa-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta,16alfa,17alfa,21-tetrol-3,20-diona

5. Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia de que, cuando el cultivo tiene 48 horas de edad, se añaden 25 mg de 9alfa-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnen-11beta,16alfa,17alfa,21-tetrol-3,20-diona disueltos en 1 cc de metanol, en presencia de 0,1 cc de una solución acuosa al 20% de Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitan).
10. Al cabo de 40 horas de incubación, un examen cromatográfico, efectuado como en el ejemplo 4, demuestra la desaparición del material de partida y la formación de un producto que tiene un Rf igual al de la 9alfa-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta,16alfa,17alfa,21-tetrol-3,20-diona. La
15. extracción, efectuada como en el ejemplo 4, conduce a la separación de la 9alfa-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta,16alfa,17alfa,21-tetrol-3,20-diona (rendimiento, 60%), fundente a 260-266°C; $[\alpha]_D^{20} + 67^\circ$ (1% en dioxano), λ max 239 milimicras, E $\frac{1\%}{1 \text{ cm}}$ 385.
20. Tres pruebas cromatográficas sobre capa delgada de gel de sílice demuestran que el producto es idéntico a la triamcinilona.



= 25 =

317705

EJEMPLO 7.

9alfa-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta,16alfa,17alfa,21-
-tetrol-3,20-diona.

- Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia
5. de que, cuando el cultivo tiene 30 horas de edad, se le diluye en la proporción de una parte de caldo de cultivo por 2 partes de agua del grifo estéril. Después de la dilución, se añaden a cada matraz 25 mg de 9alfa-
 10. -fluoro- Δ^4 -pregnen-11betam16alfa,17alfa,21-tetrol-3,20-
 diona en 0,125 cc de dimetilformamida, en presencia de una gota de una solución acuosa al 20% de Tween 80, y se incuba durante 40 horas más. Un examen cromatográfico demuestra la desaparición del material de partida y la formación de un producto que tiene un Rf igual al de
 15. la 9alfa-fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta,16alfa,17alfa,21-
 -tetrol-3,20-diona. El derivado 20beta-hidroxi está prácticamente ausente. La extracción, efectuada como en el ejemplo 4, conduce a la separación de la 9alfa-
 -fluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta,16alfa,17alfa,21-tetrol-
 -3,20-diona.



317705

EJEMPLO 8.

$\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17alfa,21-diol-3,11,20-triona

5. Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia de que en el medio de fermentación el NaNO_3 y el $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ se substituye por $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ con la concentración de 4,7 g/litro.

10. Un examen cromatográfico demuestra la desaparición completa del material de partida y la formación de un producto que tiene un R_f igual de la $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-17alfa, 21-diol-3,11,20-triona.

La extracción, efectuada como en el ejemplo 1, conduce a la separación de prednisona, con un rendimiento del 65%.

15. EJEMPLO 9.

17alfa-metil- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-4,17beta-diol-3-ona

20. Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia de que, cuando los cultivos tienen 48 horas de edad, se añaden a cada matraz 25 mg de 17alfa-metil- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-4,17beta-diol-3-ona disueltos en 0,125 cc de dimetilformamida, en presencia de una gota de una solución acuosa al 20% de Tween 80, y se incuba durante 24 horas más. Una prueba cromatográfica demuestra la formación de un producto



317705^{2.2}

que tiene un Rf igual al de la 17alfa-metil- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-4,17beta-diol-3-ona.

5. El producto de la reacción microbiológica de 20 matraces se extrae con 200 cc de cloruro de metileno y luego se evapora el disolvente y se cristaliza el residuo en acetona/éter de petróleo. Se obtienen cristales de 17alfa-metil- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-4,17beta-diol-3-ona, fundentes a 160-162°C; $\Delta^{1,4}$ (en CHCl₃); λ max 244 milimicras, E₁^{1%} 260; 305 milimicras, E₁^{1%} 175.

10.

EJEMPLO 10.

17alfa-metil- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-17beta-ol-3-ona

15. Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia de que, cuando los cultivos tienen 48 horas de edad, se añaden a cada matraz 25 mg de 17alfa-metil- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-17beta-ol-3-ona disueltos en 0,125 cc de dimetilformamida y se incuba durante 24 horas más. El examen cromatográfico demuestra la formación de un producto que tiene un Rf igual al de la 17alfa-metil- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-17beta-ol-3-ona. Por extracción, se obtienen cristales de 17alfa-metil- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-17beta-ol-3-ona, fundentes a 163-165°C; $\Delta^{1,4}$ (en CHCl₃); λ max 245 milimicras, E₁^{1%} 510.
- 20.



317705

EJEMPLO 11

6alfa,9alfa-difluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta,17alfa,21-
-triol-3,20-diona

Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia

5. de que, cuando los cultivos tienen 40 horas de edad, se añaden a cada matraz 25 mg de 6alfa,9alfa-difluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnen-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona, disueltos en 0,125 cc de dimetilformamida, en presencia de una gota de una solución acuosa al 20% de Tween 80. Se incuba durante
10. 48 horas más. Al final, un examen cromatografico demuestra la formación de un producto que tiene un Rf igual al de la 6alfa,9alfa-difluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona. Se extrae el contenido de 20 matraces con 500 cc de metilisobutilcetona y, despues de lavados
15. ácidos, alcalinos y neutros, se evapora el disolvente casi hasta sequedad. Hacia el final de la concentración, cristaliza la 6alfa,9alfa-difluoro- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11beta,17alfa,21-triol-3,20-diona, que funde a 220-223°C;
20. $\alpha_D^{20} + 88^\circ$ (1% de dioxano), λ max 237 milimicras
 $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 380.

22 SEP



= 29 =

317705

EJEMPLO 12.

$\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona

5. Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia de que, cuando los cultivos tienen 40 horas de edad, se añaden a cada matraz 25 mg de progesterona, disueltos en 0,2 cc de dimetilformamida en presencia de una gota de solución acuosa al 20% de Tween 80, y se incuba durante 48 horas. Procediendo como de ordinario, se obtiene $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-3,20-diona.



= 30 =

317705

N O T A

Descrito el objeto de la invención, se declara nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad italiana nº 51 497/64 del 23 de septiembre de 1964:

5. 1. Un procedimiento microbiológico para la preparación de 3-ceto- $\Delta^{1,4}$ -esteroides, de la serie del androstano y del pregnano, caracterizado en que se pone el 3-ceto- Δ^4 -esteroide de partida en contacto con un cultivo del nuevo microorganismo Nocardia lucida n.sp.,
10. en condiciones sumergidas y aeróbicas, en un medio nutritivo que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales, y en que el correspondiente 3-ceto- $\Delta^{1,4}$ -esteroide así obtenido se aísla y purifica de manera conocida.
15. 2. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, caracterizado en que la fuente de carbono esta constituida por mezclas de hidrocarburos alifáticos en las que los hidrocarburos contienen preferentemente de 12 a 18 átomos de carbono.

= 31 =

317705



3. Un procedimiento como se define en las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado en que la fermentación se efectúa a temperatura de 24 a 34°C, y preferentemente a 30°C.
5. 4. Un procedimiento como se define en las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado en que la fermentación se efectúa con pH entre 7 y 8, y preferentemente de 7,5 a 7,6.
10. 5. Un procedimiento microbiológico para la preparación de 3-ceto- $\Delta^{1,4}$ -esteroides.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de 31 hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 22 de septiembre de 1965

SOCIETÀ FARMACEUTICI ITALIA

15.

p.a. **JAIMÉ ISERN**
p. p.