

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 226**

51 Int. Cl.:

C12P 41/00 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

C07C 62/34 (2006.01)

C07C 51/08 (2006.01)

C07D 223/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2014 E 14156910 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2772547**

54 Título: **Procedimiento de síntesis enzimática del ácido (7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carboxílico y su utilización en la síntesis enzimática de ivabradina y sus sales**

30 Prioridad:

28.02.2013 FR 1351785

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

26.10.2015

73 Titular/es:

**LES LABORATOIRES SERVIER (100.0%)
35, rue de Verdun
92284 Suresnes Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**PEDRAGOSA MOREAU, SANDRINE y
LEFOULON, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

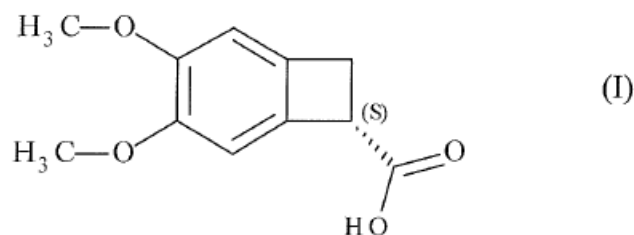
ES 2 549 226 T3

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).

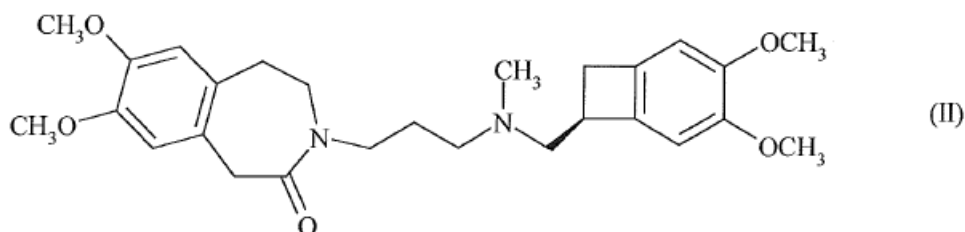
DESCRIPCIÓN

Procedimiento de síntesis enzimática del ácido (7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carboxílico y su utilización en la síntesis enzimática de ivabradina y sus sales.

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis enzimática del compuesto de fórmula (I):



y a su utilización en la síntesis de ivabradina, de fórmula (II):



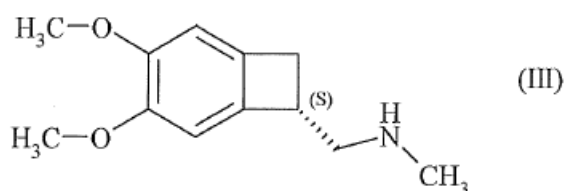
- 10 o 3-{3-[[[(7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il]metil](metil)amino]-propil}-7,8-dimetoxi-1,3,4,5-tetrahidro-2H-3-benzazepin-2-ona,

de sus sales de adición de un ácido farmacéuticamente aceptable y de sus hidratos.

- 15 La ivabradina y sus sales de adición de un ácido farmacéuticamente aceptable, y más particularmente su clorhidrato, poseen propiedades farmacológicas y terapéuticas muy interesantes, en particular propiedades bradicardizantes, que hacen que estos compuestos sean útiles en el tratamiento o la prevención de diferentes situaciones clínicas de isquemia de miocardio, tales como angina de pecho, infarto de miocardio y trastornos del ritmo asociados, y también de diferentes patologías que implican trastornos del ritmo, en particular supraventricular, y de la insuficiencia cardíaca.

- 20 En la patente europea EP 0 534 859 se describe la preparación y utilización en terapéutica de la ivabradina y sus sales de adición de un ácido farmacéuticamente aceptable, y en particular de su clorhidrato.

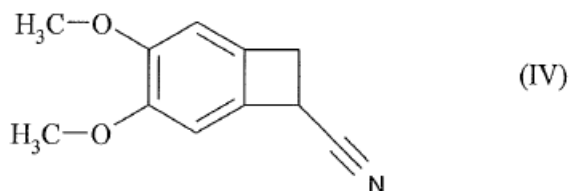
Dicha patente describe la síntesis de clorhidrato de ivabradina a partir del compuesto de fórmula (III), (7S)-1-(3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il)-N-metil-metanoamina:



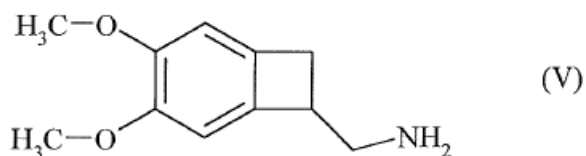
- 25 El compuesto de fórmula (III) es un producto intermedio clave en la síntesis de ivabradina y de sus sales farmacéuticamente aceptables.

El estado anterior de la técnica divulga varios métodos de obtención del compuesto de fórmula (III).

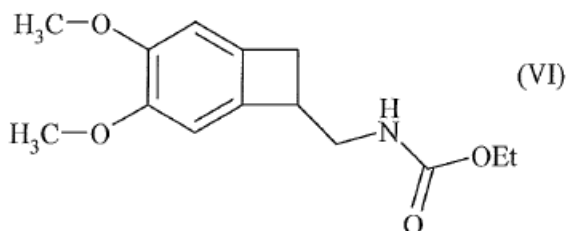
La patente EP 0 534 859 describe la síntesis del compuesto de fórmula (III) por reducción del nitrilo de fórmula (IV):



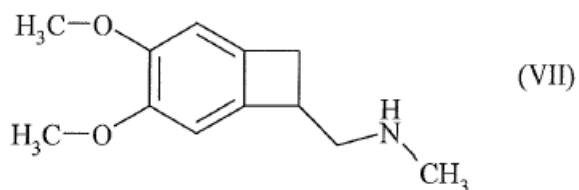
5 con BH_3 en tetrahidrofurano,
seguida de adición de ácido clorhídrico, para obtener el clorhidrato de la amina racémica de fórmula (V):



10 que se somete a reacción con cloroformiato de etilo para obtener el carbamato de fórmula (VI):



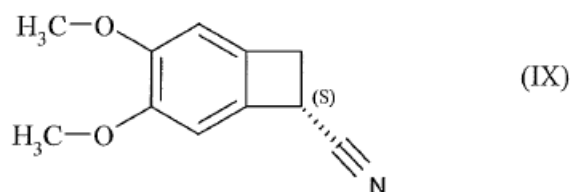
cuya reducción con LiAlH_4 conduce a la amina metilada racémica de fórmula (VII):



15 cuyo desdoblamiento con ayuda de ácido canforsulfónico conduce al compuesto de fórmula (III). Este método tiene el inconveniente de que sólo conduce al compuesto de fórmula (III) con un rendimiento muy bajo, del 2 al 3%, a partir del nitrilo racémico de fórmula (IV).

Este bajísimo rendimiento se debe al bajo rendimiento (del 4 al 5%) de la etapa de desdoblamiento de la amina secundaria de fórmula (VII).

20 La patente EP 2 166 004 describe la obtención del compuesto de fórmula (III) por resolución óptica del nitrilo racémico de fórmula (IV) mediante cromatografía quiral, para obtener el nitrilo ópticamente puro de fórmula (IX):



que se reduce con NaBH_4 o mediante hidrogenación catalítica para obtener la amina primaria de fórmula (VIII).

5 La amina primaria se puede metilar a continuación por la misma secuencia de reacción indicada más arriba (transformación en carbamato y luego reducción).

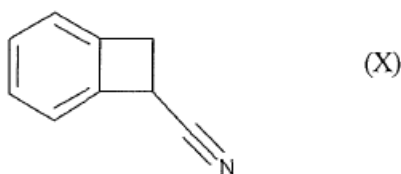
El compuesto de fórmula (III) se puede obtener de este modo en 5 etapas a partir del nitrilo racémico de fórmula (IV), con un rendimiento del 45,6% en la etapa de desdoblamiento.

10 La patente WO2011138625 describe un procedimiento de preparación de ivabradina donde el producto intermedio de fórmula (I) se obtiene por hidrólisis química del nitrilo racémico de fórmula (IV), seguida de desdoblamiento con ayuda de una base quiral.

La patente DE10010149 describe un procedimiento de hidrólisis enantioselectiva de nitrilos para obtener los ácidos carboxílicos correspondientes con ayuda de una nitrilasa del microorganismo *Rhodococcus rhodocrous* NCIMB 11216.

15 La utilización de enzimas hidrolíticas nitrilasas (EC 3.5.5.1 en la clasificación internacional de enzimas) parecía interesante para permitir la obtención directa del ácido ópticamente puro de fórmula (I) a partir del nitrilo racémico de fórmula (IV) y reducir así el número de etapas para la obtención de la amina metilada de fórmula (III) a partir del nitrilo racémico.

El nitrilo de fórmula (X) ha sido descrito como sustrato de nitrilasas del *kit* de selección NESK-1400 comercializado por la sociedad Almac:



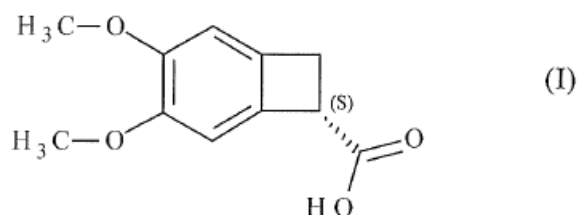
20 Sin embargo, el uso de estas mismas nitrilasas en el nitrilo de fórmula (IV) (véase el ejemplo comparativo A) ha demostrado una actividad débil y poco selectiva de éstas, conduciendo, en la mayoría de los casos, a la formación simultánea de amida (actividad de nitrilo hidratasa) y ácido, difícilmente aprovechable con fines de síntesis para la obtención de productos intermedios en la síntesis del compuesto de fórmula (III).

Por tanto, el problema de la presente invención consistía en encontrar una nitrilasa que permitiera la síntesis enantioselectiva del ácido ópticamente puro de fórmula (I) a partir del nitrilo racémico de fórmula (IV) reduciendo al mínimo la formación de amida.

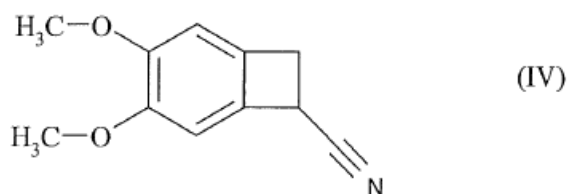
30 La solicitante ha estudiado ahora la actividad nitrilasa de determinados microorganismos enteros a favor de la formación del ácido de fórmula (I), de configuración S. De los microorganismos analizados, únicamente el *Rhodococcus rhodocrous* ha permitido obtener el ácido (S) con una buenísima enantioselectividad, sin formación de amida (véase el ejemplo comparativo B). Esta actividad ha sido mejorada por la sobreexpresión de la nitrilasa.

35 Sorprendentemente, la hidrólisis enzimática con esta nitrilasa sobreexpresada no es enantioselectiva en el sustrato de fórmula (X) (véase el ejemplo comparativo C).

Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis del compuesto de fórmula (I) ópticamente puro:



5 por hidrólisis enzimática enantioselectiva del nitrilo racémico o no ópticamente puro de fórmula (IV):



con ayuda de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodocrous* NCIMB 11216 sobreexpresada en otro organismo que posee un sistema biológico competente, como una bacteria, una levadura o un hongo,

10 en una mezcla de un disolvente orgánico y una solución acuosa, a un pH de 5 a 10, preferentemente en un tampón con un pH de 5 a 10,

en una concentración de 1 a 500 g/l, preferentemente de 2 g a 100 g del nitrilo de fórmula (IV) por litro de mezcla de disolventes,

en una relación E/S de 1/1 1/100,

15 a una temperatura de 25°C a 40°C.

Según un aspecto de la invención, la nitrilasa se sobreexpresa en una bacteria que contiene un plásmido reorganizado, como *Escherichia coli*, preferentemente *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pLysS, *E. coli* BL21star(DE3) o *E. coli* JM9(DE3).

20 Según un aspecto de la invención, el disolvente orgánico es un disolvente total o parcialmente miscible en agua, como sulfóxido de dimetilo, DMF, acetona, acetonitrilo, un alcohol como etanol o isopropanol, un éter como THF o MTBE.

Según otro aspecto de la invención, el disolvente orgánico no es miscible con agua, por ejemplo un hidrocarburo como heptano u octano.

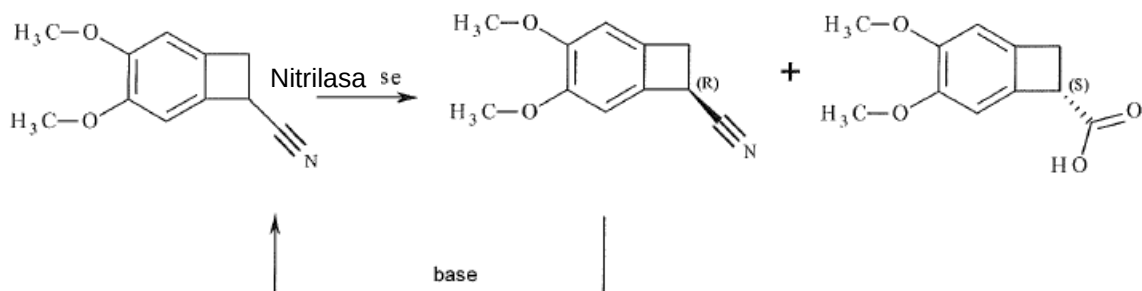
25 La solución acuosa preferentemente es una solución tampón con un pH de aproximadamente 7.

Según un aspecto de la invención, las bacterias que sobreexpresan la nitrilasa se utilizan directamente en el procedimiento en forma de residuo bacteriano o de liofilizado.

La relación E/S oscila preferentemente de 1/1 a 1/10 en el caso de un residuo bacteriano y de 1/10 a 1/20 en el caso de un liofilizado.

30 Según otro aspecto de la invención, la nitrilasa se utiliza en forma de enzima purificada.

El esquema de hidrólisis enzimática según la invención es el siguiente:



Ventajosamente, el nitrilo de configuración (R), producto secundario de la reacción, se racemiza por acción de una base orgánica tal como DBU o de una base inorgánica tal como sosa, potasa, carbonato de potasio o carbonato de sodio, para reciclarlo en el proceso de hidrólisis enzimática.

Cuando la etapa de racemización se lleva a cabo *in situ*, el procedimiento según la invención es un procedimiento de desdoblamiento cinético dinámico (DKR) que permite obtener el ácido S de fórmula (I) con un ee superior al 98%.

Preferentemente, el ácido de fórmula (I) se aísla del medio de reacción después de uno o varios ciclos de hidrólisis enzimática.

Definiciones

Por compuesto ópticamente puro se entiende un compuesto cuyo exceso enantiomérico es superior o igual al 90%.

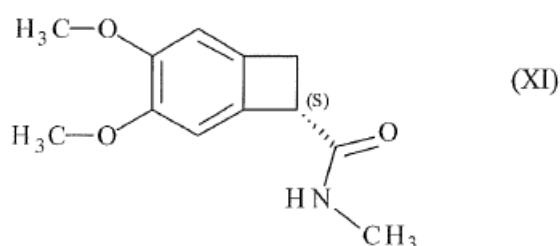
Por nitrilo no ópticamente puro se entiende un nitrilo cuyo exceso enantiomérico es inferior al 90%.

Por nitrilo racémico se entiende un nitrilo en forma de una mezcla de dos enantiómeros en una relación de 55:45 a 45:55.

Por hidrólisis enantioselectiva de un nitrilo racémico o no ópticamente puro se entiende la hidrólisis preferente de uno de los enantiómeros de la mezcla.

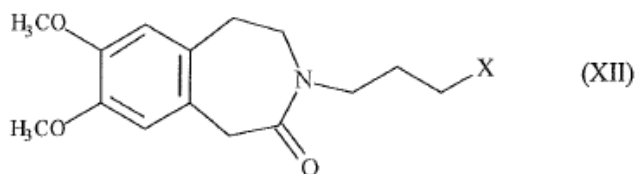
Por sistema biológico competente se entienden una o más especies (células huésped) biológicas cuyo material genético ha sido modificado por recombinación genética de forma que las vuelve capaces de producir una proteína recombinante de interés. Un vector de expresión (plásmido) construido con este fin permite la transferencia del ADN que codifica el gen de interés en la célula huésped, que así puede (sobre)expresar de forma eficiente la proteína funcional.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de síntesis del compuesto de fórmula (III) en solamente dos etapas a partir del ácido ópticamente puro de fórmula (I), que se transforma en la amida ópticamente pura de fórmula (XI):



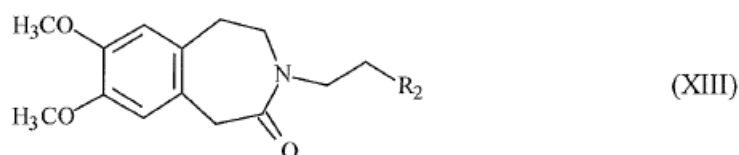
cuya reducción, preferentemente con BH_3 , NaBH_4 o LiAlH_4 , conduce al compuesto de fórmula (III).

A continuación, el compuesto de fórmula (III) bien se acopla con un compuesto de fórmula (XII):



donde X representa un átomo de halógeno, preferentemente un átomo de yodo,

que se somete a una reacción de aminación reductora con un compuesto de fórmula (XIII) en presencia de un agente reductor:



donde R_2 representa un grupo seleccionado entre CHO y CHR_3R_4 ,

donde R_3 y R_4 representan en cada caso un grupo alcoxi (C_1-C_6) lineal o ramificado, o forman, junto con el átomo de carbono que los porta, un ciclo 1,3-dioxano, 1,3-dioxolano o 1,3-dioxepano,

para obtener ivabradina, que a continuación se transforma en una sal de adición de un ácido farmacéuticamente aceptable, estando dicha sal en forma anhidra o hidratada.

El compuesto de fórmula (III) también se puede incorporar en la reacción de aminación reductora en forma de su sal de adición de un ácido farmacéuticamente aceptable, preferentemente de su clorhidrato. En este caso, la ivabradina se obtiene directamente en forma de clorhidrato.

Entre los ácidos farmacéuticamente aceptables se pueden mencionar, de forma no limitativa, los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, trifluoroacético, láctico, pirúvico, malónico, succínico, glutárico, fumárico, tartárico, maleico, cítrico, ascórbico, oxálico, metanosulfónico, bencenosulfónico y canfórico.

Entre los agentes reductores a utilizar para la reacción de aminación reductora entre el compuesto de fórmula (III) y el compuesto de fórmula (XIII) se pueden mencionar, de forma no limitativa, compuestos donadores de hidruro, como triacetoxiborohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio, y dihidrógeno en presencia de un catalizador tal como paladio, platino, níquel, rutenio, rodio o uno de sus derivados, en particular en forma soportada o en forma de óxidos.

El agente reductor preferente para la reacción de aminación reductora entre el compuesto de fórmula (III) y el compuesto de fórmula (XIII) es dihidrógeno catalizado por paladio sobre carbono.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Abreviaturas

ATFA	ácido trifluoroacético
CCF	cromatografía de capa fina
DBU	diazabicycloundeceno

	DKR	dynamic kinetic resolution (desdoblamiento cinético dinámico)
	DMF	dimetilformamida
	DMSO	sulfóxido de dimetilo
	DO	densidad óptica
5	E	coeficiente de enantioselectividad
	ee	exceso enantiomérico
	eq	equivalente molar
	HPLC	high performance liquid chromatography (cromatografía en fase líquida de alto rendimiento)
10	IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
	LB	medio de cultivo Lysogeny Broth
	MeOH	metanol
	MTBE	metil terc-butil éter
	po	pureza óptica o enantiomérica
15	relación E/S	relación enzima/sustrato, expresada en g/g
	RMN	(espectroscopia) resonancia magnética nuclear
	SM	espectrometría de masas
	THF	tetrahidrofurano
	TMS	tetrametilsilano

20 **Ejemplo 1: ácido (7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carboxílico**

Sobreexpresión de la nitrilasa:

La proteína nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 está descrita en las bases de datos proteicos y genómicos. La secuencia del gen investigado está catalogada bajo el identificador SVA (Sequence Version Archive) «EF467367» en el ENA (European Nucleotide Archive) del EMBL-Bank. Esta secuencia corresponde a la referencia «A4LA85» de la base de datos UniProtKB/TrEMBL.

Aquí se ha utilizado la cepa de producción *E. coli* BL21(DE3), transformada con el vector de expresión pET28a-Nit1.

El protocolo de sobreexpresión de la nitrilasa se describe en Applied Biochemistry and Biotechnology 2010, Vol 160(2), pp 393-400.

Las células así transformadas se utilizan bien directamente en forma de residuo bacteriano, bien liofilizadas antes de su uso.

Hidrólisis enzimática con nitrilasa sobreexpresada

Las células transformadas según el procedimiento indicado más arriba se someten a agitación en una concentración de $5,6 \cdot 10^9$ células/ml (1 ml de cultivo con una DO = 1 (600 nm) corresponde a $1 \cdot 10^9$ bacterias y aproximadamente 10 mg de residuo bacteriano o 1,5 mg de liofilizado).

A una solución de 250 ml de tampón fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1/15M con pH 7 se añade 1 g de liofilizado de *E. coli* y 500 mg ($c = 2 \text{ g/l}$, 10 mM) de 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carbonitrilo al 2% en DMSO (5 ml). El medio de reacción se mantiene a 30°C bajo agitación rotativa a 220 r.p.m. durante 6 horas.

- 5 La reacción se controla mediante HPLC en fase quiral en condiciones que permiten determinar el exceso enantiomérico del ácido y del nitrilo:

Columna chiralpak IB

90% n-hexano 10% 2-PrOH + 0,1% de ATFA

1 ml/min 30°C 288 nm

	% nitrilo	ee (nitrilo)	% ácido	ee (ácido)	conversión	E
6 h	49,9	94	50,1	97	0,49	> 100
* coeficiente de enantioselectividad $E = \ln[1-c(1+ee(\text{ácido}))] / \ln[1-c(1-ee(\text{ácido}))]$						

10

El cromatograma de HPLC en fase quiral después de 6 horas se muestra en la Figura 1.

- Después de 6 horas de reacción, el medio de reacción se acidifica con HCl 1M para obtener un pH muy ácido (pH 2) y después se extrae con 2 x 100 ml de diclorometano. La fase orgánica se retira. Una segunda extracción con tolueno (2 x 100 ml) permite recuperar todo el producto que queda en la fase acuosa. Las fases orgánicas se lavan con una disolución de NaCl saturada y después se secan con sulfato de magnesio anhidro. Tras la evaporación de los disolventes se obtiene el compuesto bruto, que se purifica por cromatografía flash en columna de sílice en las siguientes condiciones:

Tipo de columna: 80 g SiOH Macherey-Nagel

20 *Material y método: Reveleris®*

Eluyente: Isocrático (ciclohexano + 1% de ácido acético/acetato de etilo + 1% de ácido acético 75/25)

Detección: UV 288 nm

Caudal: 60 ml/min

25 Resultado:

Nitrilo (R): rendimiento 36% (179 mg), ee (R): 96%

Ácido (S): rendimiento 39% (246 mg), ee (S) 96%

Ejemplo 2: 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carbonitrilo por racemización del nitrilo (R)

- 30 En un matraz provisto de refrigerante y agitación magnética se cargan 100 mg de (R)-(3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il)nitrilo (0,53 mmol), 5 ml de isopropanol y 121 mg de DBU (1,5 eq.). La mezcla se calienta durante 2 horas a 65°C y después se deja volver a temperatura ambiente. Luego se filtra para obtener el compuesto indicado en el título.

Ejemplo 3: (7S)-3,4-dimetoxi-N-metilbiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carboxamida

- 35 El ácido (7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0] octa-1,3,5-trieno-7-carboxílico obtenido en el ejemplo 1 (300 mg) se suspende en THF (3 ml) a temperatura ambiente y se añade trietilamina (200 µl).

Después se añade lentamente cloroformiato de etilo (150 µl) al medio. El medio de reacción precipita (medio I).

En otro matraz, se agita metilamina en solución 2M en THF (2,25 ml) con agua (1 ml) y trietilamina (300 µl). La agitación se mantiene durante 20 minutos y a continuación este medio se añade al medio I y se deja bajo agitación a temperatura ambiente durante una noche.

A continuación, la mezcla de reacción se evapora y se purifica mediante HPLC preparativa.

De este modo se obtiene (7S)-3,4-dimetoxi-N-metilbiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carboxamida con un rendimiento de un 60%.

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

Ejemplo 4: (7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il]-N-metil-metanoamina

La (7S)-3,4-dimetoxi-N-metilbiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carboxamida obtenida en el Ejemplo 3 (450 mg) se suspende en tetrahidrofurano (20 ml) y después se añade lentamente al medio de reacción 1,6 ml de una solución de LiAlH₄ 2M en tetrahidrofurano a temperatura ambiente. Se observa un fuerte desprendimiento de gas y el medio de reacción se vuelve transparente. El medio de reacción se calienta a reflujo durante 30 minutos.

Después de volver a temperatura ambiente, se hidroliza y luego se extrae con acetato de etilo. Se seca mediante MgSO₄ y se evapora. El residuo obtenido se purifica por HPLC preparativa (eluyente: agua/acetronitrilo/ácido trifluoroacético 98/2/0,2 a 20/80/0,2) en 30 minutos para obtener el producto indicado en el título con un rendimiento de un 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).

Ejemplo 5: (7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il]-N-metil-metanoamina, clorhidrato

20 ml de una solución molar de BH₃ en tetrahidrofurano se añaden a temperatura ambiente a la mezcla de 2,2 g (10 mmol) de la (7S)-3,4-dimetoxi-N-metilbiciclo[4.2.0] octa-1,3,5-trieno-7-carboxamida obtenida en el Ejemplo 3 en 45 ml de tetrahidrofurano. Después de 1 hora bajo agitación se añaden 10 ml de BH₃ en tetrahidrofurano. Después de una noche de agitación a temperatura ambiente se añaden gota a gota 20 ml de etanol y la mezcla se agita hasta que termina el desprendimiento de gas (aproximadamente 1 hora). A continuación se añaden gota a gota 20 ml de una solución de ácido clorhídrico en etanol. Después de 4 horas bajo agitación, el precipitado obtenido (1,2 g del producto indicado en el título) se filtra. El filtrado se concentra y se obtienen 0,65 g adicionales del producto indicado en el título por concreción en una mezcla de acetato de etilo/etanol 80/20.

Los dos precipitados se reúnen para obtener 1,85 g del producto indicado en el título (rendimiento 77%).

Ejemplo 6: Clorhidrato de ivabradina

En un autoclave se cargan 5,5 kg de 3-[2-(1,3-dioxolan-2-il)etil]-7,8-dimetoxi-1,3-dihidro-2H-3-benzazepin-2-ona, 27,5 l de etanol y 550 g de paladio sobre carbono.

Luego se purga con nitrógeno y después con hidrógeno, se calienta a 55°C y se hidrogena a esta temperatura bajo una presión de 5 bar hasta la absorción de la cantidad teórica de hidrógeno.

A continuación, la mezcla se lleva de vuelta a temperatura ambiente y se descomprime el autoclave.

Acto seguido se añaden 4 kg del clorhidrato de (7S)-3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7-il]-N-metilmetanoamina, 11 l de etanol, 5,5 l de agua y 1 kg de paladio sobre carbono. Luego se purga con nitrógeno y después con hidrógeno, se calienta a 85°C y se hidrogena a esta temperatura bajo una presión de 30 bar hasta la absorción de la cantidad teórica de hidrógeno.

- 5 A continuación se lleva de vuelta a temperatura ambiente, se purga el autoclave, se filtra la mezcla de reacción, se destilan los disolventes y se aísla el clorhidrato de ivabradina por cristalización en una mezcla tolueno/1-metil-2-pirrolidinona.

De este modo se obtiene el clorhidrato de ivabradina con un rendimiento de un 85% y una pureza química superior al 99 %.

10 **Ejemplo comparativo A: Cribado de nitrilasas comerciales para la hidrólisis enzimática de 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carbonitrilo**

En un tubo se pesa la nitrilasa estudiada en forma de liofilizado (15 mg) y después se añaden 4 ml de tampón KH_2PO_4 0,1M pH = 7 y 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0] octa-1,3,5-trieno-7-carbonitrilo (20 mg) solubilizado en 100 μl de DMSO. La mezcla se introduce en la incubadora a 28°C y 220 r.p.m.

La tasa de conversión se mide por HPLC al cabo de 24 h y 72 h.

Las nitrilasas NIT 101, NIT 102, NIT 103, NIT 104, NIT 105, NIT 106, NIT 108, NIT 109, NIT 111, NIT 112 y NIT 113 (Almac) no hidrolizan el nitrilo después de 24 h (no se forma ácido ni amida).

- 20 En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos con las nitrilasas NIT 107, NIT 110, NIT 114 y NIT 115 (Almac):

Nitrilasa	72 h		
	Amida	Ácido	Nitrilo
NIT 107	23%	16%	61%
NIT 110	24%	15%	61%
NIT 114	21%	22%	57%
NIT 115	7%	47%	46%

Condiciones analíticas:

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

- 25 *Del 0% al 100% de B en 8 min 0,8 ml/min 40°C*

A (1000 agua + 25 ACN + 1 ATFA)

B (1000 ACN + 25 agua + 1 ATFA)

La nitrilasa NIT 115 se utilizaposteriormente en otro ensayo para determinar si la hidrólisis del nitrilo es enantioselectiva.

- 30 La nitrilasa NIT 115 (12 mg; Almac) se utiliza en 6 ml [2 mg/ml] de tampón.

Se añade 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carbonitrilo hasta alcanzar una concentración final del mismo de 4 mg/ml.

La enantioselectividad se mide por HPLC aplicando las siguientes condiciones analíticas:

Columna chiralpak IC 250 4,6*

30% etanol absoluto + 0,1% ATFA + 70% heptano + 0,1% ATFA

1 ml/min 30°C 288 nm

5 *Observación:* en estas condiciones, los enantiómeros del ácido están separados, pero no los del nitrilo.

El cromatograma obtenido después de 5 h de reacción se muestra en la Figura 2.

Conclusión: no se observa ninguna enantioselectividad.

Ejemplo comparativo B: Cribado de nitrilasas de cepas bacterianas y fúngicas para la hidrólisis enzimática de 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carbonitrilo

10 Un estudio que emplea varios inductores bacterianos (propionitrilo, benzonitrilo, 4-bromobenzonitrilo) ha mostrado que el propionitrilo permite la mejor inducción de la actividad de nitrilasa con 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carbonitrilo.

15 Las cepas bacterianas se inducen con propionitrilo 72 mM durante 72 h, las células se recogen en 50 ml (concentrados 2 veces, conc. 10 mg/ml en células) de tampón fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1M pH = 7,3 y se añade 3,4-dimetoxibiciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carbonitrilo en una concentración 10 mM al 2% en DMSO v/v_{final} .

Las cepas fúngicas se inducen con valeronitrilo.

20 El conjunto de los medios de reacción se somete a agitación a 220 r.p.m./min a 30°C en el caso de las bacterias y a 27°C en el caso de los hongos y se sigue durante 96 horas mediante HPLC en fase inversa y mediante HPLC en fase quiral de acuerdo con los métodos descritos a continuación:

Análisis en fase inversa

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

Del 0% de B al 100% de B en 8 min 0,8 ml/min 40°C

25 *A (1000 agua + 25 ACN + 1 ATFA)*

B (1000 ACN + 25 agua + 1 ATFA)

Análisis en fase quiral

*Columna chiralpak IC 250*4,6*

30% etanol absoluto + 0,1% ATFA + 70% heptano + 0,1% ATFA

30 *1 ml/min 30°C 288 nm*

Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

MICROORGANISMOS	% compuestos formados después de 96 h		
	Nitrilo residual	Amida	Ácido
Rhodococcus erythropolis NCIMB 11215	23	42	35 (S)
Rhodococcus rhodochrous NCIMB 11216	65	/	35 (S)
Rhodococcus rhodochrous NCIMB 11273	100	/	/
Rhodococcus rhodnii NCIMB 11279	100	/	/
Aspergillus niger BO	95	/	< 5
Aspergillus alliaceus NRRL 315	95	/	< 5
Cunninghamella elegans NRRL 1392	95	/	< 5
Rhizopus nigricans NRRL 1477	95	/	< 5
Absidia cylindrospora MMP 1569	95	/	< 5
Mortierella isabellina NRRL 1757	95	/	< 5
Mucor plumbeus ATCC 4740	95	/	< 5
Beauveria bassiana ATCC 7159	86	/	14
Stibella fimetaria CBS 548-84	100	/	/
Stibella fimetaria CBS 511-67	100	/	/
Stibella fimetaria CBS 294-81	100	/	/

Ejemplo comparativo C: Hidrólisis enzimática de biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carbonitrilo con nitrilasa de Rhodococcus rhodochrous NCIMB 11216 sobreexpresada

5 Escalonamiento en cajas de LB + agar + kanamicina, incubación en estático a 37°C durante 24 h (Cepa 11216 de nitrilasa de E. coli recombinante).

Precultivo en 5 ml de LB + kanamicina (50 mg/l), incubación a 37°C, 180 revoluciones/min durante una noche.

10 Cultivo: introducción de 50 ml de LB y 500 µl de precultivo en matraces Erlenmeyer sin pantalla de 250 ml, incubación a 28°C, 160 revoluciones/min hasta que la DO sea de 0,6 (es decir, aproximadamente 4 horas).

15 Inducción con IPTG (0,5 mM), incubación a 17°C, 160 revoluciones/min durante una noche (17 horas). Prueba de actividad: centrifugación de los cultivos a 4°C, 6.000 revoluciones/min durante 20 minutos, resuspensión del residuo en 10 ml de tampón fosfato 0,1M pH 7. Adición de biciclo[4.2.0]octa-1,3,5-trieno-7-carbonitrilo (10 mM) + 2% de etanol. Incubación a 220 revoluciones/min, 30°C.

Observación: si el cultivo es de más de 50 ml en el momento de la centrifugación, se toman 50 ml y después se realiza la prueba de actividad con un residuo de 50 ml de cultivo.

A continuación hidrólisis por cromatografía quiral: a 45 minutos y 2 horas.

Columna: Phenomenex®LUNA HST 50*3 C18(2) 2,5 µm

Eluyente: A + B (del 0% al 100% de B en 8 min)

A: 1000 agua + 25 ACN + 1 ATFA

B: 1000 ACN + 25 agua + 1 ATFA

5 0,8 m/min – 40°C - UV 210 nm

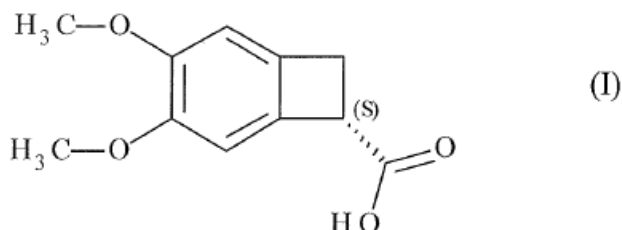
Resultados:

Tiempo	Nitrilo	Ácido carboxílico
45 minutos	50%	50%
2 horas	0%	100%

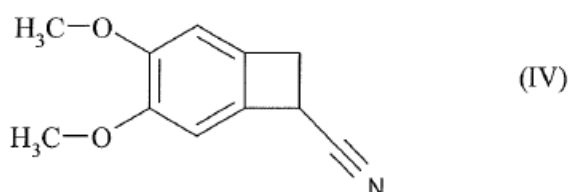
El seguimiento por cromatografía quiral muestra que la reacción no es enantioselectiva.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de síntesis del compuesto de fórmula (I) ópticamente puro:



por hidrólisis enzimática enantioselectiva del nitrilo racémico o no ópticamente puro de fórmula (IV):



5

con ayuda de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodocrous* NCIMB 11216 sobreexpresada en otro organismo que posee un sistema biológico competente,

en una mezcla de un disolvente orgánico y una solución acuosa con un pH de 5 a 10,

10

en una concentración de 1 a 500 g del nitrilo de fórmula (IV) por litro de mezcla de disolventes,

en una relación E/S de 1/1 1/100,

a una temperatura de 25°C a 40°C.

15

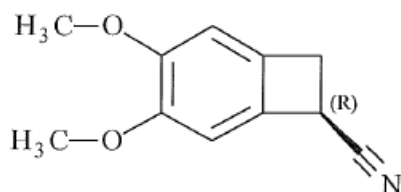
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el organismo que posee un sistema biológico competente es una bacteria que contiene un plásmido reorganizado.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque las bacterias que sobreexpresan la nitrilasa se utilizan directamente en forma de residuo bacteriano o de liofilizado.

20

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el disolvente orgánico se selecciona entre sulfóxido de dimetilo, DMF, acetona, acetonitrilo, etanol, isopropanol, THF y MTBE.

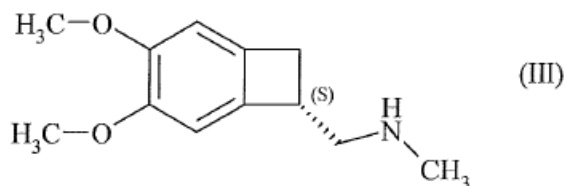
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el nitrilo de configuración (R), producto secundario de la reacción:



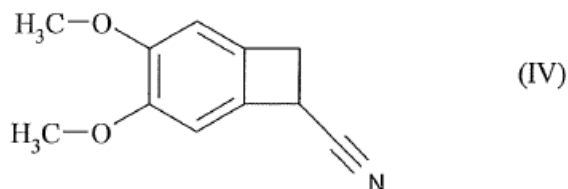
25

se racemiza mediante la acción de una base en el nitrilo racémico de fórmula (IV) para reciclarlo en el proceso de hidrólisis enzimática.

6. Procedimiento de síntesis según la reivindicación 5, caracterizado porque la base es DBU.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado porque la etapa de racemización se lleva a cabo *in situ*.
- 5 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque el ácido de fórmula (I) se aísla después de uno o varios ciclos de hidrólisis enzimática.
9. Procedimiento de síntesis del compuesto de fórmula (III):

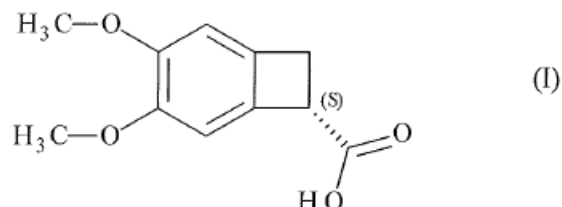


a partir del nitrilo de fórmula (IV):



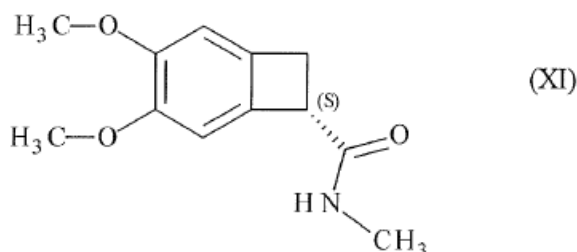
10

que se hidroliza en el ácido ópticamente puro de fórmula (I):



según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,

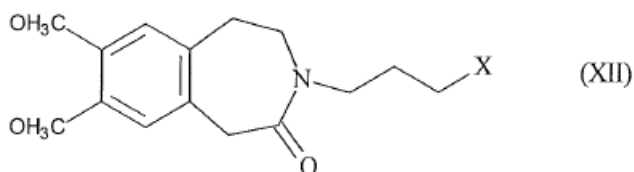
que a continuación se transforma en la amida ópticamente pura de fórmula (XI):



15

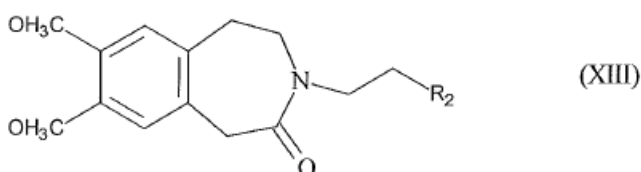
cuya reducción conduce al compuesto de fórmula (III).

10. Procedimiento de síntesis según la reivindicación 9, caracterizado porque la reducción del compuesto de fórmula (XI) en el compuesto de fórmula (III) se lleva a cabo con BH_3 , NaBH_4 o LiAlH_4 .
- 20 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, caracterizado porque a continuación el compuesto de fórmula (III) o bien se acopla con un compuesto de fórmula (XII):



donde X representa un átomo de halógeno,

o bien se somete a una reacción de aminación reductora con un compuesto de fórmula (XIII) en presencia de un agente reductor:



5

donde R_2 representa un grupo seleccionado entre CHO y CHR_3R_4 ,

donde R_3 y R_4 representan en cada caso un grupo alcoxi(C_1-C_6) lineal o ramificado, o forman, junto con el átomo de carbono que los porta, un ciclo 1,3-dioxano, 1,3-dioxolano o 1,3-dioxepano,

10 para obtener ivabradina, que a continuación se transforma en una sal de adición de un ácido farmacéuticamente aceptable en forma anhidra o hidratada.

12. Procedimiento de síntesis según la reivindicación 11, caracterizado porque X es un átomo de yodo.

15 **13.** Procedimiento de síntesis según la reivindicación 11, caracterizado porque el compuesto de fórmula (III) se incorpora en la reacción de aminación reductora en forma de su clorhidrato para obtener la ivabradina en forma de clorhidrato.

14. Procedimiento de síntesis según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 13, caracterizado porque la reacción de aminación reductora con el compuesto de fórmula (XIII) se lleva a cabo en presencia de hidrógeno catalizado con paladio sobre carbono.

sobrenadante para extracción (214,1)
adquirido el lunes, 1 de julio de 2013

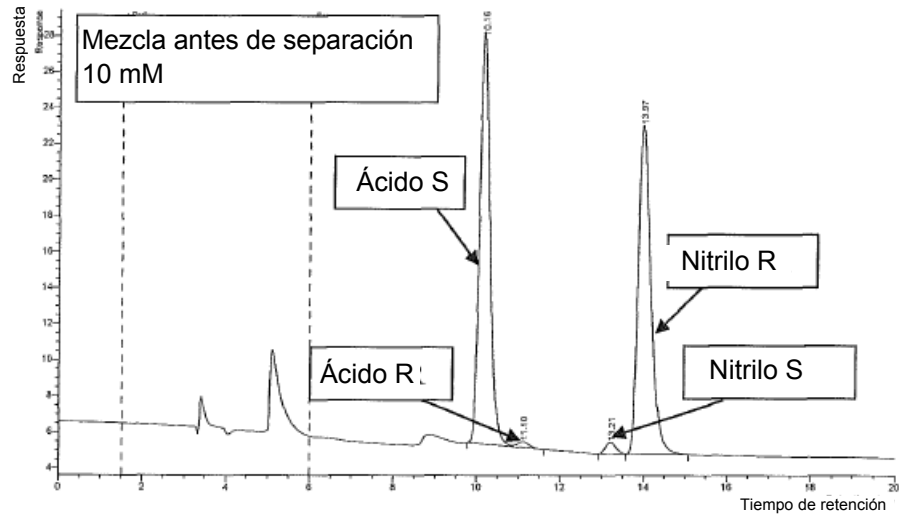
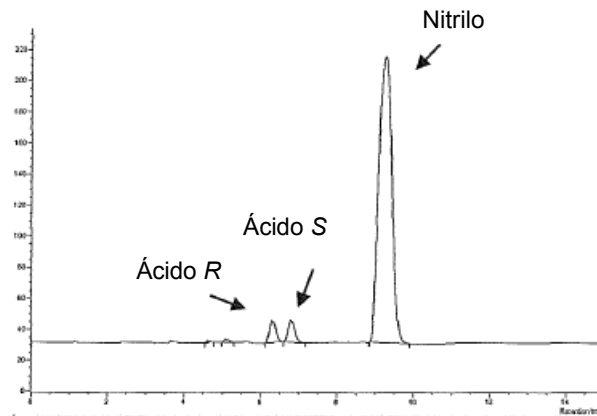


Figura 1 - Hidrólisis enzimática del nitrilo con la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* sobreexpresado - cromatograma HPLC después de 6 h



**Figura 2 - Hidrólisis enzimática del nitrilo con NIT 115
cromatograma HPLC después de 5 h**