



(11) Número de Publicação: **PT 1504021 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C07J 73/00** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2003.05.07**

(30) Prioridade(s): **2002.05.10 HU 0201584**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.02.09**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.07.12**  
**011/2006**

(73) Titular(es):

**RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR R.T.**  
**GYOMROI UT 19-21 1103 BUDAPEST X** **HU**

(72) Inventor(es):

**ISTVÁN BARTHO** **HU**  
**MÓNKA HERINE BERTA** **HU**  
**TAMÁS DEVENYI** **HU**  
**GÁBOR HANTOS** **HU**  
**KATALIN OLASZ** **HU**

(74) Mandatário:

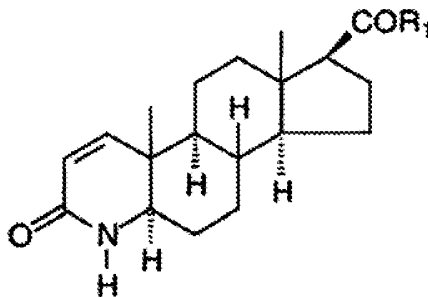
**MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA**  
**RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A DESIDROGENAÇÃO DE COMPOSTOS DE AZA-ANDROSTANO**

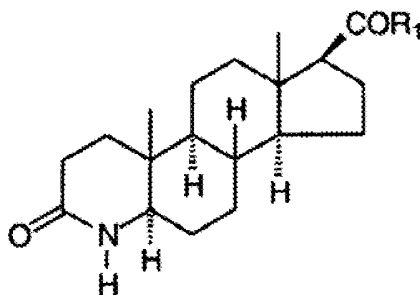
(57) Resumo:

## RESUMO

### "PROCESSO PARA A DESIDROGENAÇÃO DE COMPOSTOS DE AZA-ANDROSTANO"



(I)



(II)

A invenção relaciona-se com um processo para a produção de compostos de fórmula geral (I), em que R<sub>1</sub> é um grupo -NH-terc-butilo ou um grupo 4-metil-piperidino, por bioconversão de compostos de fórmula geral (II), em que R<sub>1</sub> é como descrito acima, utilizando um biocatalisador possuindo actividade enzimática esteróide- $\Delta^1$ -desidrogenase, em que a actividade da enzima necessária para a bioconversão é produzida por indução.

### DESCRIÇÃO

## **"PROCESSO PARA A DESIDROGENAÇÃO DE COMPOSTOS DE AZA-ANDROSTANO"**

### Área da Invenção

A presente invenção relaciona-se com um novo processo para a desidrogenação de compostos de aza-androstano.

### Técnica Relacionada

Os 4-aza-esteróides são inibidores específicos bem conhecidos da enzima testosterona 5 $\alpha$ -redutase. De acordo com dados anteriormente publicados é evidente que a introdução da ligação dupla na posição C-1,2 da molécula é necessária para se obter o efeito desejado.

Existem métodos sintéticos e bioquímicos para introduzir uma ligação dupla na posição C-1,2 de 4-aza-esteróides.

Um dos métodos de síntese é a introdução da ligação dupla  $\Delta^1$  com anidrido benzenosselénico em clorobenzeno à ebulição (por exemplo, Patente nº EP 155 096).

Alternativamente, a desidrogenação pode ser realizada com quinonas (por exemplo, 2,3-dicloro-5,6-diciano-benzoquinona) na presença de agentes de sililação (por exemplo, bis-trimetil-sililtrifluoro-acetamida) (Patente nº EP 298 652).

Segundo os processos descritos nas EP 428 366 e EP 655 459 pode utilizar-se o derivado 2-halogéneo de um esteróide como um intermediário para introduzir a ligação dupla C-1,2. A Patente nº CA 2 271 974 descreve um processo no qual a ligação dupla  $\Delta^1$  é introduzida num aza-esteróide utilizando um composto 2,2-dibromo-aza-esteróide como um intermediário.

Num outro processo, os derivados 2-halogéneo são preparados a partir do composto 4-aza não substituído apropriado via um intermediário trialquilsilil-trifluorometanossulfonato com iodo ou cloreto de trimetilsililo e iodo (Patente nº EP 473 226). O composto  $\Delta^1$  desejado é obtido a partir deste derivado 2-halogéneo-4-aza com terc-butóxido de potássio em solução em dimetilformamida com um rendimento de aproximadamente 60%.

Estes métodos de síntese requerem condições reacionais extremamente agressivas que possuem várias desvantagens. Em primeiro lugar, formam-se impurezas. Em segundo lugar, as impurezas, embora produzidas em concentração baixa (inferior a 0,1%), não estão caracterizadas e algumas podem ser tóxicas. Além disso, alguns dos reagentes utilizados são cancerígenos, inflamáveis, exigem condições completamente anidras ou são extremamente corrosivos e, por conseguinte, são perigosos para o ambiente.

Em contraste, as condições requeridas pelos métodos bioquímicos para desidrogenação em  $\Delta^1$  são suaves e produzem menos produtos secundários que são menos perigosos para o ambiente. Consequentemente é menos provável a formação de

compostos tóxicos. Além disso, em vez de dois passos de síntese, a transformação pode ser realizada num único passo.

Apesar da desidrogenação de esteróides em  $\Delta^1$  ser bem conhecida na literatura (*Microbial Transformations of Steroids*, Charney, W., Herzog, H. L., Academic Press, New York, London, (1967)), existem muito poucos exemplos da introdução microbiológica de uma ligação dupla na posição C-1,2 de aza-esteróides, provavelmente devido ao efeito antibacteriano bem conhecido dos aza-esteróides (*J. Bacteriol.*, 93(2), 627-35 (1967); *Steroids*, 27(4), 525-41 (1976); *Chem. Ind.*, 52, 1660-1 (1970)).

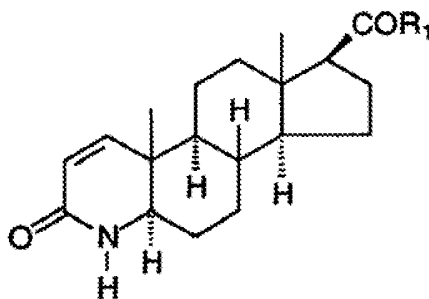
A introdução microbiana de uma ligação dupla  $\Delta^1$  em compostos 12a-aza foi conseguida com estirpes de *Nocardia sp.* e *Arthrobacter sp.* (Mazur et al., *J. Org. Chem.*, 28(9), 2442-3 (1963)). De acordo com Mazur et al., a conversão de 12a-aza-C-homo-1,4-pregnadieno-3,12,20-triona poderia ser realizada a uma concentração de 0,29 g/L com um rendimento de 62%; a conversão de 12a-aza-17 $\alpha$ -hidroxi-C-homo-1,4-pregnadieno-3,12,20-triona poderia ser realizada a uma concentração de 0,17 g/L com um rendimento de 17%; e a conversão de 12a-aza-C-homo-5 $\alpha$ -pregn-1-eno-3,12,20-triona poderia ser realizada a uma concentração de 0,29 g/L com um rendimento de 26%.

De modo semelhante, foram utilizadas estirpes de *Arthrobacter sp.* e *Nocardia sp.* para desidrogenar em  $\Delta^1$  o substrato 17-N-terc-butilcarbamoil-4-aza-androstan-3-ona a uma concentração de 0,1-1,0 g/L com um rendimento de 20-80% (Patente n° EP 786 011). Neste método, induziu-se as

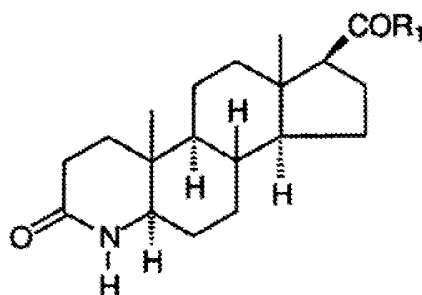
enzimas  $\Delta^1$ -desidrogenases das estirpes anteriores através da adição de hidrocortisona, suspendeu-se a biomassa separada num tampão (pH=6-8) saturado com solvente orgânico e efectuou-se a bioconversão na presença de menadiona ou metossulfato de fenazina. A bioconversão foi realizada num volume pequeno. No único exemplo descrito a conversão foi realizada durante 3 dias num volume de 20 ml a uma concentração de substrato de 0,26 g/L com um rendimento de 60%. No entanto, para aplicação à escala industrial, tem de se determinar o nível de concentração apropriado e aumentar a escala do procedimento. Segundo as nossas experiências, a conversão cai drasticamente quando se procede ao aumento de escala deste procedimento. Deste modo é essencial que se efectue uma modificação fundamental deste processo para a sua aplicação industrial.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O objectivo da presente invenção é proporcionar um processo de bioconversão que evite as desvantagens dos métodos totalmente sintéticos e que permita a sua realização industrial. Mais especificamente, a invenção relaciona-se com um processo para a produção de compostos de fórmula geral (I), em que  $R_1$  é um grupo -NH-terc-butilo ou um grupo 4-metil-piperidino, por bioconversão de compostos da fórmula geral (II), em que  $R_1$  é como descrito acima, utilizando um biocatalisador com actividade enzimática esteróide- $\Delta^1$ -desidrogenase, em que a actividade da enzima necessária para a bioconversão é gerada por indução.



(I)



(II)

Numa forma de realização preferida, a presente invenção abrange um método para produzir um composto de fórmula I, compreendendo os passos:

a) preparar uma cultura de um biocatalisador ou um extracto de um biocatalisador;

b) adicionar à cultura ou ao extracto um indutor da actividade esteróide- $\Delta^1$ -desidrogenase;

c) adicionar à cultura ou ao extracto um transportador de electrões, um estabilizante e um composto de fórmula II;  
e

d) incubar a cultura ou o extracto durante um período de tempo suficiente para que ocorra a bioconversão do composto de fórmula II no composto de fórmula I.

Noutra forma de realização preferida, a presente invenção abrange um método para produzir um composto de fórmula I, compreendendo os passos de:

a) preparar uma cultura de um biocatalisador ou um extracto de um biocatalisador, em que a referida cultura ou extracto tem um volume de pelo menos cerca de 1 L;

b) adicionar à cultura ou ao extracto um indutor da actividade esteróide- $\Delta^1$ -desidrogenase;

c) adicionar à cultura ou ao extracto um transportador de electrões, um estabilizante, um agente de complexação ou emulsionante e um composto de fórmula II; e

d) incubar a cultura ou o extracto durante um período de tempo suficiente para que ocorra a bioconversão do composto de fórmula II no composto de fórmula I.

Noutra forma de realização preferida, a presente invenção abrange um método para produzir um composto de fórmula I, compreendendo os passos de:

a) preparar uma cultura de um biocatalisador ou um extracto de um biocatalisador;

b) adicionar à cultura ou ao extracto um indutor da actividade esteróide- $\Delta^1$ -desidrogenase;

c) adicionar à cultura ou ao extracto um transportador de electrões a uma concentração de cerca de 0,05 até cerca de 3,5 g/L e um estabilizante a uma concentração de cerca de 0,01 até cerca de 0,1 g/L e um composto de fórmula II; e

d) incubar a cultura ou o extracto durante um período de tempo suficiente para que ocorra a bioconversão do composto de fórmula II no composto de fórmula I;



na condição de que não seja adicionada uma armadilha de oxigénio à cultura ou extracto.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção relaciona-se com um processo para a produção de compostos de fórmula geral (I), em que  $R_1$  é um grupo -NH-terc-butilo ou um grupo 4-metil-piperidino, por bioconversão de compostos de fórmula geral (II), em que  $R_1$  é como se descreveu acima, utilizando um biocatalisador com actividade enzimática esteróide- $\Delta 1$ -desidrogenase, através da indução da actividade da enzima, conservação da actividade da enzima ao nível necessário através da adição de um estabilizante, promoção da dissolução contínua do substrato através da adição de um agente de complexação e finalização da conversão através da adição de um transportador de electrões.

O termo bioconversão é definido como a conversão do composto (II) no composto (I) através da utilização de um biocatalisador de modo a ser produzida pelo menos uma quantidade mensurável de composto (I).

O termo biocatalisador é definido como qualquer microrganismo que possui ou pode ser induzido a possuir actividade enzimática esteróide- $\Delta 1$ -desidrogenase. Os exemplos de biocatalisadores incluem, mas não se limitam a bactérias, fungos e células de animais. O método da invenção pode ser realizado com os métodos mencionados acima e com métodos conhecidos para preparar um biocatalisador (por exemplo, células intactas, extractos sem células, preparações imobilizadas daqueles). Por

exemplo, pode utilizar-se células intactas de *Arthrobacter simplex* através da incubação de uma cultura submersa num meio líquido contendo uma fonte de carbono, de um modo preferido glucose a uma concentração de 1-15 g/L, uma fonte de azoto, tal como extracto de levedura a uma concentração de 1-10 g/L e sais inorgânicos. Incuba-se a cultura a 25-38 °C, de um modo preferido a 35 °C, durante 20-72 horas. Adiciona-se em seguida uma solução contendo o(s) agente(s) indutor(es) da actividade da enzima esteróide- $\Delta 1$ -desidrogenase. Será evidente para os especialistas na técnica que o processo da invenção pode ser realizado com outros biocatalisadores com actividade esteróide- $\Delta 1$ -desidrogenase, tais como células vivas ou células intactas em repouso, lisados celulares e preparações livres ou imobilizadas (*J. Am. Chem. Soc.*, 108, 6732, (1986); *Chem. Rev.*, 92, 1071-1140 (1992)).

Pode utilizar-se estirpes de *Arthrobacter sp.* e *Nocardia sp.* nos métodos da invenção. Além disso, apesar dos aza-esteróides terem um efeito antibacteriano, nós constatamos surpreendentemente que, para além das *Arthrobacter sp.* e *Nocardia sp.*, as estirpes pertencentes aos géneros *Bacillus* e *Mycobacterium* foram capazes de desidrogenar os 4-aza-esteróides em  $\Delta 1$ . As estirpes específicas que podem ser utilizadas incluem, mas não se limitam a *Arthrobacter simplex* (ATCC 6946), *Bacillus subtilis* (NRRL B-558), *Bacillus sphaericus* (ATCC 7054), *Bacillus lentus* (ATCC 13805), *Nocardia corallina* (ATCC 4275) e *Mycobacterium sp.* (NRRL B-3683). A produção de extractos sem células de esteróide- $\Delta 1$ -desidrogenase, assim como a imobilização de células intactas ou de extractos sem células de todas estas estirpes está extremamente

disseminada na literatura (*J. Am. Chem. Soc.*, 108, 6732, (1986); *Chem. Rev.*, 92, 1071-1140 (1992)).

A actividade da enzima  $\Delta^1$ -desidrogenase é induzida por um método conhecido, tal como a adição de hidrocortisona. Outros indutores que podem ser utilizados incluem, mas não se limitam à prednisolona, prednisona, cortisona e androsta-1,4-dieno-3,17-diona. No entanto, a actividade da enzima diminui ao longo do tempo devido ao consumo da coenzima ou à actividade de enzimas proteolíticas. Pode utilizar-se vários métodos conhecidos para manter a actividade da enzima; tal como a modificação química ou imobilização da enzima, empacotamento da enzima numa cápsula de lipossoma e a utilização de aditivos (derivados de açúcar, polióis, ésteres, aminoácidos, proteínas, dextrinas, lecitina, DMSO). *World Biotech. Rep.*, 1, 379-390 (1984); Patente nº JP 62-096084; *Biotechnol. Bioengineer.* 75, 615-618 (2001); Patentes nº JP 96196330, JP 89185636, JP 86253336.

Na ausência de um agente de indução, a actividade da enzima  $\Delta^1$ -desidrogenase pode diminuir. Para compensar esta diminuição é necessário adicionar mais agente de indução. Para uma bioconversão que prossiga durante vários dias, o agente de indução tem de ser adicionado continuamente para manter a concentração necessária do agente de indução.

A indução da enzima pode ser efectuada por qualquer método conhecido, tal como por adição de uma solução metanólica de hidrocortisona à cultura a uma concentração de cerca de 10 até cerca de 100 mg/L. Uma vez que a hidrocortisona é enzimaticamente degradada, o seu efeito de

indução diminui continuamente. Deste modo é necessário adicionar repetidamente hidrocortisona (ao todo 2,7 g/L) para manter a actividade enzimática elevada necessária para a bioconversão. A frequência da adição de hidrocortisona depende da velocidade de degradação enzimática da hidrocortisona. De um modo preferido, a hidrocortisona é administrada uma vez por dia.

De acordo com um método mais preferido, a indução pode ser realizada através da adição de esteróides que sejam resistentes à degradação pelas enzimas bacterianas, tal como 9 $\alpha$ -hidroxilase, e que sejam substratos da enzima  $\Delta^1$ -desidrogenase, ou que já possuam uma ligação dupla  $\Delta^1$ , a uma concentração de cerca de 10 até cerca de 100 mg/L.

Surpreendentemente, nós tivemos resultados excelentes com o processo de bioconversão adicionando, após a indução da actividade enzimática  $\Delta^1$ -desidrogenase, um estabilizante para manter o nível apropriado de enzima, adicionando um agente de complexação para promover a dissolução contínua do substrato e adicionando um transportador de electrões conhecido para tornar a bioconversão completa.

Constatou-se que os compostos que não podem induzir a actividade da enzima  $\Delta^1$ -desidrogenase podem estabilizar as enzimas já presentes no sistema e conservar a sua actividade  $\Delta^1$ -desidrogenase por um período de tempo prolongado sem qualquer outra intervenção. O 5 $\alpha$ -androstanodiol ou o seu derivado 17-metilo, a 13-etil-gon-4-eno-3,17-diona ou o seu derivado acetoxilo ou hidroxilo, a 9,11-desidro-hidrocortisona ou o seu derivado acetato, a

estr-4-eno-3,17-diona ou o seu derivado acetoxilo ou 11 $\alpha$ -hidroxilo, e a 13-etil-10,11 $\alpha$ -di-hidroxi-gon-4-eno-3,17-diona, os quais são adicionados para estabilizar a enzima, podem conservar a actividade quando adicionados numa concentração final de cerca de 10 até cerca de 100 mg/L. O estabilizante mais preferido de todos é a 13-etil-10,11-di-hidroxi-gon-4-eno-3,17-diona, o qual mantém o efeito de indução a uma concentração de 50 mg/L durante dias, tendo-se observado que não há perda da actividade desidrogenase durante 3-5 semanas quando a cultura é conservada a 5-12 °C.

A grande maioria dos esteróides são pouco solúveis em água. No entanto, a adição de um substrato esteróide dissolvido num solvente orgânico não proporcionaria uma biodisponibilidade suficiente no sistema de bioconversão. Assim, pode utilizar-se emulsionantes ou agentes de complexação no método da presente invenção para aumentar a acessibilidade biológica do substrato nas bioconversões realizadas em sistemas aquosos. Pode utilizar-se um emulsionante, tal como polioxietileno-sorbitano-monooleato (por exemplo, TWEEN-80) (Patente n° HU 216 874) a uma concentração de cerca de 0,5 até cerca de 4 g/L. Outros emulsionantes que podem ser utilizados incluem, mas não se limitam às TEGIN® e TAGAT® (Goldschmidt Chemical Corp.). Alternativamente, pode utilizar-se vantajosamente um agente de complexação, por exemplo,  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas e derivados de ciclodextrinas (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 556-559 (1990); "Cyclodextrins and their Industrial Uses" ed. D. Duchene, Editions de Sante, Paris, (1987); *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 393-399 (2002); Patente

nº RU 2 039 824). Um outro agente de complexação que pode ser utilizado é o TAMOL® (BASF).

No processo da presente invenção, pode adicionar-se ciclodextrina e derivados de ciclodextrina ao meio a uma concentração de cerca de 1 até cerca de 50 g/L. São preferidas as metil- $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Um derivado de ciclodextrina é definido como uma ciclodextrina modificada por uma ou mais unidades de acordo com o que a ciclodextrina modificada mantém a aptidão para actuar como um agente de complexação. As unidades que podem ser utilizadas incluem metilo, dimetilo, metilo aleatório, carboxi-metilo e succinilo.

Uma vez que a conversão enzimática do substrato de fórmula geral (II) no produto de fórmula geral (I) é uma reacção de equilíbrio, utiliza-se transportadores de electrões, tais como naftoquinona, menadiona, bissulfito de menadiona e metossulfato de fenazina para efectuar a conversão e para aumentar a velocidade da reacção, de acordo com o processo da invenção. De um modo preferido, utiliza-se bissulfito de menadiona a uma concentração de cerca de 0,05 até cerca de 3,5 g/L, de um modo mais preferido a uma concentração de pelo menos 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 ou 2,0 g/L, de um modo ainda mais preferido a uma concentração de cerca de 3,1 g/L. A adição pode ser realizada num lote ou em várias porções, mas é de um modo preferido efectuada em quatro porções. De um modo preferido, o transportador de electrões é adicionado em intervalos de 18-24 horas.

Refira-se que este elemento do processo da invenção é extremamente surpreendente, uma vez que aumentando a quantidade do transportador de electrões em duas ordens de grandeza relativamente à quantidade habitual, a velocidade de conversão pode ser aumentada consideravelmente, sem que se utilize outros aditivos para eliminar as espécies de oxigénio tóxicas produzidas. O conceito preconcebido, publicado era de que a utilização de quantidades maiores de transportador de electrões levariam à formação de derivados tóxicos de oxigénio que teriam de ser eliminados por armadilhas de oxigénio. Ver o processo descrito na Patente US nº 4 749 649.

A aplicação individual de qualquer um dos três elementos desta invenção (estabilizante, agente de complexação, transportador de electrões) origina um aumento de 10-15% na bioconversão relativamente ao observado na sua ausência. No entanto, surpreendentemente, a utilização combinada de todos eles não origina um simples efeito aditivo mas um efeito sinérgico que resulta numa bioconversão de mais do que 90%. Embora a bioconversão possa ser realizada em qualquer volume, a presente invenção é vantajosamente realizada num volume de pelo menos 1 L, de um modo preferido pelo menos 5 L.

A bioconversão pode ser realizada durante um período de tempo suficiente para que ocorra pelo menos uma quantidade mensurável de bioconversão, de um modo preferido durante pelo menos 24 horas, de um modo mais preferido pelo menos 72 horas.

A actividade da cultura induzida pode ser aumentada por métodos conhecidos, por exemplo, produzindo uma concentração celular elevada. Isto pode ser conseguido através da adição de nutrientes, inoculação repetida ou separação das células e ressuspendendo-as num volume pequeno. As células podem ser ressuspendidas numa solução tampão de pH 6-8, numa solução tampão saturada com solvente orgânico ou em meio fresco. De acordo com um método preferido, as células são separadas e ressuspendidas num meio fresco contendo os ingredientes supramencionados de modo a alcançar uma concentração de cinco até dez vezes. O substrato de fórmula geral (II) é adicionado a esta cultura de actividade elevada numa solução etanólica, a uma concentração de cerca de 0,2 até cerca de 2 g/L, de um modo preferido a cerca de 1 g/L de concentração final.

Os exemplos que se seguem são ilustrativos, mas não restritivos, dos métodos da presente invenção. Outras modificações e adaptações adequadas da diversidade de condições e parâmetros normalmente encontrados na química de síntese e na bioconversão e os quais são óbvios para os especialistas na técnica estão dentro do espírito e âmbito da invenção.

O teor de princípio activo nos produtos cristalinos obtidos nos exemplos que se seguem foi determinado por HPLC.

As condições da medição foram as seguintes:

Coluna: LiChroCART 250-4, LiChrospher 100 CN (5  $\mu$ m)

Eluente: tetra-hidrofurano : água = 30:60



Caudal: 0,7 ml/min

Volume de injeção: 20 µL

Deteção: UV, 210 nm

Temperatura: 60 °C

#### EXEMPLO 1

Manteve-se uma cultura de *Arthrobacter simplex* (ATCC 6946) em meio sólido com a composição seguinte:

Ingrediente	g/L
Produto de digestão triptica de caseína	10
Extracto de levedura	1
NaCl	5
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,25
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,07
Agar	20
Ajustou-se o pH até 7,1-7,2, esterilizou-se a 121°C durante 40 minutos	

Incubou-se o meio inoculado a 32 °C durante 4 dias, armazenou-se em seguida a 4-10 °C durante mais 30 dias para iniciar as culturas. Para produzir culturas vegetativas, lavou-se um agar e transferiu-se para 100 mL de meio com a seguinte composição, a qual foi esterilizada num Erlenmeyer de 500 mL:

Ingrediente	g/L
Extracto de levedura (Quest)	5,4
Dextrose	3
Ajustou-se o pH a 6,7-6,8 com solução de NaOH a 10%	
Esterilizou-se a 121°C durante 30 minutos	

Incubou-se a cultura a 32 °C durante 24 horas num agitador rotativo a 200 rpm, transferiu-se em seguida para 5 L de meio com a seguinte composição, o qual foi esterilizado num fermentador de recipiente com 9 L de capacidade:

Ingrediente	g/L	Notas
Dextrose	2	Esterilizada separadamente numa solução aquosa a 500 g/L, adicionada antes da inoculação
Extracto de levedura (Quest)	8	
NH <sub>4</sub> Cl	10,9	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,25	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,75	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,38	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,29	
Antiespumante Struktol SB2020	0,062	
Esterilizado a 121°C durante 40 minutos		
Ajustou-se o pH após esterilização a 6,1-6,2 com solução de NaOH a 20%		

A cultura foi realizada a 35 °C a 200 rpm e com um caudal de ar de 40 L/h. A produção da enzima  $\Delta^1$ -desidrogenase foi induzida após 20 horas de cultura através da adição de 500 mg de hidrocortisona dissolvida em metanol. Após 8 horas da indução, centrifugou-se a cultura a 4800 rpm, rejeitou-se o sobrenadante e suspendeu-se os aproximadamente 100 mL de concentrado de células em 500 mL de meio fresco. Repetiu-se esta operação oito vezes dando na totalidade 4 L de biocatalisador.

A bioconversão foi realizada no recipiente fermentador mencionado acima a 30 °C a 250 rpm e com um caudal de ar de 60 L/h.

Induziu-se uma segunda vez a formação da enzima  $\Delta^1$ -desidrogenase através da adição de 250 mg de hidrocortisona. Após 2 horas, adicionou-se 250 mg de 13-etil-10,11 $\alpha$ -di-hidroxi-gon-4-eno-3,17-diona numa solução metanólica.

A dissolução do substrato foi promovida através da adição de 120 g de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Adicionou-se à mistura 800 mg do substrato 17 $\beta$ -terc-butilcarbamoil-4-aza-androstan-3-ona numa solução etanólica.

Após a adição do substrato, adicionou-se 8 g de bissulfito de menadiona, um transportador de electrões, em quatro porções de 2 g cada, após intervalos de 19, 20 e 24 horas, respectivamente. Após adição de cada porção do transportador de electrões aumentou-se o caudal de ar em 20% relativamente ao original: proporcionando níveis de oxigénio dissolvido de 21, 25, 30 e 36% da saturação do ar. Após 72 horas de bioconversão extraiu-se a cultura com um volume equivalente de clorofórmio e concentrou-se a camada orgânica à secura.

Obteve-se 1315 mg de produto cristalino em bruto, que continha 755 mg de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona (94,4% de conversão). O teor de princípio

activo no produto cristalino obtido foi determinado por HPLC como se descreveu acima.

#### EXEMPLO 2

Aplicou-se o processo descrito no Exemplo 1, mas utilizou-se 800 mg de 4-metil-1-[(5 $\alpha$ :17 $\beta$ )-3-oxo-4-aza-androstano-17-il]-carbonil]-piperidina como substrato.

Obteve-se 1422 mg de produto cristalino em bruto, o qual continha 488 mg de 4-metil-1-[(5 $\alpha$ ,17 $\beta$ )-3-oxo-4-aza-androst-1-eno-17-il]-carbonil-piperidina como produto (61% de conversão).

#### EXEMPLO 3

Aplicou-se o processo descrito no Exemplo 1 para cada um dos estabilizantes seguintes: 5 $\alpha$ -androstanodiol e o seu derivado 17-metilo, 13-etil-4-goneno-3,17-diona e os seus derivados acetoxilo e 11 $\alpha$ -hidroxilo, 9,11-desidro-hidrocortisona e o seu derivado acetato, 4-estren-3,17-diona e os seus derivados acetoxilo e 11 $\alpha$ -hidroxilo.

Os produtos cristalinos em bruto obtidos (pela ordem dos compostos acima) foram: 1315, 1611, 1665, 1412, 1189, 1653, 1312, 1425, 1222, 1345 mg; os quais continham 611, 288, 318, 555, 297, 411, 428, 371, 387, 424 mg de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona, respectivamente. Estes correspondem a 76, 36, 40, 69, 37, 51, 54, 46, 48, 53% de conversão, respectivamente.

## EXEMPLO 4

Preparou-se uma cultura de microrganismos de *Mycobacterium sp.* (NRRL B-3683) por métodos do estado anterior da técnica, aplicou-se então o processo descrito no Exemplo 1 para se efectuar a bioconversão.

Obteve-se 1616 mg de produto cristalino em bruto, o qual continha 36 mg de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona (4,5% de conversão).

## EXEMPLO 5

Preparou-se uma cultura de microrganismo de *Bacillus subtilis* (NRRL B-558) por métodos do estado anterior da técnica, aplicou-se então o processo descrito no Exemplo 1 para se efectuar a bioconversão.

Obteve-se 1325 mg de produto cristalino em bruto, o qual continha 14,4 mg de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona (1,8% de conversão).

## EXEMPLO 6

A uma cultura de microrganismos *Arthrobacter simplex* (ATCC 6946) (80 L, densidade óptica de 18-25), a qual foi preparada por métodos do estado anterior da técnica, adicionou-se 8 g de hidrocortisona numa solução metanólica para se efectuar a indução da enzima  $\Delta^1$ -desidrogenase.

A fermentação foi realizada a 35 °C com 200 rpm e um caudal de ar de 960 L/h. A formação ocasional de espuma foi

suprimida através da adição do agente antiespumante Struktol SB2020.

Utilizou-se uma cultura de 5000-8000 U/L de actividade para iniciar a desidrogenação de di-hidrofinasteride. Arrefeceu-se a cultura induzida até 30 °C e adicionou-se 80 g de di-hidro-finasteride em 800 ml de etanol. Ajustou-se o pH até 7,5-7,7 através da adição de soluções de NaOH a 200 g/L ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 100 g/L, enquanto se mantinham constantes a agitação e o caudal de ar. Uma vez concluída a conversão extraiu-se a cultura com acetato de etilo e isolou-se o produto por métodos conhecidos.

Obteve-se 166 g de produto cristalino em bruto, o qual continha 6,8 g de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona (8,5% de conversão).

#### EXEMPLO 7

Aplicou-se o processo descrito no Exemplo 6, mas a formação da enzima  $\Delta^1$ -desidrogenase foi estabilizada para além da indução. A hidrocortisona, a qual é o indutor mais vantajoso da enzima, pode ser metabolizada pela cultura de elevada densidade celular, e isto pode levar à inactivação gradual da enzima já formada. De acordo com as nossas experiências esta inactivação foi evitada adicionando, para além da hidrocortisona, 6 g de 13-etil-10,11 $\alpha$ -di-hidroxi-gon-4-eno-3,17-diona, a qual é não indutora por si só, em solução metanólica no início da indução.

Obteve-se 138 g de produto cristalino em bruto, o qual continha 24,96 g de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona (31,2% de conversão).

#### EXEMPLO 8

Aplicou-se o processo descrito no Exemplo 6, mas antes da adição do substrato adicionou-se 6000 g de solução de 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina a 40% (p/p) esterilizada para promover a dissolução do substrato.

Obteve-se 177 g de produto cristalino em bruto, o qual continha 13,8 g de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona (11,1% de conversão).

#### EXEMPLO 9

Aplicou-se o processo descrito no Exemplo 6, mas após a adição do substrato adicionou-se 64 g de bissulfito de menadiona em 360 ml de água esterilizada, como um transportador de electrões.

Obteve-se 121 g de produto cristalino em bruto, o qual continha 22,3 g de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona (17,8% de conversão).

#### EXEMPLO 10

Aplicou-se o processo descrito no Exemplo 6, mas adoptou-se também os métodos descritos nos exemplos 7 e 8.

Obteve-se 169 g de produto cristalino em bruto, o qual continha 43,8 g de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona (35% de conversão).

#### EXEMPLO 11

Aplicou-se o processo descrito no Exemplo 6, mas adoptou-se também os métodos descritos nos Exemplos 7 e 9.

Obteve-se 151 g de produto cristalino em bruto, o qual continha 35 g de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona (28% de conversão).

#### EXEMPLO 12

Aplicou-se o processo descrito no Exemplo 6, mas adoptou-se também os métodos descritos nos Exemplos 8 e 9.

Obteve-se 187 g de produto cristalino em bruto, o qual continha 27,5 g de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona (22% de conversão).

#### EXEMPLO 13

Aplicou-se o processo descrito no Exemplo 6, mas adoptou-se também os métodos descritos nos Exemplos 7, 8 e 9.

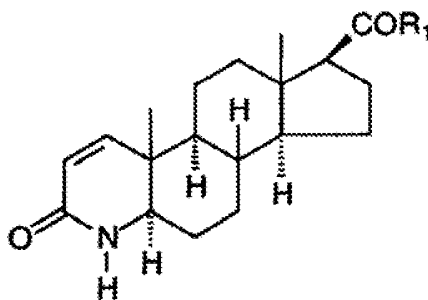
Obteve-se 154 g de produto cristalino em bruto, o qual continha 64 g de 17 $\beta$ -terc-butil-carbamoil-4-aza-androst-1-eno-3-ona (80% de conversão).

Lisboa, 25 de Setembro de 2006



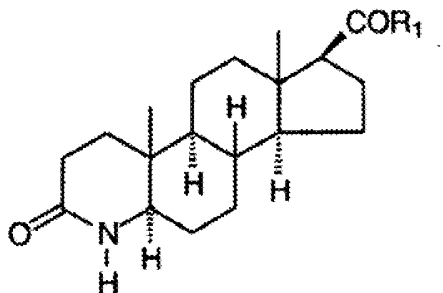
## REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um composto de fórmula I



(I)

em que R<sub>1</sub> é o grupo -NH-terc-butilo ou 4-metil-piperidino por bioconversão de compostos de fórmula II



(II)

- em que R<sub>1</sub> é o grupo -NH-terc-butilo ou 4-metil-piperidino - por meio de um biocatalisador possuindo actividade esteróide- $\Delta^1$ -desidrogenase; utilizando um indutor de enzima caracterizado por se adicionar um estabilizante para manter o nível apropriado da enzima, adicionar um agente de complexação para promover a dissolução contínua do substrato e

adicionar um transportador de electrões conhecido para melhorar a bioconversão.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o referido biocatalisador é uma bactéria seleccionada do grupo constituído por *Arthrobacter* e *Nocardia*.
3. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que a referida bactéria é a *Arthrobacter simplex*.
4. Processo de acordo com a reivindicação 1-3, em que o referido biocatalisador é uma bactéria seleccionada do grupo constituído por *Bacillus* e *Mycobacterium*.
5. Processo de acordo com a reivindicação 1-4, em que o referido indutor é hidrocortisona.
6. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que a referida hidrocortisona é utilizada a uma concentração de cerca de 10 até cerca de 100 mg/L.
7. Processo de acordo com a reivindicação 1-6, em que o referido transportador de electrões é seleccionado do grupo constituído por naftoquinona, menadiona, bissulfito de menadiona e metossulfato de fenazina.
8. Processo de acordo com a reivindicação 7, em que o referido transportador de electrões é adicionado a uma concentração de cerca de 0,05 até cerca de 3,5 g/L.
9. Processo de acordo com a reivindicação 1-8, em que o referido estabilizante é seleccionado do grupo

constituído por 5 $\alpha$ -androstandiol ou o seu derivado de 17-metilo, 13-etil-gon-4-eno-3,17-diona ou o seu derivado de acetoxilo ou hidroxilo, 9,11-desidro-hidrocortisona ou o seu derivado de acetato, estr-4-en-3,17-diona ou o seu derivado de acetoxilo ou hidroxilo e 13-etil-10,11 $\alpha$ -di-hidroxi-gon-4-eno-3,17-diona.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9, em que o referido estabilizante é a 13-etil-10,11 $\alpha$ -di-hidroxi-gon-4-eno-3,17-diona
11. Processo de acordo com a reivindicação 9 e 10, em que o referido estabilizante é adicionado a uma concentração de cerca de 10 até cerca de 100 mg/L.
12. Processo de acordo com a reivindicação 1-11, em que o referido agente de complexação é uma ciclodextrina ou um derivado de ciclodextrina seleccionado do grupo constituído por  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina, metil- $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.
13. Processo de acordo com a reivindicação 1-12, em que o referido agente de complexação é hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a uma concentração de cerca de 1 até cerca de 50 g/L.

Lisboa, 25 de Setembro de 2006