

332814

RAN 4104/39



1965

P A T E N T E
D E
I N V E N C I Ó N

por "UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR 11BETA-HIDROXI-9BETA,10ALFA-
-ESTEROIDES", a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE
& CIE. SOCIETE ANONYME, domiciliada en BASILEA (Suiza).

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

- Este invento se refiere a un procedimiento para la preparación de 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-esteroides y de sus ésteres. Más particularmente, el invento se refiere a un método para introducir el grupo 11beta-hidroxílico en
5. un 9beta,10alfa-esteroide insustituído en la posición 11, valiéndose de microorganismos de los grupos taxonómicos Fungi o Schizomycetes. El 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-esteroide así obtenido puede luego, si se desea, someterse a esterificación.

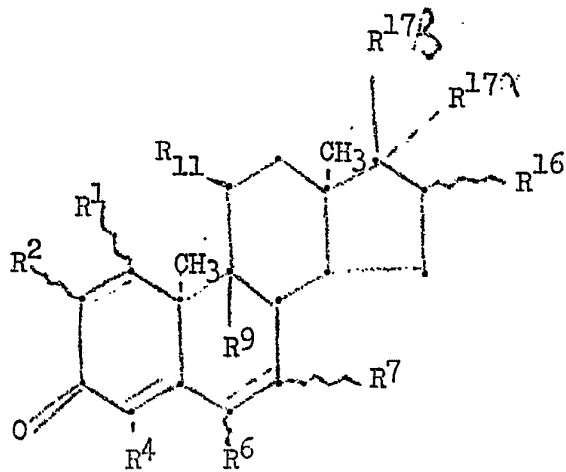
 10. Se ha descubierto mediante esta invención que ciertos



microorganismos de muestras de terreno, de animales o de sus excrementos son capaces de introducir un grupo 11beta-hidroxílico en 9beta,10alfa-esteroides. Estos microorganismos pueden utilizar los 9beta,10alfa-esteroides como única fuente de carbono o son capaces de tolerar estos esteroides en presencia de otras fuentes de carbono asimilables.

Los productos del procedimiento de este invento pueden representarse por la fórmula general

10.



15.

en la que R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^7 y R^{16} son cada uno, cuando se toman solos, hidrógeno, halógeno de un número atómico de 9 a 35, inclusive (es decir, flúor,



5. cloro o bromo), ciano, hidroxilo, aciloxilo o aciltio hasta unos 20 átomos de carbono, alcoxilo o alkiltio hasta unos 10 átomos de carbono, aralcoxilo o aralkiltio hasta unos 10 átomos de carbono, oxícicloalifático o tiocicloalifático hasta unos 10 átomos de carbono e hidrocarbilo alifático hasta unos 7 átomos de carbono; R^9 es hidrógeno o halógeno de un número atómico de 9 a 35, inclusive; $R^{17\text{alfa}}$, cuando se toma solo, es hidrógeno, hidroxilo o hidrocarbilo alifático hasta unos 7 átomos de carbono; $R^{17\text{beta}}$, cuando se toma solo, es acetilo, hidroxiacetilo, hidroxilo, aciloxilo hasta unos 20 átomos de carbono, alcoxilo hasta unos 10 átomos de carbono, aralcoxilo hasta unos 10 átomos de carbono u oxícicloalifático hasta unos 10 átomos de carbono; y R^{11} es hidroxilo o aciloxilo hasta unos 20 átomos de carbono.
- 10.
- 15.

20. Las líneas de trazos entre C_1 y C_2 y entre C_6 y C_7 representan enlaces de carbono-carbono simples o dobles. Las líneas de trazos que van a sustituyentes en el núcleo ciclo-pentafenantrénico indican que los sustituyentes se hallan en la orientación alfa; las líneas continuas indican que los sustituyentes se hallan en la orientación beta; y las líneas onduladas indican que el sustituyente puede estar en orientación alfa o beta.



- Compuestos preferidos dentro del ámbito de la fórmula I son aquellos en los que R^1 , R^2 y R^4 son cada uno hidrógeno; R^6 , R^7 y R^{16} son hidrógeno, halógeno (especialmente, fluor), alquilo hasta unos 3 átomos de carbono (en especial, metilo), hidroxilo, aciloxilo, alcoxilo, aralcoxilo u oxicloalifático, siendo hidrógeno uno por lo menos de los símbolos; y R^9 , $R^{17\text{alfa}}$ y $R^{17\text{beta}}$ tienen el significado que se les ha atribuido antes. Se prefieren en especial los productos en los que R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^7 y R^{16} son todos hidrógeno.
- 5.
10. Con la expresión "aciloxilo" se significa el radical ácido de un ácido carboxílico con 1 a 20 átomos de carbono aproximadamente, monobásico o dibásico, saturado o insaturado, alifático, cicloalifático, aralifático o aromático. Ácidos preferidos son los que carecen de heteroátomos distintos de oxígeno en forma de un grupo carbonílico o carboniloxílico.
15. Ejemplos de tales ácidos son el ácido fórmico, el ácido capríco, el ácido enántico, el ácido palmítico, el ácido esteárico, el ácido succínico, el ácido malónico, el ácido cítrico, el ácido benzoico y análogos. La expresión "aciltio" abarca los radicales de los ácidos tiólicos análogos, tales como el ácido tiolacético, el ácido tiolbenzoico, etc.
- 20.
- Las expresiones "alcoxilo", "aralcoxilo", "alkiltio" y "aralkiltio" abarcan los radicales de alcoholes o tioles, tales como metoxilo, metiltio, etoxilo, etiltio, propoxilo,
25. butoxilo terciario, benciloxilo y análogos.



Con la expresión "oxicicloalifático" se significa un grupo cicloalifático o cicloalquénico, así como sus derivados de alquilo inferior y alcoxilo inferior, y los análogos que contienen oxígeno en forma de un enlace etéreo. Los grupos apropiados incluyen ciclopentoxilo, ciclohexoxilo, ciclopent-1-enoxilo, 1-etoxiciclopentoxilo, tetrahidropiranióxilo, etc.

La expresión "hidrocarbilo alifático inferior" incluyen grupos alifáticos, alquénicos y alquínicos de 1 a unos 7 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, vinilo, alilo, 1- y 2-metililo, etinilo, propargilo, etc.

Los microorganismos que son útiles en el procedimiento de este invento son los de los grupos taxonómicos Fungi y Schizomycetes, en especial los de los subgrupos Fungi imperfecti, Ascomycetes, Phycomycetes, Basidiomycetes y Actinomycetales. Los ejemplos ilustrativos de microorganismos específicos incluyen: *Gliocladium catenulatum*, *Gliocladium roseum*, *Helicostylum piriforme*, *Penicillium canescens*, *Mucor griseocyanus*, *Mucor corymbifer*, *Choanephora circinans*, *Nocardia lurida*, *Streptomyces rimosus* y *Streptomyces fradiae*. Pueden emplearse también mutantes producidos por métodos químicos (por ejemplo, por tratamiento con nitrito) o por métodos físicos (como irradiación).



El procedimiento de este invento se lleva a cabo en condiciones semejantes a las empleadas en procedimientos conocidos antes para la fermentación de los esteroides con microorganismos.

5. Los microorganismos utilizados conforme a este invento pueden cultivarse en medios nutricios sólidos o líquidos, que contengan una fuente de nitrógeno asimilable, una fuente de carbono asimilable y sales inorgánicas.

10. Las fuentes de nitrógeno asimilables apropiadas incluyen compuestos animales, vegetales, microbianos e inorgánicos, como extractores de carne, peptonas, maceración de maíz, extractos de levadura, glicina, nitrato sódico, etc., o sus mezclas.

15. Las fuentes de carbono asimilables apropiadas incluyen todos los azúcares y sus polímeros, como por ejemplo almidón, dextrina, sacarosa, maltosa y glucosa, lo mismo que los aminoácidos, las proteínas, las peptonas, los ácidos grasos, las grasas y los esteroides, en especial los β , 10α -fa-esteroides, así como sus mezclas.

20. El medio puede contener oligoelementos (presentes por naturaleza o añadidos) asequibles a partir de ingredientes minerales u orgánicos. La presencia de hierro es particular-



mente deseable. El azufre puede hallarse presente en forma de compuestos orgánicos o inorgánicos que se hallen en otros componentes del medio o puede añadirse especialmente. Lo mismo cabe decir del fósforo, aunque en general se le administra en forma de una sal inorgánica.

5. Según se requiera o se desee, pueden agregarse a los medios otros factores o estimulantes del crecimiento, tales como vitaminas (por ejemplo, biotina o piridoxina) o auxinas (por ejemplo, ácido indolilacético).

10. Para protegerlo de las infecciones, el medio puede esterilizarse y, además, proveerse de materiales que inhiban el desarrollo de microorganismos infectantes (por ejemplo, benzoatos, antibióticos, etc.)

15. Antes de la inoculación, es deseable ajustar el pH del medio en la escala de 4 aproximadamente a 9 aproximadamente, según el microorganismo que se emplee. Para la *Nocardia lurida*, se prefiere un pH de 5 aproximadamente a 8 aproximadamente. El cultivo del microorganismo puede realizarse de la manera ordinaria, según el tipo de Fungi o Schizomycetes que se emplee. La *Nocardia lurida*, por ejemplo, se desarrolla a 20. 18-40°C, y de preferencia a 28°C.

El esteroide puede añadirse a la preparación de fermentación en cualquier estadio del desarrollo del microorganismo o antes de la esterilización del medio. Por lo general,



- sin embargo, se deja al microorganismo cierto período de desarrollo previo y no se añade el esteroide hasta pasadas 15 a 96 horas del principio de la fermentación. El esteroide que ha de fermentarse puede añadirse de cualquier manera conveniente, pero de preferencia de modo que se produzca una superficie máxima de contacto entre el esteroide y el microorganismo. Por ejemplo, el esteroide puede dispersarse en el medio mecánicamente o valiéndose de agentes dispersantes, o bien se le puede añadir en disolución en un disolvente orgánico (como acetona, propilenglicol, sulfóxido de dimetilo, alcoholes, etc.).
- 5.
- 10.

La concentración del esteroide añadido no es crítica y, según la edad de cultivo del microorganismo, pueden añadirse hasta 1 a 2 g aproximadamente por litro de solución nutritiva.

- Pueden emplearse las técnicas tanto de fermentación sumergida como de fermentación superficial. Además, la enzima que hace fermentar los esteroides puede también separarse del cultivo micótico o del medio nutritivo y ponerse en contacto con el sustrato de esteroide; en ausencia de células vivas.
- 15.

- La fermentación se efectúa de ordinario con el mismo pH y la misma temperatura que requiere el microorganismo para desarrollarse. Sin embargo, en algunos casos la temperatura y/o el pH óptimos para el desarrollo pueden no ser óptimos siempre para la hidroxilación del esteroide.
- 20.



El tiempo necesario para la reacción del esteroide fluctua algo según la preparación fermentativa, el modo de operación y el microorganismo; pero por lo general abarca un período de 2 horas aproximadamente a 172 horas aproximadamente.

5. El curso de la reacción puede determinarse para cada preparación fermentativa por medio de los métodos analíticos usuales, tales como cromatografía de capa delgada, absorción ultravioleta, etc. La rapidez de la reacción y el rendimiento de producto pueden incrementarse induciendo las enzimas deseadas antes de la adición del esteroide. Como inductores enzimáticos puede emplearse cualquier esteroide, aún los de la serie normal, tales como el estradiol, la testosterona, etc. Sin embargo, los inductores enzimáticos preferidos son los esteroides que resultan más solubles en agua que el substrato que haya de emplearse. La cantidad y el tiempo de adición de los inductores no son críticos, aunque normalmente se añade al medio de 1% en peso aproximadamente a 10% en peso aproximadamente del esteroide empleado.
- 10.
- 15.

Otra posibilidad para aumentar el rendimiento de 11beta-hidroxi-9beta,10alpha-esteroides consiste en la adición de sustancias citotóxicas, tales como el 2,4-dinitrofenol o el cianuro potásico, o de sustancias antibióticas, tales como la cloromicetina, a la preparación fermentativa en que se hallan ya las enzimas necesarias para la 11beta-hidroxilación.

- 20.



= 10 =

Terminada la fermentación, se aísla de la preparación el esteroide fermentado. Un método especialmente ventajoso para efectuar el aislamiento es la extracción por medio de un disolvente para esteroides que sea inmisible con el agua, tal como el cloruro de metileno, el cloroformo, la metil-isobutil-cetona, el tetracloruro de carbono, el éter, el tricloroetileno, los alcoholes, el benceno, el hexano, etc.

La sustancia celular puede separarse también con los disolventes enumerados antes y extraerse asimismo por medio de disolventes miscibles con el agua, como acetonas, sulfóxido de dimetilo, alcohol etílico, etc. Los esteroides obtenidos de los extractos pueden purificarse por recristalización, cromatografía o distribución en contracorriente y separarse de los productos de fermentación no deseados.

Los 11beta,10alpha-esteroides producidos de acuerdo con este invento pueden esterificarse con ácidos carboxílicos, tales como ácidos carboxílicos alifáticos, saturados o insaturados, de preferencia ácidos alcancarboxílicos inferiores con 1 a 6 átomos de carbono aproximadamente, en especial el ácido acético, o ácidos carboxílicos aromáticos, de preferencia ácidos carboxílicos aromáticos mononucleares, tales como el ácido benzoico.



- La esterificación puede llevarse a cabo por métodos que son ya de sí conocidos; por ejemplo, mediante reacción del producto de la hidroxilación con un derivado reactivo de un ácido carboxílico, tal como el anhídrido o un haluro, en presencia de bases tales como la piridina, en cuyo caso pueden esterificarse también los grupos hidroxílicos que se hallen presentes además del grupo β -hidroxílico. Luego, los grupos hidroxílicos primarios esterificados, tales como un grupo α -hidroxílico, pueden saponificarse parcialmente; por ejemplo, mediante tratamiento con álcali débil, tal como solución alcohólica de carbonato alcalino.

- La acetilación, que representa una modalidad preferida de la esterificación, puede efectuarse, por ejemplo, por medio de anhídrido acético/piridina o con acetato de isopropenilo.

- Los productos de este procedimiento tienen actividad hormonal, por ejemplo progestativa, anabólica o corticoidal. Se los puede usar como medicamentos; por ejemplo, en forma de preparados farmacéuticos que los contengan en mezcla con un vehículo farmacéutico inerte, orgánico o inorgánico, que sea apto para aplicación entérica o parentérica, como, por ejemplo, agua, gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, gomas, polialkilenglicoles, jalea de petróleo, etc. Los preparados



farmacéuticos pueden presentarse en forma sólida (por ejemplo, de pastillas, grageas, supositorios o cápsulas) o en forma líquida (por ejemplo, de soluciones, suspensiones o emulsiones). Se los puede esterilizar y/o pueden contener aditivos tales como agentes de preservación, de estabilización, de humectación o de emulsión, sales para variar la presión osmótica o amortiguadores. Asimismo pueden contener todavía otros materiales de valor terapéutico.

5.

En los ejemplos que siguen, las temperaturas se han indicado en grados centígrados. Los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR) se tomaron en deuterocloroformo, con tetrametilsilano como patrón.

10.

La separación y la identificación de los productos de la hidroxilación pueden efectuarse mediante cromatografía de capa delgada. Una reacción de color apropiado para la identificación es, por ejemplo, el rociado con ácido sulfúrico concentrado, seguido por 3% de vainilla en etanol. Los diversos derivados esteroides dan, con el ácido sulfúrico, una reacción de color al ser calentados. La coloración con el segundo rociado es igualmente característica. He aquí una sinopsis de los valores R_F y de las reacciones de color:

15.

20.



	Valor RF x 100 ⁺			Reacción de color		
	1	2	3	H ₂ SO ₄	vainilla	
5.	11beta-hidroxi-9beta, 10alfa-pregn-4-en- -3,20-diona	35,9	40,0	43	verde grisáceo	pardo amarillento
	11beta-hidroxi-9beta, 10alfa-pregna-4,6- -dien-3,20-diona	38,6	37,9	41,5	anaranjado amarillento	anaran- jado
10.	11beta,17alfa-dihidro- xi-9beta,10alfa-pregn- -4-en-3,20-diona	33,2	43,5	27,6	ocre	rojo cere- za
	11beta,16alfa-dihidro- xi-9beta,10alfa-pregn- -4-en-3,20diona	17,2	20,6	17,3	amarillo	amarillo rojizo
15.	11beta,17alfa,21-tri- hidroxi-9beta;10alfa- -pregn-4-en-3,20-diona	17,8	27,2	11,0	anaranjado amarillento	amarillo rojizo
20.	11beta,17alfa,21-tri- -hidroxi-9beta.10alfa- -pregn-4,6-dien-3,20- -diona	15,8	24,2	10,4	pardo	lila
	11beta;21-dihidroxi- -9beta,10alfa-pregna- -1,4-dien-3,20-diona	30,0	36,3	32,5	ocre	verde grisáceo



11beta,17beta-dihidroxi-
-9beta,10alfa-androst-4-
-en-3-ona

18,8 22,0 15,8 rojo lila

5. 11beta,17beta-dihidroxi-
-9beta,10alfa-androst-
-4,6-dien-3-ona

16,4 20,0 13,8 verde anaranjado
amarillento amarillento

11beta-hidroxi-9beta,10al-
fa-androsta-4,6-dien-3,17-
-diona

37,6 38,6 41,4 verde verde
grusaceo

10.

11beta-hidroxi-9beta,10al-
fa-androst-4-en-3,17-diona

35,0 41,0 34,5 azul azul

15.

- + sistema disolvente: 1: benceno/acetona 1:1
2: metil-isobutil-cetona/acetona 8:1
3: cloroformo/etanol 9:1

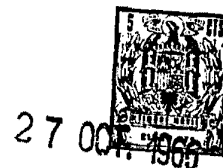
Gel silficio GF 254 (Merck), espesor de la capa, 0,2 mm.



EJEMPLO 1.

Cada una de cinco preparaciones de 8 litros de un medio acuoso que contenía 0,3% de maceración de maíz, 0,3% de dihidrofosfato amónico, 0,25% de carbonato cálcico, 0,25% de extracto de levadura y 0,1% de glucosa se ajustó a pH 7,6 por medio de sosa cáustica y se esterilizó a 120°C durante 90 minutos. Después de enfriamiento, se inoculó cada preparación con un cultivo de 25 horas de edad de *Nocardia lurida* y se trató simultáneamente con 80 mililitros de una solución al 0,1% de estradiol y sulfóxido de dimetilo. A continuación, agitando constantemente el medio nutritivo, se le ventiló con 5 litros de aire por minuto. Después de 27 horas de inculación a 28°C, se añadieron a cada preparación 2 gramos de 9beta,10alpha-pregn-4-en-3,20-diona disueltos en sulfóxido de dimetilo y se prosiguió la fermentación como antes. La concentración del producto de hidroxilación fue aumentando gradualmente hasta un máximo y luego decreció. Al cabo de 20 horas de la adición del esteroide, se combinaron las cinco preparaciones y se las extrajo por dos veces con un volumen de hexano cada vez. La fase acuosa se extrajo tres veces con un volumen de tetracloruro de carbono cada vez, y una vez con medio volumen de tetracloruro de carbono. Secando los extractos de tetracloruro de carbono combinados, se obtuvieron 8 g de residuo, el cual se recogió en un poco de benceno y se

= 16 =



- aplicó a una columna de gel silíceo de 4,9 x 83 cm. Se eluyó la columna con una mezcla de benceno/acetona (77:23), haciéndola pasar con una velocidad de 82 gotas por minuto. Se recogieron fracciones de 25 mililitros cada una. Las fracciones 148 a 178 contenían 1,48 gramos del producto deseado, del cual se separaron todavía, por medio de éter de petróleo, 0,24 g de productos secundarios de la fermentación.
- 5.

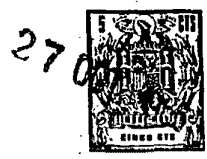
- El producto bruto se sometió a una distribución multiplicativa en el aparato de Craig, en el sistema metanol/agua/cloroformo/tetracloruro de carbono = 7:3:5:5. a 22°C y en 593 etapas, lo que dio para la 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona un coeficiente de distribución de 0,26. Después de la concentración del contenido de los elementos de Craig nº 112 a 148, se obtuvieron 790 miligramos de material cristalino. Punto de fusión: 241-243° (en cloruro de metileno/éter isopropílico); UV : λ_{max} = 238 milimicras, $\epsilon = 15.600$; $[\alpha]_{589} = -40^{\circ}$ (dioxano); NMR: señales en 53 Hz (18-metilo) y en 78 Hz (19-metilo).
- 10.
- 15.

EJEMPLO 2.

20. Cada una de cuatro preparaciones de 8 litros de un medio acuoso con 0,26% de ácido D-tartárico, 0,26% de tartrato amónico, 0,017% de sulfato amónico, 0,04% de fosfato amónico secundario, 0,04% de carbonato potásico, 0,027% de carbonato

27 OCT 1954

magnésico, 2% de peptona Difco, 5% de glucosa, 0,1% de extracto de levadura, 0,1% (en volumen) de solución de oligoelementos (1,0 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de K_2MoO_4 y 1,0 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1000 mililitros de agua destilada) y 0,025% de emulsión antiespumosa AF Dow Corning se esterilizó a 120°C durante 90 minutos. Después de enfriamiento se inoculó el medio con un cultivo de 48 horas de edad de *Penicillium canescens* y se le mantuvo a 28°C, en agitación constante con 5 litros de aire por minuto, durante 3 días. Transcurrido este tiempo, se añadieron a cada preparación 2 gramos de 9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona disueltos en 40 mililitros de acetona. Después de siete días de fermentación, se filtraron las soluciones fermentativas en tierra de diatomáceas y se extrajo el micelio por dos veces con 500 mililitros de acetona cada vez. Se concentró el extracto hasta obtener un residuo acuoso y se mezcló éste con el filtrado. Se trató la solución con 1600 gramos de sal común y se la extrajo a fondo con acetato de etilo. Concentrando todos los extractos hasta sequedad, se obtuvo un total de 21,78 gramos de residuo, que se recogió en 1000 mililitros de benceno/acetona 9:1 y se depositó en una columna que contenía alrededor de 300 mililitros de una suspensión de gel silíceo/benceno. Se eluyó la columna primeramente con benceno y luego, gradualmente, con benceno que contenía 10, 20, 30 y 50% de acetona y, por último,



- con acetona pura. Se combinaron todas las fracciones que contenían esteroide, lo que dió 12,44 gramos de substancia seca, que se disolvió en 700 mililitros de benceno/acetona = 9:1 y se depositó en una columna de gel de sílice de 6,7 centímetros de diámetro y 70 centímetros de altura. Se eluyó esta columna primeramente con benceno y luego con mezclas de benceno/acetona con fracciones crecientes de acetona (5, 10, 20, 30, y 50%). La polaridad del agente de elución fue aumentando entonces periódicamente, hasta que a cierto grado de polaridad no se eluyó ya más esteroide. Se combinaron todas las porciones de 100 mililitros del eluato que resultaron uniformes según la cromatografía de capa delgada, se las hizo secar y se cristalizó en acetona/hexano. De esta manera se obtuvieron 5 fracciones, la última de las cuales contenía
15. 794,2 miligramos de 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona. Punto de fusión: 247-250° (en cloruro de metileno/metanol/éter isopropílico); UV: λ_{max} 286 milimicras, $\epsilon = 24,400$; $[\alpha]_{589} = 353^{\circ}$ (dioxano); NMR: señales en 55 Hz (18-metilo) y 74 Hz (19-metilo).

20. EJEMPLO 3.

Una porción de 30 gramos de 9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona se hizo fermentar durante un día con un cultivo de 2 días de edad de *Mycardia lurida*, en un medio acuoso que contenía 2% de sacarosa, 0,3% de extracto de leva-



5. dura Difco, 0,1% de nitrato sódico, 0,1% de glicerina, 0,1% de fosfato potásico primario, 0,05% de sulfato magnésico, 0,05% de cloruro potásico y 0,001% de heptahidrato de sulfato de hierro bivalente. La extracción, la purificación y la separación de la solución fermentativa se efectuaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 2, con cantidades de solución y de agente de absorción adaptadas a las diferentes cantidades de extracto bruto. Se obtuvieron 9,86 gramos de 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona.

10. EJEMPLO 4.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 2, se hizo fermentar 9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona con *Gliocladium catanulatum*. Se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona con un rendimiento de 3 a 4%.

EJEMPLO 5.

20. Se fermentó 9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona con *Helicostylum piriforme*, de manera análoga al procedimiento descrito en el Ejemplo 2, con la salvedad de que el medio de cultivo no contenía aditivo de peptona. El rendimiento de 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona ascendió al 2 a 3%.



EJEMPLO 6.

De manera análoga a los procedimientos descritos en los Ejemplos 1 y 3, a partir de 9beta,10alfa-androst-4-en-3,17-diona, se obtuvo la 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3,17-diona. Punto de fusión: 160°; UV: λ_{max} 239,5 milimicras, ϵ psilon = 14750; $[\alpha]_{589}^{20}$: -8° (dioxano); NMR: señales en 69 HZ (18-metilo) y 75 Hz (1a-metilo).

EJEMPLO 7.

De manera análoga a los procedimientos que se han descrito en los Ejemplos 1 y 3, se obtuvo, a partir de 17alfa,21-dihidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona, la 11beta,17alfa,21-trihidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona. Punto de fusión: 226-227°; UV: λ_{max} 241 milimicras, ϵ psilon = 16600, $[\alpha]_{589}^{20}$ = -76,3° (dioxano).

15. EJEMPLO 8.

Una porción de 120 miligramos de 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona (obtenida conforme a los Ejemplos 1, 4 o 5) se disolvió en una mezcla de 5 mililitros de anhídrido acético y 5 mililitros de piridina y se agitó a 80° durante 3 horas. Después de la elaboración final y la cristalización en CH₂Cl₂/éter isopropílico, se obtuvieron 80 miligramos de 11beta-acetoxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona pura, de punto de fusión 167-168°; UV λ_{max} 238 ni-



limicras ϵ = 16600, $[\alpha]_{589}^{25}$ = -34° (dioxano); NMR: señales en 48,3 Hz (18-metil) y 80,3 Hz (19-metilo).

EJEMPLO 9.

De manera análoga a la del Ejemplo 8, a partir de

5. 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona (obtenida conforme a los Ejemplos 2 o 3) se obtuvo 11beta-acetoxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona, de punto de fusión 174-176 $^{\circ}$; UV λ_{max} 283 milimicras; ϵ = 26400, $[\alpha]_{589}^{25}$ = -313° (dioxano).

10. EJEMPLO 10.

Mediante acetilación de acuerdo con el Ejemplo 8, a partir de 11beta,17alfa,21-trihidroxi-9beta,10alfa-pregna-4-en-3,20-diona (obtenida conforme al Ejemplo 7) se obtuvo

15. 11beta,21-diacetoxi-17alfa-hidroxi-9beta,10alfa-pregna-4-en-3,20-diona. Punto de fusión: 167-168 $^{\circ}$; UV: λ_{max} 240 milimicras; ϵ = 16800; $[\alpha]_{589}^{25}$ = -35° (dioxano).

EJEMPLO 11.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 3, a partir de 17alfa,21-dihidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona se obtuvo, con Nocardia lurida, 11beta,17alfa,21-trihidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona, de punto de fusión 215-217 $^{\circ}$; UV: λ_{max}

20.



287 milimicras, $\epsilon = 2600$; $[\alpha]_{589}^{25} = -329^{\circ}$ (dioxano).

Mediante acetilación conforme al Ejemplo 8, se obtuvo 11beta,21diacetoxi-17alfa-hidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona, de punto de fusión 230-231 $^{\circ}$; UV:

5. λ_{max} 284 milimicras, $\epsilon = 25100$, $[\alpha]_{589}^{25} = 262^{\circ}$ (dioxano). Una porción de 1 gramo de este acetato se disolvió en 30 mililitros de metanol y, después de adición de 5 mililitros de carbonato sódico 2-n, se dejó la solución a 25 $^{\circ}$ durante 2 horas. Después de la elaboración final ordinaria
10. y de la cristalización, se obtuvieron 750 miligramos de 11beta-acetoxi-17alfa,21-dihidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona pura, de punto de fusión 197-198 $^{\circ}$; UV: λ_{max} 284 milimicras, $\epsilon = 23100$; $[\alpha]_{589}^{25} = -329^{\circ}$ (dioxano).

EJEMPLO 12.

15. De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 3, a partir de 9beta,10alfa-testosterona se obtuvo, con Nocardia lurida, 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-testosterona, de punto de fusión 190-193 $^{\circ}$; UV: λ_{max} 240 milimicras, $\epsilon = 15700$; $[\alpha]_{589}^{25} = -107^{\circ}$ (dioxano).

20. EJEMPLO 13.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 1, a partir de 21-hidroxi-9beta,10alfa-pregna-1,4-dien-3,20-diona se obtuvo, con Nocardia lurida,



11beta,21-dihidroxi-9beta,10alfa-pregna-1,4-dien-3,20-diona.

UV: λ_{max} 241 milimicras, ϵ = 18500; NMR: señales en 53,1 Hz (18-metilo) y 79,5 Hz (19-metilo).

EJEMPLO 14.

5. De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 1, a partir de 17alfa-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona se obtuvo, con *Nocardia lurida*, 11beta,17alfa-dihidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona.

UV: λ_{max} 240 milimicras, ϵ = 16100; NMR: señales en 59 Hz (18-metilo) y 76 Hz (19-metilo).

EJEMPLO 15.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 3, a partir de 21-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona se obtuvo, con *Nocardia lurida*, 11beta,21-dihidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona.

UV: λ_{max} 240 milimicras, ϵ = 16000; NMR: señales en 53 Hz (18-metilo) y 80,5 Hz (19-metilo).

EJEMPLO 16.

20. De manera análoga a la del Ejemplo 1, a partir de 16alfa-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona se obtuvo, con *Nocardia lurida*, 11beta,16alfa-dihidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona. UV: λ_{max} 241 milimicras, ϵ =



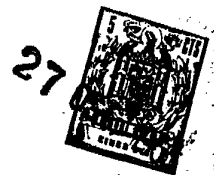
16000; NMR: señales en 53 Hz (18-metilo) y 80,5 Hz (19-metilo).

EJEMPLO 17.

- De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en los Ejemplos 1 y 3, a partir de 9beta,10alfa-androsta-4,6-dien-3,17-diona se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-androsta-4,6-dien-3,17-diona. UV: λ_{max} 285 milimicras, ϵ = 24700; NMR: señales en 71,0 Hz (18-metilo) y 19-metilo).

EJEMPLO 18.

10. Cada una de seis preparaciones de 100 cc de un medio acuoso que contenía 0,25% de cloruro sódico, 0,4% de peptona, 1,0% de glucosa, 0,4% de extracto cárnico y 0,1% de extracto de levadura se ajustó a pH 6,3, se esterilizó y se inoculó con un cultivo de *Nocardia lurida*. Después de una
15. incubación previa de 24 horas, se añadieron a cada preparación 25 mg de 9beta,10alfa-androsta-4,6-dien-3,17-diona disueltos en sulfóxido de dimetilo. A continuación se incubó el medio nutritivo a 28°C y con agitación, durante 24 horas. Los filtrados de fermentación, combinados, se extrajeron cuatro veces
20. con un volumen de diclorometano cada vez y, secando los extractos orgánicos combinados, se obtuvieron 200 mg de residuo, que fue disuelto en acetona y sometido a cromatografía preparatoria de capa delgada en gel de sílice (Merck GF 254, espesor



- de la capa 1 mm) en el sistema cloroformo/etanol = 9:1. Se formaron tres zonas, que se eluyeron utilizando metanol. Se compararon alícuotas de las tres fracciones con una muestra auténtica de 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-androsta-4,6-dien-3,17-diona. La fracción que se comportó de manera idéntica a la muestra de referencia con respecto al valor RF se disolvió en acetona y se cromatografió de nuevo utilizando metil-isobutil-cetona/acetona = 3:2. La zona resultante, que contenía el derivado 11beta-hidroxi, se eluyó y cromatografió de manera análoga en el sistema cloroformo/etanol = 9:1. El eluato metanólico de la zona que resultó idéntica a la muestra de referencia contenía 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-androsta-4,6-dien-3,17-diona uniforme, que mostró propiedades físicas idénticas a las de la muestra auténtica.
- 5.
- 10.
15. EJEMPLO 19.

- De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 18, utilizando un cultivo de *Streptomyces fradiae* en un medio nutritivo que contenía 0,5% de peptona, 0,3% de extracto cármico y 0,57% de cloruro sódico se obtuvo, a partir de 9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona, la 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona.
- 20.



EJEMPLO 20.

- Cada una de nueve preparaciones de 100 cc de un medio acuoso que contenía 5,0% de glucosa, 2,0% de peptona y 0,5% de maceración de maíz, ajustadas a pH 6,2 y esterilizadas, se inocularó con un cultivo de *Choanephora circinans*. Al cabo de 48 horas de incubación previa, se añadieron a cada preparación 25 mg de 17beta-hidroxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3-ona en sulfoxido de dimetilo. Después de incubación a 28°C durante 48 horas, con la elaboración final ordinaria y cromatografía, se obtuvo 11beta,17beta-dihidroxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3-ona, que resultó idéntica a una muestra auténtica.
- 5.
- 10.

EJEMPLO 21.

- De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 20, a partir de 9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona, que resultó idéntica a una preparación auténtica.
- 15.



EJEMPLO 22.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en los ejemplos 1 y 2, a partir de 17beta-hidroxi-9beta,10alfa-androsta-4,6-dien-3-ona se obtuvo 11beta,17beta-5. -dihidroxi-9beta,10alfa-androsta-4,6-dien-3-ona. UV: λ_{max} 286 milimicras; $\epsilon = 25200$; NMR: señales en 62,7 Hz (18-metilo) y 71,2 Hz (19-metilo).

EJEMPLO 23.

Cada una de cuatro preparaciones de 100 cc de un medio acuoso que contenía 1,0% de glucosa, 0,5% de peptona, 0,3% de extracto cárnico, 0,5% de cloruro sódico y 1,0% de carbonato cálcico, ajustadas a pH 6,5-8,5, se inoculó con un cultivo de *Chaenophora circinans* y se incubó a 28°C con 10. agitación. Al cabo de 48 horas, se añadieron a cada preparación 15. 25 mg de 17alfa,21-dihidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona. Después de 68 horas más, las preparaciones combinadas se extrajeron con tres volúmenes de diclorometano y el extracto se llevó hasta sequedad. Del residuo pudo separarse 11beta,17alfa,21-trihidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-20. -3,20-diona, que se identificó mediante cromatografía de capa delgada y reacciones específicas de color.



EJEMPLO 24.

- De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 23, se obtuvo 11beta,17alfa-dihidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona a partir de 17alfa-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona en un medio que contenía 5,0% de glucosa, 2,0% de peptona y 0,5% de maceración de maíz.

EJEMPLO 25.

- De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 23, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3,17-diona a partir de 9beta,10alfa-androst-4-en-3,17-diona después de 69 horas de incubación.

EJEMPLO 26.

- De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 24, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona a partir de 9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona.



EJEMPLO 27

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 23, se obtuvo 11beta,21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona a partir de 21-hidroxi-1,4-dien-3,20-diona.

5.

EJEMPLO 28.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 20, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona a partir de 9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona, utilizando un cultivo de *Streptomyces fradiae* en un medio acuoso que contenía 0,05% de peptona, 0,5% de extracto cárnico y 0,5% de cloruro sódico, con un pH 6-8.

10.

EJEMPLO 29.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 20, se obtuvo 11beta,17beta-dihidroxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3-ona a partir de 17beta-hidroxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3-ona en un medio acuoso que contenía glucosa, 2,0% de Edamina y 0,5% de maceración de maíz.

15.



EJEMPLO 30.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 23, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona a partir de 9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona, utilizando un cultivo de *Mucor griseocyanus*, en un medio acuoso que contenía 5,0% de glucosa, 2,0% de Edamina y 1,5% de maceración de maíz, con pH 4-6.

EJEMPLO 31.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 20, se obtuvo 11beta-hidroxi-9betam10alfa-testosterona a partir de 9beta,10alfa-testosterona, utilizando un cultivo de *Mucor corymbifer* en un medio acuoso que contenía 2,0% de glucosa y 30,0% de patatas hervidas, frescas.

EJEMPLO 32.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 23, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-progesterona a partir de 9beta,10alfa-progesterona, utilizando un cultivo de *Streptomyces rimosus* en un medio acuoso que contenía 1,0% de harina de soja, 1,0% de glucosa, 0,5% de cloruro sódico, 0,1% de nitrato sódico y 1,0% de carbonato cálcico, con pH 7-8.



EJEMPLO 33.

- De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 34, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona a partir de
5. 9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona, utilizando un medio acuoso que contenía 0,5% de peptona, 0,3% de extracto cárnico y 0,5% de cloruro sódico, con pH 5,5-6,5.

EJEMPLO 34.

- De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en los ejemplos 1 y 3, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3,17-diona a partir de
- 9beta,10alfa-androst-4-en-3,17-diona, utilizando un cultivo de *Glicocladium roseum* en un medio acuoso que contenía 1,0% de maceración de maíz, 1,0% de glucosa, 0,2% de extracto de levadura, 0,2% de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y 1,0% de carbonato cálcico.
- 15.

EJEMPLO 35.

- De manera análoga al procedimiento descrito en el ejemplo 21, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-progesterona a partir de 9beta,10alfa-progesterona, utilizando un medio acuoso que contenía 2,0% de harina de carne, 1,0% de glucosa,
- 20.



0,2% de K_2HPO_4 y 0,1% de cloruro sódico.

EJEMPLO 36.

De manera análoga al procedimiento descrito en el ejemplo 21, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-progesterona a partir de 9beta,10alfa-progesterona, utilizando un medio acuoso que contenía 2,0% de harina de pescado, 1,0% de glucosa, 0,2% de K_2HPO_4 y 0,1% de NaCl.

EJEMPLO 37.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 21, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-progesterona a partir de 9beta,10alfa-progesterona, utilizando un medio acuoso que contenía 0,2% de hidrolizado de proteína, 1,0% de glucosa, 0,2% de K_2HPO_4 y 0,1% de NaCl.

15. EJEMPLO 38.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 21, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-progesterona a partir de 9beta,10alfa-progesterona, utilizando un medio acuoso que contenía 2,0% de gluten de maíz, 1,0% de glucosa, 0,2% de K_2HPO_4 y 0,1% de NaCl.



EJEMPLO 39.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 21, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-progesterona a partir de 9beta,10alfa-progesterona, utilizando un medio acuoso que contenía 2,0% de gluten de trigo, 1,0% de glucosa, 0,2% de K_2HPO_4 y 0,1% de NaCl.

EJEMPLO 40.

De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 21, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-progesterona a partir de 9beta,10alfa-progesterona, utilizando el medio que se ha descrito en el ejemplo 2.

EJEMPLO 41.

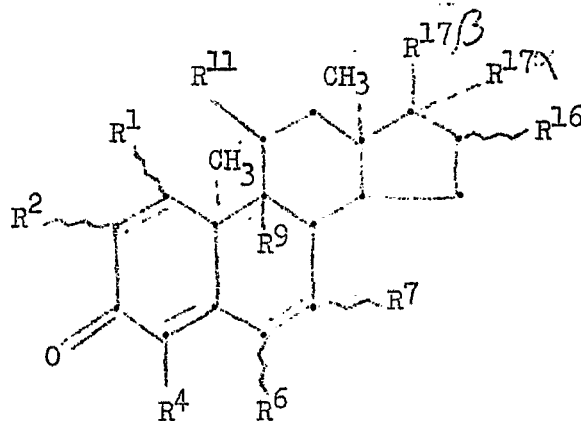
De manera análoga al procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 21, se obtuvo 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-progesterona a partir de 9beta,10alfa-progesterona, utilizando un medio acuoso que contenía 2,0% de sacarosa, 0,3% de extracto de levadura, 0,1% de $NaNO_3$, 0,1% de glicina, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,05% de $MgSO_4$, 0,05% de KCl y 0,001% de $FeSO_4$, con pH 4,5-5,5.



N O T A

Descrito el objeto de la invención, se declara nuevas las siguientes reivindicaciones, con prioridades suizas nº 14910/65 del 28.10.65 y nº 6487/66 del 4.5.66., existiendo en ambas unidad de invención:

1. Un procedimiento para producir 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-esteroides, compuestos como los definidos por la fórmula



(I)

10. en la que R¹, R², R⁴, R⁶, R⁷ y R¹⁶ son cada uno cuando se toman solos, hidrógeno, halógeno con un número atómico de 9 a 35, inclusive, ciano, hidroxilo, aciloxilo o aciltio de 20 átomos de carbono a lo sumo, alcoxilo o alkiltio de unos 10 átomos de carbono a lo sumo, aralcoxilo o aralkiltio de unos



- 10 átomos de carbono a lo sumo, oxiciclialifático tiocicloalifático de unos 10 átomos de carbono a lo sumo, o hidrocarbilo alifático de unos 7 átomos de carbono a lo sumo; R^9 es hidrógeno o halógeno con un número atómico de 9 a 35, inclusive; $R^{17\text{alfa}}$ cuando se toma solo, es hidrógeno, hidroxilo o hidrocarbilo alifático de unos 7 átomos de carbono a lo sumo; $R^{17\text{beta}}$: cuando se toma solo, es acetilo, hidroxiacetilo, hidroxilo, aciloxilo de unos 20 átomos de carbono a lo sumo, alcóxilo de unos 10 átomos de carbono a lo sumo, aralcoxilo de unos 10 átomos de carbono a lo sumo u oxiciicloalifático de unos 10 átomos de carbono a lo sumo; y R^{11} es hidroxilo o aciloxilo de 20 átomos de carbono a lo sumo,
- 5.
- 10.
15. caracterizado por hacerse fermentar el correspondiente esteroide 11-insustituído, valiéndose de un microorganismo de los grupos taxonómicos Fungi o Schizomycetes y, si se desea, esterificarse el producto de la hidroxilación.
20. 2. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, caracterizado en que el citado microorganismo es un miembro de los subgrupos Fungi imperfecti, Ascomycetes, Ehycomycetes, Basidiomycetes y Actinomycetales.



3. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, caracterizado en que dicho microorganismo es una especie de los grupos *Gliocladium catenulatum*, *Gliocladium roseum*, *Helicostylum pirififorme*, *Penicillium canescens*, *Mucor griseocyanus*, *Mucor corymbifer*, *Choanephora circinans*, *Nocardia lurida*, *Streptomyces rimosus* y *Streptomyces fradiae*.
5. 4. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, caracterizado en que R^1 , R^2 y R^3 son cada uno hidrógeno, mientras R^6 , R^7 y R^{16} se eligen cada uno, cuando se toman solos, en el grupo constituido por hidrógeno, halógeno, alquilo de unos 3 átomos de carbono a lo sumo, hidroxilo, aciloxilo, alcoxilo, aralcoxilo y oxicicloalifático, siendo hidrógeno uno por lo menos de dichos símbolos R^6 , R^7 y R^{16} .
10. 5. Un procedimiento como se define en la reivindicación 2, caracterizado en que R^1 , R^2 y R^3 son cada uno hidrógeno, mientras R^6 , R^7 y R^{16} se eligen cada uno, cuando se toman solos, en el grupo constituido por hidrógeno, halógeno, alquilo de unos 3 átomos de carbono a lo sumo, hidroxilo, aciloxilo, alcoxilo, aralcoxilo y oxicicloalifático, siendo hidrógeno uno por lo menos de dichos símbolos R^6 , R^7 y R^{16} .
15. 6. Un procedimiento como se define en la reivindicación 3, caracterizado en que R^1 , R^2 y R^4 son cada uno hidrógeno, mientras R^6 , R^7 y R^{16} se eligen cada uno, cuando se toman
- 20.



solos, en el grupo constituido por hidrógeno, halógeno, alkilo de unos 3 átomos de carbono a lo sumo, hidroxilo, aciloxilo, alcoxilo, aralcoxilo y oxicicloalifático, siendo hidrógeno uno por lo menos de dichos símbolos R^6 , R^7 y R^{16} .

5. 7. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, caracterizado en que R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^7 y R^{16} son todos hidrógeno.

10. 3. Un procedimiento como se define en la reivindicación 2, caracterizado en que R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^7 y R^{16} son todos hidrógeno.

9. Un procedimiento como se define en la reivindicación 3, caracterizado en que R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^7 y R^{16} son todos hidrógeno.

15. 10. Un procedimiento para producir 11beta-hidroxi-9beta,10alfa-esteroides.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de 37 hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

20.

Madrid, a 27 de octubre de 1966

p.a.

JAIME ISERN

Firmado: JOSE RODRIGUEZ