



(19) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: PT 552041 E

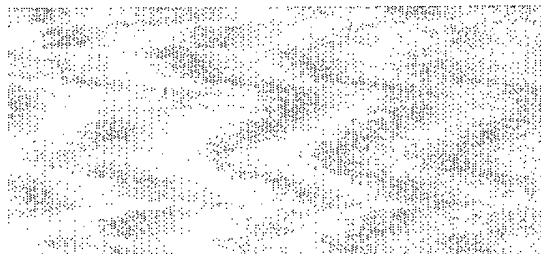
(51) Classificação Internacional: (Ed. 6 )  
C12P041/00 A C12P017/10 B  
C12P013/00 B C07D305/14 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

<p>(22) Data de depósito: 1993.01.15</p> <p>(30) Prioridade: 1992.01.15 US 822015</p> <p>(43) Data de publicação do pedido: 1993.07.21</p> <p>(45) Data e BPI da concessão: 2000.08.30</p>	<p>(73) Titular(es): E.R. SQUIBB &amp; SONS, INC. LAWRENCEVILLE-PRINCETON ROAD PRINCETON N. JERSEY 08543-4000 US</p> <p>(72) Inventor(es): RAMESH N. PATEL US LASZLO J. SZARKA US RICHARD A. PARTYKA US</p> <p>(74) Mandatário(s): JOÃO CARLOS SARDIÑA DE BARROS PRAÇA DUQUE DA TERCEIRA, 24 - 3/, DTO. 1200 LISBOA PT</p>
--	--

(54) Epígrafe: PROCESSO ENZIMÁTICOS PARA A RESOLUÇÃO DE MISTURAS ENANTIOMÉRICAS DE COMPOSTOS ÚTEIS COMO INTERMEDIÁRIOS PARA A PREPARAÇÃO DE TAXANOS

(57) Resumo:



## Descrição

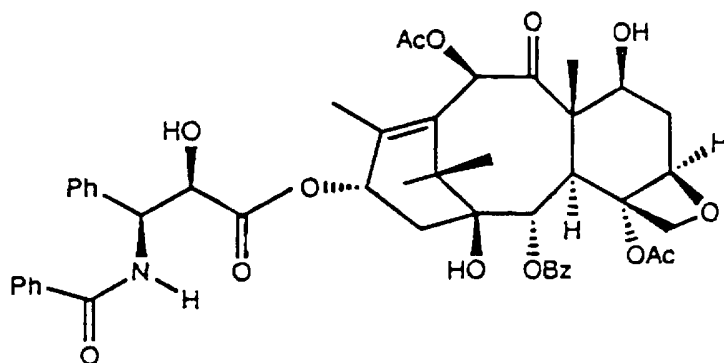
### “Processos enzimáticos para a resolução de misturas enantioméricas de compostos úteis como intermediários para a preparação de taxanos”

#### Campo da invenção

A presente invenção refere-se a processos enzimáticos para a resolução de misturas enantioméricas de compostos úteis como intermediários para a preparação de taxanos, em particular de taxol e derivados de taxol, sendo estes últimos compostos úteis no domínio farmacêutico.

#### Antecedentes da invenção

Os taxanos são diterpenos úteis no domínio farmacêutico. Por exemplo, comprovou-se que o taxol, que é um taxano que satisfaz à fórmula estrutural:



em que o símbolo Ph representa um grupo fenilo, o símbolo Ac representa um grupo acetilo e o símbolo Bz representa um grupo benzoilo, é um agente anticancerígeno eficaz, particularmente útil para o tratamento do cancro do ovário.

Os taxanos que ocorrem naturalmente, tais como o taxol, podem ser encontrados em materiais de origem vegetal e é a partir de tais materiais que têm sido isolados. No entanto, tais

taxanos podem estar presentes nos materiais de origem vegetal em quantidades relativamente pequenas, pelo que podem ser necessárias, no caso do taxol, por exemplo, grandes quantidades de teixos, que são árvores de crescimento lento, para formar uma fonte para se obter o composto. Assim, têm vindo a ser desenvolvidas pesquisas para a preparação por via sintética, incluindo as vias semi-sintéticas, de taxanos que ocorram naturalmente, tais como o taxol, e também para encontrar vias para a preparação dos seus análogos sintéticos, úteis sob o ponto de vista farmacêutico.

Uma vez que a estereoquímica destes compostos pode afectar a sua actividade farmacêutica, têm sido pesquisados, em particular, métodos que permitam uma preparação estereoespecífica eficiente de intermediários e também dos produtos finais de taxano.

#### Descrição abreviada da invenção

A presente invenção proporciona métodos eficientes para a resolução de misturas enantioméricas, de preferência misturas racémicas, de compostos úteis como intermediários para a preparação de taxanos, tais como o taxol, e conseqüentemente para a preparação estereoespecífica de tais compostos.

Dito de forma concreta, a presente invenção proporciona um método para a resolução de uma mistura I que compreende os enantiómeros Ia e Ib, em que o substituinte  $R^1$  se encontra em posição cis relativamente ao substituinte  $R^2$ , tanto na fórmula Ia como na fórmula Ib, ou em que o substituinte  $R^1$  se encontra em posição trans relativamente ao substituinte  $R^2$ , tanto na fórmula Ia como na fórmula Ib:

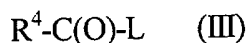


então realiza-se o passo que consiste em fazer contactar a referida mistura I, na presença de água e/ou de um álcool orgânico, com uma enzima hidrolase de éster carboxílico ou com um microrganismo que possua uma enzima hidrolase de éster carboxílico, em que a referida enzima catalisa a hidrólise estereosselectiva da referida mistura I para proporcionar a referida mistura II; ou

(ii) no caso de

o símbolo  $R^1$  representar um grupo hidroxilo e um dos substituintes  $R^{1a}$  ou  $R^{1b}$  ser um grupo hidroxilo e o outro dos substituintes  $R^{1a}$  ou  $R^{1b}$  ser um grupo de fórmula geral  $R^4-C(O)-O-$  e o substituinte  $R^4$  ser seleccionado independentemente entre os grupos enunciados a propósito do substituinte  $R^4$  anterior,

então realiza-se o passo que consiste em fazer contactar a referida mistura I, na presença de um composto de fórmula estrutural III:



em que o símbolo  $R^4$  possui as significações definidas antes a propósito dos substituintes  $R^{1a}$  ou  $R^{1b}$  e o símbolo L representa um grupo removível, com uma enzima hidrolase de éster carboxílico ou com um microrganismo que contenha uma enzima hidrolase de éster carboxílico, em que a referida enzima catalisa a hidrólise estereosselectiva da referida mistura I para proporcionar a referida mistura II.

Como variantes exemplificativas das conversões estereosselectivas anteriormente enunciadas referidas refere-se a hidrólise estereosselectiva, a esterificação estereosselectiva, a transesterificação estereosselectiva e a desalogenação estereosselectiva, em particular a hidrólise ou a esterificação estereosselectivas.

Os diversos grupos, tais como os grupos hidroxilo, que fazem parte dos compostos de fórmula estrutural I, podem ser facultativamente protegidos quando utilizados nos métodos de resolução da presente invenção; tais grupos podem ser facultativamente desprotegidos depois.

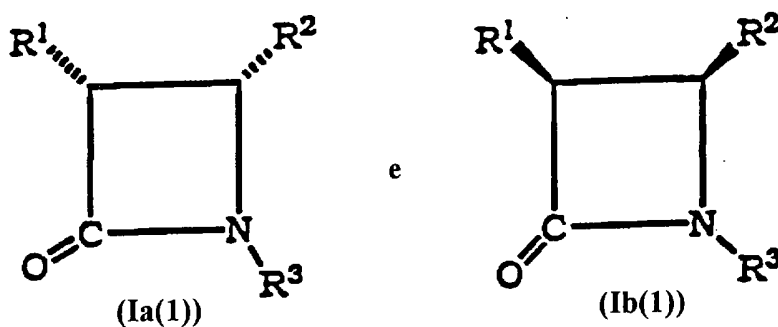
B

Descrição minuciosa da invenção

Seguidamente descreve-se mais minuciosamente os métodos da presente invenção.

Enantiómeros cis

Os pares de enantiómeros cis a seguir indicados podem ser separados pelos métodos enzimáticos da presente invenção:

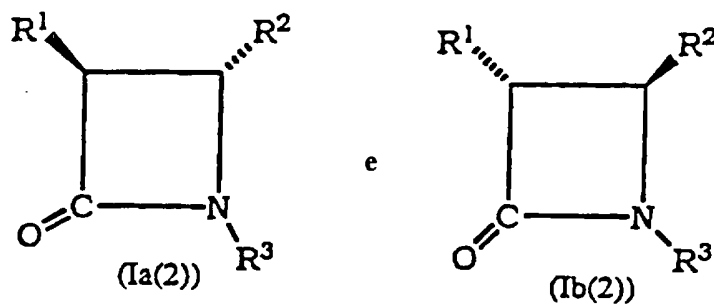


ou seja, os enantiómeros Ia e Ib em que o substituinte R<sup>1</sup> está na posição cis relativamente ao substituinte R<sup>2</sup> em qualquer das fórmulas Ia e Ib.

De acordo com os métodos da presente invenção é preferível resolver uma mistura de enantiómeros cis, conforme descrito antes.

Enantiómeros trans

O par de enantiómeros trans a seguir indicados pode ser separado pelos métodos enzimáticos da presente invenção:

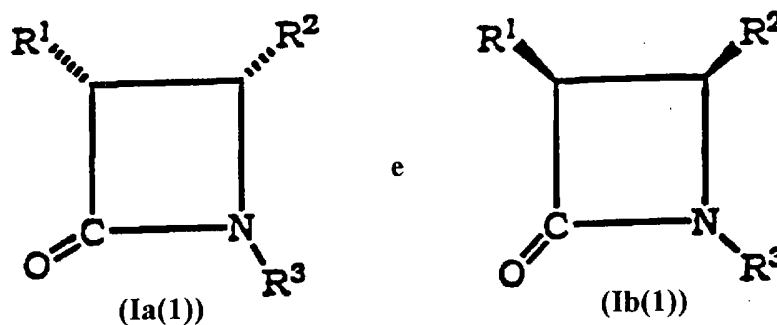


isto é, os enantiómeros Ia e Ib em que o substituinte  $R^1$  está na posição trans relativamente ao substituinte  $R^2$  em qualquer das fórmulas Ia e Ib.

### Métodos preferíveis para a resolução da mistura I

A mistura I, que é uma mistura enantiomérica de  $\beta$ -lactamas Ia e Ib, é resolvida preferencialmente por hidrólise estereosseletiva.

Um método particularmente preferido para a resolução de uma mistura I constituída por Ia(1) e Ib(1):



em que

o símbolo  $R^1$  representa um grupo alcanoiloxi ou hidroxil;

o símbolo  $R^2$  representa um grupo fenilo ou um grupo fenilo substituído; e

o símbolo  $R^3$  representa um átomo de hidrogénio ou um grupo fenilo, fenilo substituído, fenil-carbonilo, fenil-carbonilo substituído ou terc-butoxi-carbonilo, em que o radical fenilo substituído é um grupo fenol substituído por um átomo de halogénio ou por um grupo hidroxil ou alcoxi.

Os métodos referidos *supra* podem ser utilizados para a resolução de outras misturas enantioméricas da presente invenção, embora seja preferível a resolução dos enantiómeros cis Ia(1) e Ib(1) referidos antes.

Os pares de compostos assim preparados, tais como os compostos de fórmulas IIa(1) e IIb(1), são não enantioméricos e podem ser separados posteriormente para proporcionar compostos opticamente activos, de preferência opticamente puros. É preferível que a pureza óptica seja superior a 99%, em particular superior a 99,5%.

A presente invenção também proporciona um composto da mistura I praticamente isento de outros isómeros, podendo tal composto ser preparado por métodos da presente invenção.

### Definições

A expressão “conversão estereosselectiva”, tal como aqui utilizada, refere-se a uma reacção preferencial de um enantiómero relativamente ao outro, ou seja, uma reacção assimétrica enantiosselectiva. De igual modo, as expressões “hidrólise estereosselectiva” ou “esterificação estereosselectiva” referem-se respectivamente a uma hidrólise ou a uma esterificação preferenciais de um enantiómero relativamente ao outro.

O termo “mistura”, quando utilizado na presente invenção a propósito de compostos enantioméricos, designa misturas que contêm quantidade iguais (racémicas) ou desiguais de enantiómeros.

O termo “resolução”, tal como aqui utilizado, designa uma resolução parcial e também, de forma preferencial, uma resolução completa.

A expressão “forma não enantiomérica”, tal como aqui utilizada, designa a estrutura de um composto, originalmente um composto pertencente a um par enantiomérico, em que há pelo menos um grupo que foi modificado por forma a que o composto deixe de ser a imagem em espelho plano do outro composto do par enantiomérico original.

As expressões "processo enzimático" ou "método enzimático", tal como aqui utilizadas, referem-se a um processo ou a um método da presente invenção em que se utiliza uma enzima ou um microrganismo.

Os termos "alquilo", "alcano" ou "alq", tal como aqui utilizados, por si sós ou fazendo parte de outro grupo, referem-se preferencialmente a hidrocarbonetos de cadeia linear e ramificada, facultativamente substituídos, que contenham entre 1 e 15 átomos de carbono na cadeia normal, de preferência entre 1 e 6 átomos de carbono, tais como os grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, iso-hexilo, heptilo, 4,4-dimetilpentilo, octilo, 2,2,4-trimetilpentilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, os seus diversos isómeros de cadeia ramificada e não só. Como exemplos de substituintes é possível indicar um ou vários dos seleccionados entre os seguintes: átomos de halogénio (em especial o cloro) e tri-halometilo, alcoxi (por exemplo, no caso de dois substituintes alcoxi formarem um grupo acetal), arilo, tais como alquilarilo, haloarilo ou arilo insubstituído, cicloalquilo, tais como alquil-cicloalquilo ou cicloalquilo insubstituído, hidroxilo ou hidroxilo protegido, carboxilo, alquiloxi-carbonilo, alquilamino, alquilcarbonilamino, amino, aril-carbonilamino, nitro, ciano, tiol ou alquiltio. Os substituintes de grupos alquilo particularmente preferidos são os grupos hidroxilo.

O termo "alcenilo", tal como aqui utilizado, por si só ou fazendo parte de outro grupo, designa preferencialmente os grupos facultativamente substituídos anteriormente descritos a propósito dos radicais alquilo, contendo ainda pelo menos uma ligação dupla carbono a carbono.

O termo "alquinilo", tal como aqui utilizado, por si só ou fazendo parte de outro grupo, designa preferencialmente os grupos facultativamente substituídos anteriormente descritos a

propósito dos radicais alquilo, contendo ainda pelo menos uma ligação tripla carbono a carbono.

O termo "cicloalquilo", tal como aqui utilizado, por si só ou fazendo parte de outro grupo, designa preferencialmente grupos hidrocarbonados cíclicos e saturados, facultativamente substituídos, que contenham entre 1 e 3 anéis e entre 3 e 12 átomos de carbono nos anéis, de preferência entre 3 e 8 átomos de carbono nos anéis, indicando-se como exemplos os grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclo-hexilo, ciclo-heptilo, ciclooctilo, ciclodecilo, ciclo-dodecilo e adamantilo. Como exemplos de substituintes refere-se um ou vários grupos alquilo, tais como os descritos antes, ou um ou vários dos grupos anteriormente descritos enquanto substituintes de grupos alquilo.

O termo "cicloalcenilo", tal como aqui utilizado, por si só ou fazendo parte de outro grupo, designa preferencialmente grupos facultativamente substituídos, tais como os descritos antes a propósito dos grupos cicloalquilo, contendo ainda pelo menos uma ligação dupla carbono a carbono no sistema anelar.

Os termos "arilo" ou "ar", tal como aqui utilizados, designam preferencialmente grupos aromáticos monocíclicos ou bicíclicos, substituídos ou insubstituídos, que contenham entre 6 e 12 átomos de carbono na parte do anel, tais como os grupos fenilo, bifenilo, naftilo, fenilo substituído, bifenilo substituído ou naftilo substituído. Como exemplos de substituintes (de preferência três ou menos) indica-se um ou vários dos grupos seguintes: alquilo, tal como um grupo alquilo insubstituído, haloalquilo ou cicloalquil-alquilo, um átomo de halogénio, um grupo alcoxi, tal como um grupo alcoxi insubstituído ou haloalcoxi, hidroxí, arilo, tal como um grupo fenilo ou halofenilo, ariloxi, tal como um grupo fenoxi, R<sup>4</sup>-carboniloxi, em que o símbolo R<sup>4</sup> possui as significações definidas antes, tal como um grupo alquilcarboniloxi ou

benzoiloxi, alilo, cicloalquilo, alquilamino, dialquilamino, amido, tal como alquilcarbonilamino ou arilcarbonilamino, amino, nitro, ciano, alcenilo, tiol, R<sup>4</sup>-carbonilo, em que o símbolo R<sup>4</sup> possui as significações definidas antes, ou um grupo metilenodioxo, em que o radical metileno pode ser substituído por 1 ou 2 grupos alquilo inferior, 1, 2 ou 3 grupos arilalcenilo e/ou 1, 2 ou 3 grupos alquiltio.

Como exemplos de grupos arilo particularmente preferidos refere-se os grupos fenilo e os grupos fenilo substituídos, em especial o fenilo substituído por um ou vários grupos hidroxilo, grupos alquilo e/ou alcoxi, tais como p-metoxifenilo, o-metoxifenilo, p-hidroxifenilo, o-hidroxifenilo e m-hidroxifenilo.

Os termos “halogénio” ou “halo”, tal como aqui utilizados, designam os átomos de cloro, bromo, flúor e iodo, sendo preferíveis os átomos de cloro ou flúor.

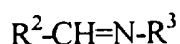
O termo “heterociclo” designa preferencialmente grupos hidrocarbonados aromáticos ou não aromáticos, monocíclicos ou bicíclicos, facultativamente substituídos e totalmente saturados ou insaturados, que possuam 5 ou 6 átomos em cada anel e possuam pelo menos um heteroátomo pelo menos num anel. O grupo heterocíclico (heterociclo) possui preferencialmente 1 ou 2 átomos de oxigénio, 1 ou 2 átomos de enxofre e/ou 1 a 4 átomos de azoto no anel. Como exemplos de substituintes refere-se os átomos de halogénio ou 1, 2 ou 3 grupos alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), 1, 2 ou 3 grupos hidroxilo, 1, 2 ou 3 grupos fenilo, 1, 2 ou 3 grupos alcanoiloxi, 1, 2 ou 3 grupos benzoiloxi, 1, 2 ou 3 grupos halofenilo, 1, 2 ou 3 grupos alquilo, tais como 1, 2 ou 3 grupos aralquilo, 1, 2 ou 3 grupos alquilamino, 1, 2 ou 3 grupos alcanoilamino, 1, 2 ou 3 grupos arilcarbonilamino, 1, 2 ou 3 grupos amino, 1, 2 ou 3 grupos nitro, 1, 2 ou 3 grupos ciano e 1, 2 ou 3 grupos tiol. Como exemplos de grupos heterocíclicos refere-se os seleccionados entre 2- e 3-tienilo, 2- e 3-furilo, 2- e 3-pirrolilo, 2-, 3- e 4-piridilo, 2-, 4- e 5-imidazolilo, 2- e

3-pirrolidinilo, 2-, 3- ou 4-piperidinilo, 2-, 3- e 4-azepinilo, 4-, 5-, 6- e 7-indolilo, 4-, 5-, 6- e 7-isoindolilo, 5-, 6-, 7- e 8-quinolinilo, 5-, 6-, 7- e 8-isoquinolinilo, 4-, 5-, 6- e 7-benzotiazolilo, 4-, 5-, 6- e 7-benzoxazolilo, 4-, 5-, 6- e 7-benzimidazolilo, 4-, 5-, 6- e 7-benzoxadiazolilo e 4-, 5-, 6- e 7-benzofurazanilo.

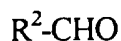
A expressão “grupo de protecção do radical hidroxilo”, tal como aqui utilizada, designa um grupo capaz de proteger um grupo hidroxilo livre, e a seguir à reacção em que tal grupo de protecção é utilizado pode então ser removido sem alterar a parte restante da molécula. A multiplicidade de grupos de protecção para o radical hidroxilo e a sua síntese podem ser encontrados na publicação “Protective Groups in Organic Synthesis” de autoria de T.W. Greene, John Wiley and Sons, 1981, ou Fieser & Fieser. Como exemplos de grupos de protecção do radical hidroxilo refere-se os seleccionados entre metoximetilo, 1-etoxietilo, benziloximetilo, ( $\beta$ -trimetilsililetoxi)-metilo, tetra-hidropiranilo, 2,2,2-tricloro-etoxicarbonilo, t-butil(difenil)-sililo, trialquilsililo, tricloro-metoxicarbonilo e 2,2,2-tricloro-etoximetilo.

#### Materiais de partida

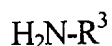
É possível preparar uma mistura I de um material de partida, constituída pelos compostos  $\beta$ -lactamas Ia e Ib, por métodos conhecidos pelos especialistas na matéria, tais como os descritos no pedido de patente de invenção europeia nº 400 971. Por exemplo, é possível preparar uma mistura racémica de compostos cis- $\beta$ -lactamas Ia e Ib mediante a formação de uma imina de fórmula geral:



por reacção de um aldeído de fórmula geral:

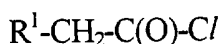


tal como o benzaldeído, com um derivado aminado de fórmula geral:



tal como a p-metoxianilina.

A imina assim preparada pode reagir depois com um cloreto de acilo de fórmula geral:



tal como um cloreto de  $\alpha$ -acetoxi-acetilo, para se obter uma mistura racémica de compostos cis- $\beta$ -lactama de fórmulas estruturais Ia e Ib. Esta última reacção pode ter lugar na presença de uma base, tal como a trietilamina, num solvente, tal como o cloreto de metileno, a uma temperatura da ordem de  $-20^\circ\text{C}$ , seguindo-se o aquecimento até  $25^\circ\text{C}$ .

Por sua vez, o procedimento descrito *supra* pode ser seguido por uma modificação da lactama formada, no caso de se desejar um material de partida que seja uma lactama diferente. Por exemplo, é possível tratar um racemato de cis-1-p-metoxifenil-3-acetoxi-4-fenilazetidina-2-ona, obtido conforme descrito antes, em acetonitrilo, a uma temperatura compreendida entre  $-10^\circ\text{C}$  e  $-5^\circ\text{C}$ , com uma solução de nitrato de amónio cérico em água para se obter um racemato de cis-3-acetoxi-4-fenilazetidina-2-ona. Por sua vez, este último composto ainda pode ser, por exemplo, hidrolisado, v.g. com uma solução aquosa de hidróxido de potássio, para se obter cis-3-hidroxi-4-fenilazetidina-2-ona.

É possível preparar uma mistura IV de material de partida que compreenda um racemato dos compostos IVa e IVb, em conformidade com métodos conhecidos pelos especialistas na matéria.

É possível obter misturas de partida diferentes das misturas racémicas, por exemplo, mediante a adição de um dos compostos Ia ou Ib a uma mistura racémica I, ou por adição de um dos compostos IVa ou IVb a uma mistura racémica IV, em quantidades que não sejam iguais.

As misturas de partida I ou IV podem conter, por exemplo, os diastereómeros dos compostos Ia e Ib ou IVa e IVb, embora seja preferível que os compostos sejam separados antes da execução dos métodos de resolução enzimática da presente invenção.

### Compostos preferidos

Os compostos cis de fórmula estrutural I possuem uma configuração estereoisomérica que é preferível quando tais compostos são utilizados como intermediários para a preparação de taxanos, tais como o taxol. São particularmente preferidos os compostos das misturas I e II que possuam a mesma configuração absoluta correspondente à de um composto Ia em que o símbolo  $R^1$  representa um grupo acetiloxi, o símbolo  $R^2$  representa um grupo fenilo e o símbolo  $R^3$  representa um átomo de hidrogénio, na configuração 3R,4S.

É preferível a resolução de  $\beta$ -lactamas de fórmula estrutural I.

Nos compostos da presente invenção o substituinte  $R^1$  é preferencialmente um grupo alcanoiloxi, por exemplo, um grupo alcanoiloxi insubstituído (v.g. acetiloxi) ou hidroxil; o substituinte  $R^2$  é preferencialmente um grupo fenilo ou um grupo fenilo substituído; e o substituinte  $R^3$  é preferencialmente um átomo de hidrogénio ou um grupo fenilo, fenilo substituído, tal como metoxifenilo ou hidroxifenilo, fenilcarbonilo, fenilcarbonilo substituído, alquilcarbonilo, alcenilcarbonilo ou alcoxicarbonilo, tal como t-butoxicarbonilo.

A maior preferência é para os compostos em que

$R^1$  é acetiloxi;

$R^2$  é fenilo;

$R^3$  é hidrogénio ou metoxifenilo;

$R^{1a}$  é acetiloxi; e

R<sup>1b</sup> é hidroxilo ou

em que

R<sup>1</sup> é hidroxilo;

R<sup>2</sup> é fenilo;

R<sup>3</sup> é hidrogénio;

R<sup>1a</sup> é acetiloxi; e

R<sup>1b</sup> é hidroxilo.

### Enzimas e microrganismos

A enzima utilizada ou o microrganismo utilizado nos métodos da presente invenção pode ser qualquer enzima ou qualquer microrganismo que tenha a capacidade de catalisar as conversões estereosselectivas, conforme aqui descrito. Há várias enzimas, tais como esterases, lipases e proteases, independentemente da sua origem ou grau de pureza, que são adequadas para efeitos de utilização na presente invenção. Por exemplo, a enzima pode ser obtida a partir de formas enzimáticas de origem animal ou vegetal, ou suas misturas, células de microrganismos, células desmembradas, extractos de células ou pode ser de origem sintética.

No que diz respeito à utilização de microrganismos, os métodos da presente invenção podem ser praticados utilizando qualquer material celular microbiano que tenha a capacidade de catalisar as conversões estereosselectivas, conforme aqui descrito. As células podem ser utilizadas na sua forma de células húmidas intactas ou células secas intactas, por exemplo, células liofilizadas, secas por micronização ou secas por via térmica. As células também podem ser utilizadas sob a forma de um material celular tratado, por exemplo, células desmembradas ou um extracto de células. As células ou os materiais celulares podem ser

utilizados no seu estado livre ou imobilizados sobre um suporte, por exemplo, por adsorção física ou por retinência.

Como exemplos de géneros de microrganismos adequados como fontes de enzimas catalisadoras refere-se os seleccionados entre *Mucor*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Trichoderma*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Proteus*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Brevibacterium*, *Geotrichum*, *Enterobacter*, *Chromobacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Methanobacterium*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Ophiobolus*, *Cladosporium* e não só. Também está prevista a utilização de células hospedeiras modificadas por técnicas da engenharia genética.

Os microrganismos específicos adequados para efeitos de utilização nos processo da presente invenção são seleccionados entre *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, tal como ATCC 31303, *Pseudomonas ovalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Alcaligenes faecalis*, *Streptomyces griseus*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa*, tal como ATCC 14830, *Geotrichum candidum*, tal como ATCC 32345, *Streptomyces clavuligerus*, *Nocardia erthropolis*, *Nocardia asteroides*, *Mycobacterium phlei*, *Agrobacterium radiobacter*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* e não só. É possível utilizar uma, duas ou várias espécies de microrganismos ao executar os processos da presente invenção.

O termo "ATCC", tal como aqui utilizado, designa o número de acesso da Colecção Americana de Culturas Tipo (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852) que é a entidade depositária do organismo assim designado.

Os métodos de resolução da presente invenção podem ser executados após o desenvolvimento do(s) microrganismo(s) utilizado(s), ou em simultaneidade com o seu crescimento,

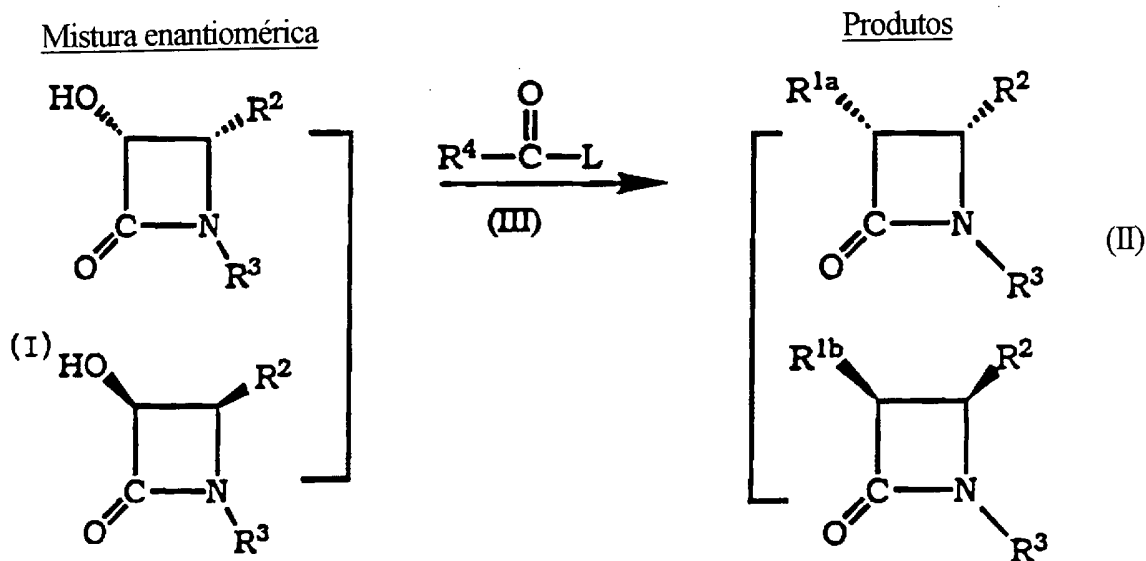
sendo neste último caso a fermentação e a resolução operações realizadas *in situ*. A criação dos microrganismos pode ser efectuada por um especialista na matéria, por exemplo, recorrendo à utilização de um meio conveniente que contenha nutrientes, tais como fontes de carbono e de azoto e oligoelementos.

Como exemplos de enzimas adequadas, comercialmente disponíveis, utilizáveis na presente invenção, refere-se as lipases, tais como Amano PS-30 (*Pseudomonas cepacia*), Amano GC-20 (*Geotrichum candidum*), Amano APF (*Aspergillus niger*), Amano AK (*Pseudomonas* sp.), Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Biocatalyst Ltd.), Amano Lipase P-30 (*Pseudomonas* sp.), Amano P (*Pseudomonas fluorescens*), Amano AY-30 (*Candida cylindracea*), Amano N (*Rhizopus niveus*), Amano R (*Penicillium* sp.), Amano FAP (*Rhizopus oryzae*), Amano Ap-12 (*Aspergillus niger*), Amano MAP (*Mucor meihei*), Amano GC-4 (*Geotrichum candidum*), Sigma L-0382 e L-3126 (pancrease dos porcos), Sigma L-3001 (germe de trigo), Sigma L-1754 (*Candida cylindracea*), Sigma L-0763 (*Chromobacterium viscosum*) e Amano K-30 (*Aspergillus niger*). Além disso, como exemplos de enzimas obtidas a partir de tecidos de animais, refere-se a esterase obtida a partir do fígado de porco, a  $\alpha$ -quimotripsina e a pancreatina obtidas a partir do pâncreas, tais como a Lipase Pancreática dos Porcos (da Sigma). É possível utilizar uma, duas ou várias enzimas ao praticar os processos da presente invenção.

As variantes preferenciais da presente invenção são melhor descritas nos esquemas de reacção seguintes. Apesar de estes esquemas de reacção ilustrarem, por razões de clareza, a resolução de determinadas misturas enantioméricas *cis*, faz-se observar que as variantes descritas se aplicam também à resolução de outras misturas enantioméricas da presente invenção.

Esquema I de Reacção

Resolução por esterificação

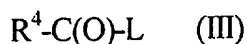


um dos substituintes  $R^{1a}$  ou  $R^{1b} = OH$ ; o outro =  $R^4-C(=O)-O-$

As misturas I podem ser esterificadas selectivamente conforme ilustrado no esquema de reacção I anterior.

(A) Acilação

A mistura I pode ser esterificada selectivamente para formar a mistura II e a mistura IV pode ser esterificada selectivamente para formar a mistura V, mediante a utilização de um agente de acilação de fórmula geral III:



Na fórmula geral III, o símbolo  $R^4$  pode representar um grupo alquilo, alcenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, cicloalcenilo ou heterociclo. Como substituintes  $R^4$  preferenciais na fórmula geral III refere-se os grupos alquilo, tais como os grupos alquilo( $C_1-C_6$ ), em especial o grupo metilo. O símbolo L representa um grupo removível que pode ser deslocado para formar um

grupo éster. Como exemplos de grupos L refere-se os átomos de halogénio e os grupos hidroxilo, alcoxi ou alceniloxi. Como grupos L preferíveis refere-se os grupos alceniloxi, mais preferencialmente os grupos alceniloxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), tais como os grupos CH<sub>2</sub>=CH-O e CH<sub>2</sub>=C(CH<sub>3</sub>)-O-. É possível utilizar qualquer agente de acilação de fórmula estrutural II que efectue a esterificação, sendo particularmente preferidos o acetato de isopropenilo e o acetato de vinilo.

Para a prática dos processos da presente invenção acrescenta-se um composto de fórmula geral III ao meio de reacção. As proporções molares preferidas, definidas pela razão composto III:compostos da mistura I, estão compreendidas entre cerca de 1:1 e cerca de 4:1.

As enzimas ou os microrganismos utilizados nos procedimentos da presente invenção são de preferência lipases ou esterases ou microrganismos capazes de produzir tais enzimas. Como enzimas, ou microrganismos, particularmente preferidas para utilização nestes processos refere-se as seleccionados entre Lipase P-30 de *Pseudomonas* sp., Lipase N de *Rhizopus niveus*, Lipase APF de *Aspergillus niger*, Lipase GC-20 de *Geotrichum candidum*, Lipase AK de *Pseudomonas* sp., Lipase AY-30 de *Candida* sp. e Lipase de *Pseudomonas fluorescens*.

Uma enzima pode ser utilizada, por exemplo, no seu estado livre ou numa forma imobilizada. Como variante preferencial da invenção refere-se o caso em que a enzima se encontra adsorvida sobre um veículo adequado, v.g. terras de diatomáceas ('Celite Hyflo Supercel' porosa), polipropileno microporoso (pó de polipropileno 'Enka Accurel<sup>®</sup>') ou num adsorvente polimérico não iónico tal como 'Amberlite<sup>®</sup> XAD-2' (polistireno) ou 'XAD-7' (poliacrilato) da empresa "Rohm and Haas Co.". No caso de se utilizar um veículo para se imobilizar uma enzima, então esse veículo pode regular o tamanho das partículas enzimáticas e pode impedir a agregação das partículas enzimáticas quando utilizado num solvente orgânico. A imobilização pode ser conseguida, por exemplo, efectuando a precipitação de uma solução aquosa da enzima com

acetona fria na presença de 'Celite Hyflo Supercel', seguindo-se uma secagem hipobárica, ou no caso de se utilizar um adsorvente polimérico não iónico, efectuando a incubação de soluções enzimáticas com o adsorvente numa revolvedora rotativa, removendo o excesso de solução e secando as resinas adsorventes da enzima, sob pressão hipobárica. De preferência, acrescenta-se a enzima à solução de reacção para se conseguir concentrações compreendidas entre cerca de 5 e cerca de 200 mg de enzima por cada mililitro (mL) de solvente. Embora seja desejável utilizar a mínima quantidade possível de enzima, a quantidade real de enzima que irá ser necessária vai variar em função da actividade específica da enzima utilizada.

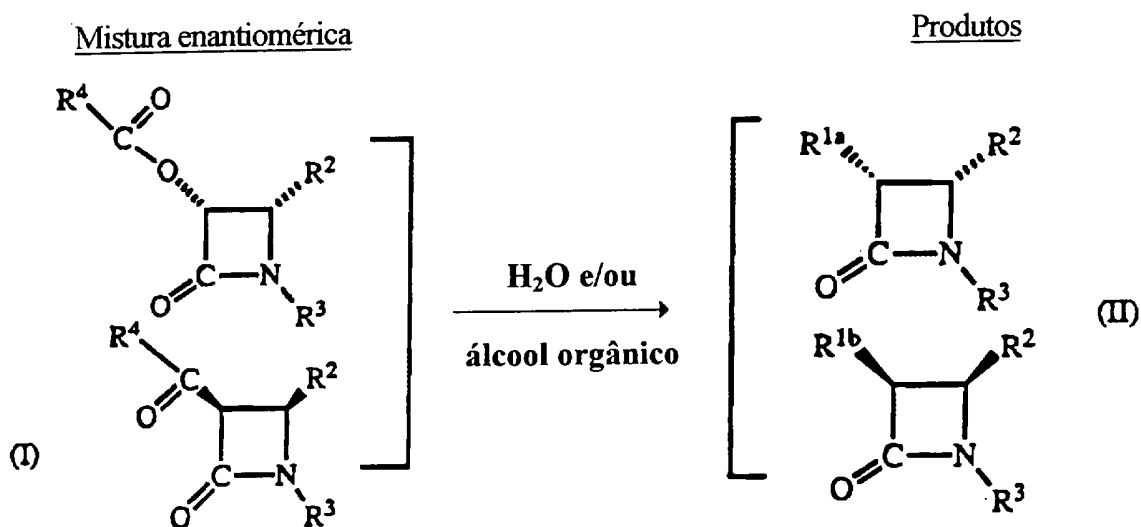
Estes processos também podem ser realizados utilizando células microbianas que contenham uma enzima que tenha capacidade para catalisar as conversões estereosselectivas. Quando se utiliza um microrganismo para efectuar a resolução, estes procedimentos são convenientemente executados acrescentando ao meio de reacção desejado as células e a mistura enantiomérica que constitui o material de partida. As células podem ser utilizadas sob a forma de células intactas, células secas, tais como células liofilizadas, secas por atomização ou secas por via térmica, células imobilizadas, ou células tratadas com solventes orgânicos, tais como a acetona ou o tolueno. As células também podem ser utilizadas sob a forma de um material celular tratado, por exemplo, células desmembradas ou extractos celulares. Também é possível utilizar extractos celulares imobilizados sobre produtos de polipropileno de tipo 'Celite<sup>®</sup>' ou 'Accurel<sup>®</sup>', conforme anteriormente descrito.

A incubação do meio de reacção realiza-se preferencialmente a uma temperatura compreendida entre cerca de 4°C e cerca de 60°C e mais preferencialmente realiza-se a uma temperatura compreendida sensivelmente entre 30°C e 50°C. O período de reacção pode variar convenientemente em função da quantidade de enzima utilizada e da sua actividade específica. Os

períodos de reacção típicos, à temperatura de 30°C para purezas ópticas de 98% e superiores, são pelo menos de cerca de 24 horas e podem ir até cerca de 72 horas no caso de conversões mais intensas e purezas ópticas mais altas, v.g. purezas ópticas superiores a 99,5%. É possível diminuir os períodos de reacção aumentando a temperatura de reacção e/ou aumentando a quantidade de enzima que é acrescentada à solução de reacção.

### Esquema II de Reacção

#### Resolução por hidrólise



um dos substituintes  $R^{1a}$  ou  $R^{1b} = R^4 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \text{O}-$ ; o outro = OH.

Conforme ilustrado no esquema II de reacção anterior, as misturas I podem ser hidrolisadas selectivamente para se obter as misturas II, utilizando água e/ou um álcool orgânico. Nos compostos enantioméricos de partida os grupos  $R^4$ , que fazem parte de  $R^1$ , são de preferência grupos alquilo e mais preferencialmente são grupos alquilo ( $C_1 - C_6$ ), tais como o grupo metilo.

Como álcool orgânico é possível utilizar um composto de fórmula geral IX:



em que o símbolo  $R^8$  representa um grupo alquilo, alcenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, cicloalcenilo ou um heterociclo, representando o símbolo  $R^8$ , de preferência, um grupo alquilo, tal como um grupo metilo. A utilização do álcool orgânico de fórmula geral IX pode dar origem à formação do subproduto éster de fórmula geral  $R^4-C(O)-OR^8$ . A utilização de água como agente de hidrólise pode dar origem à formação do subproduto ácido de fórmula geral  $R^4-C(O)-OH$ . Para se manter constante o valor do pH, à medida que vão sendo gerados subprodutos acídicos, pode ser acrescentada uma base, tal como um hidróxido de um metal alcalino. No caso de se utilizar um álcool orgânico IX acrescenta-se preferencialmente uma quantidade que dê origem a uma proporção molar entre composto IX:compostos de misturas I ou IV compreendida entre cerca de 1:1 e cerca de 4:1.

Nestes processos são utilizadas preferencialmente enzimas solúveis em água, capazes de catalisar a hidrólise estereosselectiva. São especialmente adequadas, nos processos da presente invenção, as lipases e as esterases e também a pancreatina e a  $\alpha$ -quimotripsina. É possível utilizar as formas impuras ou as formas purificadas destas enzimas, no seu estado livre ou imobilizadas num suporte. Nos processos da presente invenção são particularmente aconselháveis as enzimas Lipase PS-30 de *Pseudomonas* sp. (*Pseudomonas cepacia*) (Amano Int'l) (de preferência livre ou imobilizada numa resina, tal como um dos produtos XAD-7, XAD-2 ou Accurel<sup>®</sup>, conforme descrito *supra*), Lipase P-30 (Amano) de *Pseudomonas* sp., Lipase GC-20 de *Geotrichum candidum* ((Amano Int'l), Lipase N de *Rhizopus niveus* (Amano Int'l), Lipase APF de *Aspergillus niger* (Amano Int'l), Lipase AY-30 de *Candida* sp. (Amano), Lipase AK de *Pseudomonas* sp. (Amano Int'l), Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Biocatalyst Ltd.) e a Lipase Pancreática dos Porcinos (Sigma Chem.).

As hidrólises referidas antes são realizadas preferencialmente em meio aquoso tamponado ou não tamponado ou num sistema solvente bifásico constituído por uma fase orgânica, imiscível

com a água, e por uma fase aquosa. A utilização de um sistema solvente bifásico pode aumentar a eficiência de tais processos se o material do substrato for insolúvel em água.

Os solventes para a fase orgânica de um sistema solvente bifásico podem ser todos os solventes orgânicos imiscíveis com a água, tais como os seleccionados entre tolueno (que é preferível), ciclo-hexano, xileno, tricloro-trifluoroetano e não só. A fase aquosa é constituída convenientemente por água, de preferência água desionizada, ou pode ser constituída por uma solução aquosa tamponada conveniente, em especial uma solução com tampão fosfato. O sistema solvente bifásico contém preferencialmente entre cerca de 10% e 90% em volume de fase orgânica e entre cerca de 90% e cerca de 10% em volume de fase aquosa e mais preferencialmente contém exacta ou aproximadamente 20% em volume de fase orgânica e exacta ou aproximadamente 80% em volume de fase aquosa.

Considera-se particularmente preferencial um sistema de reacção constituído por um sistema solvente bifásico, conforme descrito *supra*, uma quantidade de mistura enantiomérica, que constitui o material de partida, compreendida entre cerca de 0,1 mg e cerca de 100 mg por cada mililitro (mL) de solvente bifásico, e uma ou várias enzimas numa quantidade compreendida entre cerca de 0,1 mg e cerca de 100 mg de enzima por cada miligrama (mg) de material de partida que se pretenda hidrolisar.

Num caso exemplificativo de tais processos, começa-se com a preparação de uma solução aquosa das enzimas que irão ser utilizadas. Por exemplo, é possível acrescentar a(s) enzima(s) preferida(s) a uma quantidade adequada de um solvente aquoso, tal como uma solução tamponada com fosfato, ou de tipo idêntico. De preferência, ajusta-se para cerca de 7,0 e assim se mantém o valor do pH desta mistura, utilizando para tal, preferencialmente, um hidróxido, um carbonato ou um bicarbonato de um metal alcalino em solução aquosa. De preferência recorre-se à

centrifugação a uma temperatura reduzida (v.g. 4°C) para se obter a parte aquosa do sistema solvente bifásico que contém a enzima. Depois forma-se e deixa-se arrefecer uma emulsão do material de partida enantiomérico num solvente orgânico e num solvente aquoso. A hidrólise enantiosselectiva pode ser efectuada acrescentando a esta emulsão o solvente aquoso que contém a enzima, de preferência sob agitação permanente e arrefecimento.

O período de reacção pode variar de enzima para enzima, mas os períodos de reacção vulgares estão compreendidos aproximadamente entre 24 horas e 72 horas, dependendo disso da temperatura e da concentração da enzima. De preferência são utilizadas temperaturas compreendidas entre cerca de 4°C e cerca de 60°C.

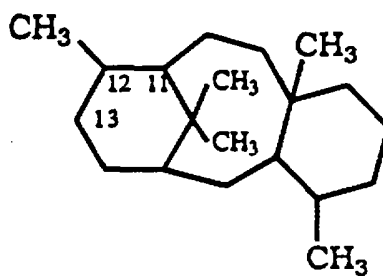
#### Separação

É possível isolar e purificar os produtos das conversões estereosselectivas, recorrendo a metodologias conhecidas, tais como a extracção, a destilação, a cristalização, a cromatografia em coluna e não só..

Um método preferido para efectuar a separação das misturas de produtos formadas pelos métodos da presente invenção consiste em repartir os compostos indesejados e os desejados da mistura que constitui o produto obtido entre dois ou vários líquidos imiscíveis em que tais compostos tenham solubilidades diferentes. É preferível utilizar água e um líquido orgânico imiscível com a água.

#### Utilidade

Os taxanos são diterpenos que contêm a estrutura de carbono do taxano:



estrutura essa que pode conter insaturações etilénicas nos seus sistemas anelares. São particularmente interessantes os taxanos que possuem a estrutura carbonada indicada anteriormente, em que as posições 11,12 estão ligadas por uma ponte etilénica e em que a posição 13 contém uma cadeia lateral, sendo tais taxanos exemplificados pelo taxol. Os taxanos farmacologicamente activos, tais como o taxol, podem ser utilizados como agentes antitumorais para tratar pacientes que padeçam de cancro, tais como o cancro do ovário, o melanoma, o cancro da mama, do cólon ou do pulmão e a leucemia.

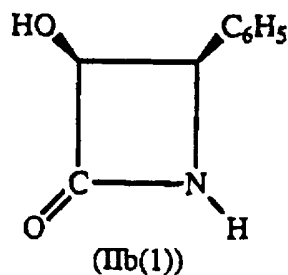
Os compostos resolvidos, obtidos pelos métodos da presente invenção, são particularmente úteis como intermediários na formação da já referida cadeia secundária na estrutura do taxano. A adição de tal cadeia lateral, em si mesma, pode conferir uma maior ou mais desejável actividade farmacológica ao produto de taxano, ou pode formar um produto de taxano que seja mais facilmente convertido num taxano que possua uma actividade farmacológica maior ou mais desejável do que a do composto de partida.

Os compostos resolvidos em conformidade com os métodos da presente invenção podem ser modificados antes de serem utilizados na formação da cadeia lateral. Por exemplo, os compostos resolvidos que contenham um grupo azida N<sub>3</sub>, enquanto substituinte W, podem ser tratados com um agente redutor para proporcionar um grupo amina que pode ser substituído.

Como exemplos de métodos para a formação da cadeia lateral e de produtos de taxano que podem ser formados utilizando tais métodos, refere-se os que vêm descritos nas patentes de



(-)-cis-3-hidroxi-4-fenil-2-azetidinona



Preparou-se uma mistura de reacção em 1 L de tampão de fosfato de potássio 25 mM a pH 7,0 contendo 8 g de substrato e 80 g de lipase PS-30 obtida a partir de *Pseudomonas* sp. (Amano International Co.). Efectuou-se a reacção à temperatura de 30°C, sob agitação a 150 rotações por minuto (r.p.m.). Durante a reacção manteve-se a mistura de reacção a um valor de pH 7,0 com NaOH 5N, utilizando para tal um dispositivo de estabilização do pH. A reacção de hidrólise foi verificada por cromatografia em líquido de elevado rendimento. Periodicamente, foram retiradas amostras de 1 mL e extraídas com 4 mL de acetato de etilo. Separou-se a camada de acetato de etilo, evaporou-se até à secura e procedeu-se a uma análise por CLER para pesquisa das concentrações do substrato e do produto e da pureza óptica do produto. Os resultados obtidos estão enumerados no quadro 1 seguinte.

Quadro 1

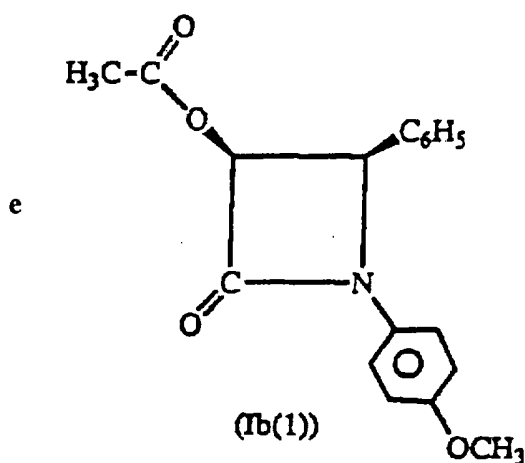
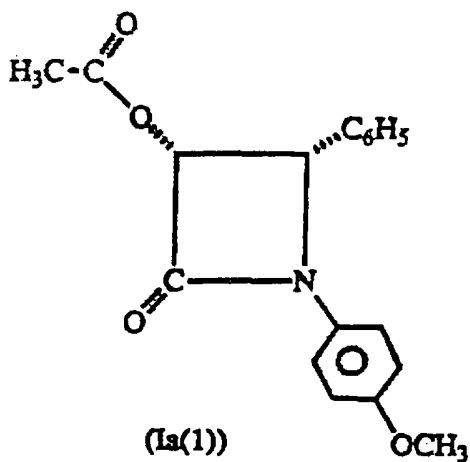
<u>Período de reacção</u> (horas)	<u>Conversão</u> (% de produto IIb)	<u>Rendimento</u> (% produto IIb)	<u>Pureza óptica percentual</u> (%) do produto IIa
24	13,5	86,5	--
48	28,0	72,0	--
72	40,0	60,0	--
96	51,0	49,0	>99,6

Uma mistura II em que o substituinte  $R^2$  é um grupo fenilo, o substituinte  $R^3$  é um átomo de hidrogénio, o substituinte  $R^{1a}$  é um grupo acetiloxi e o substituinte  $R^{1b}$  é um grupo hidroxilo, tal como aquela que foi preparada *supra*, pode ser separada por um processo de partição, uma vez que o composto IIb possui uma solubilidade em água superior à do composto IIa. Um procedimento particularmente preferido para a separação destes compostos a partir de uma mistura aquosa consiste nos passos seguintes: (1) extracção com acetato de etilo; (2) separação da camada orgânica e adição de heptano para formar uma mistura de acetato de etilo:heptano (a 1:1 em volume), seguindo-se duas lavagens com água (a 1:1 em volume, cada uma com  $H_2O$ :acetato de etilo/heptano). As camadas orgânicas obtidas no passo (2) contêm preferencialmente o composto IIa e nenhum composto IIb. É possível efectuar ainda outra separação destes compostos a partir das camadas aquosas, que podem conter pequenas quantidades de composto IIa, efectuando novas extracções com acetato de etilo/heptano seguindo-se as lavagens com soluções aquosas (tal como uma solução aquosa de NaCl a 5%-10% p/p ou somente com água).

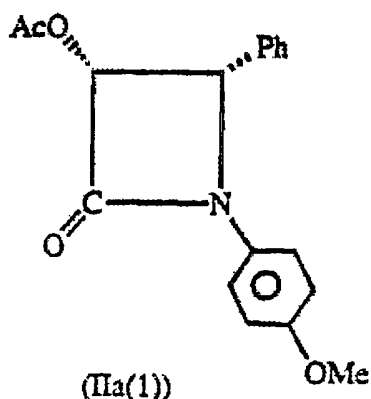
### Exemplo 2

#### Hidrólise estereosselectiva de ( $\pm$ )-1-(4-metoxifenil)-cis-3-acetoxi-4-fenil-2-azetidiona

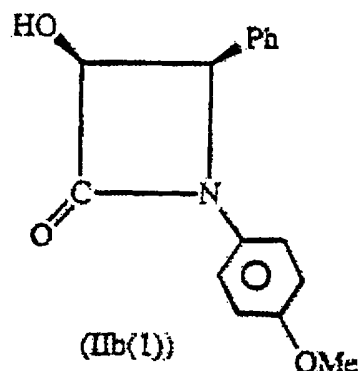
Substrato: o composto racémico em epígrafe, ou seja,



Produto:



e



Preparou-se uma mistura de reacção em 1 L de tampão de fosfato de potássio 25 mM a pH 7,0 contendo 8 g de substrato e 50 g de lipase PS-30 obtida a partir de *Pseudomonas* sp. (Amano International Co.). Efectuou-se a reacção à temperatura de 30°C, sob agitação a 150 r.p.m.. Durante a reacção manteve-se a mistura de reacção a um valor de pH 7,0 com NaOH 5N, utilizando para tal um dispositivo estabilizador do pH. A reacção de hidrólise foi verificada por cromatografia em líquido de elevado rendimento. Periodicamente, foram retiradas amostras de 1 mL e extraídas com 4 mL de acetato de etilo. Separou-se a camada de acetato de etilo, evaporou-se até à secura e procedeu-se a uma análise por CLER para pesquisa das concentrações do substrato e do produto e da pureza óptica do produto. Os resultados obtidos estão enumerados no quadro 2 seguinte.

Quadro 2

<u>Período de reacção</u> <u>(horas)</u>	<u>Conversão</u> <u>(% de produto IIb)</u>	<u>Rendimento</u> <u>(% de produto IIb)</u>	<u>Pureza óptica percentual</u> <u>(%) do produto IIa</u>
24	12	88	--
48	36	64	--
72	43	57	--
96	52	48	>99,7

### Exemplo 3

#### Hidrólise estereosselectiva de ( $\pm$ )-cis-3-acetoxi-4-fenil-2-azetidinona utilizando uma enzima imobilizada

O substrato utilizado e o produto obtido foram os referidos no exemplo 1 anterior.

#### Imobilização da enzima

Para os procedimentos de imobilização foram utilizados três veículos diferentes: XAD-7 (adsorvente polimérico não iônico de tipo Amberlite XAD-7, resina de poliacrilato de malha 20-60), XAD-2 (adsorvente polimérico não iônico de tipo Amberlite XAD-7, resina de polistireno de malha 20-60) e Accurel PP (resina de polipropileno de 200-400  $\mu$ m).

Dissolveu-se 10 g de lipase PS-30 impura, fornecida por Amano, em 25 mL de água destilada e centrifugou-se a 10000 r.p.m. durante 10 minutos para se obter um sobrenadante límpido. Colocou-se 1,3 g do veículo num frasco de 25 mL, lavou-se 5 vezes com metanol, adicionou-se a uma solução enzimática contida num balão e agitou-se suavemente numa revolvedora rotativa, à temperatura ambiente. A adsorção da enzima sobre o veículo foi verificada periodicamente por um ensaio com lipase (utilizando como substrato uma emulsão de azeite da Sigma) e pelas proteínas que ficaram no filtrado. Foram conseguidas eficiências de adsorção de 68%, 71% e 98% utilizando respectivamente as resinas XAD-7, XAD-2 e Accurel. Após a imobilização total (20 a 24 horas) filtrou-se a massa de veículo-enzima através de um filtro 'Millipore' e lavou-se o veículo com cerca de 300 mL de água destilada. Depois secou-se em estufa hipobárica, à temperatura ambiente, o veículo que continha a lipase imobilizada.

### Utilização da enzima imobilizada

Efectuou-se uma avaliação da enzima imobilizada em termos da reacção de hidrólise enzimática descrita no exemplo 1. Procedeu-se à preparação de misturas de reacção em recipientes com um volume de 20 mL (18 mL de tampão de fosfato de potássio 25 mM a pH 7,0 e 2 mL de tolueno), contendo 200 mg de substrato, tal como descrito no exemplo 1, e 200 mg da lipase PS-30 imobilizada, anteriormente preparada. As reacções decorreram conforme descrito no exemplo 1. Os resultados obtidos estão agrupados no quadro 3.

### Quadro 3

#### Avaliação da enzima imobilizada na reacção de hidrólise estereosselectiva

<u>Suporte imobilizado</u>	<u>Período de reacção (horas)</u>	<u>Conversão (% de produto IIb)</u>	<u>Rendimento (% de produto IIa)</u>	<u>Pureza óptica percentual (% do produto IIa)</u>
XAD-2	72	52	48	>99,5
XAD-7	72	53	47	>99,5
Accurel PP	72	51	49	>99,5

### Exemplo 4

#### Hidrólise estereosselectiva de ( $\pm$ )-cis-3-acetoxi-4-fenil-2-azetidinona, variando a lipase utilizada

O substrato utilizado e o produto obtido foram os referidos no exemplo 1 anterior. Neste exemplo foram realizadas diversas reacções em que foram utilizadas lipases obtidas a partir de fontes diferentes.

Em cada reacção a correspondente mistura, em 20 mL de tampão de fosfato de potássio 25 mM a pH 7,0, continha 1 g de lipase impura e 50 mg de substrato. As reacções decorreram

à temperatura de 25°C, utilizando um dispositivo de estabilização do pH regulado para o valor de pH 7,0. Os resultados obtidos estão agrupados no quadro 4 seguinte.

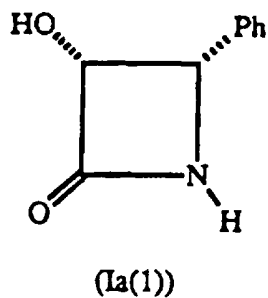
Quadro 4

<u>Enzima</u>	<u>Fonte</u>	<u>Conversão</u>	<u>Rendimento</u>	<u>Pureza óptica</u>
		(%) IIb	(%) IIa	percentual (%) IIa
Lipase P-30 de <i>Pseudomonas</i> sp.	Amano Int.	69	31	>99,5
Lipase GC20 de <i>Geotrichum candidum</i>	Amano Int.	60	40	100
Lipase N de <i>Rhizopus niveus</i>	Amano Int.	70	30	>99,5
Lipase APF de <i>Aspergillus niger</i>	Amano Int.	80	20	>99,5
Lipase AY-30 de <i>Candida</i> sp.	Amano Int.	65	35	100
Lipase AK de <i>Pseudomonas</i> sp.	Amano Int.	63	37	100
Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Biocatalyst Ltd.	64	36	>99,5
Lipase Pancreática dos Porcos	Sigma Chem.	65	35	99,0

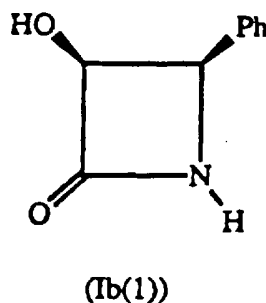
Exemplo 5

Acetilação (esterificação) estereosselectiva de (±)-cis-3-hidroxi-4-fenil-2-azetidinona

Substrato: o composto racémico em epígrafe, ou seja,

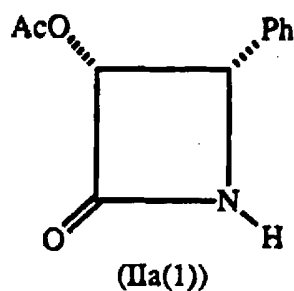


e



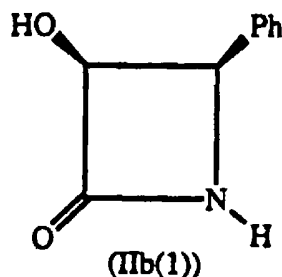
Produto:

(+)-cis-3-acetoxi-4-fenil-2-azetidinona



e

(-)-cis-3-hidroxi-4-fenil-2-azetidinona



Neste exemplo foram realizadas diversas reacções em que foram utilizadas lipases obtidas a partir de fontes diferentes.

Em cada reacção a correspondente mistura, em 25 mL de tolueno, continha 1 g de lipase impura, 100 mg de substrato, 800 mg de acetato de isopropenilo e 0,05% de água. As reacções decorreram à temperatura de 30°C e a 100 r.p.m. numa revolvedora rotativa. Os produtos e os substratos foram analisados por CLER. Os resultados obtidos estão agrupados no quadro 5 seguinte.

Quadro 5

<u>Enzima*</u>	<u>Fonte</u>	<u>Conversão</u> (%) IIa	<u>Pureza óptica</u> percentual (%) IIa
Lipase P-30	Amano Int.	48	>99,2
Lipase GC-20	Amano Int.	42	>99,1
Lipase AY-30	Amano Int.	36	>98,0
Lipase N	Amano Int.	32	>98,5

\* Ver o quadro 4 anterior para informações sobre a fonte dos microrganismos.

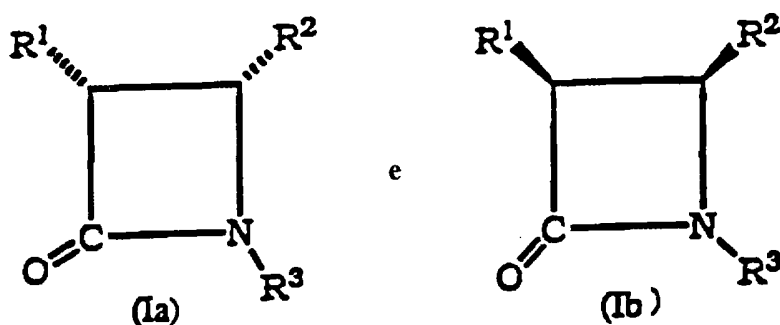
Lisboa, 12 de Setembro de 2000  
O AGENTE OFICIAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL

*João Carlos de Barros*

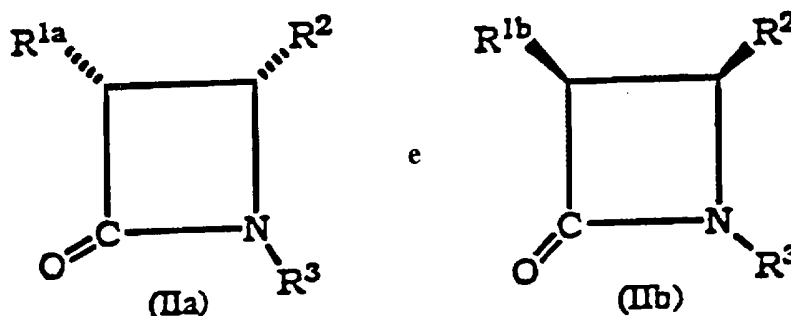
JOÃO CARLOS SARDIÑA DE BARROS  
Agente Oficial de Propriedade Industrial  
Praça Duque da Terceira, 24-3º - 1200 LISBOA  
Telefone: 213424504 - Fax: 213424531

## Reivindicações

1. Método para a resolução de uma mistura I que compreende os enantiómeros Ia e Ib, em que o substituinte  $R^1$  se encontra em posição cis relativamente ao substituinte  $R^2$ , tanto na fórmula Ia como na fórmula Ib, ou em que o substituinte  $R^1$  se encontra em posição trans relativamente ao substituinte  $R^2$ , tanto na fórmula Ia como na fórmula Ib:



para se obter uma mistura II constituída pelos compostos de fórmulas IIa(1) e IIb(1):



em que

o símbolo  $R^1$  representa um grupo hidroxil ou um grupo de fórmula geral  $-O-C(O)-R^4$ ;

o símbolo  $R^2$  representa um grupo arilo, alquilo, alcenilo ou alquinilo;

o símbolo  $R^3$  representa um átomo de hidrogénio ou um substituinte de uma das fórmulas gerais  $R^4$ ,  $-C(O)-OR^4$  ou  $-C(O)-R^4$ ;

e o símbolo  $R^4$  representa um grupo alquilo, alcenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, cicloalcenilo ou um heterociclo;

o qual compreende os seguintes passos (i) ou (ii):

(i) no caso de

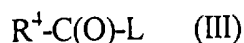
o símbolo  $R^1$  representar um grupo de fórmula geral  $-O-C(O)-R^4$  e o substituinte  $R^4$  ser seleccionado independentemente entre os grupos enunciados a propósito do substituinte  $R^4$  anterior e um dos substituintes  $R^{1a}$  ou  $R^{1b}$  ser igual ao substituinte  $R^1$  e o outro dos substituintes  $R^{1a}$  ou  $R^{1b}$  ser um grupo hidroxilo,

então realiza-se o passo que consiste em fazer contactar a referida mistura I, na presença de água e/ou de um álcool orgânico, com uma enzima hidrolase de éster carboxílico ou com um microrganismo que possua uma enzima hidrolase de éster carboxílico, em que a referida enzima catalisa a hidrólise estereosselectiva da referida mistura I para proporcionar a referida mistura II; ou

(ii) no caso de

o símbolo  $R^1$  representar um grupo hidroxilo e um dos substituintes  $R^{1a}$  ou  $R^{1b}$  ser um grupo hidroxilo e o outro dos substituintes  $R^{1a}$  ou  $R^{1b}$  ser um grupo de fórmula geral  $R^4-C(O)-O-$  e o substituinte  $R^4$  ser seleccionado independentemente entre os grupos enunciados a propósito do substituinte  $R^4$  anterior,

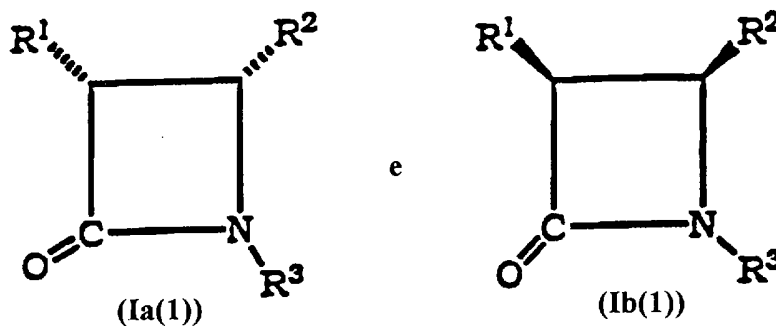
então realiza-se o passo que consiste em fazer contactar a referida mistura I, na presença de um composto de fórmula estrutural III:



em que o símbolo  $R^4$  possui as significações definidas antes a propósito dos substituintes  $R^{1a}$  ou  $R^{1b}$  e o símbolo L representa um grupo removível, com uma enzima hidrolase de éster carboxílico ou com um microrganismo que contenha uma enzima hidrolase de éster carboxílico, em que a referida enzima catalisa a hidrólise estereosselectiva da referida mistura I

para proporcionar a referida mistura II.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que se utiliza uma mistura I constituída por Ia(1) e Ib(1):



em que

o símbolo R<sup>1</sup> representa um grupo alcanoiloxi ou hidroxi;

o símbolo R<sup>2</sup> representa um grupo fenilo ou um grupo fenilo substituído; e

o símbolo R<sup>3</sup> representa um átomo de hidrogénio ou um grupo fenilo, fenilo substituído, fenil-carbonilo, fenil-carbonilo substituído ou terc-butoxi-carbonilo, em que o radical fenilo substituído é um grupo fenol substituído por um átomo de halogénio ou por um grupo hidroxilo ou alcoxi.

3. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 2, em que o símbolo L representa um átomo de halogénio ou um grupo hidroxi, alcoxi ou alceniloxi.

4. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 2,

em que

R<sup>1</sup> é acetiloxi;

R<sup>2</sup> é fenilo;

R<sup>3</sup> é hidrogénio ou metoxifenilo;

R<sup>1a</sup> é acetiloxi; e

R<sup>1b</sup> é hidroxilo.

5. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3,

em que

R<sup>1</sup> é hidroxilo;

R<sup>2</sup> é fenilo;

R<sup>3</sup> é hidrogénio;

R<sup>1a</sup> é acetiloxi; e

R<sup>1b</sup> é hidroxilo.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que o composto de fórmula geral III é o acetato de isopropenilo.

7. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que a enzima é uma esterase, uma lipase ou uma protease.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que a referida lipase é seleccionada entre lipase PS-30 de *Pseudomonas* sp., lipase P-30 de *Pseudomonas* sp., lipase GC-20 de *Geotrichum candidum*, lipase N de *Rhizopus niveus*, lipase APF de *Aspergillus niger*, lipase AY-30 de *Candida* sp., lipase AK de *Pseudomonas* sp., lipase de *Pseudomonas fluorescens* e lipase pancreática dos porcos.

9. Método de acordo com a reivindicação 7, em que a enzima é uma lipase PS-30 de *Pseudomonas* sp..
10. Método de acordo com a reivindicação 7, em que a enzima é uma lipase seleccionada entre lipase PS-30 de *Pseudomonas* sp., lipase GC-20 de *Geotrichum candidum*, lipase AY-30 de *Candida* sp. e lipase N de *Rhizopus niveus*.
11. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que o substituinte R<sup>1</sup> se encontra em posição cis relativamente ao substituinte R<sup>2</sup>, tanto na fórmula Ia como na fórmula Ib.
12. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que o substituinte R<sup>1</sup> se encontra em posição trans relativamente ao substituinte R<sup>2</sup>, tanto na fórmula Ia como na fórmula Ib.
13. Método de acordo com a reivindicação 11, em que a mistura I é constituída por (±)-cis-3-acetoxi-4-fenil-2-azetidiona ou (±)-1-(4-metoxifenil)-cis-3-acetoxi-4-fenil-2-azetidiona ou (±)-cis-3-hidroxi-4-fenil-2-azetidiona.
14. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que os compostos não enantioméricos obtidas são ainda separados mediante a execução de um passo de separação.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que o referido passo de separação é um passo de extracção, destilação, cristalização ou cromatografia em coluna.
16. Método de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que um composto obtido por tal método é utilizado para a preparação de um taxano.
17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o referido taxano é o taxol.

Lisboa, 12 de Setembro de 2000

O AGENTE OFICIAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL

*João Carlos de Barros*

**JOÃO CARLOS SARDINHA DE BARROS**  
Agente Oficial de Propriedade Industrial  
Praça Duque da Terceira, 24-33 - 1200 LISBOA  
Telefone: 213424504 - Fax: 213424531