



P - 31.514

Case PA 136-Spain

324173

30 ABR 1966

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

PATENTE DE INVENCION

formulada el 14 de Marzo de 1966, con el núm. 324.173

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de SYNTEX CORPORATION, entidad panameña, establecida en Apartado 7386, Panamá, Panamá, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENER ESTEROIDES 11-HIDROXILADOS"

=====
El presente invento se refiere a la 11-hidroxi-
lación de esteroides, selectiva, microbiana.

Más particularmente, el invento presente se re-
fiere a un nuevo procedimiento para la hidroxilación de
5 esteroides por fermentación del esteroide junto con ra-
zas conocidas de agentes de 11-hidroxilación, en presen-
cia de sulfóxido de dimetilo.

La 11-hidroxilación de esteroides, utilizando
distintas razas de hongos y bacterias, es un procedimien-
10 to bien conocido, que ha sido utilizado comercialmente
durante los pasados años. Por ejemplo, se ha dado a cono-



cer el uso de hongos del orden Mucorales para la 11-hidroxi-
lación de distintos esteroides. En general, algunos de es-
tos hongos introducen un grupo 11α -hidroxilo y algunos
otros del orden Mucorales, familia Mucoraceae, tales como
5 Cunninghamella (blakeslequeana, bainieri, elegans,
echinulata), introducen un grupo 11β -hidroxilo. Varias
patentes y publicaciones han indicado que otras familias
y especies de hongos y bacterias, poseen también la pro-
piedad de introducir el grupo 11-hidroxilo como por ejemplo,
10 curvularia, Streptomyces, etc.

En general, los rendimientos obtenidos con los
procedimientos expuestos anteriormente, no han sido cuan-
titativos y raramente exceden el 50% de esteroide 11-hidro-
xilado, basándose en el material de partida, aunque en al-
15 gunos casos utilizando ciertos esteroides específicos y
cultivos, los rendimientos han sido algo mayores que esta
cantidad. Se han expuesto varias teorías para explicar es-
tos rendimientos bajos, y es sabido, por ejemplo, que en
muchos casos se han producido reacciones secundarias en
20 la formación de productos 6-hidroxilados, productos 15-hi-
droxilados y productos poli-hidroxilados. Además, en algu-
nos casos, se han producido también cadenas laterales y
otras degradaciones de esteroides. Estas reacciones secun-
darias no solo han reducido los rendimientos del esteroide
25 deseado, sino que dan lugar también a mezclas de productos
que son muy difíciles de separar.

Según el presente invento, se ha hecho el sor-
prendente descubrimiento de que si se añade una cierta can-
tidad de sulfóxido de dimetilo al medio de fermentación,
30 se produce un efecto significativo en el proceso de 11-hi

324 173



droxilación. No es posible anticipar una teoría verdadera para explicar este efecto sorprendente y beneficioso. Es posible, que el sulfóxido de dimetilo cambie la selectividad a velocidad del transporte del esteroide y/o enzimas a través de la membrana o tejido celular. Es posible también, que el efecto significativo observado, sea debido a una inhibición de ciertas enzimas o puede ser que se produzca el crecimiento selectivo de hongos y/o bacterias, que favorece la reacción de 11-hidroxilación a costa de las reacciones secundarias. Además, el sulfóxido de dimetilo puede ayudar a la extracción del esteroide del micelio. Así, se ha observado que si a un caldo de fermentación que incluye *Cunninghamella blakesleana*, se añade de 1% a 50% de sulfóxido de dimetilo y si luego se añade a este medio de fermentación el esteroide y la mezcla resultante se incuba durante un periodo de 4 a 48 horas, se produce un mayor rendimiento del esteroide 11 β -hidroxilado aumentándose también la producción total de esteroide. Además, una investigación de los productos de la reacción anterior, indica que hay una reducción en la cantidad de productos que tienen grupos hidroxilo en lugares distintos de C-11, y hay también una reducción de los productos de reacciones secundarias que entrañan la degradación de las cadenas secundarias de esteroide en C-16 y/o C-17.

La presente reacción se ha encontrado es especialmente conveniente para la fermentación del compuesto "S" de 6 α -fluoro-16,17-acetonida.

Por tanto, puede establecerse, que en general el presente invento demuestra que el sulfóxido de dimetilo, utilizado en fermentaciones de tipo esteroide que tienen



como objeto la producción de esteroides 11-hidroxi-
lados, tiene un efecto muy significativo y puede usarse en con-
centraciones de 1% aproximadamente del caldo de partida
total a 50% aproximadamente. Sin embargo, puede apreciarse
5 que estas concentraciones para obtener el efecto óptimo,
pueden ser diferentes para los diferentes tipos de fermen-
tación. El porcentaje óptimo de sulfóxido de dimetilo para
las especies *Cunninghamella blakesleeana* y para la fermen-
tación del compuesto "S" 6 α -fluoro-16,17-acetonida, es
10 de 10% aproximadamente. Por otra parte, aún con estas mis-
mas especies, si el esteroide que se fermenta es el com-
puesto "S", da óptimos resultados otra concentración del
sulfóxido de dimetilo dentro del intervalo general expues-
to anteriormente. De forma similar, si se emplea sulfóxido
15 de dimetilo en fermentaciones que usan otros esteroides
conocidos y otros cultivos, pueden ser más efectivas otras
concentraciones para aumentar la obtención de productos
11-hidroxi-
lados.

Esencialmente, cualquier compuesto esteroide que
20 contiene de 18 a 27 átomos de carbono inclusive, que no
esté sustituido en C-11, puede usarse como material de
partida para el procedimiento del presente invento. Así,
los materiales de partida pertenecen especialmente, a las
series del androstano, estrano, pregnano, colestano y
25 sapogenina. Todos ellos poseen un grupo ceto o hidroxilo
en C-3, o pueden no estar sustituidos en dicha posición
y pueden ser saturados o no saturados. Puede haber dobles
enlaces en C-1, C-4, C-5, C-6, C-16, etc. o combinaciones
de los mismos. También pueden estar presentes una gran
30 variedad de sustituyentes en una o varias posiciones de

324 173

30 AB



la molécula esteroide y particularmente, átomos de halógeno en C-2, 6,16 y/o 21; grupos alquilo en C-2, 4, 6, 16, 17, etc.; grupos alquilidenedioxi en C-16 α , 17 α , etc. Pueden estar presentes también, otros sustituyentes en C-1,
 5 2, 4, 6,7, 12, 14, 15, 16, 17, 19 y 21.

Ejemplos de materiales de partida apropiados son: testosterona, 19-nor-testosterona, 17 α -metil testosterona, 17 α -vinil-testosterona, 17 α -etinil-19-nor-testosterona, dihidrohalotestosterona, 2-hidroximetilen-17 α -metil-
 10 -dihidrohalotestosterona, Δ^5 -androsteno-3 β , 17 β -diol, Δ^4 -androsteno-3,17-diona, progesterona, 17 α -hidroxiprogestero-
 na, 17 α -acetoxi-progesterona, pregnenolona, alopregnenolona, 6 α -metil-17 α -hidroxiprogestero-
 15 17 α -hidroxiprogestero-
 na, 21-fluoroprogestero-
 na, 3-desoxiprogestero-
 na, 19-norprogesterona, desoxicorticoste-
 rona, Δ^4 -pregneno-17 α -21-diol-3,20-diona (compuesto "S") 6 α -metil "S", 6 α -fluor "S", 6 α -cloro "S", 16 α -
 -metil "S", 16 β -metil "S", 16 α -hidroxiprogestero-
 20 17 α -acetoxi-
 na, 6 α -fluor-16 α -
 -metil "S", 16 α , 17 α -acetoxi-
 na, 6 α -fluor-16 α -
 -hidroxiprogestero-
 25 Δ^5 -pregneno-3 β , 17 α , 21-triol-20-ona, 6,16 α -
 -dimetil "S", alopregnano-3 β , 17 α , 21-triol-
 20-ona, alopregnano-17 α , 21-diol-3,20-diona, 16 α -
 metil-alopregnano-17 α , 21-diol-3,20-diona, 1-dehidro
 "S", 6-dehidro "S", 1-dehidro-16 α -metil "S", 1,6-bis-
 dehidro, "S" 6-fluor-16 α -metil-1-dehidro "S", estrona,
 estradiol, colesterol, colesteno, ácidos colánicos,
 diosgenina, tigogenina, etc.

30 Como se indicó anteriormente, los microorganismos



mos utilizados en este procedimiento son los descritos en la literatura para efectuar la 11α u 11β -hidroxilación. Estos microorganismos son hongos o bacterias.

Los hongos utilizados, pertenecen a las clases
5 Phycomyceteae, Ascomyceteae, Basidiomyceteae y Fungi Imperfecti.

Los Phycomycetos más utilizados corrientemente, para la 11 -hidroxilación, pertenecen al orden Mucorales, familia Mucoraceae, especialmente las especies que pertenecen al género Absidia o Rhizopus, tal como por ejemplo, Absidia glauca, Rhizopus nigricans y Rhizopus arrhizus, o a la familia Choanephoaraceae, particularmente, el género Cunninghamella; especialmente efectivas son la Cunninghamella blakesleana, Cunninghamella bainieri, Cunninghamella elegans y Cunninghamella echinulata.
10
15

Los ascomicetos utilizados para este tipo de reacción, pertenecen a los órdenes Hypocreales, Sphaeriales y Eurotiales, tales como por ejemplo Giberella fujikuroi, Neurospora sitophila y Eurotium chevalieri
20 respectivamente.

Los Basidiomicetos utilizados para la 11 -hidroxilación, pertenecen particularmente al orden Agaricales, familia Agaricaceae, del género Psilocybe, Stropharia y Conocybe, y específicamente las especies Panaeolus
25 campamulatus y Psilocybe caerulescens. Var Mazatecorum.

Ejemplos de Fungi Imperfecti apropiados utilizados en nuestro procedimiento, son:
Curvularia lunata,
Fusarium moniliforme y otras especies Fusarium,
30 Stachylidium bicola,

324173

80A



- Helmintosporium sativum,
Cephalotecium roseum,
Pestalotia foedans,
Dactylium dendroides,
5 Aspergillus ochraceus,
Aspergillus niger y otras especies de Aspergillus,
Penicillium chrysogenum,
Penicillium notatum,
Penicillium nigricans,
10 Penicillium roqueforti y otras especies de Penicillium,
Spondylocladium australe,
Arthrobotrys superba,
Especie Coniothyrium,
Especie Pycnosporium,
15 Especie Rhodoseptoria,
Trichothecium roseum,
Stachylidium theobromae y
Especie Epicoccum.

Otros microorganismos, que pertenecen a las
20 bacterias (orden Actinomycetales) y especialmente la especie Streptomices, tal como el Streptomices fradiae, pueden usarse también en nuestro procedimiento.

Los medios de cultivo utilizados para el procedimiento objeto del presente invento, contienen principalmente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno,
25 factores cooperantes y compuestos inorgánicos.

Ejemplos de fuentes de carbono, son: hidratos de carbono, tales como glucosa, maltosa, manosa, dextrosa, lactosa, sacarosa, galactosa, melazas y semejantes;
30 polialcoholes, tales como glicerina, manita y semejantes,



almidones, etc.

Fuentes adecuadas de nitrógeno orgánico son las proteínas vegetales o animales, tales como harina de soja, harina de maiz, lactoalbúmina, caseína, pectonas, amino-ácidos o productos comerciales, tales como Phytone (digestivo enzimático de harina de soja) Casitone o Edamine (hidrolizados de lactoalbúmina), Micophil (proteína de soja), Nutriente L-1 (hidrolizado de lactoalbúmina Scheffield Frams, Norwick, N.Y.) N.Z.- amine (hidrolizado pancreático de caseína, Baltimore Biol. Lab., Baltimore, Md.), y otros productos similares. Pueden usarse también, como fuentes de nitrógeno, diferentes nitratos o sales amónicas, tales como nitrato sódico o potásico, nitrato amónico, sulfato amónico, soluciones de hidróxido amónico, urea, etc.

Los constituyentes minerales están presentes en forma de sales, especialmente cloruros, fosfatos y sulfatos de sodio, potasio, hierro, manganeso, etc.

Como factores cooperantes pueden mencionarse extracto de levadura, cocimientos de patata, vitaminas, etc.

En general, los medios de cultivo líquidos utilizados en este procedimiento, son los utilizados en el procedimiento conocido y varían según el microorganismo oxigenante.

Es también conveniente, adicionar un agente antiespumante, tal como por ejemplo, silicona, aceites glicéridos y ceras, aceite de soja, aceite de ricino, aceites sulfonados, aceites minerales, y semejantes. El pH del medio de cultivo se ajusta al pH óptimo necesario

324173

304



para el desarrollo de cada microorganismo.

Para practicar el procedimiento del presente invento, para un crecimiento miceliar del organismo oxigenante que se obtuvo después de la incubación de un cultivo del mismo en el medio líquido apropiado, durante un periodo de tiempo de 6 a 48 horas, preferiblemente durante 24 horas, se añade cuidadosamente la cantidad deseada de sulfóxido de dimetilo, teniendo cuidado de que la temperatura del medio no exceda de 28°C. aproximadamente. Al total, se añade a continuación, el esteroide usado como sustrato, o en forma sólida o disuelto en la mínima cantidad de un disolvente tal como etanol, dioxano, acetona, etc. Alternativamente, el esteroide a hidrolizar, puede disolverse en una pequeña cantidad del sulfóxido de dimetilo calculado, necesario para tener la concentración deseada en el medio. Una vez, añadido el esteroide, se limita la incubación durante un periodo de tiempo de 4 a 48 horas, según el sustrato y tomando periódicamente cantidades alicuotas que se analizan por cromatografía sobre papel.

Cuando se completa la reacción, la mezcla se extrae con dos veces su volumen de un disolvente orgánico no miscible con agua, tal como éter, dicloruro de metileno, acetato de etilo, y semejantes, utilizando preferiblemente dicloruro de metileno, y el extracto orgánico se lava varias veces con agua para eliminar el sulfóxido de dimetilo, volviendo a extraer los lavados combinados con dicloruro de metileno para evitar la pérdida de esteroide. El extracto combinado se seca, se evapora a sequedad y se purifica por los métodos usuales.



Será obvio para el especialista en la técnica, que este procedimiento puede efectuarse también utilizando en vez de un cultivo del microorganismo, una solución de las enzimas producidas por él o con una suspensión de esporas.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar el invento pero no tienen la intención de limitarlo:

EJEMPLO 1

Se preparó un cultivo de *Cunninghamella blakesleeana* ATCC 8688b en cinco matraces Erlenmeyer de 1 litro, que contenían cada uno 200 cc. de un medio de cultivo de la siguiente composición:

	Harina de soja	5 g
	Extracto de levadura ("Difco").	5 g
15	K_2HPO_4	5 g
	NaCl	5 g
	Cerelese (Glucosa comercial)...	20 g
	Agua destilada hasta completar.	1 litro

El pH de este medio de cultivo se ajustó a 7,2.

Después de 24 horas de crecer a 28-30°C. con aireación y agitación (250 r.p.m.), el contenido de los matraces, se combinó y se añadió a un fermentador de acero inoxidable de 14 litros de capacidad que contenía 4 litros del mismo medio de cultivo y 10 g de silicona A como agente antiespumante. A continuación, se añadieron cuidadosamente, 500 cc. de sulfóxido de dimetilo (10% en volumen) mientras se mantiene la temperatura por debajo de 28°C, y 500 miligramos de 6 α -fluor-16 α , 17 α -isopropilidendioxi- \triangle^4 -pregneno-21-01-3,20-diona, disueltos en 50 cc. de etanol al 95% y la incubación se realizó a

324173



la misma temperatura con agitación (273 r.p.m.) y aireación (1 vol/1/min) durante 12 horas más. Al final de este tiempo, el producto se extrajo tres veces con cloruro de metileno y el extracto orgánico se lavó varias veces con agua para eliminar el sulfóxido de dimetilo, volviendo a extraer los lavados para evitar pérdidas de esteroide. Los extractos combinados, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, y se evaporaron a sequedad a presión reducida. El residuo sólido se purificó por cromatografía en gel de sílice-celite, obteniendo así 6 α -fluor-16 α , 17 α -isopropilidendioxi- Δ^4 -pregneno-11 β , 21-diol-3,20-diona (acetónida de 6 α -fluor-16 α -hidroxi-hidrocortisona) en forma pura, idéntica a una muestra auténtica con un rendimiento del 78%.

15

EJEMPLO II

Se repitió el ejemplo anterior, pero omitiendo el sulfóxido de dimetilo. En este caso, se obtuvo la acetónida de 6 α -fluor-16 α -hidroxi-hidrocortisona, con un rendimiento del 30-40%.

20

EJEMPLO III

En el método del Ejemplo I, el mismo tiempo de incubación se redujo a 6 horas, para obtener la acetónida de la 6 α -fluor-16 α -hidroxi-hidro-cortisona, con un rendimiento del 68%.

25

EJEMPLO IV

En el método del Ejemplo I, el tiempo de incubación se redujo a 8 horas, obteniéndose así el compuesto 11 β -hidroxilado, con un rendimiento del 72%.

EJEMPLO V

30

Se repitió el Ejemplo I pero añadiendo 25% en



volumen de sulfóxido de dimetilo, para obtener la acetoni-
da de la 6 α -fluor-16 α -hidroxi-hidrocortisona, con un
rendimiento del 50%.

5 En otro experimento, se utilizaron cantidades
iguales del medio de cultivo y sulfóxido de dimetilo, ob-
teniéndose así el producto hidroxilado con un rendimiento
del 40%.

EJEMPLO VI

10 En el método del Ejemplo I, el tiempo de incuba-
ción se alargó a 12 horas, para obtener la acetoni-
da de la 6 α -fluor-16 α -hidroxi-hidrocortisona, con un rendi-
miento del 70%.

EJEMPLO VII

15 Según el método descrito en el Ejemplo I, los
compuestos mencionados a continuación, como I, se incuba-
ron con un cultivo de *Cunninghamella blakesleeana* ATCC
8688b en presencia de 10% en volumen de sulfóxido de dime-
tilo para producir los correspondientes compuestos 11 -
hidroxi que se indican en II:

20	I	II
	Compuesto "S"	Hidrocortisona
	Acetonida de 16 α -hidroxi- "S"	Acetonida de 16 α -hidroxi- hidrocortisona
25	6 α -fluor- Δ^4 -pregneno- 17 α , 21-diol-3,20-diona	6 α -fluor-hidrocortisona
	6 α -cloro- Δ^4 -pregneno- 17 α , 21-diol-3,20-diona	6 α -cloro-hidrocortisona
	6 α -metil Δ^4 -pregneno- 17 α , 21-diol-3,20-diona	6 α -metil hidrocortisona
30	16 α -metil Δ^4 -pregneno- 17 α , 21-diol-3,20-diona	16 α -metil-hidrocortisona

324 173

30



I

- 16 β -metil- Δ^4 -pregneno-
17 α , 21-diol-3, 20-diona
- 5 6 α -fluor-16 α -metil- Δ^4 -
pregneno-17 α , 21-diol-3, 20-
diona
- 6 α -fluor-16 β -metil- Δ^4 -
pregneno-17 α , 21-diol-3, 20-
diona
- 10 Progesterona
- 17 α -hidroxi-progesterona
- 6 α -metil-17 α -acetoxi-
progesterona
- 15 Acetato de 6-cloro- $\Delta^{4,6}$ -
prenadien-17 α -ol-3, 20-diona
- $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-17 α , 21-
diol-3, 20-diona.
- 6 α -fluor- $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno
-17 α -21-diol-3, 20-diona
- 20 6 α -fluor-16 α -metil- $\Delta^{1,4}$ -
pregnadieno-17 α , 21-diol-3, 20-
diona.
- 6 α -fluor-16 β -metil- $\Delta^{1,4}$ -
pregnadieno-17 α , 21-diol-
3, 20-diona.
- 25 Testosterona
- 17 α -metil-testosterona
- 17 α -etinil-19-nor-testos-
terona
- 30 Estrona
- Colestenona
- Diosgenina
- Tigogenina

II

- 16 β -metil-hidrocortisona
- 6 α -fluor-16 α -metil-hidro-
cortisona.
- 6 α -fluor-16 β -metil-
hidrocortisona
- 11 β -hidroxi progesterona
- 11 β -17 α -dihidroxi-progeste-
rona
- 6 α -metil-11 β -hidroxi-17 α -
acetoxi progesterona
- 17-acetato de 6-cloro- $\Delta^{4,6}$ -preg-
nadien-11 β , 17 α -diol-3, 20-
diona
- $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-11 β , 17 α ,
21-triol-3, 20-diona.
- 6 α -fluor- $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-
11 β , 17 α , 21-triol-3, 20-
diona.
- 6 α -fluor-16 α -metil- $\Delta^{1,4}$ -
pregnadieno-11 β , 17 α , 21-
triol-3, 20-diona.
- 6 α -fluor-16 β -metil- $\Delta^{1,4}$ -
pregnadieno-11 β , 17 α ,
21-triol-3, 20-diona
- 11 β -hidroxi-testosterona
- 17 α -metil-11 β -hidroxi
testosterona.
- 17 α -etinil-11 β -hidroxi-
19-nor-testosterona.
- 11 β -hidroxi estrona
- 11 β -hidroxi colestenoa
- 11 β -hidroxi diosgenina
- 11 β -hidroxi tigogenina.



EJEMPLO VIII

Sometiendo a la 6α -fluor- 16α , 17α -isopropilidendioxi- Δ^4 -pregneno-21-ol-3,20-diona a la 11β -hidroxilación con *Cunninghamella bainieri*, *Cunninghamella elegans*,
5 o *Cunninghamella echinulata*, según los procedimientos conocidos y en condiciones apropiadas para los respectivos microorganismos, pero introduciendo 10% en volumen de sulfóxido de dimetilo, según el procedimiento del Ejemplo I, se obtiene en cada caso, 6α -fluor- 16α , 17α -isopropilidendioxi- Δ^4 -pregneno-11 β , 21-diol-3,20-diona, con rendimientos comparables a los descritos en el Ejemplo I.
10

EJEMPLO IX

La 6α -fluor- 16α , 17α -isopropilidendioxi- Δ^4 -pregneno-21-ol-3,20-diona, se somete a 11β -hidroxilación por incubación con un cultivo de *Cunninghamella blakesleeana*,
15 según el procedimiento del Ejemplo I, utilizando sin embargo, 250 cc. de sulfóxido de dimetilo (5% en volumen). Al completar el tratamiento, como se describió anteriormente, se obtiene 6α -fluor- 16α , 17α -isopropilidendioxi- Δ^4 -pregneno-11 β , 21-diol-3,20-diona con un rendimiento aproximado del 70%.
20

EJEMPLO X

Se preparó un cultivo de *Rhizopus nigricans* inoculando un medio acuoso que contenía 2% de pectona y 5% de jarabe de maíz con un producto vegetativo del cultivo anterior en el mismo medio y agitando a 28°C con aireación, durante 24 horas.
25

A 340 cc. de este cultivo, se añadieron a continuación lentamente, 30 cc. de sulfóxido de dimetilo, manteniendo mientras la temperatura alrededor de 28°C , y 100 mg
30

324173

30 AB



de progesterona disueltos en 4 cc. de sulfóxido de dimetilo, agitándose la mezcla con aireación a 28°C. durante 24 horas más. El producto de esta incubación se extrajo varias veces con cloruro de metileno, se lavó el extracto con agua, se
 5 secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a un pequeño volumen a presión reducida.

Los extractos concentrados se adsorbieron en una columna preparada con 20 g de gel de sílice y 20 g de ce-
 lite, lavada previamente con cloruro de metileno. La elu-
 10 ción con una mezcla de cloruro de metileno-acetona 80/20 y cristalización, dió 11% -hidroxi progesterona con un rendimiento del 75%.

EJEMPLO XI

Una raza de *Curvularia lunata* ATCC 13.935 se
 15 cultivó en un medio glucosa-agar de Sabouraud (Difco). El producto obtenido después de incubación durante una semana a 25°C. se suspendió en 5 cc. de agua estéril. Esta suspensión se dividió en cinco porciones de 1 cc., cada una de las cuales se emplearon para inocular 5 matraces Erlenmeyer
 20 de 250 cc. de capacidad, que contenían cada uno 50 cc. de un medio de cultivo de la siguiente composición:

	Glucosa	20 g
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	5 g ó
	NaNO_3	1 g
25	K_2HPO_4	1 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
	KCl	0,5 g
	ZnSO_4	trazas
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	trazas
30	Agua destilada hasta completar 1 litro.	



Los cultivos se incubaron con agitación rotatoria durante 72 horas a 25°C. El producto se homogeneizó durante un minuto en un mezclador Waring; porciones de 2 cc. de la suspensión así obtenida, se emplearon para inocular 5 100 matraces Erlenmeyer conteniendo la misma cantidad del medio descrito anteriormente. Las mezclas se incubaron durante 24 horas con agitación rotatoria a 25°C y 280 r.p.m; a cada matraz se añadieron 5 cc. de sulfóxido de dimetilo y 50 mg del compuesto "S" disueltos en 2 cc. de etanol al 10 95%, continuándose la incubación en las mismas condiciones durante 24 horas. Se combinaron los contenidos de los matraces y se extrajeron con cuatro porciones de cloruro de metileno. El extracto combinado se lavó bien con agua para eliminar el sulfóxido de dimetilo, se secó sobre sulfato 15 sódico anhidro y se concentró a temperatura baja hasta un volumen de 25 cc. Esta solución se adsorbió con 4 g de gel de sílice y se eluyó con cloruro de metileno-éter (9:1) para obtener hidrocortisona con un rendimiento del 75%.

EJEMPLO XII

20 Un cultivo de *Psilocybe caerulescens* Var. Mazatecorum, (Heim) ATCC 13964, se mantuvo por transferencia en serie cada dos semanas, en un medio micófilo de agar o malta-agar, incubando a una temperatura de 25-28°C.

El producto obtenido en un tubo inclinado de 25 agar, se suspendió en 10 cc. de agua estéril; 2 cc. de esta suspensión se usaron para inocular un matraz Erlenmeyer conteniendo 200 cc. del siguiente medio de cultivo:

Phytone	2	g
Dextrosa	2	g
30 Agua hasta	200	cc.

324173

30



Los cultivos se incubaron con agitación rotatoria (200 r.p.m.) a 25-28°C durante 3 días; el micelio así obtenido se dispersó utilizando un mezclador. Se inocularon 20 cc. de la suspensión microbiana así obtenida a cada uno de 10 matraces Erlenmeyer de 1 litro conteniendo cada uno 200 cc. del mismo medio de cultivo incubándose a continuación durante 24 horas más. A cada matraz se añadieron a continuación lentamente 10 cc. de sulfóxido de dimetilo.

A cada matraz se añadieron 50 mg de 3,21-diacetato de Δ^5 -pregneno-3 β ,17 α ,21-triol-20-ona, continuándose la agitación con aireación durante 48 horas más, a la misma temperatura. El contenido de los matraces se combinó y extrajo varias veces con cloruro de metileno, lavándose el extracto con agua, secándose sobre sulfato sódico anhidro y evaporándose a sequedad a presión reducida. El residuo se adsorbió en una columna cargada con 12 g de gel de sílice y 12 g de celite, obteniéndose así la Δ^4 -pregneno-11 α ,17 α ,21-triol-3,20-diona, p.f. 217-219°C. idéntica a una muestra auténtica de "S" de 11-epi "F".

EJEMPLO XIII

El producto vegetativo de *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*), ATCC 11161, obtenido después de una semana de incubación a 25°C en un tubo de ensayo inclinado conteniendo un medio de dextrosa de patata-agar, se suspendió en 10 cc. de agua estéril. A continuación, se usó 1 cc. de esta suspensión para inocular 10 matraces Erlenmeyer de 1 litro, conteniendo cada uno 200 cc. de solución de Czapek suplementada con 0,05% de extracto de levadura. Los matraces se agitaron en presencia de aire en condiciones sumergidas (los agitadores rotatorios girando a 150 r.p.m.)



durante 18 a 21 horas, para obtener una producción abundante del microorganismo. A continuación se añadieron a cada matraz 15 cc. de sulfóxido de dimetilo, manteniendo la temperatura a 25-28°C y 50 mg de 6 α -fluor-16 α , 17 α -isopropiliden-dioxi- Δ^4 -pregneno-21-ol-3,20 diona, realizando la incubación durante 18 horas más en las mismas condiciones. A continuación de este periodo de incubación, el contenido de los matraces se combinó y luego se extrajo varias veces con cloruro de metileno. El extracto se lavó bien con agua, se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se evaporó a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en cloruro de metileno, se adsorbió en una columna cargada con 15 g de gel de sílice y 15 g de celite. Se encontró que las fracciones eluidas de la columna con éter y éter-acetona (90/10), contenían 400 mg de 6 α -fluor-16 α , 17 α -isopropiliden dioxi- Δ^4 -pregneno-11 α , 21-diol-3,20-diona, idéntica a una muestra auténtica.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Gran Bretaña el 15 de Marzo de 1965, bajo el número 10791/65, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

324173

30 A



- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

- 5 1.- Un procedimiento para obtener esteroides 11-hidroxilados que comprende incubar el correspondiente esteroide 11 desoxi con un microorganismo capaz de efectuar dicha hidroxilación o con las enzimas producidas por él, en presencia de sulfóxido de dimetilo.
- 10 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el esteroide es un miembro de la serie androstanos, pregnanos, estranos, colestanos o sapogeninas y la incubación se realiza en un medio líquido durante un periodo de 4 a 48 horas.
- 15 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual la cantidad de sulfóxido de dimetilo usado está entre 1% y 50% del volumen total del medio de cultivo.
- 20 4.- Un procedimiento según la reivindicación 3, en el cual la cantidad de sulfóxido de dimetilo usado es un 10% del volumen total del medio de cultivo.
- 5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el microorganismo oxigenante pertenece al género *Cunninghamella*.
- 25 6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el microorganismo oxigenante pertenece al género *Rhizopus*.
- 7.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el microorganismo oxigenante es *Curvularia lunata*.
- 30 8.- Un procedimiento según la reivindicación 5,

324173

30



en el cual el microorganismo oxigenante es *Cunninghamella blakesleeana*.

5 9.- Un procedimiento según la reivindicación 5, en el cual el microorganismo oxigenante es *Cunninghamella bainieri*.

10.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el microorganismo oxigenante es *Fusarium moniliforme*.

10 11.- Un procedimiento para obtener 6alfa-fluoro-16alfa,17alfa-isopropilidenedioxi-Delta⁴-pregneno-11Beta, 21-diol-3,20-diona, que comprende incubar 6alfa-fluoro-16alfa,17alfa-isopropilidenedioxi-Delta⁴-pregneno-21-ol-3,20-diona con un cultivo de *Cunninghamella blakesleeana* ATCC 8688b, en un medio de cultivo líquido que contiene sulfóxido de dimetilo.

15 12.- El procedimiento de la reivindicación 11 en el cual el medio de cultivo líquido contiene aproximadamente 10% de sulfóxido de dimetilo.

20 13.-Un procedimiento para obtener esteroides 11-hidroxilados.

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

Esta Memoria consta de veinte hojas escritas por una sola cara.

25

Madrid,

30 ABR. 1966

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Poder

BG/ - M. G. U.