(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 628 205**

(51) Int. CI.:

C12P 7/26 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2014 PCT/DE2014/000256**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14198247**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2014 E 14732499 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 3008198**

(54) Título: **Procedimiento para la preparación de catina**

(30) Prioridad:

10.06.2013 DE 102013009631

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2017

(73) Titular/es:

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH (100.0%)
52425 Jülich, DE

(72) Inventor/es:

ROTHER, DÖRTE;
POHL, MARTINA;
SEHL, TORSTEN y
BARAIBAR, ÁLVARO GÓMEZ

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de catina

El invento se refiere a la preparación de catina.

La catina ((1S,2S)-norpseudoefedrina) se puede obtener a partir de las hojas del arbusto Kath (Catha edulis) y se emplea frecuentemente como agente inhibidor del apetito. A causa de la función simpaticomimética, que excita al sistema nervioso vegetativo, encuentra uso como agente cardiocirculatorio.

Para la preparación por vía sintética se conocen diferentes procedimientos según el estado de la técnica.

Así, en la publicación "Stereoselective Synthesis of Norephedrine and Norpseudoephedrine by Using Asymmetric Transfer Hydrogenation Accompanied by Dynamic Kintic Resolution" ("síntesis estéreoselectiva de norefedrina y norpseudoefedrina usando una hidrogenación con transferencia asimétrica acompañada por una resolución cinética dinámica") de Hyeon-Kyu Lee y colaboradores, en Journal of Organic Chemistry 2012, páginas 5454-5460 se conoce una síntesis en siete etapas.

La publicación "Efficient Synthesis of Ephedra Alkaloid Analogous Using an Enantiomerically Pure N-[(R)-(+)-α-Methylbenzyl]aziridine-2-carboxaldehyde" ("síntesis eficiente de un compuesto análogo a un alcaloide de efedra usando un N-[(R)-(+)-α-metilbencil)aziridina-2-carboxaldehído" enantioméricamente puro") de Gwon-Il Hwang y colaboradores del J.Org.Chem. 1996, 61, 6183-6188 divulga un procedimiento para la preparación de catina con altos excesos enantioméricos, que procede de un substrato enantioméricamente puro y es muy cara.

Otros procedimientos, tal como se describen en la publicación "Asymetric N1 Unit Transfer to Olefins with a Chiral Nitridomanganese Complex: Novel Stereoselective Pathways to Aziridines or Oxazolines" **(**"transferencia de la unidad N1 asimétrica a olefinas con un complejo de nitridomanganeso quiral. Nuevas rutas estereoselectivas para preparar aziridinas u oxazolinas") de Masaaki Nishimura y colaboradores divulgan unos procedimientos en los que se forma catina como producto secundario.

T. Sehl y colaboradores, Angewandte Chemie, 2013, 125, 6904-6908, describen cascadas enzimáticas para la síntesis selectiva de nor(pseudo)efedrina a partir de benzaldehído y piruvato.

D. Rother, ChemCatChem 2011, 3, 1587-1596, enseña la reacción de benzaldehído y acetaldehído para formar S-fenilacetocarbinol en presencia de una transaminasa procedente de Acetobacter pasteurianus.

Por lo tanto, la misión del invento es poner a disposición un sencillo procedimiento de preparación de catina, que supere las desventajas del estado de la técnica y que se contente con pocas etapas de reacción, sea barato, conduzca a una alta pureza enantiomérica y diastereoisomérica así como a un alto rendimiento y necesite las menos etapas de tratamiento posibles. El procedimiento debe poderse transferir de una manera sencilla a una mayor escala.

Partiendo del concepto genérico de la reivindicación 1, el problema planteado por esa misión se resuelve conforme al invento mediante las características indicadas en la parte caracterizante de la reivindicación 1.

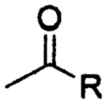
Con el procedimiento conforme al invento se puede preparar catina con una pureza enantiomérica de > 99 % y una pureza diastereoisomérica de 70 %, en una ventajosa forma de realización hasta de 97 %. Se puede conseguir un grado de conversión de 90 %. En tal caso pueden pasar a emplearse unos eductos (productos de partida) obtenibles comercialmente. El procedimiento necesita pocas etapas de tratamiento, se puede aumentar su escala de manera sencilla y se puede llevar a cabo como una reacción sin aislamiento de los productos intermedios.

Unos ventajosos perfeccionamientos del invento se indican en las reivindicaciones secundarias.

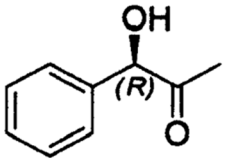
A continuación el invento se va a describir en su forma general.

Una enzima selectiva para (S) en el sentido del invento es una enzima que conduce a un producto con la configuración (S).

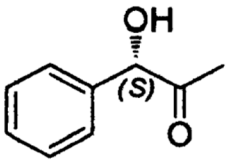
En una primera etapa de reacción se hace reaccionar in vitro benzaldehído con un compuesto donante de acetilo según la fórmula (1).

Fórmula (1) 

mediante la liasa selectiva para (S) ApPDC-E469G procedente de Acetobacter pasteurianus para dar una mezcla de enantiómeros de los compuestos según las Fórmulas (2) y (3)

Fórmula (2) 

(R)-PAC

Fórmula (3) 

(S)-PAC

significando la abreviatura PAC fenilacetilcarbinol.

En el caso del compuesto donante de acetilo según la Fórmula (1) puede tratarse en este contexto de acetaldehído con R = H o de piruvato con R = COOH.

La ruta de reacción se reproduce a modo de ejemplo en la Figura 1.

Preferiblemente, se emplean enzimas purificadas y liofilizadas. La liofilización tiene la ventaja de que las enzimas son estables y se pueden emplear altas concentraciones de estas enzimas, además de ello las enzimas purificadas conducen a unas purezas ópticas manifiestamente más altas, por lo tanto a un más alto exceso enantiomérico y diastereoisomérico del producto.

Por lo demás, se pueden emplear unos cofactores para la liasa selectiva para (S), que aumentan el grado de conversión.

Por ejemplo se pueden emplear como cofactores iones de magnesio, p.ej. en forma de sulfato de magnesio o cloruro de magnesio, con difosfato de tiamina.

En el caso de la utilización de sulfato de magnesio y difosfato de tiamina como cofactores se prefiere un intervalo de concentraciones de 1-5 mM, preferiblemente de 2,5 mM para sulfato de magnesio y de 5-300 µM, preferiblemente 100 µM para difosfato de tiamina.

La reacción se puede llevar a cabo con un valor del pH de 5 hasta 8, preferiblemente de 6 hasta 7,5.

Para ello se puede emplear por ejemplo un tampón de fosfato de potasio. Sin embargo entran en consideración también otros tampones, tales como HEPES, MOPS, TEA o TRIS-HCl.

El intervalo preferido de temperaturas se sitúa en la temperatura ambiente, pero la reacción se puede llevar a cabo bien entre 20°C y 30°C, particularmente a 25°C.

La reacción se lleva a cabo preferiblemente a la presión atmosférica.

Alternativamente, la reacción enzimática puede efectuarse *in vivo*. Esto tiene la ventaja de que la enzima se puede producir a un precio barato como catalizador.

Para esto se pueden emplear bacterias de *E. coli* como organismos productores.

En este contexto, unos genes, que codifican una liasa en la primera etapa, se pueden ligar en un vector.

Preferiblemente, las cepas de *E. coli* son recombinantes y contienen unos plásmidos que son portadores de la liasa selectiva para (S).

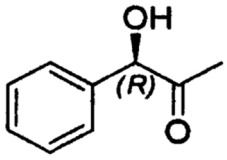
Preferiblemente, los plásmidos pueden contener los genes para las liasas más arriba mencionadas.

Como plásmidos se pueden emplear por ejemplo unos cuerpos principales de pET22b o pKK233 que contienen los correspondientes genes de liasas.

Los organismos productores secretan el deseado producto según las Fórmulas (2) y (3) en la solución acuosa.

En una forma preferida de realización del procedimiento conforme al invento, el compuesto indeseado según la Fórmula (2)

Fórmula (2)



(R)-PAC

se convierte químicamente mediante una benzaldehído liasa en benzaldehído y acetaldehído.

El esquema de reacción se representa en la Figura 2.

Esto tiene la ventaja de que el producto secundario indeseado según la Fórmula (2) es disociado y el benzaldehído y el acetaldehído resultantes se devuelven al proceso y se puede aumentar el rendimiento del deseado producto según la Fórmula (3). El exceso enantiomérico de (S)-PAC según la Fórmula 3 se puede aumentar a > 97 % en total. El rendimiento en esta etapa, referido a la cantidad total del PAC empleado, es de 95 %.

En el caso de la reacción del compuesto según la Fórmula (2) es ventajoso añadir el compuesto donante de acetilo en un exceso al proceso de reacción, de manera tal que se encuentre a disposición suficiente cantidad del compuesto donante de acetilo para la conversión química ulterior en el compuesto intermedio deseado según la Fórmula (3).Esto es ventajoso en particular en el caso de compuestos donantes de acetilo volátiles, tales como por ejemplo acetaldehído. Por ejemplo, se puede emplear un exceso de 10 veces del compuesto donante de acetilo con respecto al benzaldehído.

El producto intermedio es preferiblemente separado. Para ello se puede emplear una cromatografía en columna con gel de sílice mediando utilización de una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo (90:10) como líquido de separación.

El producto según la Fórmula (3) obtenido de esta manera se hace reaccionar, en una segunda etapa de reacción, con un compuesto donante de amina mediante una transaminasa selectiva para (S) para dar el producto final catina ((*1S*, *2S*)-norpseudoefedrina). La reacción se representa esquemáticamente en la Figura 3.

Para la segunda etapa de reacción, es decir la aminación química en condiciones reductoras, se pueden emplear unas transaminasas que convierten químicamente al substrato y son selectivas para (S). La transaminasa puede proceder de una bacteria *Chromobakterium*, por ejemplo *Chromobakterium violacaeum,* preferiblemente CV2025. Por lo demás, se pueden emplear unas transaminasas procedentes de *Alcaligens denitrificans, Arthrobacter citreus, Bacillus megaterium, Pseudomonas fluoreszens, Vibrio flurialis* o *Caulobacter crescentus*.

Preferiblemente, se emplean enzimas purificadas y liofilizadas. La liofilización tiene la ventaja de que las enzimas son estables y se pueden emplear altas concentraciones de las enzimas, además de ello, unas enzimas purificadas pueden conducir a unas purezas ópticas manifiestamente más altas, es decir un exceso enantiomérico y diastereoisomérico más alto del producto.

Como compuestos donantes de aminas se pueden emplear por ejemplo (*S*)-alfa-metilbencilamina, bencilamina, isopropilamina, L-alanina, (±)-1 -metil-3-fenilpropilamina, (±)-1-aminoindano.

Como cofactor se puede emplear piridoxal-5'-fosfato.

Preferiblemente la concentración de piridoxal-5'-fosfato está situada entre 100 y 200 µM.

La reacción se puede llevar a cabo en un medio acuoso en un intervalo de valores del pH de 6 hasta 11, preferiblemente a unos pH de 7,5 hasta 8,5.

Para esto se pueden emplear unos apropiados tampones tales como HEPES, fosfato de potasio, MOPS, TEA o TRIS-HCl.

El intervalo preferido de temperaturas está situado en 25°C, pero la reacción se puede llevar a cabo bien en un intervalo de 20°C - 30°C.

Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo a la presión atmosférica.

Alternativamente, la reacción enzimática se puede efectuar *in vivo* con la transaminasa selectiva para (*S*).

Para esto se pueden emplear bacterias de *E.coli* como organismos productores.

En tal caso unos genes que codifican una transaminasa se pueden ligar en un vector.

Preferiblemente, las cepas de *E.coli* son recombinantes y contienen unos plásmidos que son portadores de los genes para una transaminasa selectiva para (*S*).

Preferiblemente, los plásmidos pueden contener los genes para las transaminasas más arriba mencionadas.

Como plásmidos se pueden emplear por ejemplo los cuerpos principales de pET22b o pKK233, que contienen los correspondientes genes de transaminasas.

Los organismos productores secretan el deseado producto según la Fórmula (3) en la solución acuosa.

Las reacciones *in vivo* se pueden llevar a cabo, en el caso del procedimiento conforme al invento, o bien solamente para la primera o la segunda etapa de reacción o para ambas etapas de reacción 1 y 2. Las restantes condiciones se pueden escoger para cada etapa exactamente igual a como para la reacción enzimática *in vitro.*

La Figura 4 muestra un resumen de las etapas de las Figuras 1 y 3.

Ejemplo:

La síntesis en 2 etapas se llevó a cabo con éxito con la combinación de la liasa ApPDC-E469G selectiva para (*S*) procedente del organismo *Acetobacter pasteurianus* en la primera etapa y de la transaminasa CV2025 selectiva para (*S*) procedente del organismo *Chromobacterium violacaeum* en la segunda etapa. En la primera etapa, se une acetaldehído directamente con benzaldehído o respectivamente piruvato, después de una descarboxilación con benzaldehído para dar acetaldehído, para dar el (*S*)-PAC con una pureza enantiomérica de aproximadamente 70 %. El rendimiento después del tratamiento fue de 95 %, el *ee* (exceso enantiomérico) fue de aproximadamente 70 %. El grado de conversión en la segunda etapa de reacción estaba situado en 95 %. En total, de esta manera, a través de ambas etapas de reacción, se pudo producir un grado total de conversión en catina de aproximadamente 90 % con una pureza óptica de *ee* > 99 % y una diastereoisomérica *de* de aproximadamente 70 %.

Condiciones de reacción

Etapa 1 (reacción con una liasa, Fig. 1):
40 mM de benzaldehído, 400 mM de piruvato, 2,5 mM de sulfato de magnesio, 100 µm de difosfato de tiamina, 0,5 mg/ml de ApPDC-E469G **(**enzima liofilizada purificada), 100 mM de un tampón de fosfato de potasio, a 25°C, durante un período de tiempo de reacción de 48 h. A continuación se efectuaron una extracción y una purificación del producto ((*S*)-PAC) por cromatografía en columna. El rendimiento fue de 95 %. Alternativamente, la reacción se puede llevar a cabo también con acetaldehído en lugar de con piruvato y/o con células enteras en las que la enzima ApPDC-E469G se presenta sobreexpresada, en lugar de una enzima purificada.

Etapa 2 (reacción con una transaminasa Figura 3)
10 mM de (*S*)-PAC, 10 mM de (*S*)-alfa-metilbencilamina, 1 mg/ml de una enzima purificada, 25°C, 100 mM de HEPES con 0,1 mM de piridoxal-5'-fosfato, de pH 7,5, durante un período de tiempo de reacción de 24 h. El grado de conversión fue de 95 %. La reacción se puede llevar a cabo alternativamente también con células enteras liofilizadas, en las que la transaminasa selectiva para (*S*) se presenta sobreexpresada.

Por medio de una etapa adicional, después de la reacción con la liasa, la pureza enantiomérica del compuesto intermedio ((*S*)-PAC) se puede aumentar opcionalmente. Al (*S*)-PAC purificado (*ee* aproximadamente 70 %) se le añaden piruvato, ApPDC-E469G y una benzaldehído liasa procedente del organismo *Pseudomonas fluorescens*. La benzaldehído liasa cataliza la reacción de desdoblamiento selectivo de (*R*)-PAC para dar benzaldehído y acetaldehído. El resultante benzaldehído sirve, análogamente a la etapa 1 de reacción, como substrato para la reacción de carboligación de benzaldehído y piruvato catalizada sucesivamente por la enzima ApPDC-E469G para dar (*S*)-PAC. El *ee* del producto se puede aumentar de esta manera hasta un *ee* > 97 % de (S)PAC, cuando están presentes tanto la benzaldehído liasa como también la ApPDC-E469G en la tanda de reacción. El rendimiento, referido a la cantidad total de PAC empleado en esta etapa, es > 91 %.

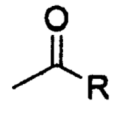
Elevación de la pureza enantiomérica de (S)-PAC en la Figura 2:

a) 11,2 mM de (S)-PAC (*ee* aprox. 70%), 200 mM de piruvato, 2,1 mg/ml de ApPDC-E469G, 2 mg/ml de BAL (benzaldehído liasa), 2,5 mM de sulfato de magnesio, 100 µM de difosfato de tiamina, 100 µM de un tampón de fosfato de potasio, 25 °C, período de tiempo de reacción: 48 h. Rendimiento: 91,6 %, *ee* (de (*S*)-PAC) = 97,4 %.

b) 20,7 mM (*S*)-PAC (*ee* aprox. 70 %), 300 mM de piruvato, 2,1 mg/ml de ApPDC-E469G, 2 mg/ml de BAL (benzaldehído liasa), 2,5 mM de sulfato de magnesio, 100 µM de difosfato de tiamina, 100 µM de un tampón de fosfato de potasio, 25 °C, período de tiempo de reacción: 48 h. Rendimiento 93,7 %, *ee* (de (*S*)-PAC) = 96,7 %.

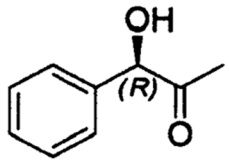
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de (1S,2S)-norpseudoefedrina),
caracterizado por que
en una primera etapa de reacción se hace reaccionar benzaldehído con un compuesto donante de acetilo según la Fórmula (1)

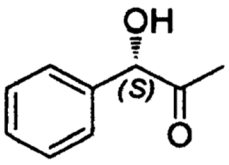
Fórmula (1) 

con R = H o COOH

mediante la liasa ApPDC-E469G selectiva para (S) para dar una mezcla de enantiómeros según las Fórmulas (2) y (3)

Fórmula (2) 

(R)-PAC

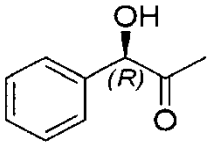
Fórmula (3) 

(S)-PAC

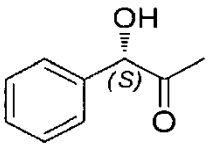
y el compuesto según la fórmula (3) se hace reaccionar en una segunda etapa con un compuesto donante de amina mediante una transaminasa selectiva para (S) para dar (1S,2S)-norpseudoefedrina.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado por que
como cofactor se emplea difosfato de tiamina.

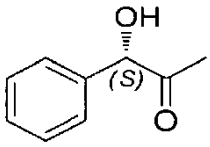
3. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2,
caracterizado por que
la etapa 1 se lleva a cabo con un valor del pH de 5 hasta 9.

4. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 3,
caracterizado por que
el compuesto según la Fórmula (2) 
como producto de la primera etapa de reacción se convierte químicamente mediante una benzaldehído liasa en benzaldehído y acetaldehído.

5. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 4,
caracterizado por que
el compuesto donante de acetilo se añade en un exceso.

6. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 5,
caracterizado por que
se separa el producto intermedio según la Fórmula (3) 
.

7. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 6,
caracterizado por que

el compuesto según la Fórmula (3)  se hace reaccionar en la segunda etapa con una transaminasa selectiva para (S) procedente de *Chromobakterium, Alcaligens denitrificans, Arthrobacter citreus, Bacillus megaterium, Pseudomonas fluoreszens, Vibrio flurialis* o *Caulobacter crescentus*

8. Un procedimiento según la reivindicación 7,
caracterizado por que
como transaminasa selectiva para (S) se emplea CV2025 procedente de *Caulobacter crescentus.*

9. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 8,
caracterizado por que
en la segunda etapa se emplea como compuesto donante de amina un componente tomado del conjunto formado por metilbencilamina, bencilamina, isopropilamina, L-alanina, (±)-1-metil-3-fenilpropilamina o (±)-1- aminoindano.

10. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 9,
caracterizado por que
en la etapa 2 se emplea piridoxal-5'-fosfato como cofactor.

11. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 10,
caracterizado por que
la etapa 2 se lleva a cabo con un valor del pH de 6 hasta 11.

12. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 11,
caracterizado por que
en las etapas 1 y/o 2 se emplean unas enzimas purificadas y liofilizadas.

13. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 hasta 12,
caracterizado por que
las etapas 1 y/o 2 se llevan a cabo *in vivo*.

14. Un procedimiento según la reivindicación 13,
caracterizado por que
como cepa productora se emplea *E. coli.*

15. Un procedimiento según la reivindicación 13 ó 14,
caracterizado por que
los genes que codifican la liasa y/o la transaminasa se ligan en un vector.

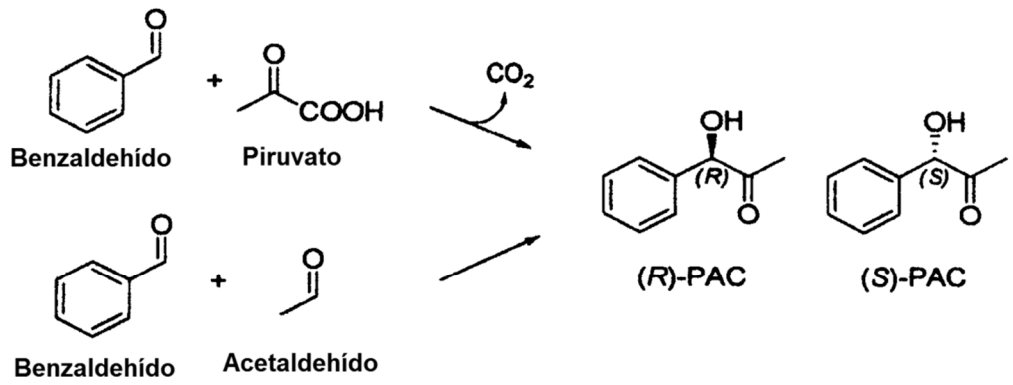


Fig. 1

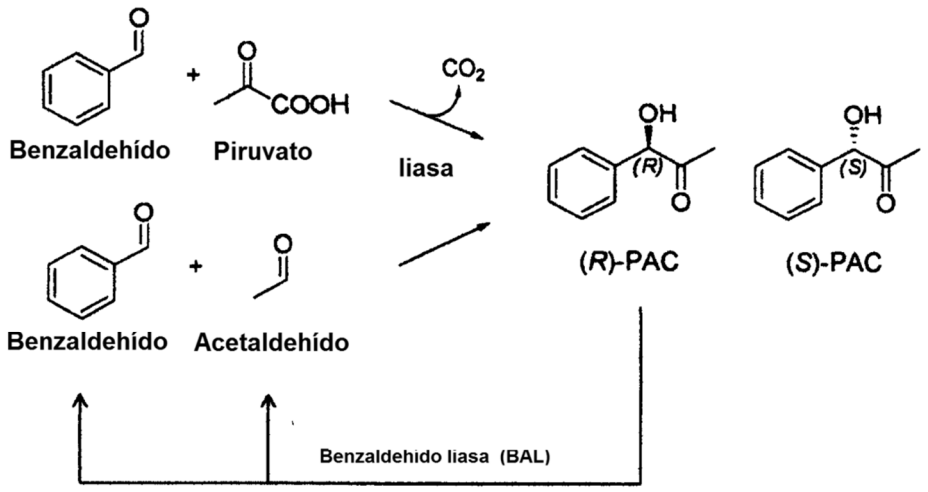


Fig:2

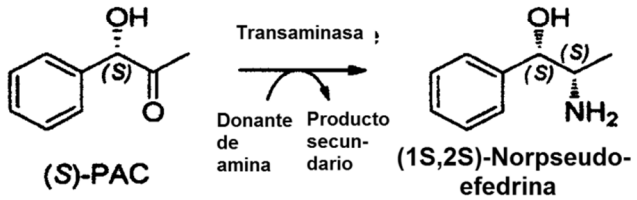


Fig.3

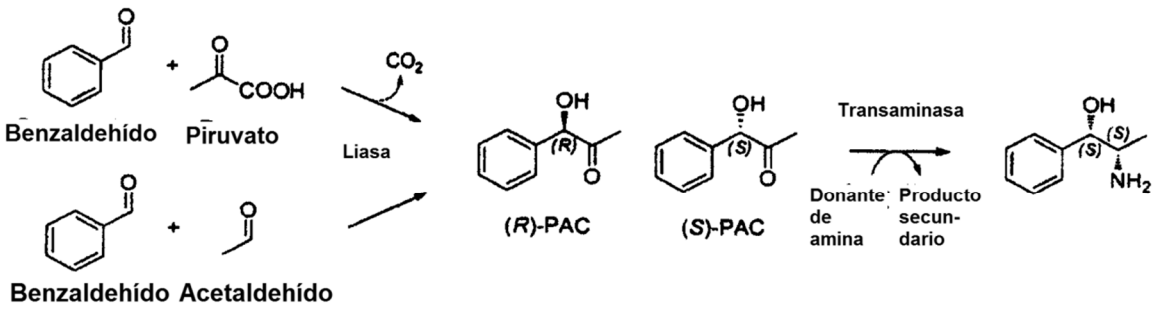

Benzaldehído
Piruvato
CO_2
Liasa
Benzaldehído
Acetaldehído
(R)-PAC
(S)-PAC
Transaminasa
Donante de amina
Producto secun-dario
NH_2

Fig.4