

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102010901894793A1

Publication Date

20120530

Applicant

MENARINI INTERNATIONAL OPERATIONS LUXEMBOURG S.A.

Title

PROCESSO PER LA PREPARAZIONE DEL NEBIVOLOLO.

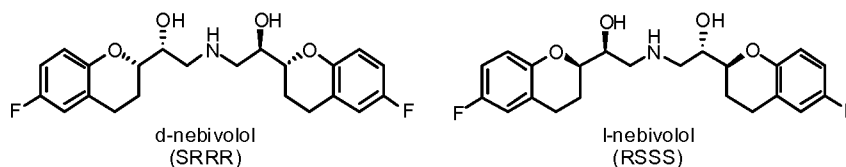
BI4267R

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:
 " Processo per la preparazione del Nebivololo"
 a nome di Menarini International Operations
 Luxembourg S.A.

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda un nuovo processo per la sintesi del Nebivololo.

Il Nebivololo è una miscela racemica dei due enantiomeri [2S[2R[R[R]]]] α,α' -[imino-bis (methylene)] bis[6-fluoro-chroman-2-methanol] e [2R[2S[S[S]]]] α,α' -[imino-bis (methylene)] bis[6-fluoro-chroman-2-methanol] (Figura 1).



nebivolol

Figura 1

In particolare si riporta la risoluzione enzimatica del cromanyl estere di partenza (**1**) attraverso il trattamento con un enzima stereoselettivo appartenente alla famiglia delle esterasi in forma nativa o ricombinante, anche ottenibile dal microorganismo *Ophiostoma novo-ulmi*.

Gli esteri ed acidi così ottenuti possono essere convertiti, con metodi noti all'uomo dell'arte, nei corrispondenti epossidi "semichirali", ovvero le coppie (RR+RS, **4**) ed (SS+SR, **5**) di Schema (1).

A loro volta, i componenti di ciascuna coppia possono essere separati sfruttando la loro diversa reattività con la benzilammina in un solvente costituito da un alcool terziario. In queste condizioni di risoluzione cinetica gli epossidi RS ed SR verranno convertiti nei corrispondenti prodotti di apertura (**6** ed **8**), mentre gli epossidi RR ed SS rimarranno inalterati.

L'eossido RR(**7**) viene poi separato dall'ammina RS (**6**) e l'eossido SS (**9**) viene separato dall'ammina SR (**8**) con metodi noti all'uomo dell'arte e preferenzialmente per cristallizzazione del componente basico.

Quindi l'ammina RS viene fatta reagire con l'eossido SS per ottenere l'l-benzilnebivololo.

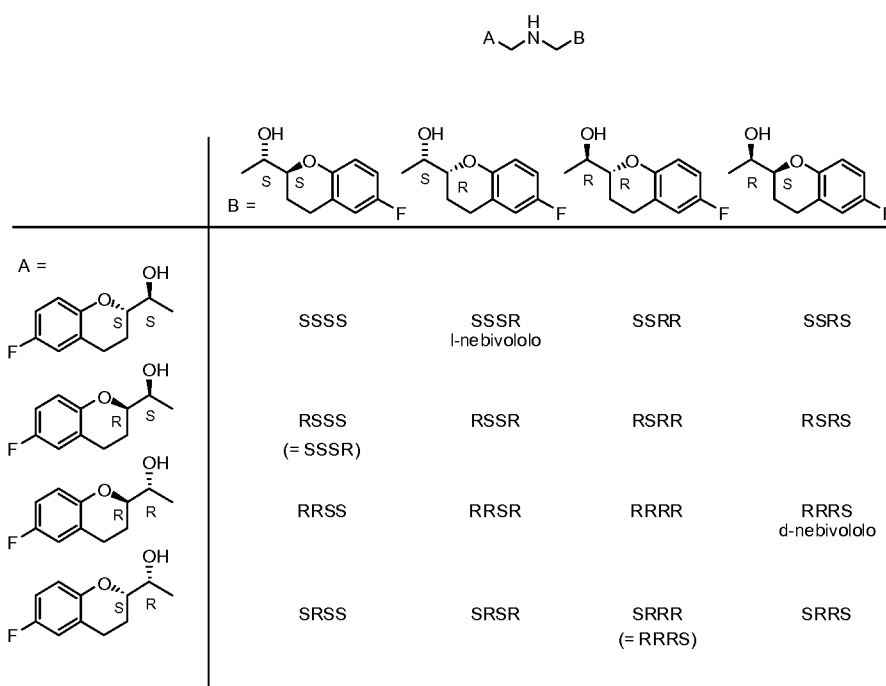
Analogamente l'ammina SR viene fatta reagire con l'epossido RR per ottenere il d-benzilnebivololo. L'l- ed il d-benzil nebivololo così ottenuti vengono uniti in quantità equimolari, cristallizzati e convertiti in nebivololo HCl secondo metodi noti all'uomo dell'arte.

STATO DELL'ARTE

Nebivololo è noto come un antagonista dei recettori beta adrenergici, un agente anti-ipertensivo, un inibitore dell'aggregazione delle piastrine ed un agente vasodilatatore.

Nebivololo ha proprietà basiche e può essere convertito in una forma farmaceutica accettabile di sale per trattamento con un acido. Il sale idrocloruro è la forma commercializzata.

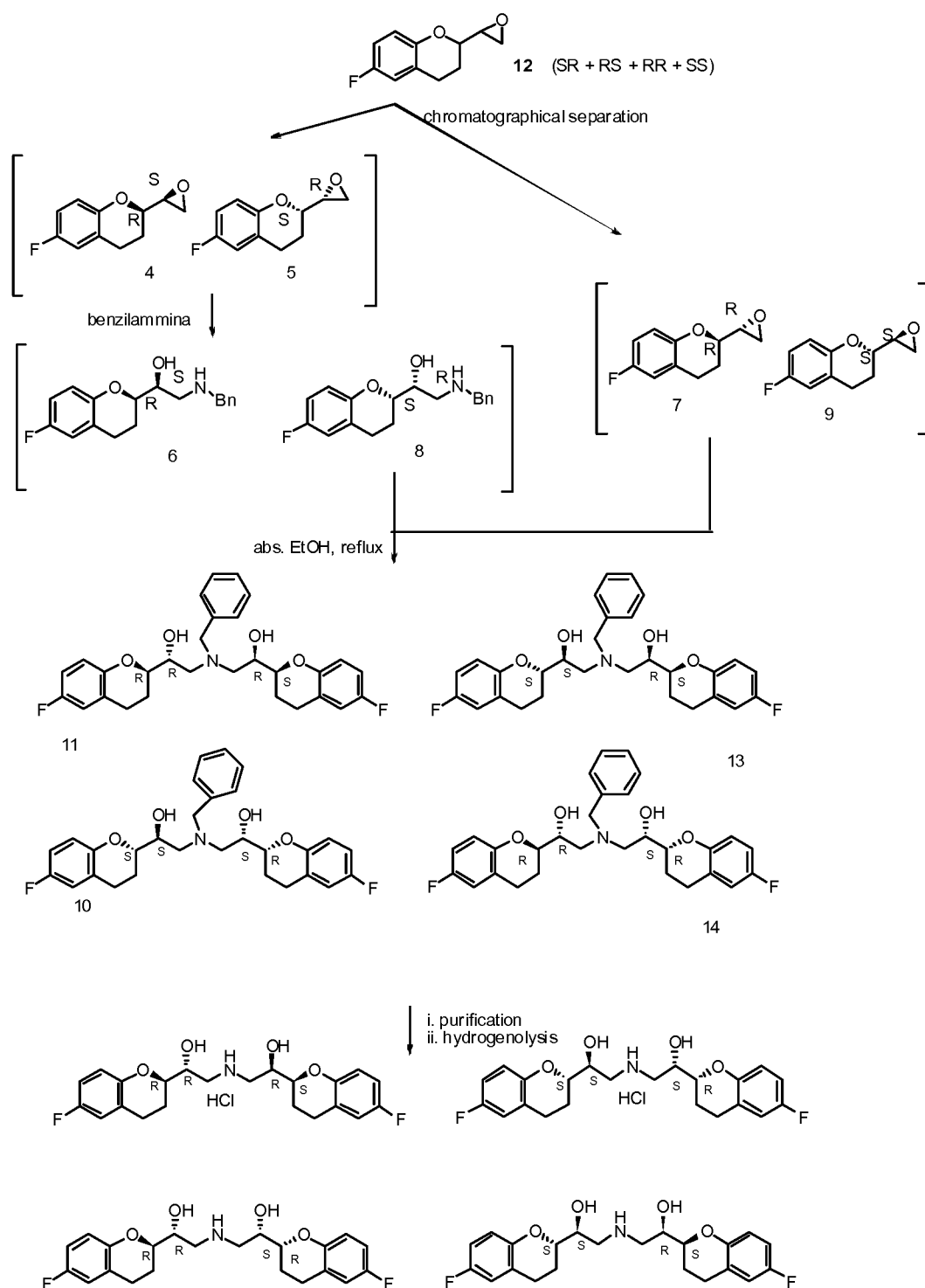
Nebivololo contiene quattro centri asimmetrici e quindi sono possibili in via teorica 16 stereoisomeri. Comunque, data la particolare struttura della molecola (la presenza di un asse di simmetria), si possono formare effettivamente solo 10 stereoisomeri (Schema 2).



Schema 2. Possibili stereoisomeri per il nebivololo

Data la simmetria della molecola, si ha infatti che
 RSSS = SSSR, RRSS = SSRR, SRSS = SSRS, RRSR = RSRR,
 SRSR = RSRS e RRRS = SRRR.

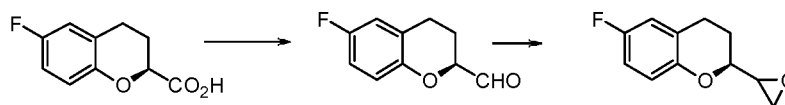
Il brevetto US Patent No 4,654,362 (EP 0145067, Janssen) descrive la sintesi di prodotti della serie del Nebivololo con l'uso degli epossidi isomeri come intermedi chiave nella sintesi. I prodotti sono ottenuti talvolta in miscela e talvolta enantiopuri senza definire la configurazione assoluta. In particolare l'esempio 84 di detto brevetto descrive l'ottenimento di una miscela di isomeri come definito nello schema 3.



Schema 3

Questi vengono separati con una colonna cromatografica nei due epossidi racemi (RS/SR, **4/5**) ed (RR/SS, **7/9**). Seguono l'apertura di una coppia di epossidi (**4 + 5**) con la benzilammina e l'uso dei prodotti di tale reazione (**6 + 8**) per aprire la seconda coppia di epossidi (**7 + 9**). Questa operazione porta alla produzione dei 4 diastereoisomeri benzilati (**10-14**).

EP 0334429 (Janssen) descrive lo stesso processo riportato in EP 0145067 ma con maggiori dettagli sperimentali e con l'attenzione centrata alla preparazione di un singolo isomero del neбиволolo. In questo caso specificamente l'acido 6-fluorochroman carbossilico viene risolto nei singoli enantiomeri per trattamento con (+)-dehydroabiethylamine. I singoli enantiomeri così ottenuti sono convertiti nei corrispondenti epossidi semichirali secondo il seguente schema sintetico (mostrato l'isomero S):



Schema 4

Viene descritta una sintesi stereoselettiva dell'isomero [2R, α S, 2'S, α' S]- α , α' -[iminobismethylene]bis[6-fluoro-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-methanol].

Il metodo di risoluzione degli esteri acidi utilizzato soffre di numerosi difetti per quello che concerne la sua applicazione industriale. Vengono infatti introdotti dei passaggi in più (formazione dell'ammide, cristallizzazione frazionata, idrolisi dell'ammide) ed in aggiunta la resa globale è piuttosto bassa. La miscela di epossidi diastereoisomeri così ottenuta viene passata su HPLC preparativo per isolare l'isomero a chiralità desiderata.

Hetero Drugs Limited, in WO 2006/016376 e nel successivo WO 2007/083318, descrive metodi di cristallizzazione frazionata applicati a livello della miscela diastereoisomerica (**10**, **11**, **13**, **14**) del benzyl nebivololo che portano, anche in questo caso, allo scarto di circa il 50% del materiale di partenza legato alla necessità di allontanare i diastereoisomeri non voluti.

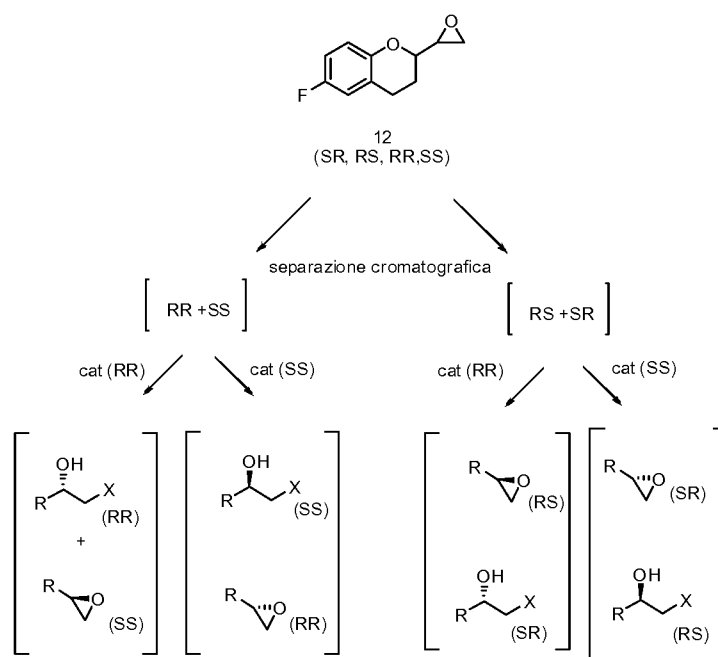
WO 2007/041805 (Egis Gyógyszergyár) describe un processo per la preparazione [2S*[R*[R*[R*]]]] e [2R*[S*[S*[S*]]]]-(±)-**α,α'**-[iminobis(methylene)] bis[6-fluoro-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-methanol] e dei suoi singoli puri enantiomeri [2S*[R*[R*[R*]]]] e [2R*[S*[S*[S*]]]] partendo da composti molto diversi. I passaggi utilizzati per la sintesi del nebivololo come miscela di enantiomeri sono circa trenta, rendendo la sintesi molto lunga ed anti-economica (Schema 5).

In WO 2008/010022 (Cimex Pharma) riporta una via che, partendo dagli acidi 6-fluoro chroman carbossilici risolti secondo metodi di letteratura, porta alla sintesi dei due enantiomeri del Nebivololo secondo due sequenze separate (Schema 6, per il d-nebivololo).

Nell'apertura degli epossidi con benzilammina un singolo prodotto di apertura cristallizza dalla miscela di reazione, ma l'altro diastereoisomero viene allontanato con le acque madri, portando anche in questo caso all'eliminazione di una considerevole porzione di materiale in uno stadio già abbastanza avanzato della sequenza sintetica. In aggiunta, l'ultimo centro chirale viene aggiunto al penultimo passaggio per riduzione di un chetone, una reazione abbastanza sensibile, che per ottenere risultati ottimali prevede l'uso di KBH_4 ed isopropossido di titanio.

WO2008/064826 (Zach System) riporta un metodo di risoluzione degli epossidi, una volta che le coppie di diastereoisomeri (RS/SR ed RR/SS) siano state separate per via cromatografica, attraverso l'apertura enantioselettiva degli epossidi stessi mediata da complessi chirali del cobalto II (schema 7). In questo caso è necessario uno step di separazione cromatografica, poco pratico dal punto di vista del processo, mentre i complessi del

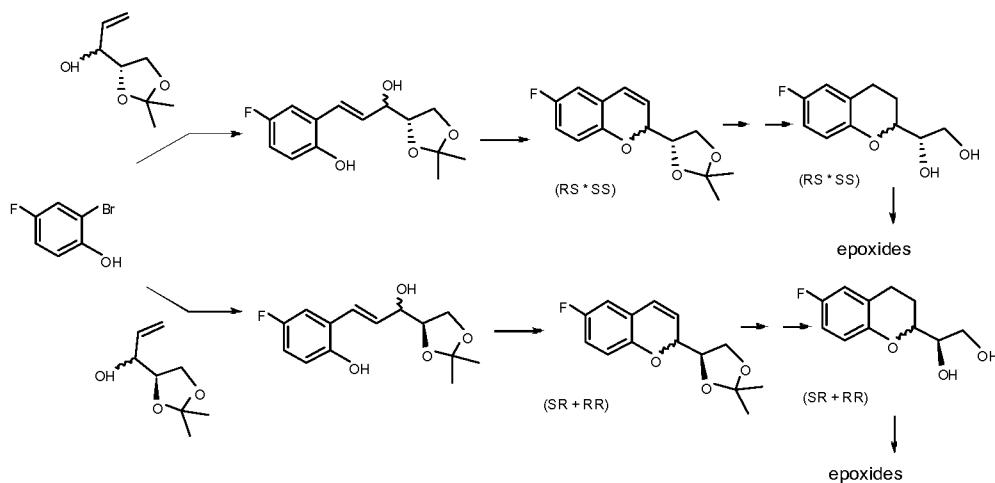
cobalto richiedono cautela nella manipolazione e nello smaltimento.



Schema 6

WO 2008/064827 (Zach System) descrive la sintesi separata ed enantioselettiva del d- ed l-Nebivololo a partire dai due isomeri ottici della gliceraldeide protetta come 2,2-dimetil acetale (Schema 7). I diastereoisomeri vengono separati con metodi noti, ma non descritti. Il numero di passaggi sintetici è superiore a quello della sintesi classica, mentre i precursori aldeide sono

noti come composti non troppo stabili, che tendono a polimerizzare se conservati in forma pura ed a temperatura ambiente.



Schema 7

Per quanto riguarda la separazione degli enantiomeri a livello dell'acido 6-fluoro-chroman-2-carbossilato è noto che il metodo della formazione dell'ammide con la (+)-dehydroabiethylamine, seguito da cristallizzazione frazionata, ed idrolisi dell'ammide per recuperare

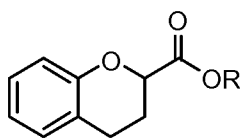
l'acido (EP 0334429), è laborioso ed a rese piuttosto basse.

Per quanto concerne la risoluzione enzimatica di esteri di acidi carbossilici, questo è un processo noto in letteratura, ma non era mai stato impiegato su esteri di fluoro derivati di acidi cromani-2-carbossilici, né conseguentemente, utilizzato per la sintesi del nebivololo.

Nello specifico si riportano gli esempi noti che riguardano cromani-2-carbossilati.

In US 5,037,747, esteri (2R)-idrossi sostituiti di benzopirano-2-carbossilati ed acidi (2S)-idrossi sostituiti di benzopirano-2-carbossilati vengono preparati per idrolisi selettiva da parte di una lipasi da *Pseudomonas*, del corrispondente racemato.

Urban (US. Pat.N°5,089,637, EP 0448254) sfrutta una idrolisi enzimatica con una esterasi derivata da *Pseudomonas fluorescens* per risolvere miscele racemiche di formula generale (I) dove R = C₁-C₃ alchile.



(I)

WO 96/40975 riporta l'uso di una esterasi microbica derivata da *Serratia marcescens* per la risoluzione di alchil cromani 2-carbossilati della stessa formula generale ma con $R > C_3$.

In DE 4430089 viene riportata una serie di esempi in cui esteri del cromano 2-carbossilato sono sottoposti ad idrolisi enzimatica con un gruppo selezionato di enzimi (chymotrypsin, lipasi da *Candida lipolytica*, lipasi da *Aspergillus oryzae*, lipasi da *Geotrichum candidum*, lipasi da *Aspergillus niger*).

Infine per quanto riguarda l'esterasi derivata dall'ascomicete *Ophiostoma novo-ulmi*, i dettagli relativi al suo isolamento, al clonaggio in E-Coli e al suo impiego nella risoluzione degli esteri vengono riportati per esempio da M. N. Isupov et al. in *Acta Crystallographica - Biological Crystallography* Section D60, p. 1879-1882 (2004), o in EP0687305, mentre un suo impiego nella risoluzione degli enantiomeri di acidi arilalcanoidi e, più in particolare, del ketoprofene è descritto in EP0693134.

Sulla base delle evidenze di letteratura fino ad oggi disponibili, la sintesi del Nebivololo

presenta ancora numerosi problemi sintetici. La sintesi Janssen originale che passa per gli epossidi (Schema 3, miscela 6) è sicuramente quella più breve, ma richiede una separazione per HPLC preparativo delle due coppie di epossidi diastereoisomeriche. Gli altri metodi prevedono in generale molti più passaggi sintetici.

In una buona parte delle sintesi riportate percentuali di un prodotto intermedio, che possono arrivare sino a circa il 50%, vengono scartate per eliminare i diastereoisomeri non voluti che sono stati inevitabilmente prodotti nella sequenza sintetica applicata.

Pertanto è fortemente avvertita l'esigenza di sviluppare un nuovo processo sintetico adatto all'impiego industriale, che eviti l'utilizzo di separazioni cromatografiche e che eviti la necessità di eliminare percentuali consistenti di composti intermedi pur mantenendo un ristretto numero di passaggi sintetici.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Ora si è sorprendentemente trovato un più efficiente processo di sintesi del Nebivololo (Schema 1) che permette di eliminare gli svantaggi già evidenziati per le vie di sintesi precedentemente note, ovvero:

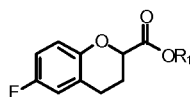
- a) evita, o riduce considerevolmente, la separazione per HPLC preparativo delle coppie di epossidi enantiomeri (RR/SS RS/SR) o di altri intermedi diastereoisomerici;
- b) riduce sensibilmente la perdita di prodotto rappresentata dagli isomeri indesiderati, con conseguente aumento della resa totale.

Il trattamento della miscela dei due enantiomeri dell'estere dell'acido 6-fluorocroman-2-carbossilico è eseguito con una esterasi (lipasi) fungina ottenibile dal genere *Ophiostoma*. La specie preferita è l'esterasi da *Ophiostoma novo-ulmi* già descritta in letteratura per la sua attività stereoselettiva sugli esteri dei composti naproxen o ketoprofene.

La reazione eseguita in mezzo acquoso o acquoso/organico porta all'idrolisi ad acido carbossilico di uno dei due enantiomeri in maniera selettiva, mentre l'altro rimane in forma di estere. La reazione procede in maniera veloce e con elevata stereoselettività. I due composti così prodotti possono essere facilmente separati per estrazione acido-base.

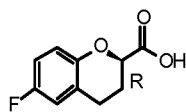
E' dunque oggetto della presente invenzione un processo per la preparazione del Nebivololo che comprende:

a. la risoluzione, mediante una reazione di idrolisi enzimatica, della miscela di enantiomeri di un estere dell'acido 6-fluoro-2-carbossilico **(1)**, in cui R_1 è un gruppo alchile C_{1-5} lineare o ramificato,

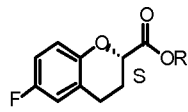


(1)

a dare una miscela di acido **(2)** e di estere **(3)**



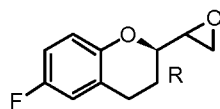
(2)



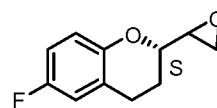
(3)

con un eccesso enantiomerico $>70\%$, preferibilmente $>80\%$, ed ancora più preferibilmente $>90\%$, in entrambi i componenti,

b. L'utilizzo dell'acido **(2)** e dell'estere **(3)** così ottenuti per la sintesi delle miscele di epossidi **(4)** e **(5)**,

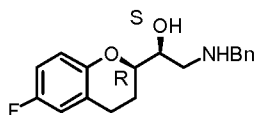


(RR + RS)
(4)

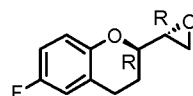


(SS + SR)
(5)

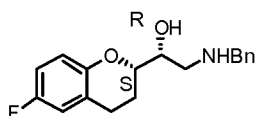
c.1) La reazione di risoluzione cinetica con benzilammina sulle miscele di epossidi (4) e (5) in un alcool stericamente ingombrato per ottenere rispettivamente i composti (6)+ (7) e (8) +(9) e loro separazione



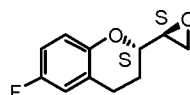
(6)



(7)



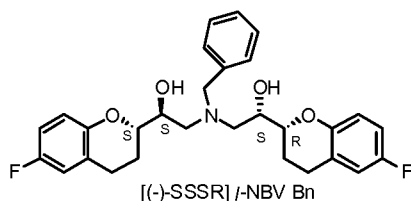
(8)



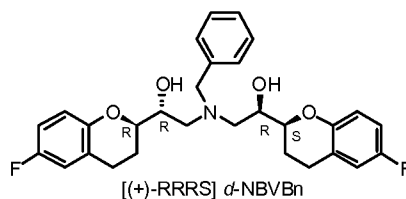
(9)

c.2) In alternativa alla risoluzione cinetica descritta al punto c.1), la separazione cromatografica delle miscele di epossidi (4) e (5) e successiva reazione dell'eossido RS con benzilammina a dare l'amminoalcool RS (6) e dell'eossido SR con benzilammina a dare l'amminoalcool SR (8).

d. La reazione dell'ammino alcool RS (6) con l'eossido (9) ad ottenere l'l-benzil nebivololo (10) e dell'amminoalcool SR (8) con l'eossido (7) ad ottenere il d-benzil nebivololo (11)

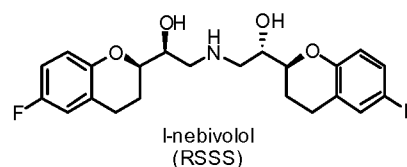
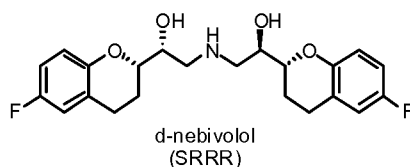


(10)



(11)

e. La deprotezione con eliminazione del gruppo benzile con la formazione del nebivololo



Nebivolol

Ai fini della presente invenzione il gruppo R_1 , definito come un gruppo alchile C_{1-5} lineare o ramificato, rappresenta un radicale scelto fra : metile, etile, propile, isopropile, butile, sec-butile, tert-butile, amile, tert-amile; preferibilmente è un radicale scelto fra metile, etile, propile ed ancora più preferibilmente è un gruppo etile.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Secondo la presente invenzione il composto nebivololo viene ottenuto con il metodo descritto nello Schema 1 dalla miscela racemica dell'estere dell'acido 6-fluorocroman-2-carbossilico (**1**).

Il 6-fluorocromano-2-carbossilato (1) può essere risolto dei suoi due enantiomeri con elevata stereoselettività attraverso l'idrolisi enantioselettiva catalizzata da un'esterasi (lipasi) fungina ottenibile dal genere *Ophiostoma*. La specie preferita è l'esterasi da *Ophiostoma novo-ulmi* già descritta in letteratura per la sua attività stereoselettiva sugli esteri dei composti naproxen o ketoprofene.

L'enzima in forma di proteina di espressione, isolata e cristallizzata è descritto da M. N. Isupov et al. in *Acta Crystallographica - Biological Crystallography* Section D60, p. 1879-1882 (2004). L'enzima è anche descritto in EP-B1-0687305 (WO94/20634), EP-0693134, US5912164 ed in EP1626093.

L'espressione dell'enzima in *E coli* può essere eseguita come descritto da M. N. Isupov et al. (sopra) o in EP-B1-0687305 (WO94/20634).

Viene dunque prodotto l'acido (**R**) 6-fluorocromano-2-carbossilico (**2**) con eccesso enantiomerico > 70%, preferibilmente >80% ed ancora più preferibilmente >90%, mentre l'acido (S) 6-fluoro carbossilico rimane in forma di estere (**3**) con eccesso enantiomerico >70%, preferibilmente >80% ed ancora più preferibilmente >90%.

La reazione può essere condotta su qualsiasi miscela di enantiomeri, ma generalmente viene usato il racemato.

L'estere utilizzato per questa reazione è un estere dell'acido 6-fluoro-2-carbossilico (**1**), in cui R₁ è un gruppo alchile C₁₋₅ lineare o ramificato, scelto nel gruppo costituito da metile, etile, propile, isopropile, butile, sec-butile, tert-butile, amile, tert-amile; preferibilmente fra metile, etile, propile ed ancora più preferibilmente da un gruppo etile.

La reazione viene preferibilmente condotta a pH 8-11, preferibilmente 8.5-10.0.

La temperatura può essere compresa tra 10 e 35°C, ma preferibilmente tra 20 e 25°C.

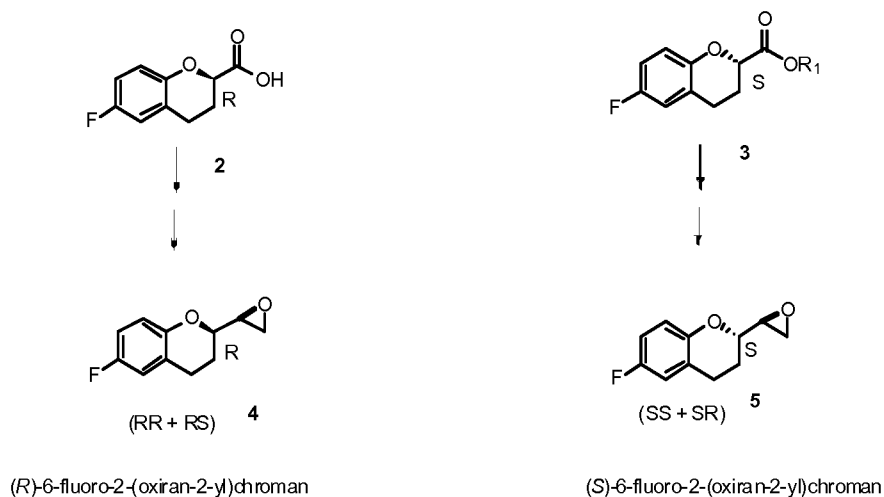
La miscela di reazione può essere in ambiente acquoso oppure in presenza di solventi immiscibili con l'acqua.

Il recupero di entrambi i composti è possibile con metodi noti all'uomo dell'arte e preferibilmente attraverso una serie di estrazioni acido base.

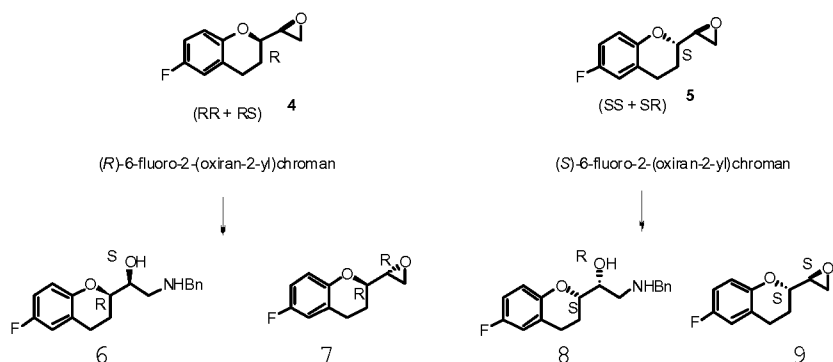
Entrambi i composti sono poi utilizzati per la sintesi del neбивололо (Schema 1).

Attraverso metodi noti all'uomo dell'arte (a titolo di esempio non limitativo, in modo analogo a quello descritto in WO2007041805) l'acido (**2**) viene trasformato nella miscela di epossidi (**4**),

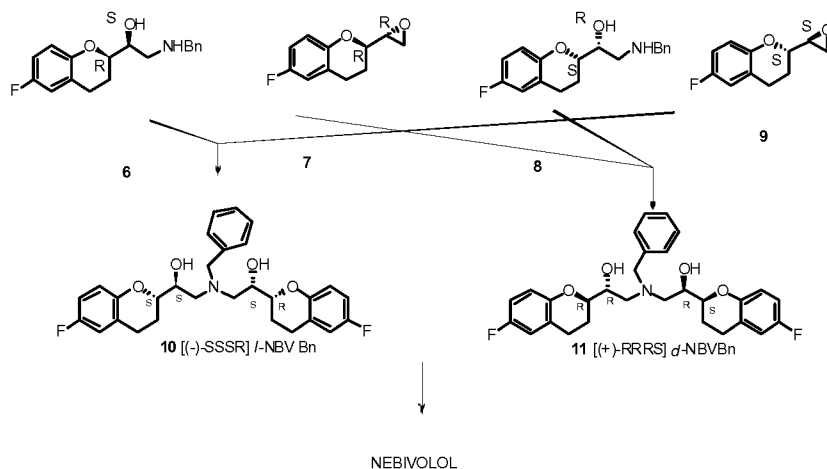
diastereoisomerici tra loro (RS) ed (RR), mentre l'estere (**3**) viene convertito nella miscela di epossidi (**5**) (SR) + (SS).



Effettuando la reazione di apertura della miscela di epossidi (**4**) con benzilammina in un solvente alcolico stericamente ingombrato (quale isopropanolo, sec-Butanolo, tert-butanolo, 2-metil-2-butanolo, alcool isoamilico, 2-metil-2-pentanol) si ha una risoluzione cinetica con formazione del solo ammino alcool RS(**6**) mentre l'eossido RR (**7**) viene recuperato inalterato.



La stessa procedura applicata alla miscela (5) produce l'ammino alcool SR (8) e l'epossido SS (9). In alternativa alla risoluzione cinetica descritta, la miscela di epossidi (4) può essere separata cromatograficamente nei due epossidi RS ed RR e la miscela degli epossidi (5) nei due epossidi SR ed SS; successivamente l'epossido RS viene fatto reagire con la benzilammina ottenendo l'amminoalcool RS(6), mentre l'epossido SR viene fatto reagire con la benzilammina ad ottenere l'amminoalcool SR (8).



Infine la reazione dell'ammino alcool (**6**) con l'epossido (**7**) produce il derivato N-benzilato del *l*-nebivololo (**10**) ed analogamente, la reazione dell'ammino alcool (**8**) con l'epossido (**9**) fornisce il derivato N-benzilato del *d*-nebivololo (**11**).

I composti (**10**) ed (**11**) vengono uniti in quantità equimolecolari, purificati mediante cristallizzazione (in modo da eliminare eventuali impurezze costituite dai composti diastereoisomerici non voluti e derivanti dalla non completa purezza enantiomerica degli esteri/acidi di partenza), debenzilati e successivamente salificati ad ottenere il sale di nebivololo finale desiderato.

ESEMPI

L'invenzione è di seguito descritta nei dettagli attraverso i seguenti esempi aventi scopo puramente illustrativo e non limitativo:

ESEMPIO 1

Come descritto in EP-0687305, un ceppo di E. Coli ricombinante contenente l'esterasi originariamente espressa in Ophiostoma novo-ulmi, viene coltivata secondo tecniche ben note all'uomo dell'arte. Una parte di cellule viene lisata mediante sonicazione ed il lisato centrifugato per ottenere una soluzione supernatante libera da cellule. 1.6 mL di soluzione contenente l'enzima esterasi (lipasi) ottenuto da Ophiostoma novo-ulmi (6800 unità per mL) ed una sospensione di circa 25 g di etil 6-fluorocromano-2-carbossilato (**1**) in 25 mL di acqua deionizzata con 100 μ L di Tween 80, vengono aggiunti a 500 mL di una soluzione di tampone NaHCO_3 0.1N (pH 9.7) aggiustando eventualmente il pH al valore di 9.7 con NaOH 2N. La miscela così ottenuta viene agitata in maniera moderata.

Il pH viene mantenuto automaticamente al valore di 9.7 con aggiunte controllate di una soluzione 2N di NaOH.

L'evolversi della reazione viene controllata tramite HPLC.

Alla fine della reazione di idrolisi la miscela viene estratta con diclorometano in modo da ottenere l'estere in fase organica. La soluzione acquosa viene acidificata con acido cloridrico 1N fino a pH 1 e quindi estratta con diclorometano per il recupero dell'acido.

Le due fasi organiche vengono lavate separatamente con brine e concentrate per ottenere 12.2 g di estere etilico ed 11.0 g di acido rispettivamente.

Rapporto degli enantiomeri (HPLC):

estere(S) (**3**)/estere (R) 95.31/4.69

acido(R) (**2**)/acido (S): 95.36/4.64

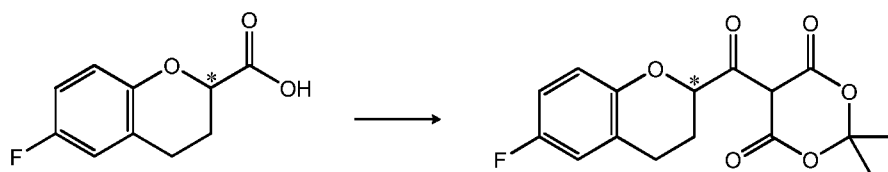
La valutazione del potere rotatorio in DMF a 25°C per la miscela di acidi (comprendente l'acido (**2**)) la mostra levogiro ed in accordo con quanto riportato in EP0334429 per l'isomero R.

ACIDO (**2**) ¹H-NMR (DMSO-D₆, 400 MHz): δ_{H} . (ppm): 2.04 (2H, m, OCHCH₂CH₂), 2.64 (1H, m, OCHCH₂CH₂), 2.79 (1H, m, OCHCH₂CH₂), 4.75 (1H, t, J=4.5 Hz, OCHCO), 6.80-7.00 (3H, m, CHar), 13.00 (1H, b, COOH).

ETIL ESTERE (**3**) ¹H-NMR (DMSO-D₆, 400 MHz): δ_{H} . (ppm): 1.19 (3H, t, J=7.2 Hz, CH₃), 2.04 (1H, m, OCHCH₂CH₂), 2.14 (1H, m, OCHCH₂CH₂), 2.62 (1H, m, OCHCH₂CH₂), 2.80 (1H, m, OCHCH₂CH₂), 4.86 (1H, t, J=4.5 Hz, OCHCO), 6.80-7.00 (3H, m, CHar)

Metodo di analisi: colonna Kromasil 5-AmyCoat (4.6 x 250 ,mm); eluenti: (A)esano 0.1% TFA, (B) isopropanolo, isocratica (A)/(B) 85/15; flusso: 1 mL/min, temperatura: 40°C; Rivelatore: UV 280 nm;

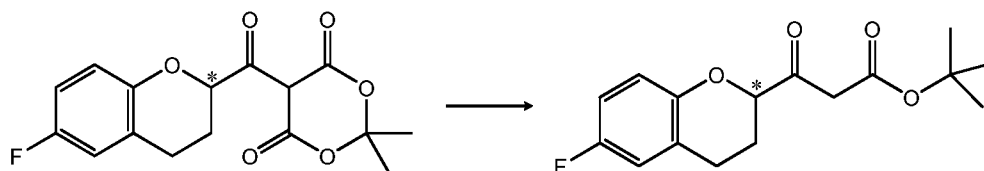
ESEMPIO 2. Preparazione dell' Acyl Meldrum derivato



28 grammi di acido (R)risolto vengono solubilizzati in 250 mL di diclorometano anidro; alla soluzione risultante si aggiungono 1.4 equivalenti di cloruro di ossalile e gocce di DMF. La soluzione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente e sotto N₂; dopo 1.5 ore si evapora il solvente ottenendo un olio che viene ridisciolto in 200 mL di diclorometano anidro. A parte si disciolgono in diclorometano anidro (150 mL) l'acido di Meldrum (1.05 equivalenti) e piridina (2 equivalenti)e si lascia agitare a 0°C per 15 minuti. A questa soluzione viene aggiunto il cloruro acido formato in precedenza. Al termine dell'aggiunta si lascia la miscela sotto agitazione a 0°C per 1 ora e altri 45 minuti a temperatura ambiente. Si diluisce quindi con altri 500 mL di diclorometano e la fase organica si lava con H₂O (2 x 200 mL), HCl 2N (100

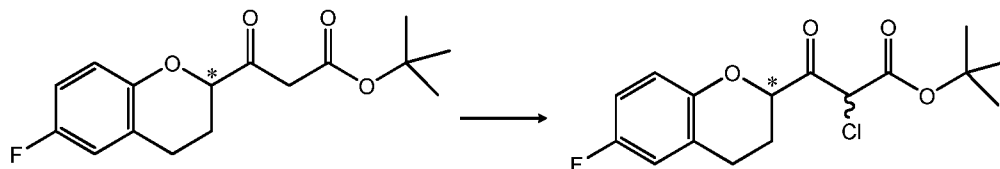
mL), acqua, e brine e seccata su Na₂SO₄. Si ottiene un olio che viene ripreso con 20 volumi di diisopropiletere, ottenendo un solido marrone (40 g, purezza HPLC = 81%, λ = 280 nm) che viene filtrato e seccato. Il solido ottenuto viene utilizzato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

ESEMPIO 3. Preparazione del β -chetoestere



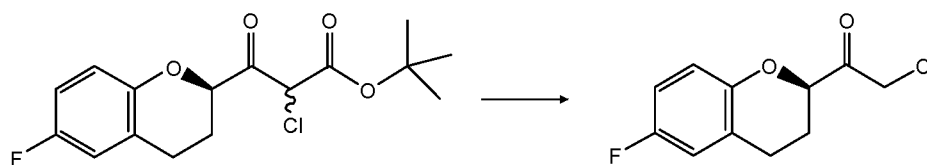
40 grammi di acyl meldrum derivato (R) grezzo si mettono sotto agitazione con 110 mL di ter-butanolo; la miscela risultante si scalda a 80° C per 1h fino a che un controllo HPLC non evidenzia la scomparsa del prodotto di partenza. Al termine della reazione si evapora il ter-butanolo a pressione ridotta, si riprende con 500 mL di acetato di etile e si lava la fase organica con una soluzione di NaHCO₃ satura, H₂O fino a neutralita', brine e si secca su Na₂SO₄. Si evapora quindi il solvente ottenendo 28 grammi di β -chetoestere grezzo (purezza HPLC = 69 %, λ = 280 nm) come olio, che viene utilizzato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

ESEMPIO 4- Preparazione del cloro β chetoestere



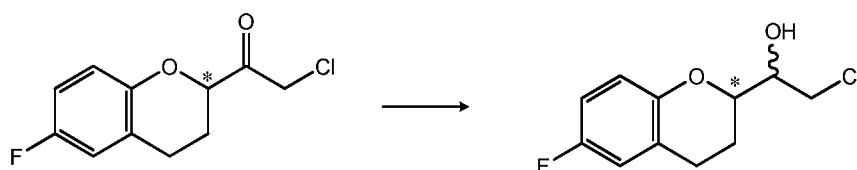
28 g di β -cheto estere grezzo(R) vengono disciolti in 250 mL di acetato di etile ed a questa soluzione si aggiungono 0.26 equivalenti di $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Dopo 30 minuti si aggiungono 0.95 equivalenti di N-clorosuccinimide in 2h. Alla fine dell'aggiunta si agita la miscela risultante per un'ora a temperatura ambiente. Si elimina quindi il solido formatosi, si trasferisce la soluzione limpida in imbuto separatore dopo aver diluito con altri di 350 mL di acetato di etile; si lava la fase organica con brine, H_2O e si secca su Na_2SO_4 . Si evapora il solvente ottenendo 34 grammi di cloro derivato grezzo (purezza HPLC = 79.40 %, $\lambda = 280$ nm) che viene utilizzato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

ESEMPIO 5. Preparazione dell' α -clorochetone



34 grammi di cloro β -chetoestere (R) grezzo vengono messi a rifluire con HCOOH (100 mL), CH₃COOH (120 mL) e H₂O (30 mL); dopo 1.5h un controllo HPLC evidenzia la fine della reazione. Si evapora quindi la miscela a pressione ridotta, si riprende con acetato di etile, e si lava la fase organica con brine, NaHCO₃ satura, H₂O e si secca su Na₂SO₄. Si evapora quindi il solvente a pressione ridotta ottenendo 21 grammi di α cloro-chetone (purezza HPLC = 60 %, λ = 280 nm) come olio che viene utilizzato tal quale per il prossimo step senza ulteriore purificazione.

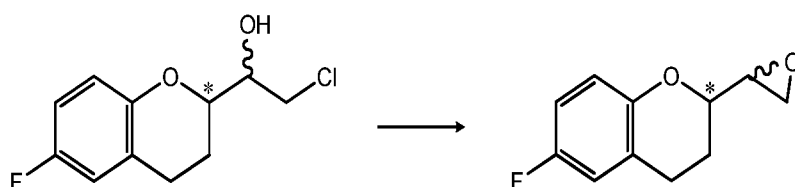
ESEMPIO 6. Preparazione dell' α cloroalcol



21 grammi dell'olio ottenuto dalla reazione precedente vengono sciolti in 15 volumi di MeOH e a questa soluzione si aggiungono a spatolate 2.0 equivalenti di NaBH(OCOCH₃)₃ e si tiene sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente. Dopo 45 minuti si aggiunge un altro equivalente di NaBH(OCOCH₃)₃. Dopo un'ora dall'ultima aggiunta un controllo HPLC denota la fine della reazione. Si evapora il solvente a pressione ridotta, si

trasferisce tutto in imbuto separatore con acetato di etile e si lava la fase organica con H₂O e brine e si secca su Na₂SO₄. Si ottengono 21 grammi di un olio che viene purificato tramite cromatografia flash (rapporto silice/grezzo 30:1, eluente: etere di petrolio/AcOEt 92:8), ottenendo 14.2 grammi di α cloro-alcol (purezza HPLC = 86.5 %, λ = 280 nm).

ESEMPIO 7. Preparazione epossidi (**4**) (RR+RS)



14 grammi di α cloro-alcol vengono disciolti in 20 volumi di Et₂O anidro e a questa soluzione si aggiungono 2.8 grammi di NaH precedente lavato con etere di petrolio. Dopo 1 ora un controllo TLC (silica gel, eluente: etere di petrolio/AcOEt 85:15) denota la scomparsa del cloro alcol di partenza (una macchia in TLC) e la formazione dei due epossidi (due macchie ben distinte su TLC). Si diluisce quindi la miscela di reazione con altri 30 volumi di Et₂O e si versa il tutto in 100 mL di NaHSO₄ 1M mantenendo una vigorosa agitazione. Si lava la fase organica con NaHCO₃, H₂O, brine e si secca su Na₂SO₄. Si evapora quindi il solvente a

pressione ridotta ottenendo 11.4 grammi della miscela di epossidi come olio (Purezza HPLC >98%, λ = 280 nm) in rapporto 51:48.

La presenza di soli due picchi principali nelle proporzioni indicate nell'analisi con HPLC chirale mostra non vi è stata racemizzazione nella sequenza di reazioni che va dall'acido (R) alla miscela di epossidi diastereoisomeri (RR + RS) con evidente conservazione della chiralità degli stereocentro.

La miscela di epossidi (SR + SS) (**5**) viene preparata in maniera analoga a quanto descritto negli esempi 2-7, partendo dall'estere (**3**) dopo sua idrolisi al corrispondente acido. In questo caso la valutazione del potere rotatorio in DMF a 25°C per l'acido così ottenuto lo mostra destrogiro ed in accordo con quanto riportato in EP 0334 429A1 per l'isomero S.

ESEMPIO 8 (risoluzione cinetica sulla miscela di epossidi (SS + SR)).

Una soluzione della miscela di epossidi (SS +SR) (4.50 g, 22.5 mmol) e benzilammina (3.8 mL, 35 mmol) in 2-metil-2-butanolo (38 mL) viene mescolata a temperatura ambiente per 12 ore. Al termine della reazione, l'ammina **8**(SR) formatasi viene filtrata sotto vuoto e seccata (1.90 g, 6.30 mmol). La

soluzione filtrata viene versata in cicloesano (250 mL) e la soluzione così ottenuta viene lavata con 1M NaHSO₄ (100 mL) ed H₂O (50 mL x 2) e quindi concentrata a pressione ridotta per ottenere 1.30 (6.00 mmol)g di epossido **9** (SS).

La risoluzione cinetica sulla miscela di epossidi (RS + RR) viene condotta in maniera analoga a quanto descritto nell'Esempio 8.

ESEMPIO 9: sintesi del benzil l-nebivololo (SSSR)

Il composto (RS)-2-benzilammino-1-(6-fluorocroman-2-il)etanolo e l'eossido (SS) vengono disciolti in etanolo assoluto (6 mL) e mantenuti a riflusso fino a scomparsa dei reagenti di partenza. Al termine della reazione si lascia arrivare la miscela a temperatura ambiente e si allontana a pressione ridotta il solvente.

ESEMPIO 10: sintesi del d-benzil nebivololo (RRRS)

Il composto (SR)-2-benzilammino-1-(6-fluorocroman-2-il) etanolo e l'eossido (RR) vengono trattati come nell'Esempio 9 per ottenere il d-benzil nebivololo.

ESEMPIO 11: sintesi del d,l-benzil nebivololo

L' l-benzil nebivololo descritto nell'Esempio 9 (3.00 g) ed il d-benzil nebivololo descritto nell'Esempio 10 (3.00 g) vengono riuniti e la

miscela così ottenuta (6.0 g) viene purificata per cristallizzazione ottenendo 5.0 g di N-benzyl neбивололо (83%, purezza HPLC 99.6%). Durante la purificazione per cristallizzazione vengono eliminate anche le impurezze costituite dagli isomeri indesiderati derivanti dalla non completa idrolisi enantioselettiva dell' etil 6-fluorocroman-2-carbossilato (**1**) di partenza.

ESEMPIO 12: sintesi del neбивололо idrocloruro

Il composto d,l-benzil neбивололо (5.0 g, 410 mmol) viene dissolto in metanolo (400 mL) insieme a Pd(OH)₂/C al 20% (1% in peso). La miscela viene tenuta sotto agitazione in atmosfera di idrogeno. Al termine della reazione si filtra il catalizzatore su setto poroso e al filtrato si aggiunge HCl concentrato (36 mL). Si concentra a pressione ridotta la soluzione e il residuo ottenuto viene trattato a caldo con etanolo assoluto (50 mL). Il solido ottenuto viene filtrato e seccato sotto vuoto (1.0 g, 82% resa, 99.9% purezza HPLC)

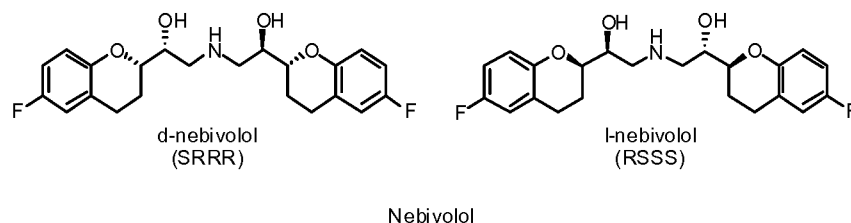
Metodo analitico HPLC

Colonna	LiChrosphere 100 RP ₁₈ endcapped Merck 5 µm (4.6 × 250 mm)
eluente	A: water + 0.1% TFA, B: acetonitrile + 0.1% TFA

	Gradiente: da 40%B a 90 %B in 20 minuti + isocratica 90% B in 10 minuti
Volume di iniezione	20 µL
flusso	1 mL/min
rivelatore:	LC: UV. λ : 280 nm
temperatura	temperatura ambiente

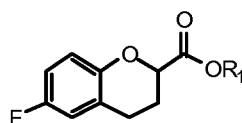
RIVENDICAZIONI

1. Un processo di sintesi di *d*-nebivololo e/o *l*-nebivololo di formule seguenti



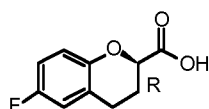
che comprende il seguente passaggio:

a) si idrolizza, mediante una reazione di idrolisi enzimatica stereoselettiva, della miscela di enantiomeri dell'estere dell'acido 6-fluoro-2-carbossilico (1), in cui R₁ è un gruppo C₁₋₅ alchile lineare o ramificato

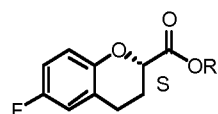


(1)

a dare una miscela di acido (R) (2) e di estere (S) (3)



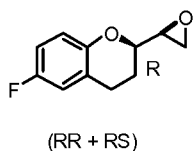
(2)



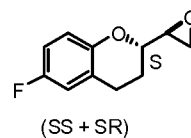
(3)

con un eccesso enantiomerico >70% per entrambi i componenti.

2. Il processo di sintesi secondo la rivendicazione 1, comprendente il seguente passaggio addizionale:
b) si utilizza l'acido (2) e dell'estere (3) così ottenuti per la sintesi delle miscele di epossidi (4) e (5),



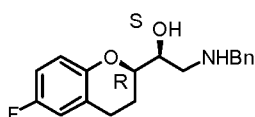
(4)



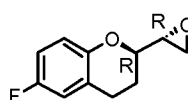
(5)

3. Il processo di sintesi secondo le rivendicazioni 1 o 2 comprendente il seguente passaggio addizionale:

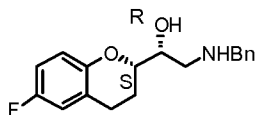
c) si risolvono cineticamente le miscele di epossidi (4) e (5) ponendole a reagire con benzilammina in un alcool stericamente ingombrato per ottenere rispettivamente i composti (6)+ (7) e (8) +(9).



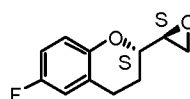
(6)



(7)



(8)



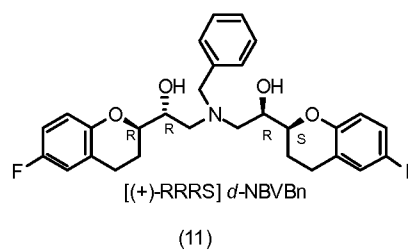
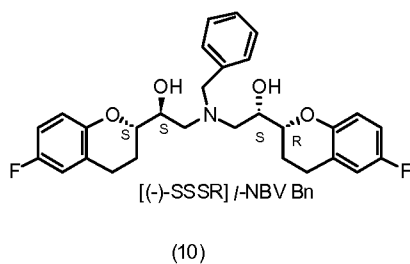
(9)

4. Il processo di sintesi secondo la rivendicazione 2 comprendente, in alternativa alla risoluzione cinetica indicata al passaggio c), il seguente passaggio:

- si separa cromatograficamente la miscela di epossidi (4) nei due epossidi RR (7) ed RS e la miscela degli epossidi (5) nei due epossidi SS (9) ed SR
- successivamente l'eossido RS viene fatto reagire con la benzilammina ottenendo l'amminoalcool RS(6), mentre l'eossido SR viene fatto reagire con la benzilammina ad ottenere l'amminoalcool SR (8).

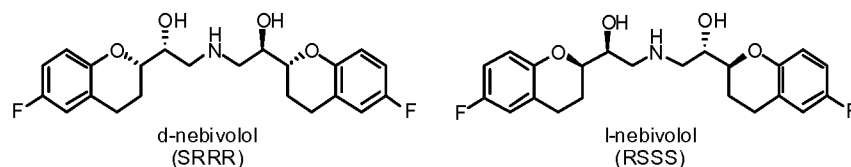
5. Il processo di sintesi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4 comprendente il seguente passaggio aggiuntionale:

- d) si reagisce l'ammino alcool RS (6) con l'eossido (9) ad ottenere l'*l*-benzil neбивололо (10) e/o dell'amminoalcool SR (8) con l'eossido (7) ad ottenere il *d*-benzil neбивололо (11)



6. Il processo di sintesi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 comprendente il seguente passaggio aggiuntivo:

e) si rimuove il gruppo protettore benzile



Nebivolol

con la formazione del *d*- e/o *l*-nebivololo

7. Il processo di sintesi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6 in cui la reazione di idrolisi enzimatica viene realizzata mediante impiego della esterasi derivata dall'*Ophiostoma novo-ulmi* o da esterasi equivalente.

8. Il processo secondo la rivendicazione 7, in cui la reazione di idrolisi enzimatica è condotta ad un pH compreso fra 8 e 11, preferibilmente fra 8.5 e 10.

9. Il processo secondo la rivendicazione 7, in cui la reazione di idrolisi enzimatica è condotta ad una temperatura compresa fra 10° e 35°C, preferibilmente tra 20° e 25°C.

10. Il processo secondo la rivendicazione 7, in cui la reazione di idrolisi enzimatica è condotta in

ambiente acquoso oppure in presenza di solventi immiscibili con acqua.

11. Il processo secondo la rivendicazione 1 in cui l'idrolisi enzimatica della miscela di esteri (1) procede a dare una miscela di acido (2) e di estere (3) con un eccesso enantiomerico >80% oppure > 90% in entrambi i componenti.

12. Un processo una secondo la rivendicazione 1, in cui l'acido (2) è convertito nella miscela di epossidi RR+RS (4), mentre l'estere (3) viene convertito nella miscela di epossidi SS+SR (5).

13. Processo secondo la rivendicazione 3, in cui la risoluzione cinetica con benzilammina dalla miscela di epossidi (4) è condotta in un alcool stericamente ingombrato scelto fra isopropanolo, sec-Butanolo, tert-butanolo, 2-metil-2-butanolo, alcool isoamilico, 2-metil-2-pentanol, con ottenimento del solo ammino alcool RS (6), mentre l'eossido RR (7) viene recuperato inalterato.

14. Processo secondo la rivendicazione 1, in cui la risoluzione cinetica con benzilammina dalla miscela di epossidi (5) è condotta in un alcool stericamente ingombrato scelto fra isopropanolo, sec-Butanolo, tert-butanolo, 2-metil-2-butanolo, alcool isoamilico, 2-metil-2-pentanol, con

ottenimento del solo ammino alcool SR (8) mentre l'eossido SS (9) viene recuperato inalterato.

15. Processo secondo le rivendicazioni 13 o 14 in cui l'alcool stericamente ingombrato è il 2-metil-2-butanolo.

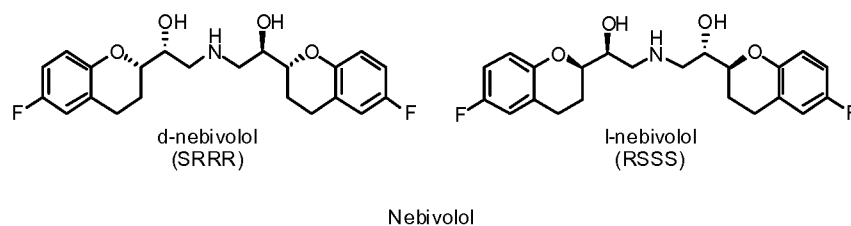
16. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 15, in cui l'ammino alcool RS (6) viene fatto reagire con l'eossido SS (9) a dare l' *l*-nebivololo benzilato (10) e/o l'ammino alcool SR (8) viene fatto reagire con l'eossido RR (7) a dare il *d*-nebivololo benzilato (11).

17. Processo secondo la rivendicazione 16, in cui i composti (10) ed (11) vengono miscelati in un rapporto 1:1, deprotetti dal gruppo benzilico fornendo il prodotto finale nebivololo.

18. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 17, in cui il prodotto finale nebivololo viene salificato con acido cloridrico ottenendone il corrispondente cloridrato.

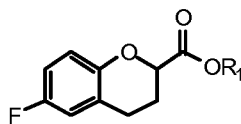
CLAIMS

1. A process for the synthesis of *d*-nebivolol and/or *l*-nebivolol of the following formulas



comprising the following step:

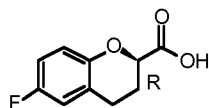
a) hydrolyzing by a stereoselective enzymatic hydrolysis reaction a mixture of enantiomers of the 6-fluoro-2-carboxylic acid ester (1), wherein R_1 is a linear or branched C_{1-5} alkyl group



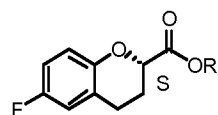
(1)

to give a mixture of (R) acid(2) and (S)ester

(3)



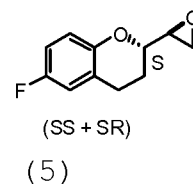
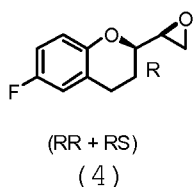
(2)



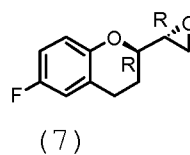
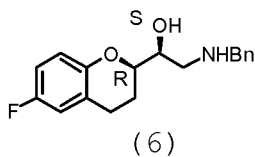
(3)

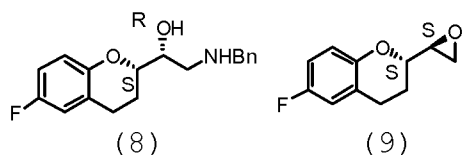
with an enantiomeric excess higher than 70% for both components.

2. The synthesis process according to claim 1, comprising the following additional step: b) synthesizing from thus obtained acid (2) and ester (3) respectively the mixtures of epoxides (4) and (5)



3. The synthesis process according to claim 1 or 2, comprising the following additional step c) kinetically resolving the mixtures of epoxides (4) and (5) by reacting them with benzylamine in a sterically hindered alcohol to obtain respectively the compounds (6)+ (7) and (8) + (9).





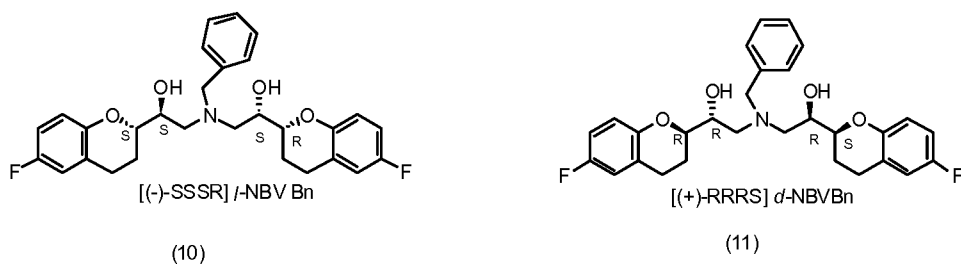
4. The synthesis process according to claim 2, comprising, as an alternative to the kinetic resolution in step c), the following step:

chromatographically separating the mixture of epoxides(4) in the two epoxides RR (7) and RS and the mixture of epoxides (5) in the two epoxides SS (9) and SR;

subsequently, reacting the epoxide RS with benzylamine, obtaining the aminoalcohol RS (6), and reacting the epoxide SR with benzylamine, obtaining the aminoalcohol SR (8).

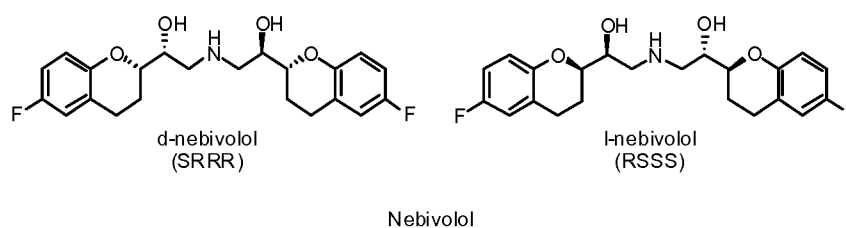
5. The synthesis process according to any one of claims from 1 to 4, comprising the following additional step:

d) reacting the aminoalcohol RS (6) with the epoxide(9) to obtain *l*-benzyl nebivolol (10) and/or the aminoalcohol SR (8) with the epoxide(7) to obtain *d*-benzyl nebivolol (11)



6. The synthesis process according to any one of claims from 1 to 5, comprising the following additional step:

e) removing the benzyl protecting group with the formation of *d*- and/or *l*-nebivolol



7. The synthesis process according to any one of claims from 1 to 6, wherein the enzymatic hydrolysis reaction is carried out by means of the esterase derived from *Ophiostoma novo-ulmi* or an equivalent esterase.

8. The synthesis process according to claim 7, wherein the enzymatic hydrolysis reaction is carried out at a pH between 8 and 11, preferably between 8.5 and 10.

9. The synthesis process according to claim 7, wherein the enzymatic hydrolysis reaction is carried out at a temperature between 10° and 35°C, preferably between 20° and 25°C.

10. The synthesis process according to claim 7, wherein the enzymatic hydrolysis reaction is carried out in an aqueous media or in presence of water immiscible solvents.

11. The synthesis process according to claim 1, wherein the enzymatic hydrolysis of the mixture of esters (1) proceeds to yield a mixture of acid (2) and ester (3) with an enantiomeric excess higher than 80% or 90% in both components.

12. The synthesis process according to claim 1, wherein the acid (2) is converted into the mixture of epoxides RR+RS (4), whereas the ester (3) is converted into the mixture of epoxides SS+SR (5).

13. The synthesis process according to claim 3, wherein the kinetic resolution with benzylamine of the mixture of epoxides (4) is carried out in an sterically hindered alcohol selected from isopropanol, sec-Butanol, tert-butanol, 2-methyl-2-butanol, isoamyl alcohol, 2-methyl-2-pentanol, obtaining the sole amino alcohol RS (6), while the epoxide RR (7) is recovered as unchanged.

14. The synthesis process according to claim 1, wherein the kinetic resolution with benzylamine of the mixture of epoxides (5) is carried out in an sterically hindered alcohol selected from

isopropanol, sec-Butanol, tert-butanol, 2-methyl-2-butanol, isoamyl alcohol, 2-methyl-2-pentanol, obtaining only the amino alcohol SR (8) while the epoxide SS (9) is recovered as unchanged.

15. The synthesis process according to claim 13 or 14, wherein the sterically hindered alcohol is 2-methyl-2-butanol.

16. The synthesis process according to any one of claims from 1 to 15, wherein the amino alcohol RS (6) is reacted with the epoxide SS (9) to give the *l*-benzyl nebivolol (10) and/or the amino alcohol SR (8) is reacted with the epoxide RR (7) to give the *d*-benzyl nebivolol (11).

17. The synthesis process according to claim 16, wherein the compounds (10) and (11) are mixed in a 1:1 ratio, deprotected from benzyl group to give the product nebivolol.

18. The synthesis process according to any one of claims from 1 to 17, wherein the nebivolol product is treated with hydrochloric acid obtaining the corresponding hydrochloride.

PP. MENARINI INTERNATIONAL OPERATIONS