República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) **PI 9908557-7 B1**

(22) Data do Depósito: 20/02/1999

(45) Data de Concessão: 18/09/2018

(54) Título: PROCESSO PARA SEPARAÇÃO ENANCIOMÉRICA ENZIMÁTICA DE 3(R)-HIDRÓXI-1-METIL-4-(2,4,6-TRIMETOXIFENIL)-1,2,3,6-TETRAHIDRO-PIRIDINA E 3-(S)- HIDRÓXI-1-METIL-4-(2,4,6-TRIMETOXIFENIL)-1,2,3,6-TETRAHIDRO-PIRIDINA E OS ÉSTERES DE ÁCIDO CARBOXÍLICO

(51) Int.Cl.: C12P 41/00

(30) Prioridade Unionista: 06/03/1998 DE 198 09 649.6

(73) Titular(es): SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

(72) Inventor(es): WOLFGANG HOLLA

(85) Data do Início da Fase Nacional: 05/09/2000

PI9900657

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROCESSO PARA SEPARAÇÃO ENANCIOMÉRICA ENZIMÁTICA DE 3(R)-HIDRÓXI-1-METIL-4-(2,4,6-TRIMETOXIFENIL)-1,2,3,6-TETRAHIDRO-PIRIDINA E 3-(S)- HIDRÓXI-1-METIL-4-(2,4,6-TRIMETOXIFENIL)-1,2,3,6-TETRAHIDRO-PIRIDINA E OS ÉSTERES DE ÁCIDO CARBOXÍLICO".**

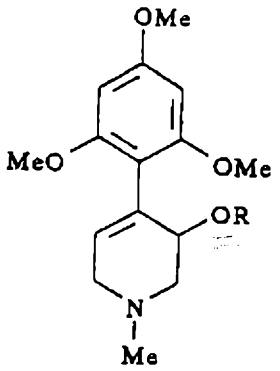
A invenção refere-se a um processo para preparação de compostos oticamente puros da fórmula (I) por reação estereodiferenciadora das misturas de enanciômeros com auxílio de uma enzima.

3(S)-hidróxi-1-metil-4-(2,4,6-trimetoxifenil)-1,2,3,6-tetrahidro-piridina e/ou 3-(R)- hidróxi-1-metil-4-(2,4,6-trimetoxifenil)-1,2,3,6-tetrahidro-piridina (compostos da fórmula (I) com R = H) ou seus derivados de éster (compostos da fórmula (I) com R = COR^1) são elementos de construção centrais e pré-etapas do pedido de patente HMR 98/L001 ("Processo para preparação de (-) cis -3-hidróxi-1-metil-4(R)-(2,4,6-trimetoxifenil) piperidina) da síntese de flavopiridóis (HMR 1275 ou L 86 8275)" descrita, do primeiro inibidor potente da cinase de proteína dependente de ciclina (ver por exemplo Sedlacek, Hans Harald; Czech, Joerg; Naik, Ramachandra; Kaur, Gurmeet; Worland, Peter; Losiewicz, Michael; Parker, Bernard; Carlson, Bradley; Smith, Adaline; e outros, Flavopiridol (L 86 8275; NSC 649890), um inibidor de cinase para terapia de tumores. Int. J. Oncol. (1996), 9(6), 1143-1168 ou Czech, Joerg; Hoffmann, dieter; Naik, Ramachandra; Sedlacek, Hans-Harald; antitumoral activity of flavone L 86 8275. Int. J. Oncol. (1995), 6(1), 31-36).

Uma dissociação de racemato ou separação de enanciômeros dos compostos da fórmula (I) não é conhecida.

Verificou-se então que compostos da fórmula (I), a partir das misturas de enanciômeros, podem ser obtidos em uma forma ótica pura por dissociação enzimática de ésteres (hidrólise ou alcoólise).

É objeto da presente invenção assim um processo para dissociação cinética de racemato de compostos da fórmula (I),



(I)

que é caracterizado pelo fato de se submeter misturas de enanciômeros ou misturas racêmicas de compostos da fórmula (I), na qual

R representa COR^1 com R^1 = (C_1-C_{16})-alquila, (C_2 - C_{16})-alquenil ou (C_3-C_{16})-alquinila, C_n H_{2n}-cicloalquila com n= 1-16, que podem ser ramificados ou não-ramificados e que podem ser substituídos por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, Br, I, CF_3, CN, NO_2, hidróxi, metóxi, etóxi e $COOR^2$, com R^2 = (C_1-C_4)-alquila e (C_2-C_4)-alquenila, que podem ser ramificados ou não-ramificados e que podem ser substituídos por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, Br, CF_3,

em meios homogêneos ou heterogêneos, aquosos, aquosos orgânicos ou meios orgânicos na presença de uma enzima, por exemplo, dos fígados ou pâncreas de mamíferos ou de origem microbiana, como por exemplo de Candida, Pseudomonas e Aspergillus ou uma protease, por exemplo de Bacillus, de uma estereohidrólise seletiva ou estéreo alcólise seletiva, a uma temperatura de 10-80° C, opcionalmente submetida na presença de co-solventes e de uma solução tampão, sendo que a mistura de reação contém de preferência 2 - 50% em peso de ésteres, e depois do decorrer da reação os ésteres não-reagidos (compostos da fórmula (I) com R = COR^1) - e os álcoois assim formados (compostos da fórmula (I) com R = H) separam-se, e assim também ambos os enanciômeros.

O processo de acordo com a invenção é econômico, simples e rápido. A reação não fornece nenhuma quantidade eqüimolar ótica de coad-

juvantes puros, nenhum reagente caro, nenhuma quantidade de solvente comparativamente grande e nenhuma etapa de trabalho custo-intensiva. Após o término da reação a separação dos produtos ou dos enanciômeros pode ocorrer por medidas simples, por exemplo, por extração.

De preferência nos compostos da fórmula (I)

R representa COR^1 com R^1 = (C_1- C_{12})-alquila, (C_2- C_{12})-alquenila ou (C_3-C_{12})-alquinila, C_nH_{2n}-cicloalquila com n = 1-12, que pode ser ramificado ou não-ramificado e que pode ser substituído por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, Br, CF_3, CN, NO_2, hidróxi, metóxi, etóxi e $COOR^2$, com R^2 = metila, etila e vinila e que pode ser substituído por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, CF_3.

Particularmente preferentemente nos compostos da fórmula (I)

R representa COR^1 com R^1 = (C_1- C_{10})-alquila, (C_2- C_{10})-alquenila ou (C_3-C_{10})-alquinila, C_nH_{2n}-cicloalquila com n = 1-10, que pode ser ramificado ou não-ramificado e que pode ser substituído por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, Br, CF_3, CN, NO_2, metóxi e $COOR^2$ com R^2 = metila, etila e vinila que pode ser substituído por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, CF_3.

Muito particularmente preferentemente nos compostos da fórmula (I)

R representa COR^1 com R^1 = (C_1- C_{10})-alquila, (C_2- C_{10})-alquenila ou (C_3-C_{10}) alquinila, que pode ser ramificada ou não ramificada e que pode ser substituída por 1-3-substituintes do grupo F, Cl, Br, CF_3 e metóxi.

Pelo processo procede-se de preferência de tal forma que reage-se e agita-se um éster da fórmula (1), por exemplo R = COR^1 com R^1 = C_3H_7 ou C_8H_{17} em uma solução contendo água ou álcool com uma lipase, esterase ou protease. Pode ser vantajoso tamponar-se a mencionada solução, por exemplo com solução tampão de fosfato ou de TRIS [= tris-(hidroximetil)-metilamina]. A adição pode ser por exemplo 0,01 - 1,0 molar. Uma faixa de solução tampão favorável é de pH 5-9.

Pode ser vantajoso, adicionar-se co-solventes. Como co-solventes são apropriados por exemplo dimetoxietano, acetona, THF, dioxano, he-

xano, terc-butilmetiléter e terc-butanol. A fração de co-solventes na solução situa-se de preferência em 10-80%.

Como enzimas são preferentemente empregadas lipases e esterases, como por exemplo colesterol-esterase (EC 3.1.1.13) do pâncreas de bezerros (Sigma Chemical Co.), esterase de fígado de porco (PLE(porcine liver esterase), Sigma Chemical Co.), pancreatina (Fluka e Sigma Chemical Co.), pó de acetona do pâncreas de bezerro (Sigma Chemical Co.), pó de acetona de fígado de cavalo (Sigma Chemical Co.) e lipase do pâncreas do porco (PPL (porcine pancreas lipase), Sigma Chemical Co.), Lipase OF de Candida rugosa (Meito Sangyo) e Lipase AP-6 de Aspergillus niger (Amano Pharmaceuticals).

Cada enzima mencionada pode ser empregada na forma livre ou imobilizada (Immobilized Biocatalysts, W. Hartmeier, Springer Verlag Berlin, 1988). A quantidade de enzima é escolhida livremente dependendo da velocidade de reação ou do tempo de reação objetivado e do tipo da enzima (por exemplo livre ou imobilizada) e pode ser facilmente determinada por tentativas prévias simples.

A mistura de reação contém de preferência 2-50% em peso de éster, particularmente preferentemente de 5-20% em peso. A temperatura de reação é de 10-80°C, de preferência de 20-60° C, particularmente preferentemente 20-40°C.

A preparação do éster (compostos da fórmula I com R = COR^1) ocorre propositadamente a partir do álcool (composto da fórmula I com R = H) segundo processos conhecidos de esterificação (Haslam, Tetrahedron 1980, 36, 2409; Höfle, Steglich, Vorbrüggen, Angew. Chem. 1978, 90, 602) ou como descrito no pedido de patente HMR98/L 001 ("Processo para preparação de (-)dis-3-hidróxi-1-metil-4(R)-(2,4,6-trimetóxifenil) piperidina").

Os produtos originados ou remanescentes do processo são separados de maneira simples, por exemplo por extração ou processos cromatográficos. O éster remanescente é obtido por exemplo por divisão da solução de reação entre água e n-heptano e concentração da fase orgânica. O álcool originado pode então ser extraído a partir da fase aquosa com etiléster de ácido acético. A re-obtenção da enzima pode ocorrer por secagem por

congelamento. A separação (e opcionalmente o re-emprego posterior) da enzima pode ser facilitada por imobilização.

Através de condução apropriada da reação consegue-se obter sempre pelo menos um enanciômero oticamente puro. Aspirando a um éster oticamente puro, a reação deveria ser superior (ou igual) a 50%, aspirando-se a um álcool oticamente puro, a reação deveria ser menor (ou igual) a 50%. A determinação da reação da hidrólise ou alcoólise enzimática ocorreu com (RP 18 LiChrosorb®), a determinação da pureza ótica foi realizada por HPLC (Chiralpak AD). Os ésteres originados ou remanescentes na dissociação de racemato são convertidos segundo processos conhecidos de dissociação (S. J. Salomon, E. G. Mata, O. A. Mascaretti, Tetrahedron 1933, 49, 3691-3748) sem inversão ou racemização no álcool correspondente. De modo contrário o álcool originado é convertido segundo processos de esterificação conhecidos (Haslam, tetrahedron 1980, 36, 2409) sem inversão ou racemização nos ésteres correspondentes.

Os produtos originados ou remanescentes no processo são empregados segundo processos conhecidos, por exemplo, por re-agrupamento catalisado por metal (L. E. Overman, Angew. Chem. 1984, 96, 565-573 e na literatura já citada), racemizados e novamente introduzidos na dissociação de racemato. Isto eleva o rendimento para acima de 50%. Por exemplo, os compostos da fórmula (I) com R = COR^1 se deixam racemizar diretamente e os descritos de acordo com a fórmula (I) com R - H, por exemplo, após a conversão em derivados apropriados, como eles são descritos em L. E. Overman, Angew. Chem. 1994, 96, 565-573. Como catalisadores metálicos podem ser empregados por exemplo compostos de Hg (II), Pd (0) ou Pd (II) ou sais.

Através dos seguintes exemplos a presente invenção deve ser minuciosamente esclarecida.

Exemplos

Todos os produtos ou misturas de produtos em bruto isoladas foram identificados por ^{1}H-RMN.

A pureza ótica dos produtos foi determinada por HPLC, por exemplo em Chiralpak AD 250 X 4,6 (Daicel).

Exemplo 1

Introduziu-se 10 mg de éster de ácido acético [Composto da fórmula I com R = COR^1 e $R^1 = CH_3$] em 1 ml de solução tampão de fosfato de potássio (0,1 m, pH = 7,0)/dimetoxietano (5:1). Adicionou-se 5 mg de pancreatina. Agitou-se a 20-25° C até que tenha ocorrido a conversão de cerca de 40% (HPLC). Depois filtrou-se, concentrou-se até a secagem, e verificou-se a mistura resultante por HPLC (Chiralpak AD 250 x 4,6, n-hexano + EtOH 5 + 1, fluxo 1 ml/min, 25°C, 220/240 nm):

ee do éster de ácido acético (R) remanescente: 63%; ee do álcool (S): 85%.

Exemplo 2

Introduz-se 10 mg do éster de ácido butírico [Composto da fórmula I com R = COR^1 e $R^1 = (CH_2)_2CH_3$] em 1 ml de solução tampão de fosfato de potássio (0,1 M, pH = 7,0)/dimetoxietano (5:1). Adicionou-se 5 mg de PPL (lipase do pâncreas do porco, Sigma Chemical Co.). Agita-se a 30°C até que a conversão tenha atingido cerca de 48% (HPLC). Depois filtra-se, concentra-se até a secagem e verifica-se a mistura resultante por HPLC (Chiralpak AD 250 x 4,6, n-hexano + EtOH 6 + 1, fluxo 1 ml/min, 25°C, 220/240 nm):

ee do éster de ácido butírico-(R): 90%; ee do álcool (S): 97%.

Exemplo 3

Introduziu-se 1,0 g (2,86 mmoles) do éster de ácido butírico [Composto da fórmula I com R = COR^1 e $R^1 = (CH_2)_2CH_3$] em 8 ml de dimetoxietano e 40 ml de solução tampão de potássio (0,1 M, pH = 7,0). Adicionou-se 90 mg de pancreatina. Agitou-se a 22-25° C até que a conversão tivesse ultrapassado 50%. Depois concentrou-se em vácuo, reagiu-se com água e extraiu-se seis vezes com cerca de 50 ml de n-heptano. Após a secagem (Na_2SO_4) concentrou-se em vácuo. Obteve-se 450 mg (45%) do éster de ácido butírico - (R); ee (HPLC): ≥ 99%. Após a extração da fase aquosa remanescente com etiléster de ácido acético, secagem (Na_2SO_4) e concentração em vácuo obteve-se 190 mg (23,8%) do álcool (S); ee (HPLC): 97%.

Exemplo 4

Introduziu-se 10 ml do éster de ácido butírico [Composto da fór-

mula I com R = COR^1 e R^1 = $(CH_2)_2CH_3$] em 1 ml de solução tampão de fosfato de potássio (0,1 M, pH = 7,0)/dimetoxietano (5:1). Adicionou-se 5 mg de PPL. Agitou-se a 30° C até que se obtivesse uma conversão de cerca de 48% (HPLC). Depois filtrou-se, concentrou-se até a secagem e verificou-se a mistura resultante por HPLC (Chiralpak Ad 250 x 4,6, n-hexano + EtOH 6 + 1, fluxo 1 ml/min, 25°C, 220/240 nm); ee do éster de ácido butírico - (R): 90%; ee do álcool (S): 97%.

Exemplo 5

Introduziu-se 10 mg do éster de ácido butírico [Composto da fórmula I com R = COR^1 e R^1 = $CO(CH_2)_2CH_3$] em 1 ml de solução tampão de fosfato de potássio (0,1 M, pH = 7,0)/dimetoxietano (5:1). Adicionou-se 5 mg de PLE (esterase de fígado de porco, Sigma Chemical Co.). Agitou-se a 30° C até que se tenha alcançado uma conversão de cerca de 47% (HPLC). Depois filtrou-se, concentrou-se até a secagem e verificou-se a mistura resultante por HPLC (Chiralpak AD 250 x 4,6, n-hexano + EtOH 6 + 1, fluxo 1 ml/min, 25°C, 220/240 nm):

ee do éster de ácido (R)-butírico: 88%; ee do álcool -(S): 97%.

Exemplo 6

Introduziu-se 10 mg do éster de ácido caprônico [Composto da fórmula I com R = COR^1 e R^1 = $(CH_2)_4CH_3$] em 1ml de solução tampão de fosfato de potássio (0,1 M, pH = 7,0)/dimetoxietano (5:1). Adicionou-se 5 mg de PLE. Agitou-se a 30°C até que tenha se alcançado uma conversão de cerca de 40 % (HPLC). Depois filtrou-se, concentrou-se até a secagem e verificou-se a mistura resultante por HPLC (Chiralpak AD 250 x 4,6, n-hexano + EtOH 6 + 1, fluxo 1 ml/min, 25° C, 220/240 nm):

ee do éster de ácido (R)-caprônico: 66%; ee do álcool -(S): 96%.

Exemplo 7

Introduz-se 10 mg do éster de ácido caprônico [Composto da fórmula I com R = COR^1 e R^1 = $(CH_2)_4CH_3$] em 1 ml de solução tampão de fosfato de potássio (0,1 M, pH = 7,0)/dimetoxietano (5:1). Adicionou-se 5 mg da esterase de colesterol de pâncreas de bezerro. Agitou-se a 30°C até que alcançou-se uma conversão de cerca de 50% (HPLC). Depois filtrou-se, concentrou-se até a secagem e verificou-se a mistura resultante por HPLC

52

(Chiralpak AD 250 x 4,6, n-hexano + EtOH 6 + 1, fluxo 1 ml/min, 25°C, 220/240 nm);

ee do éster de ácido (R)-caprônico: ≥ 99,8%; ee do álcool -(S): ≥ 99,8%.

Exemplo 8

Introduziu-se 10 mg do éster de ácido caprínico [Composto da fórmula I com R = COR^1 e R^1 = $(CH_2)_8CH_3$] em uma solução tampão de 1 ml de fosfato de potássio (0,1 M, pH = 7,0)/dimetoxietano (5:1). Adicionou-se 5 mg de PPL. Agitou-se a 30°C até que alcançou-se uma conversão de cerca de 10% (HPLC). Depois filtrou-se, concentrou-se até a secagem e verificou-se a mistura resultante por HPLC (Chiralpak AD 250 x 4,6, n-hexano + EtOH 6 + 1, fluxo 1 ml/min, 25°C, 220/240 nm) verificou-se:

ee do éster de ácido (R)- caprínico: ≥ 11%; ee do (S)- álcool: 95%.

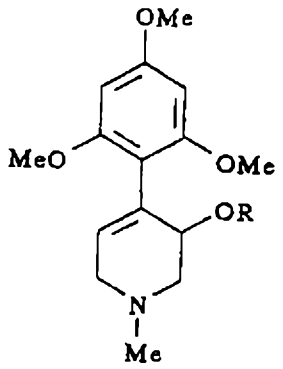
Exemplo 9

Introduziu-se 10 mg do éster de ácido butírico [Composto da fórmula I com R = COR^1 e R^1 = $(CH_2)_2CH_3$] em 1 ml de solução de fosfato de potássio (0,1 M, pH = 7,0)/dimetoxietano (5 : 1). Adicionou-se 5 mg de pó de acetona de fígado de cavalo. Agitou-se a 30° C até alcançar-se uma conversão de cerca de 46% de (HPLC). Depois filtrou-se, concentrou-se até a secagem, e verificou-se a mistura resultante por HPLC (Chiralpak AD 150 x 4,6, n-hexano + EtOH + 1, fluxo 1 ml/min, 25° C, 220/240 nm):

ee do éster de ácido (R) butírico: 82%; ee do álcool (S): 96%.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para dissociação cinética de racemato de compostos da fórmula (I)



(I)

caracterizado pelo fato de submeter-se misturas enanciomércas ou misturas racêmicas de compostos da fórmula (I), na qual

R representa COR^1 com R^1 = (C_1-C_{16})-alquila, (C_2-C_{16}) alquenila ou (C_3-C_{16})-alquinila, C_nH_{2n}- cicloalquila com n = 1 -16, que podem ser ramificados ou não-ramificados e que podem ser substituídos por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, Br, I, CF_3, CN, NO_2, hidróxi, metóxi, etóxi e $COOR^2$ com R^2 = (C_1-C_4)-alquila e (C_2-C_4)-alquenila, que podem ser ramificados ou não-ramificados e que podem ser substituídos por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, Br, CF_3,

em meios homogêneos ou heterogêneos, aquosos, aquosos-orgânicos ou orgânicos na presença de uma enzima de uma hidrólise estereosseletiva ou alcoólise a uma temperatura de 10 - 80°C, opcionalmente submetido, na presença de co-solventes e uma solução tampão, sendo que a mistura de reação de preferência contém 2 - 50 % em peso de éster e, após o decorrer da reação, separa-se o éster não reagido (Composto da fórmula (I) com R = COR^1) e separa-se o álcool formado (composto da fórmula (I) com R = H), e assim ambos os enanciômeros.

2. Processo para dissociação cinética de compostos racêmicos da fórmula (I), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que

R representa COR^1 com R^1 = (C_1-C_{12})-alquila, (C_2 - C_{12})-alquenila ou (C_3-C_{12})-alquinila, C_n H_{2n}-cicloalquila com n = 1-12, que podem ser ramificados ou não-ramificados e que podem ser substituídos por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, Br, CF_3, CN, NO_2, hidróxi, metóxi, etóxi e $COOR^2$, com R^2 = metila, etila e vinila, que podem ser substituídos por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, Br, CF_3.

3. Processo para dissociação cinética de compostos racêmicos da fórmula (I), de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que

R representa COR^1 com R^1 = (C_1-C_{10})-alquila, (C_2 - C_{10})-alquenila ou (C_3-C_{10})-alquinila, C_n H_{2n}-cicloalquila com n= 1-10, que podem ser ramificados ou não-ramificados e que podem ser substituídos por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, Br, CF_3, CN, NO_2, metóxi, etóxi e $COOR^2$, com R^2 = metila, etila e vinila, que podem ser substituídos por 1-3 substituintes do grupo F, Cl, Br, CF_3.

4. Processo para dissociação cinética de compostos racêmicos da fórmula (I) de acordo com as reivindicações de 1 até 3, caracterizado pelo fato de que

R representa COR^1 com R^1 = (C_1-C_{10})-alquila, (C_2-C_{10})-alquenila ou (C_3-C_{10})-alquinila, que podem ser ramificados ou não-ramificados e que podem ser substituídos por 1-3 substituintes do grupo dos F, Cl, Br, CF_3, e metóxi.

5. Processo para dissociação cinética de compostos racêmicos da fórmula (I) de acordo com as reivindicações de 1 até 4, caracterizado pelo fato de que como enzima é empregada uma lipase, esterase ou protease.