



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 271 636**

(51) Int. Cl.:
C07J 1/00 (2006.01)
C07J 21/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03756776 .5**
(86) Fecha de presentación : **21.03.2003**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1534732**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

(54) Título: **Intermediarios de 5 androstén-3-ol esteroides y procedimientos para su preparación.**

(30) Prioridad: **16.08.2002 US 403990 P**
01.10.2002 US 415293 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

(73) Titular/es: **Pharmacia & Upjohn Company L.L.C.**
7000 Portage Road
Kalamazoo, Michigan 49001, US

(72) Inventor/es: **White, Michael, J.;**
Wuts, Peter, G., M. y
Beck, Doris

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 271 636 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Intermediarios de 5 androstén-3-ol esteroides y procedimientos para su preparación.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona esteroides del 5-androstén-3 β -ol y los procedimientos para su preparación.

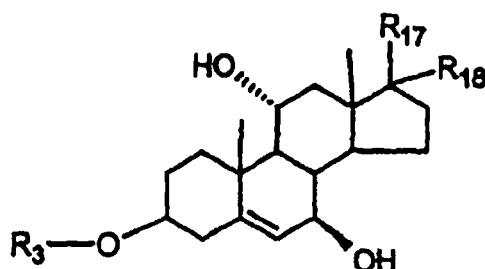
Antecedentes

Los intermedios esteroides son a menudo útiles en la producción de agentes farmacéuticos. La 5-androstén-3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona es un intermedio esteroide útil para producir eplerenona.

Resumen de la invención

De manera general, la presente invención proporciona un procedimiento fúngico práctico para la 11 α -hidroxilación de la 5-androstén-3 β -ol-17-ona y otros análogos relacionados de fórmula general (I) para dar como resultado 5-androstén-3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona y otros análogos relacionados de fórmula general (IV).

En otro aspecto, la invención presenta un 7 β ,11 α -dihidroxi esteroide de fórmula (IV)



(IV)

en el que R₃ es:

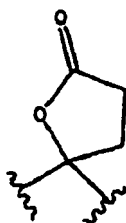
(1) -H;

(2) -CO-R₄

en el que R₄ es H o alquilo C₁-C₅;

en el que R₁₇ y R₁₈ forman de manera conjunta =O ó

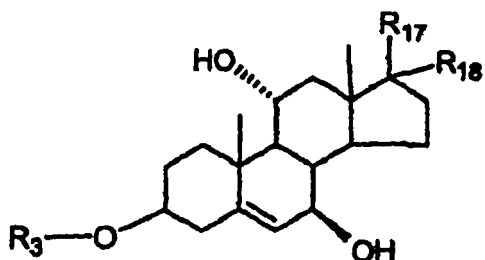
en el que R₁₇ y R₁₈ de manera conjunta con el átomo de carbono C17 del esqueleto de esteroide al cual se enlazan



forman un anillo de lactona de fórmula la 5-androstén- 3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona.

. Un ejemplo del 7 β ,11 α -dihidroxi esteroide de fórmula (IV) es

En otro aspecto más, la invención presenta un procedimiento para la preparación de un 7 β ,11 α -dihidroxi esteroide de fórmula (IV)



(IV)

en la que R_3 es

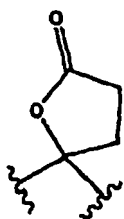
(1) -H;

(2) -CO- R_4

en el que R_4 es H o alquilo C_1 - C_5 ;

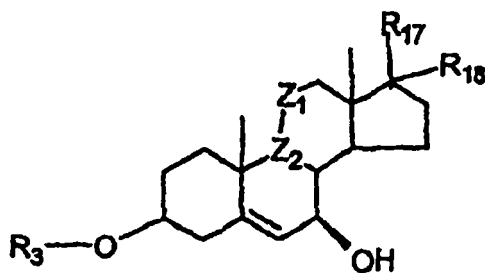
en el que R_{17} y R_{18} forman de manera conjunta =O ó

en el que R_{17} y R_{18} de manera conjunta con el átomo de carbono C17 del esqueleto de esteroide al cual se enlazan



forman un anillo de lactona de fórmula , comprendiendo el procedimiento

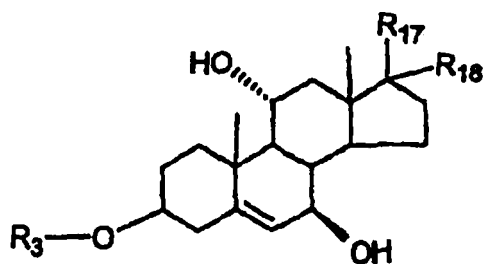
(1) poner en contacto un 7β -hidroxi esteroide de fórmula (II)



(II)

en el que R_3 , R_{17} y R_{18} son tal como se ha definido anteriormente y en el que Z_1 - Z_2 es un enlace simple con una 11α -hidroxilasa de *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus ochraceus*. Un ejemplo del $7\beta,11\alpha$ -dihidroxi esteroide (V) es la 5-androstén- $3\beta,7\beta,11\alpha$ -triol-17-ona. El procedimiento de poner en contacto puede ser mediante fermentación, concentrado de células, y reacción de células completas o libres de células.

En otro aspecto adicional más, la invención presenta un procedimiento para la preparación de un $7\beta,11\alpha$ -dihidroxi esteroide de fórmula (IV)



(IV)

en el que R_3 es

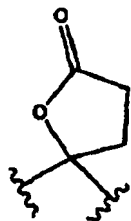
(1) -H;

(2) -CO- R_4

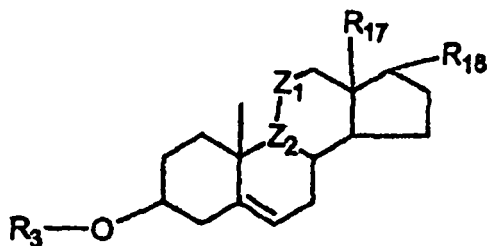
en el que R_4 es H o alquilo C_1 - C_5 ;

en el que R_{17} y R_{18} forman de manera conjunta =O ó

en el que R_{17} y R_{18} de manera conjunta con el átomo de carbono C17 del esqueleto de esteroide al cual se enlazan

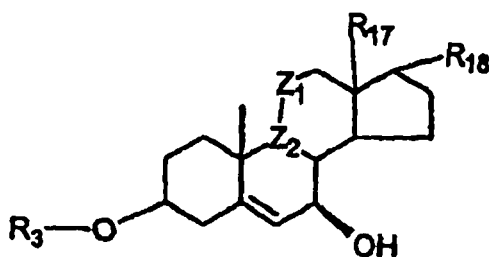


forman un anillo de lactona de fórmula , comprendiendo el procedimiento



(I)

En el que R_3 , R_{18} , y R_{17} son tal como se ha definido anteriormente y en el que Z_1-Z_2 es un enlace simple entre 7β -hidrolasa de *Diplodia*, por ejemplo, *Diplodia gossypina*, para producir un 7β -hidroxi esteroide de fórmula (II)

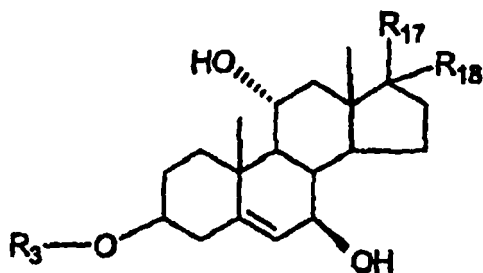


(II)

en el que R_3 , R_{17} , R_{18} , y Z_1-Z_2 son tal como se ha definido anteriormente; y

(2) poner en contacto el 7β -hidroxi esteroide (II) de la etapa (1) con la 11α -hidroxilasa de *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus ochraceus*. Un ejemplo del $7\beta,11\alpha$ -dihidroxi esteroide (IV) es la 5-androstén- $3\beta,7\beta,11\alpha$ -triol-17-ona. El procedimiento para la preparación de un $7\beta,11\alpha$ -dihidroxi esteroide (IV) en el que no se puede aislar el 7β -hidroxi esteroide (II) de la etapa (1) es anterior a la puesta en contacto de la etapa (2).

En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento para la preparación de un $7\beta,11\alpha$ -dihidroxi esteroide de fórmula (IV)



(IV)

en la que R_3 es

(1) -H;

(2) -CO- R_4

en el que R_4 es H o alquilo C_1-C_5 ;

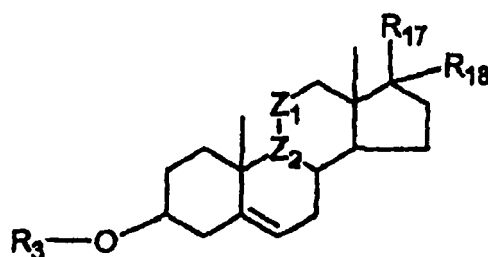
en el que R_{17} y R_{18} forman de manera conjunta =O ó

en el que R_{17} y R_{18} de manera conjunta con el átomo de carbono C17 del esqueleto de esteroide al cual se enlazan



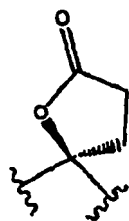
forman un anillo de lactona de fórmula , comprendiendo el procedimiento

(1) poner en contacto un Δ^5 -esteroide de fórmula (I)



en el que R_3 , R_{18} , y R_{17} son tal como se ha definido anteriormente y en el que Z_1-Z_2 es un enlace simple con la $7\beta,11\alpha$ -hidroxilasa(s) de *Absidia*, por ejemplo, *Absidia coerulea*. Un ejemplo del $7\beta,11\alpha$ -dihidroxi esteroide (IV) es la 5-androstén- $3\beta,7\beta,11\alpha$ -triol-17-ona. El procedimiento de poner en contacto puede ser mediante fermentación, concentrado de células y reacción de células completas o libre de células.

Las formas de realización de cada aspecto de la invención pueden incluir una o más de las siguientes. R_3 es H. R_3 es $-C(O)-CH_3$. R_3 es $-C(O)-H$. R_{17} y R_{18} forman =O. R_{17} , R_{18} y el átomo de carbono C17 del esqueleto de esteroide forman el anillo de lactona que se muestra anteriormente. El anillo de lactona tiene la estereoquímica α y β que se



muestra en la fórmula .

Definiciones y convenciones

Las definiciones y explicaciones siguientes son para los términos tal como se usan a lo largo de este documento completo, que incluye tanto la memoria como las reivindicaciones.

Convenciones para las fórmulas y definiciones de las variables

Las fórmulas químicas que representan los diversos compuestos o fragmentos moleculares de la memoria y las reivindicaciones pueden contener sustituyentes variables de manera adicional a las características estructurales definidas de manera expresa. Estos sustituyentes variables se identifican mediante una letra o una letra seguida por un subíndice numérico, por ejemplo, " Z_i " o " R_i " en los que "i" es un número entero.

Definiciones

Las definiciones y explicaciones siguientes son para los términos tal como se usan a lo largo del documento completo que incluye tanto la memoria como las reivindicaciones.

ES 2 271 636 T3

Todas las temperaturas están en grados Celsius.

r.p.m se refiere a revoluciones por minuto.

5 TLC se refiere a cromatografía en capa fina.

HPLC se refiere a cromatografía líquida de alta resolución.

psig se refiere a libras por pulgada cuadrada.

10

DO se refiere a oxígeno disuelto.

RO se refiere a ósmosis inversa.

15

SLM se refiere a litros estándar por minuto.

VVM se refiere a volumen por minuto.

OUR se refiere a la velocidad de captación de oxígeno.

20

Cuando se usan mezclas de solventes, las relaciones de los solventes usados son volumen/volumen (v/v).

Descripción detallada de la invención

25

De manera general, la invención se refiere a los $7\beta,11\alpha$ -dihidroesteroides y a los procedimientos para su preparación. Se pueden usar los compuestos de esta invención en la producción de Eplerenona. El Esquema I ilustra un procedimiento posible para usar unos $7\beta,11\alpha$ -dihidroesteroides para producir Eplerenona.

30

(Esquema pasa a página siguiente)

35

40

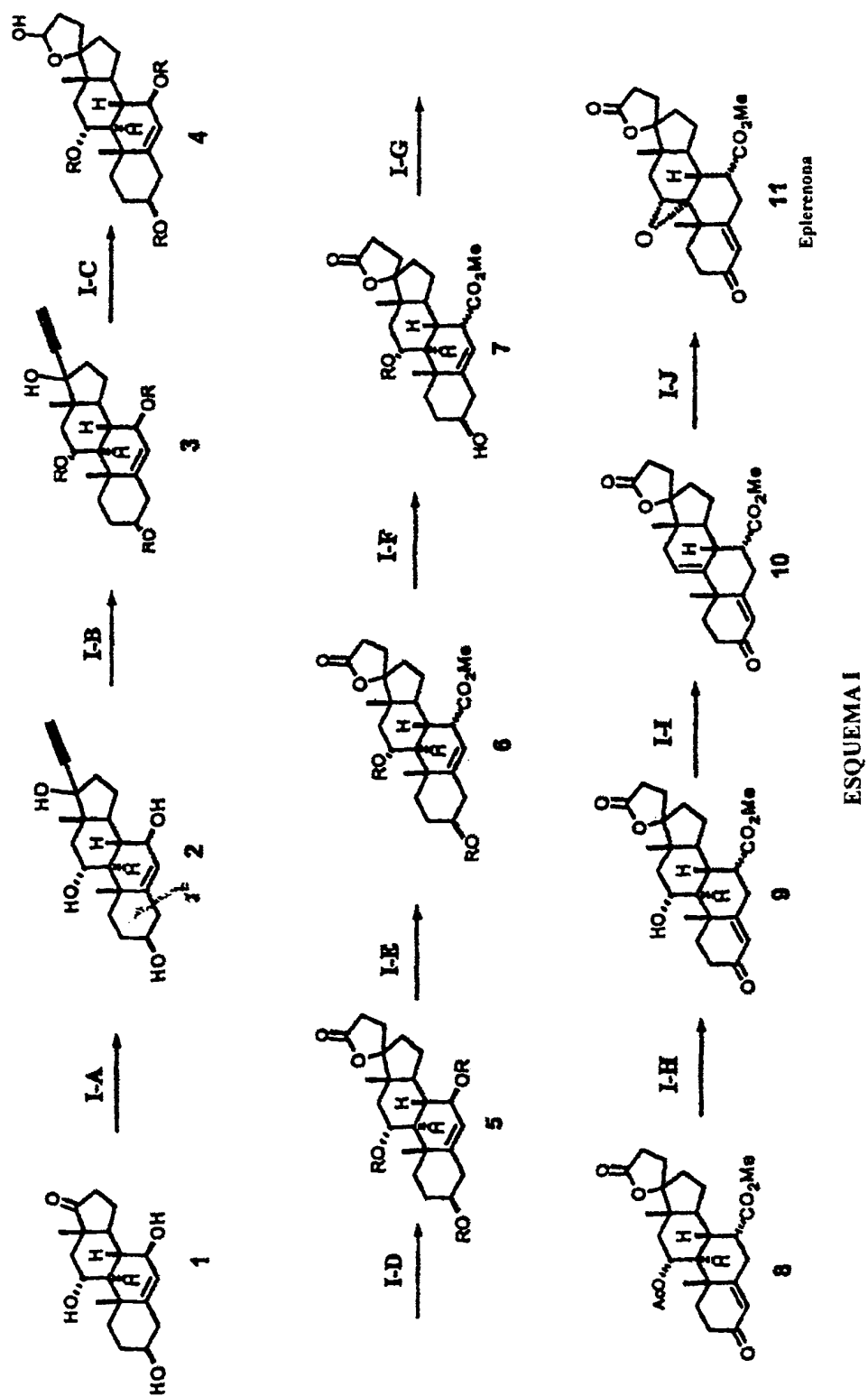
45

50

55

60

65



ESQUEMA I

ES 2 271 636 T3

En referencia al Esquema I, se puede producir el intermedio 2 añadiendo hexametildisilazano (HMDS) (100 ml) a una suspensión agitada de 50,0 g de Triol 1 en 40 ml de cloruro de metileno. A continuación se añadió sacarina (0,57 g) y se calentó la mezcla bajo reflujo durante 3 horas durante las cuales la suspensión se disolverá de manera gradual hasta una solución ámbar transparente. Se añadió agua (5 ml) para detener rápidamente cualquier exceso de HMDS, 5 Tras 5 minutos a reflujo se filtró la mezcla a través de una capa húmeda de CH_2Cl_2 de 32,6 g de magnesol en un embudo de vidrio fritado grueso de 350 ml. El filtrado debería ser transparente y casi incoloro. Se lavó la torta del filtro con 2 x 100 ml de CH_2Cl_2 . Se concentraron los filtrados combinados bajo presión reducida y se eliminó el cloruro de metileno residual mediante evaporación con porciones de 2 x 500 ml de tetrahidrofurano (THF), concentrando hasta sequedad tras cada adición para dar un sólido blanco.

10 Se enfrió una suspensión de t-butoxido de potasio (42,0 g) en 500 ml de THF a $-9^\circ \pm 5^\circ\text{C}$ con un baño de hielo/metanol. Se burbujeó acetileno en la mezcla justo por debajo de la superficie con agitación moderada durante al menos 1 hora. Se añadió el intermedio esteroide sigilado procedente del anterior en THF (400 ml) durante 30 min manteniendo a la vez una temperatura de reacción de $0^\circ \pm 5^\circ\text{C}$. Tras la adición, se agitó la mezcla durante una hora 15 más a $5^\circ \pm 5^\circ\text{C}$. Se añadió agua (100 ml) lentamente dejando calentar la mezcla de reacción hasta $15^\circ \pm 5^\circ\text{C}$. Se añadieron lentamente 125 ml de HCl al 10% para reducir el pH se 2,5 a 3. Se agitó la mezcla a pH 2,5 a 3, añadiendo pequeñas cantidades de HCl al 5% tal como se necesita para mantener un pH de 2,5 a 3, durante 1 a 2 horas a $20^\circ \pm 5^\circ\text{C}$. Cuando se completa la hidrólisis, se añade la solución de NaHCO_3 semisaturado para aumentar el pH de 5,5 a 6. se diluye la mezcla con acetato de etilo (500 ml) y se separan las fases. Se extrae la fase acuosa con acetato de 20 etilo y se lavan las fases de acetato de etilo combinado con agua y salmuera, se secan sobre sulfato de magnesio y se concentran para dar el producto de adición 2.

Se puede acilar el intermedio 2 disolviendo el tetraol 2 (50,00 g, 144 mmol) en piridina (150 ml) y enfriando la mezcla resultante a $< 10^\circ\text{C}$ en un baño de hielo. Se añadió dimetilaminopiridina (DMAP) (1,7 g, 14 mmol) seguida por 25 la adición lenta de anhídrido acético (41,4 ml, 439 mmol) a una velocidad para mantener la temperatura de la solución por debajo de 10°C . Se diluyó la mezcla con acetato de etilo (75 ml) y agua (50 ml), se agitó durante 5 minutos y se separaron las capas. Se lavó la capa orgánica con HCl al 10%/4 x 25) seguido por H_2O (2 x 50 ml), se secó sobre MgSO_4 y se concentró. Se recrystalizó el producto en tolueno (100 ml).

30 Se puede producir la hidroformilación del intermedio acilado 3 calentando el compuesto 3 (25,4 g, 54 mmol) con PPh_3 (2,13 g, 8,1 mmol) y $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (716 mg, 1,62 mmol) en acetato de etilo (200 ml) a aproximadamente 80°C bajo una mezcla 1/1 de hidrógeno/monóxido de carbono a una presión de 170 psi ($1,17 \times 10^6 \text{ N/m}^2$) durante 12 horas. Se concentró la mezcla bajo presión reducida y se purificó el producto 4 mediante cromatografía en columna (70/30 EtOAc/Hex y 500 g de sílice).

35 Se puede llevar a cabo la oxidación del compuesto lactol 4 mezclando el lactol 4 (25 g, 50 mmol), cloruro de metileno (250 ml), agua (38 ml), 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO) (156 mg, 1 mmol), KBr (595 mg, 5 mmol), y NaHCO_3 (5,5, 65 mmol), y enfriar la mezcla a $\leq 10^\circ\text{C}$ en un baño de hielo. Se añadió lentamente una solución de hipoclorito de sodio 1,1 M (NaOCl) (50 ml, 55 mmol). Se dejó calentar la mezcla a temperatura ambiente 40 y se diluyó con agua (50 ml). Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con salmuera (2 x 50 ml). Se secó la capa orgánica con MgSO_4 , se filtró y se concentró para dar como resultado 5 en forma de una espuma color crema.

Calentando una mezcla del triacetato 5 (2,0 g), $\text{Pd}(\text{dppp})\text{Br}_2$ (126 mg), diisopropil amina (0,78 mL), Et_4NBr (260 mg), NaBr (1,09 g) en 20 ml de etanol bajo 1200 psi ($8,27 \times 10^6 \text{ N/m}^2$) de CO a 65°C durante doce horas, seguida 45 por enfriamiento, concentración y cromatografía del residuo sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexano al 40-75% proporcionó el éster de metilo 6.

Se agitó a temperatura ambiente una solución de diacetiléster 6 (5,01 g) en carbonato de potasio 0,15 N en metanol (50 ml) y se monitorizó la reacción mediante TLC. Cuando ya no se detecta el material de partida 6, se diluyó la 50 mezcla con agua (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 X 200 ml). Se lavaron los extractos combinados con agua (100 ml), salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron a presión reducida hasta sequedad. Se cromatografió el residuo sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexano para dar el 3-hidroxi compuesto 7.

55 Se enfrió a 5°C una mezcla de alcohol 7 (6,0 g), CH_2Cl_2 (40 mL), agua (9,0 mL), 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO) (38 mg), KBr (142 mg) y bicarbonato de sodio (4,0 g). Se añadieron lentamente a esta mezcla 14,1 ml de NaOCl 1,1 M. Tras la adición, se dejó agitar la mezcla durante 1 h más y se acidificó con HCl diluido. Se aisló el producto 8 con CH_2Cl_2 .

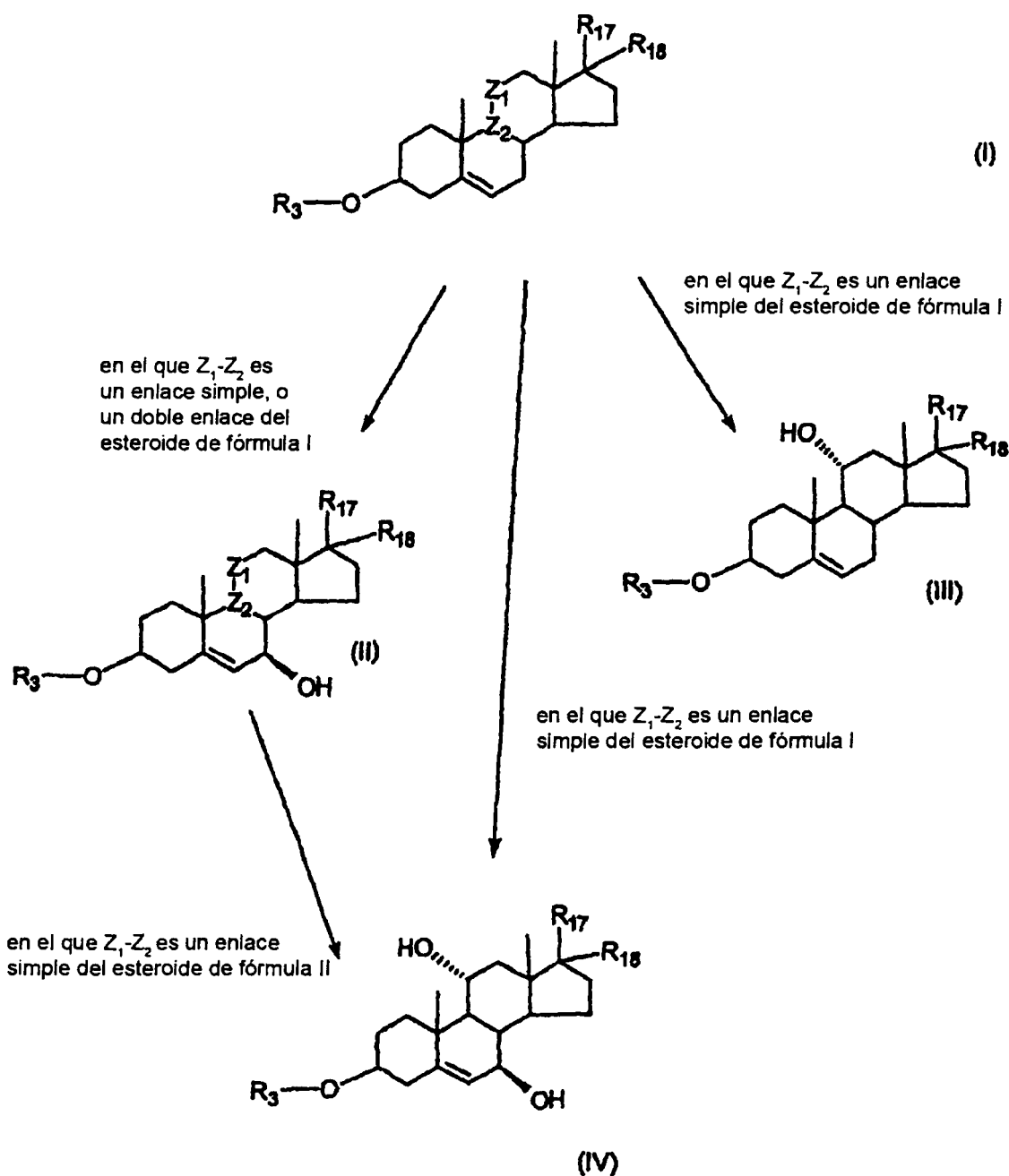
60 Se agitó a temperatura ambiente una solución de compuesto 8 (5,01 g) en carbonato de potasio 0,15 N en metanol (50 ml) y se monitorizó la reacción mediante TLC. Cuando ya no se detecta el material de partida 8, se diluyó la mezcla con agua (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 X 200 ml). Se lavaron los extractos combinados con agua (100 ml), salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron a presión reducida hasta sequedad. Se cromatografió el residuo sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexano para dar el compuesto 9.

65 Se añadió PCl_5 a una solución del compuesto 9 en THF a -51°C que dio como resultado un aumento de la temperatura a -48°C . Tras 2 h, se vertió la mezcla en NaHCO_3 acuoso y se extrajo con EtOAc y se concentró. Se cromatografió el material sobre gel de sílice con EtOAc/hexano para dar como resultado el compuesto dieno 10.

Se produjo Eperlenona mediante epoxidación del compuesto 10 mediante procedimientos conocidos descritos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 4.559.332, y 5.981.744, los contenidos de las cuales se incorporan en su totalidad por referencia.

En referencia al Diagrama A, se pueden convertir los compuestos androst-5-en-17-ona de fórmula (I) en diferentes intermedios esteroides mediante reacciones fúngicas. Por ejemplo poniendo en contacto los compuestos androst-5-en-17-ona de fórmula (I), en los que Z_1-Z_2 es un tanto un enlace simple como un doble enlace, con *Diplodia gossypina* se producen los compuestos 7 β -hidroxi androst-5-en-17-ona de fórmula (II). Los compuestos 11 α -hidroxiandrost-5-en-17-ona de fórmula (III) se producen poniendo en contacto los compuestos androst-5-en-17-ona de fórmula (I) en los que Z_1-Z_2 es un enlace simple, con *Aspergillus ochraceus*. De manera sorprendente, poniendo en contacto los compuestos 11 α -hidroxiandrost-5-en-17-ona de fórmula (III) con *Diplodia gossypina* se fracasa en la producción de los compuestos 7 β ,11 α -dihidroxiandrost-5-en-17-ona de fórmula (IV), mientras que poniendo en contacto los compuestos 7 β -hidroxiandrost-5-en-17-ona de fórmula (II), en los que Z_1-Z_2 es un enlace simple, con *Aspergillus ochraceus*, se producen los compuestos 7 β ,11 α -dihidroxiandrost-5-en-17-ona de fórmula (IV). De manera inesperada, poniendo en contacto los compuestos androst-5-en-17-ona de fórmula (I), en los que Z_1-Z_2 es un enlace simple, con *Absidia coerulea*, se producen de manera directa los compuestos 7 β ,11 α -dihidroxiandrost-5-en-17-ona de fórmula (IV).

Diagrama A



Los hongos filamentosos reactivos pertenecen a los géneros *Diplodia* (sinónimos *Botryodiplodia*, *Lasiodiplodia*), *Aspergillus*, y *Absidia coerulea*, y se prepararon de manera general mediante un estado primario y secundario de semilla vegetativa. Se utilizó la semilla secundaria para inocular la etapa de bioconversión del esteroide.

Se puede usar el procedimiento descrito en el presente documento para producir compuestos esteroides de fórmula (I), (II), (III), y (IV), que son intermedios útiles para la fabricación de esteroides farmacéuticamente activos tales como los antagonistas del receptor de la aldosterona. De manera adicional, 5-androstén-3 β ,7 β -diol-17-ona (fórmula II en la que R₃ es un hidrógeno y R₁₇ y R₁₈ son de manera conjunta una cetona, y Z₁-Z₂ es un enlace simple) es un intermedio atractivo para la síntesis de 5-androstén-3 β -ol-7,17-diona, un suplemento esteroide comercialmente disponible que se ha postulado tiene efectos beneficiosos sobre las enfermedades del corazón, la función inmune, el envejecimiento, y el bienestar general.

Descripción detallada de la etapa de 7 β -Hidroxilación

Los compuestos esteroides de fórmula (I), en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple o un doble enlace, se hidroxilan microbiológicamente en la posición 7 para producir los compuestos esteroides de fórmula (II), en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple o un doble enlace.

Se puede usar en el procedimiento de la invención cualquier hongo filamentosos de los géneros *Diplodia*, *Botryodiplodia*, o *Lasiodiplodia* de los esteroides capaz de 7 β -hidroxilar los esteroides de fórmula (I). Se usan, de manera preferible, *Diplodia gossypina* ATCC 20571 (sinónimo, *Botryodiplodia theobromae* IFO 6469) o *Botryodiplodia malorum* ATCC 24444 (sinónimo CBS 134.50). Se usa, de manera más preferible, *Diplodia gossypina* ATCC 20571 (sinónimo *Botryodiplodia theobromae* IFO 6469).

Se puede utilizar la hidroxilasa fúngica en forma de un cultivo que crece activamente, un concentrado de células completas, o un extracto libre de células. De manera preferible, se hace crecer el hongo en un cultivo sumergido en condiciones aerobias, usando cualquier procedimiento reconocido por la técnica, y la reacción de 7 β -hidroxilación se lleva a cabo *in situ*.

Se puede cultivar el hongo deseado en las condiciones que se muestran en los Ejemplos 1 y 2 usando los ingredientes especificados, u otras fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno tales como las conocidas por aquellas personas expertas en la técnica. De manera general, se usa un procedimiento de siembra vegetativo primario y secundario en la preparación de la 7 β -hidroxilación fúngica. De manera alternativa, se puede usar directamente una siembra vegetativa primaria para inocular el medio de bioconversión.

Se pueden incubar los cultivos de semillas vegetativas primarias durante un período de aproximadamente 24 a aproximadamente 96 horas (de manera preferible aproximadamente 48-72 horas) a una temperatura entre aproximadamente 20° y aproximadamente 37° (de manera preferible aproximadamente 28°), y un pH entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 7,5. El medio de siembra vegetativo secundario se inocula con aproximadamente un 0,006% a aproximadamente un 0,1% (v/v) de cultivos de siembras vegetativas secundarios, pero normalmente aproximadamente un 0,012% (v/v), y se incuba durante un período de aproximadamente 36 a aproximadamente 72 horas (de manera preferible aproximadamente 60 horas) a una temperatura entre aproximadamente 20° y aproximadamente 37° (de manera preferible aproximadamente 28°). El pH del medio de siembra secundario puede estar entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 7,0, pero de manera preferible entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 5,0. El medio de bioconversión, que puede ser el mismo o similar al medio de siembra vegetativo secundario, se inocula con aproximadamente un 1% a aproximadamente un 10% (v/v) de cultivo de siembra vegetativo secundario (de manera preferible aproximadamente un 3% a aproximadamente un 5%). Tras un período de incubación inicial de aproximadamente 12 a aproximadamente 72 horas (de manera preferible aproximadamente 16 a aproximadamente 24 horas), se añaden los sustratos esteroides de fórmula (I), de manera preferible micronizados, al cultivo de bioconversión. Se pueden añadir los sustratos esteroides micronizados de fórmula (I) como un polvo en seco o una suspensión acuosa, bien como una adición única o como una serie de adiciones, o una alimentación continua. Se prefiere usar los sustratos esteroides micronizados de fórmula (I) a una concentración mayor de 1 g/L, de manera más preferible mayor de 2,5 g/L, incluso de manera más preferible mayor de 5 g/L. Se deja proceder a la bioconversión de sustratos esteroides de fórmula (I) para formar productos 7 β hidroxilados de fórmula (II), de manera respectiva, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6 días, pero normalmente aproximadamente 3 a aproximadamente 4 días.

Se puede mejorar mucho la velocidad y extensión de la 7 β hidroxilación mediante (i) cultivar el hongo seleccionado, y llevar a cabo la bioconversión en presencia de un detergente. Se puede seleccionar el detergente entre el grupo constituido por detergentes no iónicos, pero de manera preferible por los subgrupos constituidos por alquifenoles etoxilados y ésteres de polioxietilensorbitán. De manera más preferible, se usa monooleato de polioxietilensorbitán; (ii) cultivar el hongo seleccionado, y llevar a cabo la bioconversión en presencia de aceite natural. Se puede seleccionar el aceite natural entre, pero sin restringirse a, el grupo constituido por aceite de castor, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de manteca de cerdo, aceite de semillas de lino, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de semillas de colza, aceite de semillas de cártamo, aceite de soja, aceite de semillas de girasol, y aceite de germen de trigo. De manera preferible, se usa el aceite de soja; (iii) usando una combinación de las metodologías identificadas en (i) e (ii).

Una vez se completa la bioconversión de los sustratos esteroides de fórmula (I) a productos 7 β hidroxilados de fórmula (II), se pueden aislar los compuestos de fórmula (II) usando uno cualquiera de los numerosos procedimientos

reconocidos por la técnica. De manera preferible se extraen sólidos de cerveza usando un solvente orgánico, tal como metanol, acetona, acetato de butilo, o cloruro de metileno y se aísla el producto 7 β hidroxilado de fórmula (II) mediante cristalización. Los solventes de cristalización incluyen un solvente seleccionado entre, pero no restringido a, el grupo constituido por agua, metanol, acetona, acetato de butilo, cloruro de metileno, o las combinaciones de los mismos.

5 La extracción preferida y el solvente de cristalización para el producto 7 β hidroxilado de fórmula (II) es el cloruro de metileno.

Descripción detallada de la etapa de 11 α hidroxilación

10 Los compuestos esteroides de fórmula (I) ó (II), en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple o un doble enlace, se hidroxilan microbiológicamente en la posición 11 para producir los compuestos esteroides de fórmula (III) ó (IV), de manera respectiva.

15 Se puede usar en el procedimiento de la invención cualquier hongo filamentoso del género *Aspergillus* capaz de 7 β -hidroxilar los esteroides de fórmula (I) ó (II), en el que Z₁-Z₂ es un enlace simple que se puede usar en el procedimiento de la invención. De manera preferible, se usa *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500 (sinónimo NRRL 405)

20 Se puede utilizar la hidroxilasa fúngica en forma de un cultivo que crece activamente, un concentrado de células completas, o un extracto libre de células. De manera preferible, se hace crecer el hongo en un cultivo sumergido bajo condiciones aerobias, usando cualquier procedimiento reconocido por la técnica, y la reacción de 7 β -hidroxilación se lleva a cabo *in situ*.

25 Se puede cultivar el hongo deseado en las condiciones que se muestran en los Ejemplos 3 y 4 usando los ingredientes especificados, u otras fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno tales como las conocidas por aquellas personas expertas en la técnica. De manera general, se usa un procedimiento de siembra vegetativo primario y secundario en la preparación de la 11 α -hidroxilación fúngica. De manera alternativa, se puede usar directamente una siembra vegetativa primaria para inocular el medio de bioconversión.

30 Se pueden incubar los cultivos de las siembras vegetativas primarias durante un período de aproximadamente 24 a aproximadamente 96 horas (de manera preferible aproximadamente 48-72 horas) a una temperatura entre aproximadamente 20° y aproximadamente 37° (de manera preferible aproximadamente 28°), y un pH entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 7,5. El medio de siembra vegetativo secundario se inocula con aproximadamente un 0,006% a aproximadamente un 0,1% (v/v) de cultivo de siembras vegetativas secundario, pero normalmente aproximadamente un 0,012% (v/v), y se incuba durante un período de aproximadamente 36 a aproximadamente 72 horas (de manera preferible aproximadamente 60 horas) a una temperatura entre aproximadamente 20° y aproximadamente 37° (de manera preferible aproximadamente 28°). El pH del medio de siembra secundario puede estar entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 7,0, pero de manera preferible entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 5,0. El medio de bioconversión, que puede ser el mismo o similar al medio de siembra vegetativo secundario, se inocula con aproximadamente un 1% a aproximadamente un 10% (v/v) de cultivo de siembras vegetativo secundario (de manera preferible aproximadamente un 3% a aproximadamente un 5%). Tras un período de incubación inicial de aproximadamente 12 a aproximadamente 72 horas (de manera preferible aproximadamente 16 a aproximadamente 24 horas), se añaden los sustratos esteroides de fórmula (I) ó (II), en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple con el cultivo de bioconversión. De manera preferible se micronizan los sustratos. Se pueden añadir los sustratos esteroides micronizados de fórmula (I) ó (II) como un polvo en seco o una suspensión acuosa, bien como una adición única o como una serie de adiciones, o una alimentación continua. Se prefiere usar los sustratos esteroides micronizados de fórmula (I) ó (II) en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple a una concentración mayor de 1 g/L, de manera más preferible mayor de 2,5 g/L, incluso de manera más preferible mayor de 5 g/L. Se deja proceder a la bioconversión de sustratos esteroides de fórmula (I) ó (II), en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple para formar productos 11 α hidroxilados de fórmula (III) ó (IV), de manera respectiva, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 días, pero normalmente aproximadamente 2 a aproximadamente 3 días.

55 Se puede mejorar mucho la velocidad y extensión de la 11 α hidroxilación mediante (i) cultivar el hongo seleccionado, y llevar a cabo la bioconversión en presencia de un detergente. Se puede seleccionar el detergente entre el grupo constituido por detergentes no iónicos, pero de manera preferible por los subgrupos constituidos por alquifenoles etoxilados y ésteres de polioxietilensorbitán. De manera más preferible, se usan octilfenoxipolietoxietanol o nonilfenoxipolietoxietanol; (ii) cultivar el hongo seleccionado, y llevar a cabo la bioconversión en presencia de aceite natural. Se puede seleccionar el aceite natural entre, pero sin restringirse a, el grupo constituido por aceite de castor, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de manteca de cerdo, aceite de semillas de lino, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de semillas de colza, aceite de semillas de cártamo, aceite de soja, aceite de semillas de girasol, y aceite de germen de trigo. De manera preferible, se usa el aceite de soja; (iii) usando una combinación de metodologías identificadas en (i) e (ii).

65 Una vez se completa la bioconversión de los sustratos esteroides de fórmula (I) ó (II) en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple a productos 11 α hidroxilados de fórmula (III) o (IV), se pueden aislar los compuestos de fórmula (III) o (IV) usando uno cualquiera de los numerosos procedimientos reconocidos por la técnica. De manera preferible se extraen los sólidos de cerveza, filtrados o centrifugados o las cervezas completas, usando un solvente orgánico miscible en agua, tal como metanol o acetona, a temperaturas tan bajas como aproximadamente 15°C o tan altas como aproximadamente 55°C. La temperatura de extracción preferida es aproximadamente 45-50°C. Se genera el producto

ES 2 271 636 T3

crudo 11 α hidroxilado de fórmula (II) ó (IV) mediante cristalización evaporativa, para eliminar el solvente orgánico, y enfriar. La mezcla solvente de extracción preferida es acetona 80-85%/agua 15-20%. Se descarta el licor acuoso residual.

Se purificó el producto crudo cristalino 11 α hidroxilado de fórmula (III) ó (IV), mediante tratamiento con carbono y cristalización. Se prefiere que el tratamiento con carbono y la cristalización posterior se lleven a cabo usando un solvente miscible en agua seleccionado entre, pero no restringido a, el grupo constituido por metanol o acetona. El solvente del tratamiento de carbono/cristalización preferido es metanol. Tras la eliminación del carbono mediante filtración, se lleva a cabo la cristalización mediante evaporación del solvente y enfriamiento.

Se pueden producir los compuestos de fórmula (I) en los que Z₁-Z₂ es un doble enlace eliminando el 11 α hidroxil del producto de fórmula (III) usando procedimientos químicos conocidos.

Descripción detallada de la etapa de 7 β ,11 α hidroxilación

Los compuestos esteroides de fórmula (I), en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple, se hidroxilan microbiológicamente en la posiciones 7- y 11-, en una etapa única, para producir los compuestos esteroides de fórmula (IV).

Se puede usar en el procedimiento de la invención cualquier hongo filamentoso del género *Absidia* capaz de 7 β ,11 α dihidroxilar los esteroides de fórmula (I), en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple. De manera preferible, se usa *Absidia coerulea* ATCC 6647 (sinónimo *Absidia orchidis*).

Se puede(n) utilizar la(s) hidroxilasa(s) fúngica(s) en forma de un cultivo que crece activamente, un concentrado de células completas, o un extracto libre de células. De manera preferible, se hace crecer el hongo en un cultivo sumergido en condiciones aerobias, usando cualquier procedimiento reconocido por la técnica, y las reacciones de 7 β y 11 α hidroxilación se llevan a cabo *in situ*.

Se puede cultivar el hongo deseado bajo las condiciones que se muestran en el Ejemplo 5 usando los ingredientes especificados, u otras fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno tales como las conocidas por aquellas personas expertas en la técnica. De manera general, se usa un procedimiento de siembra vegetativo primario y secundario en la preparación de la 7 β - y 11 α -dihidroxilación fúngica. De manera alternativa, se puede usar directamente una siembra vegetativa primaria para inocular el medio de bioconversión.

Se pueden incubar los cultivos de siembra vegetativos primarios durante un período de aproximadamente 24 a aproximadamente 96 horas (de manera preferible aproximadamente 48-72 horas) a una temperatura entre aproximadamente 20° y aproximadamente 37° (de manera preferible aproximadamente 28°), y un pH entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 7,5. El medio de siembra vegetativo secundario, que puede ser el mismo o similar al medio de siembras primario, se inocula con aproximadamente un 0,006% a aproximadamente un 0,1% (v/v) de cultivo de siembras vegetativo primario, pero normalmente aproximadamente un 0,012% (v/v), y se incuba durante un período de aproximadamente 36 a aproximadamente 96 horas (de manera preferible aproximadamente 70 a 80 horas) a una temperatura entre aproximadamente 20° y aproximadamente 37° (de manera preferible aproximadamente 28°). El pH del medio de siembra secundario puede estar entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 7,5, pero de manera preferible entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 7,0. El medio de bioconversión, que puede ser el mismo o similar al medio de siembra vegetativo secundario, se inocula con aproximadamente un 1% a aproximadamente un 10% (v/v) de cultivo de siembras vegetativo secundario (de manera preferible aproximadamente un 3% a aproximadamente un 5%). Tras un período de incubación inicial de aproximadamente 12 a aproximadamente 72 horas (de manera preferible aproximadamente 15 a aproximadamente 24 horas), se añaden los sustratos esteroides de fórmula (I), en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple en el cultivo de bioconversión. De manera preferible se micronizan los sustratos. Se pueden añadir los sustratos esteroides micronizados de fórmula (I), en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple como un polvo en seco o una suspensión acuosa, bien como una adición única o como una serie de adiciones, o una alimentación continua. Se prefieren usar los sustratos esteroides micronizados de fórmula (I) en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple a una concentración mayor de 1 g/L, de manera más preferible mayor de 2,5 g/L, incluso de manera más preferible mayor de 5 g/L. Se deja proceder a la bioconversión de los sustratos esteroides de fórmula (I), en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple para formar los productos 11 α hidroxilados de fórmula (IV), se deja proceder entre aproximadamente 2 y aproximadamente 9 días, pero normalmente aproximadamente 5 a aproximadamente 7 días. Una vez se completa la bioconversión de los sustratos esteroides de fórmula (I), en los que Z₁-Z₂ es un enlace simple, a los productos 7 β ,11 α dihidroxilados de fórmula (IV), se pueden aislar los compuestos de fórmula (IV) usando uno cualquiera de los numerosos procedimientos reconocidos por la técnica. De manera preferible, se extraen los sólidos de cerveza filtrados o centrifugados, o las cervezas completas, usando un solvente orgánico miscible en agua, tal como metanol o acetona a temperaturas tan bajas como aproximadamente 15°C o tan altas como aproximadamente 55°C. La temperatura de extracción preferida es aproximadamente 45 – 50°C. Se genera el producto 7 β ,11 α dihidroxilado crudo de fórmula IV mediante cristalización evaporativa, para eliminar el solvente orgánico, y enfriar. La mezcla de solvente de extracción preferida es acetona al 80%/agua al 20%. Se descarta el licor acuoso residual.

Se purificó el producto 7 β ,11 α dihidroxilado cristalino crudo de fórmula (IV) mediante trituración con cloruro de metileno, para eliminar las impurezas no deseadas, seguido por el tratamiento con carbono y cristalización. Se prefiere que el tratamiento con carbono y la cristalización posterior se lleven a cabo usando un solvente miscible en agua seleccionado entre, pero sin restringirse a, el grupo constituido por metanol o acetona o sus mezclas. El solvente

preferido para el tratamiento de carbono/cristalización es metanol. Tras eliminar el carbono mediante filtración, se consigue la cristalización del producto mediante evaporación del solvente y enfriamiento.

Ejemplos

Se cree que una persona experta en la técnica, sin elaboración adicional y siguiendo las descripciones anteriores, puede poner en práctica la presente invención en su extensión más completa. Los siguientes ejemplos detallados describen cómo preparar los diversos compuestos y/o llevar a cabo los diversos procedimientos de la invención que se deben tomar de manera meramente ilustrativa, y no como limitaciones de la descripción precedente de cualquiera de las maneras. Aquellas personas expertas en la técnica reconocerán con prontitud las variaciones de los procedimientos tales como los reactivos y tales como las condiciones de reacción y las técnicas.

3 β -hidroxiandrost-5-en-17-ona, denominado también 5-androstén-3 β -ol-17-ona, está disponible de Jiangsu Wujin Pharmaceuticals localizada en China.

Ejemplo 1

Bioconversión de 5-androstén-3 β -ol-17-ona (I, en la que R₃ = hidrógeno, R_{17,18} = cetona, y Z₁-Z₂ es un enlace simple con 5-androstén-3 β ,7 β -diol-17-ona (II, en la que R₃ = hidrógeno, R_{17,18} = cetona, y Z₁-Z₂ es un enlace simple

La bioconversión de 5-androstén-3 β -ol-17-ona en 5-androstén-3 β ,7 β -diol-17-ona se lleva a cabo usando un cultivo sumergido de *Diplodia gossypina* ATCC 20571 (sinónimo *Botryodiplodia theobromae* IFO 6469) en una escala de fermentación de 10-L.

(A) Etapa de siembra primaria

Se descongelaron las células vegetativas congeladas de *Diplodia gossypina* ATCC 20571, se transfirieron a placas con agar patata-dextrosa (PDA), y se incubaron a 28° durante 72 horas. Se usaron tapones miceliales únicos (6-7 mm de diámetro) para inocular en matraces agitados apuntados de 500 mL siliconizados que contenían 100 mL de medio de siembra primario. El medio de siembra primario está constituido por (por litro de agua RO): dextrina, 50 g; harina de soja, 35 g; cerelosa, 5 g; cloruro de cobalto hexahidrato, 2 mg; desespumante de silicona (SAG 471), 0,5 mL; se ajustó la preesterilización a pH 7,0-7,2 con hidróxido de sodio (2 N). Se incubó *Diplodia gossypina* ATCC 20571 durante 48 horas a 28°, usando un incubador-agitador de ambiente controlado ajustado a 280 r.p.m (2,54 de carrera).

(B) Etapa de siembra secundaria

Se inocularon fermentadores de diez litros con siembra secundaria usando 1,2 mL de cultivo de siembra primario vegetativo (0,012% [v/v] velocidad de inóculo). El medio de siembra secundario contiene (por litro de agua RO): cerelosa, 60 g; harina de soja, 25 g; aceite de soja, 30 mL, sulfato de magnesio heptahidrato, 1 g; dihidrógeno fosfato de potasio, 0,74 g; monooleato de polioxietilensorbitán, 2 mL; desespumante de silicona (SAG 471), 0,5 mL; se ajustó la preesterilización a pH 3,95-4,00, con ácido sulfúrico concentrado. Los fermentos, que contienen medio de siembra secundario, se esterilizaron durante 20 minutos a 121° usando tanto camisa como inyección de vapor. La velocidad de agitación durante la esterilización es de 200 r.p.m. Se ajustó el pH del medio en la postesterilización a 4,0 usando ácido sulfúrico estéril. Se incubó *Diplodia gossypina* ATCC 20571 a 28° usando los siguientes parámetros iniciales: agitación, 100 r.p.m.; presión de apoyo = 5 psig; (3,44 x 10⁴ N/m²) caudal de aire = 2,5 SLM (0,25 VVM); punto de ajuste del DO bajo, 30%; control del pH; ninguno. Cuando el DO cae por primera vez alcanzan el 30%, se incrementa el caudal de aire a 5 SLM (0,5 VVM). Cuando el cultivo alcanza de nuevo un DO bajo, se mantiene el DO al 30% usando el control de la agitación. Se cosecharon los cultivos de siembra secundarios a aproximadamente las 60 horas después de la inoculación cuando la OUR está entre aproximadamente 10 y aproximadamente 15 mM/L/h.

(C) Bioconversión del esteroide

Se inocularon fermentadores de diez litros de bioconversión esteroide usando 500 mL de cultivo de siembra secundaria (5% [v/v] tasa de inoculación). El medio de bioconversión esteroide es el mismo que el medio de siembra secundaria. Las condiciones de esterilización y el ajuste del pH son iguales a los descritos para el medio de siembra secundaria. Se incubó *Diplodia gossypina* ATCC 20571 a 28° usando esencialmente los mismos parámetros iniciales que aquellos usados para el cultivo de siembra secundaria, con la excepción que se aumenta el punto de ajuste del DO bajo desde un 30% a un 50%. Cuando el DO cae por primera vez alcanzan el 50% se incrementa el caudal de aire desde 2,5 SLM (0,25 VVM) a 5 SLM (0,5 VVM). Cuando el cultivo alcanza de nuevo el DO bajo, se mantiene el DO al 50% usando el control de la agitación. Comenzando a las 24 horas después de la inoculación, se añade el 5-androstén-3 β -ol-17-ona micronizado, suspendido en un volumen mínimo de monooleato de polioxietilensorbitán al 0,2% a la fermentación en intervalos de una hora hasta que se añaden un total de 400 g. A los aproximadamente 3 días después de la inoculación, se añaden 100 g más de cerelosa a la fermentación de 10-L.

Se ensayaron los cultivos de bioconversión diariamente para el 5-androstén-3 β ,7 β -diol-17-ona usando la TLC. Se extrajo un mililitro de cerveza entera con 10 mL de metanol. Se separaron las células de la mezcla acuosa - metanol mediante centrifugación (3.000 x g durante 10 minutos, y se aplicaron algunos microlitros a una placa de TLC. Se desarrolló la placa de TLC en ciclohexano : acetato de etilo : metanol (90:60:15) y se visualizó el producto

ES 2 271 636 T3

pulverizando la TLC con ácido sulfúrico al 50%, seguido por la carbonización en un horno. Se comparó el producto con el estándar auténtico, que se vuelve azul pulverizando con ácido sulfúrico al 50%. Se completó la bioconversión del 5-androstén-3 β -ol-17-ona a 5-androstén-3 β ,7 β -diol-17-ona aproximadamente 4 días después de la inoculación.

(D) Procedimiento de aislamiento

Se centrifugó la cerveza después de su cosechado, y se recuperaron los sólidos ricos mediante centrifugación. Se extrajeron los sólidos ricos con 10 litros de cloruro de metileno y se recuperó el extracto rico, mediante centrifugación. Se limpiaron los extractos y se concentraron hasta aproximadamente 1 litro mediante destilación y la suspensión de cristales se enfrió a -10°C. Se recuperaron los cristales mediante filtración, se lavaron con cloruro de metileno frío para eliminar el color, y se secaron para dar 227 gramos de la 5-androstén-3 β ,7 β -diol-17-ona.

Ejemplo 2

Bioconversión de la 5,9(11)-androstadien-3 β -ol-17-ona (I, en la que R₃ = hidrógeno, R_{17,18} = cetona, y Z₁-Z₂ es un doble enlace con 5,9(11)-androstadien-3 β ,7 β -diol-17-ona (II, en la que R₃ = hidrógeno, R_{17,18} = cetona, y Z₁-Z₂ es un doble enlace

Se lleva a cabo la bioconversión de 5,9(11)-androstadien-3 β -ol-17-ona en 5,9(11)-androstadien-3 β ,7 β -diol-17-ona usando un cultivo sumergido de *Diplodia gossypina* ATCC 20571 (sinónimo de *Botryodiplodia theobromae* IFO 6469) en una escala de fermentación de 10-L.

(A) Etapa de siembra primaria

Se preparan los cultivos de siembra primarios tal como se ha descrito en el Ejemplo 1.

(B) Etapa de siembra secundaria

Se prepararon diez litros de cultivos de siembra secundarios tal como se ha descrito en el Ejemplo 1.

(C) Bioconversión del esteroide

Se prepararon diez litros de cultivos de bioconversión del esteroide tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. A aproximadamente 24 horas después de la inoculación, se añadieron 120 g de 5,9(11)-androstadien-3 β -ol-17-ona, suspendidos en un volumen mínimo de monooleato de polioxietilensorbitán al 0,2%, a la fermentación de 10-L.

Se evaluaron los cultivos de bioconversión en una base diaria para 5,9(11)-androstadien-3 β ,7 β -diol-17-ona usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Se completó la bioconversión de la 5,9(11)-androstadien-3 β -ol-17-ona en la 5,9(11)-androstadien-3 β ,7 β -diol-17-ona aproximadamente 3 días después de la inoculación.

(D) Procedimiento de aislamiento

Se recuperaron los sólidos ricos de la cerveza entera mediante centrifugación. Se extrajo la fase líquida de la cerveza usando 15 litros de cloruro de metileno. Tras la sedimentación, se decantó y descartó la capa de cerveza residual superior. A continuación se usó el cloruro de metileno rico restante para extraer los sólidos ricos. Se purgó el extracto de cloruro de metileno resultante de los sólidos residuales, se lavó, se concentró mediante destilación en aproximadamente 0,5 litros, y se enfrió a -10°C. Se recuperaron los cristales obtenidos mediante filtración, se lavaron con acetato de n-butilo para eliminar el color, y se secaron para dar 52,2 gramos de la 5,9(11)-androstadien-3 β ,7 β -diol-17-ona cristalina purificada.

Ejemplo 3

Bioconversión de la 5-androsten-3 β -ol-17-ona (I, en la que R₃ = hidrógeno, R_{17,18} = cetona, y Z₁-Z₂ es un enlace simple con 5-androsten-3 β ,11 α -diol-17-ona (II, en la que R₃ = hidrógeno, R_{17,18} = cetona, y Z₁-Z₂ es un enlace simple)

Se lleva a cabo la bioconversión de de la 5-androsten-3 β -ol-17-ona en 5-androsten-3 β ,11 α -diol-17-ona usando un cultivo sumergido de *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500 (sinónimo NRRL 405) en una escala de fermentación de 10-L.

(A) Etapa de siembra primaria

Se prepararon los cultivos de siembra primarios de *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500 tal como se ha descrito para la *Diplodia gossypina* ATCC 20571 en el Ejemplo 1.

(B) Etapa de siembra secundaria

Se inocularon fermentadores de diez litros con siembra secundaria usando 1,2 mL de cultivo de siembra primario vegetativo (0,012% [v/v] índice de inóculo). El medio de siembra secundario contiene (por litro de agua RO): cerelesa,

ES 2 271 636 T3

40 g; harina de soja, 25 g; aceite de soja, 30 mL, sulfato de magnesio heptahidrato, 1 g; dihidrógeno fosfato de potasio, 0,74 g; nonilfenoxipoliethoxietanol, 0,25 mL; desespumante de silicona (SAG 471), 0,5 mL; se ajustó la preesterilización a pH 3,95-4,00, con ácido sulfúrico concentrado. Los fermentadores, que contienen medio de siembra secundario, se esterilizaron durante 20 minutos a 121° usando tanto camisa como inyección de vapor. La velocidad de agitación durante la esterilización es de 200 r.p.m. Se ajustó el pH del medio en la postesterilización a 4,0 usando ácido sulfúrico estéril. Se incubó *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500 a 28° usando los siguientes parámetros iniciales: agitación, 100 r.p.m.; presión de apoyo = 5 psig; $(3,44 \times 10^4 \text{ N/m}^2)$ caudal de aire = 2,5 SLM (0,25 VVM); punto de ajuste del DO bajo, 50%; control del pH; ninguno. Cuando el DO cae por primera vez alcanzan el 50%, se incrementa el caudal de aire a 5 SLM (0,5 VVM). Cuando el cultivo alcanza de nuevo un DO bajo, se mantiene el DO al 50% usando el control de la agitación. Se cosecharon los cultivos de siembra secundarios a aproximadamente entre 50 y 54 horas después de la inoculación cuando la OUR está entre aproximadamente 20 y aproximadamente 26 mM/L/h.

C) Bioconversión del esteroide

Se inocularon fermentadores de bioconversión esteroide de diez litros usando 500 mL de cultivo de siembra secundario (5% [v/v] tasa de inoculación). El medio de bioconversión esteroide es esencialmente el mismo que el medio de siembra secundario, con la excepción que el nonilfenoxipoliethoxietanol se incrementa de 0,25 mL/L a 2 mL/L, y el pH de preesterilización se ajustó a 2,95-3,00 con ácido sulfúrico concentrado. Las condiciones de esterilización son iguales a las descritas para el medio de siembra secundario. Tras la esterilización, el pH del medio se ajustó a 3,00 con ácido sulfúrico estéril (5%). Se incubó *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500 a 28° usando esencialmente los mismos parámetros iniciales que los usados para el cultivo de siembra secundario, con la excepción que se ajusta inicialmente la agitación a 200 r.p.m. A las 18 horas de la inoculación, se micronizaron 200 de 5-androstén-3 β -ol-17-ona, se suspendieron en un volumen mínimo de nonilfenoxipoliethoxietanol al 0,2% se añadieron a la fermentación de 10-L.

Se ensayaron los cultivos de bioconversión diariamente respecto del 5-androstén-3 β ,11 α -diol-17-ona usando la TLC. Se extrajo un mililitro de cerveza entera con 19 mL de metanol. Se separaron las células de la mezcla acuosa – metanol mediante centrifugación (3.000 x g durante 10 minutos), y se aplicaron algunos microlitros a una placa de TLC. Se desarrolló la placa de TLC en ciclohexano : acetato de etilo : metanol (90:60:15) y se visualizó el producto pulverizando la TLC con ácido sulfúrico al 50%, seguido por la carbonización en un horno. Se comparó el producto con el estándar auténtico, que se vuelve azul pulverizando con ácido sulfúrico al 50%. Se completó la bioconversión de la 5-androstén-3 β -ol-17-ona en 5-androstén-3 β ,11 α -diol-17-ona a aproximadamente 3 días después de la inoculación.

(D) Procedimiento de aislamiento

Se recuperaron los sólidos de la cerveza entera mediante centrifugación. Se descartó el líquido. Se extrajeron los sólidos ricos con 10 litros de acetona al 85%, agua al 20% a de 45°C a 50°C, y se recuperó el extracto rico mediante centrifugación. Se concentró el extracto mediante destilación para eliminar la acetona, que genera una suspensión acuosa de cristales crudos. Se recuperaron los cristales crudos mediante filtración y se descartó el licor madre. Se disolvieron los cristales húmedos en agua en 700 mililitros de metanol calentando a 55°C, y a continuación se decoloraron con 5 gramos de carbono Darco G-60. Tras la filtración para eliminar el carbono, se concentró el filtrado para cristalizar el producto. Se eliminó el metanol de manera adicional añadiendo 300 mL de acetato de n-butilo y se concentró hasta una suspensión espesa de cristales. Se filtraron los cristales, se lavaron con acetato de n-butilo, y se secaron para dar 158 gramos de la 5-androstén 3 β ,11 α -diol-17-ona cristalina purificada.

Ejemplo 4

Bioconversión de la 5-androstén-3 β ,7 β -diol-17-ona (II, en la que R₃ = hidrógeno, R_{17,18} = cetona, y Z₁-Z₂ es un enlace simple con el 5-androstén-3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona (IV, en la que R₃ = hidrógeno, R_{17,18} = cetona)

Se lleva a cabo la bioconversión de la 5-androstén-3 β ,7 β -diol-17-ona en 5-androstén-3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona usando un cultivo sumergido de *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500 (sinónimo NRRL 405) en una escala de fermentación de 10-L.

(A) Etapa de siembra primaria

Se prepararon los cultivos de siembra primarios de *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500 tal como se ha descrito en el Ejemplo 3.

(B) Etapa de siembra secundaria

Se prepararon diez litros de cultivos de siembra secundarios de *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500 tal como se ha descrito en el Ejemplo 3.

(C) Bioconversión del esteroide

Se prepararon diez litros de cultivos de bioconversión del esteroide de *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500 tal como se ha descrito en el Ejemplo 3.

ES 2 271 636 T3

A aproximadamente 18 horas después de la inoculación, se añadieron 200 g micronizados de 5-androstén-3 β ,7 β -diol-17-ona, suspendidos en un volumen mínimo de nonilfenoxipolietoxietanol al 0,2%, a la fermentación de 10-L.

- 5 Se evaluaron los cultivos de bioconversión diariamente de 5-androstén-3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona usando la TLC, tal como se ha descrito en el EJEMPLO 1. Se completó la bioconversión de la 5-androstén-3 β ,7 β -diol-17-ona en 3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona aproximadamente 4 días después de la inoculación.

(D) Procedimiento de aislamiento

10

Se recuperaron los sólidos de la cerveza entera mediante centrifugación. Se descartó el líquido. Se extrajeron los sólidos ricos con 10 litros de acetona al 80%, agua al 20% a 45°C a 50°C y se clarificó el extracto caliente mediante filtración. Se concentró el filtrado rico mediante destilación para eliminar la acetona, que genera una suspensión acuosa de cristales crudos. Se recuperaron los cristales crudos mediante filtración y se descartó el licor madre. Se trituraron los cristales húmedos en agua en 600 mililitros de cloruro de metileno para eliminar las impurezas, se disolvieron en 15 700 mililitros de metanol (calentando a 55°C) y a continuación se decoloraron con 5 gramos de carbono Darco G-60. Tras la filtración para eliminar el carbono, se concentró el filtrado para cristalizar el producto. Se eliminó el metanol de manera adicional añadiendo 300 mL de acetato de n butilo y se concentró hasta una suspensión espesa de cristales. Se filtraron los cristales, se lavaron con acetato de n-butilo, y se secaron para dar 158 gramos de la 5-androstén 3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona cristalina purificada.

20

Ejemplo 5

Bioconversión de la 5-androstén-3 β -ol-17-ona (I, en la que R₃ = hidrógeno, R_{17,18} = cetona, y Z₁-Z₂ es un enlace simple con 5-androstén-3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona (IV, en la que R₃ = hidrógeno, R_{17,18} = cetona)

25

Se llevó a cabo la bioconversión de 5-androstén-3 β -ol-17-ona en 5-androstén-3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona usando un cultivo sumergido de *Absidia coerulea* ATCC 6647 (sinónimo *Absidia orchidis*) en una báscula de fermentación de 10-L.

30

(A) Etapa de siembra primaria

Se prepararon los cultivos de siembra primarios de *Absidia coerulea* ATCC 6647 tal como se ha descrito para *Diplodia gossypina* ATCC 20571 en el Ejemplo 1

35

(B) Etapa de siembra secundaria

Se inocularon fermentadores de diez litros de siembra secundarios usando 1,2 mL de cultivo de siembra primario vegetativo (0,012% [v/v] tasa de inoculación). El medio de siembra secundario contiene (por litro de agua RO): dextrina, 50 g; harina de soja, 35 g; cerelosa, 5 g; cloruro de cobalto hexahidrato, 2 mg; desespumante de silicona (SAG 471), 0,5 mL; se ajustó la preesterilización a pH 4,95-5,00 con ácido sulfúrico concentrado. Se esterilizaron los fermentadores, que contienen medio de siembra secundario, durante 20 minutos a 121° usando camisa y corriente de inyección. La velocidad de agitación durante la esterilización es de 200 r.p.m. Tras la esterilización, se ajustó el pH del medio a 5,0 usando ácido sulfúrico estéril (al 5%). Se incubó *Absidia coerulea* ATCC 6647 a 28° usando los siguientes parámetros iniciales: agitación, 100 r.p.m.; presión de apoyo = 5 psig (3,44 x 10⁴ N/m²); caudal de aire = 2,5 SLM (0,25 VVM); punto de ajuste del DO bajo, 50 %; control del pH, ninguno: Cuando el DO cae por primera vez al 30%, se incrementa el caudal de aire a 5 SLM (0,5 VVM). Cuando el cultivo alcanza de nuevo el DO bajo, se mantiene el DO al 30% usando el control de la agitación. Se cosecharon los cultivos de siembra secundarios aproximadamente 76 horas después de la inoculación, cuando la OUR está entre 4 y aproximadamente 50 7 mM/L/h.

(C) Bioconversión del esteroide

Se inocularon fermentadores de diez litros de bioconversión del esteroide usando 500 mL de cultivo de siembra secundario vegetativo (5% [v/v] tasa de inoculación). El medio de bioconversión del esteroide contiene (por litro de agua RO): dextrina, 50 g; harina de soja, 35 g; cerelosa, 20 g; desespumante de silicona (SAG 471), 0,5 mL, se ajustó la preesterilización a pH 2,95-3,00 con ácido sulfúrico concentrado. Las condiciones de esterilización son tal como se han descrito para el medio de siembra secundario. Tras la esterilización, se ajustó el pH del medio a 3,0 usando ácido sulfúrico estéril (al 5%). Se incubó *Absidia coerulea* ATCC 6647 a 28° usando los mismos parámetros iniciales que aquellos usados para el cultivo de siembra secundario. A aproximadamente las 17 horas después de la inoculación, se añadieron 200 g de 5-androstén-3 β -ol-17-ona micronizados, suspendidos en un volumen mínimo de octilfenoxipolietoxietanol al 0,2% a la fermentación de 10-L.

60

Se evaluaron los cultivos de bioconversión diariamente respecto del 5-androstén-3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona usando TLC, tal como se ha descrito en el EJEMPLO1. Se completó la bioconversión del 5-androstén-3 β -ol-17-ona en 5-androstén-3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona aproximadamente 6-7 días después de la inoculación.

65

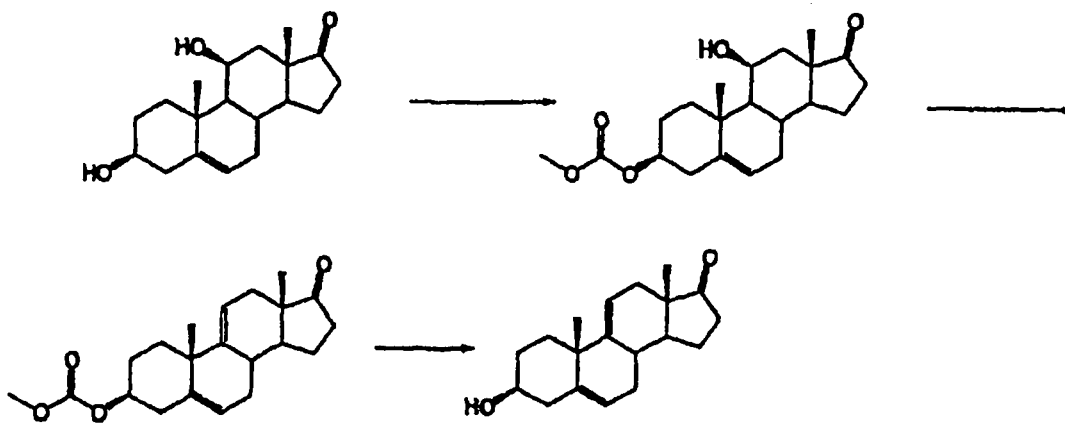
(D) Procedimiento de aislamiento

Se recuperaron los sólidos de la cerveza entera mediante centrifugación. Se descartó el líquido. Se extrajeron los sólidos ricos usando 10 litros de acetona al 85% agua al 15% a 45°C a 50°C y se clarificó el extracto caliente mediante filtración. Se concentró el filtrado rico mediante destilación para eliminar la acetona, que genera una suspensión acuosa de cristales crudos. Se filtró la suspensión de cristales y se descartó el licor madre. Se trituraron los cristales húmedos en agua en 600 mililitros de cloruro de metileno para eliminar las impurezas, se disolvieron en 700 mililitros de metanol (calentando a 55°C), y a continuación se decoloraron con 5 gramos de carbono Darco G-60. Tras la filtración para eliminar el carbono, se concentró el filtrado para cristalizar el producto. Se eliminó el metanol de manera adicional añadiendo 300 mL de acetato de n-butilo y se concentró hasta una suspensión e cristales espesa. Se filtraron los cristales, se lavaron con acetato de n-butilo, y se secaron para dar 75,5 gramos de la 5-androstén-3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona.

Se trituraron los cristales crudos en 600 mililitros de cloruro de metileno para eliminar las impurezas adicionales, se disolvieron en 700 mililitros de metanol (calentando a 55°C), y a continuación se decoloraron con 5 gramos de carbono Darco G-60. tras la filtración para eliminar el carbono, se concentró el filtrado para cristalizar el producto. Se eliminó el metanol de manera adicional añadiendo 300 mL de acetato de n-butilo y se concentró hasta una suspensión espesa de cristales. Se filtraron los cristales, se lavaron con acetato de n-butilo, y se secaron para dar 42,1 gramos de la 5-androstén-3 β ,7 β ,11 α -triol-17-ona cristalina purificada.

Ejemplo 6

Preparación de la 5,9(11)-androstadien-3 β -ol-17-ona a partir de la 5-androstén-3 β ,11 α -diol-17-ona



Etapa 1

Se añadió TMEDA (18,1 mL, 120 mmol) a una suspensión de 5-androstén-3 β ,11 α -diol-17-ona (30,4 g, 100 mmol) en CH₂Cl₂ (300 mL). Se enfrió la suspensión a -10°C y se añadió cloroformiato de metilo (7,72 mL, 100 mmol). Se dejó calentar la reacción a temperatura ambiente. No se completó la reacción mediante la TLC de tal manera que se añadió más cloroformiato de metilo (772 μ L, 100 mmol). Cuando se determinó que se completó la reacción mediante la TLC, se añadieron EtOAc (300 mL) y H₂O (100 mL) y se separaron las capas resultantes. Se lavó la fase orgánica con 50 mL de H₂O, se secó sobre MgSO₄ y se concentró hasta un aceite que se solidificó dejándolo reposar. Se recristalizó el producto crudo a partir de EtOAc/CH₂Cl₂ caliente y heptano. Se enfrió la suspensión de manera adicional a 0-5°C y se recogió el producto mediante filtración (22 g, 60,8 de producto químico). Se purificó el carbonato de manera adicional mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de acetona/CH₂Cl₂ al 5% - 20% para obtener el monocarbonato puro (20,57, 56,8%).

Etapa 2

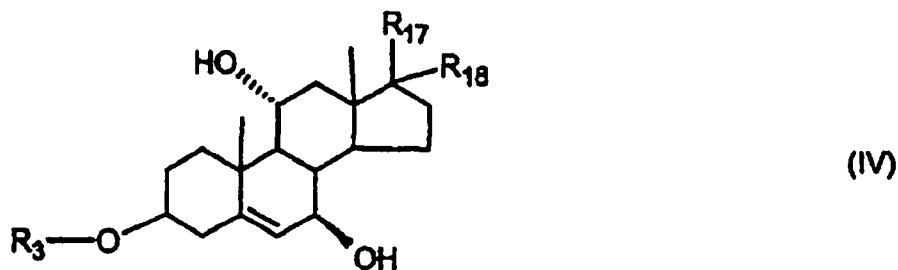
Se disolvió el carbonato de la etapa 1 (38,0 g, 0,105 mol) en 570 mL de THF y se enfrió a -35°C. Se añadió lentamente PCl₅ (37,1 g, 0,178 mol) manteniendo la temperatura por debajo de -30°C. Cuando la TLC mostró la reacción completa se vertió la mezcla en una solución de NaHCO₃ frío y se extrajo el producto con acetato de etilo. Se secaron las capas orgánicas sobre MgSO₄ y se concentraron para dar como resultado un aceite.

Etapa 3

Se disolvió este aceite de la etapa 2 en metanol (500 ml) y se trató con 36,1 g de K₂CO₃ y se agitó la mezcla a temperatura ambiente 15 h. Se eliminó el carbonato residual mediante filtración. Se concentró parcialmente la solución y se añadió agua para precipitar el alcohol diénico deseado, que se secó en un horno a 45°C. Resultado 29,52 g.

REIVINDICACIONES

1. Un $7\beta,11\alpha$ dihidroxi esteroide de fórmula (IV)



en el que R_3 es:

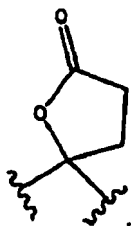
(1) -H;

(2) -CO- R_4

en el que R_4 es H o alquilo C_1 - C_5 ;

en el que R_{17} y R_{18} forman de manera conjunta =O ó

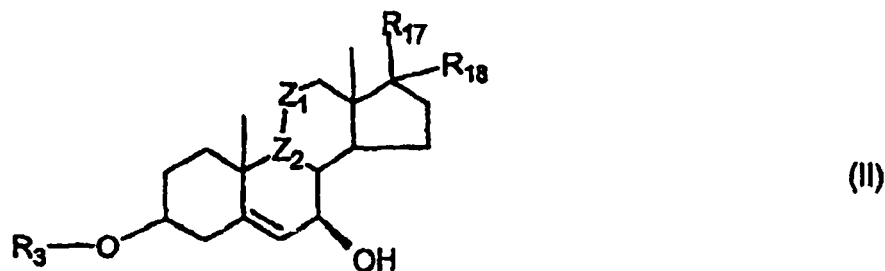
en el que R_{17} y R_{18} de manera conjunta con el átomo de carbono C17 del esqueleto de esteroide al cual se enlazan



forman un anillo de lactona de fórmula

2. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (IV) de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende

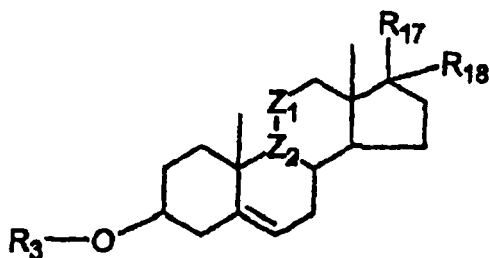
(1) poner en contacto un 7β -hidroxi esteroide de fórmula (II)



en la que R_3 , R_{17} , y R_{18} son tal como se ha definido en la reivindicación 1 y en la que Z_1 - Z_2 es un enlace simple con la 11α hidroxilasa de *Aspergillus*.

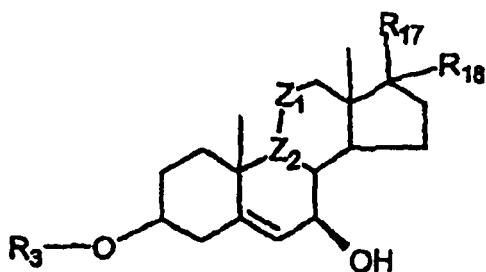
3. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (IV) de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende

(1) poner en contacto un Δ^5 -esteroide de fórmula (I)



(I)

en la que R_3 , R_{18} y R_{17} son tal como se ha definido en la reivindicación 1 y en la que Z_1 - Z_2 es un enlace simple con la 7β hidroxilasa de *Diplodia* para producir un 7β -hidroxi esteroide de fórmula (II)



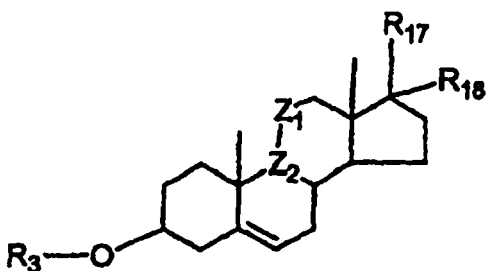
(II)

en la que R_3 , R_{17} y R_{18} son tal como se ha definido en la reivindicación 1 y en la que Z_1 - Z_2 es un enlace simple; y

(2) poner en contacto el 7β -hidroxi esteroide (II) de la etapa (I) con la 11α -hidroxilasa de *Aspergillus*.

4. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (IV) de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende

(1) poner en contacto un Δ^5 -esteroide de fórmula



(I)

en la que R_3 , R_{18} , y R_{17} son tal como se ha definido en la reivindicación 1 y en la que Z_1 - Z_2 es un enlace simple con la $7\beta,11\alpha$ -hidroxilasa de *Absidia*.

5. El compuesto o procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que R_3 es H.

6. El compuesto o procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que R_3 es $-C(O)-CH_3$.

7. El compuesto o procedimiento de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 4 en el que R_{17} y R_{18} forman $=O$

8. El compuesto o procedimiento de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 4 en el que R_{17} , R_{18} , y el átomo de carbono C17 del esqueleto de esteroide forman el anillo de lactona.

9. El compuesto o procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el anillo de lactona tiene la estereo-



química α y β que se muestra en la fórmula

10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el $7\beta,11\alpha$ - dihidroxi esteroide es la 5-androstén- $3\beta,7\beta,11\alpha$ -triol-17-ona.

11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el poner en contacto es mediante reacción de fermentación, concentrado de células, reacción de células completas o libre de células.

12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 en el que poner en contacto es mediante fermentación.

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que *Diplodia* es *Diplodia gossypina*.

14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que *Aspergillus* es *Aspergillus ochraceus*.

15. El procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (IV) de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el 7β -hidroxi esteroide (II) de la etapa (I) no se aísla antes de la puesta en contacto de la etapa (2).

16. El procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (IV) de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el 7β -hidroxi esteroide (II) de la etapa (I) se aísla antes de la puesta en contacto de la etapa (2).

17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 en el que *Absidia* es *Absidia coerulea*.