



(22) **Date de dépôt/Filing Date:** 2014/02/24

(41) **Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.:** 2014/08/28

(45) **Date de délivrance/Issue Date:** 2018/03/20

(30) **Priorité/Priority:** 2013/02/28 (FR13/51785)

(51) **Cl.Int./Int.Cl.** **C12P 7/40** (2006.01),
C07C 213/00 (2006.01), **C07C 231/02** (2006.01),
C07D 223/16 (2006.01)

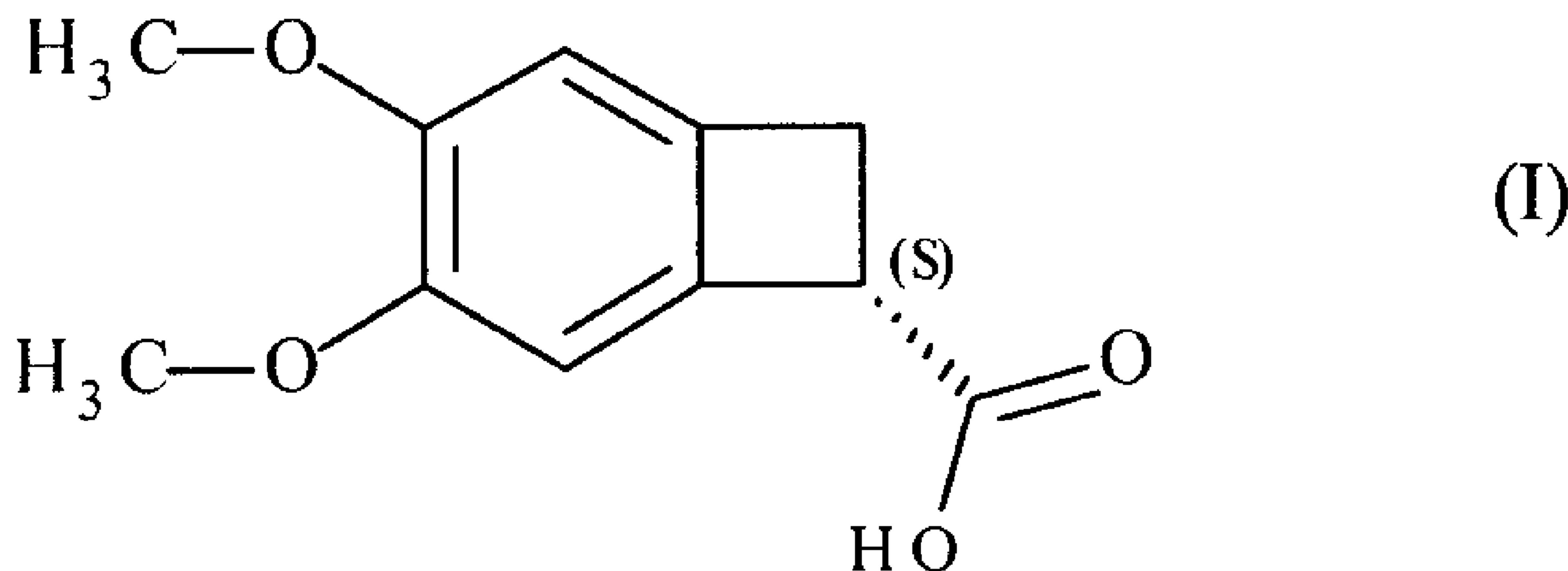
(72) **Inventeurs/Inventors:**
PEDRAGOSA MOREAU, SANDRINE, FR;
LEFOULON, FRANCOIS, FR

(73) **Propriétaire/Owner:**
LES LABORATOIRES SERVIER, FR

(74) **Agent:** NORTON ROSE FULBRIGHT CANADA
LLP/S.E.N.C.R.L., S.R.L.

(54) **Titre :** PROCEDE DE SYNTHESE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE (7S) 3,4-DIMETHOXYBICYCLO[4.2.0]OCTA-1,3,5-TRIENE 7-CARBOXYLIQUE ET APPLICATION A LA SYNTHESE DE L'IVABRADINE ET DE SES SELS

(54) **Title:** ENZYMATIC SYNTHESIS METHOD FOR (7S) 3,4-DIMETHOXYBICYCLO[4.2.0]OCTA-1,3,5-TRIENE 7-CARBOXYLIC ACID AND USE FOR THE SYNTHESIS OF IVABRADINE AND ITS SALTS



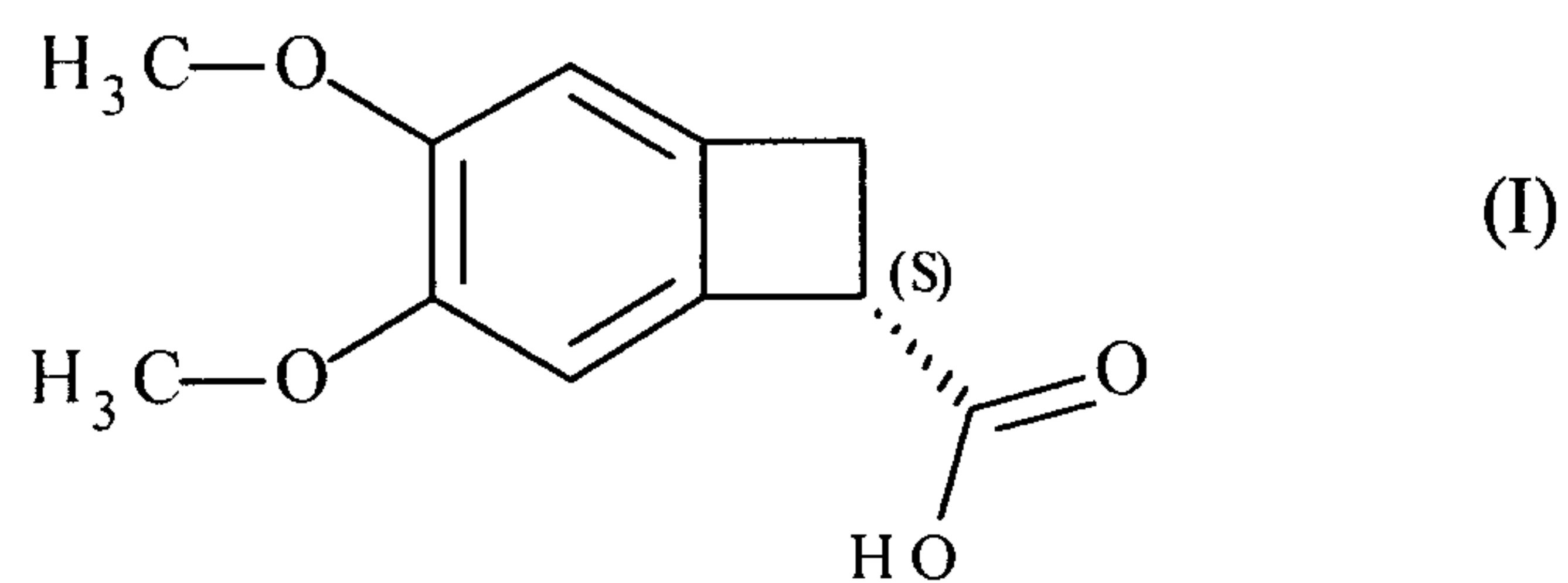
(57) **Abrégé/Abstract:**

Procédé de synthèse enzymatique du composé de formule (I) : (voir formule I) Application à la synthèse de l'ivabradine et de ses sels d'addition à un acide pharmaceutiquement acceptable.

ABREGE

PROCEDE DE SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE (7S) 3,4-DIMETHOXYBICYCLO[4.2.0]OCTA-1,3,5-TRIENE 7-CARBOXYLIQUE ET APPLICATION A LA SYNTHÈSE DE L'IVABRADINE ET DE SES SELS

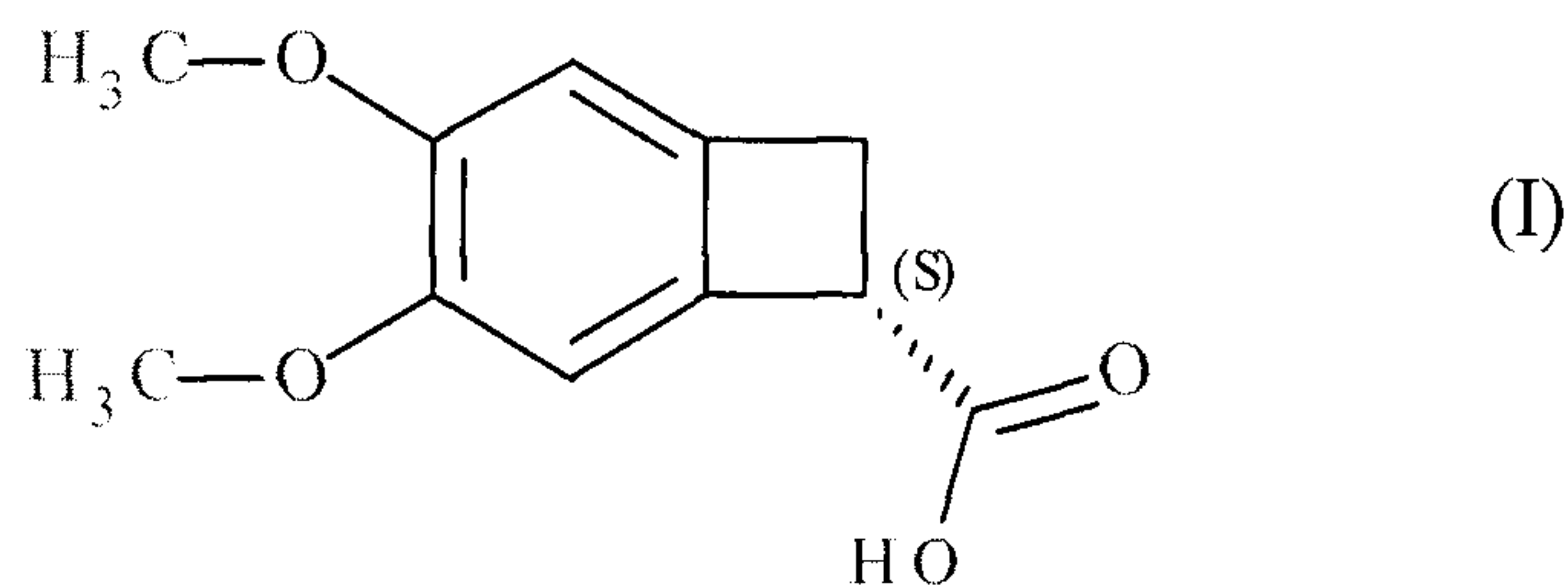
Procédé de synthèse enzymatique du composé de formule (I) :



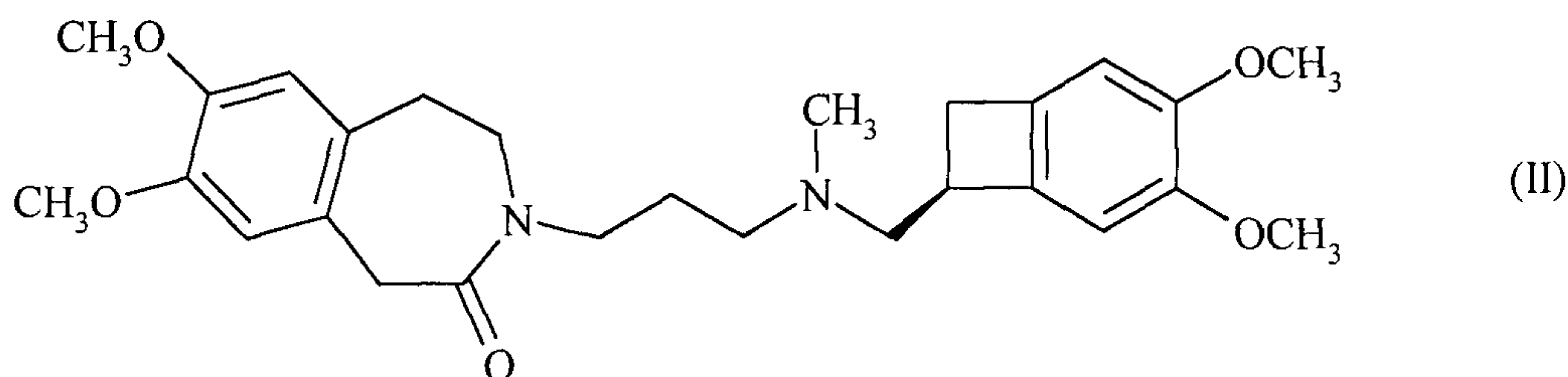
Application à la synthèse de l'ivabradine et de ses sels d'addition à un acide pharmaceutiquement acceptable.

**PROCEDE DE SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE (7S) 3,4-DIMETHOXYBICYCLO[4.2.0]OCTA-1,3,5-TRIENE 7-CARBOXYLIQUE
ET APPLICATION A LA SYNTHÈSE DE L'IVABRADINE ET DE SES SELS**

- 5 La présente invention concerne un procédé de synthèse enzymatique du composé de formule (I) :



ainsi que son application à la synthèse de l'ivabradine de formule (II) :



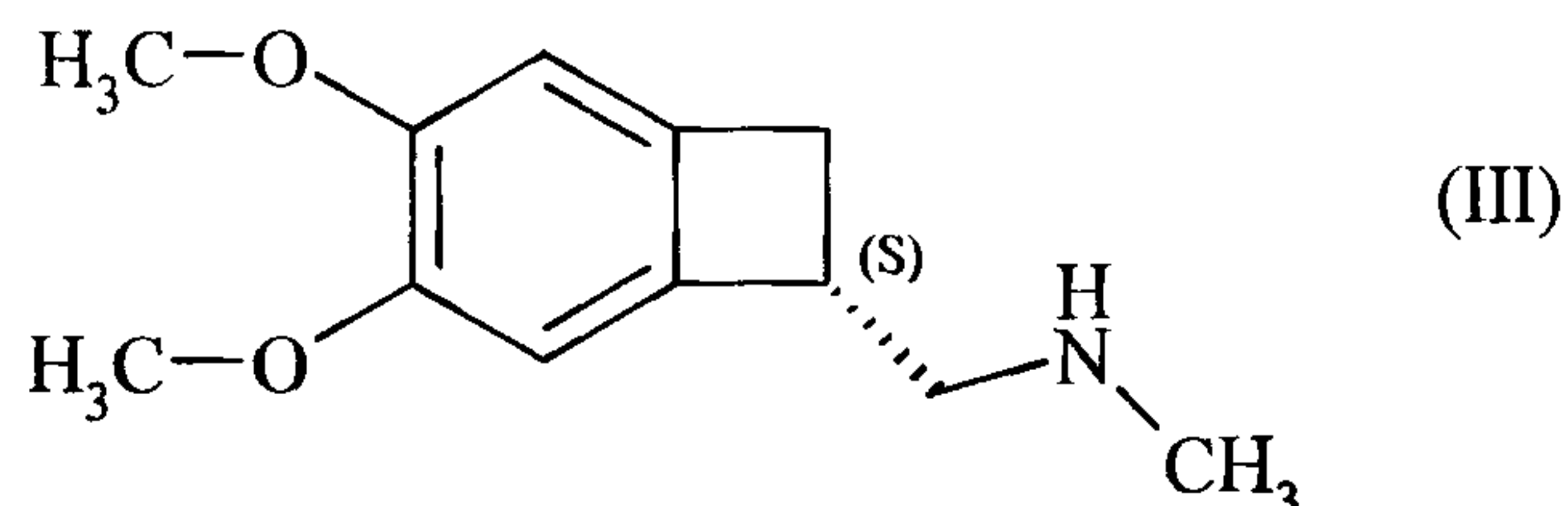
- 10 ou 3-{3-[[[(7S)-3,4-diméthoxybicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trién-7-yl]méthyl](méthyl)amino]propyl}-7,8-diméthoxy-1,3,4,5-tétrahydro-2H-3-benzazépin-2-one,

de ses sels d'addition à un acide pharmaceutiquement acceptable et de leurs hydrates.

- L'ivabradine, ainsi que ses sels d'addition à un acide pharmaceutiquement acceptable, et plus particulièrement son chlorhydrate, possèdent des propriétés pharmacologiques et thérapeutiques très intéressantes, notamment des propriétés bradycardisantes, qui rendent ces composés utiles dans le traitement ou la prévention des différentes situations cliniques d'ischémie myocardique telles que l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde et les troubles du rythme associés, ainsi que dans les différentes pathologies comportant des troubles du rythme, notamment supra-ventriculaires, et dans l'insuffisance cardiaque.

La préparation et l'utilisation en thérapeutique de l'ivabradine et de ses sels d'addition à un acide pharmaceutiquement acceptable, et plus particulièrement de son chlorhydrate, ont été décrits dans le brevet européen EP 0 534 859.

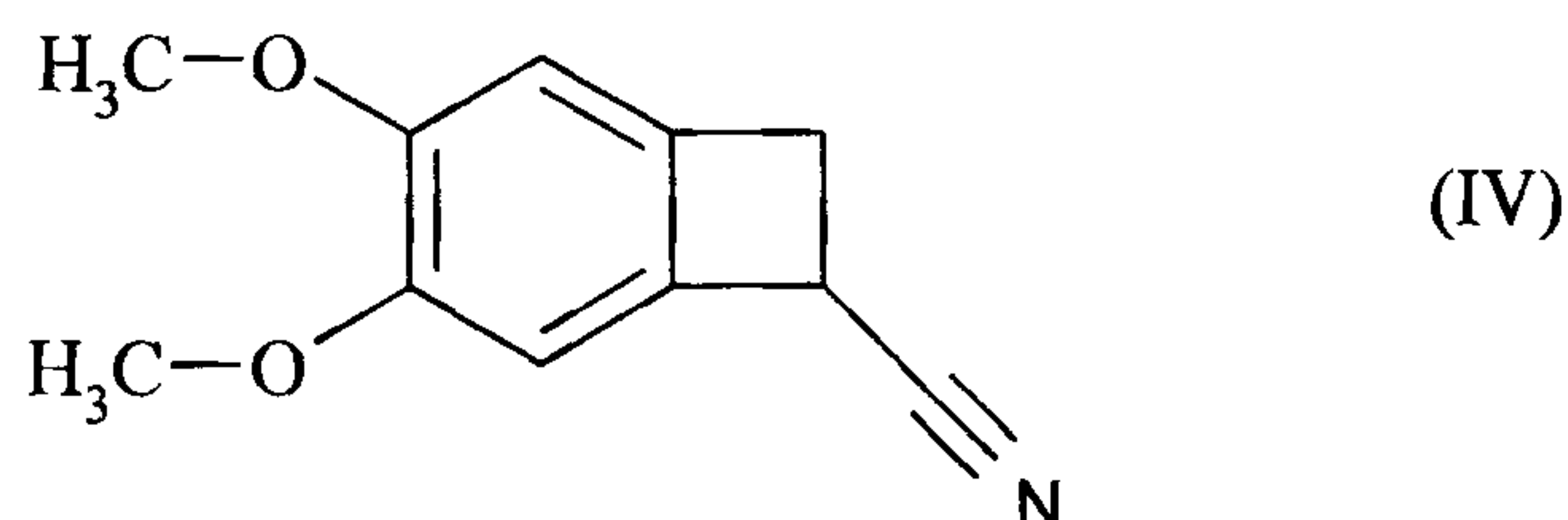
Ce brevet décrit la synthèse du chlorhydrate de l'ivabradine à partir du composé de formule (III), la (7S)-1-(3,4-diméthoxy bicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène 7-yl) N-méthyl méthanamine :



Le composé de formule (III) est un intermédiaire-clé dans la synthèse de l'ivabradine et de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

L'art antérieur divulgue plusieurs méthodes d'obtention du composé de formule (III).

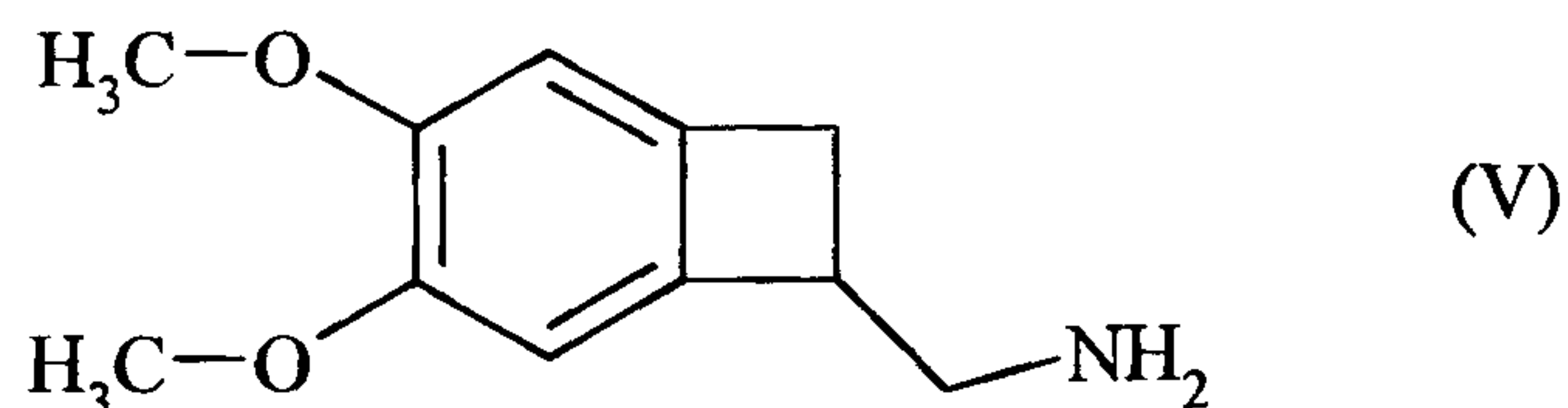
10 Le brevet EP 0 534 859 décrit la synthèse du composé de formule (III) par réduction du nitrile de formule (IV) :



par BH_3 dans le tétrahydrofurane,

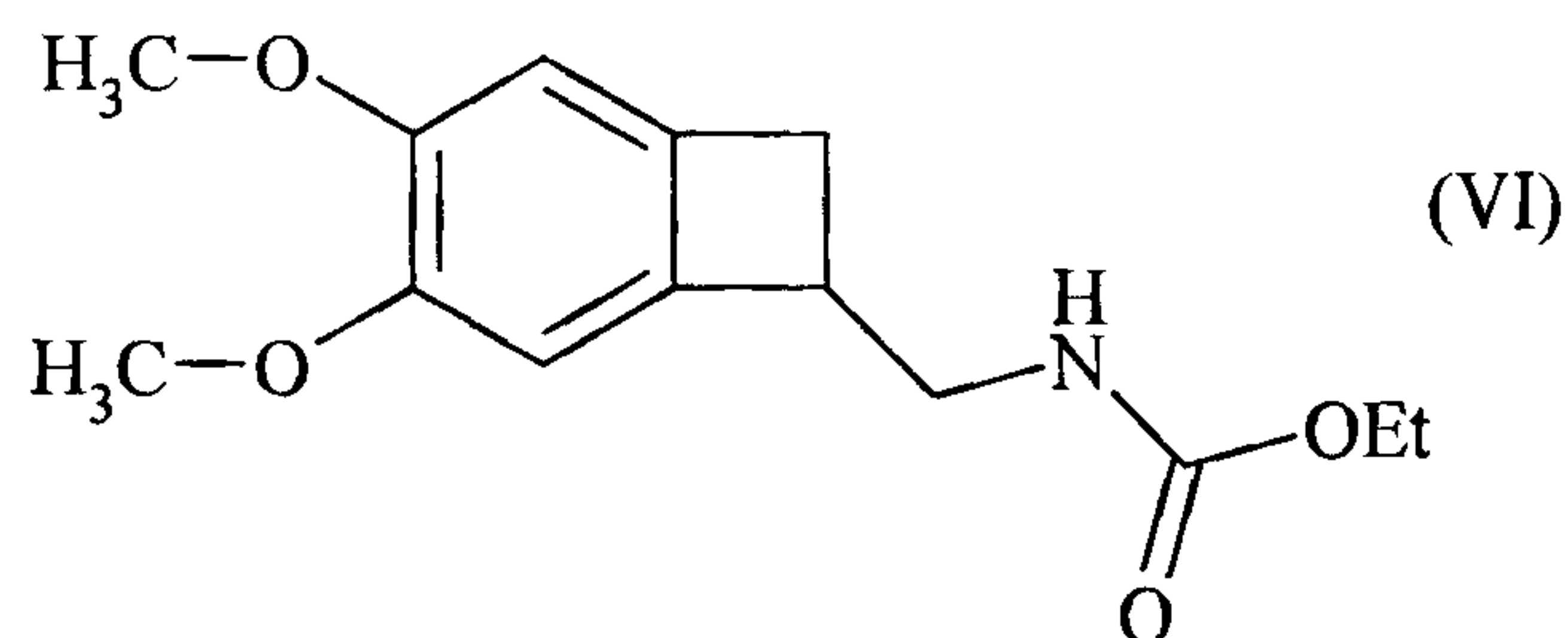
suivie de l'addition d'acide chlorhydrique, pour conduire au chlorhydrate de l'amine

15 racémique de formule (V) :

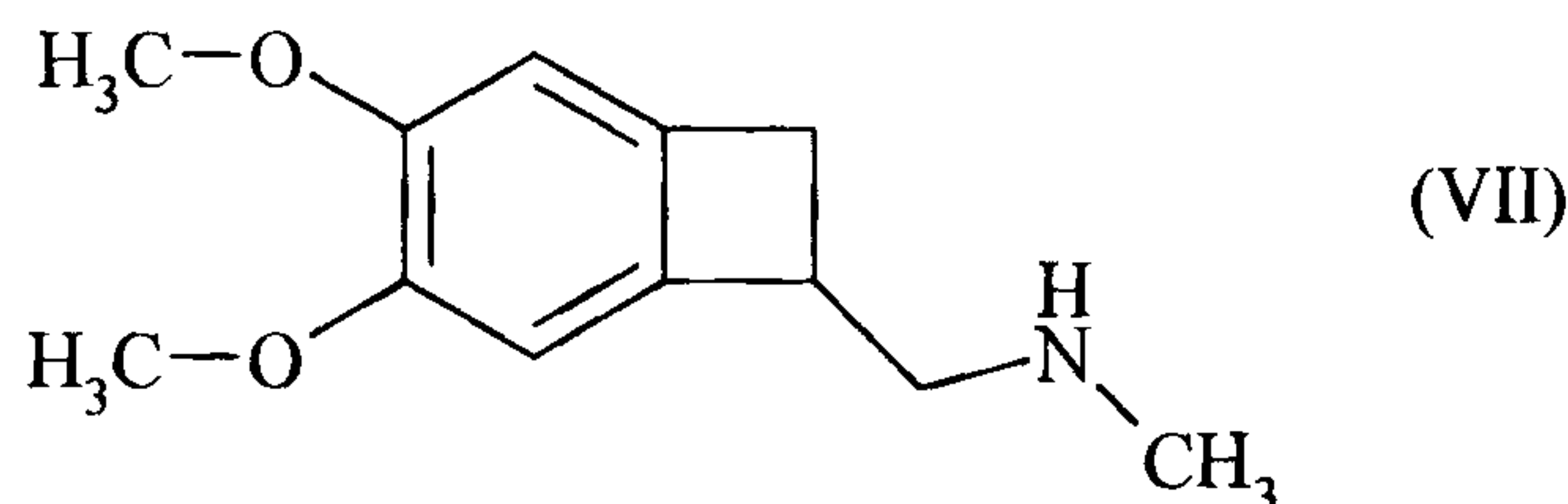


qui est mis en réaction avec du chloroformiate d'éthyle pour conduire au carbamate de formule (VI) :

- 3 -



dont la réduction par LiAlH_4 conduit à l'amine méthylée racémique de formule (VII) :

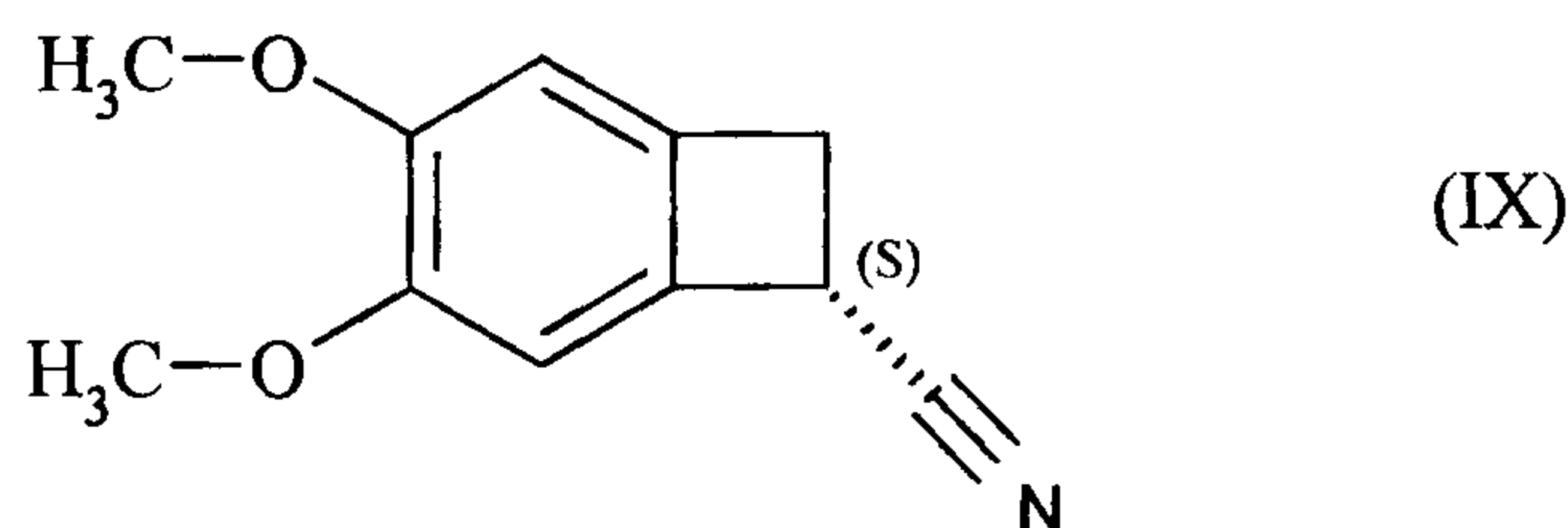


dont le dédoublement à l'aide d'acide camphosulfonique conduit au composé de formule (III).

- 5 Cette méthode a l'inconvénient de ne conduire au composé de formule (III) qu'avec un rendement très faible de 2 à 3% à partir du nitrile racémique de formule (IV).

Ce rendement très faible est dû au faible rendement (4 à 5%) de l'étape de dédoublement de l'amine secondaire de formule (VII).

- 10 Le brevet EP 2 166 004 décrit l'obtention du composé de formule (III) par résolution optique du nitrile racémique de formule (IV) par chromatographie chirale, pour conduire au nitrile optiquement pur de formule (IX) :



lequel est réduit par NaBH_4 ou par hydrogénation catalytique, pour conduire à l'amine primaire de formule (VIII).

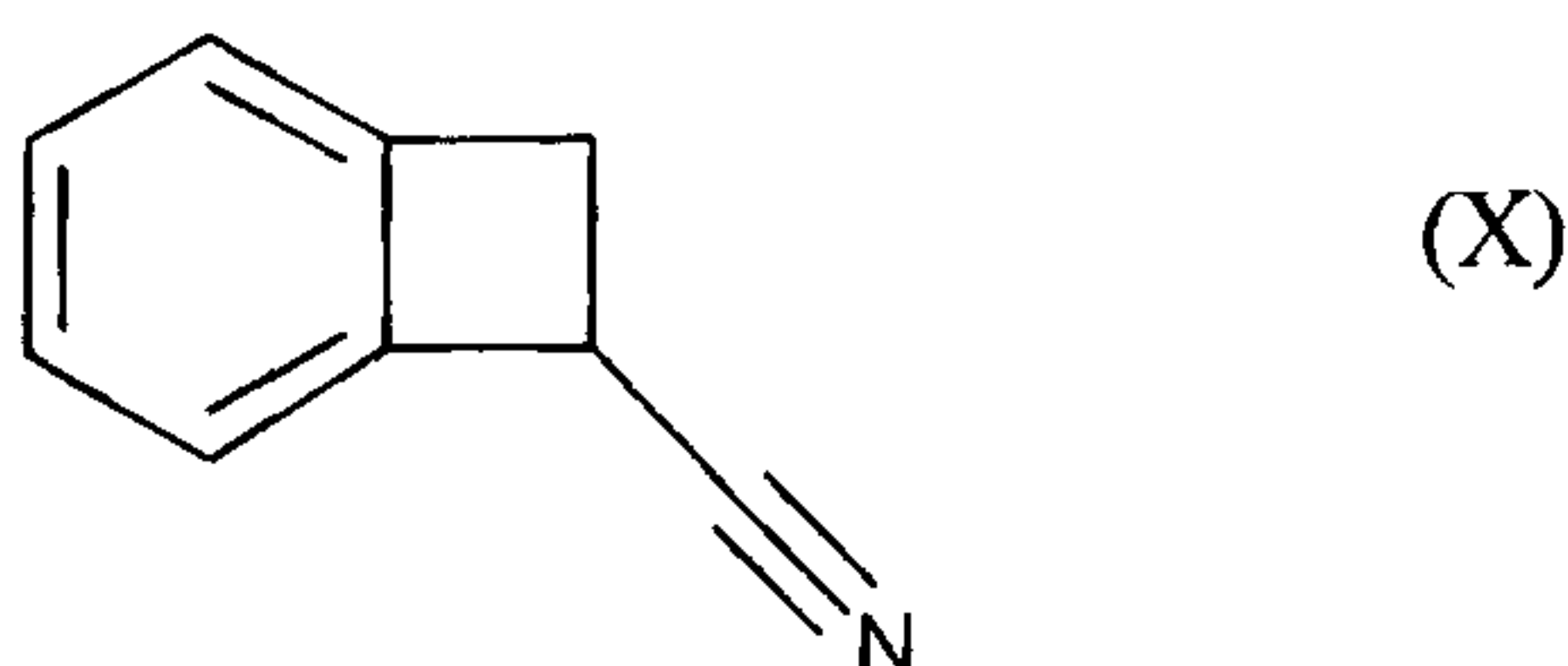
- 15 L'amine primaire peut ensuite être méthylée par la même séquence réactionnelle que précédemment (transformation en carbamate, puis réduction).

Le composé de formule (III) peut ainsi être obtenu en 5 étapes à partir du nitrile racémique de formule (IV), avec un rendement de 45,6 % pour l'étape de dédoublement.

- 20 L'utilisation d'enzymes hydrolytiques nitrilases (EC 3.5.5.1 dans la classification internationale des enzymes) paraissait intéressante pour permettre l'obtention directe de

l'acide optiquement pur de formule (I) à partir du nitrile racémique de formule (IV), et réduire ainsi le nombre d'étapes pour l'obtention de l'amine méthylée de formule (III) à partir du nitrile racémique.

Le nitrile de formule (X) a été décrit comme substrat de nitrilases du kit de screening NESK-1400 commercialisé par la société Almac :



Cependant, l'utilisation de ces mêmes nitrilases sur le nitrile de formule (IV) (cf Exemple comparatif A) a montré une activité faible et peu sélective de ces dernières, conduisant, dans la plupart des cas, à la formation simultanée d'amide (activité nitrile hydratase) et d'acide, difficilement exploitable à des fins de synthèse pour l'obtention d'intermédiaires dans la synthèse du composé de formule (III).

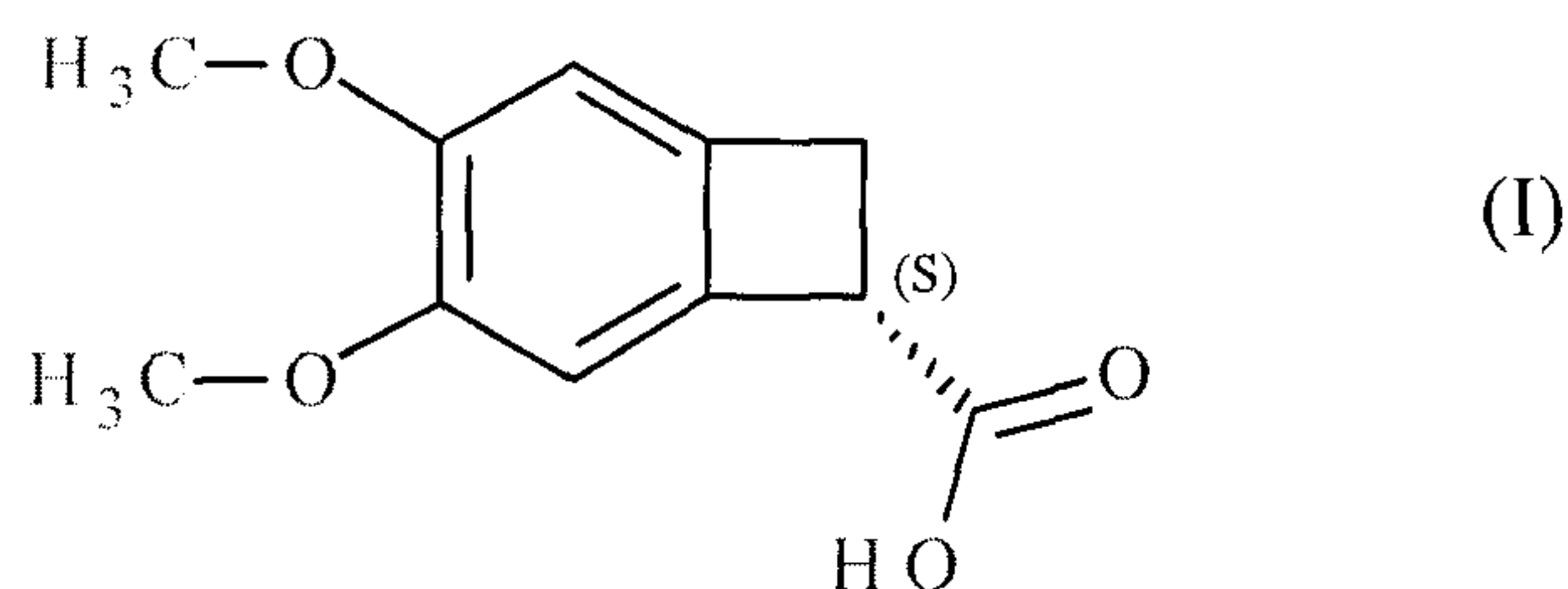
Le problème de la présente invention était donc de trouver une nitrilase permettant la synthèse énantiosélective de l'acide optiquement pur de formule (I) à partir du nitrile racémique de formule (IV), en minimisant la formation d'amide.

Le Demandeur a alors mis en évidence une activité nitrilase de certains microorganismes entiers en faveur de la formation de l'acide de formule (I), de configuration *S*. Sur les microorganismes testés, seul *Rhodococcus rhodocrous* a permis d'obtenir l'acide (*S*) avec une très bonne énantiosélectivité, sans formation d'amide (cf Exemple comparatif B). Cette activité a été améliorée par surexpression de la nitrilase.

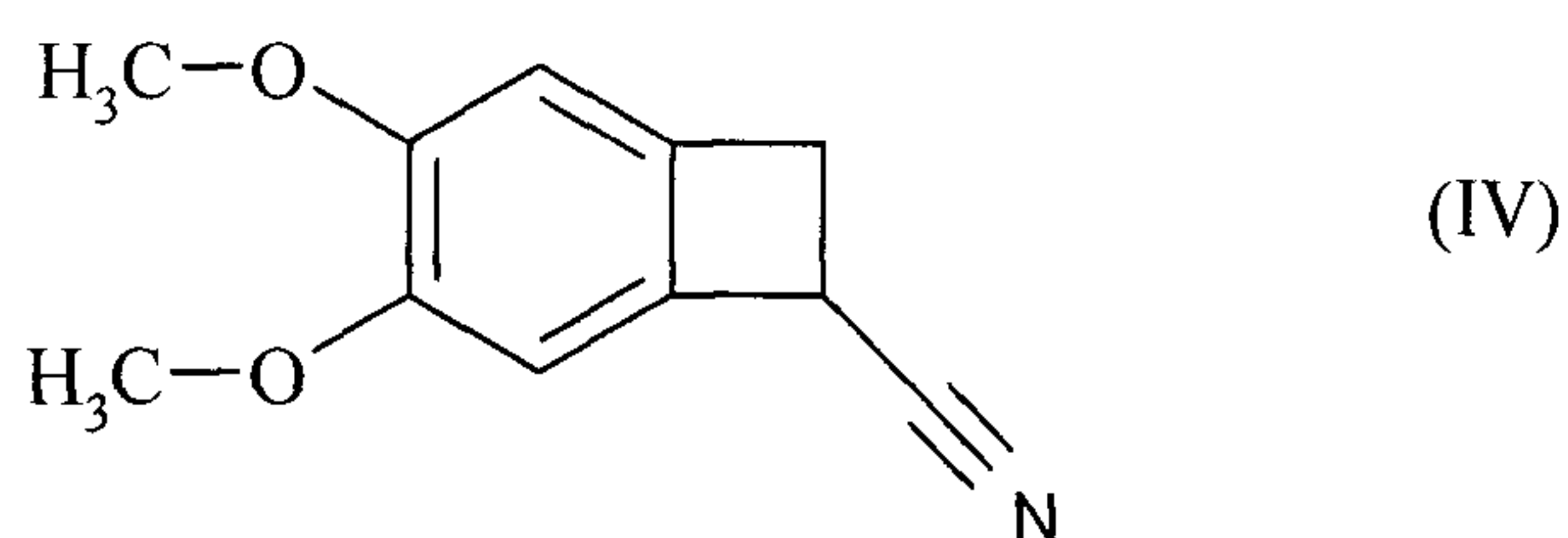
De façon surprenante, l'hydrolyse enzymatique avec cette nitrilase surexprimée n'est pas énantiosélective sur le substrat de formule (X) (cf Exemple comparatif C).

Plus spécifiquement, la présente invention concerne un procédé de synthèse du composé de formule (I) optiquement pur :

- 5 -



par hydrolyse enzymatique énantiosélective du nitrile racémique ou non optiquement pur de formule (IV) :



- 5 à l'aide de la nitrilase de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 surexprimée au sein d'un autre organisme possédant un système biologique compétent tel qu'une bactérie, une levure ou un champignon,
dans un mélange d'un solvant organique et d'une solution aqueuse à pH de 5 à 10, préférentiellement un tampon à pH de 5 à 10,
- 10 à une concentration de 1 à 500 g/L, préférentiellement de 2 g à 100 g de nitrile de formule (IV) par litre de mélange de solvants,
à un ratio E/S de 1/1 à 1/100,
à une température de 25°C à 40°C.

15 Brève description des figures

La figure 1 est un chromatogramme après 6h de l'hydrolyse enzymatique du nitrile avec la nitrilase de *Rhodococcus rhodochrous* surexprimée ;

La figure 2 est un chromatogramme après 5h de l'hydrolyse enzymatique du nitrile avec NIT 115.

- 20 Selon un aspect de l'invention, la nitrilase est surexprimée au sein d'une bactérie contenant un plasmide réarrangé, telle que *Escherichia coli*, préférentiellement *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pLysS, *E. coli* BL21star(DE3) ou *E. coli* JM9(DE3).

- 5a -

Selon un aspect de l'invention, le solvant organique est un solvant miscible à l'eau en totalité ou en partie, tel que le diméthylsulfoxyde, le DMF, l'acétone, l'acétonitrile, un alcool tel que l'éthanol ou l'isopropanol, un éther tel que le THF ou le MTBE.

5 Selon un autre aspect de l'invention, le solvant organique n'est pas miscible à l'eau, par exemple un hydrocarbure tel que l'heptane ou l'octane.

- 6 -

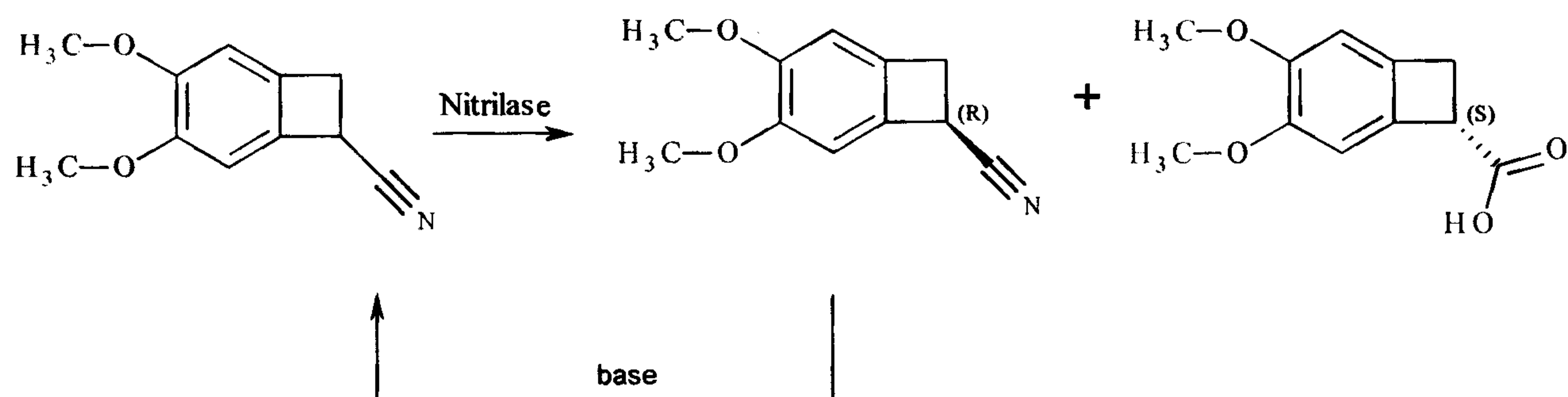
La solution aqueuse est préférentiellement une solution tampon à pH environ 7.

Selon un aspect de l'invention, les bactéries surexprimant la nitrilase sont utilisées directement dans le procédé, sous forme de culot bactérien ou de lyophilisat.

Le ratio E/S est préférentiellement de 1/1 à 1/10 dans le cas d'un culot bactérien, et de 1/10 à 1/20 dans le cas d'un lyophilisat.

Selon un autre aspect de l'invention, la nitrilase est utilisée sous la forme d'enzyme purifiée.

Le schéma de l'hydrolyse enzymatique selon l'invention est le suivant :



De façon avantageuse, le nitrile de configuration (R), produit secondaire de la réaction, est racémisé par action d'une base organique telle que le DBU ou d'une base minérale telle que la soude, la potasse, le carbonate de potassium ou le carbonate de sodium, pour être recyclé dans le processus d'hydrolyse enzymatique.

Lorsque l'étape de racémisation est effectuée *in situ*, le procédé selon l'invention est un procédé de dédoublement cinétique dynamique (DKR) qui permet d'obtenir l'acide S de formule (I) avec un ee supérieur à 98 %.

L'acide de formule (I) est préférentiellement isolé du milieu réactionnel après un ou plusieurs cycles d'hydrolyse enzymatique.

Définitions

Par composé optiquement pur, on entend composé dont l'excès énantiomérique est supérieur ou égal à 90%.

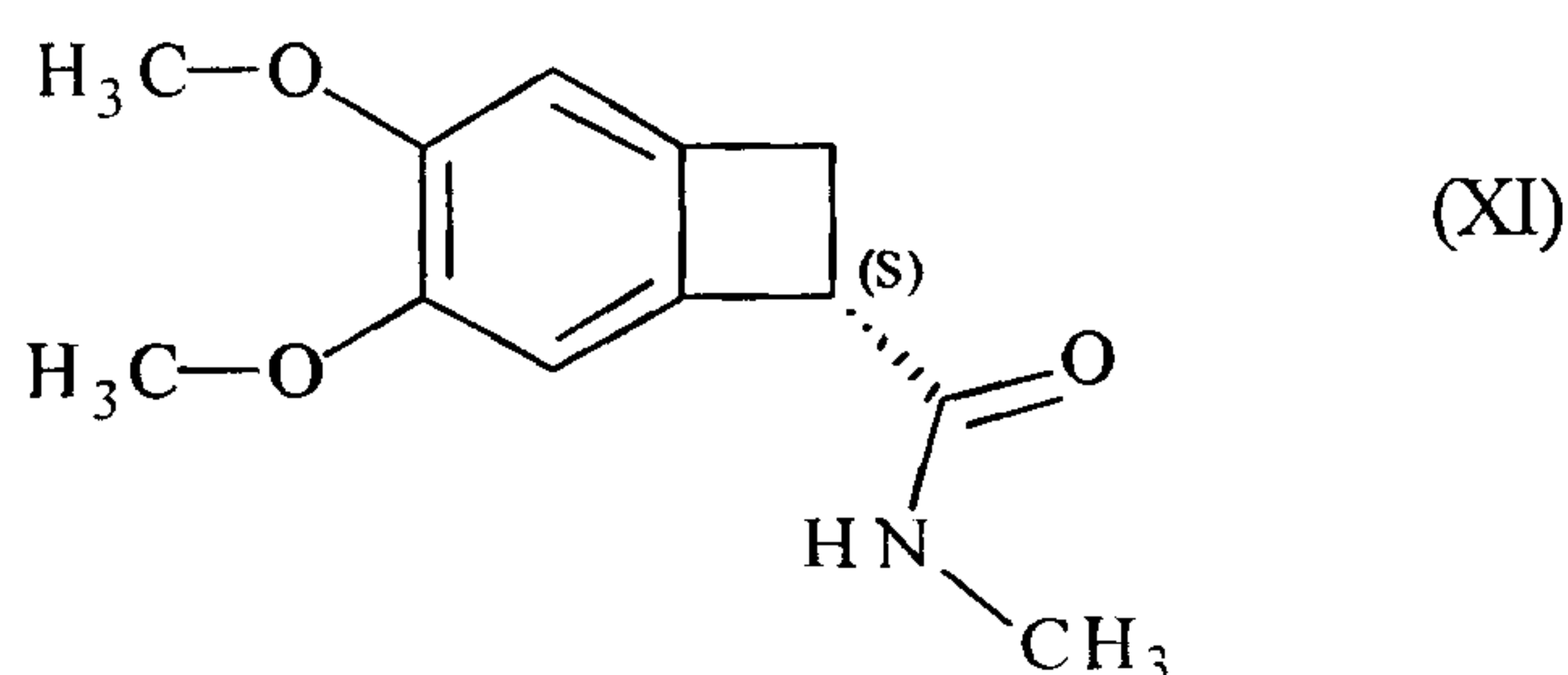
Par nitrile non optiquement pur, on entend nitrile dont l'excès énantiomérique est inférieur à 90%.

Par nitrile racémique, on entend nitrile sous la forme d'un mélange de deux énantiomères dans un rapport 55:45 à 45:55.

- 5 Par hydrolyse énantiosélective d'un nitrile racémique ou non optiquement pur, on entend hydrolyse préférentielle de l'un des énantiomères du mélange.

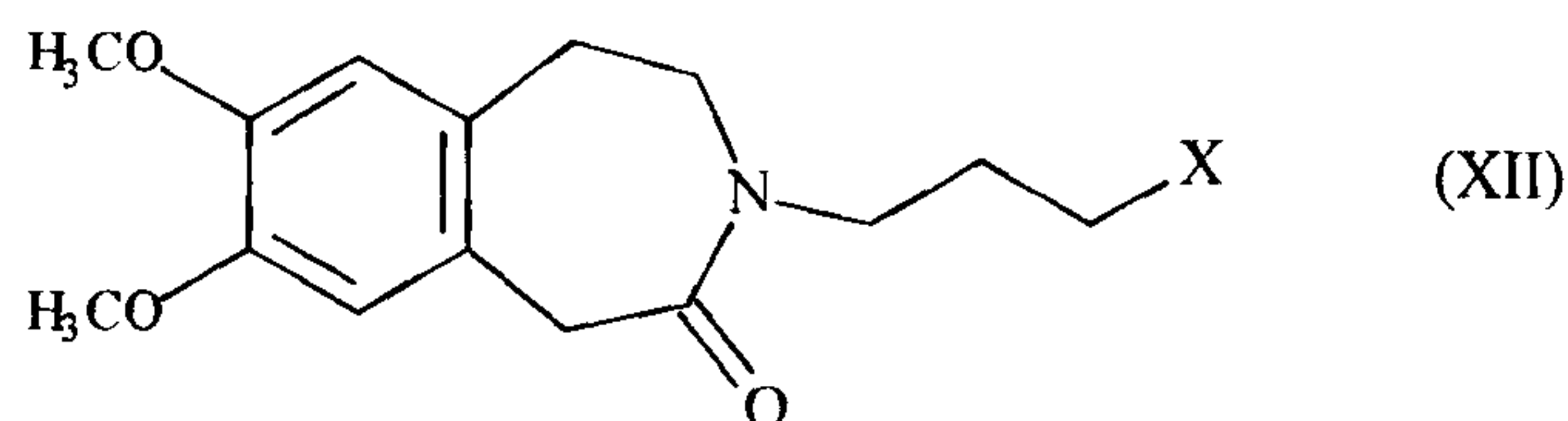
Par système biologique compétent, on entend espèce (cellules hôtes) biologique(s) dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique la (les) rendant capable(s) de produire une protéine recombinante d'intérêt. Un vecteur d'expression (plasmide) construit à cet effet permet le transfert de l'ADN codant le gène d'intérêt dans la cellule hôte qui peut ainsi (sur)exprimer de manière efficiente la protéine fonctionnelle.

Un autre aspect de l'invention concerne un procédé de synthèse du composé de formule (III) en seulement deux étapes à partir de l'acide optiquement pur de formule (I), qui est transformé en l'amide optiquement pur de formule (XI) :

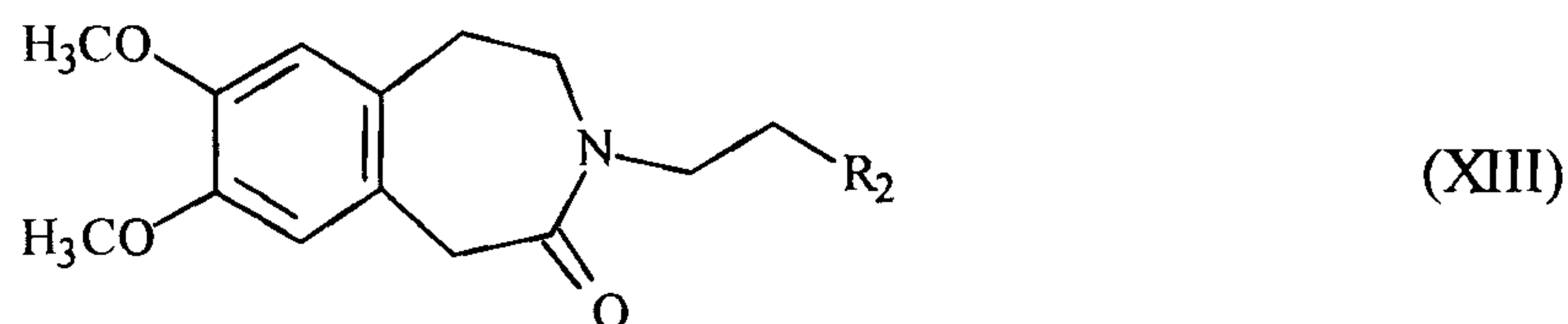


dont la réduction, préférentiellement par BH_3 , NaBH_4 ou LiAlH_4 , conduit au composé de formule (III).

Le composé de formule (III) est ensuite couplé, soit avec un composé de formule (XII) :



où X représente un atome d'halogène, préférentiellement un atome d'iode,
soit soumis à une réaction d'amination réductrice avec un composé de formule (XIII) en
présence d'un agent réducteur :



5

où R₂ représente un groupement choisi parmi CHO et CHR₃R₄,

où R₃ et R₄ représentent chacun un groupement alkoxy (C₁-C₆) linéaire ou ramifié, ou bien
forment ensemble avec l'atome de carbone qui les porte un cycle 1,3-dioxane, 1,3-dioxolane
ou 1,3-dioxépane,

- 10 pour conduire à l'ivabradine, qui est ensuite transformée en un sel d'addition à un acide
pharmaceutiquement acceptable, ledit sel étant sous forme anhydre ou hydrate.

Le composé de formule (III) peut être également engagé dans la réaction d'amination
réductrice sous la forme de son sel d'addition à un acide pharmaceutiquement acceptable,
préférentiellement son chlorhydrate. Dans ce cas, l'ivabradine est obtenue directement sous la
15 forme de chlorhydrate.

Parmi les acides pharmaceutiquement acceptables, on peut citer à titre non limitatif les acides
chlorhydrique, bromhydrique, sulfurique, phosphorique, acétique, trifluoroacétique, lactique,
pyruvique, malonique, succinique, glutarique, fumarique, tartrique, maléïque, citrique,
ascorbique, oxalique, méthanesulfonique, benzènesulfonique et camphorique.

- 20 Parmi les agents réducteurs utilisables pour la réaction d'amination réductrice entre le
composé de formule (III) et le composé de formule (XIII), on peut citer à titre non limitatif les
composés donneurs d'hydrure tel que le triacétoxyborohydrure de sodium ou le

cyanoborohydrure de sodium, et le dihydrogène en présence d'un catalyseur tel que le palladium, le platine, le nickel, le ruthénium, le rhodium ou un de leurs dérivés, notamment sous forme supportée ou sous forme d'oxydes.

L'agent réducteur préféré pour la réaction d'amination réductrice entre le composé de formule (III) et le composé de formule (XIII) est le dihydrogène catalysé par le palladium sur charbon.

Les exemples ci-dessous illustrent l'invention.

Abréviations

	ATFA	Acide TriFluoroAcétique
	CCM	Chromatographie sur Couche Mince
10	DBU	DiazaBicycloUndécène
	DKR	Dynamic Kinetic Resolution (Dédoublément cinétique dynamique)
	DMF	DiMéthylFormamide
	DMSO	DiMéthylSulfOxyde
	DO	Densité Optique
15	E	Coefficient d'énantiosélectivité
	ee	excès énantiomérique
	éq	équivalent molaire
	HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie en phase liquide à haute performance)
20	IPTG	IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside
	LB	milieu de culture Lysogeny Broth
	MeOH	Méthanol
	MTBE	MéthylTertButyl Ether
	po	pureté optique ou énantiomérique
25	ratio E/S	ratio Enzyme/Substrat, exprimé en g/g
	RMN	(Spectroscopie) Résonance Magnétique Nucléaire
	SM	Spectrométrie de Masse
	THF	TétraHydroFurane
	TMS	TétraMéthylSilane

EXEMPLE 1 : (7S)- Acide 3,4-diméthoxybicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carboxylique

Surexpression de la nitrilase :

La protéine nitrilase de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 est décrite dans les bases
5 de données protéiques et génomiques. La séquence du gène recherché est répertoriée sous
l'identifiant SVA (Sequence Version Archive) « EF467367 » au sein de l'ENA (European
Nucleotide Archive) de l'EMBL-Bank. Cette séquence correspond à la référence « A4LA85 »
de la base de données UniProtKB/TrEMBL.

La souche de production *E. coli* BL21(DE3), transformée avec le vecteur d'expression
10 pET28a-Nit1, a été utilisée.

Le protocole de surexpression de la nitrilase est décrit dans *Applied Biochemistry and
Biotechnology* 2010, Vol 160(2), pp 393-400.

Les cellules ainsi transformées sont soit utilisées directement sous forme de culot bactérien,
soit lyophilisées avant utilisation.

15 Hydrolyse enzymatique avec la nitrilase surexprimée.

Les cellules transformées selon le protocole ci-dessus sont mises sous agitation à une
concentration de $5,6 \cdot 10^9$ cellule/mL (*1mL de culture à DO=1 (600 nm) correspond à $1 \cdot 10^9$
bactéries et environ 10 mg de culot bactérie ou 1,5 mg de lyophilisat*).

A une solution de 250 mL de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1/15 M à pH 7 sont
20 ajoutés 1g de lyophilisat d'*E. coli* et 500 mg ($c=2$ g/L, 10mM) de 3,4-
diméthoxybicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carbonitrile dans 2% de DMSO (5 mL).

Le milieu réactionnel est maintenu à 30°C, sous agitation 220 tr/min rotative pendant 6h.

La réaction est contrôlée par HPLC sur phase chirale dans des conditions permettant de
déterminer l'excès énantiomérique de l'acide et du nitrile :

25 *Colonne chiralpak IB*

90 % n-hexane 10 % 2-PrOH + 0,1 % d'ATFA

1mL/min 30 °C 288 nm

	% nitrile	ee (nitrile)	% acide	ee (acide)	conversion	E
6h	49,9	94	50,1	97	0,49	>100

* coefficient d'énantiosélectivité $E = \ln[1-c(1+ee(acide))]/\ln[1-c(1-ee(acide))]$

Le chromatogramme HPLC sur phase chirale après 6h est représenté en **Figure 1**.

Après 6h de réaction, le milieu réactionnel est acidifié par HCl 1M afin d'obtenir un pH très
 5 acide (pH 2), puis extrait par 2x100mL de dichlorométhane. La phase organique est soutirée.
 Une deuxième extraction au toluène (2x100mL) permet de récupérer tout le produit restant
 dans la phase aqueuse. Les phases organiques sont lavées par une solution de NaCl saturée
 puis séchées avec du sulfate de magnésium anhydre. Après évaporation des solvants, on
 obtient le composé brut qui est purifié par chromatographie flash sur colonne de silice dans
 10 les conditions suivantes :

Type de colonne : 80g SiOH Macherey-Nagel

Matériel et méthode : Reveleris®

*Eluant : Isocratique (cyclohexane +1% d'acide acétique / acétate d'éthyle +1% d'acide
 acétique 75/25)*

15 *Détection : UV 288 nm*

Débit : 60ml/min

Résultat :

Nitrile (R) : rendement 36 % (179 mg), ee (R) : 96%

Acide (S) : rendement 39 % (246 mg), ee (S) 96%

20 **EXEMPLE 2 :** 3,4-diméthoxybicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carbonitrile *par*
racémisation du nitrile (R)

Dans un ballon muni d'un réfrigérant et d'une agitation magnétique, charger 100 mg du (R)-
 (3,4-diméthoxy-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trién-7-yl)nitrile (0,53 mmol), 5 mL d'isopropanol et
 121 mg de DBU (1,5 éq.). Chauffer 2h à 65°C puis laisser revenir à température ambiante.
 25 Filtrer pour obtenir le composé du titre.

EXEMPLE 3 : (7*S*)-3,4-Diméthoxy-N-méthylbicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carboxamide

Mettre en suspension l'acide (7*S*)-3,4-diméthoxybicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carboxylique obtenu à l'exemple 1 (300 mg) dans le THF (3 ml) à température ambiante puis
5 ajouter la triéthylamine (200 µl). Le chloroformiate d'éthyle (150 µl) est ajouté lentement au milieu. Le milieu réactionnel précipite (milieu I).

Dans un autre flacon, la méthylamine en solution 2M dans le THF (2,25 ml) est mise sous agitation avec l'eau (1 ml) et la triéthylamine (300 µl). L'agitation est maintenue pendant 20 min puis ce milieu est ensuite additionné au milieu I et laissé sous agitation à température
10 ambiante pendant une nuit.

Le mélange réactionnel est ensuite évaporé et purifié par HPLC préparative.

Le (7*S*)-3,4-diméthoxy-N-méthylbicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carboxamide est obtenu avec un rendement de 60%.

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

EXEMPLE 4 : (7*S*)-3,4-Diméthoxybicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triène-7-yl]-N-méthyl-méthanamine

Mettre en suspension le (7*S*)-3,4-diméthoxy-N-méthylbicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carboxamide obtenu à l'Exemple 3 (450 mg) dans le tétrahydrofurane (20 mL) puis ajouter
20 lentement 1,6 mL d'une solution de LiAlH₄ 2M dans le tétrahydrofurane au milieu réactionnel à température ambiante. On observe un fort dégagement gazeux et le milieu réactionnel devient limpide. Chauffer le milieu réactionnel à reflux pendant 30 min.

Hydrolyser après le retour à température ambiante, puis extraire par l'acétate d'éthyle. Sécher sur MgSO₄ puis évaporer. Le résidu obtenu est purifié par HPLC préparative (éluant :
25 eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique de 98/2/0,2 à 20/80/0,2) en 30 minutes pour conduire au produit du titre avec un rendement de 46%.

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

EXEMPLE 5 : (7S)-3,4-Diméthoxybicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trién-7-yl]-N-méthyl-méthanamine, chlorhydrate

- 5 20 mL d'une solution molaire de BH₃ dans le tétrahydrofurane sont ajoutés à température ambiante au mélange de 2,2 g (10 mmol) du (7S)-3,4-diméthoxy-N-méthylbicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carboxamide obtenu à l'Exemple 3 dans 45mL de tétrahydrofurane. Après 1h sous agitation, 10mL de la solution de BH₃ dans le tétrahydrofurane sont ajoutés. Après une nuit d'agitation à température ambiante, 20 mL d'éthanol sont additionnés goutte à goutte
- 10 et le mélange est agité jusqu'à fin de dégagement gazeux (1h environ). 20 mL d'une solution d'acide chlorhydrique dans l'éthanol sont ensuite additionnés goutte à goutte. Après 4h sous agitation, le précipité obtenu (1,2 g de produit du titre) est filtré. Le filtrat est concentré et 0,65g supplémentaires de produit du titre sont obtenus par concrétisation dans un mélange acétate d'éthyle/éthanol 80/20.
- 15 Les deux précipités sont réunis pour conduire à 1,85 g du produit du titre (Rendement 77%).

EXEMPLE 6 : Chlorhydrate de l'ivabradine

Dans un autoclave, charger 5,5 kg de 3-[2-(1,3-dioxolan-2-yl)éthyl]-7,8-diméthoxy-1,3-dihydro-2H-3-benzazépin-2-one, 27,5 l d'éthanol et 550 g de palladium sur charbon.

- 20 Purger à l'azote puis à l'hydrogène, chauffer à 55°C, puis hydrogéner à cette température sous une pression de 5 bars jusqu'à absorption de la quantité théorique d'hydrogène.

Ramener ensuite à température ambiante, puis décompresser l'autoclave.

Ajouter ensuite 4 kg du chlorhydrate de la (7S)-3,4-diméthoxybicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trién-7-yl]-N-méthylméthanamine, 11 l d'éthanol, 5,5 l d'eau et 1 kg de palladium sur charbon.

- 25 Purger à l'azote puis à l'hydrogène, chauffer à 85°C, puis hydrogéner à cette température sous une pression de 30 bars jusqu'à absorption de la quantité théorique d'hydrogène.

Revenir ensuite à température ambiante, purger l'autoclave, puis filtrer le mélange réactionnel, distiller les solvants puis isoler le chlorhydrate d'ivabradine par cristallisation dans un mélange toluène/1-méthyl-2-pyrrolidinone.

Le chlorhydrate d'ivabradine est ainsi obtenu avec un rendement de 85 % et une pureté chimique supérieure à 99 %.

EXEMPLE comparatif A: Criblage de nitrilases commerciales pour l'hydrolyse enzymatique du 3,4-diméthoxybicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carbonitrile

5

Dans un tube, peser la nitrilase étudiée sous forme de lyophilisat (15 mg) puis ajouter 4 ml de tampon 0,1 M KH_2PO_4 à pH=7 et le 3,4-diméthoxybicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carbonitrile (20 mg) solubilisé dans 100 μl de DMSO.

Mettre dans l'incubateur à 28°C et 220tr/min.

10 Le taux de conversion a été mesuré par HPLC au bout de 24 h et 72h.

Les nitrilases NIT 101, NIT 102, NIT 103, NIT 104, NIT 105, NIT 106, NIT 108, NIT 109, NIT 111, NIT 112 et NIT 113 (Almac) n'hydrolysent pas le nitrile après 24h (pas de formation d'acide ni amide).

15 Les résultats obtenus avec les nitrilases NIT 107, NIT 110, NIT 114 et NIT 115 (Almac) sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Nitrilase	72h		
	Amide	Acide	Nitrile
NIT 107	23%	16%	61%
NIT 110	24%	15%	61%
NIT 114	21%	22%	57%
NIT 115	7%	47%	46%

Conditions analytiques:

colonne phenomenex LUNA HST 50*3 C18(2) 2,5 μm

0% à 100% de B en 8min 0,8ml/min 40°C

20 A (1000 eau+25 ACN+1 ATFA)

B (1000 ACN+25 eau+1 ATFA)

La nitrilase NIT 115 a alors été engagée dans un autre essai pour déterminer si l'hydrolyse du nitrile est énantiosélective.

La nitrilase NIT 115 (12 mg ; Almac) a été utilisée dans 6 mL [2 mg/mL] de tampon.

Le 3,4-diméthoxybicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carbonitrile a été ajouté pour atteindre une
5 concentration finale de 4 mg/mL en ce dernier.

L'énantiosélectivité a été mesurée par HPLC en utilisant les conditions analytiques suivantes :

*colonne chiralpak IC 250*4.6*

30% éthanol absolu + 0,1%ATFA + 70%heptane + 0,1%ATFA

1ml/min 30°C 288nm

10 *Remarque* : dans ces conditions, les énantiomères de l'acide sont séparés, mais pas ceux du nitrile.

Le chromatogramme obtenu après 5h de réaction est représenté en **Figure 2**.

Conclusion : aucune énantiosélectivité n'est observée.

**EXEMPLE comparatif B: Criblage de nitrilases de souches bactériennes et fongiques
15 pour l'hydrolyse enzymatique du 3,4-
diméthoxybicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carbonitrile**

Une étude utilisant plusieurs inducteurs bactériens (propionitrile, benzonitrile, 4-bromobenzonitrile) a montré que le propionitrile permettait la meilleure induction de l'activité nitrilase avec le 3,4-diméthoxybicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carbonitrile.

20 Les souches bactériennes ont été induites au propionitrile à 72 mM durant 72h, les cellules ont été reprises dans 50 mL (concentrées 2 fois, conc.10mg/ml en cellules) de tampon phosphate 0,1M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ à pH=7,3 et le 3,4-diméthoxybicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carbonitrile ajouté à la concentration de 10 mM dans 2% de DMSO v/v_{final}.

Les souches fongiques ont été induites au valéronitrile.

25 L'ensemble des milieux réactionnels est mis sous agitation 220 tr/min à 30°C pour les bactéries et à 27°C pour les champignons et suivi pendant 96H par HPLC sur phase inverse et par HPLC en phase chirale selon les méthodes décrites ci-dessous :

Analyse en phase inverse

colonne phenomenex LUNA HST 50*3 C18(2) 2,5µm

0% de B à 100% de B en 8min 0.8ml.min 40°C

A (1000 eau+25 ACN+1 ATFA)

5 B (1000 ACN+25 eau+1 ATFA)

Analyse en phase chirale

colonne chiralpak IC 250*4.6

30% éthanol absolu + 0,1%ATFA + 70%heptane + 0,1%ATFA

1ml/min 30°C 288nm

10 Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

MICROORGANISMES	% composés formés après 96h		
	Nitrile résiduel	amide	acide
<i>Rhodococcus erythropolis</i> NCIMB11215	23	42	35 (S)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB11216	65	/	35 (S)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB11273	100	/	/
<i>Rhodococcus rhodnii</i> NCIMB11279	100	/	/
<i>Aspergillus niger</i> BO	95	/	< 5
<i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 315	95	/	< 5
<i>Cunninghamella elegans</i> NRRL 1392	95	/	< 5
<i>Rhizopus nigricans</i> NRRL 1477	95	/	< 5
<i>Absidia cylindrospora</i> MMP 1569	95	/	< 5
<i>Mortierella isabellina</i> NRRL 1757	95	/	< 5
<i>Mucor plumbeus</i> ATCC 4740	95	/	< 5
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	86	/	14
<i>Stibella fimetaria</i> CBS 548-84	100	/	/
<i>Stibella fimetaria</i> CBS 511-67	100	/	/
<i>Stibella fimetaria</i> CBS 294-81	100	/	/

EXEMPLE comparatif C: Hydrolyse enzymatique du bicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carbonitrile avec la nitrilase de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 surexprimée

Etalement sur des boîtes de LB+agar+kanamycine, incubation en statique à 37°C pendant 24h
5 (Souche 11216 de nitrilase d'E. coli recombinante).

Préculture dans 5ml de LB+kanamycine(50mg/l), incubation à 37°C, 180 tours/min pendant une nuit.

Culture : mettre 50ml de LB et 500µl de préculture dans des fioles d'erlenmeyer non bafflées de 250 ml, incubation à 28°C, 160 tours/min jusqu'à ce que la DO soit égale à 0,6 (soit
10 environ 4h).

Induction à l'IPTG (0,5mM), incubation à 17°C, 160 tours/min pendant une nuit (17 heures).

Test d'activité : centrifuger les cultures à 4°C, 6000 tours/min pendant 20 minutes, resuspendre le culot dans 10 ml de tampon phosphate 0,1M pH 7. Ajouter le bicyclo[4.2.0] octa-1,3,5-triène-7-carbonitrile (10mM) +2% d'éthanol. Incuber à 220 tours/mn, 30°C.

15 *Remarque : si la culture est de plus de 50ml au moment de la centrifugation on prélève 50ml puis on fait le test d'activité avec un culot de 50ml de culture.*

Suivi de l'hydrolyse par chromatographie chirale : à 45 min et 2h.

*Colonne : Phenomenex® LUNA HST 50*3 C18(2) 2.5µm*

Eluant : A +B (de 0% à 100% de B en 8min)

20 *A : 1000 eau+25 ACN+1 ATFA*

B :1000 ACN+25 eau+1 ATFA

0.8m/min - 40°C - UV 210 nm

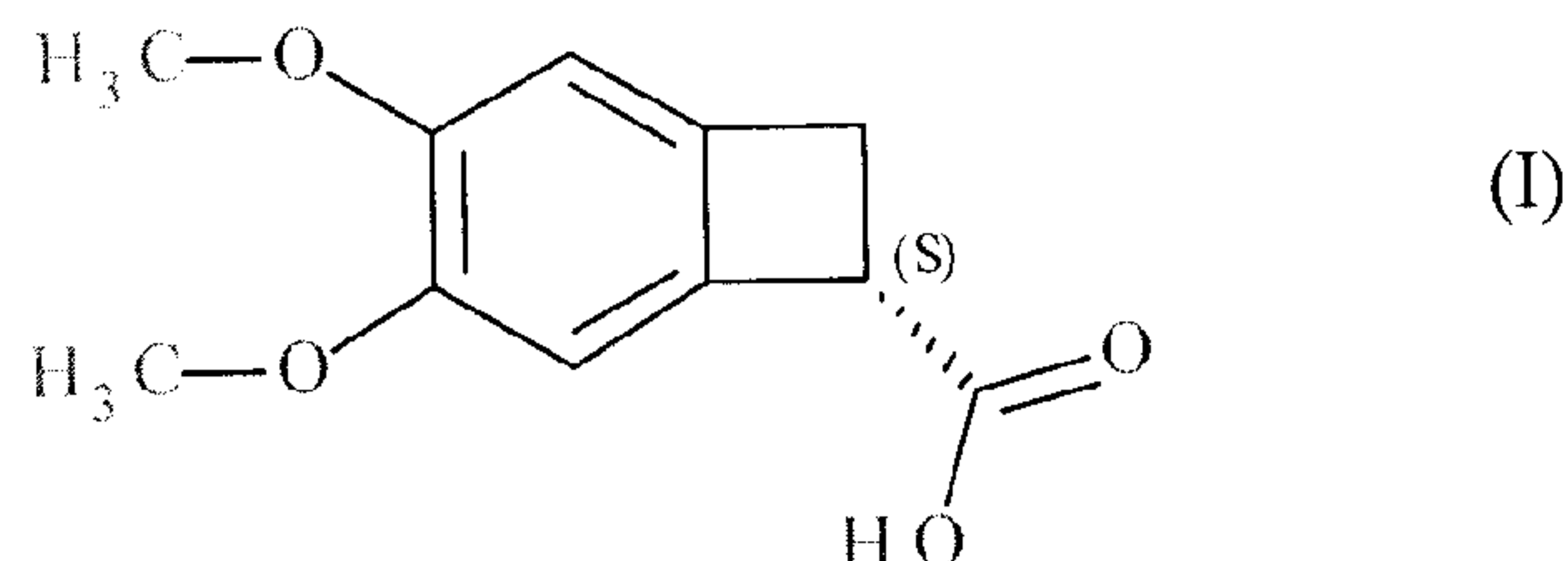
Résultats :

Temps	Nitrile	Acide carboxylique
45 minutes	50 %	50%
2 heures	0 %	100 %

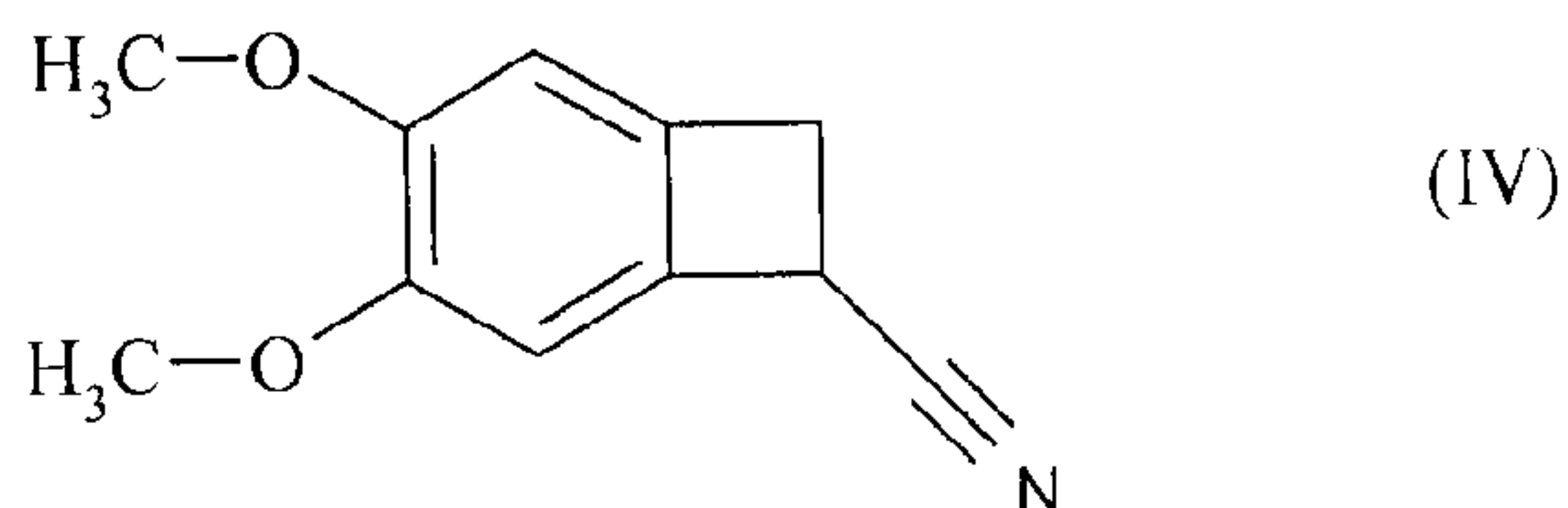
25 Le suivi par chromatographie chirale montre que la réaction n'est pas énantiosélective.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de synthèse du composé de formule (I) optiquement pur :



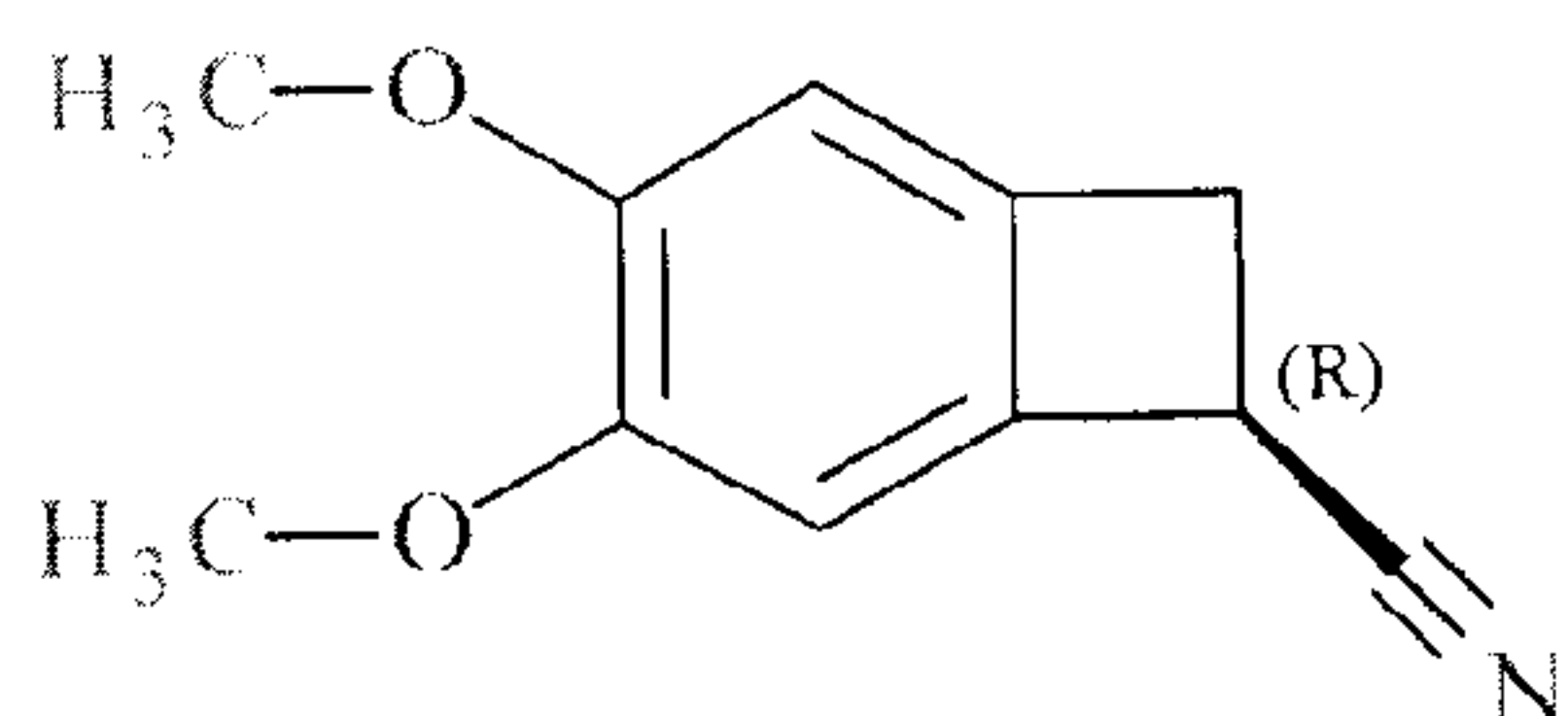
par hydrolyse enzymatique énantiosélective du nitrile racémique ou non optiquement pur de formule (IV) :



à l'aide de la nitrilase de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 exprimée au sein d'un autre organisme possédant un système biologique compétent,
dans un mélange d'un solvant organique et d'une solution aqueuse à pH de 5 à 10,
à une concentration de 1 à 500 g de nitrile de formule (IV) par litre de mélange de solvants,
à un ratio Enzyme/ Substrat (E/S) de 1/1 à 1/100, exprimé en g/g,
à une température de 25°C à 40°C.

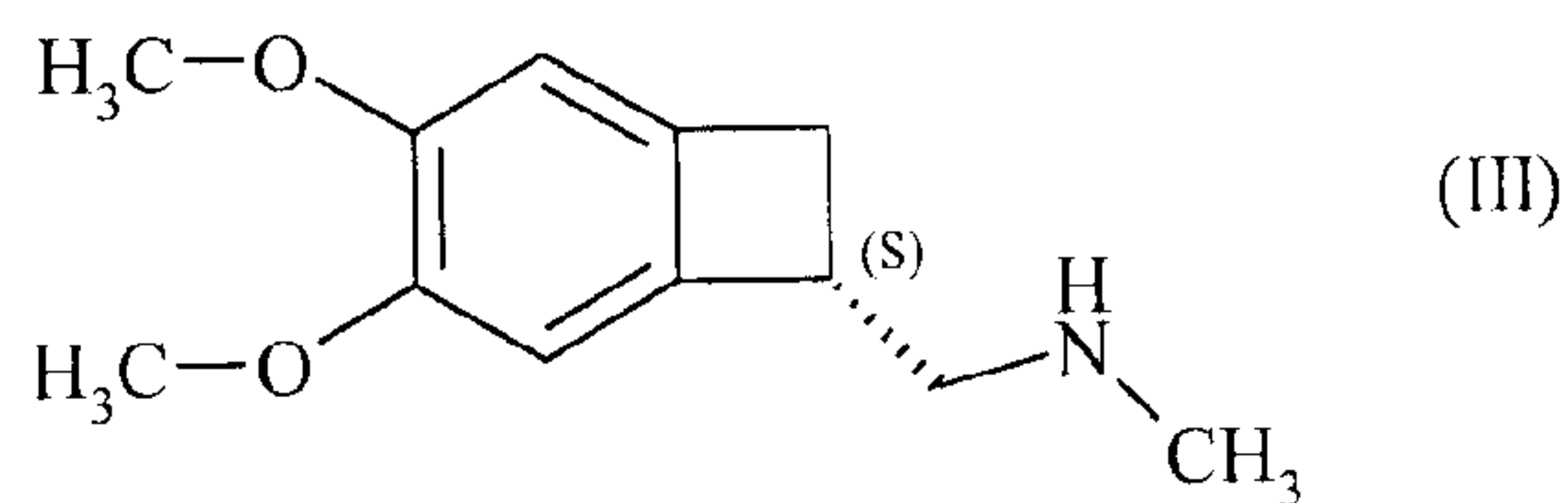
2. Procédé selon la revendication 1, où l'organisme possédant un système biologique compétent est une bactérie contenant un plasmide codant pour la nitrilase.
3. Procédé selon la revendication 2, où la bactérie est utilisée directement, sous forme de culot bactérien ou de lyophilisat.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, où le solvant organique est choisi parmi le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide (DMF), l'acétone, l'acétonitrile, l'éthanol, l'isopropanol, le tétrahydrofurane (THF) et le méthyltertbutyléther (MTBE).

5. Procédé de synthèse selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le nitrile de configuration (R), produit secondaire de la réaction :

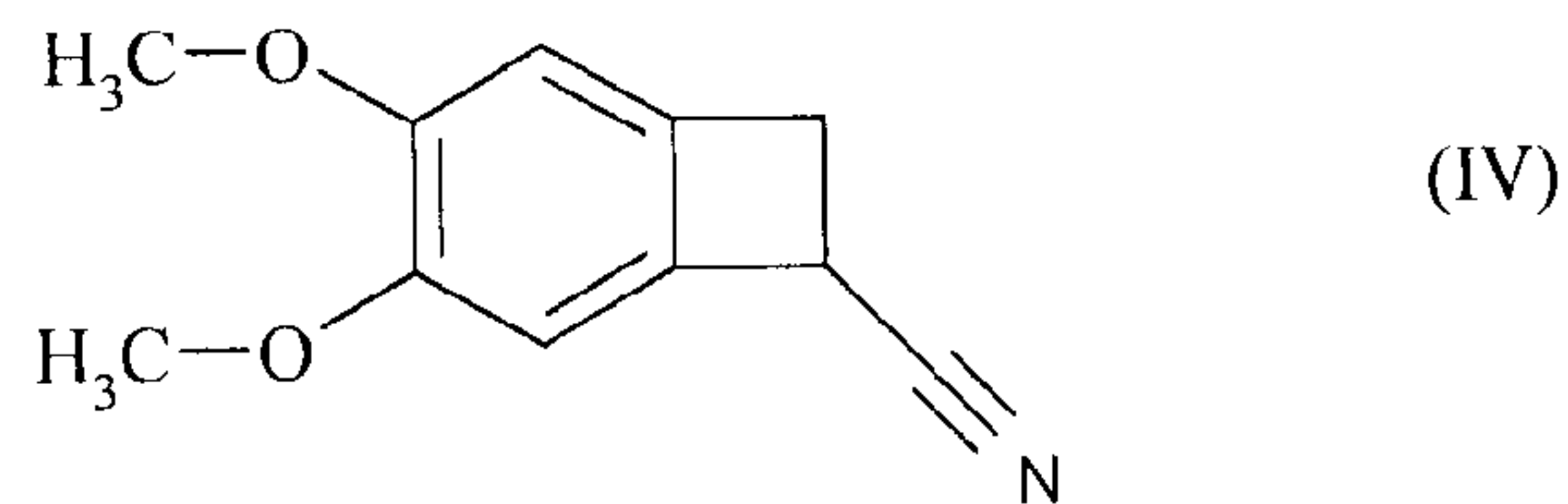


est racémisé par action d'une base en nitrile racémique de formule (IV) pour être recyclé dans le processus d'hydrolyse enzymatique.

6. Procédé de synthèse selon la revendication 5, dans lequel la base est le diazabicycloundécène (DBU).
7. Procédé de synthèse selon la revendication 5 ou 6, dans lequel l'étape de racémisation est effectuée *in situ*.
8. Procédé de synthèse selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, dans lequel le composé de formule (I) est isolé après un ou plusieurs cycles d'hydrolyse enzymatique.
9. Procédé de synthèse du composé de formule (III) :

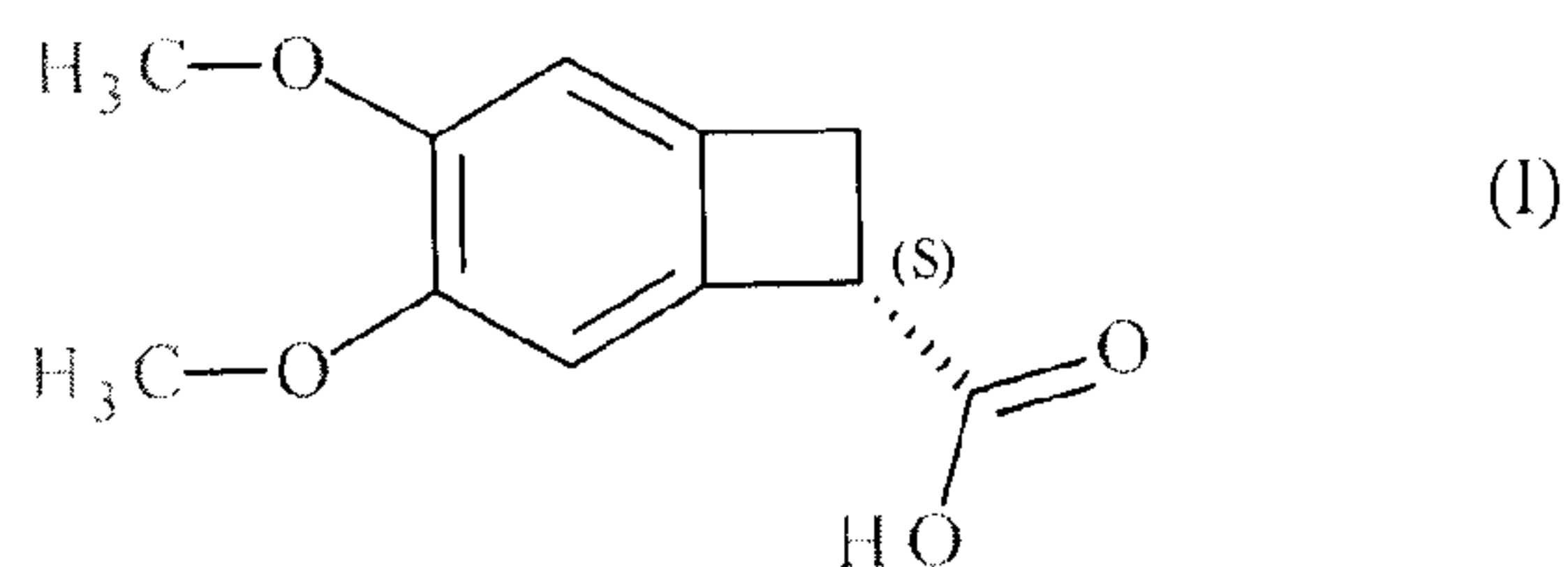


à partir du nitrile de formule (IV) :

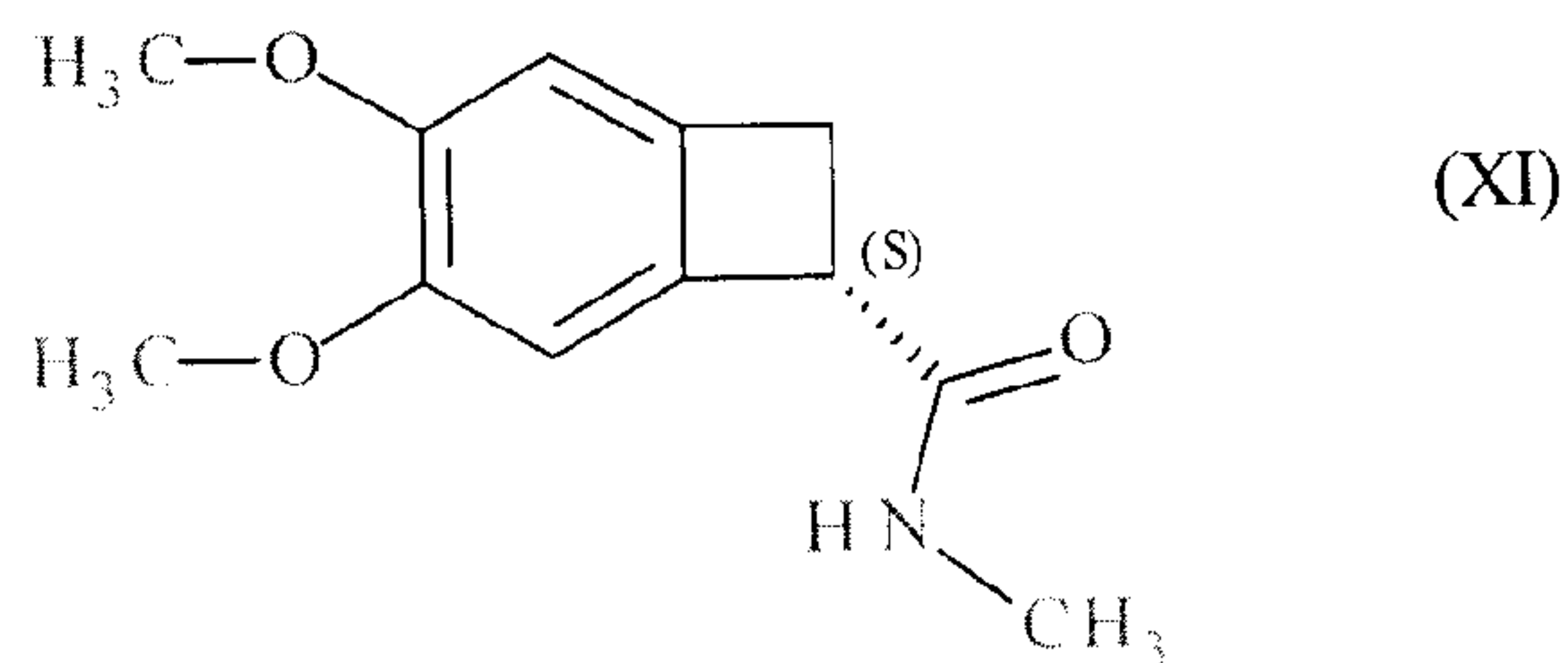


qui est hydrolysé en acide optiquement pur de formule (I) :

- 20 -

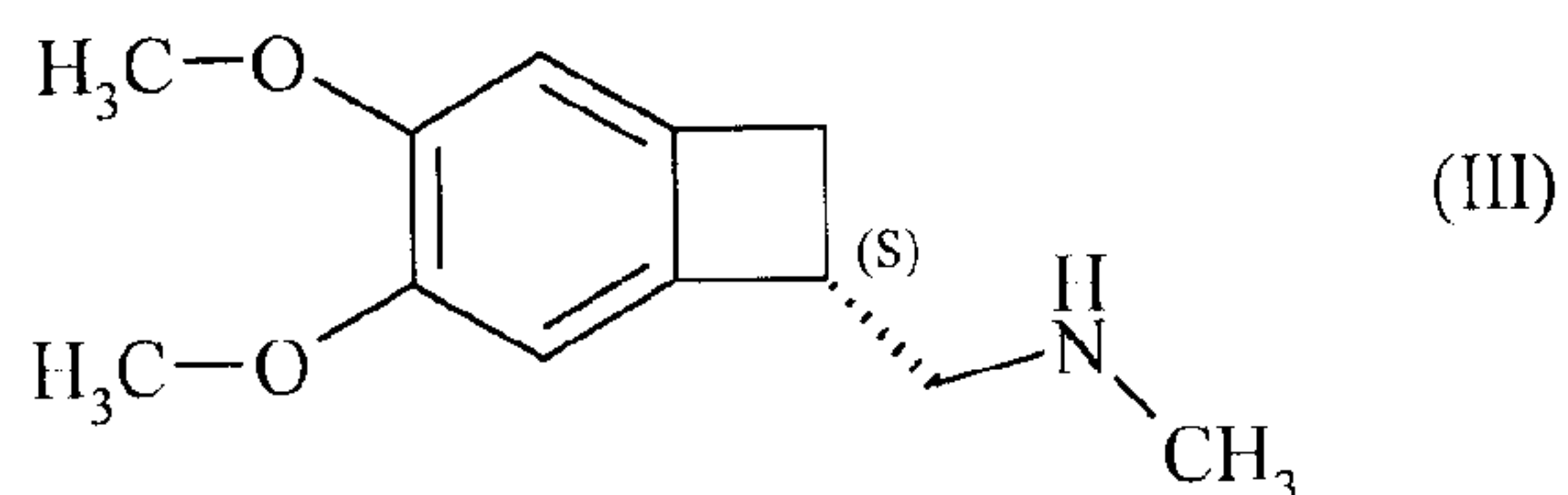


selon l'une quelconque des revendications 1 à 8,
qui est ensuite transformé en l'amide optiquement pur de formule (XI) :

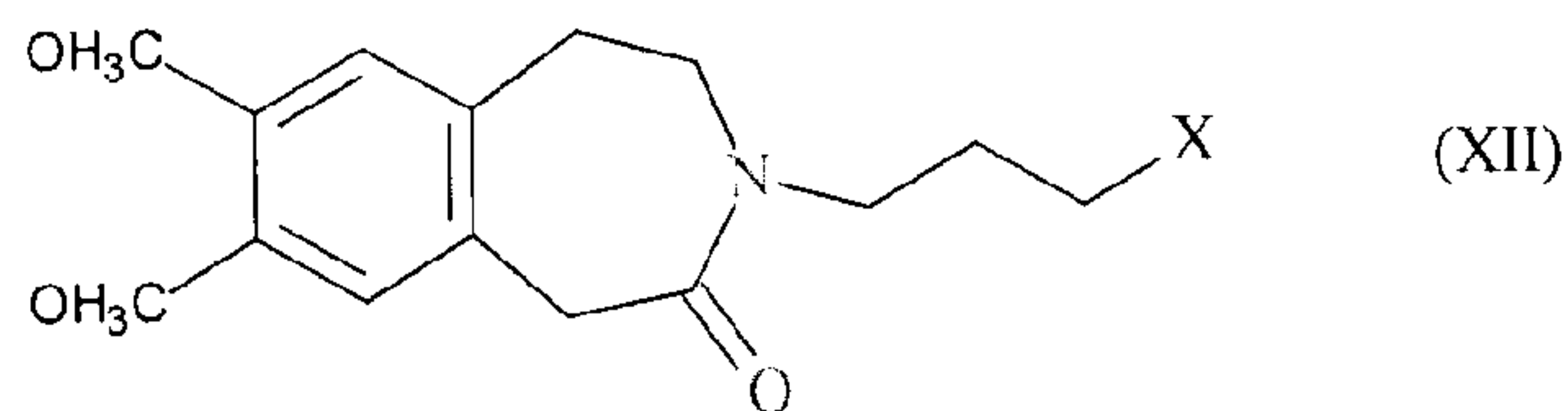


dont la réduction conduit au composé de formule (III).

10. Procédé de synthèse selon la revendication 9, dans lequel la réduction du composé de formule (XI) en composé de formule (III) est effectuée par BH_3 , NaBH_4 ou LiAlH_4 .
11. Procédé de synthèse de l'ivabradine, ou son sel d'addition à un acide pharmaceutiquement acceptable, sous forme anhydre ou hydrate, caractérisé en ce que le composé de formule (III) :

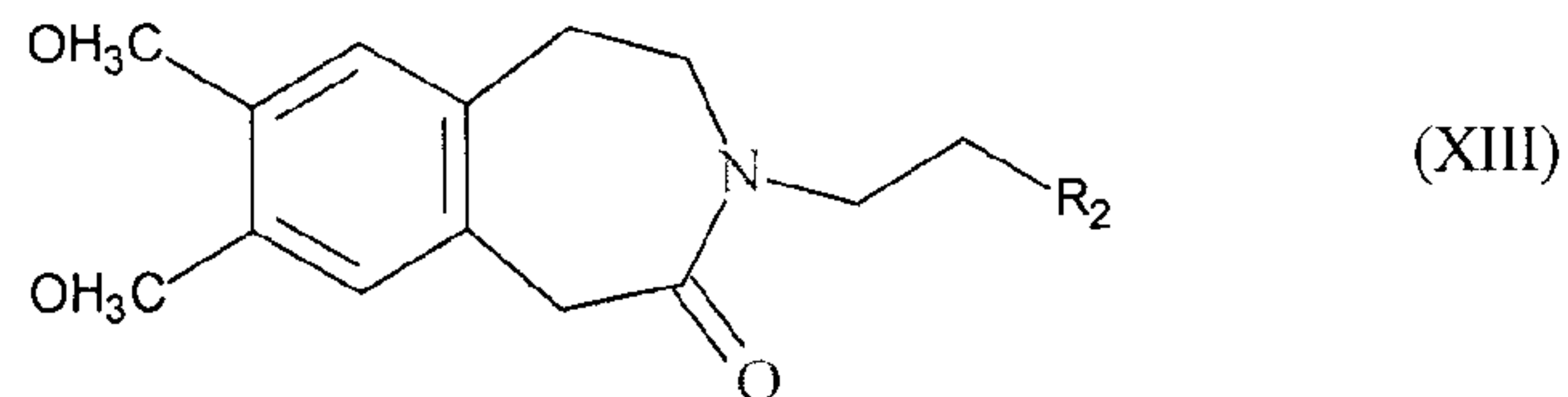


est obtenu selon le procédé de la revendication 9 ou 10 et est ensuite soit couplé avec un composé de formule (XII) :



où X représente un atome d'halogène,

soit soumis à une réaction d'amination réductrice avec un composé de formule (XIII) en présence d'un agent réducteur :



où R_2 représente un groupement choisi parmi CHO et CHR_3R_4 ,

où R_3 et R_4 représentent chacun un groupement alkoxy (C_1-C_6) linéaire ou ramifié, ou bien forment ensemble avec l'atome de carbone qui les porte un cycle 1,3-dioxane, 1,3-dioxolane ou 1,3-dioxépane,

pour conduire à l'ivabradine, qui est ensuite éventuellement transformée en un sel d'addition à un acide pharmaceutiquement acceptable sous forme anhydre ou hydrate.

12. Procédé de synthèse selon la revendication 11, dans lequel X est un atome d'iode.
13. Procédé de synthèse selon la revendication 11, dans lequel le composé de formule (III) est engagé dans la réaction d'amination réductrice sous la forme de son chlorhydrate, pour conduire à l'ivabradine sous la forme de chlorhydrate.
14. Procédé de synthèse selon la revendication 11 ou 13, dans lequel la réaction d'amination réductrice avec le composé de formule (XIII) est effectuée en présence de dihydrogène catalysé par le palladium sur charbon.

- 1/1 -

FIGURES

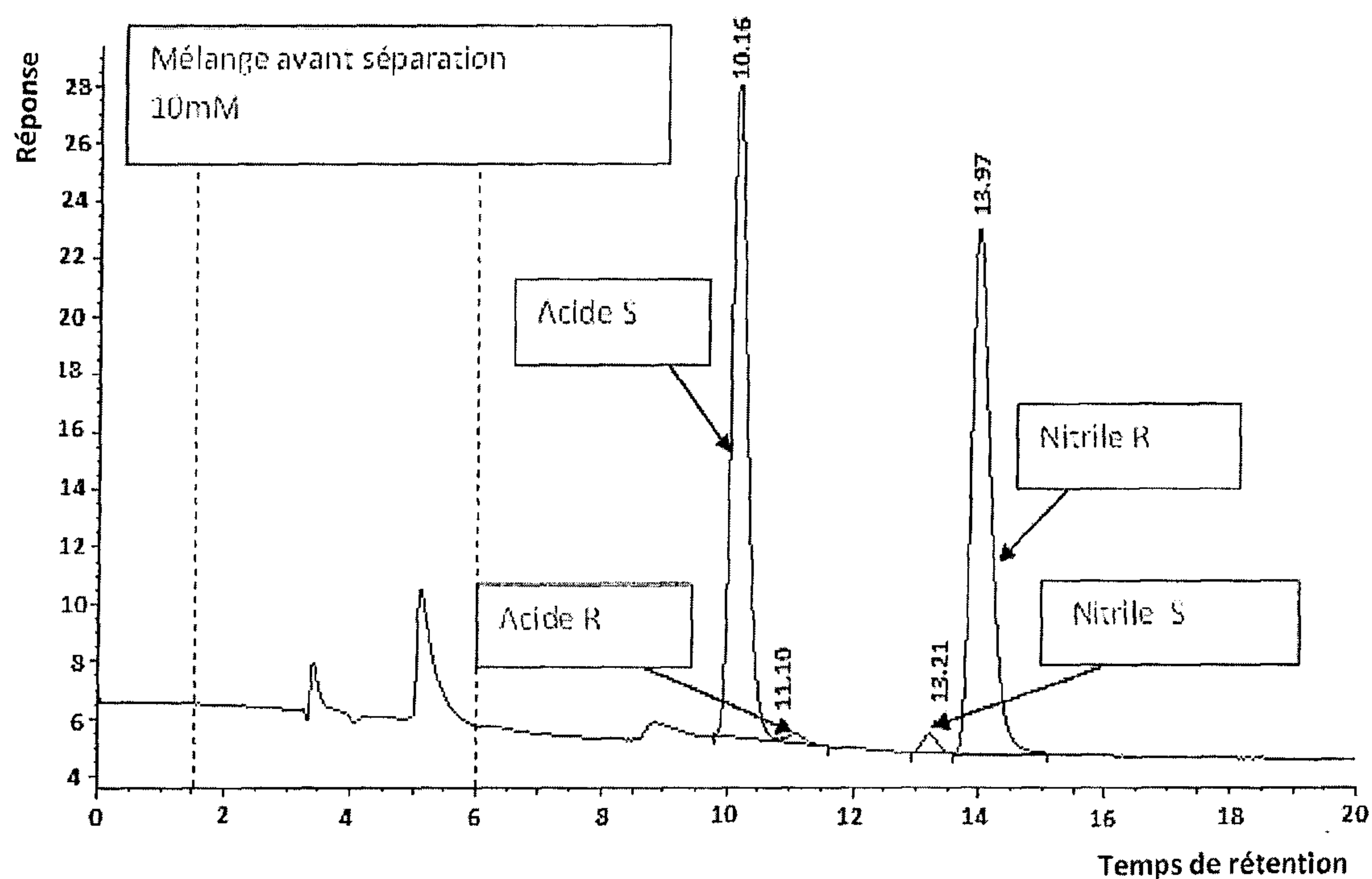


Figure 1 – Hydrolyse enzymatique du nitrile avec la nitrilase de *Rhodococcus rhodochrous* surexprimée - chromatogramme HPLC après 6 h

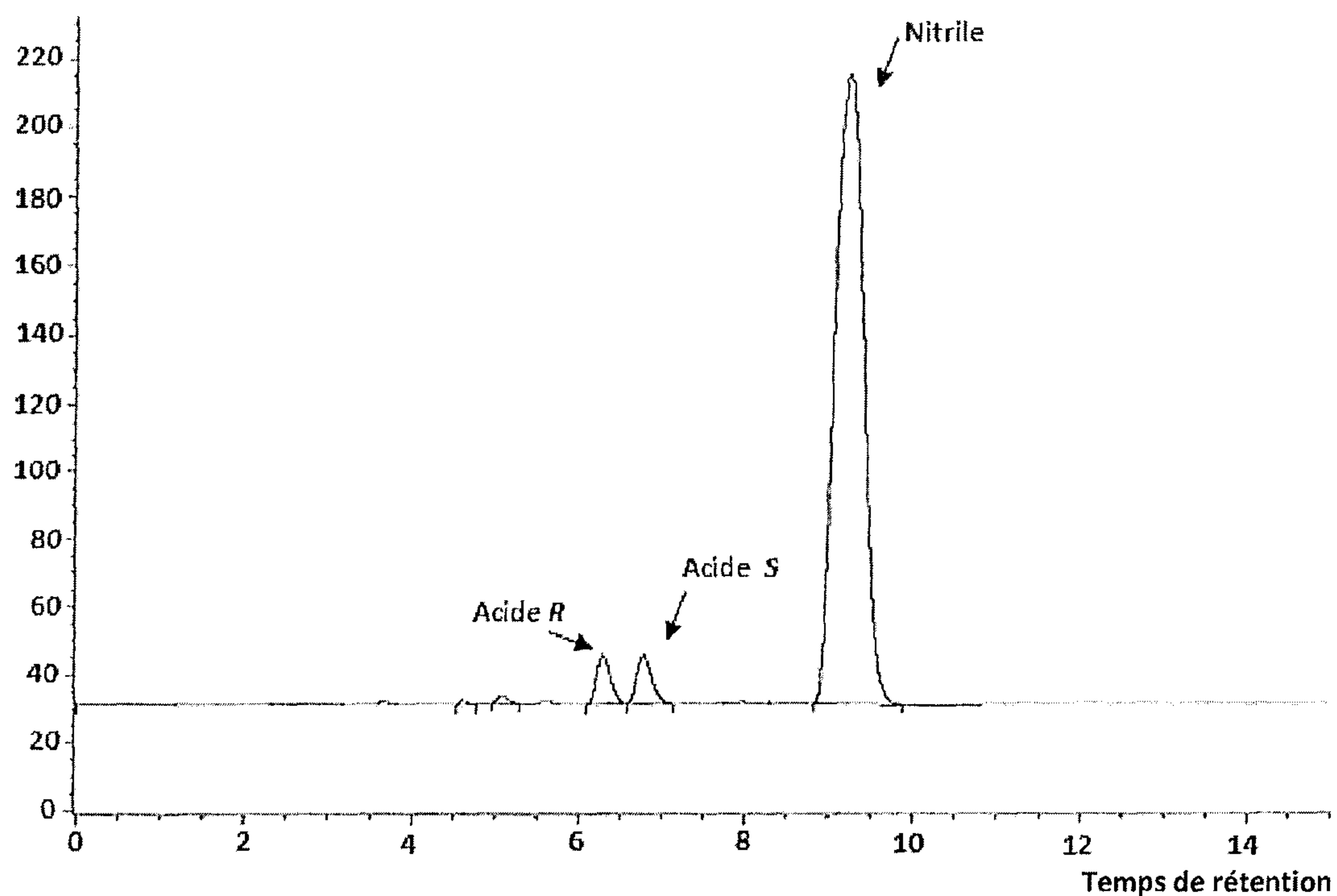


Figure 2 – Hydrolyse enzymatique du nitrile avec NIT 115
chromatogramme HPLC après 5 h

