



330.679

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

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

formulada el día 29 de Agosto de 1.966, con el Nº 330.679

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

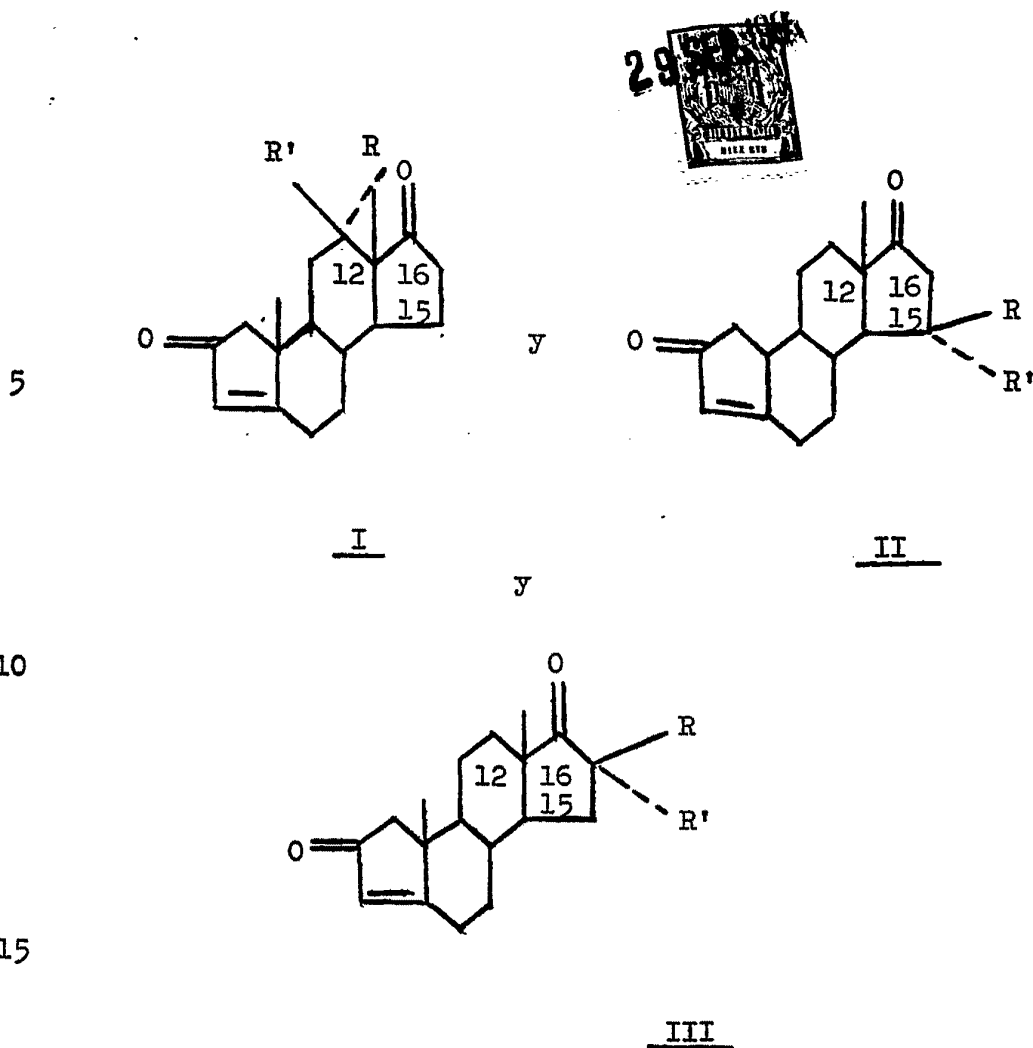
a nombre de E.R. SQUIBB & SONS, INC., entidad norteamericana, establecida en 745 Fifth Avenue, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR ESTEROIDES FISIOLÓGICAMENTE  
ACTIVOS"

=====

La presente invención se refiere a y tiene como objeto proporcionar nuevos esteroides fisiológicamente activos, y métodos para su producción.

Más en particular, la invención se refiere a  
5 la producción de compuestos de fórmulas:



20 donde R es hidrógeno; R' se elige del grupo que consta de hidroxilo y aciloxi; y R y R', juntas, son oxo (O=).

25 Los radicales aciloxi preferidos son los de ácidos carboxílicos hidrocarbonados de menos de 12 átomos de carbono, ejemplificados por los ácidos alcanóicos inferiores (por ejemplo ácido acético, propiónico, butírico y terc-pentanoico), ácidos alquenoicos inferiores, ácidos carboxílicos arílicos monocíclicos (por ejemplo ácido benzoico y toluico), ácidos arilalcanoicos inferiores monocíclicos (por ejemplo ácido fenacético y ácido β-fenilpropiónico), ácidos cicloalcanocarboxílicos y ácidos cicloalquenoicarboxílicos.

30



Los compuestos de la presente invención son esteroides fisiológicamente activos que poseen actividad antiandrógena, es decir, inhiben la acción de los andrógenos, y se pueden usar en el tratamiento de estados tales como la acné hiperandrógena. Los compuestos se pueden formular para tal administración, basándose la concentración y/o la dosis en la actividad del compuesto concreto, y en los requisitos del paciente.

Los nuevos compuestos de la invención se pueden preparar según el procedimiento de la invención, empleando como material de partida  $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona.

#### I

Los nuevos compuestos se pueden preparar a partir del material de partida, sometiendo este último a la acción de las enzimas de Colletotrichum derridis, bajo condiciones oxidantes y preferiblemente aerobias. La oxidación se puede efectuar de la mejor forma incluyendo el material de partida en un cultivo aerobio del microorganismo, o juntando en un medio acuoso los compuestos, aire, y enzimas de células no prolíficas del microorganismo. Esto produce la oxidación en la posición 12 $\beta$ , formula I.

#### II

Los nuevos compuestos se pueden preparar a partir del material de partida sometiendo este último a la acción de las enzimas de Colletotrichum linicola bajo condiciones oxidantes y preferiblemente aerobias. La oxidación se puede efectuar de la mejor forma incluyendo el



material de partida en un cultivo aerobio del microorganismo, o juntando en un medio acuoso los compuestos, aire, y enzimas de células no prolíficas del microorganismo. Es to produce la oxidación en la posición 15 $\alpha$ , fórmula II.

5

### III

Los nuevos compuestos de la presente invención se pueden preparar a partir del material de partida sometiendo este último a la acción de las enzimas de Streptomyces roseochromogenes, bajo condiciones oxidantes y preferiblemente aerobias. La oxidación se puede efectuar de la mejor forma incluyendo el material de partida en un cultivo aerobio del microorganismo, o juntando en un medio acuoso los compuestos, aire, y enzimas de células no prolíficas del microorganismo. Esto produce la oxidación en la posición 16 $\alpha$ , fórmula III.

10

15

En general, las condiciones de cultivo del microorganismo, para los fines de la invención, son las mismas que las de cultivo de microorganismos para la producción de antibióticos (salvo por la inclusión del material de partida que se ha de convertir), es decir, el microorganismo se hace crecer de forma aerobia en contacto con (en o sobre) un medio de fermentación adecuado. Un medio adecuado comprende esencialmente una fuente de carbono y energía. Esta última puede ser un carbohidrato (tal como sacarosa, melazas, glucosa, maltosa, almidón o dextrina), un ácido graso, una grasa y/o el propio compuesto. Sin embargo, preferiblemente, el medio incluye una fuente asimilable de carbono y energía, además del esteroide. Entre las grasas utilizables para los fines de la invención se

20

25

30



encuentran: aceite de manteca, aceite de soja, aceite de linaza, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de coco, aceite de maiz, aceite de ricino, aceite de sésamo, aceite de palma crudo, sebo análogo al de cordero, aceite de esperma, aceite de oliva, triestearina, tripalmitina, trioleina y trilaurina. Entre los ácidos grasos utilizables para los fines de la invención se encuentran: el ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido mirístico.

La fuente de factores nitrogenados puede ser orgánica (por ejemplo harina de soja, líquido de maceración de maiz, extracto de carne y/o solubles de destilación) o sintética (es decir, compuesta por compuestos orgánicos o inorgánicos simples sintetizables, tales como sales amónicas, nitratos alcalinos, aminoácidos o urea).

Durante la fermentación se debe mantener un suministro adecuado de aire estéril, por ejemplo por los métodos usuales de exponer al aire una superficie grande del medio, o utilizando un cultivo aireado sumergido. El compuesto se puede añadir al cultivo durante el período de incubación, o se puede incluir en el medio antes de la esterilización o inoculación. El intervalo preferido (pero no limitativo) de concentración del material de partida es aproximadamente de 0,01 a 0,10%. El período de cultivo (o más bien el tiempo durante el que se somete el compuesto a la acción de la enzima) puede variar considerablemente, siendo factible el intervalo de aproximadamente 6 a 96 horas, pero no limitativo.

El procedimiento produce, entre otros, el derivado 12 $\beta$ -, 15 $\alpha$ - ó 16 $\alpha$ -hidroxi de la  $\Delta^3$ -A-norandrostero



no-2,17-diona. El derivado ceto se puede esterificar de la forma usual, tal como por tratamiento con el anhídrido de ácido o haluro de acilo deseados, en un disolvente orgánico (preferiblemente en una base orgánica tal como piridina), produciendo el derivado 12 $\beta$ -, 15 $\alpha$ - ó 16 $\alpha$ -éster, o se puede oxidar para producir el derivado 12-, 15- ó 16-ceto.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

12 $\beta$ -hidroxi- $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona

A) FERMENTACION.- Se suspende en 5 ml de solución acuosa de laurilsulfato sódico al 0,01% el crecimiento superficial de cada uno de dos cultivos en agar inclinados, de 2 semanas, de Colletotrichum derridis CBS (Centralbureau voor Schimmel Cultures, Baarn, Holanda), conteniendo dichos cultivos como medio nutritivo (A):

Harina de avena	20 g
Pasta de tomate	20 g
Agar	15 g
Agua del grifo hasta	1 litro

Se usan porciones de 1 ml de esta suspensión para inocular 8 matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo cada uno de ellos 50 ml del siguiente medio esterilizado (B):

Dextrosa	10 g
Líquido de maceración de maiz	6 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Extracto de levadura	2,5 g
CaCO <sub>3</sub>	2,5 g
Agua destilada hasta	1 litro



Después de 75 horas de incubación a 25°C, con  
agitación rotativa continua (280 ciclos/min; radio igual  
a 50,8 mm), se hacen transferencias del 10% (vol/vol) a  
34 matraces Erlenmeyer de 250 ml, cada uno de los cuales  
5 contiene 50 ml de medio B recientemente esterilizado. Des-  
pués de 24 horas más de incubación, usando las mismas con-  
diciones antes descritas, se añade el esteroide (300 mi-  
crogramos/ml), introduciendo como suplemento en cada ma-  
traz 0,25 ml de una solución estéril (60 mg/ml) de  $\Delta^3$ -A-  
10 norandrosteno-2,17-diona en N,N-dimetilformamida. Se fer-  
menta un total de 510 mg.

Después de 72 horas más de incubación, usando  
condiciones idénticas a las antes descritas, se reúne el  
contenido de los matraces, y luego se filtra el caldo a  
15 través de una masa clarificadora Seitz. Los matraces, mi-  
celio y masa se lavan con porciones sucesivas de 50 ml de  
agua caliente. El filtrado y los lavados, combinados, tie-  
nen un volumen de 1800 ml.

B) AISLAMIENTO.- El filtrado así obtenido se  
20 extrae tres veces con cloroformo. Los extractos en cloro-  
formo se lavan tres veces con agua, se secan sobre sulfa-  
to sódico, y se evaporan a sequedad. La cromatografía en  
placa del residuo, usando alúmina neutra (actividad V) co-  
mo adsorbente, y cloroformo como disolvente revelador, dá  
25 dos bandas principales que se detectan por rayos ultravio-  
letas, se eluyen con acetato de etilo y se combinan. La  
nueva cromatografía de este material, tal como se ha des-  
crito antes, dá una banda principal que se cristaliza con  
cloroformo-éter isopropílico, dando aproximadamente 111  
30 mg de 12 $\beta$ -hidroxi-  $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona, que



tiene un punto de fusión de aproximadamente 228-230°C. La muestra analítica se prepara por recristalización con cloroformo-éter isopropílico; p.f., aproximadamente 235-237°C;

5  $[\alpha]_D^{26} = +51^\circ$  (EtOH);  $\lambda^{KBr} = 2,82, 5,81, 5,93$  y  $6,18$   $\mu$ ;  $\lambda^{EtOH} = 231$  m $\mu$  (14.700);  $\tau_{CDCl_3}^{TMS} = 8,99$  (s, 18-Me), 8,79 (s, 19-Me), 6,21 (d,d,d, J =  $\sim$  1-2 c.p.s., 8 c.p.s., 9,5 c.p.s., 12 $\alpha$ -H) y 4,25 (s, 3-H).

Análisis.- Calc. para C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub> (288,37): C, 74,97; H, 8,39

Hallado : C, 75,06; H, 8,28

10

### Ejemplo 2

#### 12 $\beta$ -acetoxi- $\Delta^3$ -A-norandrosten-2,17-diona

Una solución de 0,0033 ml de ácido perclórico en 0,3 ml de anhídrido acético se añade a 500 mg de 12 $\beta$ -hidroxi- $\Delta^3$ -A-norandrosten-2,17-diona en 10 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min, y luego se vierte en agua de hielo y se somete a extracción con cloroformo. Los extractos en cloroformo se lavan con una solución saturada de bicarbonato sódico, solución con 8% de sal, se secan sobre sulfato sódico y se evaporan a sequedad, dando 12 $\beta$ -acetoxi- $\Delta^3$ -A-norandrosten-2,17-diona.

15

20

### Ejemplo 3

#### 25 $\Delta^3$ -A-norandrosten-2,12,17-triona

Una solución de 50 mg de 12 $\beta$ -hidroxi- $\Delta^3$ -A-norandrosten-2,17-diona en 10 ml de acetona se trata, gota a gota, con una cantidad equivalente de trióxido de cromo-ácido sulfúrico. El sulfato crómico se separa por filtración y se lava con acetona adicional. El filtrado

30



se concentra, se diluye con agua y se extrae con cloro-  
formo. Los extractos en cloroformo se lavan con solución  
con 8% de sal, se secan sobre sulfato sódico, y se evapo-  
ran a sequedad, dando  $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,12-17-trio-  
5 na.

Ejemplo 4

15 $\alpha$ -hidroxi-  $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona

A) FERMENTACION.- Se suspende en 5 ml de so-  
10 lución acuosa de laurilsulfato sódico al 0,01% el creci-  
miento superficial de cada uno de dos cultivos en agar  
inclinados, de 2 semanas, de Colletotrichum linicola  
NCTC-1194 (National Collection Type Culture, Londres, In-  
glaterra), conteniendo dichos cultivos como medio nutri-  
15 tivo (A):

Glucosa	10 g
Extracto de levadura	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Agar	20 g
20 Agua destilada hasta	1 litro

Se usan porciones de 1 ml de esta suspensión para inocu-  
lar 8 matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo cada uno  
de ellos 50 ml del siguiente medio esterilizado (B):

Dextrosa	10 g
25 Líquido de maceración de maíz	6 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Extracto de levadura	2,5 g
CaCO <sub>3</sub>	2,5 g
Agua destilada hasta	1 litro

30 Después de 96 horas de incubación a 25°C, con



agitación rotativa continua (280 ciclos/min; radio de 50,8 mm), se hacen transferencias de 10% (vol/vol) a 34 matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo cada uno 50 ml de medio B recientemente esterilizado. Después de 24 horas más de incubación, usando las mismas condiciones antes descritas, se añade el esteroide (300 microgramos/ml), introduciendo como suplemento en cada matraz 0,25 ml de una solución estéril (60 mg/ml) de  $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona en N,N-dimetilformamida. Se fermenta un total de 510 mg.

Después de aproximadamente 9 horas más de incubación, usando condiciones idénticas a las antes descritas, se reúne el contenido de los matraces y luego se filtra el caldo a través de una masa clarificadora Seitz. Los matraces, micelio y masa se lavan con sucesivas porciones de 50 ml de agua caliente. El filtrado y lavados combinados tienen un volumen de 1800 ml.

B) AISLAMIENTO.- El filtrado así obtenido se extrae tres veces con porciones de 600 ml de cloroformo. Los extractos en cloroformo se lavan tres veces con porciones de 600 ml de agua, se secan sobre sulfato sódico y se evaporan a sequedad. El residuo se cristaliza con metanol-éter isopropílico, dando aproximadamente 223 mg de 15 $\alpha$ -hidroxi- $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona, que tiene un punto de fusión de aproximadamente 266-269°C. La muestra analítica se prepara por recristalización con metanol; p. f. aproximadamente 269,5-270,5°C;  $[\alpha]_D^{29} = +66^\circ$  (EtOH);  $\lambda_{KBr} = 2,92, 5,77, 6,00$  y  $6,19 \mu$ ;  $\lambda_{max}^{EtOH} = m\mu$  (16.100);  $\tau_{CDCl_3}^{TMS} = 9,04$  (s, 18-Me), 8,79 (s, 19-Me), 5,53 (m, 15 $\beta$ -H) y 4,27 (s, 3-H).



Análisis.- Calc. para  $C_{18}H_{24}O_3$  (288,37): C, 74,97; H, 8,39  
Hallado: C, 74,85; H, 8,44

Ejemplo 5

5 15 $\alpha$ -acetoxi- $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona

Una mezcla de 35 mg de 15 $\alpha$ -hisroxi- $\Delta^3$ -A-no  
randrosteno-2,17-diona, 0,25 ml de anhídrido acético y  
0,5 ml de piridina se deja a temperatura ambiente durante  
4,25 horas, se diluye con agua y se somete a extracción  
10 tres veces con éter. Los extractos en éter se lavan con  
una solución saturada de bicarbonato sódico, solución con  
8% de sal, se secan sobre sulfato sódico, y se evaporan a  
sequedad. El residuo se cristaliza con éter, dando aproxi  
madamente 20 mg de 15 $\alpha$ -acetoxi- $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17  
15 -diona, que tiene un punto de fusión de aproximadamente  
153-155°C. La muestra analítica se prepara por recristali  
zación con acetato de etilo-éter isopropílico; p.f., apro  
ximadamente 153-155°C;  $[\alpha]_D^{25} = +63^\circ$  (EtOH);  $\lambda^{KBr} =$   
5,75, 5,95 y 6,18  $\mu$ ;  $\lambda_{max}^{EtOH} = 232 m\mu$  (18.300);  
20  $T_{CDCl_3}^{TMS} = 9,00$  (s, 18-Me), 8,80 (s, 19-Me), 4,78 (m,  
15 $\beta$ -H) y 4,26 (s, 3-H).

Análisis.- Calc. para  $C_{20}H_{26}O_4$  (330,41): C, 72,70; H, 7,93  
Hallado: C, 72,80; H, 7,91

25 Análogamente, sustituyendo el anhídrido acéti  
co por otros agentes de acilación, tal como anhídrido pro  
piónico y cloruro de benzoílo, se forman los ésteres co-  
rrespondientes.

Ejemplo 6

30  $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,15,17-triona



Una solución de 50 mg de 15 $\alpha$ -hidroxi- $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona en 9 ml de acetona se trata, gota a gota, con una cantidad equivalente de trióxido de cromo-ácido sulfúrico. El sulfato crómico se separa por filtración, y se lava con acetona adicional. El filtrado se concentra, se diluye con agua y se somete a extracción con cloroformo. Los extractos en cloroformo se lavan con solución con 8% de sal, se secan sobre sulfato sódico y se evaporan a sequedad, dando  $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,15,17-triona.

#### Ejemplo 7

#### 16 $\alpha$ -hidroxi- $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona

A) FERMENTACION.- Se suspende en 5 ml de solución acuosa de laurilsulfato sódico al 0,01% el crecimiento superficial de cada uno de dos cultivos en agar inclinados, de dos semanas, de Streptomyces roseochromogenes ATCC 13400, conteniendo dichos cultivos como medio nutritivo (A):

Glucosa	10 g
Extracto de levadura	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Agar	20 g
Agua destilada hasta	1 litro

Se usan porciones de 1 ml de esta suspensión para inocular 8 matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo cada uno 50 ml del siguiente medio esterilizado (B):



	Glucosa	30 g
	Harina de soja	20 g
	Aceite de soja	2,2 g
	CaCO <sub>3</sub>	2,5
5	Agua destilada hasta	1 litro

Después de 72 horas de incubación a 25°C, con agitación rotativa continua (280 ciclos/min; radio de 50,8 mm), se hacen transferencias de 10% (vol/vol) a 34 matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo cada uno 50 ml de medio B recientemente esterilizado. Después de 24 horas más de incubación, usando las mismas condiciones antes descritas, se añade el esteroide (300 microgramos/ml), introduciendo como suplemento en cada matraz 0,25 ml de una solución estéril (60 mg/ml) de  $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona en N,N-dimetilformamida. Se fermenta un total de 510 mg. Después de 72 horas más de incubación, usando condiciones idénticas a las antes descritas, se reúne el contenido de los matraces y el caldo se ajusta a un pH igual a 4,5, usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12N. El caldo acidificado se filtra luego a través de una masa clarificadora Seitz. Los matraces, micelio y masa se lavan con sucesivas porciones de 50 ml de agua caliente. El filtrado y lavados combinados tienen un volumen de 1650 ml.

B) AISLAMIENTO. - El filtrado así obtenido se somete a extracción tres veces con cloroformo. Los extractos en cloroformo se lavan tres veces con agua, se secan sobre sulfato sódico y se evaporan a sequedad. El residuo se cristaliza con metanol-éter isopropílico, dando aproximadamente 315 mg de 16 $\alpha$ -hidroxi- $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona, que tiene un punto de fusión de aproximadamente



198-200°C. La muestra analítica se prepara por recristalización con cloroformo-éter isopropílico; p.f., aproximadamente 199,5-200,5°C;  $[\alpha]_D^{28} = +41^\circ$  (EtOH);  $\lambda^{KBr} = 2,95, 5,72, 6,00$  y  $6,20 \mu$ ;  $\lambda^{EtOH} = 233 m\mu$  (16.000);  $\tau_{CDCl_3}^{TMS} = 8,99$  (s, 18-Me), 8,80 (s, 19-Me), 5,61 (q, J-3 c.p.s., 5,5 cps., 16 $\beta$ -H) y 4,25 (s, 3-H).

Análisis.- Calc. para  $C_{18}H_{24}O_3$  (288,37): C, 74,97; H, 8,39  
Hallado: C, 74,88; H, 8,50

#### Ejemplo 8

#### 16 $\alpha$ -acetoxi- $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona

Una mezcla de 35 mg de 16 $\alpha$ -hidroxi- $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona, 0,25 ml de anhídrido acético y 0,5 ml de piridina se deja a temperatura ambiente durante 4 horas, se diluye con agua y se somete a extracción tres veces con éter. Los extractos en éter se lavan con una solución saturada de bicarbonato sódico, solución con 8% de sal, se secan sobre sulfato sódico y se evaporan a sequedad. El residuo se cristaliza con éter-éter isopropílico, dando aproximadamente 21 mg de 16 $\alpha$ -acetoxi- $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona, que tiene un punto de fusión de aproximadamente 158-160°C. La muestra analítica se prepara por recristalización con éter-éter isopropílico; p.f., aproximadamente 161-162°C;  $[\alpha]_D^{26} = +37^\circ$  (EtOH);  $\lambda^{KBr} = 5,74, 5,90$  y  $6,17 \mu$ ;  $\lambda^{EtOH} = 232 m\mu$  (16.300)  $\tau_{CDCl_3}^{TMS} = 8,97$  (s, 18-Me), 8,80 (s, 19-Me), 7,89 (s, 16 $\alpha$ -acetato), 4,58 (d,d, J = 2,5, 8 c.p.s., 16 $\beta$ -H) y 4,24 (s, 3-H).

Análisis.- Calc. para  $C_{20}H_{26}O_4$  (330,41): C, 72,70; H, 7,93  
Hallado: C, 72,80; H, 7,91

Análogamente, sustituyendo el anhídrido acéti

29 SEP 1968

co por otros agentes de acilación, tal como anhídrido pro-  
piónico y cloruro de benzoílo, se forman los ésteres co-  
rrespondientes.

Ejemplo 9

5

$\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,16,17-triona

Una solución de 50 mg de  $16\alpha$ -hidroxi- $\Delta^3$ -A-  
norandrosteno-2,17-diona en 9 ml de acetona se trata, gota  
a gota, con una cantidad equivalente de trióxido de  
10 cromo-ácido sulfúrico. El sulfato crómico se separa por  
filtración y se lava con acetona adicional. El filtrado  
se concentra, se diluye con agua y se extrae con cloroformo.  
Los extractos en cloroformo se lavan con una solución  
con 8% de sal, se secan sobre sulfato sódico y se evaporan  
15 a sequedad, dando  $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,16,17-triona.

La presente solicitud que corresponde a la  
presentada en los Estados Unidos de América, el 30 de Agos-  
to de 1.965, bajo los números 483.784 y 483.812 y 20 de  
Septiembre de 1.965, número 488.773, se acoge a los bene-  
20 ficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propie-  
dad Industrial.

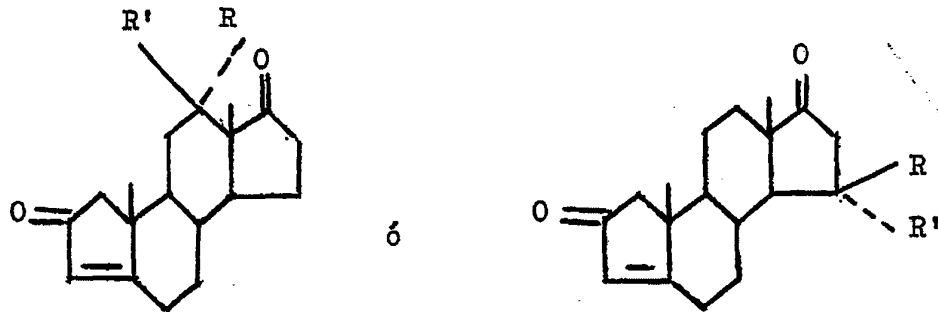
N O T A

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

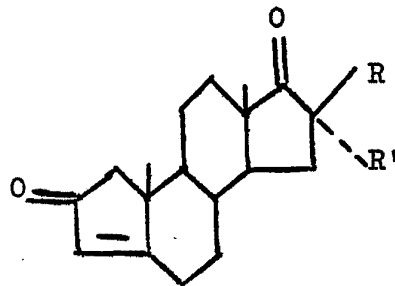


güentes:

1.- Procedimiento para preparar un compuesto de fórmulas:



6



5 donde R es hidrógeno; R' se elige del grupo que consta de hidroxilo y el radical aciloxi de un ácido carboxílico hidrocarbonado de menos de 12 átomos de carbono; y R y R', juntas, son oxo; caracterizado por someter  $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona a la acción de enzimas de los microorganismos Colletotrichum derridis, Colletotrichum linicola o Streptomyces roseochromogenes, y recuperar el correspondiente derivado 12 $\beta$ -hidroxi, 15 $\alpha$ -hidroxi o 16 $\alpha$ -hidroxi de  $\Delta^3$ -A-norandrosteno-2,17-diona.

10

2.- Procedimiento para preparar 12 $\beta$ -hidroxi-



$\Delta^3$ -A-norandrosten-2,17-diona, caracterizado por someter  $\Delta^3$ -A-norandrosten-2,17-diona a la acción de enzimas del microorganismo Colletotrichum derridis.

3.- Procedimiento para preparar  $15\alpha$ -hidroxi-  
5  $\Delta^3$ -A-norandrosten-2,17-diona, caracterizado por someter  $\Delta^3$ -A-norandrosten-2,17-diona a la acción de enzimas del microorganismo Colletotrichum linicola.

4.- Procedimiento para preparar  $16\alpha$ -hidroxi-  
10  $\Delta^3$ -A-norandrosten-2,17-diona, caracterizado por someter  $\Delta^3$ -A-norandrosten-2,17-diona a la acción de enzimas del microorganismo Streptomyces roseochromogenes.

5.- Procedimiento para preparar esteroides fisiológicamente activos.

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

Esta Memoria consta de diecisiete hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

29 SEP. 1966

P. A.

Alberto de Euzkadi  
Por Euzkadi