



MD 4440 C1 2017.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4440** (13) **C1**
(51) Int.Cl: **C07C 51/08** (2006.01)
C07C 62/34 (2006.01)
C12P 41/00 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C07B 53/00 (2006.01)
C07B 57/00 (2006.01)
C07D 223/16 (2006.01)

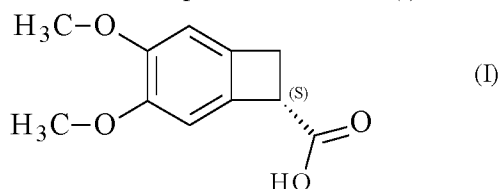
(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2014 0015 (22) Data depozit: 2014.02.24 (31) Nr.: 1351785 (32) Data: 2013.02.28 (33) Țara: FR (41) Data publicării cererii: 2014.08.31	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.10.31, BOPI nr. 10/2016
(71) Solicitant: LES LABORATOIRES SERVIER, FR (72) Inventatori: PEDRAGOSA MOREAU Sandrine, FR; LEFOULON Francois, FR (73) Titular: LES LABORATOIRES SERVIER, FR (74) Mandatar autorizat: SIMANENKOVA Tatiana	

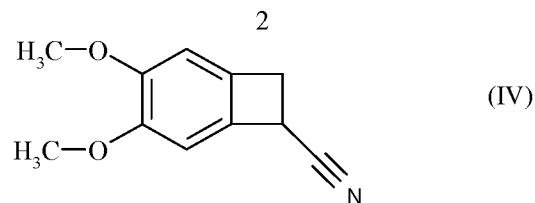
(54) Procedeu de sinteză enzimatică a acidului (7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carboxilic și aplicarea acestuia în sinteza ivabradinei și a sărurilor sale

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de sinteză enzimatică a compusului cu formula (I):



prin hidroliza enzimatică enantioselectivă a nitrilului racemic sau non optic pur cu formula (IV):



cu ajutorul nitrilazei *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 cu supraexpresie într-un alt organism care are un sistem biologic competent, într-un amestec de solvent organic și soluție apoasă.

Invenția se referă, de asemenea, la un procedeu de sinteză a ivabradinei, a sărurilor sale acceptabile farmaceutic sub formă anhidră sau de hidrat, cu utilizarea compusului cu formula (I).

Revendicări: 14

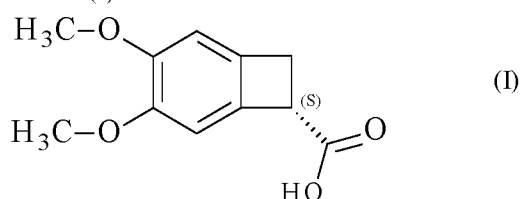
Figuri: 2

MD 4440 C1 2017.05.31

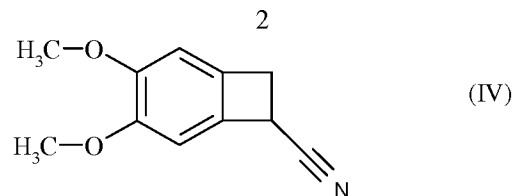
(54) Process for the enzymatic synthesis of (7S)-3,4-dimethoxybicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene-7-carboxylic acid and application thereof in the synthesis of ivabradine and salts thereof

(57) Abstract:

The invention relates to a process for the enzymatic synthesis of the compound of formula (I):



by enantioselective enzymatic hydrolysis of the racemic, or not optically pure, nitrile of formula (IV):



using the nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 over-expressed in another organism having a competent biological system, in a mixture of an organic solvent and an aqueous solution.

The invention also relates to a process for the synthesis of ivabradine, pharmaceutically acceptable salts thereof in anhydrous or hydrate form, using the compound of formula (I).

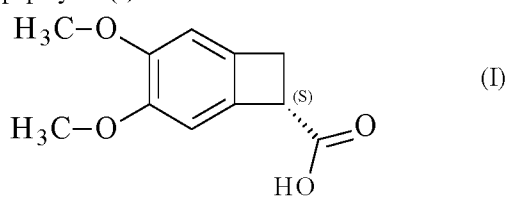
Claims: 14

Fig.: 2

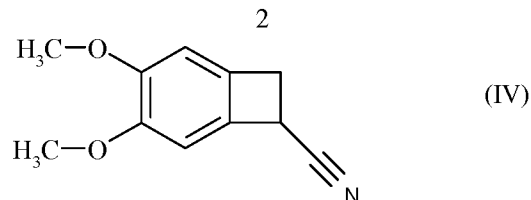
(54) Способ ферментативного синтеза (7S)-3,4-диметоксибицикло[4.2.0]окта-1,3,5-триен-7-карбоновой кислоты и ее применение в синтезе ивабрадина и его солей

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу ферментативного синтеза соединения формулы (I):



путем ферментативного энантиоселективного гидролиза рацемического или не оптически чистого нитрила формулы (IV):



с помощью нитрилазы *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 сверхэкспрессированной в другом организме, имеющем подходящую биологическую систему, в смеси органического растворителя и водного раствора.

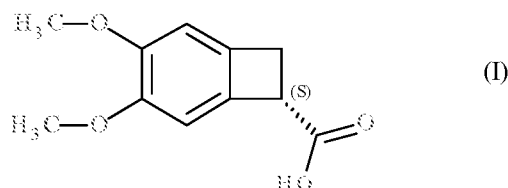
Изобретение также относится к способу синтеза ивабрадина, его фармацевтически приемлемых солей в безводной и гидратной форме, используя соединение формулы (I).

П. формулы: 14

Фиг.: 2

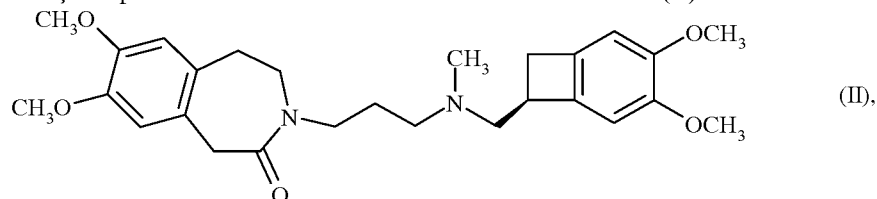
Descriere:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de sinteză enzimatică a compusului cu formula (I):



5

precum și la aplicarea acestuia în sinteza ivabradinei cu formula (II):



sau 3-{3-[[[(7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il]metil}(metil)amino]propil}-7,8-dimetoxi-1,3,4,5-tetrahidro-2H-3-benzazepin-2-onă, a sărurilor sale de adiție cu un acid acceptabil farmaceutic și a hidraților acestora.

10

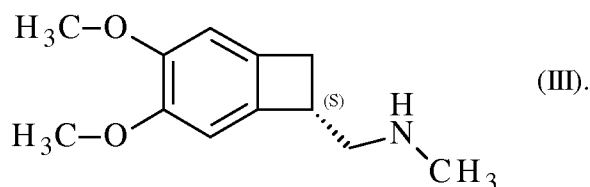
Ivabradina, precum și sărurile sale de adiție cu un acid acceptabil farmaceutic, îndeosebi clorhidratul său, posedă proprietăți farmacologice și terapeutice foarte valoroase, în special proprietăți bradicardice, ceea ce face ca acești compuși să fie utili în tratamentul sau prevenirea diverselor situații clinice de ischemie miocardică, cum este angina pectorală, infarctul miocardic și tulburările asociate ale ritmului, precum și în diverse patologii ce se referă la tulburări ale ritmului, în special supraventriculare, și în cazuri de insuficiență cardiacă.

15

Prepararea și utilizarea terapeutică a ivabradinei și a sărurilor sale de adiție cu un acid acceptabil farmaceutic, îndeosebi a clorhidratului său, au fost descrise în brevetul european EP 0 534 859 [1].

20

Brevetul respectiv descrie sinteza clorhidratului de ivabradină pornind de la compusul cu formula (III), (7S)-1-(3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il) N-metilmelanamină:



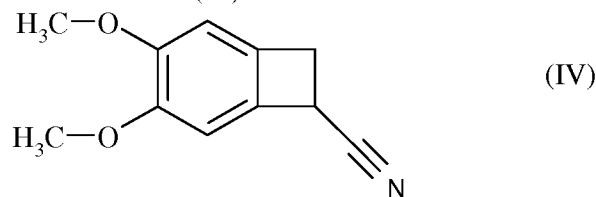
25

Compusul cu formula (III) este un intermediar important în sinteza ivabradinei și a sărurilor sale acceptabile farmaceutic.

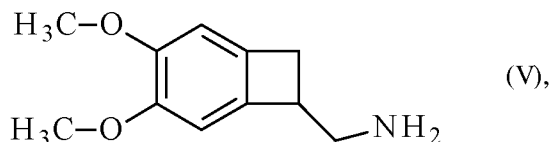
Stadiul cunoscut al tehnicii dezvăluie mai multe procedee de obținere a compusului cu formula (III).

30

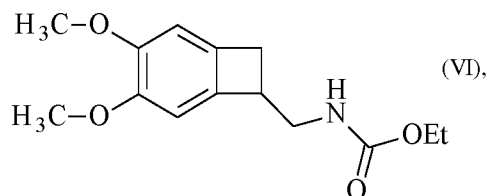
Brevetul EP 0 534 859 descrie sinteza compusului cu formula (III) prin reducerea nitrilului cu formula (IV):



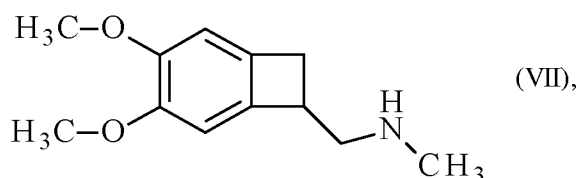
prin BH_3 în tetrahidrofuran, urmată de adăugarea acidului clorhidric, pentru a obține clorhidratul de amină racemică cu formula (V):



care este supus reacției cu cloroformiatul de etil pentru a obține carbamatul cu formula (VI):



- 5 reducerea căruia, prin LiAlH_4 , duce la obținerea aminei metilate racemice cu formula (VII):

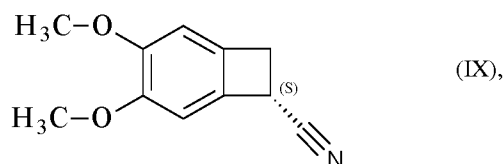


descompunerea căreia cu ajutorul acidului camforsulfonic duce la obținerea compusului cu formula (III).

- 10 Dezavantajul acestei metode constă în faptul că permite obținerea compusului cu formula (III) cu un randament foarte redus, de 2...3%, pornind de la nitrilul racemic cu formula (IV).

Acest randament foarte redus este determinat de randamentul redus (4...5%) al etapei de descompunere a aminei secundare cu formula (VII).

- 15 Brevetul EP 2 166 004 [2] descrie obținerea compusului cu formula (III) prin descompunerea optică a nitrilului racemic cu formula (IV) cu ajutorul cromatografiei chirale pentru a obține nitrilul optic pur cu formula (IX):



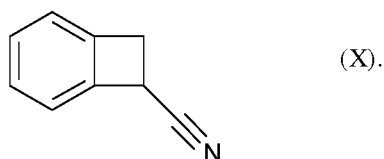
- 20 care este redus cu ajutorul NaBH_4 sau prin hidrogenare catalitică, pentru a obține amina primară cu formula (VIII).

Amina primară poate fi apoi metilată cu ajutorul aceleiași secvențe reacționale descrise mai sus (transformare în carbamat și apoi reducerea).

Compusul cu formula (III) poate fi obținut astfel în 5 etape pornind de la nitrilul racemic cu formula (IV), cu un randament de 45,6% pentru etapa de descompunere.

- 25 Utilizarea enzimelor hidrolitice de nitrilază (CE 3.5.5.1 în clasificarea internațională a enzimelor) s-a arătat a fi promițătoare pentru a permite obținerea directă a acidului optic pur cu formula (I) pornind de la nitrilul racemic cu formula (IV), astfel reducându-se numărul de etape pentru obținerea aminei metilate cu formula (III) pornind de la nitrilul racemic.

- 30 Nitrilul cu formula (X) a fost descris ca un substrat de nitrilaze din setul de screening NESK-1400 comercializat de compania Almac:



Cu toate acestea, utilizarea acestor nitrilaze pe nitril cu formula (IV) (a se vedea Exemplul comparativ A) a demonstrat că ele posedă o activitate redusă și puțină selectivitate, rezultând în majoritatea cazurilor în formarea simultană a amidei (activitatea nitril hidratatei) și acidului, care este dificil de exploatat în scopul obținerii

5 substanțelor intermediare în sinteza compusului cu formula (III).

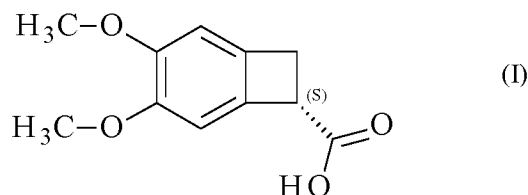
Prin urmare, problema prezentei invenții este de a găsi o nitrilază care ar permite sinteza enantioselectivă a acidului optic pur cu formula (I) pornind de la nitrilul racemic cu formula (IV), cu reducerea la minimum a formării amidei.

10 Solicitantul a găsit atunci dovadă a activității nitrilazei în diverse microorganisme întregi cu formarea preferențială a acidului cu formula (I), cu configurarea *S*. Dintre microorganismele testate, doar *Rhodococcus rhodochrous* a permis obținerea acidului (*S*) cu o enantioselectivitate foarte bună, fără formarea amidei (a se vedea Exemplul comparativ B).

Această activitate a fost îmbunătățită prin expresia în exces a nitrilazei.

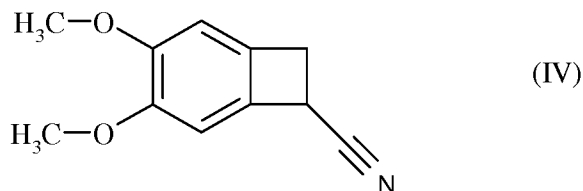
15 În mod surprinzător, hidroliza enzimatică cu utilizarea acestei nitrilaze exprimate în exces nu este enantioselectivă pentru substratul cu formula (X) (a se vedea Exemplul comparativ C).

În mod mai specific, prezenta invenție se referă la un procedeu de sinteză a compusului optic pur cu formula (I):



20

prin hidroliza enzimatică enantioselectivă a nitrilului racemic, sau non optic pur, cu formula (IV):



25 cu ajutorul nitrilazei *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 cu supraexpresie într-un alt organism având un sistem biologic competent, cum ar fi o bacterie, drojdie sau ciupercă, într-un amestec de solvent organic și soluție apoasă având un pH cuprins între 5 și 10, de preferință o soluție tampon având un pH cuprins între 5 și 10, într-o concentrație cuprinsă între 1 și 500 g, de preferință între 2 g și 100 g de nitril cu formula

30 (IV) pe litru de amestec de solvent, într-un raport E/S cuprins între 1/1 și 1/100, la o temperatură cuprinsă între 25 și 40°C.

Conform unui aspect al invenției, nitrilaza este exprimată în exces într-o bacterie ce cuprinde o plasmidă rearanjată, cum ar fi *Escherichia coli*, de preferință *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pLysS, *E. coli* BL21star(DE3) sau *E. coli* JM9(DE3).

35 Conform unui aspect al invenției, solventul organic este un solvent complet sau parțial miscibil cu apa, cum ar fi dimetilsulfoxidul, dimetilformamida, acetona, acetonitrilul, un alcool, cum ar fi etanolul sau izopropanolul, sau un eter, cum ar fi tetrahidrofurantul și eterul metil-terț-butilic.

40 Conform unui alt aspect al invenției, solventul organic nu este miscibil cu apa, de exemplu o hidrocarbură, cum ar fi heptan sau octan.

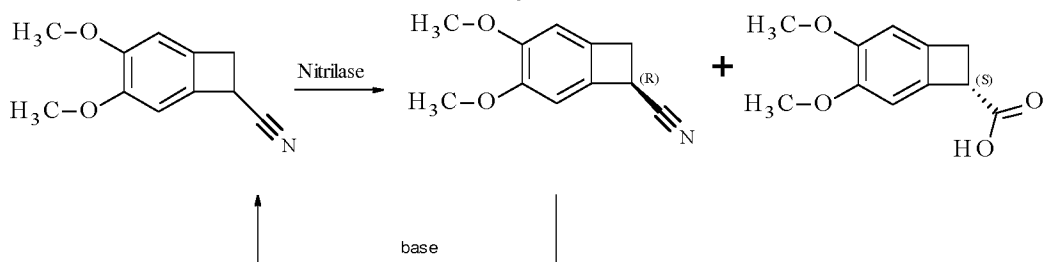
Soluția apoasă este, de preferință, o soluție tampon având un pH de circa 7.

Conform unui aspect al invenției, bacteriile care exprimă nitrilaza în exces sunt utilizate direct în procedeu, sub formă de suspensie bacteriană sau liofilizat.

45 Raportul E/S este, de preferință, cuprins între 1/1 și 1/10 în cazul unei suspensii bacteriene și între 1/10 și 1/20 în cazul unui liofilizat.

Conform unui alt aspect al invenției, nitrilaza este utilizată sub formă de enzimă purificată.

Schema hidrolizei enzimatică conform invenției este următoarea:



In mod avantajos, nitrilul de configurare (R) - produsul secundar al reacției, este racemizat prin acțiunea unei baze organice, cum ar fi diazabicycloundecenul sau a unei baze minerale, cum ar fi hidroxidul de sodiu, hidroxidul de potasiu, carbonatul de potasiu sau carbonatul de sodiu, pentru a fi reciclat în procesul de hidroliză enzimatică.

Atunci când etapa de racemizare este efectuată *in situ*, procedeul conform invenției este un procedeu de rezoluție cinetică dinamică (dynamic kinetic resolution (DKR)), care permite obținerea acidului S cu formula (I) cu un exces enantiomeric mai mare de 98%.

Acidul cu formula (I) este, de preferință, izolat din mediul de reacție după unul sau mai multe cicluri de hidroliză enzimatică.

Definiții

Prin compus optic pur se înțelege un compus cu un exces enantiomeric mai mare sau egal cu 90%.

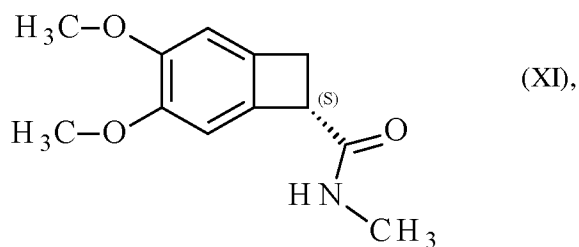
Prin nitril care nu este optic pur se înțelege un nitril cu un exces enantiomeric mai mic de 90%.

Prin nitril racemic se înțelege un nitril sub formă de un amestec din doi enantiomeri într-un raport cuprins între 55:45 și 45:55.

Prin hidroliza enantioselectivă a unui nitril racemic, non optic pur, se înțelege hidroliza preferențială a unuia dintre enantiomerii amestecului.

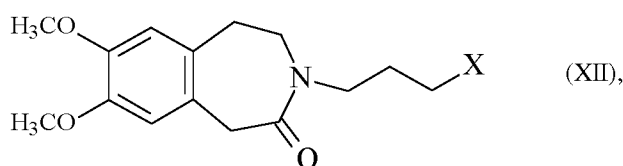
Prin sistem biologic competent se înțelege (a) specia(ile) biologică(e) (celulele gazdă), al cărei(or) material genetic a fost modificat prin recombinarea genetică ce o/le face capabilă(e) să producă o proteină recombinantă de interes. Un vector de expresie (plasmidă) creat pentru acest scop permite transferarea ADN-ului care codifică gena de interes în celula gazdă, care poate astfel să exprime (în exces) în mod eficient proteina funcțională.

Un alt aspect al invenției se referă la un procedeu de sinteză a compusului cu formula (III) în doar două etape, pornind de la acidul optic pur cu formula (I), care este transformat în amidă optic pură cu formula (XI):



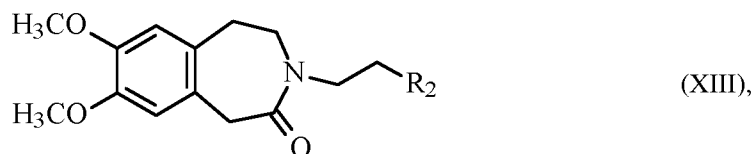
reducerea căreia, preferabil prin BH_3 , NaBH_4 sau LiAlH_4 , duce la obținerea compusului cu formula (III).

Compusul cu formula (III) este ulterior fie cuplat cu un compus cu formula (XII):



unde X reprezintă un atom de halogen, de preferință, un atom de iod,

fie este supus unei reacții de aminare reductivă cu un compus cu formula (XIII) în prezența unui agent reducător:



unde R_2 reprezintă o grupă selectată din CHO și CHR_3R_4 ,

- 5 unde R_3 și R_4 reprezintă fiecare o grupă (C_1 - C_6)alcoxi liniară sau ramificată sau formează, împreună cu atomul de carbon care le poartă, un ciclu 1,3-dioxan, 1,3-dioxolan sau 1,3-dioxepan,

10 pentru a duce la obținerea ivabradinei, care este apoi transformată într-o sare de adiție cu un acid acceptabil farmaceutic, unde sarea menționată este sub formă anhidră sau de hidrat.

Compusul cu formula (III) poate fi de asemenea utilizat în reacția de aminare reductivă sub formă de sarea sa de adiție cu un acid acceptabil farmaceutic, de preferință, clorhidratul său. În acest caz, ivabradina este obținută direct sub formă de clorhidrat.

- 15 Printre acizii acceptabili farmaceutic pot fi menționați, fără a se limita la acidul clorhidric, bromhidric, sulfuric, fosforic, acetic, trifluoroacetic, lactic, piruvic, malonic, succinic, glutaric, fumaric, tartric, maleic, citric, ascorbic, oxalic, metansulfonic, benzensulfonic și camforic.

- 20 Printre agenții reducători care pot fi utilizați pentru reacția de aminare reductivă între compusul cu formula (III) și compusul cu formula (XIII) pot fi menționați, fără a se limita la compușii donori de hidrură, cum sunt triacetoxiborohidru de sodiu sau cianoborohidru de sodiu, și dihidrogenul în prezența unui catalizator, cum este paladiul, platina, nichelul, ruteniul, rodiul sau un compus al acestora, în special pe un suport sau sub formă de oxizi.

- 25 Agentul reducător preferat pentru reacția de aminare reductivă între compusul cu formula (III) și compusul cu formula (XIII) este dihidrogenul catalizat de paladiu pe carbon.

Exemplele de mai jos ilustrează invenția.

Abrevieri

- 30 ATF - acidul trifluoroacetic
CSS - cromatografia în strat subțire
DBU – diazabicycloundecen
RCD - rezoluție cinetică dinamică
DMF - dimetilformamidă
35 DMSO - dimetilsulfoxid
OD - densitatea optică
E - coeficientul de enantioselectivitate
ee - exces enantiomeric
ech - echivalent molar
40 HPLC - High Performance Liquid Chromatography (Cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță)
IPTG - izopropil β -D-1-tiogalactopiranozidă
BL - mediu de cultură din bulion de lizogen
MeOH - metanol
45 MTBE - eter metil-terț-butilic
op - puritate optică sau enantiomerică
raportul E/S - raportul Enzimă/Substrat, exprimat în (g/g)
RMN - Rezonanță magnetică nucleară (spectroscopie)
SM - spectrometrie de masă
50 THF - tetrahidrofuran
TMS - tetrametilsilan

EXEMPLUL 1: Acid (7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carboxilicExprimarea în exces a nitrilazei

Proteina nitrilază *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 este descrisă în bazele de date ale proteinelor și genomilor. Secvența genei cercetate este înscrisă sub identificatorul SVA (Sequence Version Archive) "EF467367" în ENA (European Nucleotide Archive – Arhiva europeană a nucleotidelor) a EMBL-Bank. Această secvență corespunde referinței "A4LA85" în baza de date UniProtKB/TrEMBL.

A fost utilizată tulpina de producție *E. coli* BL21(DE3), transformată cu vectorul de expresie pET28a-Nit1.

Protocolul de exprimare în exces a nitrilazei este descris în Applied Biochemistry and Biotechnology 2010, vol. 160 (2), p. 393-400.

Celulele transformate astfel sunt fie utilizate direct sub formă de suspensie bacteriană, fie liofilizate înainte de utilizare.

Hidroliza enzimatică cu nitrilaza exprimată în exces.

Celulele transformate conform protocolului menționat sunt amestecate într-o concentrație de $5,6 \times 10^9$ celule/ml (1ml de cultură la DO=1 (600 nm) corespunde cu $1,10^9$ bacterii și circa 10 mg de suspensie bacteriană sau 1,5 mg de liofilizat).

La o soluție de 250 ml de soluție tampon de fosfat $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1/15 M la pH 7 se adaugă 1 g de liofilizat de *E. coli* și 500 mg ($c=2$ g/l, 10mM) de 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carbonitril în 2% de DMSO (5 ml).

Amestecul reacției este menținut la 30°C, fiind agitat rotativ la 220 rpm, timp de 6 ore.

Reacția este monitorizată prin HPLC în fază chirală în condiții ce permit determinarea excesului enantiomeric al acidului și nitrilului:

Coloana chiripak IB

90% n-hexan 10% 2-PrOH + 0,1% ATF

1 ml/min 30°C 288 nm

	% nitril	ee (nitril)	% acid	ee (acid)	transformare	E
6 ore	49,9	94	50,1	97	0,49	>100

* coeficientul de enantioselectivitate $E = \ln[1-c(1+ee(\text{acid}))] / \ln[1-c(1-ee(\text{acid}))]$

Cromatograma HPLC în fază chirală după 6 ore este arătată în Figura 1.

După ce s-a aflat în reacție timp de 6 ore, amestecul reacției este oxidat cu HCl 1M pentru a obține un pH (pH 2) extrem de acid și apoi este extras cu 2 x 100 ml de diclormetan. Faza organică este înlăturată. A doua extragere cu ajutorul toluenului (2 x 100 ml) permite extragerea întregului produs rămas în fază apoasă. Fazele organice sunt spălate cu soluție saturată de NaCl și apoi sunt uscate cu ajutorul sulfatului de magneziu anhidru. După evaporarea solvenților, este obținut produsul în stare brută, care este purificat prin cromatografia flash pe coloana de siliciu în următoarele condiții:

Tipul coloanei: 80 g SiOH Macherey-Nagel

Materialul și metoda: Reveleris®

Eluantul: Izocratic (ciclohexan + 1% acid acetic / acetat de etil + 1% acid acetic 75/25)

Detectarea: UV 288 nm

Viteza de curgere: 60 ml/min

Rezultatul:

Nitril (R): randament 36% (179 mg), ee (R): 96%

Acid (S): randament 39% (246 mg), ee (S): 96%

EXEMPLUL 2: 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carbonitril prin racemizarea nitrilului (R)

Se transferă 100 mg de (R)-(3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il)nitril (0,53 mmol), 5 ml de izopropanol și 121 mg de DBU (1,5 ech.) într-un balon prevăzut cu un condensator și un agitator magnetic. Se încălzește timp de 2 ore la 65°C și apoi se lasă să revină la temperatura ambiantă. Se filtrează pentru a obține compusul indicat în denumire.

EXEMPLUL 3: (7S)-3,4-dimetoxi-N-metilbicio[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carboxamidă

Se pune în suspensie acidul (7S)-3,4-dimetoxibicio[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carboxilic obținut în Exemplul 1 (300 mg) în THF (3 ml) la temperatura ambiantă și
5 apoi se adaugă trietilamină (200 μl). Se adaugă lent cloroformiat de etil (150 μl) la amestec. Amestecul reacției se precipită (amestecul I).

Intr-un alt balon, metilamina în formă de soluție 2M în THF (2,25 ml) se agită cu apă (1 ml) și trietilamină (300 μl). Se menține agitarea timp de 20 minute, apoi amestecul rezultat se adaugă la amestecul I și se agită la temperatura ambiantă timp de o
10 noapte.

Amestecul reacției este apoi evaporat și purificat prin HPLC preparativă.

Se obține (7S)-3,4-dimetoxi-N-metilbicio[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carboxamidă cu un randament de 60%.

¹H RMN (DMSO-d₆, ppm / TMS) = 2,61 (m; 3H); 3,16 (m; 2H); 3,71 (s; 6H); 4,05
15 (m; 1H); 6,78 (s; 1H); 6,81 (s; 1H); 7,78 (br s; 1H).

EXEMPLUL 4: (7S)-3,4-dimetoxibicio[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il] N-metil metanamină

Se pune în suspensie (7S)-3,4-dimetoxi-N-metilbicio[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carboxamida obținută în Exemplul 3 (450 mg) în tetrahidrofuran (20 ml), apoi la
20 amestecul reacției se adaugă lent 1,6 ml de soluție LiAlH₄ 2M în tetrahidrofuran la temperatura ambiantă. Se observă o degajare puternică a gazului și amestecul reacției devine limpede. Se încălzește amestecul reacției la reflux timp de 30 minute.

După reîntoarcerea la temperatura ambiantă, se hidrolizează și apoi se extrage cu acetat de etil. Se usucă pe MgSO₄ și apoi se evaporă. Precipitatul obținut este purificat
25 prin HPLC preparativă (eluant: apă/acetonitril/acid trifluoracetic de la 98/2/0,2 până la 20/80/0,2) timp de 30 minute pentru a obține produsul indicat în denumire cu un randament de 46%.

¹H RMN (DMSO-d₆, ppm / TMS) = 2,60 (m; 3H); 2,85 (m; 1H); 3,15 (m; 1H); 3,25 (dd; 1H); 3,30 (m; 1H); 3,62 (m; 1H); 3,70 (s; 6H); 6,82 (s; 1H); 6,89 (s; 1H); 8,48 (br
30 s; 1H).

EXEMPLUL 5: (7S)-3,4-dimetoxibicio[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il] N-metil metanamină, clorhidrat

Se adaugă 20 ml de soluție molară de BH₃ în tetrahidrofuran, la temperatura ambiantă, la un amestec de 2,2 g (10 mmol) de (7S)-3,4-dimetoxi-N-metilbicio[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carboxamidă obținută în Exemplul 3 în 45 ml de
35 tetrahidrofuran. După agitare timp de 1 oră, se adaugă 10 ml de soluție de BH₃ în tetrahidrofuran. După agitare timp de o noapte la temperatura ambiantă, se adaugă 20 ml de etanol prin picurare și amestecul se agită până când nu se mai degajă gaz (circa 1 oră). Apoi se adaugă prin picurare 20 ml de soluție de acid clorhidric în etanol. După
40 agitarea timp de 4 ore, precipitatul obținut (1,2 g de produsul indicat în denumire) este filtrat. Filtratul este concentrat, obținându-se o cantitate suplimentară de 0,65 g de produsul indicat în denumire prin solidificarea acestuia într-un amestec de acetat de etil/etanol 80/20.

Cele două precipitate sunt combinate pentru a obține 1,85 g de produsul indicat în denumire (randament: 77%).
45

EXEMPLUL 6: Clorhidrat de ivabradină

Se încarcă într-o autoclavă 5,5 kg de 3-[2-(1,3-dioxolan-2-il)etil]-7,8-dimetoxi-1,3-dihidro-2H-3-benzazepin-2-onă, 27,5 litri de etanol și 550 g de paladiu-pe-carbon.

Se purifică cu azot și apoi cu hidrogen, se încălzește până la 55°C, apoi se
50 hidrogenează la această temperatură sub o presiune de 5 bari până la absorbția cantității teoretice de hidrogen. Apoi se readuce la temperatura ambiantă și se reduce presiunea în autoclavă. Se adaugă 4 kg de clorhidrat de (7S)-3,4-dimetoxibicio[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il] N-metil metanamină, 11 litri de etanol, 5,5 litri de apă și 1 kg de paladiu-pe-carbon.

Se purifică cu azot, apoi cu hidrogen, se încălzește până la 85°C, se hidrogenează la această temperatură sub o presiune de 30 bari până la absorbția cantității teoretice de hidrogen. Apoi se readuce la temperatura ambiantă, se curăță autoclava și se filtrează amestecul reacției; se distilează solvenții și se izolează clorhidratul de ivabradină prin
55 cristalizare dintr-un amestec de toluen/1-metil-2-pirolidinonă.

Clorhidratul de ivabradină este obținut cu un randament de 85% și o puritate chimică mai mare de 99%.

EXEMPLUL COMPARATIV A: Screening-ul nitrilazelor comerciale pentru hidroliza enzimatică a 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carbonitrilului

Se cântărește nitrilaza studiată (15 mg), sub formă de liofilizat, într-o eprubetă, apoi se adaugă 4 ml de soluție tampon 0,1 M KH_2PO_4 cu pH=7 și 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carbonitril (20 mg) dizolvat în 100 μl de DMSO.

Se pune în incubator la 28°C și 220 rpm.

Viteza de transformare a fost măsurată prin HPLC după 24 ore și 72 ore.

Nitrilazele NIT 101, NIT 102, NIT 103, NIT 104, NIT 105, NIT 106, NIT 108, NIT 109, NIT 111, NIT 112 și NIT 113 (Almac) nu hidrolizează nitrilul după 24 ore (nicio formare de acid sau amidă).

Rezultatele obținute cu nitrilazele NIT 107, NIT 110, NIT 114 și NIT 115 (Almac) sunt rezumate în tabelul de mai jos:

Nitrilază	72 ore		
	Amidă	Acid	Nitril
NIT 107	23%	16%	61%
NIT 110	24%	15%	61%
NIT 114	21%	22%	57%
NIT 115	7%	47%	46%

Condiții analitice:

Coloana Phenomenex LUNA HST 50*3 C18(2) 2,5 μm

0% până la 100% B în 8 min 0,8 ml/min 40°C

A (1000 apă+25 ACN+1 ATF)

B (1000 ACN+25 apă+1 ATF)

Nitrilaza NIT 115 a fost apoi utilizată într-un alt studiu pentru a determina dacă hidroliza nitrilului este enantioselectivă.

Nitrilaza NIT 115 (12 mg; Almac) a fost utilizată în 6 ml [2 mg/ml] de soluție tampon.

S-a adăugat 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carbonitril pentru a atinge o concentrație finală de 4 mg/ml a acesteia.

Enantioselectivitatea a fost măsurată prin HPLC folosind următoarele condiții analitice:

Coloana Chiralpak IC 250*4,6

30% etanol pur + 0,1% ATF + 70% heptan + 0,1% ATF

1 ml/min 30°C 288 nm

Notă: În aceste condiții, enantiomerii acidului sunt separați, însă nu cei ai nitrilului.

Cromatograma obținută după 5 ore de reacție este prezentată în fig. 2.

Concluzie: Nu s-a observat nicio enantioselectivitate.

EXEMPLUL COMPARATIV B: Screening-ul nitrilazelor de tulpini bacteriene și fungice pentru hidroliza enzimatică a 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carbonitrilului

Un studiu în care se utilizează mai mulți inductori bacterieni (propionitril, benzonitril, 4-bromobenzonitril) a demonstrat că propionitrilul a permis cea mai bună inducere a activității nitrilazei cu 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carbonitril.

Tulpinile bacteriene au fost induse cu propionitril la 72mM timp de 72 ore, iar celulele au fost extrase în 50 ml (concentrate de două ori, conc. 10 mg de celule per ml) de soluție tampon de fosfat 0,1M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ cu pH=7,3 cu adaos de 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carbonitril într-o concentrație de 10mM în 2% de DMSO v/v_{final}.

Tulpinile fungice au fost induse cu valeronitril.

Toate amestecurile reacției au fost agitate la 220 rpm la 30°C în cazul bacteriilor și la 27°C în cazul ciupercilor și monitorizate timp de 96 ore prin HPLC în fază inversă și prin HPLC în fază chirală conform metodelor descrise mai jos.

Analiza fazei inverse

Coloana Phenomenex LUNA HST 50*3 C18(2) 2,5 µm

0% B până la 100% B în 8 min 0,8 ml/min 40°C

A (1000 apă+25 ACN+1 ATF)

5 B (1000 ACN+25 apă +1 ATF)

Analiza în fază chirală

Coloana Chiralpak IC 250*4,6

30% etanol pur + 0,1% ATF + 70% heptan + 0,1% ATF

10 1 ml/min 30°C 288 nm

Rezultatele obținute sunt rezumate în tabelul de mai jos:

MICROORGANISME	% compuși formați după 96 ore		
	Nitril rezidual	Amidă	Acid
<i>Rhodococcus erythropolis</i> NCIMB11215	23	42	35 (S)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB11216	65	/	35 (S)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB11273	100	/	/
<i>Rhodococcus rhodnii</i> NCIMB11279	100	/	/
<i>Aspergillus niger</i> BO	95	/	< 5
<i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 315	95	/	< 5
<i>Cunninghamella elegans</i> NRRL 1392	95	/	< 5
<i>Rhizopus nigricans</i> NRRL 1477	95	/	< 5
<i>Absidia cylindrospora</i> MMP 1569	95	/	< 5
<i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757	95	/	< 5
<i>Mucor plumbeus</i> ATCC 4740	95	/	< 5
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	86	/	14
<i>Stibella fimetaria</i> CBS 548-84	100	/	/
<i>Stibella fimetaria</i> CBS 511-67	100	/	/
<i>Stibella fimetaria</i> CBS 294-81	100	/	/

EXEMPLUL COMPARATIV C: Hidroliza enzimatică a biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carbonitrilului cu utilizarea nitrilazei exprimate în exces de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216

15 Placare pe LB+agar+kanamicină, incubare statică la 37°C timp de 24 ore (tulpină 11216 de nitrilază a *E. coli* recombinantă).

20 Precultură în 5 ml de LB+kanamicină (50 mg/l), incubare la 37°C, 180 rpm timp de o noapte.

Cultură: se transferă 50 ml de LB și 500 µl de precultură în baloane Erlenmeyer de 250 ml fără despărțituri, incubare la 28°C, 160 rpm până ce DO este egală cu 0,6 (adică circa 4 ore).

Inducere cu IPTG (0,5mM), incubare la 17°C, 160 rpm timp de o noapte (17 ore).

25 Testul de activitate: se centrifughează culturile la 4°C, 6000 rpm timp de 20 minute, se repune în suspensie amestecul în 10 ml de soluție tampon de fosfat 0,1M cu pH-ul 7. Se adaugă biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carbonitril (10mM) + 2 % etanol. Se incubează la 220 rpm, 30°C.

30 Notă: Dacă cultura este într-o cantitate mai mare de 50 ml în timpul centrifugării, se extrag 50 ml și se efectuează testul de activitate cu ajutorul unei suspensii de 50 ml de cultură.

Monitorizarea hidrolizei prin cromatografia chirală: la 45 minute și 2 ore.

Coloană: Phenomenex® LUNA HST 50*3 C18(2) 2,5 µm

Eluant: A +B (de la 0% până la 100% B în 8 minute)

35 A: 1000 apă+25 ACN+1 ATF

B: 1000 ACN+25 apă+1 ATF

0,8 ml/min - 40°C - UV 210 nm

Rezultate:

Durata	Nitril	Acid carboxilic
45 minute	50%	50%
2 ore	0%	100%

Monitorizarea prin cromatografia chirală demonstrează că reacția nu este enantioselectivă.

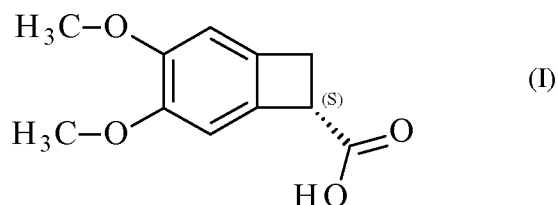
5

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

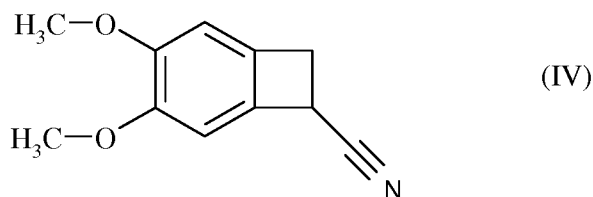
1. EP 0534859 B1 1994.11.17
2. EP 2166004 B1 2010.10.06

(57) Revendicări:

1. Procedeu de sinteză a compusului optic pur cu formula (I):



prin hidroliza enzimatică enantioselectivă a nitrilului racemic, sau non optic pur cu formula (IV):



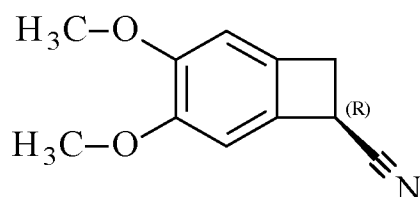
cu ajutorul nitrilazei *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 cu supraexpresie într-un alt organism care are un sistem biologic competent, într-un amestec de solvent organic și soluție apoasă având un pH cuprins între 5 și 10, într-o concentrație cuprinsă între 1 și 500 g de nitril cu formula (IV) pe litru de amestec de solvenți, într-un raport E/S cuprins între 1/1 și 1/100, la o temperatură cuprinsă între 25 și 40°C.

2. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** organismul care are un sistem biologic competent este o bacterie ce conține o plasmidă rearanjată.

3. Procedeu, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** bacteriile care exprimă nitrilaza în exces sunt utilizate direct, sub formă de suspensie bacteriană sau liofilizat.

4. Procedeu, conform oricăreia dintre revendicările 1 - 3, **caracterizat prin aceea că** solventul organic este selectat dintre dimetilsulfoxid, dimetilformamidă, acetonă, acetonitril, etanol, izopropanol, tetrahidrofuran și eter metil-terț-butilic.

5. Procedeu, conform oricăreia dintre revendicările 1 - 4, **caracterizat prin aceea că** nitrilul de configurare (R), produsul secundar al reacției:



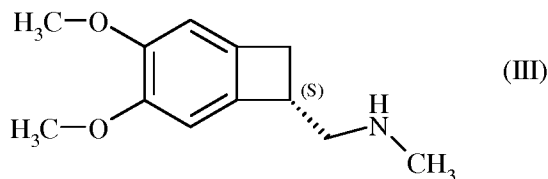
este racemizat prin acțiunea unei baze în nitrilul racemic cu formula (IV) pentru a fi reciclat în procedeul de hidroliză enzimatică.

6. Procedeu, conform revendicării 5, **caracterizat prin aceea că** baza este diazabicycloundecen.

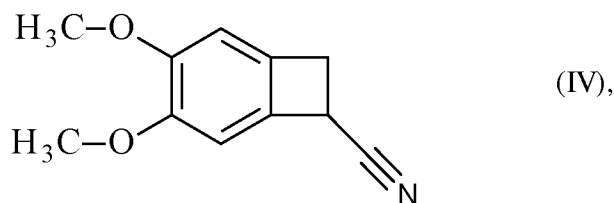
7. Procedeu, conform revendicării 5 sau 6, **caracterizat prin aceea că** etapa de racemizare se efectuează *in situ*.

8. Procedeu, conform oricăreia dintre revendicările 5 - 7, **caracterizat prin aceea că** acidul cu formula (I) este izolat după unul sau mai multe cicluri de hidroliză enzimatică.

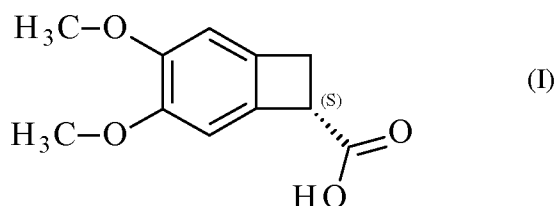
9. Procedeu de sinteză a compusului cu formula (III):



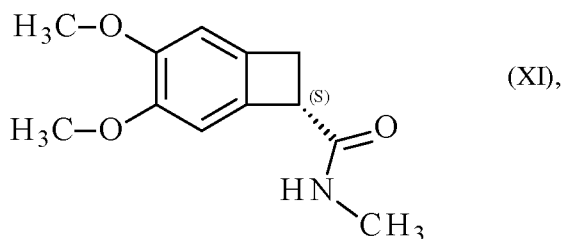
pornind de la nitrilul cu formula (IV):



care este hidrolizat pentru a forma acidul optic pur cu formula (I):



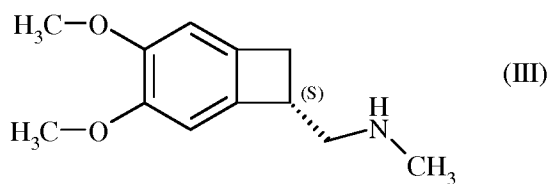
conform oricăreia dintre revendicările 1 - 8,
care este apoi transformat în amidă optic pură cu formula (XI):



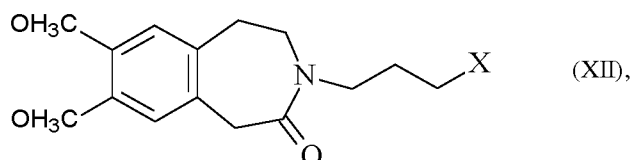
reducerea căreia duce la obținerea compusului cu formula (III).

10. Procedeu, conform revendicării 9, **caracterizat prin aceea că** reducerea compusului cu formula (XI) pentru a forma compusul cu formula (III) se efectuează cu BH_3 , NaBH_4 sau LiAlH_4 .

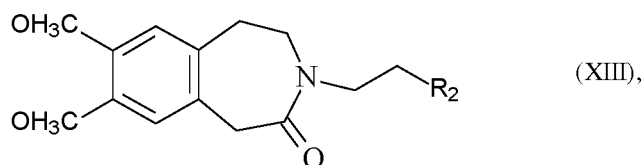
11. Procedeu de sinteză a ivabradinei, **caracterizat prin aceea că** compusul cu formula (III):



obținut conform revendicării 9, este fie cuplat cu un compus cu formula (XII):



unde X reprezintă un atom de halogen,
fie este supus unei reacții de aminare reductivă cu un compus cu formula (XIII) în prezența unui agent reducător:



unde R_2 reprezintă o grupă selectată dintre CHO și CHR_3R_4 ,
unde R_3 și R_4 reprezintă fiecare o grupă alcoxi (C_1-C_6) liniară sau ramificată sau formează împreună cu atomul de carbon care le poartă un ciclu 1,3-dioxan, 1,3-dioxolan sau 1,3-dioxepan,
pentru a obține ivabradina, care poate fi transformată într-o sare de adiție cu un acid acceptabil farmaceutic sub formă anhidră sau de hidrat.

12. Procedeu, conform revendicării 11, unde X este un atom de iod.

13. Procedeu, conform revendicării 11, unde compusul cu formula (III) este utilizat în reacția de aminare reductivă sub formă de clorhidratul său pentru a obține ivabradina sub formă de clorhidrat.

14. Procedeu, conform revendicării 11 sau 13, unde reacția de aminare reductivă cu compusul cu formula (XIII) se efectuează în prezența dihidrogenului catalizat de paladiu pe carbon.

Șef Direcție Brevete:

GUȘAN Ala

Examinator:

LEVIȚCHI Svetlana

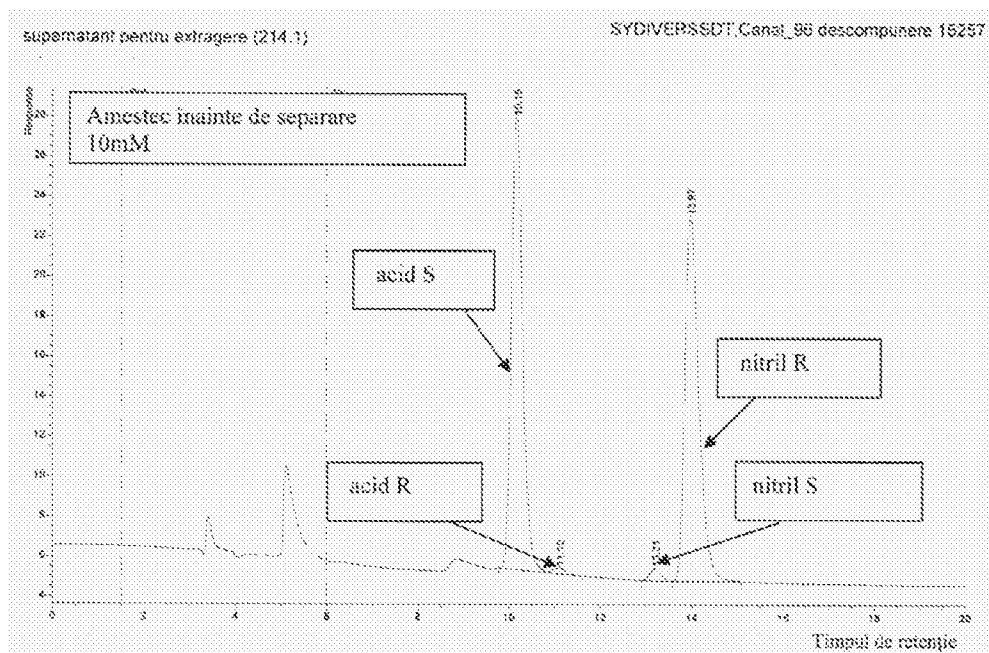


Fig. 1

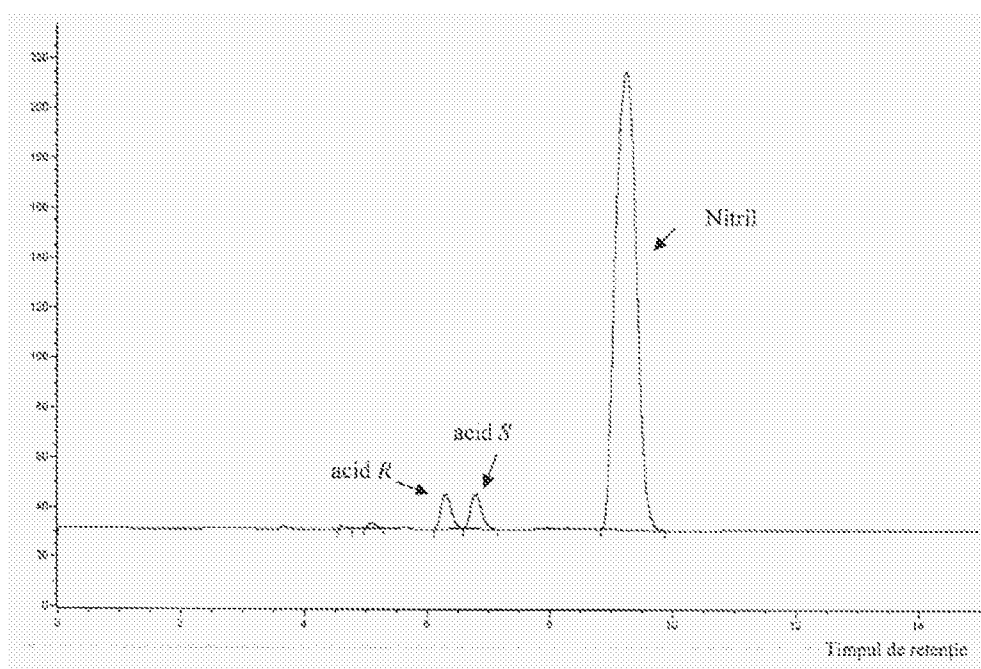


Fig. 2

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2014 0015 (32) Data de prioritate recunoscută: 2013.02.28
 (22) Data depozit: 2014.02.24 Raport de documentare internațională: ☐ da
 (71) Solicitant: **LES LABORATOIRES SERVIER, FR**
 (54) **Titlul: Procedeu de sinteză enzimatică a acidului (7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-carboxilic și aplicarea acestuia în sinteza ivabradinei și a sărurilor sale**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** **C07C 51/08** (2006.01) **C07B 53/00** (2006.01)
C07C 62/34 (2006.01) **C07B 57/00** (2006.01)
C12P 41/00 (2006.01) **C07D 223/16** (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta):

a) **C07C 51/08 C07C 62/34 C12P 41/00 C12P 7/40 C07B 53/00 C07B 57/00 C07D 223/16**
 b) termeni caracteristici în limba română: „hidroliza enzimatică”, „optic pur”, nitril, „acid carboxilic”, „metil metanamină”, carboxamidă, dimetoxibiciclo, ivabradină

"Worldwide" (Espacenet):

a) **C07C 51/08 C07C 62/34 C12P 41/00 C12P 7/40 C07B 53/00 C07B 57/00 C07D 223/16**
 b) termeni caracteristici în limba engleză: «dimethoxybicyclo carboxylic», «dimethoxybicyclo carbonitrile», «enzymatic hydrolysis», «optically pure», methyl methanamine, cyclobutane, carboxamide, ivabradine

EA, CIS (Eapatis), FIPS(RU), SU:

a) **C07C 51/08 C07C 62/34 C12P 41/00 C12P 7/40 C07B 53/00 C07B 57/00 C07D 223/16**
 b) termeni caracteristici în limba rusă: «диметоксибицикло карбоновая кислота», «диметоксибицикло карбонитрил», «ферментативный гидролиз», «оптически чистый», метилметанамин, циклобутан, карбоксамид, ивабрадин

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

1. Gradley M., Deverson C., Knowles C. Asymmetric hydrolysis of R-(-), S(+)-2-methylbutyronitrile by Rhodococcus rhodochrous NCIMB 11216. Archives of Microbiology, 1994, vol. 161, nr. 3, p. 246-251
2. Hoyle A., Bunch A., Knowles C. The nitrilases of Rhodococcus rhodochrous NCIMB 11216. Enzyme and Microbial Technology, 1998, vol. 23, nr. 7-8, p. 475-482

--

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	EP 0534859 B1 1994.11.17	1-14
A, D, C	EP 2166004 B1 2010.10.06	1-14
A	WO 2011138625 A1 2011.11.10	1-14
A	DE 10010149 A1 2001.09.06	1-14
A	WO 2007071578 A2 2007.06.28	1
A	Gradley M., Deverson C., Knowles C. Asymmetric hydrolysis of R-(-), S(+)-2-methylbutyronitrile by <i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB 11216. Archives of Microbiology, 1994, vol. 161, nr. 3, p. 246-251	1
A	Hoyle A., Bunch A., Knowles C. The nitrilases of <i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB 11216. Enzyme and Microbial Technology, 1998, vol. 23, nr. 7-8, p. 475-482	1
A	EP 0610049 B1 1999.11.03	1

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării	2016.04.12
Examinator	LEVIȚCHI Svetlana