



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 573**

51 Int. Cl.:
C12P 7/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08761962 .3**

96 Fecha de presentación : **22.01.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2121950**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **Procedimiento de hidrólisis enzimática quimioselectiva de un compuesto diéster para la preparación de un compuesto monoéster monoácido.**

30 Prioridad: **22.01.2007 FR 07 52792**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.08.2011

73 Titular/es: **ZACH SYSTEM**
Zi La Croix Cadeau
49240 Avrille, FR
NOVACTA BIOSYSTEMS LIMITED

72 Inventor/es: **Burgos, Alain;**
Caille, Jean-Claude y
Lorraine Gradley, Michelle

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 573 T3

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).

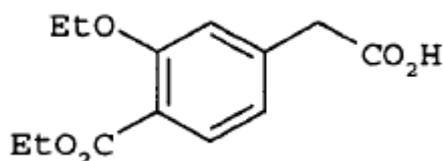
DESCRIPCIÓN

Procedimiento de hidrólisis enzimática quimioselectiva de un compuesto diéster para la preparación de un compuesto monoéster monoácido

Introducción

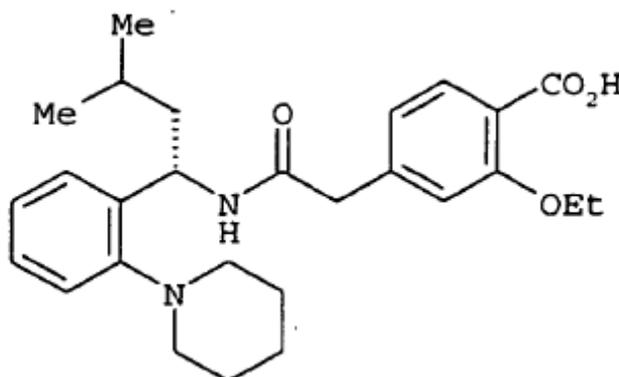
- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis de un derivado de éster alquílico del ácido 4-carboximetil-2-alkiloxibenzoico a partir del derivado diéster.

Más específicamente, se trata de un procedimiento de preparación de éster etílico del ácido 4-carboximetil-2-etoxibenzoico,



- 10 un intermedio de síntesis clave para la producción industrial del principio activo farmacéutico repaglinida, utilizado en el tratamiento de la diabetes.

Repaglinida



- 15 **Técnica anterior**

Se conoce de la técnica anterior el artículo del autor P. Müller *et al.* publicado en la revista *J. Med. Chem.*, 1998, 41(26), p 5219, que describe un procedimiento de síntesis de éster etílico del ácido 4-carboximetil-2-etoxibenzoico caracterizado por una reacción de hidrólisis selectiva del derivado diéster correspondiente.

- 20 Esta reacción de hidrólisis selectiva se efectúa en etanol a una temperatura de 25°C y en presencia de una base fuerte como, por ejemplo, una solución acuosa de sosa.

Los límites de este procedimiento para una aplicación industrial se encuentran en la formación de subproductos en cantidad no despreciable, especialmente el compuesto diácido que es difícil de eliminar, la necesidad de varios tratamientos de extracción y lavado o de varias recristalizaciones para el aislamiento del producto y por último el bajo rendimiento másico de obtención del producto esperado.

- 25 Por otro lado, la técnica anterior no describe procedimientos de preparación de un compuesto de ácido fenilacético que comprenda una función éster en el núcleo aromático aplicando una reacción de hidrólisis enzimática quimioselectiva del correspondiente compuesto diéster.

- 30 Particularmente, no se describe en la técnica anterior un procedimiento de hidrólisis enzimática quimioselectiva de una función éster de un ácido fenilacético con respecto a una función éster de un ácido benzoico en un compuesto que comprenda estas dos funciones.

Objetos de la invención

La presente invención tiene como objeto principal resolver el nuevo problema técnico consistente en la provisión de un nuevo procedimiento de preparación de éster etílico del ácido 4-carboximetil-2-etoxibenzoico evitando la formación de subproductos y aumentando el rendimiento másico.

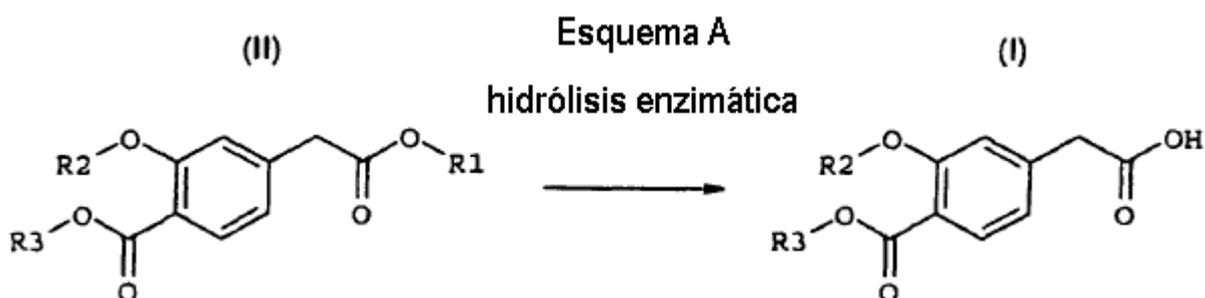
- 5 La presente invención tiene también como objeto principal resolver el nuevo problema técnico consistente en la provisión de dicho nuevo procedimiento de manera que se minimice el coste de producción.

La presente invención tiene también como objeto principal resolver los nuevos problemas enunciados anteriormente según un nuevo procedimiento que permita preparar dicho intermedio de síntesis en cantidades y con una calidad industrial compatibles con una producción farmacéutica.

10 **Sumario de la invención**

La solicitante ha puesto a punto ahora un nuevo procedimiento de síntesis del compuesto de fórmula (I) tal como se define a continuación.

Más particularmente, este procedimiento se realiza según el esquema A a continuación,



- 15 en las que R1, R2 y R3, idénticos o diferentes, representan individual e independientemente un grupo alquilo.

Según un modo de realización particular, cada grupo R1, R2 y R3 es simultáneamente el mismo, ventajosamente un etilo.

En el marco de la invención, se obtiene el compuesto de fórmula (I) aplicando una reacción de hidrólisis enzimática quimioselectiva de una de las dos funciones éster.

- 20 Este procedimiento según la invención se caracteriza por una reacción de hidrólisis enzimática que comprende la puesta en contacto del compuesto de fórmula (II) con una lipasa que realiza la hidrólisis quimioselectiva de una sola de las dos funciones éster del compuesto de fórmula (II), obteniendo el compuesto de fórmula (I). En el marco de la invención, para la preparación de repaglinida, se realiza la hidrólisis quimioselectiva de la función éster en posición 4 del intermedio.

- 25 Según otro modo de realización ventajoso de este procedimiento, se efectúa la reacción de hidrólisis enzimática en una solución a pH controlado en presencia o ausencia de un codisolvente orgánico. El valor de pH de la solución se controla durante la reacción de tal manera que la actividad de la enzima no se vea afectada por este valor, particularmente se mantiene este valor durante la reacción entre 6 y 8.

- 30 Según otro modo más de realización ventajosa de este procedimiento, para la preparación del intermedio de síntesis de repaglinida, se realiza la reacción de hidrólisis enzimática a un pH controlado mediante el empleo de una solución tampón tal como una solución acuosa basada en fosfato, carbonato o sulfato con un valor de pH comprendido entre 6 y 8. Más generalmente, el valor de pH de la solución tampón es tal que no afecta a la actividad de la enzima utilizada.

Particularmente, la solución tampón es una solución acuosa que tiene un valor de pH igual a aproximadamente 7,2.

- 35 Según un modo de realización particular de la invención, esta solución tampón acuosa puede obtenerse mediante el empleo de una solución acuosa basada en fosfato, carbonato o sulfato, regulada a un valor de pH inicial comprendido entre 6 y 8. Está disponible comercialmente dicha solución acuosa tampón.

Según una variante de realización, se utiliza una solución tampón acuosa que tiene un pH inicial de aproximadamente 7,2, particularmente basada en fosfato de potasio.

Según otro modo de realización particular de la invención, el procedimiento se caracteriza porque se efectúa un control del mantenimiento del valor de pH entre 6 y 8 en el transcurso del procedimiento mediante la adición de una solución acuosa de una base fuerte tal como un hidróxido o un alcoholato de metal alcalino.

5 La normalidad de la solución de base fuerte es tal que permite una regulación satisfactoria del valor de pH que permite el mantenimiento de la actividad de la enzima.

Según un modo de realización ventajoso, con el fin de asegurar el mantenimiento de la actividad de la enzima y de evitar una hidrólisis significativa de la segunda función éster, particularmente en posición 1 en el marco de la fabricación de repaglinida, se efectúa el control del valor de pH del medio de reacción mediante la adición de una base fuerte tal como un hidróxido o un alcoholato de metal alcalino.

10 Preferiblemente, se efectúa el control del pH mediante la adición de una solución de sosa, más particularmente una solución acuosa de sosa. La normalidad de la solución básica es tal que permite una regulación satisfactoria del valor de pH que permite el mantenimiento de la actividad de la enzima.

15 Según un modo de realización ventajoso de este procedimiento según la invención, éste se caracteriza porque la reacción de hidrólisis enzimática se efectúa a una temperatura comprendida entre 10 y 70°C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 45°C.

Según otro modo de realización ventajosa de la invención, la concentración inicial de producto de partida está comprendida entre 1 kg/l y 50 g/l, preferiblemente entre 500 g/l y 50 g/l, muy preferiblemente la concentración inicial es de aproximadamente 400 g/l.

20 Más en general, ventajosamente la concentración inicial del producto de partida es prácticamente el valor máximo que permite a la vez la solubilidad del producto en el disolvente seleccionado y la falta de degradación de la actividad de la enzima.

La enzima utilizada para realizar esta hidrólisis enzimática selectiva es una lipasa.

La lipasa utilizada puede estar en forma sólida, en solución, en suspensión o inmovilizada sobre un soporte inerte.

La enzima puede utilizarse directamente en la forma comercializada o bien después de purificación.

25 A modo de ejemplo, pero no limitativo, se puede utilizar en el marco de la invención una enzima elegida entre una lipasa, una lipasa obtenida a partir de una *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus usuamii*), una *Rhizopus* (*Rhizopus oryzae*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus sp*, *Rhizopus javenicus*, *Rhizopus delegar*, *Rhizopus delemar*), una *Penicillium* (*Penicillium roquefortii*, *Penicillium cambertii*, *Penicillium cyclopium*), una *Mucor* (*Mucor miehei* liofilizada o sobre soporte (Chirazyme L9), *Mucor javanicus*, *Mucor javenicus*), una *Candida* (*Candida antartica*, *Candida antartica* de tipo A liofilizada o sobre soporte (Chirazyme L5), *Candida antartica* de tipo B liofilizada o sobre soporte (Chirazyme L2), *Candida cylindraceae*, *Candida lypolytica*, *Candida rugosa*), una *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas species*), una *Alkaligenes* (*Alkaligenes sp.*), una *Humicola* (*Humicola lanuginosa*, lipasa de *Humicola sp.*), una *Geotrichum* (*Geotrichum candidum*), un páncreas (páncreas de cerdo, páncreas porcino), una *Achromobacter* (*Achromobacter sp.*), una *Thermomyces* (*Thermomyces lanuginose*) o una *Burkholderia* (*Burkholderia cepacia*).

30 Entre las demás lipasas, se pueden citar igualmente a modo indicativo, pero no limitativo, una lipasa F14, una lipasa F10, una lipasa F12, una lipasa A1, una lipasa F7, una lipasa F13, una lipasa F8, una lipasa F2, una lipasa F3, una Amano 6, una lipasa AP15, una lipasa F, una Amano 50, una lipasa G, una lipasa F4, una lipasa F6, una lipasa B1, una lipasa PS-D1, una lipasa PS-C2, una lipasa 1, una lipasa 1, una lipasa 2, una lipasa 4 Euroform, una lipasa 4, una lipasa 6, una lipasa 7, una lipasa 10, una lipasa 11, una lipasa 12, una lipasa 13, una lipasa 14, una lipasa 15, una lipasa 18, una lipasa 20, una lipasa PGE, una Ap-6 y una lipolasa.

Estas enzimas están comercialmente disponibles en compañías tales como Sygma, Amano, Europa, Biocatalysts, Boehringer, Novo-nordisk, Biotal, Enzymatix, Fluka, Genecore, Novorymes etc...

45 A modo de ejemplo, pero no limitativo, se puede utilizar según otra variante más de realización una enzima comercial y ensayada en el procedimiento de la invención, la de *Candida cylindracea* inmovilizada (Sigma), la de *Candida antartica* B inmovilizada o la Novozyme 435 (Novozymes), la de *Mucor miehei* inmovilizada (Fluka), la de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada o la PSD1 (Amano), la de *Pseudomonas menodicina* o la Lumafast (Genecore), la de *Humicola lanuginosa* o la lipolasa, la de *Aspergillus niger* o la AP6 (Amano), la de *Penicillium camembertii* o la lipasa G (Amano), la de germen de trigo (Fluka) o la de *Rhizopus niveus*.

Preferiblemente, la enzima elegida es una lipasa tal como particularmente una enzima obtenida a partir de *Candida*

antartica de tipo B, por ejemplo la Novozyme 435 comercialmente disponible en la compañía Novozymes.

Según otro modo de realización de la invención, la relación de cantidad de enzima utilizada y cantidad de sustrato/producto en peso/peso (la relación E/S) está comprendida entre 1/10.000 y 20/100, preferiblemente entre 1/1000 y 5/100.

- 5 Según otro modo de realización más de la invención, la concentración de enzima puede estar comprendida entre 1 g/l y 10 g/l.

Según una variante de realización particular, la duración de la incubación de la enzima está comprendida entre 10 minutos y 4 días, preferiblemente está comprendida entre 0,5 y 24 h.

- 10 Según otra variante de realización particular más, el codisolvente orgánico eventualmente utilizado, solo o en mezcla, puede ser, a modo de ejemplo, pero no limitativo, un sulfóxido como dimetilsulfóxido (DMSO), un nitrilo como acetonitrilo, un alcohol como etanol, *terc*-butanol, isopropanol (IPA), una amida como dimetilformamida (DMF), un éter como éter etílico, un hidrocarburo como hexano o un compuesto aromático como tolueno.

La concentración de codisolvente puede estar comprendida entre 0,1% y 30%.

- 15 Una vez eliminada en el tratamiento de la reacción, la enzima puede reutilizarse de nuevo en el procedimiento de la invención.

Más genéricamente, el número de ciclos de utilización de la enzima puede estar entre 1 y 5, preferiblemente entre 1 y 3.

Definiciones

Las definiciones siguientes son aplicables a la descripción y las reivindicaciones de la invención.

- 20 Para facilitar la comprensión, la nomenclatura de los grupos, reactivos, disolventes o productos es la nomenclatura internacional o la nomenclatura utilizada comúnmente por el especialista en la materia.

El término alquilo significa una cadena alquilo lineal o ramificada constituida por 1 a 10 átomos de carbono.

El término alcóxido significa un grupo alquilo lineal o ramificado constituido por 1 a 10 átomos de carbono.

El término metal alcalino significa un átomo de sodio o potasio.

- 25 En los ejemplos, los porcentajes se dan en peso, la temperatura está en grados Celsius y la presión es la presión atmosférica, salvo que se indique lo contrario.

Para facilitar la comprensión, la nomenclatura de los productos utilizada es la nomenclatura internacional utilizada por el especialista en la materia.

Ejemplo 1 de la invención: Preparación de éster etílico del ácido 4-carboximetil-2-etoxibenzoico

- 30 Compuesto de fórmula (I) en la que R es un grupo etilo.

Enzima lipasa: Novozym 435

Solución tampón: solución acuosa de fosfato de potasio 0,2 M y pH 7,2.

La cantidad de enzima utilizada es de 10 mg.

Se realiza la reacción en un matraz de vidrio de 4 ml cerrado herméticamente a un tamaño de 1 ml.

- 35 Se fija el volumen de reacción a 1 ml adaptando el volumen de solución tampón con relación a la cantidad de materia prima utilizada.

Se efectúa la reacción a 45°C.

Ejemplo 1 a): 50 mg de diéster (concentración 50 g/l).

Después de 1 h y 50 min de reacción, se obtiene una tasa de conversión de un 100%.

- 40

Ejemplo 1 b): 100 mg de diéster (concentración 100 g/l).

Después de 2 h y 50 min de reacción, se obtiene una tasa de conversión de un 100%.

Ejemplo 1 c): 200 mg de diéster (concentración 200 g/l).

Después de 3 h y 50 min de reacción, se obtiene una tasa de conversión de un 80%.

Ejemplo 2 de la invención: Preparación de éster etílico del ácido 4-carboximetil-2-etoxibenzoico:

5 Compuesto de fórmula (I) en la que R es un grupo etilo.

Enzima: Novozymes 435

Solución tampón: solución acuosa de fosfato de potasio 0,1 M y pH 7,2.

Control del pH: solución acuosa de NaOH 2,5 M.

10 Se realiza la reacción en un matraz de vidrio de 100 ml cerrado herméticamente. Se añaden 3,86 g (13,8 mmol) de diéster en un volumen de tampón fosfato de 10 ml y 0,2 g de enzima.

Se calienta el medio a una temperatura de 45°C.

Se mantiene el valor de pH a 7,2 mediante adiciones regulares de una solución de sosa.

Después de 1 h y 35 min de reacción, la tasa de conversión es de un 100%.

15 Se elimina la enzima del medio por filtración. Se lava la torta con agua caliente. Se reúnen los filtrados y se acidifican con una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 20% hasta la obtención de un valor de pH de 3,5.

Se pone en agitación el medio, se enfría después con un baño de hielo durante 1 h. Se filtra el precipitado formado y después se seca a una temperatura de 45°C hasta la obtención de un peso constante.

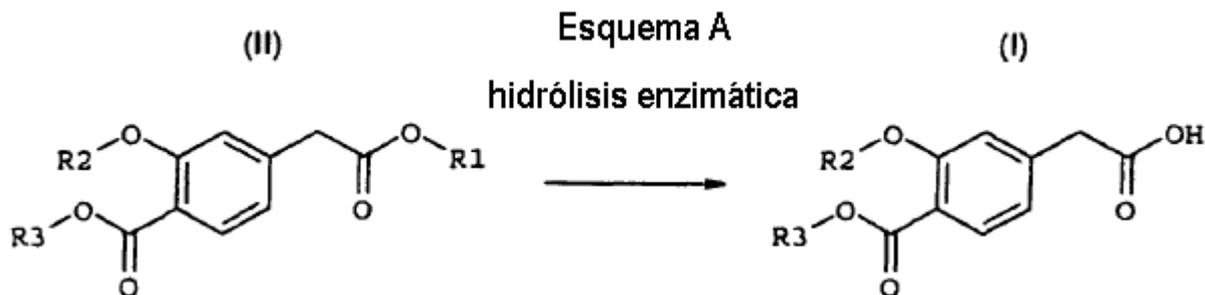
El producto obtenido es un sólido blanco.

Rendimiento: cuantitativo.

20 Pureza: 99,3%.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de síntesis del compuesto de fórmula (I) según el esquema A anterior,



- 5 en las que R1, R2, R3, idénticos o diferentes, representan individual e independientemente un grupo alquilo, **caracterizado por** una reacción de hidrólisis enzimática que comprende la puesta en contacto del compuesto de fórmula (II) con una lipasa, para obtener el compuesto de fórmula (I).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la reacción de hidrólisis se efectúa en una solución a pH controlado, particularmente por el empleo de una solución tampón, en presencia o ausencia de un codisolvente orgánico.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** la lipasa utilizada está presente en forma de sólido, en solución, en suspensión o también en forma inmovilizada sobre un soporte inerte.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la lipasa seleccionada puede utilizarse directamente en la forma comercializada o después de purificación.
- 15 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** está controlado durante la reacción el valor del pH de tal manera que la actividad de la lipasa no se vea afectada por este valor de pH, particularmente este valor de pH se mantiene durante la reacción entre 6 y 8.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el número de ciclos de utilización de la lipasa está comprendido entre 1 y 5.
- 20 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la relación de cantidad de lipasa utilizada y cantidad de sustrato en valores de peso/peso (relación E/S) está comprendida entre 1/10.000 y 20/100, preferencial 1/1000 y 5/100.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la concentración inicial del producto de partida está comprendida entre 1 kg/l y 50 g/l.
- 25 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la hidrólisis enzimática se realiza a una temperatura comprendida entre 10 y 70°C.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** se efectúa el control del pH del medio de reacción mediante la adición de una base fuerte, especialmente un hidróxido o alcoholato de metal alcalino.
- 30 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por** la ausencia de un codisolvente orgánico.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** cada grupo R1, R2 y R3 es simultáneamente un etilo.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** la lipasa utilizada se obtiene a partir de *Candida antarctica* de tipo B.
- 35 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 13, **caracterizado porque** la solución tampón es una solución acuosa basada en fosfato, carbonato o sulfato de un valor de pH comprendido entre 6 y 8, especialmente una solución acuosa basada en fosfato de potasio.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado porque** el valor inicial del pH de la solución tampón es de aproximadamente 7,2.
16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 13, **caracterizado porque** el control del pH se efectúa mediante la adición de una solución acuosa de una base fuerte, particularmente sosa.
- 5 17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado porque** la temperatura de reacción es preferiblemente aproximadamente 45°C.
18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado porque** la concentración inicial del producto de partida de fórmula (II) es aproximadamente 400 g/l.
- 10 19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado porque** la cantidad de lipasa está comprendida entre 1 g/l y 10 g/l.
20. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado porque** el compuesto de fórmula (I) es utilizado como intermedio de síntesis para la preparación de repaglinida.