

AH



ESPAÑA

ADUCADO
PATENTE DE INTRODUCCION

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D 13/08 // A61K 31/57
--------------------------	--

(54) TITULO DE LA INVENCIÓN
PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE 16- α -OXI- $\Delta^{1,4}$ -PREGNADIENOS.

(59) PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION
Patente U.S.A. 2.789.118

(71) SOLICITANTE (S)
COMPANIA ESPAÑOLA DE ESTEROIDES, S.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Clara del Rey, 31 - MADRID

(72) INVENTOR (ES)

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

El Estatuto vigente sobre Propiedad Industrial, en su artículo 68 señala que puede ser objeto de patente de introducción la invención que, habiendo sido divulgada o patentada en el extranjero, no ha sido divulgada, practicada ni puesta en ejecución en España.

El objeto de la presente introducción, está referido a un procedimiento para la obtención de esteroides delta 1,4 de la familia de pregnadienos con o sin fluor en la posición 9 alfa y con o sin radical acetato en las posiciones 16 y 21, a través de un proceso de fermentación microbiológica en el que se utiliza como materia prima los esteroides delta 4 de la familia de los pregnenos con o sin fluor en la posición 9 alfa y con o sin radical acetato en las posiciones 16 y 21.

La fuente de esta invención es la patente norteamericana número 2.789.118, concedida el 16 de Abril de 1957, cuyos inventores son Seymour Bernstein, Pearl River, N.Y., Robert H. Lenbard, Ridgefield Park, N.J., and William S. Allen, Pearl River, N.Y. y cuyo propietario es la firma americana American Cyanamid Company, New York N.Y., una corporación de Maine, lo que se hace constar expresamente para dar cumplimiento al artículo 70 del Estatuto.

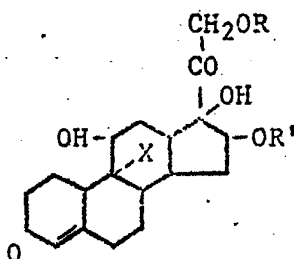
Finalmente, y como sea que ha transcurrido el plazo que determina el artículo 4 del Convenio de la Unión sin que la firma American Cyanamid Company haya depositado su solicitud de patente en el Registro, no incurre nuestra solicitud en el caso de nulidad previsto en el artículo 65 del vigente Estatuto de la Propiedad Industrial.

PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE 16-ALFA OXI- $\Delta^{1,4}$ -PREGNADIENOS

1. OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento cuyo objeto es la obtención de determinados $\Delta^{1,4}$ esteroides de la serie de los pregnadienos mediante la transformación de los Δ^4 esteroides correspondientes.

Los Δ^4 esteroides objetos del proceso de transformación responden a la fórmula general

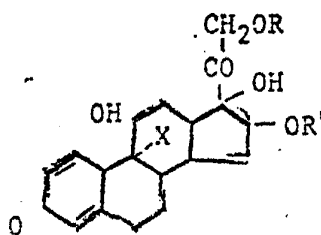


siendo X: hidrógeno o un halógeno (principalmente fluor)

R y R': hidrógeno o un radical alcanoilo

(principalmente acetato)

Estos productos, mediante el proceso de fermentación descrito más adelante, se transforman en los $\Delta^{1,4}$ correspondientes, de fórmula general



siendo X: hidrógeno o un halógeno (principalmente fluor)

R y R': hidrógeno o un radical alcanoilo (principalmente acetato)

2. JUSTIFICACION TECNICO-ECONOMICA DE LA INTRODUCCION

Se ha comprobado que un gran número de esteroides de las series del pregneno y del pregnadieno tales como hidro

1 cortisona y 1-dehidrocortisona, han resultado unos agentes
terapéuticamente importantes y útiles como intermediarios
para la preparación de otros esteroides de mayor utilidad
5 terapéutica. El procedimiento que se introduce permite la
obtención de productos útiles como agentes antiinflamato-
rios en el tratamiento de la artritis, asma, quemaduras,
bursitis y similares, y también en el tratamiento de las
afecciones de la piel y enfermedades del colágeno.

10 Los compuestos obtenidos por este procedimiento pue-
den utilizarse solos o en combinación con otros elementos
y pueden aparecer en el mercado en forma sólida (tabletas,
polvos, píldoras, etc) o en formas líquidas (solución o -
suspensión). Dichos compuestos son sólidos cristalinos y
tienen un punto de fusión definido, siendo en general so-
lubles en los disolventes orgánicos usuales.

15 3. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento objeto de introducción consiste en
un proceso de fermentación microbiológica bajo unas condi-
ciones adecuadas, utilizando un microorganismo del género
20 "Corynebacterium". Dicho microorganismo del género Corynebac-
terium se cultiva aeróbicamente en un medio nutriente ade-
cuado, utilizandose como sustrato un Δ^4 esteroide de la se-
rie de los pregnenos como se describe más adelante. Duran-
te el crecimiento de los microorganismos bajo condiciones
25 favorables, dos grupos de hidrógeno son eliminados del ani-
llo A del esteroide y se obtiene un doble enlace en la po-
sición 1-2. El mecanismo exacto de esta deshidrogenación -
es oscuro, y es debido a la acción de las enzimas produci-
das por el microorganismo en el proceso de crecimiento. Un
30 medio nutriente adecuado contiene una fuente soluble de -

1 carbón , nitrógeno y elementos minerales. Las fuentes de
carbón incluyen azúcares tales como glucosa, sacarosa, -
maltosa, dextrosa, etc. También alcoholes tales como gli-
cerol o manitol; ácidos orgánicos tales como ácido cítri-
5 co, ácido málico y ácido acético, y varios productos natu-
rales ricos en carbohidratos, tales como maíz, almidón,
licor de maíz, harina de soja, harina de semilla de algo-
dón y muchos otros materiales disponibles que han sido -
utilizados como fuentes de carbón en procesos de fermenta-
10 ción. Usualmente, una combinación de lo anterior puede ser
empleada como medio de cultivo con buenos resultados.

Las fuentes de nitrógeno incluyen algunos de los ma-
teriales anteriormente mencionados, tales como licor de
maíz, harina de soja, harina de semilla de algodón y simi-
15 lares, y otras varias sustancias tales como extracto de -
buey, caseína, levadura, proteínas enzimáticamente hidro-
lizadas, y productos de degradación incluyendo peptonas,
aminoácidos, y muchos otros materiales proteínicos disponi-
bles que se han descubierto son adecuados para soportar el
20 crecimiento de "Corynebacterium".

Las fuentes inorgánicas del nitrógeno incluyen urea,
amoníaco, sales, nitratos y similares. Estos pueden ser -
usados, en el medio, como una fuente de nitrógeno asimila-
ble para proveer un medio de cultivo favorable de crecimien-
25 to al microorganismo.

Los requisitos minerales de la fermentación son nor-
malmente aportados por los materiales crudos que son usados
a menudo como fuentes de carbón y nitrógeno o se encuentran
en el agua utilizada en el proceso. Sin embargo, es aconse-
30 jable suplementar el mineral normalmente presente, con can-

1
5
10
15
20
25
30

tidades adicionales para obtener un máximo crecimiento del "Corynebacterium". Los principales cationes y aniones que pueden ser necesarios en el medio son sodio, potasio, calcio, magnesio, fosfato, sulfato, cloruro, cobalto, manganeso y otros varios. El uso de trazas de elementos tales como boro, cobre, cobalto, molibdeno y cromo, es a menudo deseable.

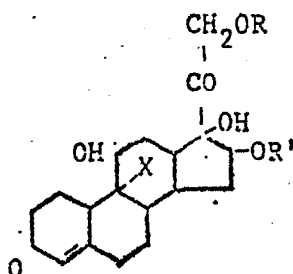
El crecimiento del "Corynebacterium" tiene lugar bajo condiciones aeróbicas, y con agitación. La agitación puede ser conseguida, por ejemplo, con un agitador rotativo o de vaivén en botellas o tanques, inyectando aire esterilizado a través de la mezcla de fermentación. Es deseable que el aire esterilizado sea inyectado a través del medio de cultivo en una cantidad de 1 a 2 volúmenes de aire por volumen de medio de cultivo y por minuto. La agitación en las botellas o tanques de fermentación se consigue por medio de un impulsor mecánico. Aunque el "Corynebacterium" crece a una temperatura entre 10 y 45°C, es preferible llevar a cabo el proceso de la presente invención a una temperatura de 25° a 38°C.

Para preparar la inoculación se utiliza 1,0 ml. de suspensión de células vegetativas lavadas de "Corynebacterium" para inocular 100 ml. de caldo de soja tripticasa - estéril en un recipiente con agitación de 500 ml.

El caldo de soja tripticasa se compone de un 3% de hidrolizado de proteínas de soja con tripticasa, 5% de glicerina y 0,3% de extracto de buey. Después de la esterilización durante 15 minutos a una temperatura de 120°C (15 libras presión de vapor), se obtiene un medio con un pH de rango 7,4-7,7. El inóculo es incubado a 37°C en un recipiente con

1 agitador durante aproximadamente de 4 a 8 horas. Tal inócu
lo puede ser utilizado para inocular mayores cantidades de
medio en tanques fermentadores. En lugar del caldo de soja
Trypticasa utilizado anteriormente, pueden ser usados otros
5 medios de cultivo.

Los esteroides Δ^4 de la serie de los pregnenos que -
pueden ser utilizados en el proceso de la presente inven-
ción se ilustran por la presente fórmula general



15 siendo X: hidrógeno o un halógeno (principalmente fluor)

R y R': hidrógenos o un radical alcanilo

(principalmente acetato)

Los esteroides arriba mencionados se añaden general-
mente a la fermentación en forma de soluciones o en forma
finamente dividida. Un método preferible es disolver el es-
20 teroide de etanol u otros disolventes miscibles en agua y
añadirlo al medio de fermentación en la etapa deseada del
proceso. Aunque el esteroide Δ^4 puede precipitarse de la so-
lución cuando se añade así, en contacto con el medio se dis-
persa como una fina suspensión y se hace disponible al mi-
25 croorganismo para su oxidación. La cantidad de esteroide -
añadida a la fermentación puede variar considerablemente,
pero se encuentra generalmente en el rango de 0,1-1 gr. por
litro de medio de cultivo. Durante el proceso de fermenta-
30 ción puede ser deseable añadir agentes antiespumantes tales

1 como silicóna y aceites glicéricos y similares. Estos com-
puestos se añaden de vez en cuando y en las cantidades ne-
cesarias para el control de la espuma. En el proceso de la
presente invención 10 ml. de inóculo se inoculan en tubos
5 agitadores de 100 ml. y se incuban generalmente por un pe-
riodo de alrededor de 16 a 48 horas a una temperatura de
alrededor de 32°C. En este punto, se añaden a cada tubo -
2 mg. del sustrato estéril (Δ^4 esteroide de la serie pregn-
10 eno) descrito anteriormente, disuelto en 3,2 ml. de etanol
y la fermentación se continúa a alrededor de 32°C. Es aconsejable el realizar la fermentación durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo para obtener el máximo de conversión del Δ^4 pregneno al $\Delta^{1,4}$ pregnadieno. Este periodo de tiempo puede variar de 2 horas y media a 72 horas o más.

15 Al finalizar el proceso de fermentación el $\Delta^{1,4}$ este-
roide deseado de la serie del pregnadieno es recuperado del
medio de fermentación por el siguiente procedimiento, que
se describe en particular para una fermentación de 10 mo.
20 Este es un procedimiento general y es operativo para fermen-
taciones de varios tamaños.

25 Los contenidos de un tubo de fermentación son extraí-
dos 4 veces con 4 volúmenes de cloruro de metilano. Los 4
extractos son unidos y la solución resultante se lava una
vez con una solución de un 2% de bicarbonato de sodio sa-
turado con cloruro de sodio y después se lava dos veces con
una solución de cloruro de sodio saturado. La solución la-
vada de cloruro de metilano puede ser secada sobre sulfato
de magnesio anhidro y posteriormente filtrado. El filtrado
30 se concentra en un baño de vapor a presión atmosférica has

1 ta un volumen pequeño y el concentrado se transfiere a un
recipiente con agitación, de 10 ml. de volumen, completan
dose el mismo con cloruro de metileno. Esta solución se -
usa para la caracterización del contenido del esteroide -
5 como se describe más adelante.

En fermentaciones a mayor escala, el producto o pro-
ductos crudos pueden ser recuperados en la fermentación -
mediante simples extracciones con disolventes inmiscibles
en agua, tales como cloruros de hidrocarburos de bajo pe-
10 so molecular, alcoholes, ésteres, etc. Se pueden conseguir
otras purificaciones y separaciones de productos esteroi-
des de extractos, por métodos bien conocidos por aquellos
expertos en la materia. La separación y purificación de -
las mezclas de esteroides a menudo requieren el uso de -
15 cromatografía.

El proceso empleado para identificar los esteroides
presentes en el extracto de la fermentación es el de cro-
matografía de tira de papel. El sistema disolvente utili-
zado es agua-metanol-benceno, preparado por agitación de
20 aproximadamente 50% de agua y 50% de metanol con benceno
en un embudo de decantación y permitiendo que se separen
las dos capas. Una porción de la capa inferior se situa
sobre un plato en el suelo de un gran vaso cilíndrico. La
capa superior es la fase disolvente y se utiliza para sa-
25 turar la ranura en el interior del cilindro.

Se prepara una solución patrón, de esteroide disol-
viendo 10 mg. de cada uno de los siguientes esteroides en
10 ml. de cloruro de metileno:

Δ^4 -pregneno-11 β , 16 α , 17 α , 21-tetrol-3,20 diona

30 Δ^4 -pregneno-11 β , 16 α , 17 α , 21-tetrol-3,20-diona 16,21-diacetato

Δ^4 -pregneno-9 α -fluoro-11 β ,13 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona

Δ^4 -pregneno-9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona 16,21
-diacetato

(Pueden ser utilizados otros esteroides en la solución patrón, cuando son apropiados)

Al menos una solución patrón es cromatografiada simultáneamente cada vez que se examina una solución desconocida. Exactamente 0,025 ml. de la solución examinada del esteroide patrón se aplican a la tira de papel en la línea de partida, 4 pulgadas por debajo de la parte superior de la tira, la cual se dobla sobre el borde de la ranura y se sumerge en la fase disolvente. La cromatografía es desarrollada de 2 a 4 horas a 37°C. Similarmente, 0,1 ml. de la solución desconocida son aplicados a otra tira que se dobla dentro de la misma ranura y desarrollada simultáneamente con la tira del esteroide patrón. La ranura permite el desarrollo de muchas tiras simultáneamente. Después del desarrollo de las tiras de papel, éstas se retiran del aparato y se dejan secar al aire a 37°C aproximadamente. Después del secado, las tiras se tratan con un pulverizador que contiene una solución alcalina de Azul de Tetrazolium la cual hace colorearse los puntos donde el esteroide está presente. Las tiras reveladas se alinean junto con, por lo menos una tira patrón y se comparan. Los diferentes esteroides se pueden identificar por sus posiciones en las tiras.

El esteroide $\Delta^{1,4}$ deseado será más polar que su correspondiente esteroide Δ^4 . Hay que aclarar, que los esteroides $\Delta^{1,4}$ deseados una vez que han sido aislados y caracterizados, pueden ser utilizados como una solución de este-

roide patrón para la mejora del proceso.

Los ejemplos específicos que aparecen a continuación ilustran la deshidrogenación de esteroides Δ^4 de la serie pregneno para producir los correspondientes esteroides $\Delta^{1,4}$ de la serie pregnadieno.

EJEMPLO 1

Preparación de $\Delta^{1,4}$ -Pregnadieno-11 β ,16 α ,17 α ,21-Tetrol-3,20-diona.

Un tubo de ensayo, con agar inclinado y soja Tripti-
casa, conteniendo un cultivo de "Corynebacterium" fue lavado
con 150 mililitros de agua esterilizada y la suspensión
celular de "Corynebacterium" resultante fue utilizada para
inocular 100 mililitros de medio estéril de caldo de so-
ja Tripticasa en un recipiente con agitación de 500 ml. Es-
ta mezcla fue incubada con agitación a 37°C durante 3 ho-
ras. A continuación, 25 recipientes, con agitación y de 500
ml. de capacidad, conteniendo cada uno de ellos 100 ml. de
medio estéril de caldo de soja Tripticasa sin glicerol, -
fueron inoculados, cada uno de ellos con 1 ml. de inóculo
de 8 horas, incubándose seguidamente a 32°C durante 40 ho-
ras. Simultáneamente 40 mg. de Δ^4 -pregneno-11 β ,16 α ,17 α ,21-
tetrol-3,20-diona, disueltos en 4 ml. de etanol, fueron aña-
didos a cada recipiente y la fermentación se continuó 8 ho-
ras a 32°C. Finalizada la fermentación, el contenido de los
25 recipientes se reunió, resultando una mezcla con un pH
8.1.

Esta mezcla fue extraída, a continuación, una vez con
3 litros de cloruro de metileno y tres veces con porciones
de 2 litros del mismo producto. El extracto combinado se la-
vó una vez con una solución salina saturada y fue evaporado

1 a sequedad bajo presión reducida. Se obtuvieron 500 mgr.
de residuo aceitoso, el cual fue disuelto en 1,5 ml. de la
fase estacionaria del sistema (3 partes de acetato de eti-
lo:2 partes de éter de petróleo (90-100°C): 3 partes de me-
5 tanol: 2 partes de agua) y mezclado con 3 gr. de tierra de
diatomeas. Este impregnado de tierra de diatomeas se depo-
sitó sobre una columna de vidrio de 1,5 x 35 cm. que conte-
nía 25 gr. de tierra de diatomeas impregnada con 12,5 ml.
de la fase estacionaria del sistema descrita anteriormente.

10 El compuesto deseado fue, a continuación, eliminado
con la fase móvil del sistema anterior, obteniéndose 297
mgr. de crudo sólido. Se cristalizó con un sistema aceto-
na-éter de petróleo (60-70°C), obteniéndose 56 mgr. de un
producto de punto de fusión 195-200°C (Koner). Una poste-
rior recristalización en el mismo par de disolventes, ele-
15 vó el punto de fusión a 202-205°C (Koner) que corresponde
a 229-231°C (método del capilar).

Espectro ultravioleta $\lambda_{\text{Max}}^{\text{EtOH}}$ 241 m μ (ϵ 14.500)

Espectro infrarrojo $\nu_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3412, 1718, 1667, 1622, 1612, 1098,
20 1072 cm^{-1}

20 Análisis: Calculado a partir del peso molecular

$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_6$ (376.44): C, 67.00; H, 7.5

Método de fusión: C, 66.80; H, 7.62

A partir de las propiedades físicas y químicas se ha deter-
25 minado que el producto final obtenido es el $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona.

EJEMPLO 2

Preparación de $\Delta^{1,4}$,pregnadieno-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-
diona

30 El producto resultante obtenido mediante un proceso de fer-

1 mentación semejante al descrito en el ejemplo 1, fue extraído con 7 porciones de 2 litros de cloruro de metileno y el extracto combinado evaporado hasta sequedad bajo presión reducida.

5 Se obtuvieron 1,585 gr. de un crudo semisólido que fue, a continuación, cromatografiado. Las fracciones que contenían el compuesto deseado fueron reunidas y evaporadas a sequedad. Se obtuvieron, de esta forma, 601 mgr. de residuo cristalino. La cristalización mediante un sistema acetona-éter de petróleo permitió obtener 278 mgr. de producto con un punto de fusión de 229-231°C. Una posterior recristalización, en el mismo par de disolventes, elevó el punto de fusión a 231-232°C.

10 $[\alpha]_D^{24} + 77^\circ\text{C}$ (metanol

15 Espectro ultravioleta: $\lambda_{\text{Max}}^{\text{EtOH}}$ 241-242 m μ (ϵ 14.800)

Espectro infrarrojo $\nu_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3436, 1715, 1664, 1621, 1603,
1129, 1053 cm^{-1}

Análisis: Calculado a partir del peso molecular

$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_6$ (376,44): C, 67.00; H, 7.5

20 Método de fusión: C, 66.80; H, 7.62

El producto fue identificado con una muestra de $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona obtenida en el ejemplo 1.

EJEMPLO 3

25 Preparación de $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona-16,21-diacetato

Una mezcla de 100 mgr. de $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20 diona disueltos en 10 ml. de piridina conteniendo 2 ml. de anhídrido acético, se mantuvo durante una noche a la temperatura ambiente y posteriormente se lle

30

vó a sequedad en condiciones de presión reducida.

El residuo sólido fue cristalizado con un sistema acetato de etilo-éter de petróleo (90-100°C) obteniéndose 105 mgr. (86%) de $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona,16,21-diacetato, con punto de fusión 147-150°C. Una posterior recristalización del producto, en el mismo par de disolventes, elevó el punto de fusión a 161-163°C.

Espectro infrarrojo $\nu_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ 3458, 1758, 1668, 1632, 1612, 1234, 1069 cm^{-1}

Espectro ultravioleta $\lambda_{\text{Max}}^{\text{EtOH}}$ 242 m μ (ϵ : 14.200)

EJEMPLO 4

Preparación de $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol,16,21-diacetato.

Un tubo de ensayo con agar inclinado conteniendo el cultivo se lavó con 5 ml. de una solución salina esterilizada y la suspensión celular resultante de "Corynebacterium simplex" se añadió a 100 ml. de medio estéril de caldo de soja Tripticasa, llevandose la solución resultante a un recipiente con agitación de 500 ml.

La mezcla se incubó a 32°C durante 8 horas, al cabo de las cuales, 1 ml. de este cultivo se utilizó para inocular diez recipientes conteniendo cada uno de ellos 100 ml. de medio de cultivo estéril de caldo de soja Tripticasa.

Los diez recipientes se incubaron con agitación a 32°C durante 16 horas, al cabo de las cuales se añadieron a cada uno de ellos, 30 mgr. de Δ^4 -pregneno-9 α -fluor-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona-16,21 diacetato disueltos en 2 ml. de etanol. Posteriormente el contenido de los recipientes fue reunido. La solución reunida fue extraída varias veces con un gran volumen de cloruro de metileno, lavado con una

solución salina saturada y evaporada bajo presión reducida.

El residuo fue disuelto en metanol, tratado con carbón activado, posteriormente filtrado a través de tierra de diatomeas y vuelto a evaporar, obteniéndose 277 mgr. de un aceite que fue acetilado durante toda una noche.

La cromatografía en tira de papel mostró aproximadamente iguales cantidades de sustrato y de un producto más polar ($\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-9 β -fluor-11 α ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona-16,21-diacetato) juntamente con muy pequeñas cantidades de dos productos menos polares. Una cromatografía de reparto de 0,25 gr. del residuo en tierra de diatomeas y un sistema constituido por: 2 partes de acetato de etilo, 3 partes de éter de petróleo (90-100°C): 3 partes de metanol: 2 partes de agua, separó los productos menos los productos menos polares y el sustrato.

El producto más polar resultó ser el deseado, permaneció en la columna y fue eluido con 500 ml. de metanol.

El residuo (90 mgr.) obtenido después de evaporado el metanol, fue recromatografiado con tierra de diatomeas (sistema: 3 partes de acetato de etilo: 2 partes de éter de petróleo (90-100°C): 3 partes de metanol: 2 partes de agua) y el corte de la columna conteniendo el producto deseado (determinado mediante el espectro ultravioleta de absorción), fue evaporado bajo presión reducida, obteniéndose 18 mgr. de sólido, que recristalizado con un sistema acetona-éter de petróleo, permitió obtener 13 mgr. de $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona-16,21-diacetato, incoloro y con un punto de fusión (Köfler) de 150°-240°C - con una aparente pérdida de disolvente a 150°C. Una posterior recristalización mediante el mismo par de disolventes,

citados anteriormente, no alteró el punto de fusión.

Espectro ultravioleta $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs,al}}$ 239 m μ (ϵ :15.200)

Espectro en ácido sulfúrico $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{SO}_4}$ 261,308,387 m μ

El 2,4-bis-4-nitrofenilhidrazona del compuesto anterior fue preparado y su espectro ultravioleta de absorción determinado:

$\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$: 258.300 (inflexión), 312 (inflexión) y 400 m μ

EJEMPLO 5

$\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona

Una solución de 100 mgr. de $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona 16,21-diacetato fue disuelta en 10 ml. de metanol y enfriada a 0°C. Después de un lavado con nitrógeno, una solución de 35 mgr. de hidróxido de potasio en 2 ml. de metanol, fue añadida a la solución del esteroide. Después de ser sometida a la temperatura ambiente durante una hora, la solución fue neutralizada con ácido acético glacial y evaporada bajo una atmósfera de nitrógeno hasta obtener un sólido blanco.

Se le añadió agua, y después de enfriado el producto se filtró y lavó con agua para conseguir 52 mgr. de $\Delta^{1,4}$ -pregnadieno-9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrol-3,20-diona. Tres cristalizaciones mediante acetona-éter de petróleo dieron 29 mgr. del tetrol, punto de fusión 260°-2-2,5°C.

Análisis: Calculado a partir del peso molecular

$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_6\text{F}$: C, 63,94; H, 6,90; F, 4,82

Método de fusión: C, 64.19; H, 7,17; F, 4,90

REIVINDICACIONES

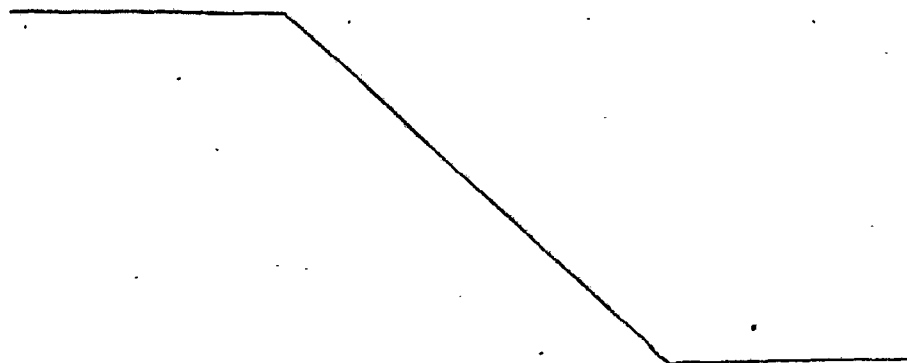
1.- Procedimiento de obtención de 16- α -oxi- $\Delta^{1,4}$ -pregnadienos, caracterizado porque con la realización de un proceso

de fermentación microbiológica en el que se utilizan un microorganismo del género de los "Corynebacterium" y como sustratos los esteroides Δ^4 de la serie de los pregnenos que poseen en posición 9 α un átomo de hidrógeno o un átomo de fluor y en la posición 16 y 21 radicales hidroxilos o sus correspondientes acetatos, se obtienen los esteroides $\Delta^{1,4}$ pregnadienos que poseen en posición 9 α un átomo de hidrógeno o un átomo de fluor y en la posición 16 y 21 radicales hidroxilos o sus correspondientes acetatos.

2.- Procedimiento de obtención de 16- α -oxi- $\Delta^{1,4}$ -pregnadienos, según reivindicación anterior, que se caracteriza porque el microorganismo citado en la reivindicación 1 es cultivado aeróbicamente y con agitación en un medio nutriente de caldo estéril de soja Trypticase de pH comprendido entre 7,4-7,7, el cual se compone de un 3% de hidrolizado de proteínas de soja con Trypticase, un 5% de glicerina y un 0,3% de extracto de buey, todo ello previamente esterilizado durante 15 minutos a una temperatura de 120°C y 15 lb. de presión de vapor, y porque dicho medio nutriente es inoculado por una suspensión de células lavadas de un "Corynebacterium", obtenidas previamente por un inóculo en un tubo de ensayo con agar inclinado, dentro de un recipiente con agitación al que se le inyecta aire esterilizado en una cantidad de 1 a 2 volúmenes de aire por volumen de medio y por minuto, siendo la temperatura del proceso de 25 a 38°C y la duración de la fermentación de 2 a 72 horas y porque se realiza en botellas y tanques de fermentación sin que exista limitación -

de capacidad.

3.- Procedimiento de obtención de 16- α -oxi- $\Delta^{1,4}$ -pregnadienos, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque uno cualquiera de los esteroides mencionados en la reivindicación 1 es disuelto en un disolvente miscible en agua, principalmente el etanol, y añadido al medio de fermentación en una cantidad comprendida entre 0,1-1 gr. por litro de medio de fermentación, pudiendo ser añadido el esteroide, además de en forma de solución, en forma finamente dividida y porque en el proceso de fermentación se añade sílica, aceites glicéridos y similares como agentes antiespumantes y porque al finalizar el proceso de fermentación, los contenidos son extraídos del recipiente 4 veces con 4 volúmenes de cloruro de metileno, siendo las 4 extracciones reunidas y lavadas con una solución de un 2% de bicarbonato de sodio saturado con cloruro de sodio y a continuación lavada dos veces con una solución de cloruro de sodio saturado, siendo el residuo evaporado a sequedad a presión reducida y porque la purificación de los esteroides así obtenidos es realizada mediante procesos consecutivos de cristalización con un sistema acetona-éter de petróleo.



1 4.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha
de recaer la Patente de introducción que se solicita
PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE 16- α -OXI- $\Delta^{1,4}$ - PREGNADI-
NOS.

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre-
sente memoria descriptiva que consta de diecinueve pá-
ginas mecanografiadas.

Madrid, 29 de Agosto 1.979

BERNARDO UNGRIA

P.P.



10

15

20

25

30