



358829

RAN 4104/63

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

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ESTEROIDES C_{17} -
OXIGENADOS DE LA SERIE ANDROSTANICA", a favor de la firma
suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE. S.A., residente en
BASILEA (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un procedimiento para
la preparación de esteroides C_{17} -oxigenados de la serie
androstánica y se caracteriza por someterse un esteroide
 C_{20} -oxigenado de la serie pregnánica a oxidación enzimá-
tica aerobia por medio de Gliocladium roseum o de enzimas
5. aisladas de él.

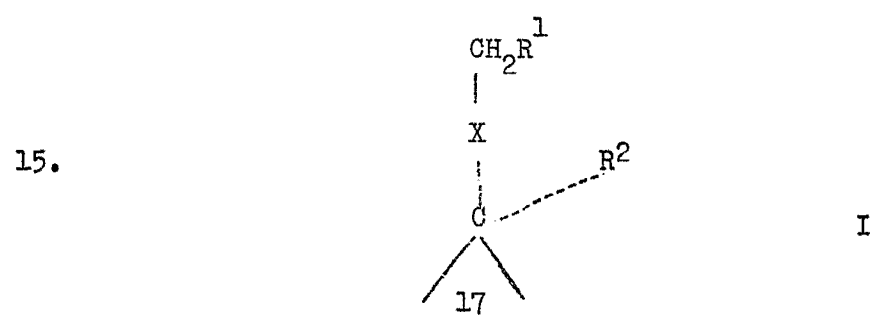
En los procedimientos microbiológicos cono-
cidos para desintegrar la cadena lateral de C_{17} de los este-
roides de la serie pregnánica se forman, además de los este-

POOR
QUALITY



roides 17-oxygenados de la serie androstánica (como los 17-beta-hidroxiandrostano y sus ésteres), productos secundarios, en particular lactonas (por ejemplo, la testololactona). La formación de estos productos secundarios, indeseados, se evita con el procedimiento del invento que aquí se expone.

Como materiales de partida para el procedimiento de este invento están indicados en particular los esteroides de la serie pregnánica que en la posición 17 presentan una agrupación de la fórmula general



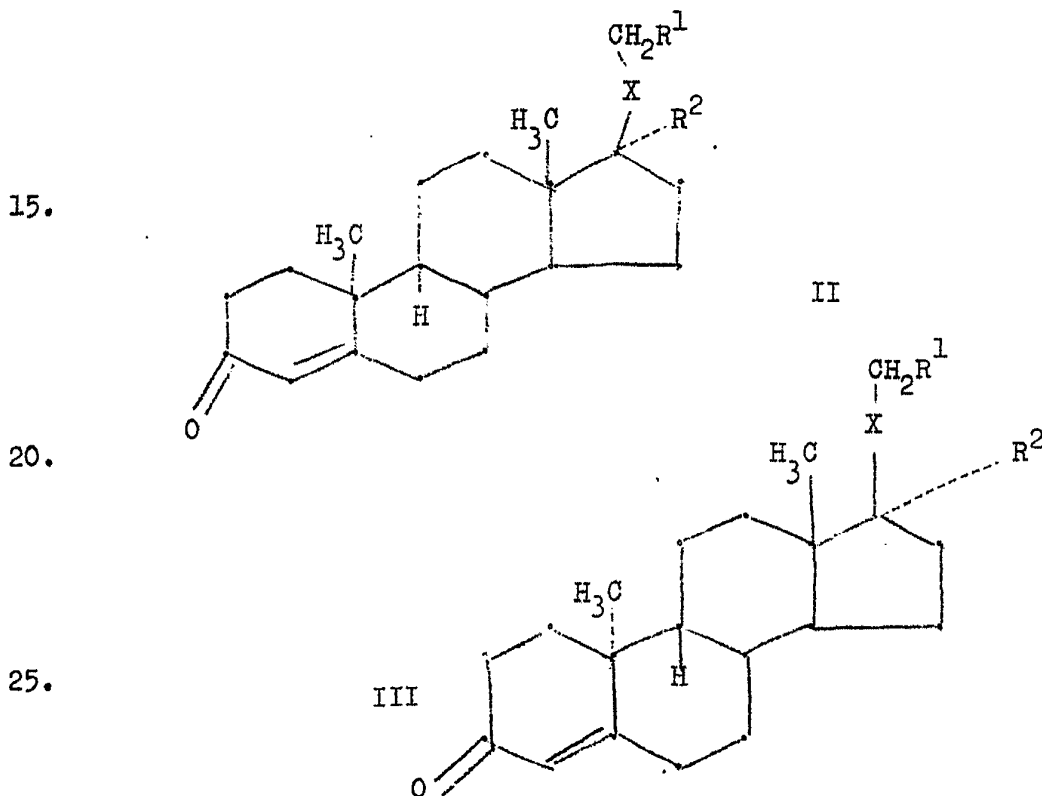
20. donde X representa el grupo $>\text{CO}$ o $>\text{CHOH}$, mientras que R^1 y R^2 representan cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxílico libre o esterificado.



Un grupo hidroxílico esterificado contiene de preferencia el radical ácido de un ácido carboxílico alifático o cicloalifático saturado o insaturado, aralifático o aromático, con 20 átomos de carbono a lo sumo. Ejemplos

5. de tales ácidos son el ácido fórmico, el ácido acético, ácido pivalico, el ácido propiónico, el ácido butírico, el ácido caprónico, el ácido enántico, el ácido palmítico, el ácido esteárico, el ácido succínico, el ácido malónico, el ácido cítrico y el ácido benzoico.

10. Materiales de partida preferidos son los pregnanos de las fórmulas generales





donde

X, R¹ y R² tienen el mismo significado que se les ha atribuido antes,

así como sus derivados 3-, 9-, 15- o 16-hidroxílicos.

5. La realización del procedimiento de este invento puede llevarse a cabo de analogía con las actuaciones ya conocidas para la fermentación de esteroides.

10. Los microorganismos empleados según este invento (pueden emplearse también mutantes producidos por vía química, por ejemplo mediante tratamiento con nitrito, o por vía física, por ejemplo mediante irradiación) pueden cultivarse en medios nutritivos sólidos o líquidos que contengan una fuente de carbono asimilable junto con sales inorgánicas.

15. En calidad de fuentes de nitrógeno asimilable están indicados los compuestos de nitrógeno animales, vegetales, microbianos e inorgánicos, como por ejemplo los extractos de carne, las peptonas, la maceración de maíz (cornsteep), el extracto de levadura, la glicina, el NaNO₃, etcétera, y pueden ser ventajosas las mezclas de diversas fuentes de nitrógeno.

20. En calidad de puentes de carbono asimilable están indicados todos los azúcares y los polímeros de ellos, como por ejemplo el almidón, la dextrina, la sacarosa, la maltosa y la glucosa, así como los aminoácidos, las pro-
- 25.



= 5 =

teínas, las peptonas, los ácidos grasos, las grasas y los esteroides. Con frecuencia son ventajosas las mezclas de diversas fuentes de carbono.

En una modalidad preferida de realización

5. del procedimiento de este invento, se emplea como microorganismos el Gliocladium roseum Bainier, ATCC 20 010. Terrenos nutritivos muy apropiados para este microorganismo son los que contienen como ingredientes principales agua de maceración de maíz (cornsteep), harina y soja, extracto de levadura,
10. peptona, extracto de malta, harina de carne o de pescado, hidrolizado de albúmina, gluten de maíz o gluten de trigo y que presentan un índice de pH inferior a 8, por ejemplo de 5,0 a 6,3.

Terrenos nutritivos apropiados son, por ejem-

15. plo, los siguientes:
- 1) 5% de glucosa, 2% de peptona y 0,5% de cornsteep; agua del grifo, pH 6,2.
 - 2) 0,027% de $MgCO_3$, 0,26% de ácido D-tartárico, 0,26% de tartrato amónico, 0,017% de sulfato amónico, 0,04% de fosfato amónico secundario,
 20. 0,04% de K_2CO_3 , 2,0% de peptona, 5,0% de glucosa, 0,1% de extracto de levadura y 0,1 cc de solución de oligoelementos (1 g de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,15 g de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$,
 25. 0,1 g de $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ y 0,1 g de K_2MoO_4 en 1 litro de agua del grifo); agua del grifo, pH 5,0



- 3) 1,5% de peptona, 0,3% de cornsteep y 0,005% de glucosa; agua del grifo; pH 6,5.
- 4) 0,25% de NaCl, 0,4% de peptona, 1,0% de glucosa, 0,4% de extracto de carne y 0,1% de extracto de levadura; agua destilada, pH 6,3.
5. 5) 1% de glucosa técnica, 1% de harina de soja, 2% de cornsteep, 0,5% de NaCr, 0,1% de NaNO_3 y 1,0% de CaCO_3 ; agua destilada, pH 7,8.
- 6) 1% de glucosa técnica, 1% de harina de soja, 0,5% de NaCl y 0,1% de NaNO_3 ; agua destilada, PH 7,5-8.
10. 7) 3,5% de glucosa técnica, 0,1% de extracto de levadura, 0,1% de ácido glutámico, 0,1% de NH_4NO_3 , 0,05% de cornsteep, 0,15% de KH_2PO_4 , 0,15% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0,05% de aneurina.
15. 8) 2% de glucosa, 0,5% de extracto de levadura, 0,1% de K_2HPO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05% de KCl, 0,001% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; agua del grifo.
20. 9) 2% de extracto de malta, 2% de glucosa, 0,025% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0,05 % de KH_2PO_4 ; agua destilada, pH 6,8.
25. 10) 2% de harina de carne, hidrolizado de albúmina, gluten de maíz o de trigo, 1% de glucosa, 0,2% de KH_2PO_4 y 0,1% de NaCl.



Los terrenos nutritivos se esterilizan a 120° durante 15 minutos.

De preferencia se agrega al cultivo del microorganismo un inductor enzimático, por ejemplo:

5. 9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona,
17alfa-acetoxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3-ona,
9beta,10alfa-testosterona,
9beta,10alfa-androst-4-en-3,17-diona,
9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona,
10. 17alfa-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona,
21-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona o
17alfa,21-dihidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona.

- El inductor se añade de conveniencia al cultivo después del desarrollo del crecimiento visible,
15. por ejemplo a una edad de cultivo entre 15 y 40 horas.

- La adición a la preparación fermentativa del esteroide de la serie pregnánica que sirve de material de partida se efectúa de conveniencia después de cierto crecimiento previo del cultivo, por ejemplo al cabo de unas
20. 15 a 96 horas. El esteroide que ha de fermentar puede añadirse en cualquier forma apropiada; pero es ventajoso que sea de manera que pueda originarse la máxima superficie de contacto entre el esteroide y el microorganismo. Por ejemplo, el esteroide se añade al terreno después que se le ha di
 25. vidido mecánicamente o por medio de dispersantes o puesto en solución en un disolvente orgánico, como por ejemplo acetona,



roideo de partida. Mediante esta modalidad particular de realización del procedimiento de este invento es posible influir en la reacción de modo que:

- 1) la formación del primer metabolito (acetato) se realice despacio y
- 2) la saponificación del primer metabolito sea muy reprimida

De esta manera es posible preparar el primer metabolito, si se quiere, en cantidades máximas. Si se emplea un material de partida de la fórmula I en el que R_2 signifique hidroxilo o un grupo hidrofílico esterificado, el primer metabolito resulta por lo general más inestable y se convierte tan rápidamente en el segundo metabolito, que de ordinario no se aísla el primer metabolito.

En cambio, si se persiguen rendimientos máximos del segundo metabolito, o bien se efectúa la adición del material esteroideo de partida a la preparación sin disolución previa en un disolvente orgánico, o bien se prolonga el tiempo de reacción, pues prolongando el tiempo de fermentación se produce sin más una conversión completa del primer metabolito a segundo metabolito.

En curso de la fermentación puede seguirse por vía analítica; por ejemplo, mediante cromatografía de capa fina. Para ello sirve, por ejemplo, la cromatografía sobre placas de capa delgada, fluorescente, de gel de sílice G, con éter/diclorometano 9:1 como líquido revelador. La fermentación se interrumpe tan pronto como está consumido el material de partida o cesa la formación de producto de desintegración C_{17} -oxigenado, lo que ocurre alrededor de 4 a 48 horas después de añadirse el esteroide de partida a la solución fermentativa.



Siguiendo por cromatografía de capa fina el curso de la fermentación, se advierte la dependencia de la concentración del primer metabolito respecto a la naturaleza y la cantidad del disolvente orgánico del esteroide.

5. En la tabla que sigue se ilustra este hallazgo con el ejemplo de la formación del acetato de r-testosterona a partir de la r-progesterona.

TABLA

10. Influencia de diversos disolventes orgánicos sobre la formación de acetato de r-testosterona a partir de r-progesterona

Condiciones de ensayo:

15. En un fermentador que contiene 8 litros de solución fermentativa se introducen cada vez 2 g de r-progesterona, disueltos en determinadas cantidades de acetona, etanol, metanol, propanol o sulfóxido de dimetilo.
20. A determinados intervalos de tiempo se toman muestras y se determina el acetato de r-testosterona formado, procediendo en forma semicuantitativa, o sea midiendo la absorción en 254 milimicras de las manchas del cromatograma de capa fina y comparando con una serie de manchas de referencia de concentración conocida en acetato de r-testosterona.
- 25.



r-progesterona		Formación máxima de acetato de r-testosterona en la solución fermentativa		
Disolvente	ml	en % respecto a la r-progestero <u>na</u> introducida	alcanzada después de la ad <u>ic</u> ión de r-proges-terona, en horas	Mantenimiento del nivel máximo de acetato de r-testos <u>terona</u> , en horas
acetona	80	60	7	aprox. 1
etanol	80	70	7	aprox. 1
	160	80	8	aprox. 7
	240	100	15	aprox. 27
	320	80-90	40	aprox. 80
	400	65-80	48	aprox. 168
metanol	80	90	8	aprox. 1
	160	100	7	aprox. 1
	240	90	8	aprox. 1
	320	80	10	aprox. 4
	400	70	7	aprox. 7
	480	60	18	aprox. 40
propanol	80	90	13	aprox. 30
sulfóxido de dimetilo	80	90	13	aprox. 4



Terminada la fermentación, se aísla de la preparación el esteroide fermentado. Para ello es muy ventajosa la extracción por medio de un disolvente para los esteroides no miscible con el agua, como el cloruro de metile-

5. no, el cloroformo, la metilisobutilcetona, el tetracloruro de carbono, el éter, el tricloroetileno, los alcoholes, el benceno, el hexano y similares.

La masa celular puede también extraerse por separado con los disolventes que se han reseñado antes y asimismo por medio de disolventes miscibles con el agua, como, por ejemplo, acetona, sulfóxido de dimetilo, alcohol etílico, etcétera. Los esteroides obtenidos de los extractos pueden purificarse por recristalización, cromatografía o distribución en contracorriente y separarse de los productos no deseado de la fermentación.

15.

Los productos de este procedimiento pueden utilizarse como productos intermediarios para la preparación de esteroides de actividad farmacológica. En parte, los productos de este procedimiento son de por sí fisiológicamente (por ejemplo, anabólicamente) activos.

20.

Los ejemplos que siguen ilustran el procedimiento de este invento. Las temperaturas están expresadas en grados centígrados.



EJEMPLO 1

Se suspendió en 5 cc de agua destilada la mitad de la superficie de un cultivo de 8 días de edad de Gliocladium roseum Bainier, ATCC 20010, en agar oblicuo, y se introdujo la suspensión en 100 cc de una solución nu-

5. tritiva de la composición siguiente:

0,027% de carbonato magésico

0,26 % de ácido D-tartárico

0,26 % de tartrato amónico

0,017% de sulfato amónico

10. 0,04 % de fosfato amónico secundario

0,04 % de carbonato potásico

2,0 % de peptona

5 % de glucosa

0,1 % de extracto de levadura

15. 0,001% de solución de oligoelementos

(1 g de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,

0,15 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 1/g

de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de

$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ y 0,1 g de

20. K_2MoO_4 en 1 litro de agua del grifo).



La solución nutritiva inoculada se sacudió excéntricamente a 28° durante 37 horas en un matraz de Erlenmeyer de 500 cc, provisto de chicanas y cerrado con tapones de guata. Luego se introdujo el cultivo en un fermentador pequeño cargado con 7 litros de la misma solución nutritiva y 10 a 20 cc de aceite vegetal, y, aireando con 6 a 8 litros de aire por minuto, se incubó a 28° durante 31 horas. Con 1 litro del cultivo así obtenido, se inocularon en un fermentador grande 90 litros de la misma solución alcalina, y al cabo de 24 horas de crecimiento con agitación y aireación (20 litros por minuto), se añadieron 22,5 g de 9beta, 10alfa-pregn-4-en-3,20-diona disueltos en 1600 cc de sulfóxido de dimetilo. Transcurridas 5 horas, se cosechó la preparación fermentativa. Para la elaboración, se separaron por filtración el micelio y la solución fermentativa. Esta se extrajo por dos veces en el extractor de contracorriente con un volumen doble de cloruro de metileno, mientras el micelio se trituró con acetona y luego se extrajo a fondo con cloroformo. Evaporando los extractos obtenidos de la solución fermentativa y el micelio, se obtuvo un extracto bruto oleoso. Para eliminar el sulfóxido de dimetilo, se evaporó el extracto bruto dos veces con dimetilformamida y una vez con benceno. El residuo así obtenido se disolvió en acetona y se purificó con carbón. Después de evaporar el disolvente, se cromatografió el residuo en gel de sílice



(de tamaño granular 0,05 de 0,2 mm) con benceno/acetona, de lo que se recogieron fracciones de 30 cc. Las fracciones 1 a 250 se eluyeron con benceno/acetona 19:1 y las fracciones siguientes se eluyeron con benceno/acetona 4:1.

5. Se obtuvieron 4,41 g de 17 alfa-acetoxi-9-beta,10alfa-androst-4-en-3-ona, 608 g de 9beta,10alfa-testosterona y 3,87 g de material de partida.

Ejemplo 2

10.

Se efectuó la fermentación de la manera que se ha descrito en el Ejemplo 1, pero inoculando el fermentador pequeño con un cultivo de 24 horas. La fermentación se interrumpió al cabo de 5 horas. Se obtuvo 18% de 17 beta-acetoxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3-ona y 20,8% de 9beta,10alfa-testosterona (respecto a la 9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona introducida).

15.

Ejemplo 3

20.

Se efectuó la fermentación de la manera que se ha descrito en el Ejemplo 2, pero se introdujeron 20 g de 9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona y la fermentación duró 24 horas. Se obtuvo 39% de 17beta-acetoxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3-ona, 29,5% de 9beta,10alfa-testosterona y 8,3% de 9beta,10alfa-androst-4-en-3,17-diona.

25.



Ejemplo 4

Se fermentó pregn-5-en-3-ol-20-ona de manera análoga a la del Ejemplo 1. Se obtuvo testosterona y androst-4-en-3,17-diona.

5.

Ejemplo 5

Se fermentó 11alfa-hidroxi-9beta,10alfa-4-en-3,20-diona de manera análoga a la del Ejemplo 1, la elaboración final de la preparación fermentativa dió 11alfa-10. hidroxi-17beta-acetoxi-9beta-10alfa-androst-4-en-3-ona.

Ejemplo 6

Se fermentó 15alfa-hidroxi-9beta,10alfa-en-4-en-3,20-diona de manera análoga a la del Ejemplo 1. 15. De la preparación fermentativa se aislaron 15alfa-hidroxi-17beta-acetoxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3-ona y 15 alfa, 17beta-dihidroxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3-ona.

Ejemplo 7

20.

La fermentación de progesterona de manera análoga a la del Ejemplo, 1, proporcionó acetato de testosterona y testosterona.



Ejemplo 8

Se fermentó 11alfa-hidroxi-progesterona de manera análoga a la del Ejemplo 1. De la preparación fermentativa se aisló 11alfa-hidroxi-testosterona.

5.

Ejemplo 9

Se fermentó 15alfa-hidroxi-progesterona de manera análoga a la del Ejemplo 1. De la preparación fermentativa se aisló 15alfa-hidroxi-testosterona.

Ejemplo 10

10. Se efectuó la fermentación de la manera que se ha descrito en el Ejemplo 1, pero añadiendo a un cultivo de 8 litros. viejo de 24 horas, en un fermentador pequeño, 2 g de r-progesterona disueltos en 240 cc de etanol absoluto. Al cabo de 6 horas se hallaban en la solución fermentativa
15. 86 % de acetato de r-testosterona y 14 % de r-testosterona.

Ejemplo 11

Se efectuó la fermentación como en el Ejemplo 10, pero empleando como material de partida 2 g de delta6-r-progesterona, disueltos en 320 cc de etanol absoluto. Al



cabo de 26 horas pudieron aislarse 21,1 % de acetato de delta6-r-testosterona y 37,8 % de delta6-r-testosterona.

Ejemplo 12

5. Se fermentó, de manera análoga a la del Ejemplo 1, 16alfa-hidroxi-9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona. De la preparación fermentativa se aislaron 16alfa-hidroxi-17beta-acetoxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3-ona y 16alfa,17beta-dihidroxi-9beta,10alfa-androst-4-en-3-ona, con rendimiento del 4 % y 12 %, respectivamente.

10.

Ejemplo 13

15. Se fermentó de manera análoga a la del Ejemplo 1, 16alfa-hidroxi-9beta,10alfa-pregna-4,6-dien-3,20-diona. De la preparación fermentativa se aislaron 16alfa-hidroxi-17beta-acetoxi-9beta,10alfa-androsta-4,6-dien-3-ona y 16alfa,17beta-dihidroxi-9beta,10alfa-androsta-4,6-dien-3-ona, con rendimiento del 14% y 50%, respectivamente.

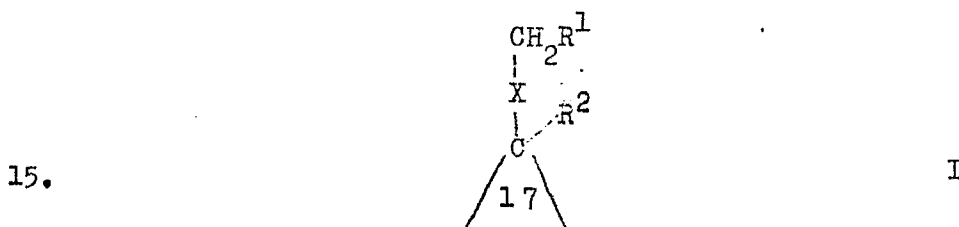


REIVINDICACIONES

Se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente suiza nº 13.930/67 del 5.10.67.

5. Procedimiento para la preparación de esteroides C₁₇-oxigenados de la serie androstánica, caracterizado por someterse un esteroide C₂₀-oxigenado de la serie pregnánica a oxidación enzimática aerobia por medio del Gliocladium roseum o de enzimas aisladas de él.

10. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por emplearse como material de partida un esteroide de la serie pregnánica que presenta en la posición 17 una agrupación de la fórmula general



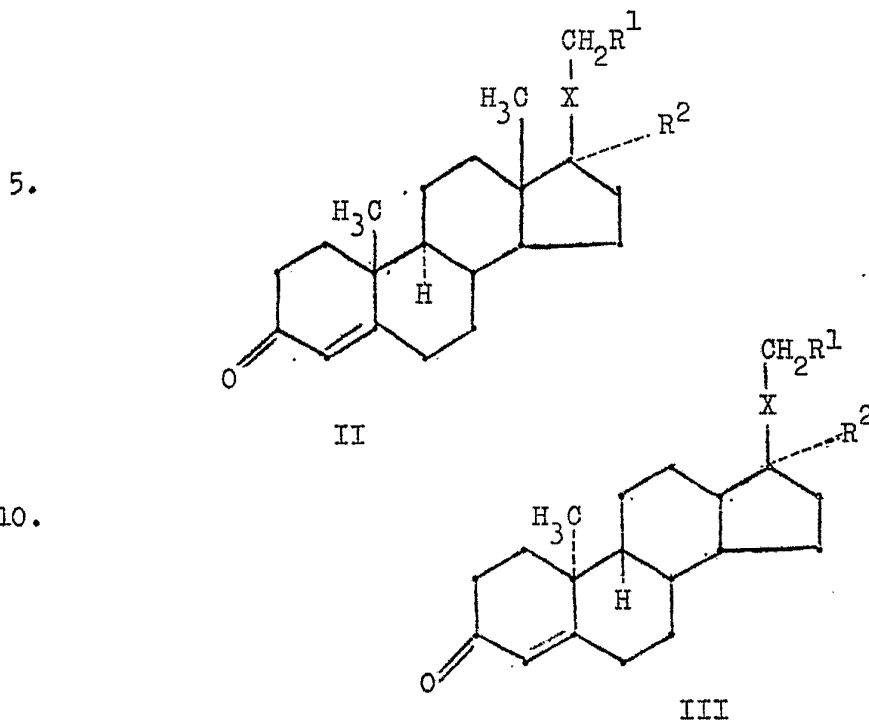
donde

X representa el grupo $>\text{CO}$ o $>\text{CHOH}$,
mientras que

20. R¹ y R² representan cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxílico libre o esterificado.



3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por emplearse como material de partida un pregnano de la fórmula general



15.

donde

X, R¹ y R² tienen el mismo significado que se les ha atribuido antes,

o un derivado 3-, 9-, 11-, 15- ó 16-hidroxílico respectivo.

20.



- 4, Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por emplearse como material de partida 9beta,10alfa-pregn-4-en-3,20-diona.
5. 5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por emplearse como material de partida pregn-5-en-3-ol-20-ona.
10. 6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por efectuarse la oxidación por medio de Glioclaidum roseum Bainier, ATCC 20 010, o de enzimas aisladas de él.
15. 7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por disolverse el material de partida esteroideo en un disolvente orgánico y, si se quiere, interrumpirse la reacción cuando se ha llegado a la concentración óptima de acetato de esteroide C₁₇-oxigenado de la serie androstánica.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por emplearse, en concepto de material de partida, r-progesterona o delta6-r-progesterona.
20. 9. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por emplearse, en concepto de disolvente orgánico, acetona, etanol, metanol, propanol o sulfóxido de dimetilo.



10. Procedimiento según las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado por emplearse por cada 2 g de material de partida esteroideo 80 a 500 cc de disolvente orgánico e interrumpirse la reacción al cabo de 7 a 40 horas.

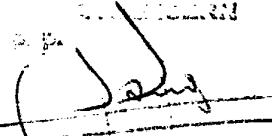
5. 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por emplearse por cada 2 g de material de partida esteroideo 80 a 120 cc de disolvente orgánico e interrumpirse la reacción al cabo de 7 a 15 horas.

10. 12. Procedimiento para la preparación de esteroi-
des C₁₇-oxigenados de la serie androstánica.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 22 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 4 de Octubre de 1968

p.a.


Firmado: ROQUE SANZ HERRERO