

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

REF: EXPEDIENTE 05-021-991

TÍTULO SOLICITADO: "MÉTODO PARA LA SEPARACIÓN DE INTERMEDIARIOS QUE PUEDEN SER UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE ESCITALOPRAM"

PUBLICACIÓN: GACETA 567 DE 31-08-2006, NÚMERO DE PUBLICACIÓN 366

**PRIORIDAD: DK PA 2002 01201 (12/08/2002)
US 60/403,088 (12/08/2002)**

SOLICITANTE: H. LUNDBECK A/S

APODERADO: EMILIO FERRERO

TRÁMITE: SUSTENTACIÓN DE OPOSICIÓN

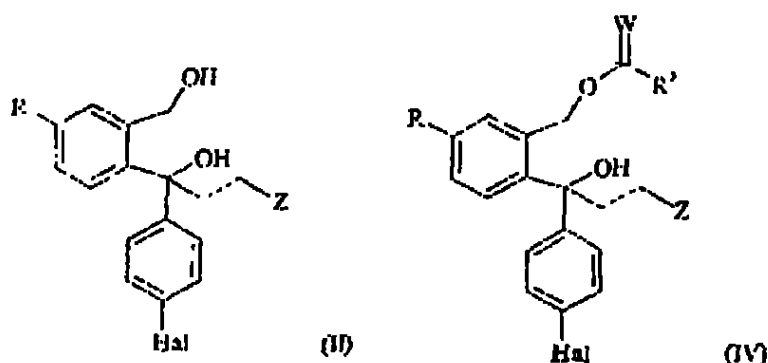
JOSÉ LUIS REYES VILLAMIZAR, identificado como aparece al pie de mi firma, reconocido apoderado del opositor en el trámite de la referencia, estando dentro de los términos de la prórroga solicitada, por medio del presente escrito me permito ratificar y sustentar los argumentos del escrito de oposición, también radicado dentro del plazo de ley ante esa entidad.

I. RATIFICACIÓN

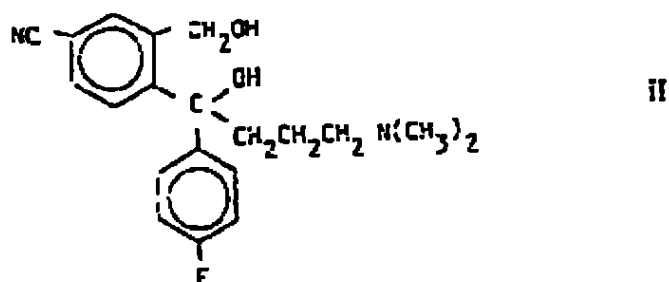
Reitero a su Despacho la solicitud de negar el beneficio patentario para la totalidad de las reivindicaciones contenidas en el expediente en referencia, por los argumentos que fueron expuestos en el escrito de oposición del 28 de Noviembre de 2006. En efecto, es evidente que en el estado del arte ya se encontraban

algunas solicitudes de patente que proporcionan métodos o procesos para obtener Citalopram como mezcla racémica o sus correspondientes enantiómeros, los cuales hacen uso de intermediarios comunes a los que se presentan en la solicitud colombiana en trámite, y que demuestran la ausencia de nivel inventivo de ésta última.

Por ejemplo, la solicitud en curso se refiere a un método para la preparación de intermediarios diol de fórmula (II) o de fórmula (IV) útiles para la preparación de Escitalopram que involucra la acilación o desacilación enzimática selectiva.



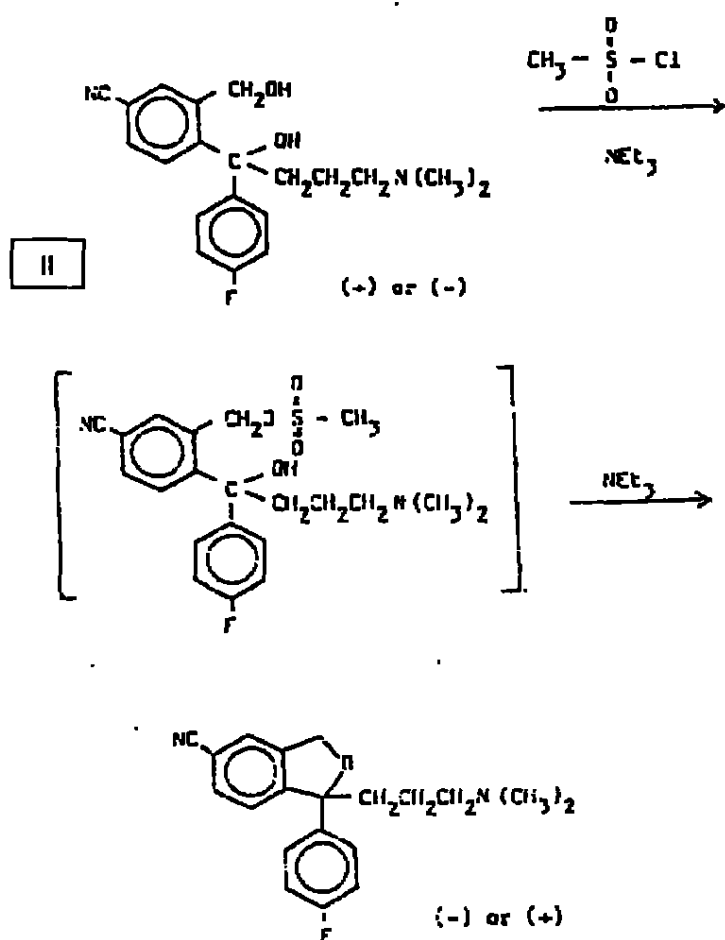
Para 1989, la patente europea EP 0 347 066 A1 "NEW ENANTIOMERS AND THEIR ISOLATION" revelaba los dos nuevos enantiómeros del fármaco antidepresivo 1-(3-dimetilaminopropil)-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidroisobenzofuran-5-carbonitrilo (citalopram) y demostraba además, que es posible resolver el intermediario 4-(4-dimetilamino)-1-(4-fluorofenil)-1-(hidroxibutil) -3-(hidroximetilbenzonitrilo, de fórmula (II) en sus enantiómeros y finalmente por vía estereoselectiva convertir estos enantiómeros a los correspondientes enantiómeros de Citalopram.



Como vemos, en las dos solicitudes se usa el mismo compuesto de tipo diol (compuesto de fórmula II colombiano y compuesto II de la EP 0 347 066 A1) como intermediario en la obtención de Citalopram.

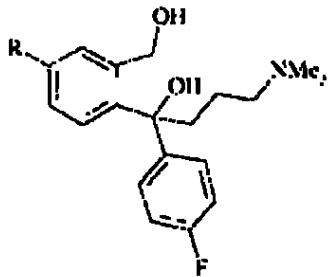
Adicionalmente, y si se tiene en cuenta el esquema de reacción consignado en la EP 0 347 066 A1 tantas veces mencionado, y si se hace una comparación entre los dos procesos tenemos que en ambos casos la reacción tiene el mismo material de partida (Compuesto de fórmula II –diol R ó S), el cual es sometido a acilación, se obtiene un éster lábil del mismo y posteriormente en condiciones básicas se logra el cierre de anillo y en consecuencia se obtiene Citalompram (+) ó (-) para la EP y S-Citalopram para la Solicitud Colombiana.

REACTION SCHEME II



De otro lado, en 1999 la publicación internacional WO 99/30548 "METHOD FOR THE PREPARATION OF CITALOPRAM", revelaba y como su nombre lo dice, un método para la preparación de Citalopram como se describe a continuación:

In a preferred embodiment of the invention the intermediate of Formula IV is prepared by ring closure of the corresponding compound of Formula VI:



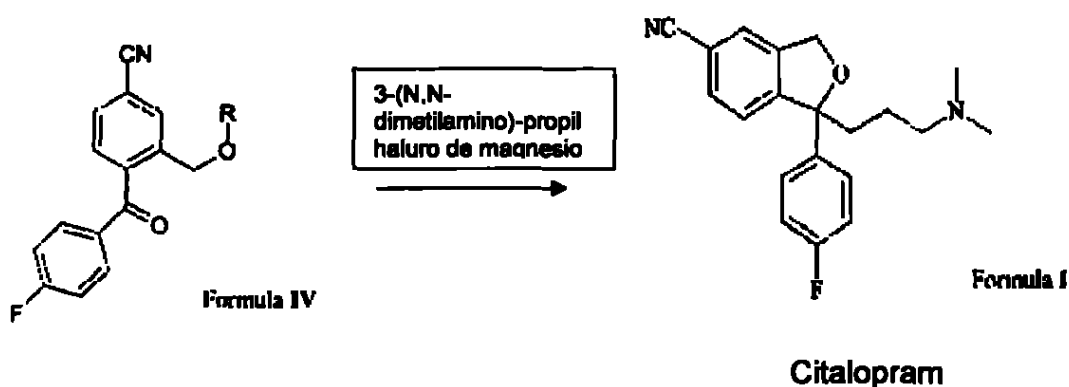
Formula VI

Ring closure of the compound of Formula VI may be effected by an acid or via a labile ester with a base. Acidic ring closure is performed by an inorganic acid, such as a sulfuric or phosphoric acid, or an organic acid, such as methylsulfonic, p-toluenesulfonic or trifluoroacetic acid. The basic ring closure is performed via a labile ester, such as the methane sulfonyl, p-toluene sulfonyl, 10-camphorsulfonyl, trifluoroacetyl or trifluoromethanesulfonyl ester with addition of a base, such as triethyl amine, dimethylaniline, pyridine, etc. The reaction is performed in an inert solvent, preferably with cooling, in particular about 0 °C and is preferably carried out by a one-pot procedure, i.e. with esterification and simultaneous addition of the base. Before further reaction the intermediate of Formula VI may be separated into its enantiomers, thereby obtaining the enantiomer giving S-citalopram.

Al comparar lo expuesto con la materia que revela la solicitud colombiana en trámite, la cual, se reitera, describe que la preparación de **Escitalopram comprende la reacción del enantiómero S de un diol de fórmula (IIs) y el posterior cierre del anillo en condiciones básicas del enantiómero S de fórmula (IIs) o un derivado de éster lábil de mismo**, tenemos que en ambos documentos el método de preparación de S-Citalopram es muy similar, en tanto uno y otro emplean los mismos compuestos o intermediarios –tipo diol-, y que la única diferencia que en gracia de discusión existiría entre ellos sería la forma de obtener la resolución óptica del compuesto racémico, diferencia que en caso de existir no resultaría lo suficientemente relevante como fundamento de Novedad ni mucho menos de Nivel Inventivo.

II. COMPLEMENTO DE INFORMACIÓN

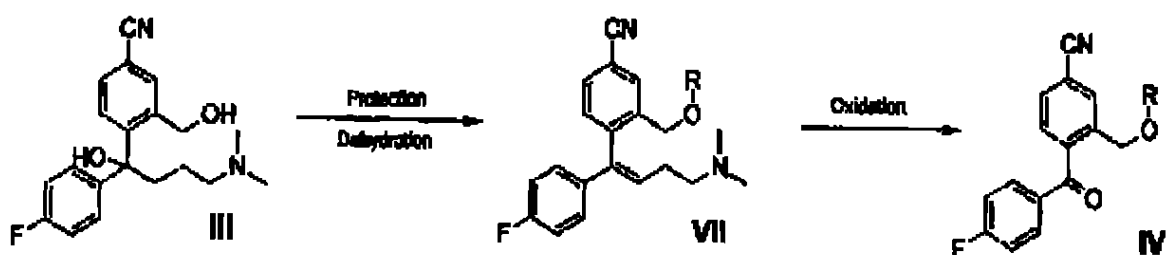
- La publicación internacional WO 00/12044 "METHOD FOR THE PREPARATION OF CITALOPRAM", publicada el 9 de marzo del 2000, revela como su nombre lo dice, un método para la preparación de citalopram que comprende:



En el capítulo reivindicatorio se describe de manera detallada la obtención de distintos intermediarios que intervienen en la síntesis de dicho compuesto antidepresivo, y particularmente (reivindicación 6) se puede observar que en este método se usan también compuestos de tipo R-diol (Compuesto de fórmula III) que, a través de una serie de pasos permite la obtención de Citalopram, tal como se pretende en la solicitud de patente colombiana en trámite.

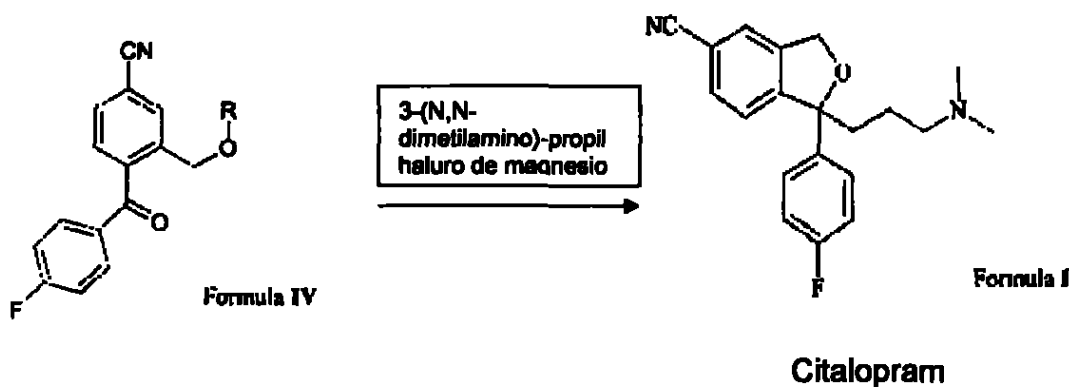
Veamos con más detalle lo revelado en la parte descriptiva de la anterioridad mencionada:

According to the third method for preparing the compound of Formula IV, one of the enantiomers of the compound of Formula III, i.e. the R-enantiomer, is subjected to protection and dehydration to give the compound of Formula VII, which is oxidised to give the ketone of Formula IV.



In this way, the R-enantiomer of Formula III may be used in the preparation of racemic citalopram.

Luego, el compuesto de fórmula IV reacciona con 3-(N,N-dimetilamino)-propil haluro de magnesio para permitir la ciclación de la molécula y permite así obtener Citalopram:



Como se observa, el método propuesto señala que se obtiene Citalopram mezcla racémica, sin embargo, en la página 5 de la parte descriptiva se afirma que:

The active S-enantiomer of citalopram may be prepared from the compound of Formula III by separation of the S-enantiomer and the R-enantiomer followed by ring closure of the S-enantiomer as described in US Patent No 4,943,590. The R-enantiomer of the compound of Formula III has previously not been used after separation.

Lo anterior significa que, a pesar de que el proceso descrito en la anterioridad no permite conseguir de manera directa el enantiómero S de Citalopram, este puede ser obtenido usando el compuesto de fórmula III (diol), separando los enantiómeros y cerrando el anillo tal como es divulgado en la patente americana referenciada.

Ahora bien, si se compara lo anteriormente expuesto con lo revelado en la solicitud colombiana en trámite tenemos algunas similitudes importantes:

- En ambos casos se hace uso del mismo compuesto intermediario como es un enantiómero de un diol; para la solicitud colombiana es el compuesto de fórmula (IIa); para la publicación internacional es el compuesto de fórmula (III);
- En ambos casos se puede obtener S-Citalopram luego del cierre del anillo en condiciones básicas.

De igual manera, es importante admitir que existen unas ligeras diferencias entre los procesos, a saber, el número de pasos o de etapas y el origen del compuesto de tipo diol; mientras que el intermediario diol de la publicación internacional WO

00/12044 se obtiene luego de una serie de reacciones de Grignard (ver a su vez US 4,650,844 y US 4,943,590), el intermediario diol de la solicitud colombiana en trámite se obtiene mediante el uso de enzimas inmovilizadas conocidas en el estado de arte y útiles en la síntesis de compuestos óptimamente puros.

En consecuencia, lo anteriormente discutido y en unión a lo que se expresará en el siguiente punto, demuestra una vez más la falta de nivel inventivo que envuelve a la solicitud colombiana en trámite.

- Otro aspecto que es importante resaltar es el relacionado con el uso de enzimas inmovilizadas en la síntesis de compuestos; como se observa, en las reivindicaciones 51 a 53 de la solicitud colombiana en trámite se revela que la acilación o desacilación enzimática se lleva a cabo con una hidrolasa en forma de una enzima inmovilizada, cristalizada y reticulada, donde la hidrolasa puede ser una lipasa, una estearasa, una acilasa o una proteasa.

En este punto es necesario destacar que, y según Miguel Arroyo¹:

Actualmente el método más novedoso de cross-linking consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs). El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50Å) que permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción. Estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos, así como la acción de las proteasas. Esta tecnología se ha aplicado a enzimas muy diferentes (8), las cuales se han utilizado en la obtención de compuestos enantioméricamente puros y en la síntesis de péptidos.

La Industria Farmacéutica trabaja con moléculas lábiles, y en muchos casos con moléculas quirales. El empleo de enzimas inmovilizadas es una alternativa seria a la síntesis química en pasos clave, donde no conviene trabajar a temperaturas altas o se requiere una elevada especificidad de sustrato. Las enzimas son unos reactivos quirales estrictos, es decir, biocatalizadores con una estructura tridimensional asimétrica definida que permiten la obtención de productos de gran pureza óptica. Se trata de una ventaja fundamental cuando las reglamentaciones exigen la síntesis de compuestos ópticamente puros, ya sean fármacos, hormonas o antibióticos.

¹ *Ars Pharmaceutica*, 39:2; 23-39, 1998. "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Dr Miguel Arroyo. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

De igual manera, en dicho texto se demuestra que las enzimas inmovilizadas son de gran utilidad por ejemplo, en la obtención de antibióticos β -lactámicos y en la obtención de fármacos óptimamente puros como se designa a continuación:

La actividad biológica, la toxicidad, la distribución y el metabolismo de un fármaco dependen en gran medida de su estereoquímica (23). Hay muchos ejemplos que ilustran el diferente comportamiento farmacológico de los enantiómeros de una mezcla racémica. En algunos casos, un enantiómero presenta actividad mientras que el otro no tiene efecto farmacológico; uno es tóxico frente al otro que demuestra ser seguro y activo; e incluso hay casos en los que uno es agonista frente al otro que se comporta como antagonista (24). A pesar de todo, la mayoría de estos fármacos se han vendido como mezclas racémicas hasta hace poco al no existir una normativa clara al respecto, ni métodos económicos para realizar la separación de enantiómeros. La Industria Farmacéutica ha empezado a superar este último problema introduciendo métodos enzimáticos en la obtención de fármacos ópticamente puros (25). Un ejemplo es el empleo de lipasas microbianas inmovilizadas (26) en la obtención de antiinflamatorios no esteroideos (Figura 7). El isómero S de estos ácidos (ibuprofeno, naproxeno o ketoprofeno) es el que posee actividad terapéutica, y también se ha obtenido con una gran pureza óptica empleando cristales reticulados de lipasa de *Candida rugosa* (CLEC-CR[®]) (27).

Como se observa, por lo menos desde 1998 ya se hacía evidente el empleo de enzimas inmovilizadas o reticuladas en la obtención de fármacos ópticamente puros -en este caso particular, en la obtención del isómero S de AINES-, ahora, en el método o procedimiento utilizado en la solicitud colombiana 05-021-991 en trámite y para efectos comparativos se pretende lo mismo, la obtención de intermediarios ópticamente puros útiles en la síntesis de Escitalopram; esto y sin discusión alguna, demuestra nuevamente la falta de nivel inventivo que envuelve la solicitud colombiana en trámite.

- De otro lado, la utilización de la lipoproteína lipasa B obtenida de *Thermomyces lanuginosus* (LypozymeTM TLIM y Novozyme[®] 435) o de *Candida Antartica* para acilación o desacilación tal como se describe en la solicitud Colombiana en trámite y que se menciona explícitamente en las reivindicaciones 54 a 65, es común en diversos procesos de síntesis y obtención de compuestos ópticamente puros, como se muestra en los siguientes abstracts de publicaciones de carácter científico:

A. Nathan K. Yee,* Laurence J. Nummy, Denis P. Byrne, Lana L. Smith, and Gregory P. Roth. "Practical synthesis of an enantiomerically pure *trans*-4,5-disubstituted 2-pyrrolidinone via enzymatic resolution. Preparation of the LTB₄ inhibitor BIRZ-227. *J. Org. Chem.* 63 (2), 326-330 1998.

Abstract

A practical synthesis of the enantiomerically pure BIRZ-227 (1), a LTB₄ inhibitor, has been developed. The key steps include the effective synthesis of the *trans*-diarylpyrrolidinone (+/-)-8 and the enzymatic resolution of *N*-acetoxymethyl pyrrolidinone (+/-)-10 by immobilized Lipase Novozym 435. Reduction of pyrrolidinone (+)-8 with borane and subsequent coupling with chlorobenzoxazole 2 furnished BIRZ-227 in high enantiomeric purity (99%). The overall process described herein required no chromatographic separation and is amenable to the preparation of multikilogram quantities of the desired drug candidate in a cost-effective manner.

- B. Bruno Danieli,^{*,†} Monica Luisetti,[†] Sabine Steurer,[‡] Astrid Michelitsch,[‡] Werner Likussar,[‡] Sergio Riva,[§] Josef Reiner,[^] and Manfred Schubert-Zsilavecz^{*}, "Application of lipase-catalyzed regioselective esterification in the preparation of digitonin derivatives"; *J. Nat. Prod* 1999, 62, 670-673:

Abstract

The oligosaccharide chain of the monodesmosidic haemolytic saponin digitonin (1) **undergoes an efficient and regioselective acylation in organic solvent by use of Novozym 435 (lipase B from *Candida Antarctica* supported on acrylic resin)** in the presence of an activated ester. With vinyl acetate, acetylation occurs at C-6 OH of glucose(II) and C-4 OH of xylose to afford the previously unreported diacetyl derivative 2 and the monoacetyl derivatives 3 and 4. With vinyl laurate only the monolauryl derivative 5 is formed. The structures of these acylated digitonins have been established using modern 2D NMR techniques, which allowed complete assignments of all proton resonances. The hemolytic activity of derivatives 2-5 is significantly reduced compared to that of digitonin.

- C. Xifu Liang and Mikael Bols. "Chemoenzymatic synthesis of enantiopure 1-azafagomine" *J. Org. Chem.* 1999, 64, 8485-8488:

A new chemoenzymatic synthesis of both enantiomeric forms of the glycosidase inhibitor 1-azafagomine (1) is reported. The synthesis starts from the achiral starting materials pentadienol and methylurazol with the key **steps being a hetero-Diels-Alder reaction followed by a lipase R/Novozym 435-catalyzed enantioselective esterification of the Diels-Alder adduct.**

- D. Kirpal S. Bisht,^{†,§} Richard A. Gross,^{*,†} and David L. Kaplan. "ENZYME-MEDIATED REGIOSELECTIVE ACYLATIONS OF SOPHOROLIPIDS" *J. Org. Chem.* 1999, 64, 780-789.

Enzymatic synthesis of well-defined sophorolipid analogues for evaluation of their bioactivities and as new building blocks for the preparation of glycolipid-based amphiphilic polymers is described. **Lipase Novozym 435 from *Candida Antarctica* has been shown to be an efficient catalyst for acylation of sophorolipids esters.** A mixture of sophorolipids produced by *Torulopsis bombicola* was esterified by reaction with sodium alkoxide. **The alkyl esters of sophorose lipids were subjected to Novozym 435 catalyzed acylation** in dry tetrahydrofuran (THF) with vinyl acrylate and vinyl acetate to diacyl derivatives. The reactions were highly regioselective, and exclusive acylation of the hydroxyl groups on C-6' and C-6'' took place. Methyl ester in the absence of the acylating agent, or with the agent at a concentration less than equimolar, gave sophorolactone (9). Careful analysis of the spectral data revealed it to be a synthetic analogue of microbially produced macrolactone. Sophorolactone (9) differs in the site at which the sophorose ring is attached to the fatty acid. Specifically, in 9, unlike the natural sophorolipids, the fatty acid carboxyl carbon is linked to the C-6'' hydroxyl, not to the C-4'' hydroxyl.

372-10

Subsequent acrylation of 9 catalyzed by Novozym 435 led to the formation of the C-6' monoacryl derivative linked only to the primary site.

Por lo expuesto anteriormente reitero la petición de declarar fundada la presente oposición, de negar en consecuencia el privilegio solicitado, y de ordenar el archivo del expediente respectivo.

III. PRUEBAS

Ruego que se tengan como tales, sin perjuicio de que el Despacho considere oficiosamente, las siguientes:

- Publicación internacional WO 00/12044 "METHOD FOR THE PREPARATION OF CITALOPRAM", publicada el 9 de marzo del 2000, páginas 5, 6, capítulo reivindicatorio páginas 14 a 17.
- *Ars Pharmaceutica*, 39:2; 23-39, 1998. "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Dr. Miguel Arroyo. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Páginas 7, 12 y 13.
- Abstract - Nathan K. Yee,* Laurence J. Nummy, Denis P. Byrne, Lana L. Smith, and Gregory P. Roth. "Practical synthesis of an enantiomerically pure *trans*-4,5-disubstituted 2-pyrrolidinone via enzymatic resolution. Preparation of the LTB₄ inhibitor BIRZ-227. *J. Org. Chem.* 63 (2), 326-330 1998.
- Abstract - Bruno Danieli,* Monica Luisetti, Sabine Steurer, Astrid Michelitsch, Werner Likussar, Sergio Riva, Josef Reiner, and Manfred Schubert-Zsilavecz*, "Application of lipase-catalyzed regioselective esterification in the preparation of digitonin derivatives"; *J. Nat. Prod* 1999, 62, 670-673.
- Abstract - Xifu Liang and Mikael Bols. "Chemoenzymatic synthesis of enantiopure 1-azafagomine" *J. Org. Chem.* 1999, 64, 8485-8488.

323

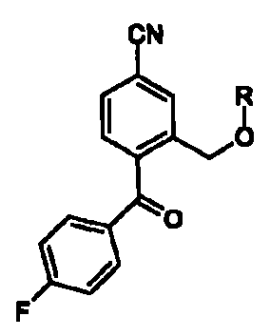
- Abstract - Kirpal S. Bisht,^{†,§} Richard A. Gross,^{*,†} and David L. Kaplan.
"ENZYME-MEDIATED REGIOSELECTIVE ACYLATIONS OF
SOPHOROLIPIDS" *J. Org. Chem.* 1999, 64, 780-789.

Señor Superintendente,

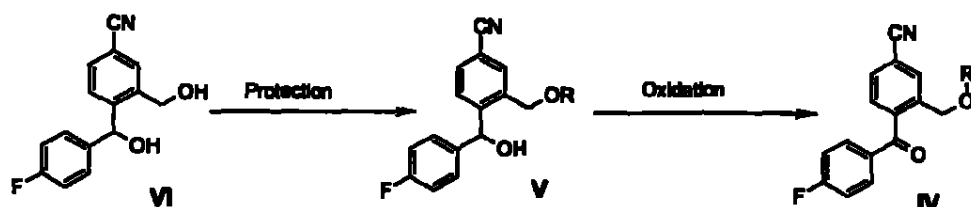


JOSÉ LUIS REYES VILLAMIZAR

C.C. 79.152.473 de Usaquén
T.P.A. 44.655 de C.S.J.

(51) International Patent Classification ⁷ : A61K	A2	(11) International Publication Number: WO 00/12044 (43) International Publication Date: 9 March 2000 (09.03.00)
(21) International Application Number: PCT/DK99/00581 (22) International Filing Date: 25 October 1999 (25.10.99) (71) Applicant (for all designated States except US): H. LUNDBECK A/S (DK/DK); Østlievej 9, DK-2500 Valby Copenhagen (DK). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): ROCK, Michael, Harold (GB/DK); Rishjergvej 28, DK-2650 Hvidovre (DK). PETERSEN, Hans (DK/DK); Guldagervej 11, DK-2720 Vmlyse (DK). ELJÆGAARD, Peter (DK/DK); Knud Lavardavej 98, DK-4174 Jystup (DK). (74) Common Representative: H. LUNDBECK A/S; John Meikahl Petersen, Østlievej 9, DK-2500 Valby Copenhagen (DK).		(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BR, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SI, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (OH, GM, KE, LS, MW, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>Upon the request of the applicant, before the expiration of the time limits referred to in Article 21(2)(a). Without international search report and to be republished upon receipt of that report. Without classification; title and abstract not checked by the International Searching Authority.</i>
(54) Title: METHOD FOR THE PREPARATION OF CITALOPRAM  (IV) (57) Abstract A method for the preparation of citalopram comprising reaction of a compound of Formula (IV), wherein R is C₁₋₄ alkyl, acyl, C₁₋₄ alkylsulfonyl or arylsulfonyl, with 3-(N,N-dimethylamino)-propyl magnesium halide, to prepare citalopram.		

375



followed by an oxidation to afford the compounds of Formula IV, wherein R is C₁₋₆ alkyl, acyl, C₁₋₆ alkylsulfonyl or arylsulfonyl.

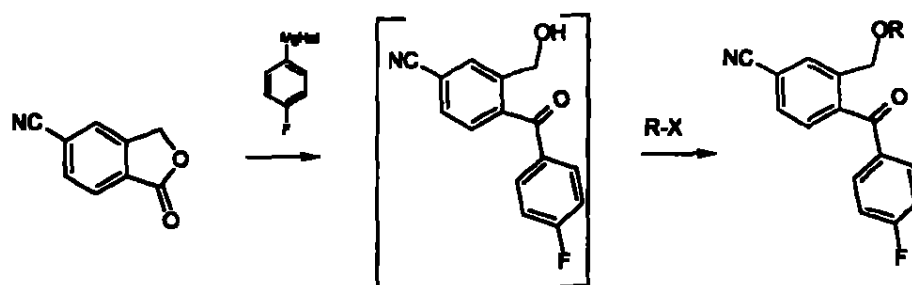
5

The oxidation of the compounds of Formula V, may be performed by any convenient oxidation agent, preferably performed by Na₂WO₄.

The starting material of the compound of Formula VI may be prepared as described in
10 International Patent Application No. PCT/DK97/00511.

Another method for preparing the compounds of Formula IV includes the reaction of 5-cyanophthalide with 4-fluorophenylmagnesiumhalide, preferably 4-fluorophenylmagnesiumbromide followed by the reaction with R-X, wherein R is as defined above and X
15 is a leaving group, preferably R-X is pivaloylchloride, 3,5-dimethoxybenzoylchloride, methyl iodide, ethylbromide, tosylchloride, Me₂SO, or MeSO₂Cl.

The reaction is illustrated below:

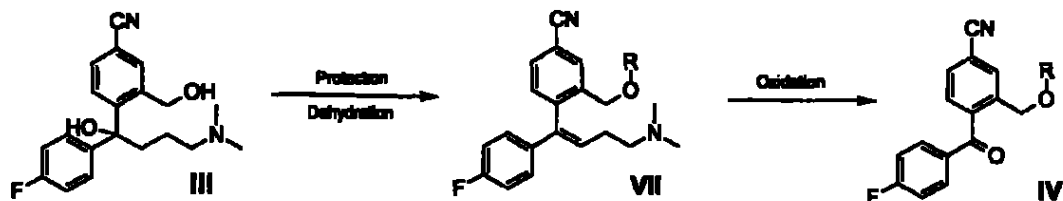


20 The starting material, 5-cyanophthalide, may be prepared as described in Tirouflet, J.; Bull.Soc.Sci. Bretagne 26, 1959,35.

According to the third method for preparing the compound of Formula IV, one of the enantiomers of the compound of Formula III, i.e. the R-enantiomer, is subjected to protection
25 and dehydration to give the compound of Formula VII, which is oxidised to give the ketone of Formula IV.

376

6



In this way, the R-enantiomer of Formula III may be used in the preparation of racemic citalopram.

5

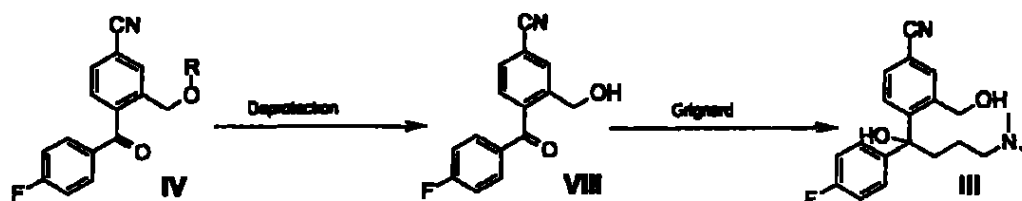
The oxidative cleavage of the compound of Formula VII is effected by oxidation, preferably performed by MnO_4^- (permanganates), or ozone, RuCl_3 , OsO_4 .

Citalopram is on the market as an antidepressant drug in the form of the racemate. However, in the near future the active S-enantiomer of citalopram is also going to be introduced to the market.

The active S-enantiomer of citalopram may be prepared from the compound of Formula III by separation of the S-enantiomer and the R-enantiomer followed by ring closure of the S-enantiomer as described in US Patent No 4,943,590. The R-enantiomer of the compound of Formula III has previously not been used after separation.

Furthermore, according to a further aspect of the invention, after conversion of the R-enantiomer of Formula III to the non-optically active compound of Formula IV, the racemic compound of Formula III may be prepared as illustrated below:

20



The racemic compound of Formula III may be separated into the optically active enantiomers by the procedure described in US Patent No 4,943,590 thereby obtaining the S-enantiomer of the compound of Formula III, which is used in the preparation of S-citalopram. The R-enantiomer of the compound of Formula III can be recycled once more in the process cycle described above.

25

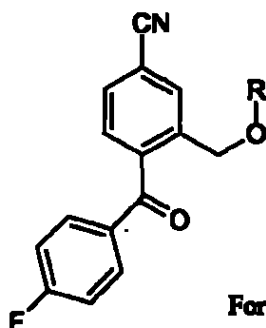
In this way, the R-enantiomer of Formula III may be converted to S-citalopram.

30

377

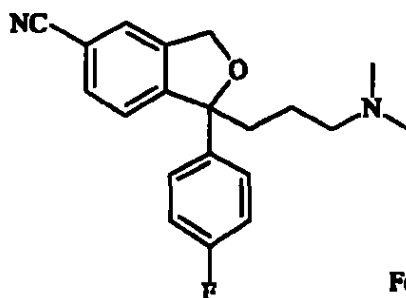
CLAIMS

1. A method for the preparation of citalopram comprising reaction of a compound of Formula IV



Formula IV

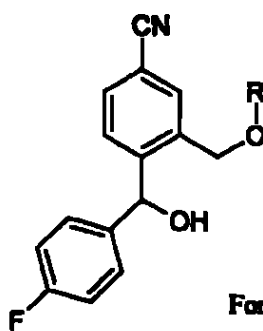
wherein R is C₁₋₄ alkyl, acyl, C₁₋₄ alkylsulfonyl or arylsulfonyl, with 3-(N,N-dimethylamino)propyl magnesium halide, preferably 3-(N,N-dimethylamino)propyl magnesium chloride to afford citalopram



Formula I

which is isolated as the base or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. The method of Claim 1 characterised in that the intermediate of Formula IV is prepared by oxidation of the corresponding compound of Formula V:

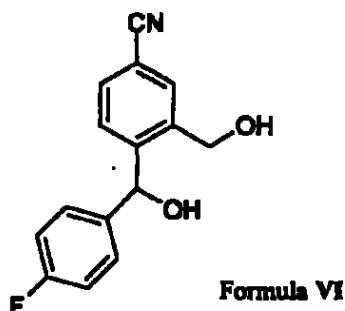


Formula V

wherein R is as defined in Claim 1.

3. The method of Claim 2 characterised in that the compound of Formula V is prepared by protection of the hydroxymethylalcohol of (4-cyano-2-hydroxymethylphenyl)(4-fluorophenyl)methanol of Formula VI:

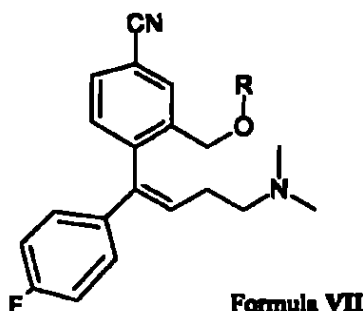
5



Formula VI

4. The method of Claim 1 characterised in that the intermediate of Formula IV is prepared by oxidative cleavage of the corresponding compound of Formula VII:

10



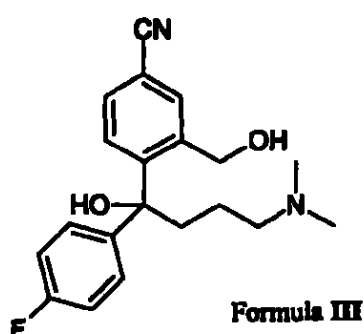
Formula VII

wherein R is as defined in Claim 1.

15 5. The method of Claim 4 characterised in that the oxidative cleavage of the compound of Formula VII is effected by oxidation preferably performed by MnO₄⁻ (permanganates), or ozone, RuCl₃, OsO₄.

20 6. The method of any of the Claims 4 - 5 characterised in that the intermediate alkene of Formula VII is prepared by protection and dehydration of the corresponding compound of Formula III:

16



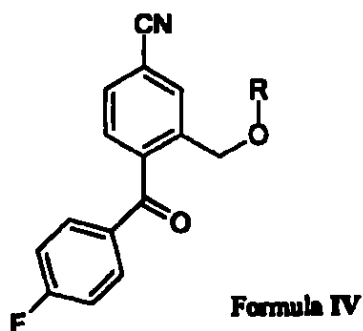
wherein the compound of Formula III is the R-enantiomer.

7. The method of Claim 1 characterised in that the intermediate of Formula IV is prepared
 5 by the reaction of 5-cyanophthalide with 4-fluorophenylmagnesiumhalide, preferably 4-fluorophenylmagnesiumbromide followed by the reaction with R-X to prepare the ketone compound of Formula IV, wherein R is as defined in Claim 1 and X is a leaving group, preferably R-X is pivaloylchloride, 3,5-dimethoxybenzoylchloride, methyl iodide, ethylbromide, tosylchloride, Me_2SO , or MeSO_2Cl .

10

8. The method for the preparation of the racemic compound of Formula III comprising the steps of

- a) deprotecting a compound of Formula IV

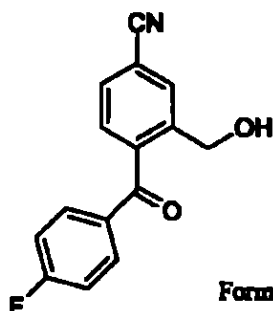


15

wherein R is as defined in Claim 1

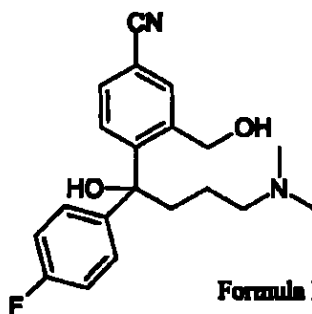
- b) reacting the resulting compound of Formula VIII

17



Formula VIII

with 3-(N,N-dimethylamino)propyl magnesium halide, preferably 3-(N,N-dimethylamino)propyl magnesium chloride to prepare the racemic compound of Formula III

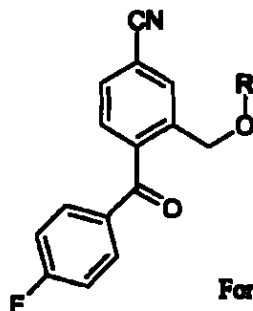


Formula III

5

9. The method of any of the Claims 1 – 8 wherein R is acyl, preferably pivaloyl, acetyl or optionally substituted benzoyl.

10 10. A compound of Formula IV:



Formula IV

wherein R is C₁₋₆ alkyl, acyl, C₁₋₆ alkylsulfonyl or arylsulfonyl, preferably pivaloyl, acetyl or optionally substituted benzoyl.

15 11. An antidepressant pharmaceutical composition comprising citalopram manufactured by the process of any of the Claims 1 – 9.

12. Use of an intermediate of Claim 10 for the preparation of citalopram or S-citalopram.

19
20

Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones

Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications

DR. MIGUEL ARROYO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Complutense de Madrid 28040 Madrid

Tfno: 34-1-3944150 Fax: 34-1-3944672 e-mail: arroyo@soles.quim.ucm.es

RESUMEN

La inmovilización de enzimas permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos; en el tratamiento de residuos; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y otras muchas aplicaciones. En esta revisión se analizan los diferentes métodos de inmovilización de enzimas, y el efecto sobre las propiedades catalíticas y la estabilidad de los biocatalizadores obtenidos.

Palabras clave: Inmovilización de enzimas. Estabilidad de enzimas.

ABSTRACT

Immobilization of enzymes can dramatically improve their stability, and the biocatalysts available for the industrial production of chemicals, drugs and foods; waste treatment; clinical analyses and disease treatment and many other applications. In this review, different methods of immobilization of enzymes and the effect on catalytic properties and the stability of biocatalysts are considered.

Key words: Enzyme immobilization. Enzyme stability.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances y, paralelamente sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos:

Presentan una gran actividad catalítica;

Muestran una gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad);

Son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica.

A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar.

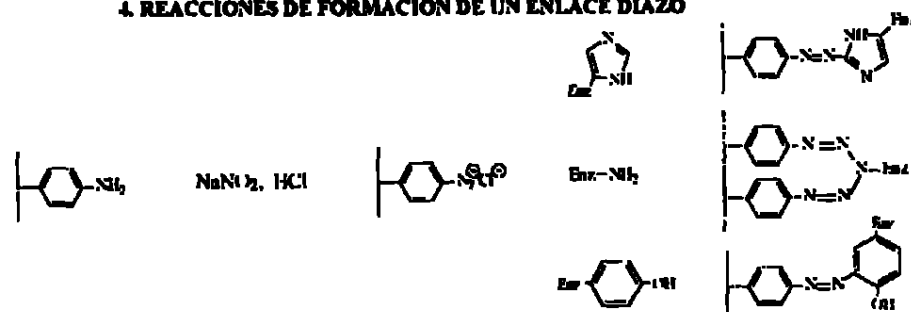
Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

II. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

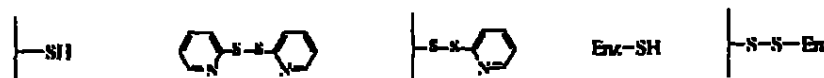
La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y

20-
382

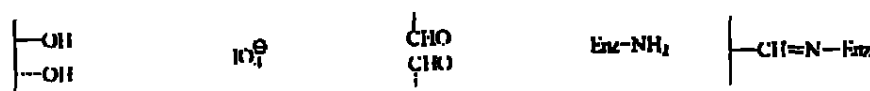
4. REACCIONES DE FORMACIÓN DE UN ENLACE DIAZO



5. REACCIONES DE INTERCAMBIO TIOL-DISULFURO



6. REACCIONES DE FORMACIÓN DE UNA BASE DE SCHIFF



IV.2. Reticulado

También denominado entrecruzamiento o *cross-linking*, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas (7). El método del reticulado consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. El co-reticulado, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, la albúmina bovina). Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional.

Actualmente el método más novedoso de cross-linking consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs). El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50Å) que permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción. Estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos, así como la acción de las proteasas. Esta tecnología se ha aplicado a enzimas muy diferentes (8), las cuales se han utilizado en la obtención de compuestos enantioméricamente puros y en la síntesis de péptidos.

V. EFECTOS DE LA INMOVILIZACIÓN

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar se producen cambios en su estabilidad. En segundo lugar, la enzima inmovilizada es un sistema

383

1. la instrumentación requerida es barata y sencilla,
2. el análisis es muy sensible,
3. permite el uso de muestras con color o turbias que no se podrían medir con métodos espectroscópicos.

Los métodos de inmovilización más utilizados en el diseño de biosensores son la inclusión en membranas semipermeables y la unión covalente a membranas. En ambos casos, las enzimas inmovilizadas van adheridas a la superficie sensible del electrodo (18).

Aplicaciones de los biosensores:

- Como se indicó anteriormente, los biosensores son de gran utilidad en el campo del diagnóstico clínico. Los niveles séricos de glucosa, lactato y ácido úrico se pueden detectar mediante electrodos enzimáticos disponibles comercialmente. Actualmente, el desarrollo de nuevos biosensores va dirigido a la detección de fármacos, células y virus patógenos.
- En el caso del control de calidad en las industrias alimentarias, los biosensores pueden determinar el grado de contaminación microbiana, o por ejemplo, cuantificar el azúcar presente en bebidas.
- Finalmente, los biosensores pueden ser muy útiles en el control de la polución del medioambiente. Los analizadores de contaminantes en el agua se basan en el empleo de biosensores capaces de detectar la presencia de residuos tóxicos, pesticidas, herbicidas o microorganismos.

VII.2. Aplicaciones médicas

Existen muchas enfermedades causadas por una alteración o carencia de una determinada enzima. También hay enzimas con actividad antitumoral, cicatrizante y con otras acciones terapéuticas. El tratamiento con estas enzimas inmovilizadas permitiría una acción más prolongada, ya que serían más resistente a la acción de las proteasas. Por ejemplo, la L-asparaginasa se utiliza en el tratamiento de leucemias y cánceres diseminados que requieren asparagina para desarrollarse. En la actualidad se ha diseñado un hemodializador de fibra hueca que contiene asparaginasa inmovilizada (19). La tripsina o la colagenasa se utilizan para eliminar los tejidos muertos de heridas, quemaduras, úlceras, etc.; para acelerar el crecimiento de nuevos tejidos e injertos de piel, y también para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos contaminantes. Este tipo de enzimas se pueden inmovilizar en celulosas o fibras que formarán parte del tejido de apósitos y vendas (20).

VII. 3. Aplicaciones en la Industria Farmacéutica

La Industria Farmacéutica trabaja con moléculas lábiles, y en muchos casos con moléculas quirales. El empleo de enzimas inmovilizadas es una alternativa seria a la síntesis química en pasos clave, donde no conviene trabajar a temperaturas altas o se requiere una elevada especificidad de sustrato. Los enzimas son unos reactivos quirales estrictos, es decir, biocatalizadores con una estructura tridimensional asimétrica definida que permiten la obtención de productos de gran pureza óptica. Se trata de una ventaja fundamental cuando las reglamentaciones exigen la síntesis de compuestos ópticamente puros, ya sean fármacos, hormonas o antibióticos.

1) Obtención de antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos semisintéticos, se sintetizan a partir del ácido 6-amino penicilánico (6-APA) y del ácido 7-amino cefalosporánico (7-ACA) o el ácido 7-amino desacetoxi-cefalosporánico (7-ADCA). El 6-APA, precursor de las penicilinas semisintéticas (amoxicilina, ampicilina, etc.), se obtiene industrialmente mediante la hidrólisis de la penicilina G catalizada por las penicilina G acilasas

22
184

inmovilizadas de *E. coli* o *Bacillus megaterium* (Figura 6).

Se calcula que la producción anual mundial de 6-APA mediante este método fue de 7500 toneladas en 1992 (21). La producción industrial de 7-ACA o 7-ADCA a partir de la cefalosporina C es más

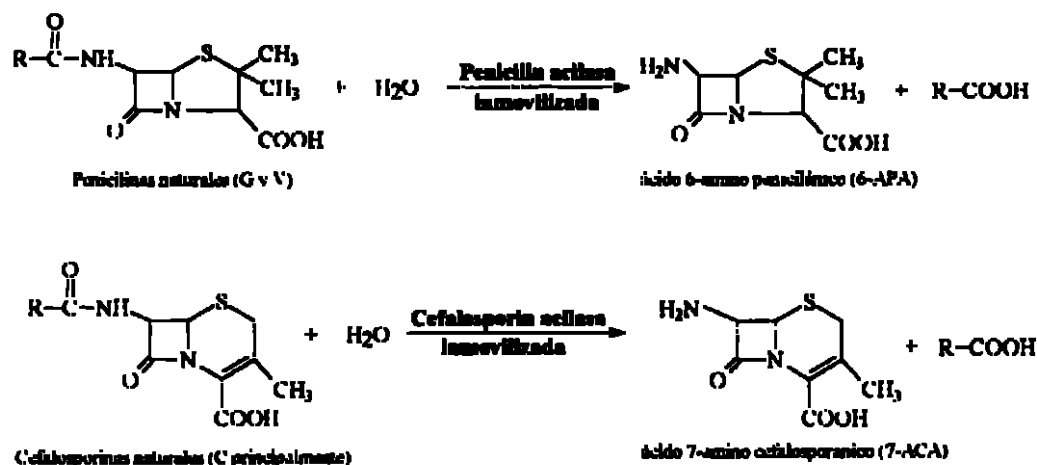


FIGURA 6. Obtención de los precursores de antibióticos semisintéticos mediante enzimas inmovilizadas

compleja, aunque ya se han desarrollado procesos enzimáticos para su producción (22).

2) Obtención de fármacos ópticamente puros

La actividad biológica, la toxicidad, la distribución y el metabolismo de un fármaco dependen en gran medida de su estereoquímica (23). Hay muchos ejemplos que ilustran el diferente comportamiento farmacológico de los enantiómeros de una mezcla racémica. En algunos casos, un enantiómero presenta actividad mientras que el otro no tiene efecto farmacológico; uno es tóxico frente al otro que demuestra ser seguro y activo; e incluso hay casos en los que uno es agonista frente al otro que se comporta como antagonista (24). A pesar de todo, la mayoría de estos fármacos se han vendido como mezclas racémicas hasta hace poco al no existir una normativa clara al respecto, ni métodos económicos para realizar la separación de enantiómeros. La Industria Farmacéutica ha empezado a superar este último problema introduciendo métodos enzimáticos en la obtención de fármacos ópticamente puros (25). Un ejemplo es el empleo de lipasas microbianas inmovilizadas (26) en la obtención de antiinflamatorios no esteroides (Figura 7). El isómero S de estos ácidos (ibuprofeno, naproxeno o ketoprofeno) es el que posee actividad terapéutica, y también se ha obtenido con una gran pureza óptica empleando cristales reticulados de lipasa de *Candida rugosa* (CLEC-CR[®]) (27).

VII. 4. Aplicaciones en la Industria Alimentaria

4
PS 23

Enzyme-Mediated Regioselective Acylations of Sophorolipids

Kirpal S. Bisht,^{1,2} Richard A. Gross,^{2,3} and David L. Kaplan¹¹ Polytechnic University, Six Metrotech Center, Brooklyn, New York 11201, and Department of Chemical Engineering, Tufts University, 4 Gully Street, Medford, Massachusetts 02155

Received July 28, 1998

Enzymatic synthesis of well-defined sophorolipid analogues for evaluation of their bioactivities and as new building blocks for the preparation of glycolipid-based amphiphilic polymers is described. Lipase Novozym 435 from *Candida antarctica* has been shown to be an efficient catalyst for acylation of sophorolipids esters. A mixture of sophorolipids produced by *Torulopsis bombicola* was esterified by reaction with sodium alkoxide. The alkyl esters of sophorose lipids were subjected to Novozym 435 catalyzed acylation in dry tetrahydrofuran (THF) with vinyl acetate and vinyl propionate to diacyl derivatives. The reactions were highly regioselective, and exclusive acylation of the hydroxyl groups on C-6' and C-6'' took place. Methyl ester in the absence of the acylating agent, or with the agent at a concentration less than equimolar, gave sophorolactone (9). Careful analysis of the spectral data revealed it to be a synthetic analogue of microbially produced macrolactone. Sophorolactone (9) differs in the site at which the sophorose ring is attached to the fatty acid. Specifically, in 9, unlike the natural sophorolipids, the fatty acid carboxyl carbon is linked to the C-6'' hydroxyl, not to the C-4'' hydroxyl. Subsequent acylation of 9 catalyzed by Novozym 435 led to the formation of the C-6' monoacyl derivative linked only to the primary site.

Introduction

Sophorolipids are microbial extracellular surface-active glycolipids. Cells of *Torulopsis bombicola* produce sophorolipids when they are grown on sugars, hydrocarbons, vegetable oils, or mixtures thereof. First described by Gorlin et al.,¹ in 1961, sophorolipids occur as a mixture of macrolactone and free acid structures that are acetylated to various extents at the sophorose ring primary hydroxyl positions (Figure 1). Careful examinations have revealed that at least eight structurally different sophorolipids are produced.² The main component was 17-hydroxyoctadecanoic acid and its corresponding lactone.³ It has been suggested that these lipids are not only essential for the growth of *T. bombicola* on water-insoluble alkanes but that they also inhibit the growth of other alkane-utilizing yeasts.⁴ Recent advances in microbial fermentation methods have made it possible to generate up to 700 g/L of sophorolipids.⁵

Work has been carried out to "tailor" sophorolipid (SL) structure during *in vivo* formation. These studies have mainly involved the selective feeding of different lipophilic substrates. For example, changing the cosubstrate from sunflower to canola oil resulted in a large increase (50% to 73%) of the lactonic portion of SLs.⁶ Also, unsaturated C-18 fatty acids of oleic acid may be trans-

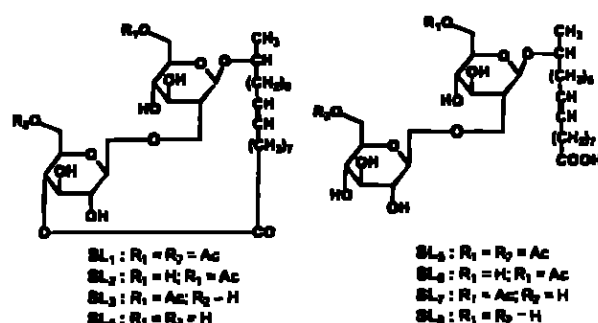


Figure 1. Structures of sophorolipids produced by *Torulopsis* sp.

ferred unchanged into sophorolipids.⁷ Thus, to date, physiological variables during fermentations have provided routes to the variation of sophorolipid composition but have not led to well-defined pure compounds. Our interest in sophorolipids arises due to their intriguing structures and potential application in a wide variety of fields. Sophorolipids are routinely prepared in our laboratory by fermentation of *T. bombicola* on glucose/oleic acid mixtures following a literature procedure.⁸

One of our goals was the development of suitable synthetic methods so that well-defined sophorolipid analogues would be in-hand for subsequent evaluation of their bioactivities. Review of the existing data on the use of glycolipids to treat very severe immune disorders is certainly promising. In summary, the glycolipids have

¹ Corresponding author, Herman F. Mark Professor.

² Polytechnic University.

³ Tufts University.

⁴ Dept. of Chemistry, University of South Florida, 4202 E. Fowler Ave., CHE 305, Tampa, FL 33620-5250.

(1) Gorlin, P. A. J.; Spencer, J. F. T.; Tulloch, A. P. *Can. J. Chem.* 1961, 39, 846.

(2) Davlin, A. M.; Marchal, R.; Morin, R.; Vandecastelle, J. P. *J. Chromatogr.* 1993, 648, 139.

(3) (a) Tulloch, A. P.; Spencer, J. F. T.; Gorlin, P. A. J. *Can. J. Chem.* 1962, 40, 1328. (b) Tulloch, A. P.; Hill, A.; Spencer, J. F. T. *Can. J. Chem.* 1968, 46, 3337.

(4) Ito, S.; Iwano, S. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58, 1278. Ito, S.; Kunita, M.; Iwano, S. *Appl. Biol. Chem.* 1990, 43, 2221.

(5) Marchal, R.; Lamm, J.; Sulzer, C. U.S. Patent 5,618,479, 1997.

(6) Zhou, Q.-H.; Kossar, N. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1995, 72, 87. Zhou, Q.-H.; Kossar, N.; Kossar, N. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1992, 69, 88. Assner, H. J.; Stegmüller, L.; Fritz, W.; Wray, V. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1993, 70, 1460. Davlin, A. M.; Marchal, R.; Vandecastelle, J. P. *Appl. Microbiol. Biotech.* 1992, 38, 6. Tulloch, A. P.; Spencer, J. F. T.; Gorlin, P. A. J. *Can. J. Chem.* 1962, 40, 1326.

(7) Bau, U.; Manzke, G.; Wagner, F. *Biochem. Lett.* 1998, 18, 149.

(8) Assner, H. J.; Lang, S.; Wagner, F.; Wray, V. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1993, 70, 1460.

Chemoenzymatic Synthesis of Enantiopure 1-Azafagomine

Xifu Liang and Mikael Bols*

Department of Chemistry, University of Aarhus, DK-8000 Aarhus C, Denmark

Received May 17, 1999

A new chemoenzymatic synthesis of both enantiomeric forms of the glycosidase inhibitor 1-azafagomine (**1**) is reported. The synthesis starts from the achiral starting materials pentadienol and methylurazol with the key steps being a hetero-Diels–Alder reaction followed by a lipase R/Novozym 435-catalyzed enantioselective esterification of the Diels–Alder adduct.

Introduction

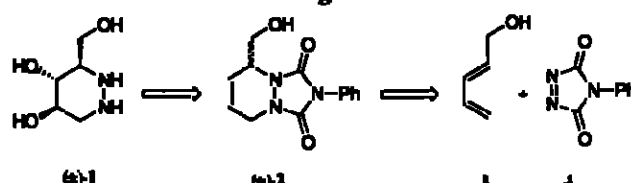
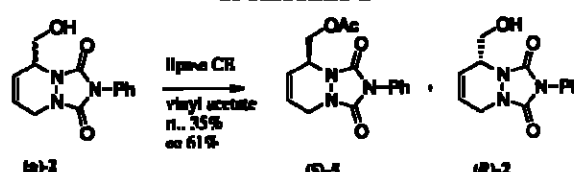
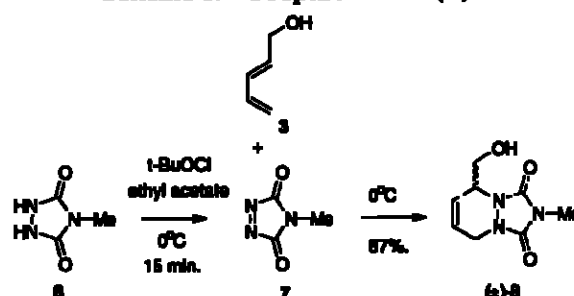
Potent glycosidase inhibitors are important compounds both as potential drug candidates and biochemical tools. Recently, our group reported the strong, racemic glycosidase inhibitor 1-azafagomine (**1**);¹ subsequently, we have found, by synthesis of both enantiomers from D- and L-xylose, that only the (–)-**1** form is biological active.^{2,3} The synthesis of (–)-**1** is relatively long,³ and the starting material L-xylose is relatively expensive compared to the exceptionally short synthesis of (±)-**1** starting from achiral materials.¹ We therefore in this paper report an alternative synthesis of enantiopure **1** that combines the Diels–Alder strategy of the racemic synthesis with a lipase-catalyzed resolution step.

Results and Discussion

The previous synthesis of (±)-**1** consisted of four steps: (1) Diels–Alder reaction of 2,4-pentadienol (**3**) and 4-phenyltriazoline-3,5-dione (**4**) to give (±)-**2**, (2) epoxidation, (3) hydrolysis, and (4) deprotection (Scheme 1). Since the overall yield was good (32%), this synthesis was an attractive basis for an improved synthesis of enantiopure **1**. If, in some way, one of the intermediates in the racemic synthesis could be resolved, we chose to attempt biocatalytic kinetic resolution using lipases, and for this purpose, (±)-**2** seemed the best candidate, since it is a monool. This was previously attempted using lipase-catalyzed esterification with vinyl acetate as acetyl donor.³ Over 20 lipases were screened, and lipase CE showed the best stereoselectivity. With this enzyme, the transesterification of (±)-**2** gave (S)-**5** in 35% yield and 61% ee (Scheme 2). The stereoselectivity of this reaction was, however, far too modest to be practically useful.

It was now suggested that the moderate selectivity was due to the fact that the phenyl group is too bulky to be well accommodated in the enzyme-binding pocket. A number of reports describe successful kinetic resolution with lipases of hydroxymethylated piperidines,^{4,5} but in

Scheme 1. Strategy for the Synthesis of 1-Azafagomine

Scheme 2. Lipase-Catalyzed Transesterification of Racemic **2**Scheme 3. Preparation of (±)-**8**

all cases the substrates had less bulky substituents on nitrogen. Therefore, we decided to replace the phenyl group with a methyl group to reduce the steric bulk in this region.

The substrate (±)-**8** was easily obtained using our method for synthesis of (±)-**2**. Thus, 4-methyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (**7**) was prepared in situ by *tert*-butyl hypochlorite oxidation of 4-methylurazol (**6**). This compound and pentadienol (**3**) underwent Diels–Alder reaction to provide **8** as a colorless solid in 87% yield (Scheme 3).

Lipase-catalyzed transesterification of (±)-**8** using vinyl acetate as acetyl donor was tested first (Scheme 4). Over 20 different enzymes were screened; many enzymes showed no reaction or low rate, but four enzymes were

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +45 8942 3363. Fax: +45 8619 6190. E-mail: mb@kum.au.dk.

(1) Bols, M.; Hazell, R.; Thomsen, I. *Chem. Eur. J.* 1997, 3, 1910–7.
(2) Ernlund, H. V.; Thomsen, I.; Jensen, K. B.; Bols, M. *Synlett* 1999, 2, 701–704.

(3) Ernlund, H. V.; Thomsen, I.; Lohse, A.; Plesner, I. W.; Jensen, K. B.; Hazell, R.; Liang, Xifu; Jacobsen, A.; Bols, M. *Chem. Eur. J.*, in press.

(4) Liang, X.; Ouellet, S. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 2501.

(5) Allenbuch, H.-J.; Bianda, C. *Tetrahedron: Asymmetry* 1998, 9, 1519–24.

(6) Batchelor, M. J.; Meller, J. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1989, 985–986.

2
387-25

Application of Lipase-Catalyzed Regioselective Esterification in the Preparation of Digitonin Derivatives

Bruno Danieli,^{*,†} Monica Luisetti,[†] Sabine Steurer,[‡] Astrid Michelitsch,[‡] Werner Likussar,[§] Sergio Riva,[§] Josef Reiner,[‡] and Manfred Schubert-Zsilavocz^{*,§}

Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Milano, Centro CNR di Studio per le Sostanze Organiche Naturali, via Venezian 21, 20133 Milano, Italy, Institute of Pharmaceutical Chemistry, University of Graz, Schubertstrasse 1, A-8010 Graz, Austria, CNR, Istituto di Biocatalisi e Riconoscimento Molecolare, via Mario Bianco 9, 20131 Milano, Italy, Department of Organic Chemistry, University of Bayreuth, Universitätsstrasse 30, D-95440 Bayreuth, FRG, and Institute of Pharmaceutical Chemistry, University of Frankfurt am Main, Marie-Curie-Strasse 9, D-60439 Frankfurt am Main, FRG

Received July 15, 1998

The oligosaccharide chain of the monodesmosidic hemolytic saponin digitonin (**1**) undergoes an efficient and regioselective acylation in organic solvent by use of Novozym 435 (lipase B from *Candida antarctica* supported on acrylic resin) in the presence of an activated ester. With vinyl acetate, acetylation occurs at C-6 OH of glucose(II) and C-4 OH of xylose to afford the previously unreported diacetyl derivative **2** and the monoacetyl derivatives **3** and **4**. With vinyl laurate only the monolauryl derivative **5** is formed. The structures of these acylated digitonins have been established using modern 2D NMR techniques, which allowed complete assignments of all proton resonances. The hemolytic activity of derivatives **2–5** is significantly reduced compared to that of digitonin.

Digitonin (**1**), a complex monodesmosidic steroidal saponin isolated from the seeds of *Digitalis purpurea* L.¹, has the distinctive characteristic of causing the rupture of the membrane of red blood cells. This hemolytic activity is shared by other natural saponins, and it is greatly influenced by the structure of the aglycon and by the number and type of sugars, as well as by their glycosidic linkages. However, despite systematic studies, no defined structure-activity relationships are presently known.² For many saponins, especially for spirosterial glycosides, it is assumed that hemolysis depends on the ability to form a complex with cholesterol, a central component of the erythrocyte membrane.³ A 1:1 complex of digitonin has been prepared by us, and extensive NMR studies have been undertaken to clarify the sites of interaction between these two molecules.⁴ As a part of this work, we modified the digitonin molecule by preparing specific acylated derivatives in order to evaluate their hemolytic activity and measure their ability to form complexes with cholesterol. These data would furnish a better understanding of structural requirements for the hemolytic mechanism and provide information on the structure of the digitonin-cholesterol complex.

The digitonin molecule contains a branched pentasaccharide chain and therefore, due to the presence of multiple hydroxy functions of similar reactivity, represents a challenging target for selective modification. As for carbohydrates,⁵ the chemical synthesis of individual acyl derivatives would require multistep protection-deprotection procedures and tedious chromatographic separations, resulting in low overall yields of the desired product.

We have shown that esters present at specific positions of the saccharide moiety of flavonoid glycosides⁶ and of ginsenoside Rg₁⁷ can be prepared by reaction with an activated ester under the catalysis of enzymes in anhydrous organic solvents. Therefore, we hoped that this enzyme-mediated regioselective acylation could also be successfully applied to digitonin. This was indeed the case, and in this paper we report that, of the several hydroxyl groups present in this molecule, only the C-4 OH of xylose and C-6 OH of glucose(II) were recognized by *Candida antarctica* lipase in *tert*-amyl alcohol solution. In the presence of vinyl acetate and vinyl laurate this enzyme catalyzed the exclusive formation of the diacetate **2**, of the monoacetates **3** and **4**, and of the monolaurate **5**, respectively, whose structures rely on a complete analysis of their NMR spectra.

Results and Discussion

Due to its polyhydroxylated nature, digitonin (**1**) is soluble in polar solvents and barely soluble in solvents of low polarity. We found that **1** is moderately soluble in *tert*-amyl alcohol containing a limited amount of DMF (13%), and therefore, according to the protocol used for the esterification of ginsenoside Rg₁⁷, we first used Novozym 435 (*Candida antarctica* lipase B supported on an acrylic resin) and vinyl acetate to attempt the acylation of **1**. Under these conditions a 75% conversion of **1** was observed after 98 h to form three products, **2**, **3**, and **4**, in nearly a 1:2:1 ratio.⁸

The less polar product (**2**) was recognized as a di-*O*-acetyldigitonin on the basis of its LSTMS [(M-H)⁺ ion at *m/z* = 1311] and of its proton spectrum, which showed, among other things, two singlets at δ 2.05 and 2.06 for the acetate groups, a downfield-shifted AB portion of an ABX system at δ 4.20 and 4.42 for the acylated oxymethylene protons of a glucose or galactose unit, and a downfield shifted ddd at δ 4.73, presumably due to H-4 of the xylose unit on the basis of its coupling constants.

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: (Int +) 39 02 2367606. Fax: (Int +) 39 02 2364360. E-mail: danieli@chi4.dic.unimi.it. Dedicated to Prof. Helmut on the occasion of his 60th birthday.

[†] Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Milano.

[‡] Institute of Pharmaceutical Chemistry, University of Graz.

[§] CNR, Istituto di Biocatalisi e Riconoscimento Molecolare.

[§] Department of Organic Chemistry, University of Bayreuth.

[§] Institute of Pharmaceutical Chemistry, University of Frankfurt am Main.

Practical Synthesis of an Enantiomerically Pure *trans*-4,5-Disubstituted 2-Pyrrolidinone via Enzymatic Resolution. Preparation of the LTB₄ Inhibitor BIRZ-227[†]

Nathan K. Yeo,* Laurence J. Nummy, Denis P. Byrne, Lana L. Smith, and Gregory P. Roth

Department of Chemical Development, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., 900 Ridgebury Road,
P.O. Box 368, Ridgefield, Connecticut 06877-0368

Received August 28, 1997[‡]

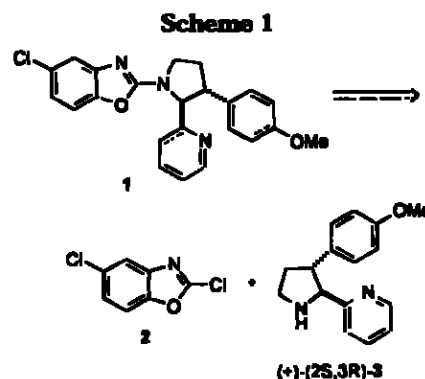
A practical synthesis of the enantiomerically pure BIRZ-227 (**1**), a LTB₄ inhibitor, has been developed. The key steps include the effective synthesis of the *trans*-diarylpyrrolidinone (**±**)-**8** and the enzymatic resolution of *N*-acetoxymethyl pyrrolidinone (**±**)-**10** by immobilized Lipase Novozym 435. Reduction of pyrrolidinone (**±**)-**8** with borane and subsequent coupling with chlorobenzoxazole **2** furnished BIRZ-227 in high enantiomeric purity (99% ee). The overall process described herein required no chromatographic separation and is amenable to the preparation of multikilogram quantities of the desired drug candidate in a cost-effective manner.

Introduction

For at least 2 decades considerable research has been centered on the discovery of compounds that inhibit the arachidonic acid cascade. One particular strategy involves the inhibition of leukotriene biosynthesis, and this area has been well-reviewed in the literature.¹ Several years ago our inflammatory disease group discovered a potent class of *cis*- and *trans*-diaryl pyrrolidines that inhibit this biosynthetic pathway, specifically the synthesis of leukotriene B₄.² Such compounds can be useful for the treatment of inflammatory disorders such as asthma, arthritis, inflammatory bowel disease, and psoriasis. During the preclinical evaluation of this series, a potential clinical candidate, BIRZ-227 (**1**), emerged, thus initiating the need for large quantities of enantiomerically pure material for further development.

Simple retrosynthetic analysis indicates that **1** can be split into two subunits (Scheme 1), the benzoxazole **2** and the chiral pyrrolidine **3**. In the initial synthesis,² 1,3-cycloaddition³ of an azoallyl anion with 4-methoxystyrene furnished a racemic mixture of the *cis*- and *trans*-diaryl pyrrolidines which could be separated after tedious chromatography. Following reaction with a substituted chlorobenzoxazole **2**, milligram quantities were then purified using chiral HPLC to furnish material for initial biological assay. Multigram quantities of (+)-**1** were prepared through scaling up the 1,3-dipolar cycloaddition chemistry and a method of resolving racemic **3** using (–)-diacetone-2-keto-L-gulonate.⁴

This protocol allowed for the synthesis of essentially enantiomerically pure material but was limited for additional scale-up since several recrystallizations (five



or six) were required to reach an acceptable enantiomeric excess with a modest overall yield (~10%). In addition, the 1,3-dipolar cycloaddition step required reaction temperatures below –60 °C, which is impractical for large-scale production. These parameters initiated our decision to find an alternative synthetic route that ultimately could be demonstrated in the pilot plant. In this paper, we will detail a large-scale synthesis of the enantiomerically pure BIRZ-227 (**1**).

Results and Discussion

Synthesis of Racemic Substrate. In a previous paper⁵ we outlined a practical and general method for the preparation of racemic *trans*-4,5-disubstituted 2-pyrrolidinones, which was based on Michael addition of a Schiff base anion to a substituted cinnamate using phase transfer catalysis (PTC) conditions.⁶ The one-pot procedure to (**±**)-**8** started from commercially available 2-(aminomethyl)pyridine (**4**, Scheme 2). The Schiff base **5** was

[†] Dedicated to Professors Robert M. Coates and Frederick E. Ziegler on the occasion of their 60th birthday.

[‡] Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, December 15, 1997.

(1) (a) Recent reviews: Musser, J. H.; Kraft, A. P. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 2501. (b) Summers, J. B. *Drug News Perspect.* 1990, 3, 3517.

(2) (a) Pal, K.; Behnke, M.; Adams, J. US Patent 5594008, 1/14/97. (b) Pal, K.; Behnke, M. L.; Tong, L. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 6205.

(3) For 1,3-cycloaddition chemistry of azoallyl anion see: Pearson, W. H.; Saura, D. P.; Pasrich, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 1329.

(4) Roth, G. P.; Emmanuel, M.; Tong, L. *Tetrahedron Asymmetry* 1997, 8, 185.

(5) Yeo, N. K. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 5001 and references therein.

(6) For phase transfer catalysis reactions of benzylidenbenzylamine with cinnamic acid derivatives, see: Potapov, V. M.; Gracheva, R. A.; Stoyan, N. A. *Zh. Org. Khim.* 1989, 25, 1876. For stereoselective Michael additions of metal enolates of α -amino ester, see: (a) Totsukawa, A.; Dan, M.; Ohnaka, M.; Kawatake, K.; Fukuta, T.; Wachi, E.; Kanemasa, S.; Kakoi, S. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 4221. (b) Kanemasa, S.; Uchida, O.; Wada, E. *J. Org. Chem.* 1990, 55, 4411.

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
Emilio Ferrero
Apoderado

Oficio N°: 3268

ASUNTO:

Radicación PCT N°	05-21991
Trámite	011
Evento	379
Actuación	440
Folios	054

Con fundamento en lo previsto por el artículo 43 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que la oposición presentada por el doctor José Luis Reyes Villamizar, en su calidad de apoderado de Tecnoquímicas S.A., reúne los requisitos formales exigidos por la ley al momento de su presentación.

En cumplimiento de lo dispuesto en la citada norma, se le concede el término de sesenta (60) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, para que haga valer sus argumentaciones y presente pruebas.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

09 MAR. 2007

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, _____.

202021

32

2



2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
Emilio Ferrero
Apoderado

Oficio N°: 3269

ASUNTO:

Radicación PCT N°	05-21991
Trámite	011
Evento	379
Actuación	440
Folios	008

Con fundamento en lo previsto por el artículo 43 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que la oposición presentada por el doctor Reinaldo Pinilla Moreno, en su calidad de apoderado de Procaps S.A., reúne los requisitos formales exigidos por la ley al momento de su presentación.

En cumplimiento de lo dispuesto en la citada norma, se le concede el término de sesenta (60) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, para que haga valer sus argumentaciones y presente pruebas.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 MAR. 2007.

202021

32

2

