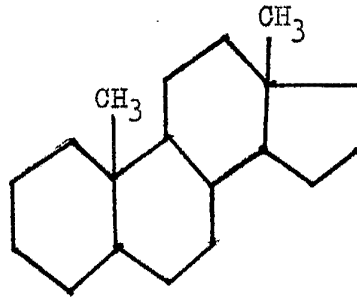




1

El invento se refiere a la preparación microbiológica de esteroides, que no contienen un sustituyente carbonoso en la posición 17 y cuya estructura de carbono se muestra abajo:

5



10

Esta preparación parte de esteroides o derivados de los mismos, que tienen en el átomo de carbono 17 un grupo alifático con un mínimo de 8 átomos de carbono.

15

Se conoce desde hace mucho tiempo que ciertos micro-organismos son capaces de descomponer completamente esteroides con una cadena lateral en el átomo de carbono 17, tal como colesterol. En 1913 SOEHNGEN halló que las bacterias del género Mycobacterium podían crecer en un medio conteniendo colesterol como única fuente de carbono (Zentr. bl. Bakt. II Abt. 37 (1913) 595).

20

En 1942 TAK dedicó a estos fenómenos una investigación, en el curso de la cual aisló una bacteria, que denominó Mycobacterium cholesterolicum (Ant. van Leeuwenhoek 8 (1942) 32). Después de esto, aparecieron publicaciones sobre la conversión de colesterol, en que se mencionan micro-organismos de los géneros Proactinomyces, Azotobacter, Flavobacterium, Aerobacter, Pseudomonas, Nocardis, y Streptomyces.

25



1 En estas conversiones el colesterol es disociado completamente en compuestos teniendo un bajo peso molecular y no se acumulan cantidades apreciables de productos intermedios con un carácter de esteroide. 4-colesteno 3-ona y
5 7-dehidrocolesterol se detectan algunas veces en pequeñas cantidades. En una ocasión se menciona por TAK una pequeña cantidad de 4-colesteno 3,6-diona.

WHITMARSH trató de retardar la disociación de colesterol (con especies de Nocardia) por adición de un inhibidor orgánico esperando así aislar productos intermedios que pudieran dar una indicación sobre la ruta por la que prosigue esta disociación. El inhibidor usado por el mismo fué 8-hidroxinolina y entonces fué posible detectar ácido 3-queto $\Delta^{1,4}$ -bis-norcolénico así como una pequeña cantidad de ácido 3-queto $\Delta^{1,4}$ -bis-norcolénico en extractos ácidos del medio de cultivo. En la fracción neutra se detectaron pequeñas cantidades de 1,4-androstadieno-3,17-diona y 4-androsteno-3,17-diona (Bioch. J. 90 (1964) 23P).

20 De acuerdo con Abstracts of Papers the 150th Meeting of the American Chem. Soc. (1965) 13 Q, C.J. SIH s.s. sometió 1,3,5 (10)-colestatrieno a la acción de bacterias con la intención de obtener que se formase estrona. A ese halló que el substrato no fué convertido por organismos del género Nocardia y Mycobacterium. Por otra parte 19-hidroxi-colesteno-3-ona se convirtió fácilmente en estrona, y 6,19-óxido-4-colesteno 3-ona en 6,19-óxido-4-androsteno-3,17-diona por estos micro-organismos.

25 Ahora se ha encontrado posible preparar esteroi-



1

des no conteniendo ningún sustituyente carbonoso en la posición 17, por conversión microbiológica de esteroides conteniendo un radical saturado o insaturado por lo menos con 8 átomos de carbono en posición 17, con la ayuda de organismos del género Mycobacterium, cuando la conversión microbiológica se ejecuta en la presencia de un inhibidor orgánico.

5

El procedimiento según el invento parte de esteroides, cuyo sistema de anillo es atacado durante la conversión microbiológica.

10

Como ejemplos de los productos de partida se mencionan específicamente los siguientes 3-queto ó 3-hidroxiesteroides con una cadena lateral en posición 17: colesterol β -sitosterol, stigmasterol, 4-colesteno 3-ona.

15

También es posible usar derivados, tales como los ésteres de esteroides, específicamente cloruro de colesteril betaina, acetato de colesteril, hemisuccinato de colesteril ó productos de adición, específicamente 5 α -clorocolestanol, o también esteroides, en que además han tenido lugar en el anillo A una o más sustituciones adicionales. Los microorganismos que deben ser usados para la conversión, pertenecen al género Mycobacterium, tales como Mycobacterium phlei,

20

Mycobacterium butyricum. Son inhibidores adecuados, que inhiben la disociación de tal modo que la estructura de anillo esteroide y los correspondientes grupos angulares de metilo permanecen intactos cuanto sea posible, por ejemplo, ciertos iones inorgánicos, tales como, ión de níquel, ion de cobalto, ión de plomo, ion de cadmio y ion de selenio. El objeto del

25



1 es la preparación de esteroides teniendo una estructura de
19 átomos de carbono que juntos forman la estructura dimetil
ciclopentenoperhidrofenantreno, y en particular la prepara-
5 ción de 1,4-androstadieno-3,17-diona y 4-androsteno-3,17-
diona.

El grupo queto en la posición 17 puede detectarse
fácilmente por medio de la reacción Zimmerman si no están
presentes sustituyentes en el átomo de carbono 16 (W. Zimmer
10 man, Hoppe Sylers Z. Physiol. Chemie 233 (1935) 257).

10 La androstadieno diona es un producto valioso, que
puede servir como material de partida para la preparación
de compuestos con actividad androgénica, estrogénica, anabó-
lica y anti-concepcional.

15 El nuevo procedimiento hace posible, entre otras
cosas, convertir el colesterol presente en la naturaleza,
que en sí mismo es usado sólo en una extensión limitada, en
un producto intermedio de gran valor.

Para la aplicación apropiada del procedimiento es
necesario cultivar la especie de bacteria del género Mycobac
20 terium en un medio conteniendo una fuente inorgánica u or-
gánica de nitrógeno tal como amino-ácidos, sales de amonio,
nitratos de álcali y metales alcalino-térreos, peptona, li-
cor de maceración de maíz, extracto de levadura, harina de
semilla de algodónero, harina de semilla de soja, "solubles
25 de destilador" y semejantes son también muy adecuados. Los
medios no necesitan contener ninguna clase de fuentes asimi-
lables de carbono, tales como azúcares, almidón, alcoholes



1 polivalentes, aunque su presencia no tiene ningún efecto no-
civo sobre el curso del procedimiento. Además un medio ade-
cuado también contiene la cantidad usual de sales, tales co-
mo fosfatos, sulfatos, cloruros de álcali y de metales alca-
5 lino-térreos. Elementos de traza están usualmente presentes
en cantidades suficientes debido al uso de agua de la cañería.

10 Cuando se utilicen fuentes naturales de nitrógeno,
consistentes en una mezcla complicada, tal como el licor de
maceración de maiz, puede omitirse frecuentemente la adición
de sales minerales.

Los medios son esterilizados de la manera conven-
cional y después de este tratamiento pueden tener un pH de
4.0 a 8.5, y una acidez de alrededor de 7.0 es usual.

15 Cuando las células han crecido suficientemente en
el medio bajo aereación constante, puede agregarse el este-
roide, por ejemplo, colesterol ó β -sistoterol, bien sea di-
suelto en un disolvente adecuado tal como N,N-dimetilforma-
mida, o en la forma de una fina suspensión en agua.

20 La cantidad de inhibidor que debe agregarse, depen-
de de de circunstancias. Si la concentración es demasiado baja,
el esteroide agregado se disociará completamente en sustan-
cias teniendo un bajo peso molecular. Si la concentración
es demasiado alta, la conversión del esteroide será grande-
mente inhibida y el micro-organismo algunas veces incluso
25 será muerto. Si se utiliza $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, es suficiente una
concentración de 10-1000 mg por litro, aunque pueden conce-
birse circunstancias, en que es deseable una concentración.



1

más baja o más alta. Si se usa cloruro de cobalto, acetato de plomo, sulfato de cadmio o selenita de sodio, la concentración preferentemente también cae en los límites arriba mencionados.

5

El momento en que se agrega el esteroide, está situado entre 0 y 72 horas después de la inoculación, aunque se obtienen resultados razonables también con una adición más tardía. Sin embargo, preferentemente la adición tiene lugar de 24 a 48 horas después de la inoculación del cultivo,

10

cuando las bacterias han crecido suficientemente. Permanece posible una adición muy temprana, por ejemplo, inmediatamente después de la inoculación. El inhibidor en general se añadirá simultáneamente con el esteroide, porque las bacterias no se matan cuando el inhibidor se agrega en una concen-

15

tración adecuada. Esto puede determinarse fácilmente por referencia a cultivos obtenidos untando el cultivo, después de adición de esteroide e inhibidor, sobre un medio adecuado de cultivo.

20

La conversión del esteroide tiene lugar con constante aireación a una temperatura que varía entre 20° y 45°C, aunque el procedimiento también progresará a una temperatura

25

más baja o más alta. Se hace que la reacción preferentemente tenga lugar a 30°C, aunque no es necesario que sea la misma la temperatura durante las fases de cultivo y proceso de disociación. La bacteria puede cultivarse primeramente durante 24 horas a 26°C, después de lo cual la temperatura puede elevarse a 30°C después de adición de esteroide e inhibidor.



1 La conversión del esteroide añadido requiere 1-7 días, pero como regla la cantidad del producto final deseado no aumenta más después de 3 días. Un producto principal importante formado en el caso de esteroides, cuando no ha tenido lugar ninguna ulterior sustitución en el anillo A, es 5 1,4-androstadieno-3,17-diona, con pequeñas cantidades de 4-androsteno 3,17-diona en adición, siendo dependientes los grados de rendimiento, entre otras cosas, de la aireación. Las circunstancias descritas conducen a una deseable preponderancia de 1,4-androstadieno-3,17-diona sobre 4-androsten-10 3,17-diona. Los esteroides formados pueden ser obtenidos del líquido de cultivo por extracción con un líquido inmiscible en agua, tal como metil isobutil-cetona, etilacetato, cloruro de metileno, cloroformo. Estos extractos se evaporan 15 a sequedad; el residuo es extraído con un disolvente orgánico para la eliminación de sustrato no convertido, tal como colesterol o stigmasterol.

La sustancia sólida restante entonces puede purificarse ulteriormente y separarse en sus componentes por cromatografía y recristalización. 20

El invento se explicará con referencia a los siguientes ejemplos:

Ejemplo I

25 Un cultivo de inoculación de Mycobacterium phlei, cepa de KNGSF 70 se prepara inoculando un cultivo de esta bacteria sobre agar de caldo, incubado durante 3 días a 30°C en un medio consistente en una solución de 10g de extracto



130001800

- 8. -

1 de levadura (DIFCO) en 1 litro de agua de la cañería de pH = 6,8 que previamente ha sido esterilizada durante 30 minutos a 110°C. El medio está contenido en frascos de dos litros. Cada frasco contiene 500 ml de medio.

5 El cultivo se agita sacudiendo durante 48 horas a 30°C en un aparato sacudidor del tipo rotativo a un régimen de 250 r.p.m. y una sacudida de $2\frac{1}{2}$ cm, después de lo cual las bacterias han crecido suficientemente para ser ulteriormente inoculadas.

10 El principal medio de fermentación se prepara diluyendo en cada caso 5 g. de licor de maceración de maíz (calculado como materia seca) con agua de la cañería a 1 litro y llevando suficientemente líquido a pH = 7.0 con solución diluida de hidróxido de sodio. Este medio es esterilizado en tres frascos durante 30 minutos a 110°C. Cada uno de los tres frascos de 2 litros utilizados contiene 1 litro de medio. Los frascos ahora se inoculan con el cultivo de inoculación arriba descrito, añadiéndose 50 ml a cada uno de los frascos. La inoculación es por lo tanto de 5%. Los
15
20 frascos son sacudidos durante 48 horas a 30°C de la misma manera descrita arriba.

25 A cada uno de los frascos se añade 1 g de colesterol en forma de una suspensión en agua, obteniéndose pulverizando el esteroide en un mortero con adición de agua conteniendo 0,1% de Tween-80. Además se agrega a cada frasco una solución estéril de 750 mg de $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua, que importa 157 mg de iones de níquel. Los frascos ahora



1

son sacudidos ulteriormente bajo las mismas condiciones. Ya 12 horas después de la adición de colesterol puede demostrarse la presencia de 1,4-androstadieno-3,17-diona por medio de una delgada capa de cromatografía. Para esto se usa gel de G de sílice de acuerdo con STAHL; el eluyente consiste en una mezcla de cloroformo y acetato de etilo en la relación de volumen 10:1.

5

10

15

20

Después de 3 días de agitación el contenido de tres frascos se combina y la mezcla se extrae tres veces con 1/5 de su volumen de metil isobutilcetona. El extracto es evaporado a sequedad a presión reducida y el residuo es extraído con 20 ml de metanol hirviendo. Como consecuencia, se elimina el colesterol no convertido. Del residuo puede recuperarse 1,6 g de colesterol. El extracto de metanol contiene el producto deseado. Después de evaporación a sequedad, el mismo se recibe en 8 ml de benceno, después de lo cual esta solución se cromatografía sobre una columna conteniendo 30 g de óxido de aluminio (Al_2O_3 de acuerdo con WOELMS, neutro, actividad III). La columna es eluida con una mezcla de benceno y acetona (10:1), mientras se determina por medio de cromatografía de capa delgada, en qué fracciones está presente la 1,4-androstadieno-3,17-diona. Las fracciones en cuestión se recogen y evaporan.

25

El residuo se recrystaliza desde una mezcla de acetona y heptano (1:3). De esta manera se obtienen 160 mg de cristales, de los que, después de cristalización renovada, se obtienen finalmente 138 mg del producto puro. Esto llega



1 a un rendimiento de 13,4% basado sobre el colesterol consumido.

El punto de fusión es 137,5-139°C y el de una muestra de androstadieno diona de calidad analítica es 137-138°C.
5 Una mezcla de los dos productos cristalinos no muestra ningún descenso del punto de fusión. Los espectros infrarrojos de las dos muestras son idénticos.

Ejemplo II

10 Análogamente al procedimiento descrito en el Ejemplo I, se prepara un cultivo Mycobacterium phlei, cepa KNGSF 75-3/53.

15 La fermentación principal tiene lugar en tres frascos de 500 ml, cada uno de los cuales contiene 100 ml de medio. Aquí se usa de nuevo un cultivo de inoculación de 5%, en relación con la cantidad de medio principal de fermentación. Los frascos son sacudidos de la manera usual, y 48 horas después de la inoculación se añaden 200 mg de colesterol a cada frasco, y también 50 mg de NiSO₄·7H₂O, después de lo cual se continua la agitación. Después de tres días
20 los frascos juntos contienen cantidades de 1,4-androstadieno-3,17-diona variando entre 188,9 y 236 mg, usualmente con pequeñas cantidades de 4-androsteno 3,17-diona en adición.

El rendimiento varía de 42,8 a 53,6% basado en el colesterol añadido.

Ejemplo III

25 De acuerdo con el procedimiento del Ejemplo II se usa un cultivo de Mycobacterium phlei, cepa KNGSF 70.

18



1

A cada uno de los frascos se agregan 400 mg de colesterol y después de cuatro días puede aislarse 93 mg de 1,4-androstadieno-3,17-diona por el método descrito en el Ejemplo I. La cantidad de sustrato no convertido alcanza a 230 mg para cada uno de los casos. Correspondientemente, por lo menos 170 mg de colesterol se ha convertido en cada frasco, de lo que teóricamente puede obtenerse 124 mg de 1,4-androstadieno-3,17-diona. De estos datos resulta que la conversión ha tenido lugar en un rendimiento de 75% basado en el colesterol convertido y de 31,6% basado en el colesterol añadido.

5

10

Ejemplo IV

15

Análogamente al Ejemplo II, se trata Mycobacterium butyricum ATCC 11.314. Aislamiento y purificación de acuerdo con el Ejemplo I, rendimiento 30 mg de 1,4-androstadieno-3,17-diona en cada frasco después de tres días de sacudir. El rendimiento es 20,4% basado en el colesterol añadido.

Ejemplo V

20

Se trata de acuerdo con el Ejemplo II Mycobacterium phlei cepa KNGSF 70. En lugar de colesterol, sin embargo, se agrega a cada uno de los frascos 400 mg de β -sitosterol. Después de cuatro días se aísla de cada uno de los frascos de acuerdo con el Ejemplo I, 37 mg de 1,4-androstadieno-3,17-diona. Esto llega a un rendimiento de 13,5% basado en el β -sitosterol añadido.

25



18 MAR 1966

1

Ejemplo VI

5

El procedimiento es el mismo que en el Ejemplo III, con la diferencia de que se añade a cada uno de los frascos 400 mg de stigmasterol. Después de tres días puede demostrarse la presencia de 1,4-androstadieno-3,17-diona por medio de cromatografía de capa delgada, como se describe en el Ejemplo I.

Ejemplo VII

10

Un cultivo de Mycobacterium phlei, cepa KNGSF 70 se prepara como se describe en el Ejemplo III, pero en lugar de 50 mg de sulfato de níquel, se añade a cada uno de los frascos una cantidad igual de cloruro de cobalto. Después de agitación durante dos días a 30°C puede demostrarse, por medio de cromatografía de capa delgada, la presencia de 1,4-androstadieno-3,17-diona y 4-androsteno-3,14-diona.

15

Ejemplo VIII

20

Se repite el Ejemplo VII, con la diferencia de que en lugar de sulfato de níquel se añade a cada uno de los frascos 5 mg de sulfato de cadmio. Después de 1 día de agitación es evidente de los cromatogramas de capa delgada la presencia de cantidades de 1,4-androstadieno-3,17-diona, así como de 4-androstadieno-3,17-diona. En adición, son visibles otras dos manchas desconocidas, que mostrarán una reacción positiva de Zimmerman. La cantidad del producto se determina por extracción del líquido con metil isobutilcetona y cromatografía del extracto sobre papel en un sistema de benceno heptano (5:4) saturado con formamida, elución de la respec-

25



1 tiva mancha con metanol y medida de la extinción a una longitud de onda de 244 m μ en un espectrofotómetro Unicam.

Una mezcla de 1,4-androstadieno-3,17-diona y 4-androsteno-3,17-diona está presente en cada uno de los frascos en una cantidad de 2,4 mg (rendimiento 10% calculado sobre el colesterol añadido).

Ejemplo IX

10 El experimento descrito en el Ejemplo VII se repite, pero en lugar de sulfato de níquel, se añade a cada uno de los frascos 50 mg de acetato de plomo. Después de dos días, ya se encuentra una considerable formación de 1,4-androstadieno-3,17-diona, por medio de cromatografía de capa delgada.

Ejemplo X

15 Se repite el experimento descrito en el Ejemplo VII, pero en lugar de sulfato de níquel se añade a cada uno de los frascos 50 mg de selenita de sodio. Por medio de cromatografía de capa delgada puede detectarse después de dos días la formación de 1,4-androstadieno-3,17-diona. También está presente 4-androsteno-3,17-diona.

Ejemplo XI

20 El procedimiento es análogo al del Ejemplo III, con la diferencia de que en lugar de colesterol, se añade a cada uno de los frascos 200 mg de 4-colesteno 3-ona. Después de tres días de agitación, por medio del método de medición de extinción, descrito en el Ejemplo VIII puede comprobarse una cantidad de 25-30 mg de 1,4-androstadieno-3,17-diona (rendimiento de 16,9-20,2% basado en el colesterol añadido).

1

Ejemplo XII

El procedimiento es análogo al del Ejemplo III, con la diferencia de que en lugar de colesterol, se añade a cada uno de los frascos 200 mg de cloruro de colesteril betaina fácilmente soluble en agua. Después de cuatro días de agitación, el producto de reacción se aísla y purifica de la manera descrita en el Ejemplo I. Así se obtuvieron 20-25 mg de 1,4-androstadieno-3,17-diona así como pequeñas cantidades de la 4-androsteno-3,17-diona (rendimiento de 18,3-22,9% basado en el cloruro de colesterilbetaina añadido).

5

10

Ejemplo XIII

El procedimiento es análogo al del Ejemplo IV, con la diferencia de que ahora se añade a cada uno de los frascos 200 mg de 5 α -clorolestanol. Aislamiento y purificación de acuerdo con el Ejemplo I, rendimiento 16,7 mg de 1,4-androstadieno-3,17-diona y 3,9 mg de 4-androsteno-3,17-diona, un rendimiento total de 15,3% basado en colesterol añadido. Los productos formados contienen 18,9% de 4-androsteno 3,17-diona.

15

20

N O T A . -
 = = = = =

25

La presente patente de invención, comprende las siguientes reivindicaciones:



1

1.- Procedimiento para la preparación de esteroides, que no contienen un sustituyente carbonoso en la posición 17, por conversión micro-biológica de esteroides conteniendo un radical alifático saturado o insaturado con por lo menos 8 átomos de carbono en posición 17, con la ayuda de micro-organismos del género Mycobacterium, caracterizado porque dichos esteroides conteniendo un radical alifático saturado o insaturado, con por lo menos 8 átomos de carbono en posición 17, son esteroides, cuyo sistema de anillo será atacado durante la conversión microbiológica con micro-organismos del género Mycobacterium y porque dicho ataque del sistema de anillo es impedido por realizar la conversión microbiológica en presencia de un inhibidor inorgánico.

5

10

15

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se usa un ion como inhibidor inorgánico.

20

3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque se usa ion de níquel como inhibidor inorgánico.

25

4.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque se usa ion de cadmio como inhibidor inorgánico.

5.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque se usa ion de cobalto como inhibidor inorgánico.



1
6.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque se usa ion de plomo como inhibidor inorgánico.

5
7.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque se usa ion de selenita como inhibidor inorgánico.

10
8.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque se usa como material de partida colestero o un derivado del mismo.

9.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque se usa como material de partida β -sitosterol o un derivado del mismo.

15
10.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque se usa como material de partida stigmasterol o un derivado del mismo.

20
11.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque se usa como material de partida 4-colesteno-3-ona.

25
12.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque se usa como material de partida 5 α -clorocolestanol o un derivado del mismo.

13.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-

18



- 17.-

1

12, caracterizado porque se usa como micro-organismo, Mycobacterium phlei.

5

14.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque se usa como micro-organismo, Mycobacterium butyricum.

10

15.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-14, caracterizado porque se prepara 1,4-androstadieno-3,17-diona y 4-androsteno-3,17-diona.

15

16.- Procedimiento para la preparación de esteroides.

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

Madrid, a 18 OCT. 1966
CARLOS ROEB

20

25