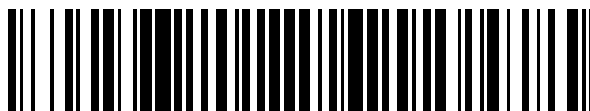


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 266**

51 Int. Cl.:

C07D 311/58 (2006.01)

C12P 17/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11815574 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2646426**

54 Título: **Proceso para la preparación de nebevoloI**

30 Prioridad:

30.11.2010 IT RM20100622

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2015

73 Titular/es:

**MENARINI INTERNATIONAL OPERATIONS
LUXEMBOURG S.A. (100.0%)
1, Avenue de la Gare
1611 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**MAURO, SANDRO;
FATTORI, DANIELA;
D'ANDREA, PIERO y
CIPOLLONE, AMALIA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 553 266 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).

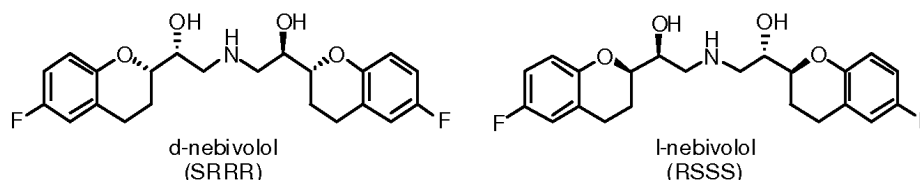
DESCRIPCIÓN

Proceso para la preparación de nebivolol

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un nuevo proceso para la síntesis de Nebivolol.

10 El Nebivolol es una mezcla racémica de los dos enantiómeros [2S[2R[R[R]]]] α,α' -[imino-bis(metilen)]bis[6-fluorocromano-2-metanol] y [2R[2S[S[S]]]] α,α' -[imino-bis(metilen)]bis[6-fluoro-cromano-2-metanol] (Figura 1).



nevibolol

Figura 1

15 En particular, se describe la resolución enzimática del éster cromanílico de partida (1) mediante el tratamiento con una enzima estereoselectiva que pertenece a la familia de las esterasas, en forma nativa o recombinante, que también puede obtenerse del microorganismo *Ophiostoma novo-ulmi*.

20 Los ésteres y ácidos obtenidos de este modo pueden convertirse, mediante procesos conocidos para una persona experta en la materia, en los correspondientes epóxidos "semiquirales", es decir, los pares (RR+RS, 4) y (SS+SR, 5) del Esquema (1).

25 A su vez, los componentes de cada par pueden separarse mediante el aprovechamiento de su diferente reactividad con bencilamina en un disolvente que consiste en un alcohol terciario. En estas condiciones de resolución cinética, los epóxidos RS y SR se convertirán en los productos iniciales correspondientes (6 y 8), mientras que los epóxidos RR y SS permanecerán inalterados.

30 El epóxido RR (7) se separa después de la amina RS (6) y el epóxido SS (9) se separa de la amina SR (8) mediante procesos conocidos para una persona experta en la materia y preferentemente mediante cristalización del componente básico.

Después, la amina RS se hace reaccionar con el epóxido SS para obtener l-bencilnebivolol. Análogamente, la amina SR se hace reaccionar con el epóxido RR para obtener d-bencilnebivolol.

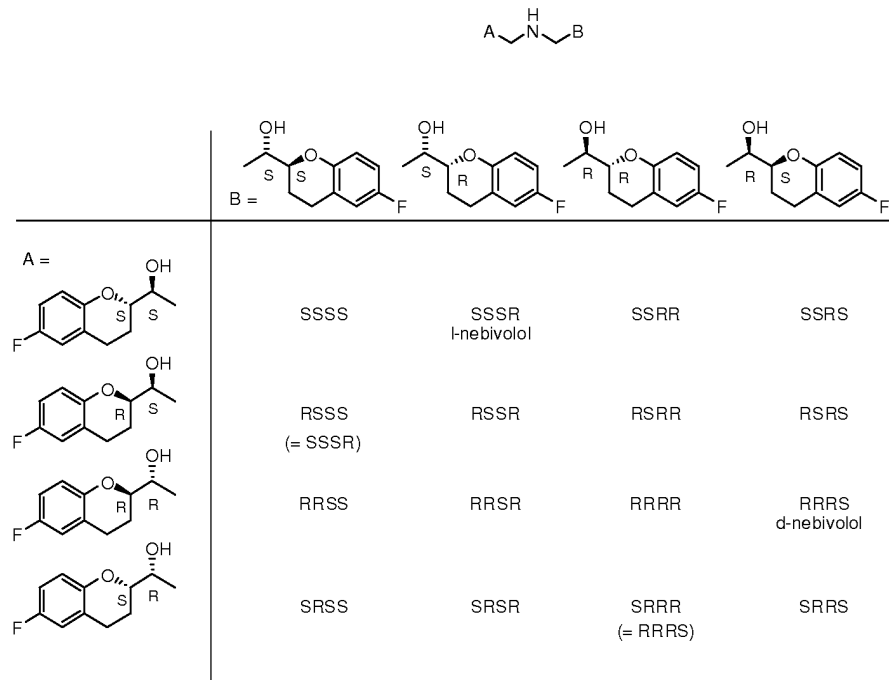
35 El l- y el d-bencil Nebivolol obtenidos de este modo se agrupan en cantidades equimolares, se cristalizan y se convierten en Nebivolol HCl de acuerdo con procesos conocidos para una persona experta en la materia.

Estado de la técnica

40 El Nebivolol es conocido como un antagonista del receptor beta adrenérgico, un agente antihipertensivo, un inhibidor de la agregación plaquetaria y un agente vasodilatador.

El Nebivolol tiene propiedades básicas y puede convertirse en una forma de sal farmacéuticamente aceptable mediante el tratamiento con un ácido. La sal de clorhidrato es la forma comercializada.

45 El Nebivolol contiene cuatro centros asimétricos y, por tanto, son teóricamente posibles 16 estereoisómeros. Sin embargo, debido a la estructura particular de la molécula (la presencia de un eje de simetría), realmente solo pueden formarse 10 estereoisómeros (Esquema 2).

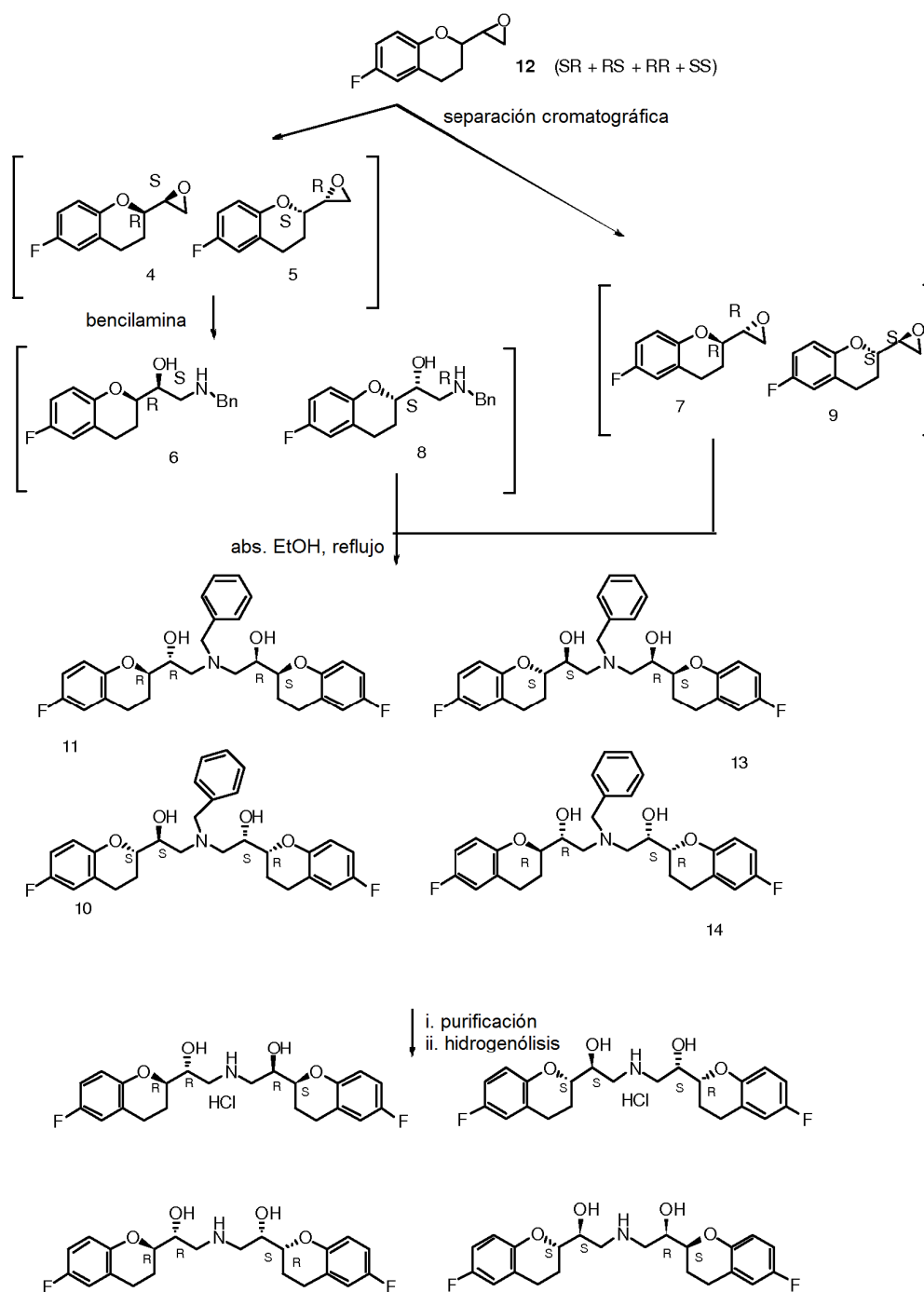


Esquema 2. Estereoisómeros posibles para el Nebivolol

De hecho, debido a la simetría de la molécula, RSSS=SSSR, RRSS=SSRR, SRSS=SSRS, RRSR=RSRR, SRSR=RSRS y RRRS=SRRR.

5

La Patente de Estados Unidos N° 4.654.362 (documento EP 0145067, Janssen) describe la síntesis de productos de la serie del Nebivolol con el uso de isómeros epóxido como intermedios clave en la síntesis. Los productos se obtienen a veces en mezcla y a veces enantiopuros, sin definir la configuración absoluta. En particular, el ejemplo 84 de dicha patente describe la obtención de una mezcla de isómeros como se define en el Esquema 3.



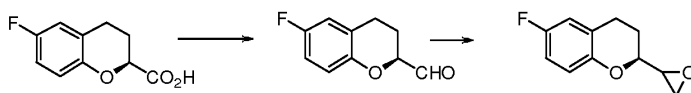
Esquema 3

Estos se separan, con una columna de cromatografía, en los dos racematos epóxido (RS/SR, 4/5) y (RR/SS, 7/9). Siguen la apertura de un par de epóxidos (4 + 5) con benzilamina y el uso de los productos de dicha reacción de (6 + 8) para abrir el segundo par de epóxidos (7 + 9). Esta operación conduce a la producción de los 4 diastereoisómeros bencilados (10-14).

5

10

El documento EP 0334429 (Janssen) describe el mismo proceso notificado en el documento EP 0145067, pero con más detalles experimentales y con la atención centrada en la preparación de un único isómero de Nebivolol. En este caso, el ácido 6-fluorocromancarboxílico, específicamente, se resuelve en los enantiómeros individuales mediante tratamiento con (+)-deshidroabietilamina. Los enantiómeros individuales obtenidos de este modo se convierten en los correspondientes epóxidos semiquirales de acuerdo con el siguiente esquema de síntesis (se muestra el isómero S):



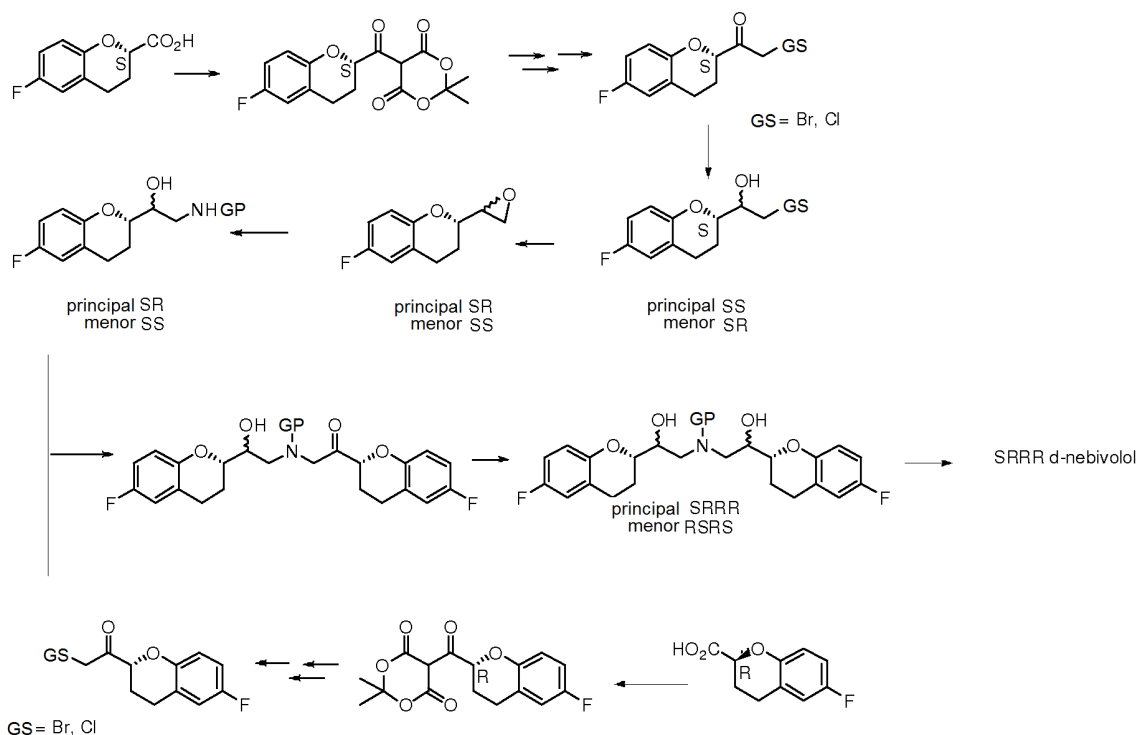
Esquema 4

Se describe una síntesis estereoselectiva del isómero [2R,αS,2'S,α'S]-α,α'-[iminobismetilen]bis[6-fluoro-3,4-dihidro-2H-benzopiran-2-metanol].

5 El proceso para la resolución de ésteres de ácido utilizado adolece de varios inconvenientes en lo que concierne a su aplicación industrial. De hecho, se introducen etapas adicionales (formación de amidas, cristalización fraccionada, hidrólisis de amidas), y, además, el rendimiento global es bastante bajo. La mezcla de epóxidos diastereoisoméricos obtenida de este modo se desarrolla en HPLC preparativa para aislar el isómero de la quiralidad deseada.

10 Hetero Drugs Limited, en el documento WO 2006/016376 y en el posterior documento WO 2007/083318, describe procesos de cristalización fraccionada aplicados a nivel de la mezcla diastereoisomérica (10, 11, 13, 14) de bencil Nebivolol, que conducen, también en este caso, a un descarte de aproximadamente el 50% del material de partida, relacionado con la necesidad de eliminar los diastereoisómeros no deseados.

15 El documento WO 2004/041805 (Egis Gyógyszergyár) describe un proceso para la preparación de [2S*[R*[R*[R*]]] y [2R*[S*[S*[S*]]]-(±)-α,α'-[iminobis(metilen)]bis[6-fluoro-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-2-metanol] y sus enantiómeros puros individuales [2S*[R*[R*[R*]]] y [2R*[S*[S*[S*]]] a partir de compuestos muy diferentes. Las etapas utilizadas para la síntesis de Nebivolol en forma de mezcla de enantiómeros son aproximadamente treinta, lo que hace a la
20 síntesis muy larga y antieconómica.



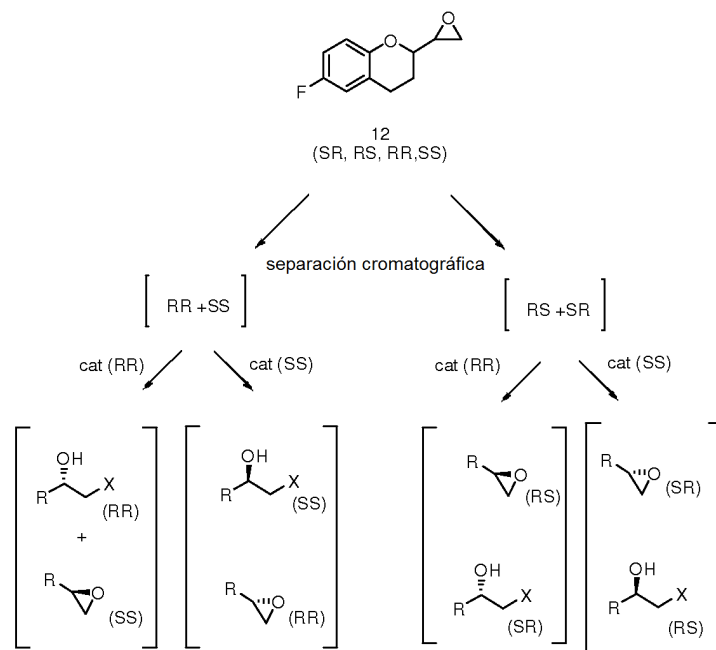
Esquema 5

25 En el documento WO 2008/010022 (Cimex Pharma) se describe una vía que, a partir de ácidos 6-fluorocromanocarboxílicos resueltos de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía, conduce a la síntesis de los dos enantiómeros de Nebivolol de acuerdo con dos secuencias separadas (Esquema 5, para d-Nebivolol).

30 En la apertura de epóxidos mediante una bencilamina, un solo producto de la apertura cristaliza en la mezcla de reacción, el otro diastereoisómero se retira con las aguas madres, lo que conduce también en este caso a la eliminación de una fracción considerable de material en una etapa ya bastante avanzada de la secuencia de

síntesis. Además, el último centro quiral se añade en la penúltima etapa mediante la reducción de una cetona, una reacción bastante sensible que, a fin de obtener resultados óptimos, prevé el uso de KBH_4 e isopropóxido de titanio.

5 El documento WO2008/064826 (Zach System) describe un proceso para la resolución de epóxidos, una vez que los pares de diastereoisómeros (RS/SR y RR/SS) se han separado cromatográficamente, a través de la apertura enantioselectiva de los mismos epóxidos mediada por complejos quirales de cobalto II (Esquema 6). En este caso es necesaria una etapa de separación cromatográfica, menos práctica desde el punto de vista del proceso, mientras que los complejos de cobalto requieren precaución en su manipulación y eliminación.

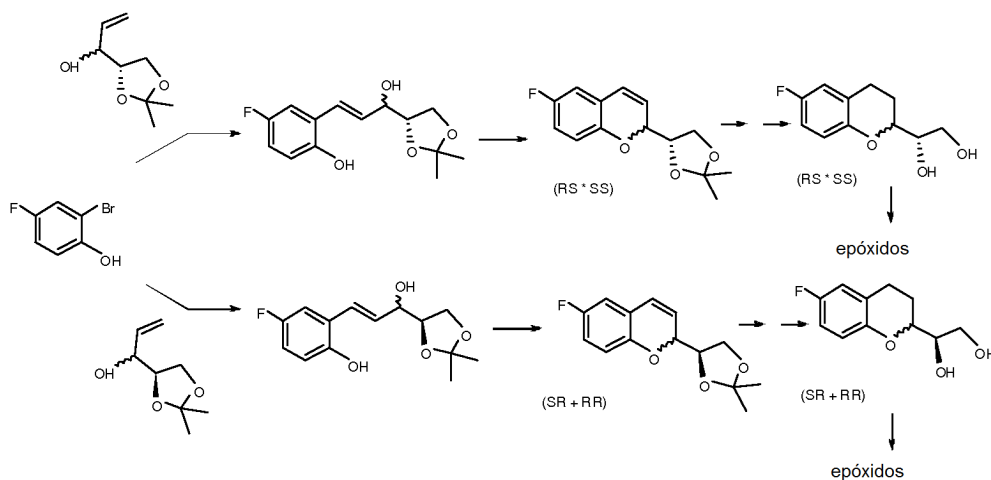


Esquema 6

10

El documento WO 2008/064827 (Zach System) describe la síntesis por separado y enantioselectiva de d-Nebivolol y l-Nebivolol a partir de los dos isómeros ópticos del gliceraldehído protegido, tales como 2,2-dimetilacetal (Esquema 7). Los diastereoisómeros se separan con procesos conocidos, pero que no se describen. El número de etapas de síntesis es superior al de la síntesis clásica, mientras que los precursores aldehídicos son conocidos como compuestos no demasiado estables, que tienden a polimerizar cuando se almacenan en forma pura y a temperatura ambiente.

15



Esquema 7

20

En cuanto a la separación de enantiómeros en el nivel del ácido 6-fluoro-cromano-2-carboxílico, se sabe que el proceso para la formación de amidas con (+)-deshidroabietilamina, seguido de cristalización fraccionada e hidrólisis

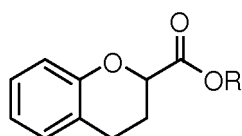
de amidas para recuperar el ácido (documento EP 0334429), es trabajoso y proporciona rendimientos bastante bajos.

5 En lo concerniente a la resolución enzimática de ésteres de ácidos carboxílicos, éste es un proceso conocido en la bibliografía, pero nunca se había empleado en ésteres de derivados de flúor de ácidos cromano-2-carboxílicos, ni se había utilizado, por consiguiente, para la síntesis de Nebivolol.

Específicamente, se describen ejemplos conocidos relacionados con cromano-2-carboxilatos.

10 En el documento US 5.037.747, se preparan ésteres benzopirano-2-carboxílicos (2R)-hidroxi-sustituídos y ácidos benzopirano-2-carboxílicos (2S)-hidroxi-sustituídos mediante la hidrólisis selectiva del correspondiente racemato catalizada por la lipasa de *Pseudomonas*.

15 Urban (Patente de los EE.UU. Nº 5.089.637, documento EP 0448254) aprovecha una hidrólisis enzimática con una esterasa derivada de *Pseudomonas fluorescens* para resolver mezclas racémicas de fórmula general (I), donde R = alquilo C₁-C₃.



(I)

20 El documento WO 96/40975 describe la utilización de una esterasa microbiana derivada de *Serratia marcescens* para la resolución de cromano-2-carboxilalquilos de la misma fórmula general, pero con R > C₃.

25 En el documento DE 4430089 se describe una serie de ejemplos en los que los ésteres cromano-2-carboxílicos se someten a la hidrólisis enzimática con un grupo seleccionado de enzimas (quimotripsina, lipasa de *Candida lipolytica*, lipasa de *Aspergillus oryzae*, lipasa de *Geotrichum candidum*, lipasa de *Aspergillus niger*).

30 Finalmente, en cuanto a la esterasa derivada del ascomiceto de *Ophiostoma novo-ulmi*, se describen los detalles relacionados con su aislamiento, su clonación en *E. Coli* y su uso en la resolución de ésteres, por ejemplo, por M. N. Isupov et al. en *Acta Crystallographica - Biological Crystallography Section D60*, págs. 1879-1882 (2004) o en el documento EP 0687305, mientras que un uso de la misma en la resolución de enantiómeros de ácidos arilalcanoicos y, más específicamente, de ketoprofeno, se describe en el documento EP 0693134.

35 Sobre la base las pruebas bibliográficas disponibles hasta la fecha, la síntesis de Nebivolol todavía conlleva numerosos problemas de síntesis. La síntesis original de Janssen que se realiza a través de los epóxidos (Esquema 3, mezcla 6) es sin duda la más corta, pero requiere una separación mediante HPLC preparativa de los dos pares de epóxidos diastereoisoméricos. Los otros procesos generalmente prevén muchas más etapas de síntesis.

40 En una parte considerable de las síntesis descritas, se descartan porcentajes de productos intermedios, que pueden llegar hasta el 50%, para eliminar los diastereoisómeros no deseados que inevitablemente se han producido en la secuencia de síntesis aplicada.

Por tanto, la necesidad de desarrollar un nuevo proceso de síntesis, adecuado para su uso industrial, y que evite el uso de separaciones cromatográficas y la necesidad de eliminar porcentajes considerables de compuestos intermedios, aunque manteniendo un número limitado de etapas de síntesis, se percibe notablemente.

45 Sumario de la invención

Se ha descubierto ahora sorprendentemente un proceso más eficaz para la síntesis de Nebivolol (Esquema 1) que permite eliminar los inconvenientes destacados en el presente documento para las vías de síntesis previamente conocidas, es decir, que:

- 50
- a) evita, o reduce considerablemente, la separación por HPLC preparativa de los pares (RR/SS RS/SR) de enantiómeros epóxidos o de otros intermedios diastereoisoméricos;
 - b) reduce sensiblemente la pérdida de producto representada por isómeros no deseados, con el consiguiente aumento del rendimiento global.

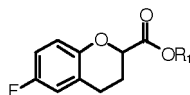
55 El tratamiento de la mezcla de los dos enantiómeros del éster del ácido 6-fluorocromano-2-carboxílico se realiza con una esterasa fúngica (lipasa) obtenible del género *Ophiostoma*. Los especie preferida es la esterasa de *Ophiostoma novo-ulmi*, ya descrita en la bibliografía por su actividad estereoselectiva sobre los ésteres de compuestos de naproxeno o ketoprofeno.

60

La reacción realizada en un medio acuoso o acuoso/orgánico conduce a la hidrólisis a ácido carboxílico de uno de los dos enantiómeros de una manera selectiva, mientras que el otro permanece en forma de un éster. La reacción transcurre rápidamente y con una alta estereoselectividad. Los dos compuestos producidos de este modo pueden separarse fácilmente mediante extracción ácido-base.

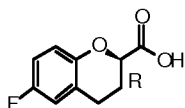
5 Por tanto, el objeto de la presente invención es un proceso para la preparación de Nebivolol, comprendiendo el proceso:

10 a. resolver, mediante una reacción de hidrólisis enzimática, la mezcla de enantiómeros de un éster del ácido 6-fluoro-2-carboxílico (1), en donde R₁ es un grupo alquilo C₁₋₅ lineal o ramificado,

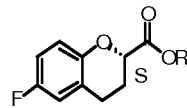


(1)

15 para proporcionar una mezcla del ácido (2) y el éster (3)



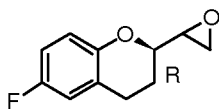
(2)



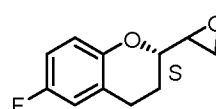
(3)

20 en donde el ácido R (2) está presente con un exceso enantiomérico de >70% y el éster S (3) está presente con un exceso enantiomérico de >70%; el exceso enantiomérico es preferentemente de >80%, e incluso más preferentemente de >90%, en ambos componentes;

b. usar el ácido (2) y el éster (3) obtenidos de este modo para la síntesis de las mezclas de epóxidos (4) y (5),

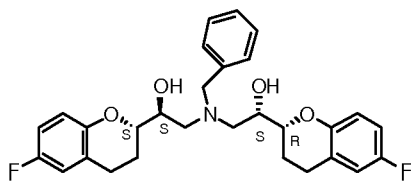


(RR + RS)
(4)

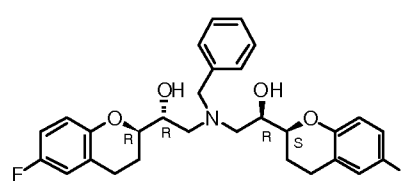


(SS + SR)
(5)

25 d. hacer reaccionar el aminoalcohol RS (6) con el epóxido (9) para obtener l-bencil Nebivolol (10) y el aminoalcohol SR (8) con el epóxido (7) para obtener d-bencil Nebivolol (11)

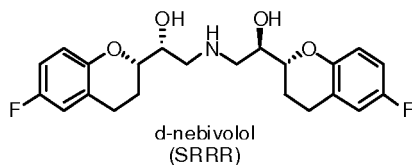


(10)

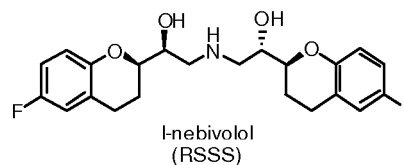


(11)

30 e. desproteger, con la eliminación del grupo bencil con formación de Nebivolol



d-nebivolol
(SRRR)



l-nebivolol
(RSSS)

Nebivolol

caracterizado porque se realizan, en la etapa (a), la hidrolización por una reacción de hidrólisis enzimática estereoselectiva realizada mediante el uso de una esterasa obtenida del género *Ophiostoma*, para proporcionar la mezcla del ácido R (2) con un exceso enantiomérico de >70% y del éster de S (3) con un exceso enantiomérico de >70%; y, en la etapa (c), la resolución de forma cinética de las mezclas de epóxidos (4) y (5), haciéndolos reaccionar con bencilamina en un alcohol estéricamente impedido seleccionado entre isopropanol, sec-butanol, *terc*-butanol, 2-metil-2-butanol, alcohol isoamílico, 2-metil-2-pentanol.

Para los fines de la presente invención, el grupo R₁, definido como un grupo alquilo C₁₋₅ lineal o ramificado, representa un radical seleccionado entre: metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, amilo, *terc*-amilo; preferentemente es un radical seleccionado entre metilo, etilo, propilo, e incluso más preferentemente es un grupo etilo.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, el compuesto de Nebivolol se obtiene con el proceso descrito en el Esquema 1 partiendo de la mezcla racémica del éster del ácido 6-fluorocromano-2-carboxílico (1).

El 6-fluorocromano-2-carboxilato (1) puede resolverse en sus dos enantiómeros con alta estereoselectividad a través de la hidrólisis enantioselectiva catalizada por una esterasa fúngica (lipasa) obtenible del género *Ophiostoma*. La especie preferida es la esterasa de *Ophiostoma novo-ulmi*, ya descrita en la bibliografía por su actividad estereoselectiva sobre los ésteres de compuestos de naproxeno o ketoprofeno.

La enzima, en forma de una proteína de expresión aislada y cristalizada, se describe por M. N. Isupov et al. en *Acta Crystallographica - Biological Crystallography Section D*60, págs. 1879-1882 (2004). La enzima también se describe en los documentos EP-B1-0687305 (WO94/20634), EP-0693134, US5912164 y en el documento EP1626093.

La expresión enzimática en *E. coli* puede realizarse como se describe por M. N. Isupov et al. (citado anteriormente) o en el documento EP-B1-0687305 (WO94/20634).

Esta cepa proporciona un buen ejemplo de actividad, sin embargo, dada la naturaleza algo difusa de la actividad en una amplia variedad de cepas relacionadas, el alcance de la invención no está destinado a limitarse solamente a la misma. Los microorganismos del género *Ophiostoma* y su actividad enzimática pueden utilizarse para hidrolizar el éster racémico de etilo 6-fluorocromano-2-carboxilado de manera estereoselectiva, así como llevarlo al ácido, enriquecido considerablemente en enantiómero R, por ejemplo, un 93-100% de exceso enantiomérico con un 45-50% de conversión y dejar el éster residual enriquecido en el enantiómero S.

Por tanto, se produce el ácido (R) 6-fluorocromano-2-carboxílico (2) con un exceso enantiomérico de >70%, preferentemente de >80% e incluso más preferentemente de >90%, mientras que el ácido (S) 6-fluoro carboxílico permanece en forma de un éster (3) con un exceso enantiomérico de >70%, preferentemente de >80% e incluso más preferentemente de >90%.

La reacción puede realizarse en cualquier mezcla de enantiómeros, pero generalmente se utiliza el racemato.

El éster utilizado para esta reacción es un éster del ácido 6-fluoro-2-carboxílico (1), en donde R₁ es un grupo alquilo C₁₋₅ lineal o ramificado seleccionado entre el grupo comprendido por metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, amilo, *terc*-amilo; preferentemente entre metilo, etilo, propilo y aún más preferentemente entre un grupo etilo.

La reacción se realiza preferentemente a un pH de 8-11, preferentemente de 8,5-10,0.

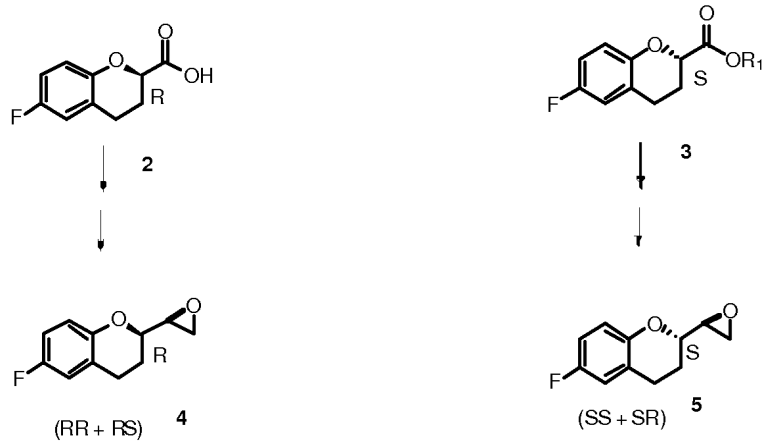
La temperatura puede estar comprendida entre 10 y 35°C, pero preferentemente entre 20 y 25°C.

La mezcla de reacción puede estar en un medio acuoso o en presencia de disolventes inmiscibles en agua.

La recuperación de ambos compuestos es posible mediante procesos conocidos para una persona experta en la materia y, preferentemente, a través de una serie de extracciones ácido-base.

Ambos compuestos después se utilizan para la síntesis de Nebivolol (Esquema 1).

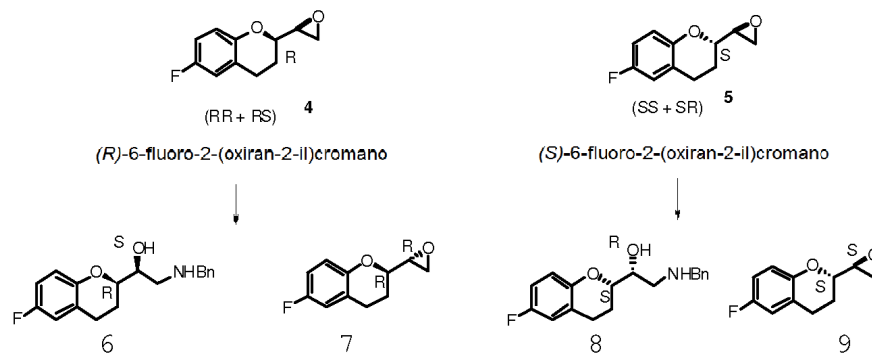
A través de procesos conocidos para una persona experta en la materia (a modo de ejemplo no limitativo, análogamente a aquel descrito en el documento W02008/010022) el ácido (2) se transforma en la mezcla de epóxidos (RS) y (RR) (4), diastereoisoméricos entre los mismos, mientras que el éster (3) se convierte en la mezcla de epóxidos (SR) + (SS) (5).



(*R*)-6-fluoro-2-(oxiran-2-il)cromano

(*S*)-6-fluoro-2-(oxiran-2-il)cromano

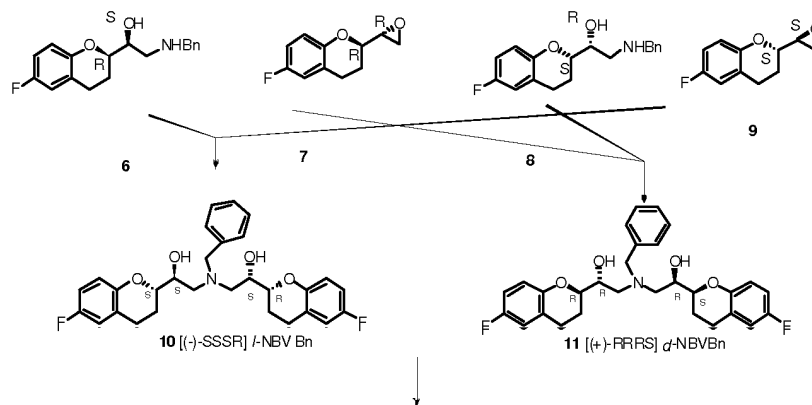
5 Mediante la realización de la reacción de apertura de la mezcla de epóxidos (4) con bencilamina en un disolvente alcohólico estéricamente impedido seleccionado entre isopropanol, *sec*-butanol, *terc*-butanol, 2-metil-2-butanol, alcohol isoamílico, 2-metil-2-pentanol se obtiene una resolución cinética con formación del aminoalcohol RS (6) solo, mientras que el epóxido RR (7) se recupera inalterado.



10 El mismo proceso, aplicado a la mezcla (5), produce el aminoalcohol SR (8) y el epóxido SS (9).

15 Como alternativa a la resolución cinética descrita, la mezcla de epóxidos (4) puede separarse cromatográficamente en los dos epóxidos RR y RS, y la mezcla de los epóxidos (5) en los dos epóxidos SR y SS; posteriormente el epóxido RS se hace reaccionar con bencilamina obteniendo el aminoalcohol RS (6), mientras que el epóxido SR se hace reaccionar con bencilamina para obtener el aminoalcohol SR (8).

Finalmente, la reacción del aminoalcohol (6) con



20 el epóxido (9) produce el derivado N-bencilado del *l*-Nebivolol (10) y análogamente la reacción del aminoalcohol (8) con el epóxido (7) proporciona el derivado N bencilado del *d*-Nebivolol (11).

Los compuestos (10) y (11) se agrupan en cantidades equimoleculares, se purifican mediante cristalización (a fin de eliminar cualesquier impurezas constituidas por compuestos diastereoisómeros no deseados derivados de la pureza enantiomérica no completa de los ésteres/ácidos de partida), se desbencilan y posteriormente se salifican para obtener la sal de Nebivolol final deseada.

Ejemplos

La invención se describe a continuación en el presente documento en detalle mediante los siguientes ejemplos, puramente a modo de ilustración y no con fines limitativos:

EJEMPLO 1

Como se describe en el documento EP-0687305, una cepa de *E. Coli* recombinante que contiene la esterasa originalmente expresada en *Ophiostoma novo-ulmi* se cultiva de acuerdo con técnicas bien conocidas para una persona experta en la materia. Una fracción celular se lisa mediante sonicación y el lisado se centrifuga para obtener una solución sobrenadante libre de células. Se añaden 1,6 ml de una solución que contiene la enzima esterasa (lipasa) obtenida de *Ophiostoma novo-ulmi* (6800 unidades/ml) y una suspensión de aproximadamente 25 g de ácido etil 6-fluorocromano-2-carboxílico (1) en 25 ml de agua desionizada con 100 µl de Tween 80, a 500 ml de una solución tampón de NaHCO₃ 0,1 N (pH 9,7), ajustando opcionalmente el pH con NaOH 2 N a un valor de 9,7. La mezcla obtenida de este modo se agita suavemente.

El pH se mantiene automáticamente en el valor de 9,7 con adiciones controladas de una solución de NaOH 2 N.

La evolución de la reacción se controla mediante HPLC.

Al final de la reacción de hidrólisis, la mezcla se extrae con diclorometano a fin de obtener el éster en la fase orgánica. La solución acuosa se acidifica con ácido clorhídrico 1 N a pH 1, y después se extrae con diclorometano para la recuperación del ácido.

Las dos fases orgánicas se lavan con salmuera separadamente, y se concentran para obtener 12,2 g de éster etílico y 11,0 g de ácido respectivamente.

Relación de enantiómeros (HPLC):

Éster (S) (3)/éster (R): 95,31/4,69
Ácido (R) (2)/ácido (S): 95,36/4,64

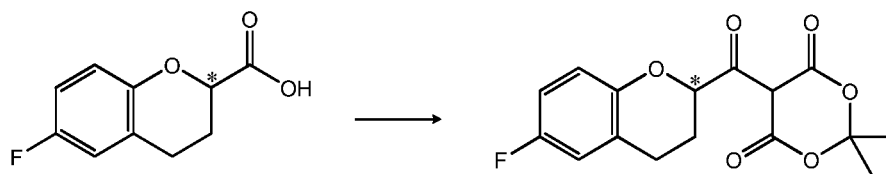
La evaluación del poder rotatorio en DMF a 25°C para la mezcla de ácidos (que comprende el ácido (2)) muestra que dicha mezcla es levógira y está de acuerdo con lo descrito en el documento EP0334429 para el isómero R.

ÁCIDO (2) RMN-1H (DMSO-D₆, 400 MHz): δ_H (ppm): 2,04 (2H, m, OCHCH₂CH₂), 2,64 (1H, m, OCHCH₂CH₂), 2,79 (1H, m, OCHCH₂CH₂), 4,75 (1H, t, J = 4,5 Hz, OCHCO), 6,80-7,00 (3H, m, CHar), 13,00 (1H, b, COOH).

ÉSTER ETÍLICO (3) RMN-1H (DMSO-D₆, 400 MHz): δ_H (ppm): 1,19 (3H, t, J = 7,2 Hz, CH₃), 2,04 (1H, m, m, OCHCH₂CH₂), 2,14 (1H, m, OCHCH₂CH₂), 2,62 (1H, m, OCHCH₂CH₂), 2,80 (1H, m, OCHCH₂CH₂), 4,86 (1H, t, J = 4,5 Hz, OCHCO), 6,80-7,00 (3H, m, Char).

Proceso de análisis: columna Kromasil 5-AmyCoat (4,6 × 250 mm); eluyentes: (A) hexano (TFA al 0,1%), (B) isopropanol, (A)/(B) isocrático 85/15; caudal: 1 ml/min, temperatura: 40°C; Detector: UV a 280 nm;

EJEMPLO 2. Preparación del derivado de acil Meldrum



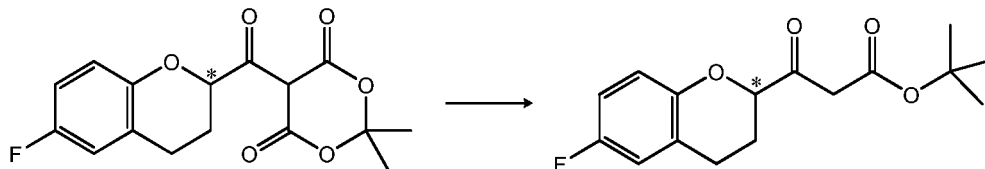
Se solubilizan 28 g de ácido (R) resuelto en 250 ml de diclorometano anhidro; a la solución resultante, se le añaden 1,4 equivalentes de cloruro de oxalilo y DMF gota a gota. La solución se mantiene en agitación a temperatura ambiente y en atmósfera de N₂; después de 1,5 horas se evapora el disolvente, obteniéndose un aceite que se redisuelve en 200 ml de diclorometano anhidro. Por separado, se disuelven ácido de Meldrum (1,05 equivalentes) y piridina (2 equivalentes) en diclorometano anhidro (150 ml) y se dejan en agitación a 0°C durante 15 min. A esta solución se le añade el cloruro de ácido formado previamente. Al final de la adición la mezcla se deja en agitación a 0°C durante 1 hora y otros 45 min a temperatura ambiente.

Después, se diluye con otros 500 ml de diclorometano y la fase orgánica se lava con H₂O (200 ml, 2 veces), HCl 2 N (100 ml), agua y salmuera y se seca sobre Na₂SO₄. Se obtiene un aceite que se recoge con 20 volúmenes de éter

diisopropílico, obteniéndose un sólido de color marrón (40 g, pureza por HPLC = 81%, $\lambda = 280$ nm) que se filtra y se seca. El sólido obtenido se utiliza en la reacción posterior sin purificación adicional.

EJEMPLO 3. Preparación del β -ceto éster

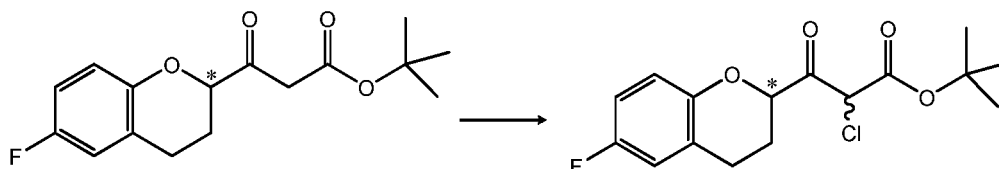
5



Se colocan 40 gramos del derivado de acil Meldrum (R) en bruto en agitación con 110 ml de *tert*-butanol; la mezcla resultante se calienta a 80°C durante 1 hora hasta que un control por HPLC destaca la desaparición del producto de partida. Al final de la reacción, el *tert*-butanol se evapora a presión reducida; se recoge con 500 ml de acetato de etilo y la fase orgánica se lava con una solución saturada de NaHCO₃, H₂O a neutralidad, salmuera y se seca sobre Na₂SO₄. Después, el disolvente se evapora, obteniéndose 28 g de β -ceto éster en bruto (pureza por HPLC: 69%, $\lambda = 280$ nm) en forma de un aceite, que se utiliza en la reacción posterior sin purificación adicional.

EJEMPLO 4: Preparación del cloro β -ceto éster

15

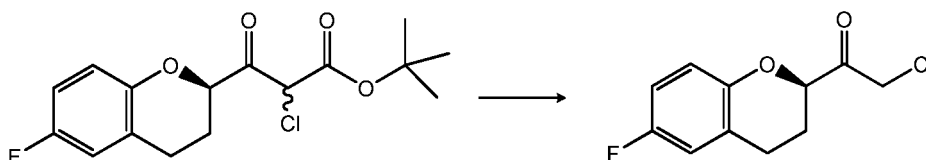


Se disuelven 28 g del β -ceto éster (R) en bruto en 250 ml de acetato de etilo y a esta solución se le añaden 0,26 equivalentes de Mg(ClO₄)₂. Después de 30 min, se añaden 0,95 equivalentes de N-clorosuccinimida en 2 h. Al final de la adición, la mezcla resultante se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, el sólido formado se elimina, la solución transparente se transfiere a un embudo de decantación, después de diluirla con otros 350 ml de acetato de etilo; la fase orgánica se lava con salmuera, H₂O y se seca sobre Na₂SO₄. Se evapora el disolvente, obteniéndose 34 g de derivado de cloro en bruto (pureza por HPLC = 79,40%, $\lambda = 280$ nm) que se utiliza en la reacción posterior sin purificación adicional.

20

25

EJEMPLO 5: Preparación de la α -clorocetona



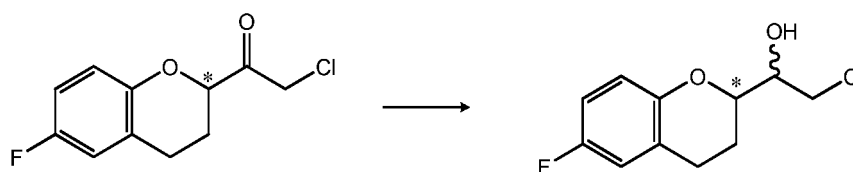
30

Se calientan a reflujo 34 g del cloro β -ceto éster (R) en bruto con HCOOH (100 ml), CH₃COOH (120 ml) y H₂O (30 ml); después de 1,5 h un control por HPLC destaca el final de la reacción. Después, la mezcla se evapora a presión reducida, se recoge con acetato de etilo y la fase orgánica se lava con salmuera, NaHCO₃ saturado, H₂O, y se seca sobre Na₂SO₄. Después, el disolvente se evapora a presión reducida, obteniéndose 21 g de α -cloro-cetona (pureza por HPLC = 60%, $\lambda = 280$ nm) en forma de un aceite que se utiliza tal cual para la siguiente etapa sin purificación adicional.

35

EJEMPLO 6. Preparación del α -cloroalcohol

40



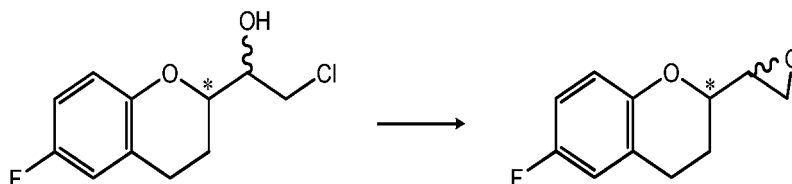
40

Se disuelven 21 g del aceite obtenido de la reacción precedente en 15 volúmenes de MeOH, a esta solución se le añaden 2,0 equivalentes de NaBH(OCOCH₃)₃ con una espátula y se mantiene en agitación magnética a temperatura ambiente. Después de 45 min se añade otro equivalente de NaBH(OCOCH₃)₃. Después de 1 hora de la última adición, un control por HPLC indica el final de la reacción. El disolvente se evapora a presión reducida, todo se transfiere a un embudo de decantación con acetato de etilo y la fase orgánica se lava con H₂O y salmuera, y se seca

45

sobre Na₂SO₄. Se obtienen 21 g de un aceite que se purifica mediante cromatografía ultrarrápida (relación sílice/bruto: 30:1, eluyente: éter de petróleo/AcOEt 92:8), obteniéndose 14,2 g de α-cloro-alcohol (pureza por HPLC = 86,5%, λ = 280 nm).

5 EJEMPLO 7: Preparación de los epóxidos (RR + RS) (4)



10 Se disuelven 14 g del α-cloro-alcohol en 20 volúmenes de Et₂O anhidro y a esta solución se añaden 2,8 g del NaH precedente, lavados con éter de petróleo. Después de 1 hora, un control por TLC (gel de sílice, eluyente: éter de petróleo/AcOEt 85:15) indica la desaparición del cloroalcohol de partida (una mancha en la TLC) y la formación de los dos epóxidos (dos manchas claramente distintas en la TLC). Después, la mezcla de reacción se diluye con otros 30 volúmenes de Et₂O, y todo se vierte en 100 ml de NaHSO₄ 1 M, manteniendo una agitación enérgica. La fase orgánica se lava con NaHCO₃, H₂O, salmuera y se seca sobre Na₂SO₄. Después, el disolvente se evapora a presión reducida, obteniéndose 11,4 g de la mezcla de epóxidos en forma de un aceite (Pureza por HPLC >98%, λ = 280 nm) en una relación de 51:48.

La presencia de solo dos picos principales en las relaciones indicadas en el análisis con HPLC quiral muestra que no había ninguna racemización en la secuencia de reacción que va desde el ácido (R) a la mezcla de epóxidos diastereoisoméricos (RR + RS), con preservación evidente de la quiralidad del estereocentro.

La mezcla de epóxidos (SR + SS) (5) se prepara análogamente a lo descrito en los ejemplos 2-7, a partir del éster (3) después de su hidrólisis al ácido correspondiente. En este caso, la evaluación de la capacidad de rotación en DMF a 25°C para el ácido obtenido de este modo muestra que es dextrógiro y está de acuerdo a lo descrito en el documento EP 0 334 429A1 para el isómero S.

EJEMPLO 8: Resolución cinética de la mezcla de epóxidos (SS + SR).

30 Una solución de la mezcla de epóxidos (SS + SR) (4,50 g, 22,5°mmol) y bencilamina (3,8 ml, 35°mmol) en 2-metil-2-butanol (38 ml) se mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas. Al final de la reacción, la amina (SR) 8 formada se filtra al vacío y se seca (1,90 g, 6,30°mmol). La solución filtrada se vierte en ciclohexano (250 ml) y la solución obtenida de este modo se lava con NaHSO₄ 1 M (100 ml) y H₂O (50 ml, 2 veces) y, después, se concentra a presión reducida para obtener 1,30 g (6,00°mmol) de epóxido (SS) 9.

35 La resolución cinética de la mezcla de epóxidos (RS + RR) se realiza análogamente a lo descrito en el Ejemplo 8.

EJEMPLO 9: Síntesis de l-bencil Nebivolol (SSSR)

40 El compuesto (RS)-2-bencilamino-1-(6-fluorocromano-2-il)etanol y el epóxido (SS) se disuelven en etanol absoluto (6 ml) y se mantienen a reflujo hasta la desaparición de los reactivos de partida. Al final de la reacción la mezcla se deja alcanzar la temperatura ambiente y el disolvente se retira a presión reducida.

EJEMPLO 10: Síntesis de d-bencil Nebivolol (RRRS)

45 El compuesto (SR)-2-bencilamino-1-(6-fluorocromano-2-il)etanol y el epóxido (RR) se tratan como en el Ejemplo 9 para obtener d-bencil Nebivolol.

EJEMPLO 11: Síntesis de d,l-bencil Nebivolol

50 El l-bencil Nebivolol descrito en el Ejemplo 9 (3,00 g) y el d-bencil Nebivolol descrito en el Ejemplo 10 (3,00 g) se combinan y la mezcla obtenida de este modo (6,0 g) se purifica mediante cristalización, obteniéndose 5,0 g de N-bencil Nebivolol (83%, pureza por HPLC = 99,6%). Durante la purificación mediante cristalización también se eliminan las impurezas que consisten en isómeros no deseados derivados de la hidrólisis enantioselectiva no completa del ácido etil 6-fluorocromano-2-carboxílico (1) de partida.

EJEMPLO 12: Síntesis de clorhidrato de Nebivolol

60 El compuesto d,l-bencil Nebivolol (5,0 g, 410°mmol) se disuelve en metanol (400 ml) junto con Pd(OH)₂ al 20%/C (1% p/p). La mezcla se mantiene en agitación y en atmósfera de hidrógeno. Al final de la reacción el catalizador se filtra sobre un septo poroso y se añade HCl concentrado (36 ml) al filtrado. La solución se concentra a presión

ES 2 553 266 T3

reducida y el residuo obtenido se trata con calor con etanol absoluto (50 ml). El sólido obtenido se filtra y se seca al vacío (1,0 g, rendimiento: 82%, pureza por HPLC: 99,9%).

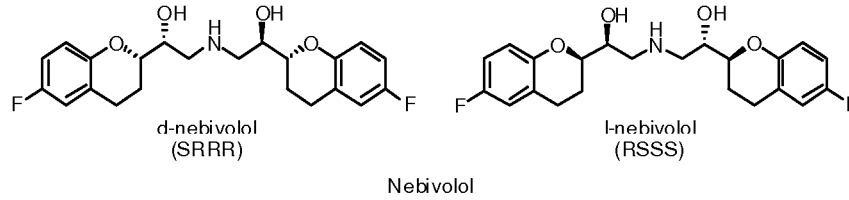
Método analítico de HPLC

5

Columna	Merck LiChrosphere 100 RP ₁₈ protegida terminalmente (5°mm) (4,6 × 250°mm)
Eluyente	A: agua + TFA al 0,1%, B: acetonitrilo + TFA al 0,1% Gradiente: desde B al 40% hasta B al 90% en 20 min + B al 90% isocrático en 10 min
Volumen de inyección	20 µl
Caudal	1 ml/min
Detector	CL: UV. λ: 280 nm
Temperatura	Temperatura ambiente

REIVINDICACIONES

1. Un método para la síntesis de d-Nebivolol y/o l-Nebivolol de las siguientes fórmulas

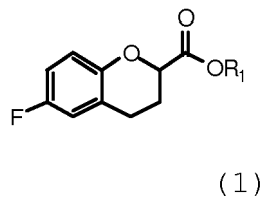


5

que comprende las siguientes etapas:

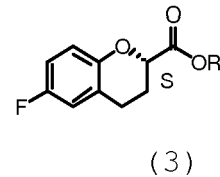
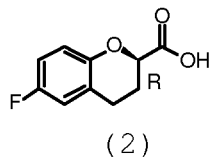
10

a) hidrolizar una mezcla de enantiómeros del éster del ácido 6-fluoro-2-carboxílico (1), en donde R₁ es un grupo alquilo C₁₋₅ lineal o ramificado



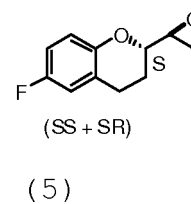
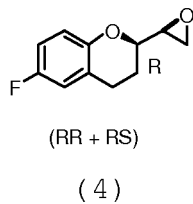
15

para proporcionar una mezcla del ácido (2) y el éster (3)



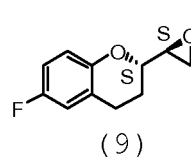
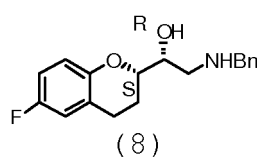
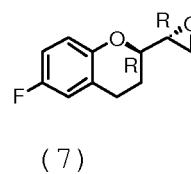
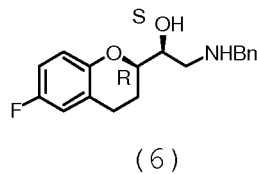
20

b) utilizar el ácido (2) y el éster (3) obtenidos de este modo para la síntesis, respectivamente, de las mezclas de epóxidos (4) y (5),



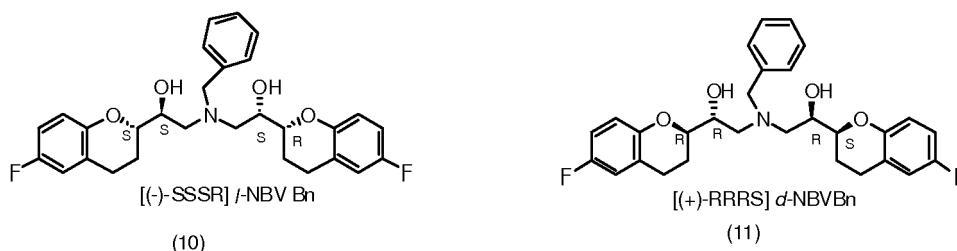
25

c) resolver las mezclas de epóxidos (4) y (5) para obtener, respectivamente, los compuestos (6) + (7) y (8) + (9),



30

d) hacer reaccionar los aminoalcoholes (6) y (8) con los epóxidos (7) y (9) para obtener l-bencil Nebivolol (10) y d-bencil Nebivolol (11)



- 5 e) retirar el grupo protector bencilo; caracterizado porque en la etapa (a), la hidrólisis se realiza mediante una reacción de hidrólisis enzimática estereoselectiva utilizando una esterasa obtenida del género *Ophiostoma*, para proporcionar la mezcla del ácido R (2) con un exceso enantiomérico de >70% y del éster de S (3) con un exceso enantiomérico de >70%; y, en la etapa (c), la resolución de las mezclas de epóxidos (4) y (5), se realiza cinéticamente haciéndolas reaccionar con bencilamina en un alcohol estéricamente impedido seleccionado entre isopropanol, *sec*-butanol, *terc*-butanol, 2-metil-2-butanol, alcohol isoamílico, 2-metil-2-pentanol.
- 10 2. El método de síntesis de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la reacción de hidrólisis enzimática se realiza mediante el uso de la esterasa obtenida de la cepa AJ3 de *Ophiostoma novo-ulmi*.
- 15 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la reacción de hidrólisis enzimática se realiza a un pH comprendido entre 8 y 11.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la reacción de hidrólisis enzimática se realiza a un pH comprendido entre 8,5 y 10.
- 25 5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la reacción de hidrólisis enzimática se realiza a una temperatura comprendida entre 10 ° y 35 °C.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la reacción de hidrólisis enzimática se realiza a una temperatura comprendida entre 20 ° y 25 °C.
- 35 7. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la reacción de hidrólisis enzimática se realiza en un medio acuoso o en presencia de disolventes inmiscibles en agua.
- 40 8. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la hidrólisis enzimática de la mezcla de ésteres (1) transcurre para producir una mezcla del ácido (R) (2) y el éster (S) (3) con un exceso enantiomérico de >80% o >90% en ambos componentes.
- 45 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido (2) se convierte en la mezcla de epóxidos RR + RS (4), mientras que el éster (3) se convierte en la mezcla de epóxidos SS + SR (5).
- 50 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la resolución cinética con bencilamina de la mezcla de epóxidos (4) se realiza en un alcohol estéricamente impedido seleccionado entre isopropanol, *sec*-butanol, *terc*-butanol, 2-metil-2-butanol, alcohol isoamílico, 2-metil-2-pentanol, obteniéndose solo el aminoalcohol RS (6), mientras que el epóxido RR (7) se recupera inalterado.
- 55 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la resolución cinética con bencilamina de la mezcla de epóxidos (5) se realiza en un alcohol estéricamente impedido seleccionado entre isopropanol, *sec*-butanol, *terc*-butanol, 2-metil-2-butanol, alcohol isoamílico, 2-metil-2-pentanol, obteniéndose solo el aminoalcohol SR (8), mientras que el epóxido SS (9) se recupera inalterado.
12. El método de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde el alcohol estéricamente impedido es 2-metil-2-butanol.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el aminoalcohol RS (6) se hace reaccionar con el epóxido SS (9) para proporcionar el Nebivolol *l*-bencilado (10) y/o el aminoalcohol SR (8) se hace reaccionar con el epóxido RR (7) para proporcionar el Nebivolol *d*-bencilado (11).
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde los compuestos (10) y (11) se mezclan en una relación 1:1, se desprotegen del grupo bencilo para proporcionar el producto final Nebivolol.
15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el producto final Nebivolol se salifica con ácido clorhídrico, obteniéndose el clorhidrato correspondiente.