

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 85 412

REQUERENTE: GIST-BROCADES, N.V., holandesa, com sede em Wateringseweg 1, P.O.Box 1,2611 XT Delft, Holanda e SHELL INTERNATIONALE RESEARCH MAATSCHAPPIJ, B.V., holandesa, com sede em Carel van Bijlandtlaan 30, P.O.Box 162,2501 an den Haag, Holanda

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ÉSTERES DO ÁCIDO 4-(2,3-EPOXIPROPOXI)-FENILACÉTICO E DO ÁCIDO 4-(2-HIDROXI-3-ISOPROPILAMINO-PROPOXI)-FENILACÉTICO E/OU DE ATENOLOL SOB FORMA ESTEREOSPECÍFICA"

INVENTORES: Gareth Thomas Phillips, Mauro Attilio Bertola, Arthur Friedrich Marx e Hein Simon Koger

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Grã-Bretanha, em 28 de Julho de 1986, sob o No. 8618324



Memória descritiva referente à patente de invenção de GIST-BROCADES NV, holandesa, industrial e comercial com sede em Wateringseweg 1, P.O. Box 1, 2611 XT Delft, Holanda e de SHELL INTERNATIONAL RESEARCH MAATSCHAPPIJ B.V., holandesa industrial e comercial, com sede em Carel van Bijlandtlaan 30, P.O. Box 162, 2501 AN Den Haag, Holanda (inventores Gareth Thomas Phillips, residente no Reino Unido, Mauro Attilio Bertola, Arthur Friedrich Marx e Hein Simon Koger, residentes na Holanda), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ÉSTERES DO ÁCIDO 4-(2,3-EPOXIPROPOXI)-FENILACÉTICO E DO ÁCIDO 4-(2-HIDROXI-3-ISOPROPILAMINO-PROPOXI)-FENILACÉTICO E/OU DE ATENOLOL SOB FORMA ESTEREOESPECÍFICA"

MEMÓRIA DESCRITIVA

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de atenolol (4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenilacetamida) sob forma estereoespecífica e de sais desse produto farmacêuticamente aceitáveis, por exemplo sais de adição de ácido bem como para a produção de ésteres de ácido

4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacético e do ácido 4-(2-hidroxi-3-isopropilamino-propoxi)-fenilacético sob forma estereoespecífica.

Muitos compostos biologicamente activos são sintetizados sob a forma duma mistura de estereoisómeros. Estas misturas são frequentemente usadas sob essa forma em aplicações agrícolas e farmacêuticas. Normalmente a maior parte da actividade biológica desejada reside num único estereoisómero, de maneira que quando a mistura contém dois ou mais estereoisómeros, a potência da mistura é reduzida. A razão principal para se continuarem a usar as misturas de estereoisómeros é porque o custo da separação dos estereoisómeros excede a potencial vantagem de um possível aumento da actividade. De qualquer modo, é manifesto que os farmacologistas modernos estão-se a tornar gradualmente mais atentos a outras implicações de administração de misturas em que um ou mais estereoisómeros têm que ser encarados não só como meras impurezas, as quais podem não ter o efeito terapêutico desejado, mas que podem para além disso ter outros efeitos fisiológicos indesejados, incluindo toxicidade.

Alguns exemplos são citados em seguida para ilustrar a associação da actividade biológica com um único estereoisómero.

Dentro da área farmacêutica, a maior parte dos agentes bloqueadores beta-adrenérgicos são apresentados como misturas apesar de a actividade residir num só estereoisómero. Num exemplo, um produto farmacêutico conhecido por labetalol tem uma acção bloqueadora alfa-adrenérgica e uma acção bloqueadora beta-adrenérgica as quais tem sido demonstrado serem imputáveis a dois pares de isómeros da mistura de quatro.

N. Toda et al. descreveram em J. Pharmacol. Exp. Ther. 207 (1978) 311 que (-)-metoprolol é 270 a 380 vezes mais potente que (+)-metoprolol na acção de atenuar a resposta de músculos do átrio e da traqueia de coelho ao isoproterenol (um estimulador dos beta-adenorecetoires).

Hoje em dia as vias de síntese para os estereoisómeros bloqueadores beta implicam geralmente resoluções químicas ou sínteses químicas bastante demoradas a partir de precursores estereoisoméricos, as quais são descritos, por



exemplo, na Patente Norte Americana 4 408 063 e em J. Org. Chem. 41 (1976) 3121 por L.M. Weinstok et al.. Estes processos para a preparação de modo análogo do enantiômero S (estereoisômero opti- camente activo) de metoprolol não são vantajosos economicamente. Por conseguinte um objectivo da presente invenção é fornecer um processo eficiente para a preparação de certos estereoisômeros que possa ser levado a cabo à escala industrial de uma forma eco- nomicamente atractiva.

A capacidade de microorganismos pa- ra converterem alcenos de cadeia curta (C_2-C_4) estereoespecifica- mente nos epoxialcanos correspondentes num bioreactor de gás/sô- lido ou de duas fases líquidas foi demonstrado por J. Tramper et al. (3rd European Congress on Biotechnology, Munchen, 10-14 Sep- tembro 1984). Outro exemplo de uma preparação microbiológica de epoxialcanos é revelado na Patente Norte Americana 4 106 986 des- crevendo a conversão de 1-alcenos de cadeia linear (C_2-C_{20}) em 1,2-epoxialcanos. No pedido de Patente Europeia EP-A-0099609 são dados exemplos da conversão de propeno e de 1-octeno nos seus epoxialcanos correspondentes. No entanto, a conversão dos alca- nos substituídos como 4-aliloxifenilacetatos, não pode de manei- ra alguma ser deduzida a partir destes processos conhecidos, os quais são só aplicáveis a alcenos lineares e por vezes a alcenos ramificados.

O pedido de Patente Europeia EP-A- -0166527 descreve um processo para a preparação de epóxidos e, mais particularmente, de éteres 2,3-epoxipropílicos a partir dos éteres alílicos correspondentes por acção de microorganismos. Contudo, nesta publicação a epoxidação só é demonstrada para oi- to éteres fenilalílicos, dos quais só três podem conduzir a blo- queadores adrenérgicos beta.

Além disso, a pureza óptica dos com- postos epoxi era baixa, variando entre 71% e 79% dependendo do epóxido e do microorganismo utilizado. Por isso, o produto resul- tante ainda necessita de ser separado nos dois enantiômeros.

A presente invenção fornece um pro- cesso de epoxidação estereo-selectiva, o qual compreende subme- ter um éster de ácido 4-aliloxifenilacético à acção de um micro-



organismo com capacidade para epoxidação estereo-selectiva de forma a produzir o correspondente éster de ácido 4-(2,3-epoxipropoxi)-fenil-acético, o qual se apresenta predominantemente na configuração S.

Por "predominantemente na configuração S" pretende-se significar que mais de 50% em peso do composto epoxipropoxi resultante tem a configuração S e na prática, a nossa invenção possibilita que pelo menos 70% em peso, de preferência pelo menos 80% em peso e de modo particular pelo menos 90% em peso do composto epoxipropoxi a ser produzido tenha a configuração S.

O composto epoxipropoxi tendo predominantemente a configuração S pode ser convertido em atenolol por métodos conhecidos em si, os quais mantêm a configuração S desejada na cadeia lateral de propoxi. Apesar de, em princípio, qualquer éster de ácido 4-aliloxifenilacético poder ser usado no processo da presente invenção, considerações práticas indicam que o éster será normalmente um éster alquílico inferior contendo até 6 e normalmente até 4 átomos de carbono e que são preferidos ésteres de metilo ou etilo. O éster do ácido epoxipropoxifenilacético pode então ser feito reagir com isopropilamina para dar o éster de ácido 4-(2-hidroxi-3-isopropilamino-propoxi)-fenilacético correspondente a este éster por sua vez pode ser transformado na respectiva amida por reacção com amônia para formar atenolol. O atenolol resultante pode ser convertido, se desejado, em sais farmaceuticamente aceitáveis por reacção com o ácido adequado por métodos conhecidos em si.

De preferência o processo é realizado de tal maneira, por meio da selecção de microorganismos adequados, que pelo menos 70%, de preferência 80% e ainda de modo mais preferível pelo menos 90% em peso do atenolol é formado na configuração S.

Pela expressão "microorganismos que possuem capacidade para epoxidação estereo-selectiva" entendem-se, por exemplo, bactérias, leveduras ou fungos. As bactérias adequadas são, por exemplo, microorganismos pertencendo ao género Pseudomonas.



Também são englobados na referida definição microorganismos que obtiveram a capacidade para epoxidação estereo-selectiva por meio da introdução de novo material genético. Isto pode ser realizado por transferência do gene clonado, que codifica para um polipeptídeo responsável pela epoxidação estereo-selectiva, por exemplo, para uma enzima, de um microorganismo adequado para outro microorganismo, particularmente para Echerichia coli. Outros microorganismos podem ser pertencentes aos gêneros Pseudomonas, Mycobacterium, Streptomyces, Saccharomyces, Kluyveromyces, Bacillus, Nocardia, Rhodococcus, Escherichia e Corynebacterium. Os genes clonados podem ser seleccionados pela sua capacidade para codificar para uma enzima apta para epoxidação estereo-selectiva de um éster de ácido 4-aliloxifenilacético.

Em alternativa, poderão ser seleccionados por hibridação cruzada com um gene previamente seleccionado, codificando para uma enzima para a epoxidação estereo-selectiva.

Os microorganismos podem de modo vantajoso ser imobilizados, por exemplo, num gel polimérico. Isto pode ser feito com células vivas, células mortas e/ou células inactivas, em alternativa com enzimas adequadas derivadas destas células, as quais podem ser purificadas até um certo grau se uma actividade especifica mais elevada for necessária. Por isso, pelo termo "microorganismos ou substâncias daí derivadas" entendem-se os microorganismos, mortos, vivos ou inactivos e extractos destes opcionalmente concentrados e/ou purificados. Podem ser usados, por exemplo, enzimas opcionalmente em combinação com, por exemplo, cofactores artificiais ou naturais. Células não activas de forma fermentativa poderão ser utilizadas para a epoxidação do éster de ácido 4-aliloxifenilacético. Verificou-se que as enzimas derivadas de células vivas ou células mortas podem produzir o isômero S em condições adequadas. Os microorganismos ou substâncias daí derivadas poderão ser usadas várias vezes e são, geralmente, activos durante pelo menos 2 semanas. Mesmo sem um co-substrato (por exemplo glucose) os microorganismos podem manter-se activos. O enriquecimento do éster do ácido 4-(2,3-epoxi-



propoxi)-fenilacético em isômero S pode ter lugar em tampões adequados bem como em sais fisiológicos. Verificou-se que, depois de armazenadas, as células induzidas são directamente capazes de produzir o enriquecimento em isômero-S.

As bactérias particularmente preferidas para a epoxidação de 4-aliloxifenilacetatos incluem Pseudomonas oleovorans (uma estirpe desta espécie foi depositada na ATCC sob o número de acesso 29347 em 21 de Junho de 1976), ou uma sua variante ou mutante.

Ao praticar uma concretização preferida do processo da presente invenção, um microorganismo que tenha a capacidade para converter 4-aliloxifenilacetatos em 4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetatos, tendo pelo menos 70% e preferivelmente pelo menos 80% ou, de modo especialmente preferido, pelo menos 90% em peso da configuração S pode ser seleccionado a partir dos microorganismos mencionados, e pode ser cultivado durante 0,5 a 10 dias. Daqui em diante as células podem ser suspensas num meio nutriente líquido e o 4-aliloxifenilacetato é submetido à acção das células. Em alternativa, as células podem ser mortas, por exemplo por suspensão num meio lisogénico, e o 4-aliloxifenilacetato é submetido à acção das substâncias derivadas das células.

Após esta cultura, durante cerca de 0,5 a 10 dias, as células poderão ser isoladas do meio de cultura antes de serem suspensas no meio nutriente líquido ou num meio lisogénico. Para crescimento dos microorganismos utilizados para a epoxidação estereo-selectiva do 4-aliloxifenilacetato, podem ser utilizados meios de cultura usuais contendo uma fonte de carbono assimilável (por exemplo glucose, glicerol, lactato, hidrocarbonetos como hexano (C6), etc.), uma fonte de nitrogénio (por exemplo sulfato de amónio, nitrato de amónio, cloreto de amónio, etc.), e uma fonte de nutrientes inorgânicos (por exemplo fosfato, magnésio, potássio, zinco, ferro e outros metais em quantidades residuais).

Um meio de cultura preferido é um meio PSX, opcionalmente enriquecido com um ou mais aditivos. Opcionalmente pode ser adicionado ao meio de cultura um indutor



(por exemplo dietoximetano). Uma temperatura de 0 a 45°C e um pH de 3,5 a 9 são mantidos de preferência durante o crescimento dos microorganismos. De preferência os microorganismos são feitos crescer a uma temperatura de 20 a 37°C e a um pH de 5 a 8.

As condições aeróbicas requeridas durante o crescimento dos microorganismos podem ser conseguidas de acordo com qualquer dos procedimentos habituais, desde que o fornecimento de oxigênio seja suficiente para as necessidades metabólicas dos microorganismos. Isto é realizado de forma mais conveniente mediante o fornecimento de oxigênio, preferivelmente sob a forma de ar.

Durante a conversão do 4-aliloxifenilacetato em 4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetato, os microorganismos podem ser mantidos num estágio de crescimento usando um meio de cultura habitual acima referido. Os microorganismos poderão ser suplementados com um co-substrato.

Durante a conversão de 4-aliloxifenilacetato em 4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetato os microorganismos podem ser mantidos num estágio de crescimento ou num estágio substancialmente de não crescimento utilizando um meio de cultura mínimo. Como meio de cultura mínimo pode ser utilizado um meio de cultura usual contendo uma fonte de carbono assimilável quando requerido (por exemplo glucose, etanol, hidrocarbonetos como hexano (C6), etc.), uma fonte de nitrogênio quando requerido (por exemplo sulfato de amônio, nitrato de amônio, cloreto de amônio, etc.) e uma fonte de nutrientes inorgânicos quando requerido (por exemplo fosfato, magnésio, potássio, zinco, ferro e outros metais em quantidades residuais). Os microorganismos podem ser mantidos no estágio de não crescimento, por exemplo, por exclusão da fonte de carbono assimilável ou da fonte de nitrogênio. Um meio de cultura preferido é um meio PSX, opcionalmente enriquecido com um ou com vários aditivos. É mantida de preferência uma temperatura de 0 a 45°C e é preferivelmente mantido um pH de 3,5 a 9 durante este estágio. De preferência os microorganismos são mantidos à temperatura de 30 a 45°C e a pH de 5 a 8. As condições aeróbicas requeridas durante este estágio podem ser conseguidas de acordo com os procedimentos acima mencionados, contan-



to que o fornecimento de oxigênio seja suficiente para ir de encontro às necessidades metabólicas dos microorganismos mas também para converter o 4-aliloxifenilacetato em 4-(2,3-epoxipropoxi)fenilacetato.

O 4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetato produzido pelos microorganismos mencionados acima pode ser recuperado e purificado de acordo com os procedimentos habituais.

O R -(-)-4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetato, o S -(+)-4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetato ou misturas destes compostos produzidos de acordo com a presente invenção podem ser convertidos em R -(+)-atenolol, em S -(-)atenolol ou nas misturas destes compostos, respectivamente, pelas reacções químicas com isopropilamina e amônia realizadas sucessivamente. Um exemplo da reacção para formar agentes bloqueadores de receptores beta adrenérgicos com a configuração (S) absoluta a partir de éteres aril-glicidílicos com a configuração (S) absoluta é descrito na publicação de pedido de Patente Alemã DE-A-2453324. A conversão química de S ou de R 4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenilacetato de metilo em S ou R atenolol foi levada a efeito utilizando tanto amônia aquosa como amoníaco anidro. As condições anteriores, embora dessem origem a S-atenolol a partir de S -4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenilacetato de metilo em baixo rendimento, deram uma alta proporção do ácido livre proveniente da hidrólise do éster, enquanto que o uso de amoníaco anidro fornecia o produto requerido em bom rendimento. É possível converter atenolol nos seus sais farmacêuticamente aceitáveis, como seja um sal de adição do ácido.

Por conseguinte, um processo para a produção de atenolol de acordo com a presente invenção compreende a reacção de 4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenilacetato de metilo com amônia e pelo menos a separação parcial do atenolol e/ou a conversão do etanolol num seu sal farmacêuticamente aceitável.

Podem ser usadas vantajosamente em produtos farmacêuticos especialmente misturas com uma quantidade predominante do composto S -(-)-atenolol. De preferência podem ser usados em produtos farmacêuticos os compostos que contenham


pelo menos 80% e de modo mais preferível pelo menos 90% em peso na configuração S.

Podem ser obtidas produtividades de cerca de 25 mg/g/h em 3 h e níveis de produto de 1,3 g/l utilizando Pseudomonas oleovorans para epoxidar 4-aliloxifenilacetato. Além disso são possíveis produtividades mais altas utilizando 4-aliloxifenilacetato como substrato com glucose como co-substrato, e foram alcançadas produtividades de mais de 94 mg/g/h e níveis de produto de 4,1 g/l em 3 h. Os produtos resultantes eram enantiomericamente puros no limite dos erros experimentais.

A pureza óptica tal como será mencionado nesta especificação é representada em excesso enantiomérico em percentagem: S-R/S+R.

A presente invenção será ilustrada mais em pormenor por intermédio dos Exemplos seguintes sem restringir o seu âmbito a estes Exemplos.

EXEMPLO 1

Transformação de 4-aliloxifenilacetato de metilo em 4-(2,3-epoxi propoxi)-fenilacetato de metilo, usando Pseudomonas oleovorans ATCC 29347.

Uma cultura pré-cultivada de Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 foi utilizada para inocular um meio PSX a pH 7,0 contendo 0,75% de glicerol e 0,05% de dietoximetano. O meio PSX contém: KH_2PO_4 (8,92 g/l), Na_2HPO_4 (2,94 g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1,0 g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,2 g/l), KCl (0,2 g/l), citrato tris sódico (0,294 g/l), $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/l), e solução de elementos residuais PS II (10 ml/l). (A solução de elementos residuais contém: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g/l), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g/l), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,03 g/l), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,015 g/l), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,015 g/l), H_3BO_3 (0,005 g/l), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,0055 g/l), KI (0,01 g/l), HCl para pH 3).

A cultura (15 litros) foi desenvolvida a 30°C durante 24 h. As células foram recuperadas, ressuscendidas em meio PSX (1,5 litros) contendo 0,5% de glucose. Fo-

~~CONFIDENTIAL~~

ram incubadas aliquotas de 100 ml com 2,5% de 4-aliloxifenilacetato de metilo durante um período máximo de 6 horas. Foram extraídas amostras (1 ml) com diclorometano a determinados intervalos de tempo e analisado o conteúdo de S-(+)-4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetato de metilo (V) por cromatografia em fase gasosa (glc).

Análise por cromatografia em fase gasosa

A análise foi levada a efeito num instrumento Varian 3700 utilizando uma coluna de OV1 3% em WHP 100-120 (50 cm x 2 mm)

Condições: N₂ a 30°C por minuto, detector de ionização de chama 280°C, injetor a 200°C. Programado a 120-190°C a 10°C/min. O tempo de retenção do 4-aliloxifenilacetato de metilo é de 1,5 min e o do 4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetato de metilo é de 3,1 min.

Os resultados são dados no Quadro 1.

QUADRO 1

Conversão de 4-aliloxifenilacetato de metilo em S-(+)-4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetato de metilo utilizando Pseudomonas oleovorans ATCC29347

Biomassa g/l	<u>S</u> -(+)-4-(2,3-epoxipropoxi)fenilacetato de metilo mg/g/h (g/l)			
	t = 1 h	t = 3 h	t = 4 h	t = 6 h
16,3	48 (0,8)	78 (3,8)	71 (4,6)	58 (5,6)
14,6	77 (1,1)	94 (4,1)	72 (4,2)	49 (4,3)
15,5	53 (0,8)	69 (3,2)	68 (4,2)	55 (5,1)

EXEMPLO 2

- Transformação de 4-aliloxifenilacetato de metilo em S-(+)-4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetato de metilo utilizando Pseudomonas oleo

~~CONFIDENTIAL~~

vorans ATCC 29347 e a sua subsequente conversão em S -(-)-4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenil-acetato de metilo.

Inoculou-se com uma cultura líquida pré-cultivada de Pseudomonas oleovorans ATCC 2937 um volume de 15 l de meio de sais minerais PSX a pH 7,0, contendo 0,75% de glicerol e 0,05% de dietoximetano e incubou-se durante 24 h a 30°C num agitador orbital. As células foram separadas por centrifugação e ressuspensas em meio PSX a pH 7,5 (1,5 l). Foram colocadas aliquotas de 100 ml em balões de agitação de 2,0 l e incubadas com 0,5% de glucose e 2,5% de 4-aliloxifenilacetato de metilo durante 6 h a 37°C. Após 6 h as células foram extraídas com diclorometano (2,5 l), secou-se o extracto sobre sulfato de sódio anidro e removeu-se o solvente por evaporação obtendo-se 42,7 g do produto contendo 26% de S -(+)-4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetato de metilo. O isolado bruto foi purificado em gel de sílica (550 g), eluído com éter/hexano: 4/6 obtendo-se 4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacetato de metilo (11,04 g), $[\alpha]_D^{25} = +8,27^\circ$ (c = 1,39, EtOH). Por pmr (CDCl_3) obtiveram-se sinais a δ 2,72/2,90 (2d, 2H, $-\text{CH} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 \end{array}$), 3,32 (m, 1H, $-\text{CH} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 \end{array}$), 3,95/4,18 (2d, 2H, OCH_2), 6,88/7,2 (2d, 4H, aromático), 3,57 (5, 2H, $\text{CH}_2 \text{CO}$), 3,68 (s, 3H, OCH_3). Eu (hfc)₃ pmr não separação dos sinais a 2,72/2,90 indicando a presença de um só enantiómero. E. I. espectro de massa m/z 222.

As análises de pmr foram efectuadas utilizando um instrumento Brucker WM. As medidas ópticas foram levadas a cabo utilizando um polarímetro Optical Activity Ltd. AA 100.

Síntese de S -(-)-4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)fenil-acetato de metilo

Foi adicionada isopropilamina (37 ml, 405 mmole) a uma solução de S-(+)-4-(2,3-epoxipropoxi)fenilacetato de metilo (6,0 g, 27 mmole). A mistura reaccional foi agitada durante 24 h a 22°C. O reagente e o solvente em excesso foram removidos por evaporação e o resíduo oleoso foi dissolvido

em diclorometano (100 ml). O diclorometano foi lavado com HCl 0,2 N (2 x 75 ml), as fases ácidas foram combinadas e lavadas com diclorometano (2 x 50 ml) e transformadas em bases com NaOH 2 N. Foi extraído o precipitado com diclorometano (5 x 100 ml), o extracto foi seco sobre sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado até se obter um produto semi-sólido (8,73 g). O produto foi recristalizado a partir de acetato de etilo/hexano para se obter S - (-)-4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenilacetato de metilo (6,08 g) sob a forma de cristais brancos, p.f. 87,5-89,5°C (não corrigido), $[\alpha]_D^{25} = -4,8^\circ$ (C=1,01, EtOH), pmr (CDCl₃ deu sinais a δ = 1,08 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 2,82 (m 1H, CH₃(CH₃)₂), 2,7/2,88 (m, 2H, CH₂NH), 3,98 (m, 1H, CHOH), 3,94 (m, 2H, OCH₂), 6,88/7,2 (2d, 4H, Ar), 3,55 (s, 2H, CH₂CO), 3,68 (s, 3H, OCH₃). E.I. espectro de massa m/z = 282 (m+1).

Determinação da pureza enantiomérica

Síntese dos derivados de 2-oxazolidona de 4-(2-hidroxi-3-isopropilamino-propoxi)-fenilacetato de metilo (ver J. Hermansson, J. Chromatography p. 379, 325 (1985).

Foi colocado num balão de reacção de 1,0 ml de (+)- ou (-)-4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)fenilacetato de metilo e dissolvido em éter dietílico seco (0,5 ml). Foi adicionado à mistura NaOH 0,5 N (0,05 ml) e agitado à temperatura ambiente durante 1 minuto. Foi adicionado fosgênio à mistura (0,05 ml de uma solução em tolueno a 120 mg/ml) e agitada à temperatura ambiente durante mais 1 h. Permitiu-se às fases separarem-se, removeu-se a fase etérea e lavou-se a fase aquosa com éter dietílico seco (3 x 0,5 ml). As fases etéreas foram combinadas e o solvente removido por evaporação com N₂. O resíduo foi dissolvido em clorofórmio/hexano (5/95, 2,0 ml) antes de ser analisado por HPLC.

A pureza enantiomérica do S - (-)-4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenilacetato de metilo foi confirmada seguindo a sua conversão no derivado de oxazolidona, o qual foi analisado utilizando um sistema de HPLC Gilson (método de detecção espectrofotométrica) numa coluna quiral Spherisorb S5 (cheia de UMIST, N-formil-L-isoleucina ligado a sílica por li

gações covalentes, $\angle 0,25 \text{ m} \times 4,5 \text{ mm}$, separação de fase) utilizando uma fase móvel de propano-2-ol/diclorometano/hexano (0,75/15/84,25; v/v/v). Composto detectado a 229 nm.

As análises do S-(-)-4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)fenil-acetato mostraram que o composto é enantiomericamente puro (tempo de retenção 12,6 min) dentro do erro experimental (o tempo de retenção do isômero R foi de 11,9 min).

Síntese de S-(-)-4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenilacetamida (Atenolol).

Foi dissolvido em metanol (5,0 ml) S-(-)-4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenilacetato de metilo (500 mg, 1,8 mmole). Adicionou-se amônia (1,0 ml, solução aquosa a 35%) e permitiu-se a reação continuar a 22°C durante 8 dias. O reagente e o solvente em excesso foram removidos por evaporação a pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em diclorometano (10 ml). A solução foi lavada com NaHCO_3 a 1% (2 x 10 ml) para remover o ácido e as lavagens com soluções básicas foram combinadas e lavadas com diclorometano (3 x 10 ml). As fases orgânicas foram combinadas, secas sobre sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado obtendo-se o produto bruto (0,27 g) contendo a amina e o material de partida. O produto bruto foi purificado sobre alumina neutra (15 g) usando um gradiente de eluição de diclorometano/metanol. Foram separados o 4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)fenilacetato de metilo e o atenolol e analisados num Lichrosorb RP8 ($0,25 \times 4,5 \text{ mm}$, Hichrom) utilizando uma fase móvel de acetato de amônia a 2% (pH 3,7) em metanol num sistema HPLC Gilson (sistema de detecção espectrofotométrica). Foram detectados compostos a 254 nm. Os tempos de retenção foram de 6,5 min e 3,2 min respectivamente. As frações que se verificou conter S-(-)-Atenolol (por HPLC) foram combinadas e o solvente evaporado para dar um produto o qual por recristalização a partir de acetato de etilo/hexano deu S-(-)Atenolol (50 mg, 0,19 mmole) p.f. 149,5-151°C (não corrigido), $[\alpha]_D^{25} = -2,82^\circ$ ($c = 0,332$, EtOH) pmr (CDCl_3) deu sinais a δ 1,08 (d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,82

~~CONFIDENTIAL~~

(m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,7/2,88 (m, 1H, CH_2NH), 3,98 (m 1H, CHOH), 3,98 (m, 2H, OCH_2), 6,92/7,2 (2d, 4H, Ar) 3,52 (5, 2H₂, CH_2CO), 5,38 (5, 2H, CONH_2). EI espectro de massa m/z = 267 (m+1).

Determinação da pureza enantiomérica.

Derivatização diastereomérica do atenolol com anidrido de ácido (R,R)-0,0-dibenzoil-tartárico.

Colocou-se num balão de reacção de 1,0 ml de (+) ou de (-)-atenolol (2,5 mg). Adicionou-se ácido tricloroacético (0,3 ml, de uma solução de ácido tricloroacético (61 mg) em diclorometano seco (6 ml)) e a mistura foi agitada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se anidrido de ácido dibenzoil-tartárico (7 mg) e a mistura foi agitada a 50°C durante 3 h. Removeu-se um volume de 0,2 ml de mistura reaccional, o solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em 1,0 ml de metanol para análise por HPLC.

A análise foi efectuada num Spherisorb RP 18 (0,25 m x 4,9 mm), utilizando uma fase móvel de 2% de acetato de amónio (pH 3,7) em metanol (35/65, v/v) num sistema de HPLC Gilson utilizando métodos de detecção espectrofotométrica. Os compostos foram detectados a 254 nm.

Comprovou-se uma pureza enantiomérica de 100% por meio de cromatografia do derivado diastereomérico formado com anidrido do ácido (R,R)-0,0-dibenzoil-tartárico. O atenolol racémico é separado igualmente nos seus pares diastereoméricos quando analisado da mesma maneira com tempos de retenção de 4,4 min e 6,7 min para os enantiómeros R e S respectivamente.

EXEMPLO 3

Síntese de S-(-)-4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenil-acetamida [(S)-atenolol]

Foram misturados 1,83 g de (S)-(-)-4-(2-hidroxi-3-isopropil-aminopropiloxi)-fenil-acetato de metilo com 8 ml de amoníaco anidro 11 N em metanol e selou-se a mis-



tura num tubo de vidro com um agitador magnético arrefecendo numa mistura de gelo seco e acetona. Em seguida, o tubo foi colocado num banho de óleo de 50°C e agitado durante três dias.

O tubo foi então arrefecido numa mistura de gelo seco-acetona e aberto e o conteúdo foi evaporado para dar 1,74 g de um sólido amarelo. Este foi cristalizado a partir de 80 ml de acetato de etilo quente dando 1,38 g de (S)-atenolol; p.f. 150-151,5°; $[\alpha]_D^{25} = -5,2^\circ$ (c = 1; etanol).

A pureza enantiomérica foi determinada de acordo com o método de determinação descrito no Exemplo 2 e foi confirmada a 100% por meio de cromatografia do derivado diastereoisomérico formado com anidrido de ácido (R,R)-0,0-dibenzoil-tartárico. O atenolol racêmico é separado igualmente nos seus pares diastereoisoméricos quando analisado do mesmo modo.



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1ª -

Processo de epoxidação estereoespecífica caracterizado por se submeter um éster do ácido 4-aliloxi-fenilacético à acção dum microorganismo dotado da capacidade de epoxidação estereoespecífica de modo a produzir o correspondente éster do ácido 4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacético predominante na configuração S.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter um éster do ácido epoxipropoxi-fenilacético com um conteúdo superior a 80% em peso da configuração S.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por se obter um éster do ácido epoxipropoxi-fenilacético com um conteúdo superior a 90% em peso da configuração S.

- 4ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado por o microorganismo mencio-



nado ser uma bacteria, uma levedura ou um fungo.

- 5ª -

Processo de acordo com a reivindica
ção 4, caracterizado por o microorganismo ser uma bactéria per-
tencente ao gênero Pseudomonas.

- 6ª -

Processo de acordo com a reivindica
ção 5 caracterizado por o microorganismo ser Pseudomonas oleovo-
rana.

- 7ª -

Processo de acordo com a reivindica
ção 6, caracterizado por o microorganismo ser Pseudomonas oleovo
rans (ATCC 29347) ou um mutante ou variante deste.

- 8ª -

Processo de acordo com qualquer das
reivindicações anteriores caracterizado por se fazer reagir o ês
ter de ácido 4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacético com isopropilami-
na sob condições em que se mantém de forma substancial a configu-
ração S de modo a formar o éster do ácido 4-(2-hidroxi-3-isopro-
pilaminopropoxi)-fenilacético correspondente.



- 9ª -

Processo de acordo com a reivindica
ção 8, caracterizado por o éster ser o éster metílico.

- 10ª -

Processo de acordo com a reivindica
ção 8, caracterizado por se fazer reagir o éster do ácido 4-(2-
-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenilacético com amônia sob con
dições em que se mantem de forma substancial a configuração S de
modo a formar a 4-(2-hidroxi-3-isopropilaminopropoxi)-fenilaceta
mida (atenolol).

- 11ª -

Processo de acordo com a reivindica
ção 10 caracterizado por o éster ser o éster metílico.

- 12ª -

Processo de acordo com qualquer das
reivindicações 10 ou 11, caracterizado por se fazer reagir o ate
nolol com um ácido apropriado para formar um sal farmacêuticamen
te aceitável.

- 13ª -



- 13^a -

Processo para a preparação duma com posição farmacêutica caracterizado por se incorporar como ingrediente activo um éster do ácido 4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacético do ácido 4-(2-hidroxi-3-isopropilamino-propoxi)-fenilacético e/ou de atenolol ou um sal farmaceuticamente aceitável deste com posto quando preparados de acordo com o processo de qualquer das reivindicações anteriores.

- 14^a -

Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o éster ser um éster metílico.

- 15^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 13 ou 14, caracterizado por o composto usado como ingrediente activo ter um conteúdo de pelo menos 80% em peso da configuração S.

- 16^a -

Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por o composto usado como ingrediente acti vo ter um conteúdo de pelo menos 90% em peso da configuração S.

Os requerentes declaram que o primeiro pedido desta patente foi apresentado na Grã Bretanha em 28 de Julho de 1986 sob o nº. 8618324.

Lisboa, 27 de Julho de 1987.

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ESTERES DO ÁCIDO 4-(2,3-EPOXIPROPOXI)-FENILACÉTICO E DO ÁCIDO 4-(2-HIDROXI-3-ISOPROPILAMINO-PROPOXI)-FENILACÉTICO E/OU DE ATENOLOL SOB FORMA ESTEREOESPECÍFICA"

A invenção refere-se a um processo de epoxidação estereoespecífica que compreende submeter-se um éster do ácido 4-aliloxifenilacético à acção dum microorganismo dotado da capacidade de epoxidação estereoespecífica de modo a produzir o correspondente éster do ácido 4-(2,3-epoxipropoxi)-fenilacético predominante na configuração S.