

①②

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②② **Date de dépôt** : 19.03.98.

③③ **Priorité** :

④③ **Date de mise à la disposition du public de la demande** : 24.09.99 Bulletin 99/38.

⑤⑥ **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire** : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥⑥ **Références à d'autres documents nationaux apparentés** :

⑦① **Demandeur(s)** : HOECHST MARION ROUSSEL  
*Société anonyme* — FR.

⑦② **Inventeur(s)** : AZERAD ROBERT, BITON JACQUES  
et LACROIX ISABELLE.

⑦③ **Titulaire(s)** :

⑦④ **Mandataire(s)** : HOECHST MARION ROUSSEL.

⑤④ **NOUVEAU PROCÉDE DE PREPARATION DE LA FEXOFENADINE.**

⑤⑦ L'invention a pour objet un procédé de préparation de la Fexofénadine à partir de la Terfenadine par une méthode de bioconversion en utilisant la souche *Absidia corymbifera* LCP 63-1800 ou *Streptomyces platensis* NRRL 2364.

**FR 2 776 302 - A1**



La présente invention a pour objet un nouveau procédé de préparation de la Fexofénadine.

La Fexofénadine est un médicament qui possède une activité antihistaminique significative et qui est dépourvu  
5 d'effets secondaires. (Efficacy and safety of Fexofenadine hydrochloride for treatment of seasonal allergic rhinitis, Bernstein D.I. et al, Ann. Allergy-Asthma-Immunol. (1997) 79(5) 443-448.

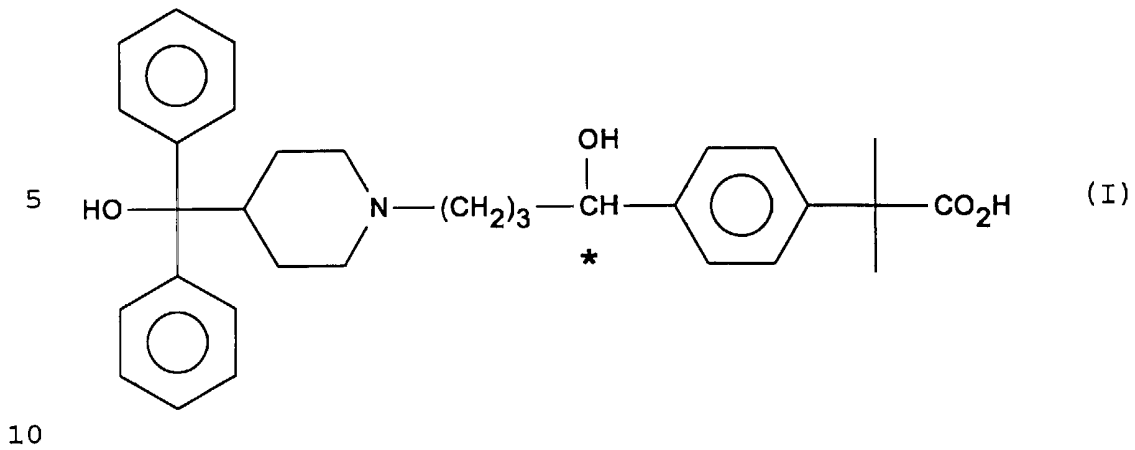
Ce composé est le principal métabolite de la Terfena-  
10 dine, lui-même agent antihistaminique (D. Mc Tavish, KL Goa et M. Ferill, "terfenadine : an updated review of its pharmacological properties and therapeutic efficiency, Drug 39, 552-574 (1989)).

La Fexofénadine est actuellement préparée par voie  
15 chimique, en de nombreuses étapes avec un rendement inférieur à 10 % (Brevets US 5.578.610 et 5.581.011).

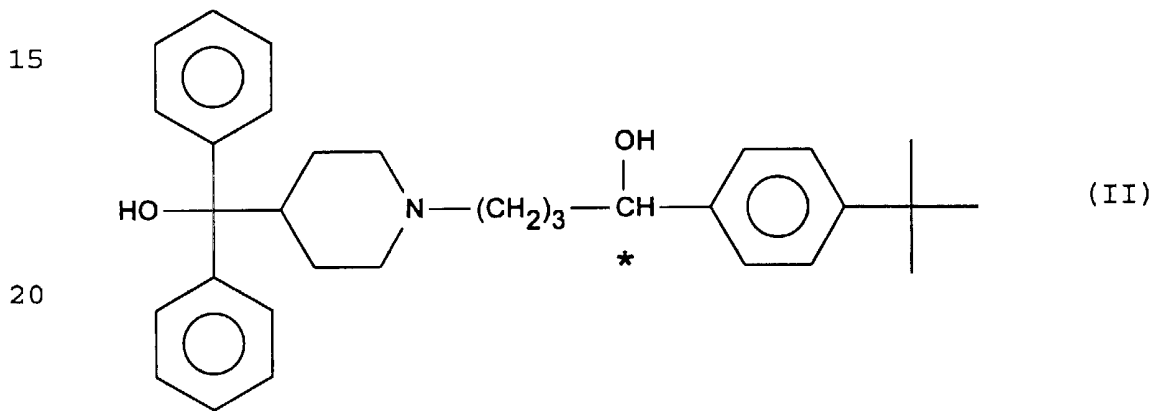
La demanderesse se propose donc de trouver une autre voie de synthèse de la Fexofénadine. Le choix s'est alors porté sur une méthode de bioconversion en utilisant l'une des  
20 deux souches de microorganisme très spécifiques suivantes : soit le champignon filamenteux *Absidia corymbifera* LCP 63-1800, soit le *Streptomyces platensis* NRRL 2364.

La spécificité de la bioconversion avec ces souches était  
25 inattendue : parmi de nombreuses souches étudiées lors d'un screening, ce sont les seules qui permettent l'obtention de la Fexofénadine avec un bon rendement et peu ou pas de produits secondaires.

L'invention a pour objet un procédé de préparation des  
30 composés de formule (I) :



caractérisé en ce qu'on effectue une bioconversion du ou des composés de formule (II) :



25 avec soit une culture d'*Absidia corymbifera* LCP 63-1800, soit une culture de *Streptomyces platensis* NRRL 2364, à un pH compris entre 5,0 et 8,0, afin d'obtenir le ou les composés de formule (I) attendus, qui le cas échéant sont isolés, purifiés et/ou salifiés, les composés de formules (I) ou (II) 30 pouvant être sous les deux formes énantiomères possibles, isolées ou en mélanges. L'astérisque indique la position du carbone asymétrique.

La Fexofénadine est un mélange racémique des énantiomères de formule (I). Le procédé a donc plus particulièrement 35 pour objet le procédé tel que décrit précédemment dans lequel on effectue une bioconversion de la Terfenadine, correspondant à un mélange racémique des deux énantiomères de formule (II), afin d'obtenir la Fexofénadine.

Ce procédé présente de nombreux avantages. D'une part, il évite la voie chimique qui nécessite de nombreuses étapes de synthèses accompagnées des procédés d'isolement nécessaires à chacune de ces étapes réactionnelles. Dans le cas  
5 d'une industrialisation, cette voie peut s'avérer coûteuse et polluante.

Dans le cas du procédé objet de cette demande, une seule opération est nécessaire et l'étape de purification éventuelle n'a essentiellement pour objet que d'éliminer un  
10 produit secondaire qui peut se former lors de la bioconversion, à savoir le triolphosphate qui correspond à l'alcool non encore oxydé en acide, estérifié sous la forme d'un phosphate (formule (IIIb)) décrit plus bas.

*Absidia corymbifera* LCP 63-1800 est accessible au  
15 Laboratoire de Cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris.

D'autre part ce procédé se prête bien à l'industrialisation. En opérant avec une concentration de produit de départ de 0,5 g/l, le rendement dépasse les 70 % par rapport  
20 au produit de départ.

Parmi les autres avantages de l'utilisation de la voie microbiologique par rapport à la voie chimique, on peut souligner l'aspect non polluant de cette technique, toutes les opérations s'effectuant en milieux aqueux.

25 La purification s'effectue selon les méthodes connues de l'homme du métier. Il peut s'agir d'une purification par cristallisation, par chromatographie ou par résine échangeuse d'ions.

Les réactions de salification peuvent être effectuées  
30 dans des conditions usuelles. On opère par exemple en présence de soude éthanolique. On peut également utiliser un sel de sodium tel que le carbonate ou le carbonate acide de sodium ou de potassium. Les sels obtenus peuvent être des sels de métaux alcalins ou alcalinoterreux ou d'ammonium  
35 éventuellement substitué.

La mise en oeuvre de l'oxydation s'effectue selon les méthodes qu'on applique couramment pour l'oxydation microbiologique des molécules organiques à l'aide de cultures de

champignons filamenteux (Holland HL, Organic synthesis with oxidative enzymes. VCH publisher, Inc, New York 1992 ; Lacroix I, Biton J and Azerad R, Microbial biotransformation of a synthetic immunomodulating agent HR325, Bioorg. Med. Chem. (1997) 7, 1369-1380 ; Sebek OK, Fungal transformations as a useful method for the organic synthesis of organic compounds, Mycologia 75(2) 383-394, 1983 ; Smith RV and Rosazza JP, Microbial transformation as a mean of preparing mammalian drug metabolites, Microbial Transformation of Bioactive Compounds, Vol. II (Ed Rosazza JP) pages 1-42 CRC Press, Boca Raton, Fl 1982).

Ainsi, on détermine tout d'abord par voie analytique, en particulier par chromatographie en couche mince ou HPLC, dans des essais préalables, les conditions de fermentation les plus favorables, comme par exemple le choix du milieu nutritif, du solvant de substrat approprié, de la concentration de substrat, des conditions techniques telles que la température, aération, pH, et des périodes optimum pour la culture, l'addition de substrat et le contact du substrat avec le microorganisme.

Dans une première phase, on effectue la culture à partir d'un inoculum (spores ou mycelium) d'*A. corymbifera* LCP 63-1800 ou de *S. platensis* NRRL 2364, dans un milieu nutritif liquide à un pH initial de 5 à 7 et à une température de 20 à 30°C, de préférence de 26 à 28°C. L'aération est assurée par agitation rotative des récipients de culture (150 à 250 rpm) ou, en fermenteur, par introduction d'air à un débit d'environ 1 l/min et par litre de bouillon de culture.

Après un temps variant de 24 à 72 heures, de préférence 60 à 65 heures, on ajoute la terfénadine à une concentration de 0,1 à 1 g/litre, de préférence 0,4 à 0,6 g/litre, en solution dans un solvant organique miscible à l'eau, tel que l'éthanol, l'acétone, le tétrahydrofurane, la diméthylformamide ou le diméthylsulfoxyde (5 à 20 ml/litre de culture), de préférence l'éthanol (10 ml/litre). L'incubation est poursuivie dans les mêmes conditions que la culture. Le pH est éventuellement réajusté et maintenu à une valeur de 5,0 à 8,0. La transformation du substrat est avantageusement suivie

par analyse par HPLC du surnageant d'incubation ou chromatographie en couche mince d'échantillons extraits par un solvant organique. En général après 48 à 200 heures, il s'est formé des quantités suffisantes de Fexofénadine.

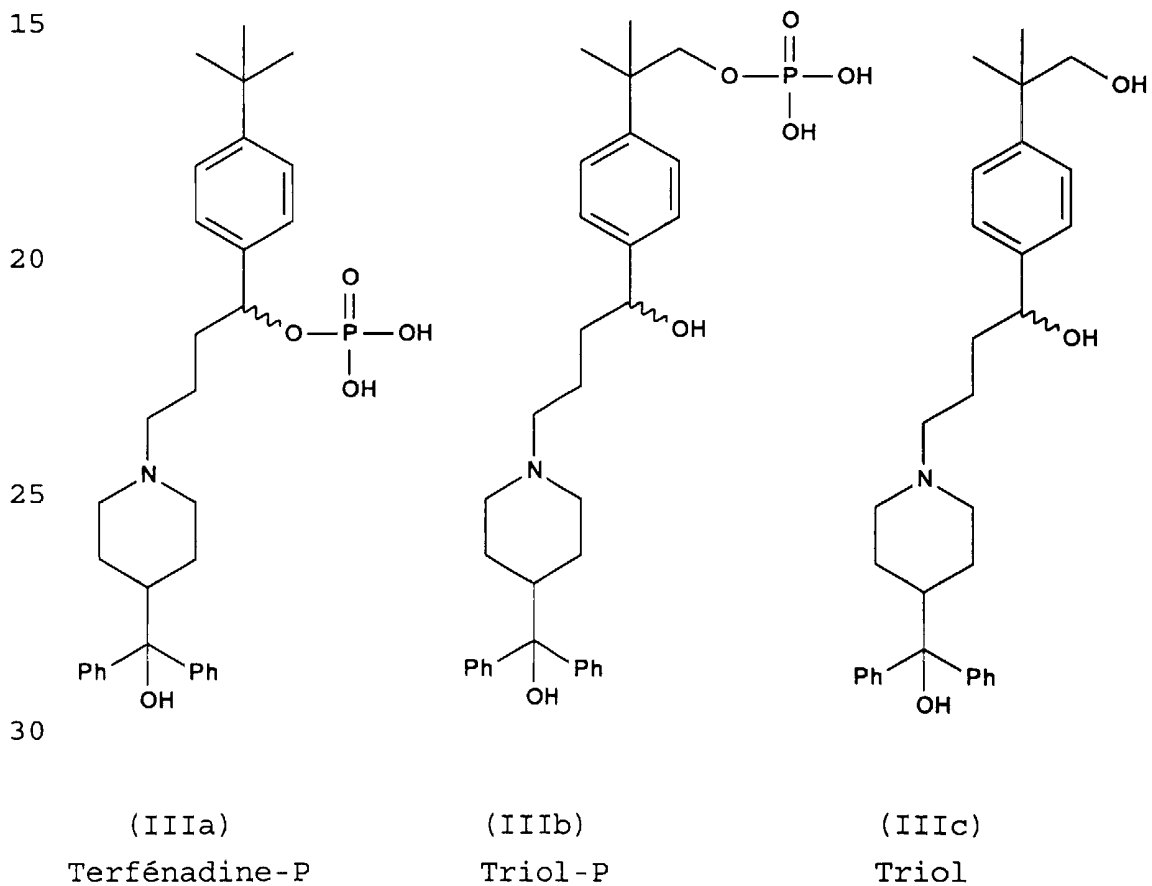
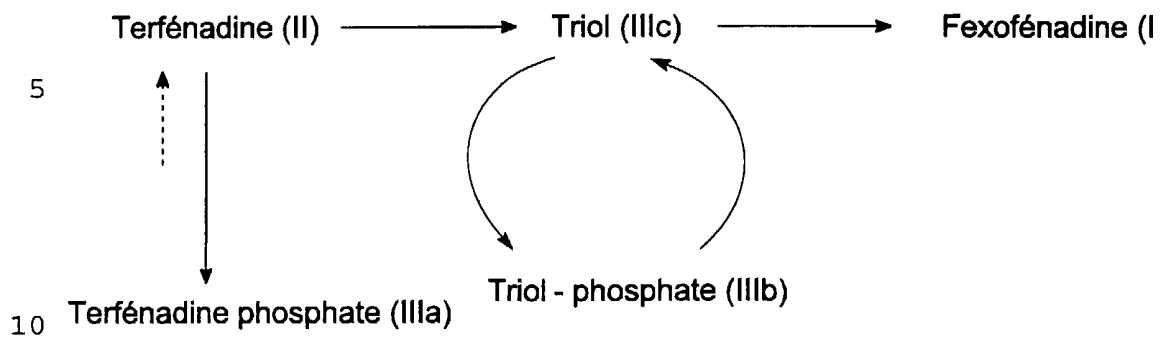
5 Une autre procédure consiste à séparer la biomasse du milieu de culture par filtration, la laver à l'eau ou une solution tamponnée de pH neutre, puis la remettre en suspension dans un tampon adéquat, par exemple un tampon phosphate 0,05 M à pH 7, puis ajouter le substrat et  
10 poursuivre l'incubation comme décrit précédemment.

L'isolement et la purification des produits du procédé s'effectuent d'une manière connue en soi. Par exemple, on peut extraire les produits du procédé avec un solvant organique, de préférence l'acétate d'éthyle, ou par adsorp-  
15 tion sur une colonne hydrophobe, suivie d'élution par un solvant organique, évaporer le solvant organique, séparer et purifier les produits par chromatographie sur colonne ou par cristallisation.

L'invention a donc plus particulièrement pour objet, le  
20 procédé tel que décrit précédemment dans lequel les conditions de biotransformation sont les suivantes :  
concentration en terfenadine ajoutée de 0,5 g/l à 10 g/l,  
pH évoluant entre 5,0 et 8,0, température comprise entre 26  
et 28°C et aération par introduction d'un débit d'air  
25 d'environ 1 l/mn et par litre de bouillon de culture.

Un des objectifs de l'invention est d'ajuster le pH au cours de l'incubation et éventuellement le maintenir à une valeur optimisée, en vue de minimiser la formation de produits secondaires.

30 La transformation de la Terfénadine (II) en Fexofénadine (I) par *A. corymbifera* ou *S. platensis* met en jeu plusieurs étapes successives, avec la formation intermédiaire du triol (IIIc) et celle de deux produits secondaires non souhaités, la Terfénadine-phosphate (IIIa) et le triolphosphate (IIIb)  
35 selon le schéma ci-dessous :



35      L'oxydation initiale de la terfénadine (I) en triol (IIIc), produit par le micro-organisme dans le milieu d'incubation, est favorisée par un pH légèrement acide ou neutre ( $6 < \text{pH} < 7$ ) (tableau 2). La formation (apparemment

irréversible) de Terfénadine-phosphate (IIIa) reste très limitée dans toutes les conditions étudiées et inférieure à 1-2 %. Par contre, la formation de triol-phosphate (IIIb) représente une part importante des produits d'oxydation  
5 accumulés dans le milieu, particulièrement lorsque l'incubation est menée à pH neutre ou alcalin (pH 7,0-8,0) comme le montre le tableau 3 (voir aussi figure 1) ; c'est le pH vers lequel évolue naturellement le milieu d'incubation. Cependant, à pH légèrement plus acide (pH optimum ~6), une  
10 phosphatase d'origine fongique, présente dans le milieu d'incubation, catalyse l'hydrolyse rapide du triol-phosphate (IIIb) (tableau 4, figure 1), tandis que l'oxydation irréversible du triol en fexofénadine est favorisée à pH plus élevé (pH  $\geq$  7) (tableau 5, figure 1).

15 Il en résulte plusieurs stratégies possibles pour transformer la quasi-totalité de la Terfénadine en Fexofénadine (si on ne tient pas compte de la très faible quantité de Terfénadine-phosphate formée) :

- procéder d'abord à l'incubation dans le milieu de culture  
20 initialement à un pH d'environ 6,5, sans contrôle du pH, ce qui conduit (en même temps que le pH évolue vers 8,0-8,5) à une transformation complète de la terfénadine en un mélange stationnaire stable de triol-phosphate (IIIb) et de fexofénadine (Fig. 2) (exemples 2 et 3), puis abaisser le pH à une  
25 valeur comprise entre 3,5 et 4 afin de favoriser la transformation de (IIIb) en (IIIc) et le laisser remonter lentement et spontanément vers 6,0, jusqu'à disparition complète du triol-phosphate (IIIb), puis réajuster et maintenir le pH aux environs de 8,0, jusqu'à transformation du triol (IIIc) en  
30 fexofénadine (Fig. 3) (exemple 4).

- procéder de la même manière à une incubation dans le milieu de culture, initialement à un pH d'environ 6,5, sans contrôle du pH, (le pH évolue naturellement vers 8,0-8,5) puis abaisser et maintenir celui-ci à une valeur comprise entre  
35 6,0 et 6,5, pH auquel le triol-phosphate (IIIb) est assez rapidement hydrolysé, comme résultat de l'équilibre des activités phosphatase-phosphorylase à ce pH, tandis que le triol (IIIc) est lui-même assez rapidement oxydé, jusqu'à

transformation presque complète en fexofénadine (fig. 4) (exemple 5).

- L'invention a donc plus particulièrement pour objet :
- un procédé tel que défini plus haut dans lequel le pH 5 initialement à environ 6,5,
    - . évolue naturellement à 8,0-8,5, ce qui conduit à un mélange de triol-phosphate (IIIb) et de composé de formule (I),
    - . est ensuite abaissé à une valeur comprise entre 3,5 et 10 4 afin de favoriser la transformation du composé intermédiaire de formule (IIIb) en composé intermédiaire de formule (IIIc),
    - . puis évolue naturellement à environ 6,0 jusqu'à disparition complète du composé (IIIb),
    - 15 . et enfin est réajusté et maintenu à environ 8,0 jusqu'à transformation du composé (IIIc) en Fexofénadine.
  - un procédé tel que défini plus haut dans lequel le pH initialement à environ 6,5
    - 20 . évolue naturellement à 8,0-8,5,
    - . puis est abaissé et maintenu à une valeur comprise entre 6,3 et 6,8.
  - un procédé tel que défini plus haut dans lequel au cours de l'étape de purification, l'extraction du produit de formule 25 (I) est effectuée dans l'acétate d'éthyle.

Enfin, l'invention a également pour objet à titre de composés intermédiaires, les composés de formules (IIIb) et (IIIc), telles que définies plus haut.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans 30 toutefois la limiter.

#### Préparation des différents milieux de culture

- Milieu A : Corn steep liqueur, 10 ml ;  $\text{NaNO}_3$ , 2 g ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g ; KCl, 0,5 g pour 900 ml d'eau distillée. Tampon phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2 g ; 35  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g dans 40 ml d'eau distillée) et glucose, 30 g dans 60 ml d'eau distillée, ajoutés au moment de l'ensemencement.
- Milieu B : Peptone de soja, 5 g ; extrait de levure, 5 g ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g ;  $\text{NaNO}_3$ , 2 g ; KCl, 0,5 g ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,

0,02 g pour 900 ml d'eau distillée. Tampon phosphate ( $K_2HPO_4$ , 2 g ;  $KH_2PO_4$ , 1 g dans 40 ml d'eau distillée) et glucose, 30 g dans 60 ml d'eau distillée, ajoutés au moment de l'ensemencement.

5 Milieu C : Peptone de soja, 5 g ; extrait de levure, 5 g ; NaCl, 5 g ;  $K_2HPO_4$ , 5 g pour 900 ml d'eau distillée. Glucose, 100 ml d'une solution à 200 g/L ajoutés au moment de l'ensemencement.

Milieu D : Corn steep liqueur, 10 ml ; peptone de soja, 5 g ;  
10  $NaNO_3$ , 2 g ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5 g ;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,02 g ; KCl, 0,5 g pour 900 ml d'eau distillée. Tampon phosphate ( $K_2HPO_4$ , 2 g ;  $KH_2PO_4$ , 1 g dans 40 ml d'eau distillée) et glucose, 30 g dans 60 ml d'eau distillée, ajoutés au moment de l'ensemencement.

15 Milieu E : Milieu C ajusté à pH 7 avec HCl concentré, avant stérilisation.

**EXEMPLE 1 : Etude de différents micro-organismes (Screening)**

Pour le screening, les erlens de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture sont ensemencés par une suspension de  
20 spores fraîchement récoltés sur milieu solide et la croissance est effectuée dans un incubateur rotatif à 27°C et 200 RPM pendant 66 heures.

La Terfénadine est ajoutée en solution dans l'éthanol (10 ml/litre) à une concentration finale de 0,2 g/l directement à la biomasse dans son milieu de culture.  
25

L'incubation est poursuivie dans les mêmes conditions que la culture pendant 7 jours.

**a) Méthodes analytiques**

Des prélèvements réguliers (1 ml par jour) du surnageant  
30 sont effectués en cours d'incubation, centrifugés, micro-filtrés et injectés en HPLC sur une colonne de nucléosil C18 (250 x 4 mm ; débit : 1 ml/min ; détection à 220 nm et à 60°C ; le solvant est un gradient d'acétonitrile-eau-acide trifluoroacétique (TFA) constitué à partir du mélange  $CH_3CN$ -  
35 eau-TFA (100:900:1) (solvant A) et  $CH_3CN$ -eau-TFA (900:100:1) (solvant B).

Dans ces conditions,  
la terfénadine (II) a un temps de rétention de 14,56 min.,

la terfénadine-P (IIIa), un temps de rétention de 11,8 min.,  
le triol (IIIc), un temps de rétention de 9,61 min.,  
la fexofénadine, un temps de rétention de 9,45 min. et  
le triol-P (IIIb), un temps de rétention de 7,43 min.

#### 5 b) Résultats du screening

La réalisation d'un screening dans les conditions de culture décrites plus haut a donné, entre autres souches testées, les résultats reportés dans le tableau ci-dessous et a permis de trouver 2 souches *Absidia corymbifera* LCP 63-1800 et *Streptomyces platensis* NRRL 2364, capable de produire en erlen la fexofénadine avec un bon rendement, mais en présence d'une quantité non négligeable de triol phosphate et de triol.

15 Tableau 1 : Métabolisation de la terfénadine par divers microorganismes, 0,2 g/l, 96 h, 27°C.

|    | Terfénadine (a)                            | Triol-P | Fexofénadine | Triol | Terfénadine-P |   |
|----|--|---------|--------------|-------|---------------|---|
| 20 | <i>Absidia corymbifera</i><br>LCP 63.1800  | -       | ±            | +++   | +             | - |
|    | <i>Absidia blakesleeana</i><br>ATCC 6811   | +       | -            | -     | -             | - |
|    | <i>Absidia blakesleeana</i><br>ATCC 42838  | -       | ±            | -     | -             | - |
| 25 | <i>Absidia blakesleeana</i><br>ATCC 22617  | -       | -            | -     | -             | - |
|    | <i>Absidia blakesleeana</i><br>ATCC 10148b | -       | ±            | -     | -             | - |
|    | <i>Absidia blakesleeana</i><br>ATCC 22739  | -       | ±            | -     | -             | - |
| 30 | <i>Absidia corymbifera</i><br>LCP 64.1942  | -       | -            | ±     | -             | - |
|    | <i>Absidia corymbifera</i><br>LCP 86.3480  | -       | ±            | ±     | -             | - |
| 35 | <i>Actinomucor elegans</i><br>MMP 2092     | ±       | +            | ±     | -             | - |
|    | <i>Aspergillus ochraceus</i><br>ATCC 1008  | -       | -            | ±     | -             | - |

|    |  |   |   |   |     |   |
|----|--|---|---|---|-----|---|
|    | <i>Cunninghamella blakesleeana</i><br>ATCC 8688a | ± | ± | - | ±   | ± |
|    | <i>Cunninghamella echinulata</i><br>LCP 73.2203  | ± | - | - | ±   | - |
| 5  | <i>Cunninghamella echinulata</i><br>NRRL 3655    | ± | ± | - | ±   | ± |
|    | <i>Cunninghamella elegans</i><br>ATCC 9245       | ± | - | - | -   | + |
| 10 | <i>Streptomyces platensis</i><br>NRRL 2364       | - | - | + | +++ | - |

(a) : Seuls les surnageants de culture ont été testés, ce qui peut expliquer l'absence de terféfadine éventuellement adsorbée sur le mycélium.

15

± : 5-10 % (HPLC)

+ : 10-20 % (HPLC)

+++ : 70-80 % (HPLC)

c) Purification et caractérisation complète de la fexoféna-  
20 dine formée par *Absidia corymbifera* LCP 63.1800

A partir d'un erlen d'*Absidia corymbifera* (100 ml -  
20 mg de terféfadine), après filtration du mycélium et lavage  
à l'eau, le surnageant est saturé au NaCl puis extrait 3 fois  
à l'acétate d'éthyle ; la phase organique est séchée sur  
25 MgSO<sub>4</sub> puis évaporée sous pression réduite pour conduire à  
27 mg d'un résidu solide blanchâtre qui est purifié par  
chromatographie sur colonne de gel de silice (230-400 mesh) à  
l'aide du solvant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-NH<sub>4</sub>OH (82,5 : 15 : 2,5). On  
récupère 12,4 mg de produit pur identique à la fexoféfadine  
30 authentique. F = 190-195°C.

d) Etude structurale de la fexoféfadine obtenue à l'aide  
d'*Absidia corymbifera* LCP 63-1800

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 250,13 MHz) δ, ppm : 1,49 (6H, s, 2 CH<sub>3</sub>),  
1,55-1,82 (8H, m, H-9, H-10 et H-13), 2,73-2,85 (4H, m,  
35 H-12), 3,30-3,32 (2H, m, H-11), 4,60 (1H, dd, J=5,57 et 5,97  
Hz, H-8), 7,17 (2H, d, J=7,17 Hz, H-5), 7,29 (6H, dd, J=7,17  
et 7,97 Hz, H-18, H-19 et H-20), 7,39 (2H, d, J=8,37 Hz,  
H-6), 7,53 (4H, d, J=7,57 Hz, H-17 et H-21).

RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 62,9 MHz) δ, ppm : 23,7 (CH<sub>2</sub>, C-10), 27,1

(2 CH<sub>2</sub>, C-13), 30,2 (2 CH<sub>3</sub>, C-3), 39,0 (CH<sub>2</sub>, C-9), 44,9 (CH, C-14), 50,9 (C quat., C-2), 55,4 (2 CH<sub>2</sub>, C-12), 59,5 (CH<sub>2</sub>, C-11), 75,9 (CH, C-8), 81,7 (C quat., C-15), 23,7 (CH<sub>2</sub>, C-10), 128,6 ; 123,9 ; 129,4 et 131,0 (CH, C-5, C-6, C-17, 5 C-18, C-19, C-20 et C-21), 145,2 ; 149,2 et 150,3 (C quat., C-4, C-7 et C-16), 186,3 (C quat., C-1).

MS (electrospray, ions négatifs), m/z : 500 (M-H<sup>+</sup>), 456 (M-H<sup>+</sup>-CO<sub>2</sub>), 378 (456-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>).

**EXEMPLE 2** : Préparation microbiologique de la Fexofénadine

10 On ensemence 10 erlens de 250 ml contenant 100 ml de milieu D par *A. corymbifera* LCP 63-1800. On ajoute 50 mg de Terfénadine dans 1 ml d'éthanol dans chaque erlen. A J+7, on filtre les 10 erlens sur gaze (le surnageant a un pH égal à 8,0), et on sature au chlorure de sodium pendant 2 heures  
15 (pH = 5-6). On extrait 3 fois à l'acétate d'éthyle et sèche sur sulfate de magnésium. Après évaporation sous pression réduite, on obtient 409 mg de produit brut attendu (rendement = 77 %, produit pur à 90 % environ).

Ce produit est purifié sur colonne de gel de silice (230-400  
20 mesh, 40 g de silice, diamètre = 3 cm) en éluant avec le mélange chlorure de méthylène/méthanol/hydroxyde d'ammonium (82,5-15-2,5). On récupère 312 mg de fexofénadine pure (61,4 %).

**EXEMPLE 3** : Préparation de la fexofénadine en fermenteur

25 (milieu A)

On effectue la culture d'*Absidia corymbifera* dans le milieu A (pH 6,5), mais en fermenteur Biolafitte, dans un volume de 5 litres inoculé avec 2.10<sup>6</sup> spores/litre, à 27°C, avec un débit d'air de 5 litres/min environ et une agitation  
30 (turbine hélicoïdale) de 275 tours/min. La biomasse obtenue après 66 heures de culture et qui se présente sous forme de pellets homogènes de 1 mm environ de diamètre a été utilisée pour la bioconversion directement dans le fermenteur de culture. 1,25 g de Terfénadine dans 50 ml d'éthanol sont  
35 ajoutés et l'incubation est poursuivie dans les mêmes conditions pendant 7 jours. A ce stade, le pH est de 8,5 et le milieu d'incubation contient 35 % de fexofénadine et 65 % de triolphosphate. La biomasse est séparée du milieu liquide

par filtration. Le filtrat est saturé en NaCl, son pH est ajusté à 6,0 avec HCl dilué et il est extrait 3 fois à l'acétate d'éthyle. Après purification comme décrit dans l'exemple 2, on récupère 350 mg (27 %) de fexofénadine pure.

5 On peut récupérer le triolphosphate (IIIb) dans la phase aqueuse par adsorption sur une colonne de XAD-2 et élution avec le méthanol.

**EXEMPLE 3 bis : Préparation de la fexofénadine en fermenteur (milieu D)**

10 On effectue la culture d'*Absidia corymbifera* dans le milieu D (pH 6,5), en fermenteur Biolafitte, dans les mêmes conditions que dans l'exemple 3. La biomasse obtenue après 66 heures de culture est utilisée pour la bioconversion directement dans le fermenteur de culture. 1 g de Terfénadine  
15 dans 25 ml d'éthanol sont ajoutés et l'incubation est poursuivie dans les mêmes conditions pendant 4 jours. A ce stade, le pH est de 8,0 et le milieu d'incubation contient 70 % de fexofénadine et 30 % de triolphosphate qui sont isolés et purifiés comme décrit dans l'exemple 3.

20 **EXEMPLE 4 : Méthode avec ajustements successifs du pH pour la préparation de la fexofénadine en fermenteur**

On effectue la culture d'*Absidia corymbifera* dans le milieu D (pH 6,5), dans les conditions décrites dans l'exemple 3. 2,5 g de Terfénadine dans 50 ml d'éthanol sont  
25 ajoutés et l'incubation est poursuivie dans les mêmes conditions pendant 4 jours. A ce stade, le pH est de 8,0 et le milieu d'incubation contient 42 % de fexofénadine, 13 % de triol (IIIc) et 25 % de triolphosphate (IIIb). Le pH est ajusté à 3,5 avec HCl concentré et on continue l'incubation  
30 dans les mêmes conditions en laissant le pH du milieu évoluer librement jusqu'à 6 (3 jours). A ce stade, le triol-phosphate (IIIb) a presque totalement disparu au bénéfice du triol. On réajuste le pH à 8,0 et on poursuit l'incubation dans les mêmes conditions pendant 2 jours supplémentaires. Le milieu  
35 contient alors 85 % de fexofénadine et 13 % de triol phosphate (IIIb).

**EXEMPLE 5 : Méthode optimisée pour la préparation de la fexofénadine en fermenteur**

On effectue la culture d'*Absidia corymbifera* dans le milieu D (pH 6,5), dans les conditions décrites dans l'exemple 3. 2,5 g de Terfénadine dans 50 ml d'éthanol sont ajoutés et l'incubation est poursuivie dans les mêmes conditions pendant 4 jours. A ce stade, le pH est de 8,0 et le milieu d'incubation contient 35 % de fexofénadine, 11,5 % de triol (IIIc) et 34 % de triolphosphate (IIIb). Le pH est ajusté et maintenu à 6,0-6,5 avec HCl dilué pendant qu'on continue l'incubation dans les mêmes conditions (3 jours). Le milieu contient alors 89,5 % de fexofénadine et 9,5 % de triol phosphate.

**EXEMPLE 6 :**

On ensemence un erlen de 250 ml contenant 100 ml de milieu E par *Streptomyces platensis* NRRL 2364 et on cultive comme décrit dans l'exemple 1. Une moitié du milieu de culture et de la biomasse, dont le pH est de 5,0, est additionnée de 10 mg de terfénadine dissoute dans 0,5 ml d'éthanol et l'incubation est poursuivie pendant plusieurs jours dans les mêmes conditions. Après 3 jours, le seul métabolite observé est le triol (IIIc) (60 %) ; après 7 jours le rendement en triol atteint 67 %.

**EXEMPLE 7 :**

L'autre moitié du milieu de culture et de la biomasse de l'exemple 6, est additionnée de terfénadine (10 mg dans 0,5 ml d'éthanol) et incubé dans les mêmes conditions que dans l'exemple 6, pendant 3 jours, puis porté à pH 8,0 par addition de NaOH 7,5 M. L'incubation est poursuivie pendant 4 jours supplémentaires et on obtient 16 % de triol-phosphate (IIIb), 37 % de fexofénadine (I) et 26 % de triol (IIIc).

Tableau 2 : Vitesse initiale d'oxydation de la Terfénadine en fonction du pH (Biomasse de 66 h, lavée et remise en suspension dans un tampon phosphate 0,05 M en présence de terfénadine 1061  $\mu\text{mol/litre}$ ). La mesure effectuée par HPLC correspond à la somme (triol + triol-phosphate + fexofénadine)

| pH  | Terfénadine<br>oxydée (total)<br>$\mu\text{mol/l/h}$ |
|-----|--|
| 6,3 | 1,60   |
| 6,5 | 2,45   |
| 7,0 | 0,60   |
| 7,5 | 0,59   |
| 8,0 | 0,76   |

10 Tableau 3 : Vitesse initiale (après 2 heures d'incubation) de phosphorylation du triol en fonction du pH (Biomasse de 66 h, lavée et remise en suspension dans un tampon phosphate 0,05 M en présence de triol 186  $\mu\text{mol/litre}$ ). On mesure par HPLC le triol-phosphate formé et le triol restant dans le surnageant  
15 d'incubation (aucune formation de fexofénadine n'est observée dans les 2 premières heures).

| pH  | Triol disparu<br>$\mu\text{mol/l/h}$ | Triol-phosphate<br>$\mu\text{mol/l/h}$ |
|-----|--------------------------------------|--|
| 6,3 | 165,5                                | 53,5                                   |
| 6,5 | 159,0                                | 57,0                                   |
| 7,0 | 143,5                                | 41,5                                   |
| 7,5 | 132,0                                | 27,0                                   |
| 8,0 | 124,0                                | 24,0                                   |

20 Tableau 4 : Vitesse initiale d'hydrolyse du triol-phosphate en fonction du pH (surnageant d'incubation de 120 heures contenant 272  $\mu\text{mol/litre}$  de triol-phosphate, ajusté et  
30 maintenu aux différents pHs par HCl concentré et incubé à 27°C. L'hydrolyse est mesurée en HPLC à la fois par la disparition de triol-phosphate et l'apparition de triol. La vitesse initiale est calculée sur la moyenne des prélèvements effectués pendant les 7,5 premières heures d'hydrolyse.

|    | Après 4 heures<br>d'incubation   |  | Après 24 heures<br>d'incubation  |  | Vitesse<br>initiale<br>d'hydrolyse du<br>triol-<br>phosphate<br>$\mu\text{mol/l/h}$ |       |
|----|--|--|--|--|---|-------|
|    | triol-<br>phosphate<br>résiduel<br>$\mu\text{mol/l}$<br>(% hydro-<br>lyse) | triol<br>apparu<br>$\mu\text{mol/l}$<br>(% hydro-<br>lyse) | triol-<br>phosphate<br>résiduel<br>$\mu\text{mol/l}$<br>(% hydro-<br>lyse) | triol<br>apparu<br>$\mu\text{mol/l}$<br>(% hydro-<br>lyse) |   |       |
|    | 4,0  | 258 (5 %)  | 12 (4,4 %)   | 223 (18 %)   | 35 (13 %)   | 3,13  |
|    | 5,0  | 234 (14 %)   | 40 (14,7 %)  | 148 (45,6%)  | 120 (44,1%)   | 8,71  |
| 5  | 6,0  | 196 (27,9%)  | 68 (25 %)  | 50 (81,7%)   | 216 (79,4%)   | 17,49 |
|    | 6,5  | 224 (17,6%)  | 30 (11 %)  | 140 (48,5%)  | 131 (48,2%)   | 8,71  |
|    | 7,0  | 237 (12,9%)  | 30 (11 %)  | 167 (38,6%)  | 109 (40 %)  | 7,12  |
|    | 7,5  | 240 (12 %)   | 31 (11,4 %)  | 181 (33 %)   | 77 (28,3 %)   | 5,48  |
| 10 | 8,0  | 244 (10 %)   | 19 (7 %)   | 197 (28 %)   | 69 (25,4 %)   | 4,37  |

Tableau 5 : oxydation du triol mesurée entre 6 h et 24 h d'incubation en fonction du pH (Biomasse de 66 h, lavée et remise en suspension dans un tampon phosphate 0,05 M en présence de triol 186  $\mu\text{mol/litre}$ ). Dans cet intervalle de temps où la fexofénadine est formée, la concentration en triol est stationnaire. Les deux produits sont mesurés par HPLC.

|    | pH  | Triol aux temps<br>6-24 h<br>$\mu\text{mol/litre}$ | Triol-phosphate<br>aux temps 6-24 h<br>$\mu\text{mol/litre}$ | Fexofénadine<br>apparue entre 6<br>et 24 h<br>$\mu\text{mol/litre} (\%)*$ |
|----|-----|--|--|---|
|    | 6,3 | 110-130  | 65-27  | 0 (0)   |
|    | 6,5 | 93-96  | 72-31  | 15 (15,6)   |
|    | 7,0 | 46-58  | 110-64   | 25 (45,1)   |
|    | 7,5 | 21-43  | 124-61   | 30 (69,7)   |
| 25 | 8,0 | 20-49  | 128-41   | 30 (61,2)   |

\* % calculé = (fexofénadine formée/triol résiduel) x 100

Figure 1 : Récapitulation de l'influence du pH sur les quatre réactions unitaires du métabolisme de la terfénadine par *A. corymbifera*. L'échelle des ordonnées a été ramenée par multiplication pour chaque courbe à des valeurs du même 5 ordre.

Figure 2 : Bioconversion de la terfénadine (0,2 g/l) en milieu D, sans contrôle de pH.

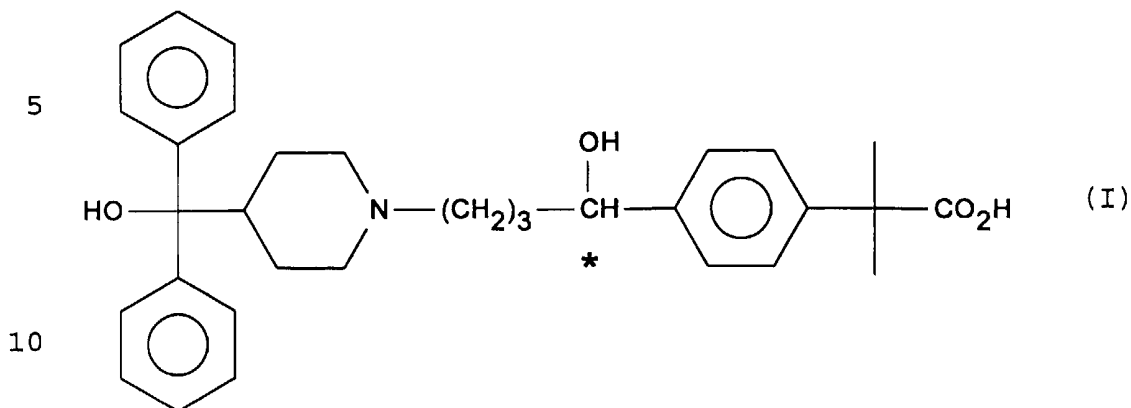
Figure 3 : Bioconversion de la terfénadine (0,5 g/l) en erlen de 100 ml en milieu D avec ajustement du pH de l'incubation à 10 3,5 (96 h) et 8,0 (168 h).

Figure 4 : Bioconversion de la terfénadine (0,5 g/l 27°C, milieu D) en erlen par *A. corymbifera* avec modification et maintien du pH de l'incubation à 6,0 après 96 heures. Les traits verticaux indiquent les ajustements de pH.

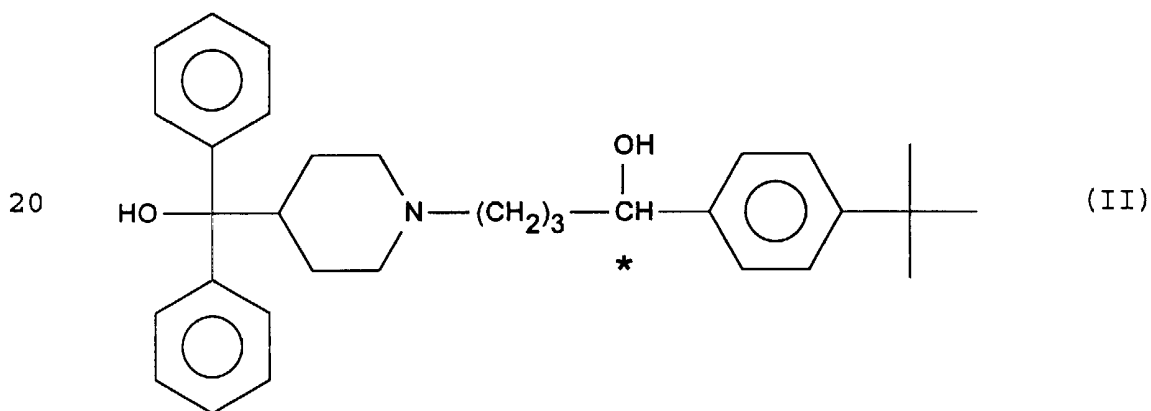
15

## REVENDICATIONS

1) Procédé de préparation des composés de formule (I) :



caractérisé en ce qu'on effectue une bioconversion du ou des  
15 composés de formule (II) :



avec soit une culture d'*Absidia corymbifera* LCP 63-1800 soit  
une culture de *Streptomyces platensis* NRRL 2364, à un pH  
compris entre 5,0 et 8,0, afin d'obtenir le ou les composés  
30 de formule (I) attendus, qui le cas échéant sont isolés,  
purifiés et/ou salifiés, les composés de formules (I) ou (II)  
pouvant être sous les deux formes énantiomères possibles,  
isolés ou en mélanges.

2) Procédé selon la revendication 1 dans lequel on effectue  
35 une bioconversion de la Terfénadine, correspondant à un  
mélange racémique des énantiomères de formule (II), afin  
d'obtenir la Fexofénadine, correspondant à un mélange  
racémique des énantiomères de formule (I).

3) Procédé selon la revendication 1 ou 2 dans lequel les conditions de biotransformation sont les suivantes :

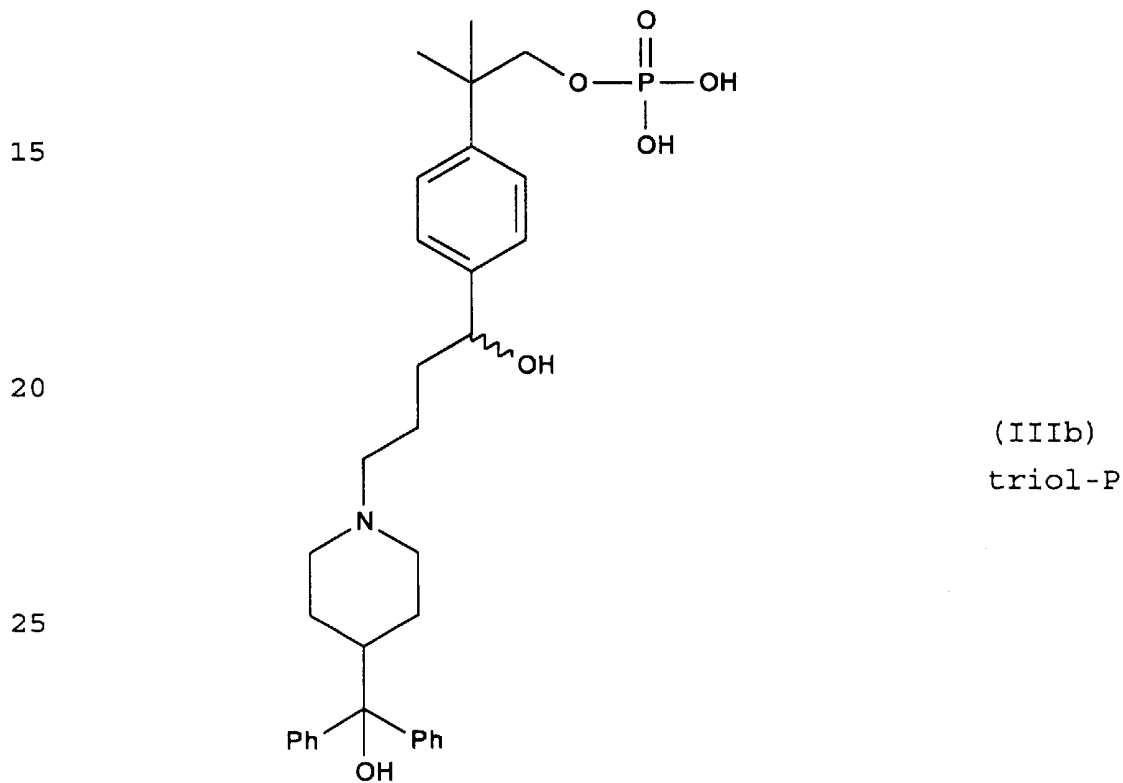
- concentration en Terféndine ajoutée d'environ 0,5 à 10 g/l
- pH évoluant entre 5,0 et 8,0

5 - température comprise entre 26 et 28°C

- aération par introduction d'un débit d'air d'environ 1 l/minute et par litre de bouillon de culture.

4) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dans lequel le pH initialement à environ 6,5,

- 10 - évolue naturellement à 8,0-8,5, ce qui conduit à un mélange de triol-phosphate (IIIb) :

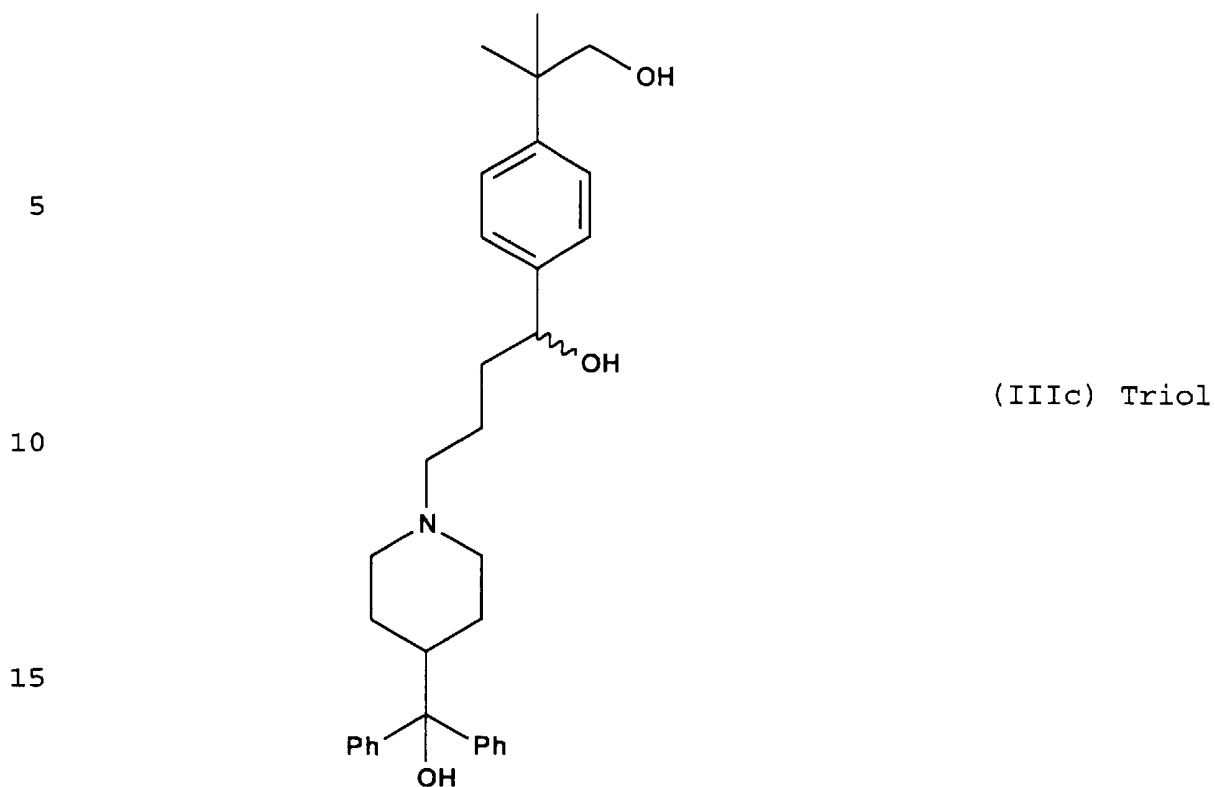


30

et de composé de formule (I),

- est ensuite abaissé à une valeur comprise entre 3,5 et 4 afin de favoriser la transformation du composé intermédiaire de formule (IIIb) en composé intermédiaire de formule

35 (IIIc) :



20 - puis évolue naturellement à environ 6,0 jusqu'à disparition complète du composé (IIIb),

- et enfin est réajusté et maintenu à environ 8,0 jusqu'à transformation du composé (IIIc) en Fexofénadine.

5) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dans lequel le pH initialement à environ 6,5

- évolue naturellement à 8,0-8,5,

- puis est abaissé et maintenu à une valeur comprise entre 6,3 et 6,8.

6) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que, au cours de l'étape de purification, l'extraction du produit de formule (I) tel que défini à la revendication 1, est effectuée dans l'acétate d'éthyle.

7) A titre de composé intermédiaire les composés de formules (IIIb) et (IIIc) tels que définis à la revendication 4.

1/4

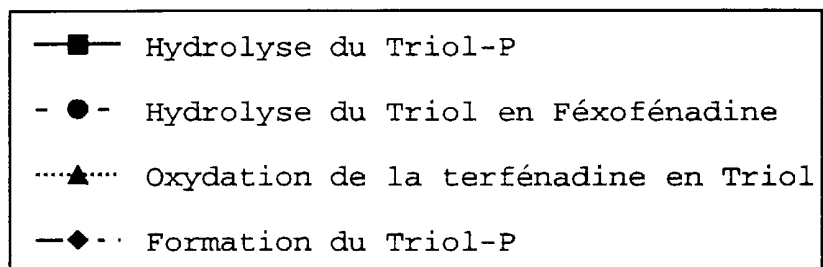
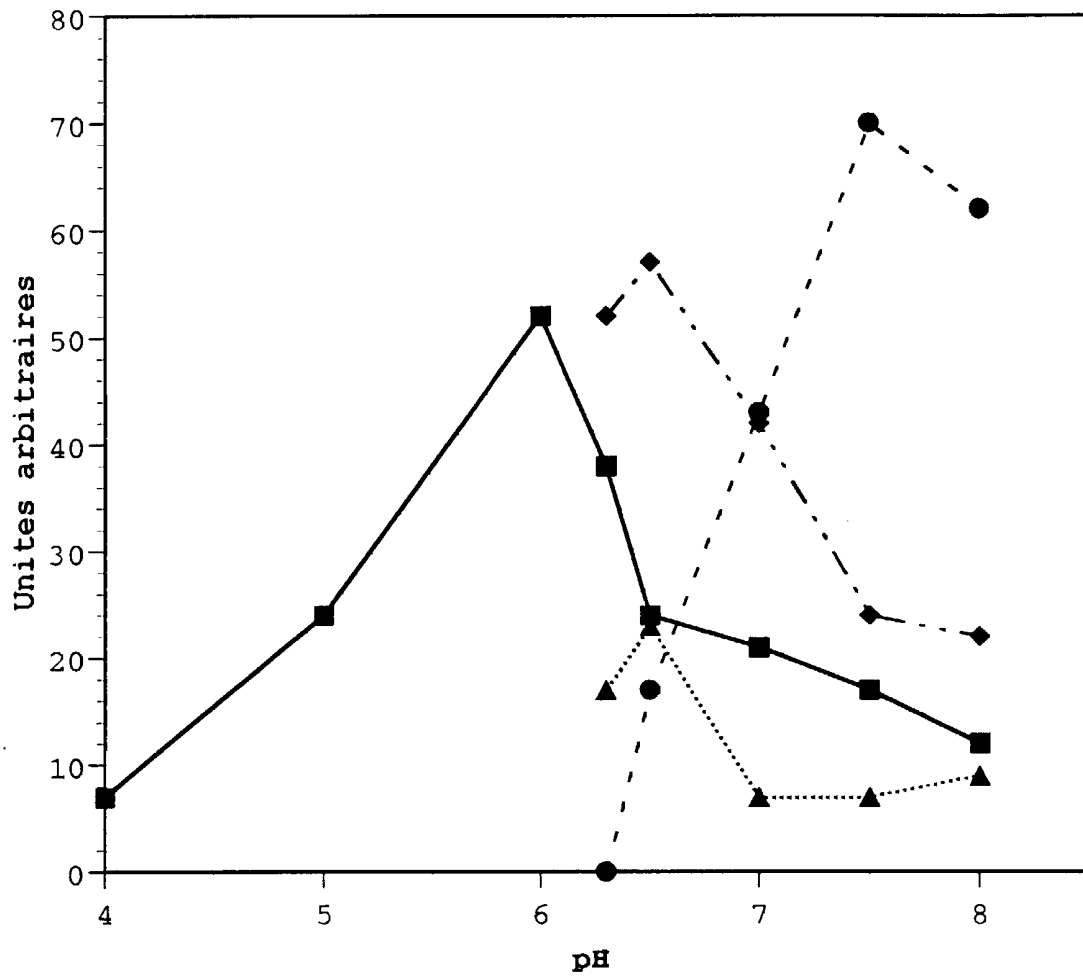


FIGURE 1

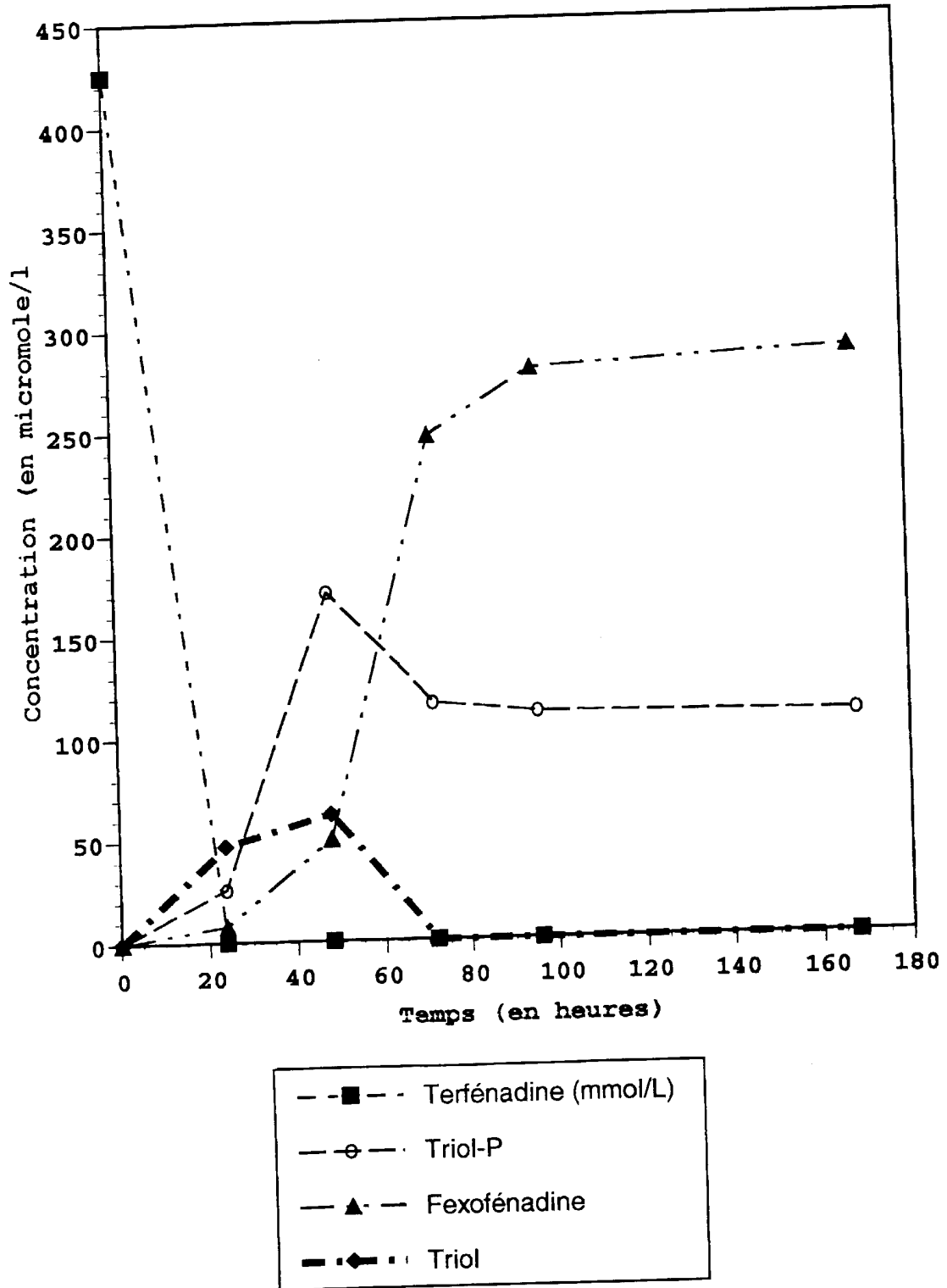


FIGURE 2

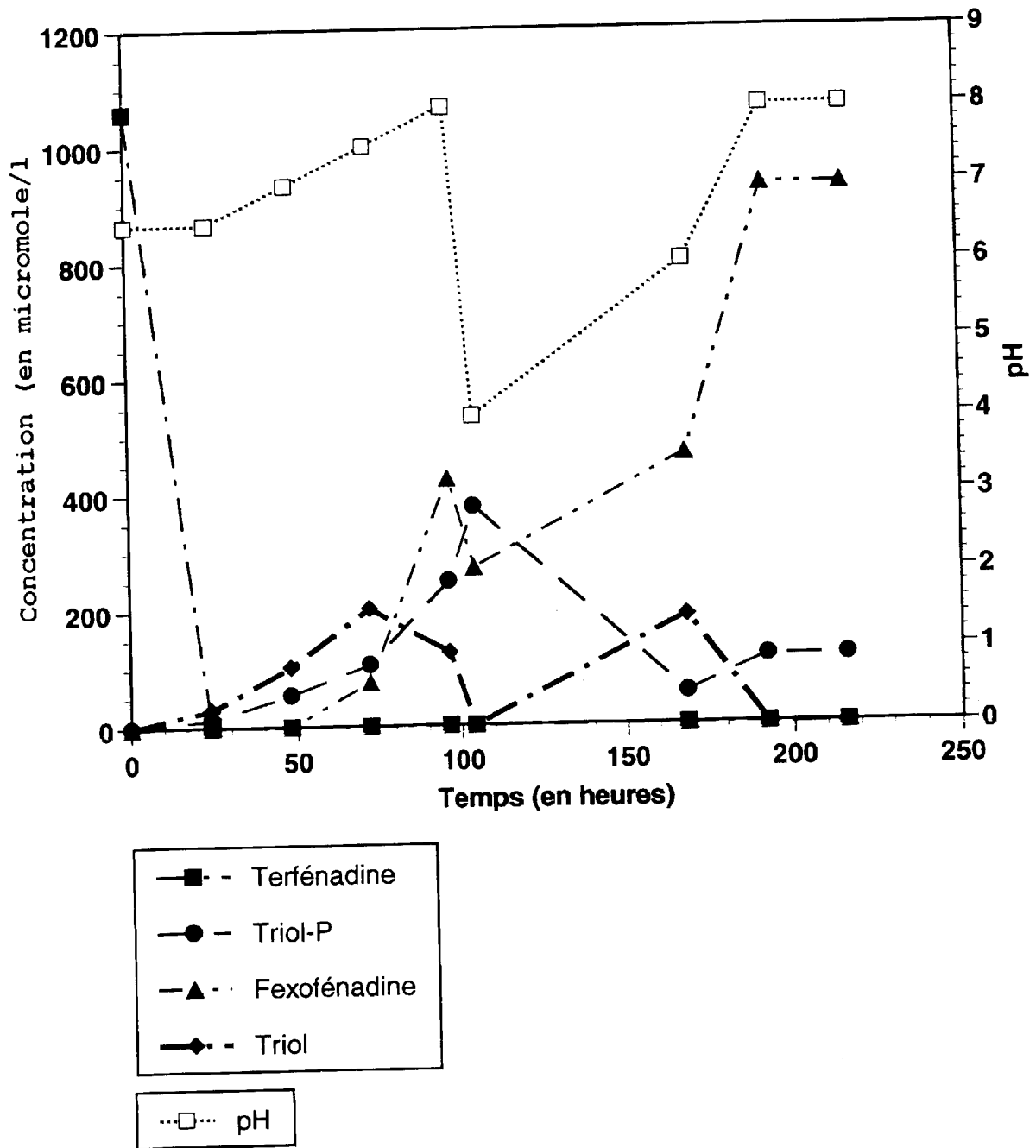


FIGURE 3

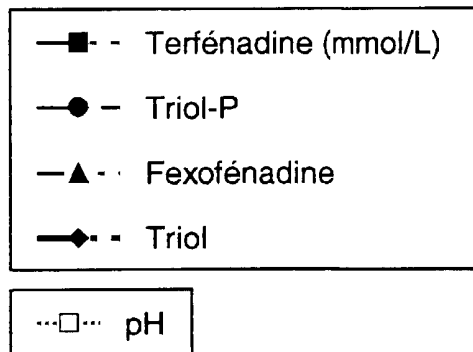
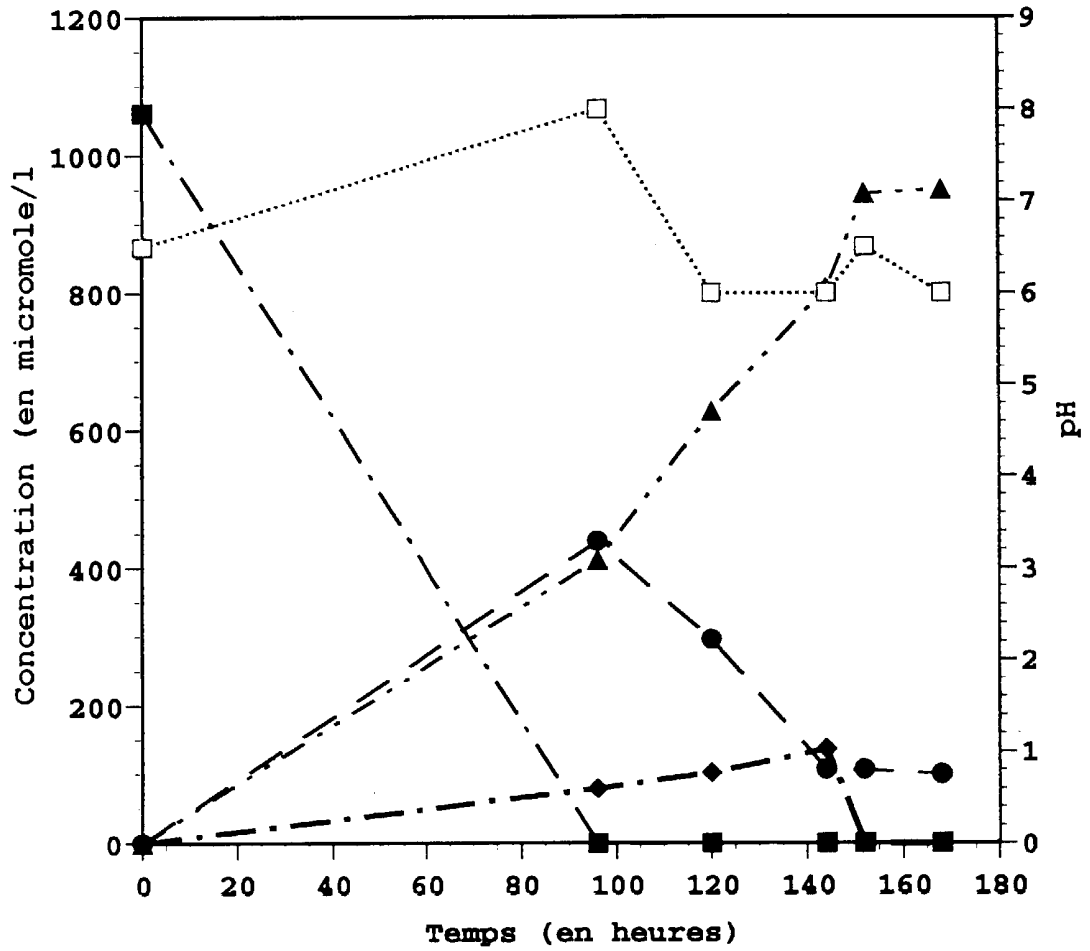


FIGURE 4

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 555387  
FR 9803349

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS   |   | Revendications<br>concernées<br>de la demande<br>examinée |
|---|---|---|
| Catégorie   | Citation du document avec indication, en cas de besoin,<br>des parties pertinentes  |   |
| A   | CHAN K Y ET AL: "DIRECT ENANTIOMERIC<br>SEPARATION OF TERFENADINE AND ITS MAJOR<br>ACID METABOLITE BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID<br>CHROMATOGRAPHY, AND THE LACK OF<br>STERESELECTIVE TERFENADINE ENANTIOMER<br>BIOTRANSFORMATION IN MAN"<br>JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, BIOMEDICAL<br>APPLICATIONS,<br>vol. 571, no. 1/02, 15 novembre 1991,<br>pages 291-297, XP002046562<br>---- | 1   |
| A   | WO 95 00480 A (MERRELL DOW PHARMA)<br>5 janvier 1995<br>----  | 1   |
| E   | EP 0 864 653 A (HOECHST MARION ROUSSEL DE<br>GMBH) 16 septembre 1998<br>* revendications *<br>-----   | 3,4,7   |
|   |   | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHES (Int.CL.6)              |
|   |   | C12P<br>C07F<br>C07D                                      |
| Date d'achèvement de la recherche   |   | Examineur   |
| 1 décembre 1998   |   | DeLanghe, L   |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES   |   |   |
| <p>X : particulièrement pertinent à lui seul<br/> Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un<br/> autre document de la même catégorie<br/> A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication<br/> ou arrière-plan technologique général<br/> O : divulgation non-écrite<br/> P : document intercalaire</p>   |   |   |
| <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention<br/> E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure<br/> à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date<br/> de dépôt ou qu'à une date postérieure.<br/> D : cité dans la demande<br/> L : cité pour d'autres raisons<br/> .....<br/> &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p> |   |   |

1