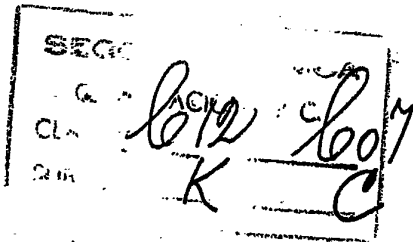


387501



PATENTE DE INVENCION

Ref: SC. 3667.

387501

*Memoria Descriptiva*

*sobre:*

Procedimiento para la preparación de L beta-(dihidroxí-3,4 fenil)alfa-alanina.

=====

*Solicitante:* RHONE-POULENC S.A., entidad francesa, residente en 22, Avenue Montaigne, Paris-8e, Francia.

=====

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de la L beta-(hidroxí-3,4 fenil) alfa-alanina (ó "L-DOPA") por transformación microbiológica de la tirosina.

5. Es bien conocido que la L-DOPA es un produc-

POOR QUALITY

38750121



to del metabolismo de la L-tirosina en el caso del hombre y en el caso de los animales. Existen igualmente en el caso de los hongos superiores y en el caso de las plantas "tirosinasas" que transforman la L-tirosina en pigmentos melánicos pasando por la L-DOPA.

5. Los microorganismos utilizan generalmente la tirosina de una forma totalmente diferente. Sin embargo LARWAY y EVANS (Biochem. 85, 22P, 1962) han analizado el pigmento negro que se forma en los cultivos de *Microspira tyrosinática* desarrollada en presencia de tirosina y han encontrado que este pigmento contiene DOPA. Como consecuencia se ha demostrado (ARONSON y VICKERS, Biochim. Biophys. Acta 110, 624, 1965) que extractos hidrosolubles de *Bacillus cereus* T contienen una tirosinasa capaz de transformar la tirosina y la metatirosina en DOPA. Finalmente SIH y coll. (J. Am. Chem. Soc. 91, 6204, 1969) han descrito una preparación de la L-DOPA por oxidación de la L-tirosina (tras bloqueo de la función amina por diversas agrupamientos) por medio de diferentes microorganismos tal como *Gliocladium deliquescens*.

10. Se ha encontrado, y esto es lo que constituye el objeto de la presente invención, que *Vibrio tyrosinaticus* ATCC 19.378 es capaz de transformar, en cultivo sumergido, cantidades importantes de L-tirosina con un rendimiento elevado en L-DOPA. Se puede llegar de este modo a una producción económica de esta sustancia.

15. En la puesta en práctica del procedimiento no es necesario separar los microorganismos para extraer los sistemas enzimáticos, lo cual es generalmente difícil de realizar a gran escala.

20. Se puede llegar de este modo a una producción económica de esta sustancia.

25. En la puesta en práctica del procedimiento no es necesario separar los microorganismos para extraer los sistemas enzimáticos, lo cual es generalmente difícil de realizar a gran escala.

30. Se puede llegar de este modo a una producción económica de esta sustancia.

- 3 387501<sup>21</sup>



La transformación de la L-tirosina en L-DOPA por *Vibrio tyrosinaticus* tiene lugar en diferentes pH. Se obtienen habitualmente los rendimientos de transformación mas elevados a pH de 4,0 a 7,0 y de preferencia próximos a 5,5.

5.

El pH óptimo para la transformación no es compatible con un buen desarrollo del microorganismo, es preferible que el cultivo comprenda dos fases: en la primera fase se deja desarrollar *Vibrio tyrosinaticus* ATCC 19.378 en un medio nutritivo apropiado cuyo pH es superior a 6,0; en la segunda fase, se efectúa la adición y la transformación de la tirosina tras corrección eventual del pH del cultivo para encontrarse en la zona mas favorable.

10.

15.

El cultivo de *Vibrio tyrosinaticus* ATCC 19.378 puede efectuarse por cualquier método de cultivo aerobio en superficie o en profundidad, pero este último es preferible por razones de comodidad. Se utilizan a este fin los diferentes tipos a aparatos que son de uso corriente en la industria de las fermentaciones.

20.

En particular se puede adoptar la marcha siguiente para la conducción de las operaciones:

*Vibrio tyrosinaticus* ATCC 19.378

↓  
cultivo sobre gelosa

25.

↓  
cultivo en frasco agitado

↓  
cultivo de producción en fermentador

El medio de fermentación puede variar pero debe contener esencialmente una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno asimilables, elementos minerales y eventualmente factores de crecimiento, pudiendo aportarse todos

30.



estos elementos en forma de productos bien definidos o por mezclas complejas, tales como las que se encuentran en productos biológicos de orígenes diversos.

5. Como fuentes de carbono asimilable se pueden utilizar hidratos de carbono tales como la glucosa, la maltosa, las dextrinas, el almidón o fuentes de alcoholes tales como el glicerol u otras sustancias hidrocarbonadas como las melazas. Algunos aceites animales o vegetales como el aceite de tocino o el aceite de soja pueden incluso reemplazar estas distintas fuentes hidrocarbonadas, o agregárseles.

10. Las fuentes convenientes de nitrógeno asimilable son extremadamente variadas. Pueden ser sustancias químicas muy simples como las sales minerales u orgánicas de amonio, la urea, algunos ácidos aminados. También pueden aportarse por sustancias complejas que contengan principalmente el nitrógeno en forma protídica: caseína, lactalbumina, gluten y sus hidrolisatos, harinas de soja, de mani, de pescado, extractos de carne, de levadura, distillers' solubles, corn-steep.

15. Entre los elementos minerales añadidos, algunos pueden tener un efecto tampon o neutralizante como los fosfatos alcalinos o alcalino-terreos o los carbonatos de calcio y de magnesio.

20. Otros aportan el equilibrio iónico necesario para el desarrollo de *Vibrio tyrosinaticus* ATCC 19.378 como los cloruros y sulfatos de metales alcalinos y alcalino-terreos. Finalmente algunos actúan mas especialmente como activadores de reacciones metabólicas de *Vibrio tyrosinaticus*; estas son las sales de cinc, de cobalto, de hierro,

25.

30.

**POOR  
QUALITY**

387501<sup>21</sup>



de cobre, de manganeso.

El pH del medio de fermentación al comienzo del cultivo debe estar comprendido entre 6,0 y 7,8 y de preferencia entre 6,5 y 7,5. El medio de cultivo así pre-

5. preparado se siembra con un cultivo inoculum en medio líquido de la cepa *Vibrio tyrosinaticus* ATCC 19.378 y el cultivo se incuba entre 22 y 37°C y de preferencia entre 25 y 26°C con agitación y aireación. La aireación de la fermentación puede variar entre valores bastante amplios.
10. Se ha encontrado sin embargo que aireaciones de 0,3 a 3 litros de aire por litro de caldo y por minuto convienen particularmente bien.

En la segunda fase, en el transcurso de la cual se efectúa la síntesis de la L-DOPA, se añaden en el cultivo la L-tirosina de calidad comercial en cantidades que van de 0,1 a 15 g/l y comprendidas de preferencia entre 3 y 10 g/l. Esta adición en forma sólida o en forma de solución puede hacerse en diferentes momentos en el transcurso del cultivo pero de preferencia tras una

20. primera fase (incubación) de 16 a 24 horas. La utilización de ácidos o de bases para la disolución de la tirosina permite obtener soluciones relativamente concentradas de esta última. Es ventajoso utilizar simultáneamente una solución de tirosina en ácido clorhídrico y una
25. solución de tirosina en sosa para hacer esta adición, porque una relación conveniente de las dos soluciones permite obtener a la vez la dosis deseada de tirosina en el cultivo y la corrección del pH sin aumentar notablemente la cantidad de sales minerales del medio.
30. Tras esta adición, cualquiera que sea el momento



y la cantidad de tirosina añadida, conviene proseguir aún el cultivo durante 1 a 2 días en las mismas condiciones de agitación y de temperatura para obtener la producción máxima de L-DOPA.

5. Puede ser ventajoso añadir en los cultivos, al comienzo de la fase de transformación, es decir inmediatamente después de la adición de tirosina, glucosa (2 a 20 g/l) cuyo metabolismo aporta a la vez energía al microorganismo y el medio de controlar el pH del cultivo evitando una evolución por encima de 6,0 desfavorable a la vez a la transformación de la tirosina y a la estabilidad de la L-DOPA ya formada.

10. Puede ser ventajoso efectuar la transformación de la L-tirosina en L-DOPA en presencia de ácido ascórbico.

15. El ácido ascórbico se añade generalmente después de la fase de desarrollo del microorganismo bien antes, bien durante, bien después de la adición de L-tirosina. Permite mantener rendimientos interesantes incluso cuando el pH, en el transcurso de la fase de transformación, está comprendido entre 6 y 7. En estas condiciones, no es generalmente ya necesario ajustar el pH del medio de cultivo antes de efectuar la transformación de la L-tirosina en L-DOPA.

20. El ácido ascórbico, añadido en una o varias veces, se utiliza a concentraciones comprendidas entre 1 y 5 g/litro.

Finalmente la transformación está favorablemente influenciada por los aditivos siguientes:

25. - sales de cobre (1 a 10 mg/litro)

- 7 387501



1971

5. - antioxidantes, por ejemplo ácido sórbico, N,N'-difenilparafenilendiamina, terciobutil-2 (y -3) metoxi-4 fenoles, diterciobutil-2,6 paracresol, y, mas particularmente, trimetil-2,2,4 etoxi-6 dihidro-1,2 quinoleina a la dosis de 0,1 a 1 g/litro.

10. La extracción de la L-DOPA del mosto de fermentación puede efectuarse de manera conocida. Por ejemplo el mosto se clarifica tras acidificación a pH 2 por filtración o centrifugación. La L-DOPA puede entonces retenerse sucesivamente sobre una resina intercambiadora de cationes del tipo sulfónica según la técnica descrita por L.E. MARTIN y C. HARISSON (Anal. Biochem. 23, 529, 1968) y sobre alúmina en presencia de ácido etilendiaminotetraacético y de metabisulfito de sodio según el método de A.H. ANTON y D.E. SAYRE (J. Pharmacol. Exp. Therap., 145, 326, 1964). La L-DOPA fijada sobre alúmina puede eluirse por una solución de ácido oxálico y purificarse por recristalización tras eliminación del ácido oxálico.
- 15.

20. Los ejemplos siguientes, dados a título no limitativo, muestran como la invención puede ponerse en práctica.

EJEMPLO 1

Se cargan, en un fermentador de 30 litros:

- |     |  |       |
|-----|--|-------|
| 25. | - extracto de levadura                     | 40 g  |
|     | - peptona                                  | 80 g  |
|     | - extracto de carne                        | 80 g  |
|     | - glucosa monohidratada                    | 160 g |
|     | - cloruro sódico                           | 80 g  |
|     | - agua de ciudad hasta completar 17 litros |       |

30. El pH se ajusta a 7,5 por adición de 22 cm<sup>3</sup> de sosa



- 10 N. Se esteriliza el medio a 122°C durante 40 minutos. Tras refrigeración, el volumen de caldo es de 16 litros y el pH de 6,95. Se siembra entonces con 200 cm<sup>3</sup> de un cultivo en erlenmeyer agitado de *Vibrio tyrosinaticus* ATCC 19.378. El cultivo se desarrolla a 26°C durante 16 horas agitando y aireando con aire esteril; entonces es conveniente para efectuar la transformación deseada. Esta se efectúa a pH 5,3. Se lleva por tanto el pH del cultivo a este valor por adición de una solución esteril de ácido clorhídrico 2,4 N y se añaden 64 g de tirosina en 2 soluciones estériles de igual volumen, la una al 20 % en el ácido clorhídrico 2,4 N y la otra al 20 % en sosa 2,4 N. Se añaden aun 350 cm<sup>3</sup> de una solución esteril que contiene 160 g de glucosa monohidratada y se prosigue el cultivo durante 27 horas, corrigiendo si es necesario el pH para mantenerle a 5,3. El volumen final es de 14 litros que contienen 3,0 g/l de L-DOPA.
- 5.
- 10.
- 15.

- La valoración de la L-DOPA se efectúa sobre el filtrado a pH 2 del mosto de fermentación según el método descrito por L.E. ARNOW [J. Biol. Chem. 118, 531, 1937]. La lectura de la coloración obtenida se hace en el espectrofotómetro con relación a una muestra pura de L-DOPA. Se verifica la validez de esta valoración (no específica de la L-DOPA) cromatografiando el filtrado sobre capa delgada de celulosa en los sistemas disolventes propanol-agua (7/3 en volumen) o isopropanol-HCl 0,1 N (5/1 en volumen) y evaluando espectrofotométricamente la L-DOPA tras revelación con ferricianuro de potasio y con etilendiamina. Los títulos obtenidos por estos dos métodos están en buen acuerdo.
- 20.
- 25.
- 30.

387501<sup>21</sup> ENE.



EJEMPLO 2

- Una fracción (1,8 litros) del cultivo de transformación descrito en el ejemplo 1, que contiene 5,4 g de L-DOPA, se acidifica a pH 2 con 50 cm<sup>3</sup> de ácido clorhídrico 12 N y se centrifuga. El líquido sobrenadante recogido y pasado tal cual sobre una columna (diámetro 7,5 cm - altura 63 cm) de resina DOWEX 50 W-X 2 en forma ácida (resina a base de ácido poliestirensulfónico al 2 % de divinilbenceno, que contiene 0,9 meq/ml y 5,3 meq/g sobre resina seca). La L-DOPA fijada se eluye con el ácido clorhídrico 2 N. El eluato (5,2 litros), que contiene aun pequeñas cantidades de tirosina no transformada, se purifica llevando su pH a 4,0 por una adición de 800 cm<sup>3</sup> de sosa (d = 1,33) y añadiéndole 250 g de alúmina, 5 g de metabisulfito de sodio y 5 g de ácido etilendiaminotetraacético en forma de sal disódica. La mezcla se agita; su pH se lleva a 8,6 por adición de 200 cm<sup>3</sup> de sosa concentrada (d = 1,33), a continuación se abandona durante 15 minutos. Se separa la alúmina por filtración y se la lava varias veces por un total de 3 litros de agua destilada. El filtrado y los lavados que contienen la tirosina se tiran, mientras que la L-DOPA se recupera tratando la alúmina con 2,2 litros de ácido oxálico 2 N. La solución oxálica se concentra a 0,7 litros bajo presión reducida (30 mm de mercurio) por calentamiento al baño maría hirbiente, y se elimina por filtración el ácido oxálico, que ha cristalizado. El filtrado se trata a continuación por 3,7 litros de alcohol etílico y su pH se lleva a 5,5 con 150 cm<sup>3</sup> de sosa (d = 1,33) para precipitar las sales minerales. Se completa la precipi-
5.  
10.  
15.  
20.  
25.  
30.



387501

- tación añadiendo aun 3,7 litros de acetona. El precipitado formado se filtra inmediatamente y el nuevo filtrado se concentra bajo presión reducida (30 mm de mercurio) por calentamiento al baño maría hirviendo hasta 0,8 litros.
5. Se termina la concentración a la presión normal bajo atmósfera de nitrógeno calentando por medio de un baño de parafina para obtener 70 cm<sup>3</sup> de una solución de la que se aislan tras reposo de 10 horas a 4°C, 2,54 g de L-DOPA bruta. La concentración de las aguas madres de cristalización proporciona aun 0,65 g de cristales.
- 10.

La totalidad del producto bruto se purifica por recristalización en agua tras decoloración de la solución acuosa por medio de un carbón activo. Se obtienen de este modo 2,65 g de L-DOPA cristalizada con un rendimiento del 49 % sobre el producto dosificado en el mosto de fermentación.

15.

$$[\alpha]_D^{20} = -16,4 \pm 0,8 \quad (c = 1, \text{HCl } 0,1 \text{ N})$$

- El producto cromatografiado sobre capa delgada de celulosa con el sistema propano-HCl 3 N 70-30 (en volumen) y revelado por alfa-nitroso-beta-naftol [cf. R. ACHER y C. CROCKER, Biochim. Biophys. Acta, 9, 704, (1952)] se ha revelado exento de tirosina.
- 20.

EJEMPLO 3

Se cargan en un fermentador de 75 litros:

- 25.
- |   |       |
|---|-------|
| - extracto de levadura                      | 100 g |
| - peptona                                   | 200 g |
| - extracto de carne                         | 200 g |
| - cloruro de sodio                          | 200 g |
| - agua de ciudad complemento para 33 litros |       |

30. El pH se ajusta a 7 por adición de 40 cm<sup>3</sup> de sosa

387501



10 N. Se esteriliza el medio por borboteo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Tras refrigeración, el volumen del caldo es de 38,5 litros. Es completado a 40 litros por adición de 1,5 litros de una solución acuosa esterilizada que contiene:

- glucosa monohidratada 600 g

5. El pH es de 6,90. Se siembra con 200 cm<sup>3</sup> de un cultivo en erlenmeyer agitado de la cepa *Vibrio tyrosinaticus* ATCC 19.378. El cultivo se desarrolla a 30°C durante 10 horas agitando y aireando con aire esteril, antes de su empleo para la siembra del cultivo productor.

El cultivo productor se efectúa en un fermentador de 800 litros cargado con las sustancias siguientes:

10. - corn-steep (50 % de extracto seco) 2,2 Kg  
15. - sulfato de magnesio con 7 H<sub>2</sub>O 0,220 Kg  
- agua de ciudad hasta completar 390 litros

Tras haber ajustado el pH a 6,6 con 120 cm<sup>3</sup> de sosa 10 N, se añade:

- carbonato de calcio 1,1 Kg

20. después, se esteriliza el medio por borboteo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Tras refrigeración, el volumen de caldo es de 425 litros. Se completa a 440 litros por adición de 10 litros de una solución acuosa esteril que contiene:

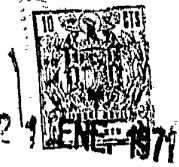
25. - glucosa monohidratada 4,4 Kg

y de 5 litros de una solución acuosa esteril que contiene:

- sulfato de amonio 0,880 Kg

El pH es igual a 7.

30. Se siembra con 6 litros del cultivo inoculum en el fermentador de 75 litros descrito anteriormente. El



5. cultivo se desarrolla a 30°C durante 20 horas agitando por medio de una turbina que gira a 180 vueltas/minuto y aireando con un volumen de aire estéril de 20 m<sup>3</sup>/hora; el pH del cultivo se mantiene automáticamente en 6,6 ± 0,05 por adición de amoníaco 6 N ó de ácido clorhídrico 4 N.

10. Al cabo de 20 horas el cultivo es conveniente para efectuar la transformación deseada, el volumen del mosto se añade a 400 litros y el pH se lleva a 5,5 con ácido clorhídrico 6 N.

A continuación se introducen 1,1 litros de una solución acuosa a pH 5,5 que contiene:

- ácido L-ascórbico 215 g

15. y se mantiene durante 2 horas a 30°C el mosto agitado por turbina que gira a 180 vueltas/minuto y se airea con un volumen de aire estéril de 20 m<sup>3</sup>/hora.

Se introducen de nuevo en el mosto 1,1 litros de una solución acuosa a pH 5,5 que contiene:

- ácido L-ascórbico 215 g

20. a continuación 1,720 Kg de L-tirosina en forma de dos soluciones acuosas la una al 6,15 % en sosa N, la otra al 6,15 % en ácido clorhídrico N. Se hacen aún tres adiciones sucesivas, con 1 hora de intervalo, de 1,1 litros de una solución acuosa a pH = 5,5 que contiene:

25. - ácido L-ascórbico 215 g

El cultivo se prosigue durante 7 horas, tras el final de estas adiciones manteniendo el pH a 5,5. El volumen final del mosto es de 430 litros. La cantidad de L-DOPA presente es entonces de 3,55 g/litro.

387501

21



EJEMPLO 4

Un cultivo de *Vibrio tyrosinaticus* ATCC 19.378 se prepara en las condiciones del ejemplo 3. Tras 20 horas el cultivo es conveniente para efectuar la transformación, el volumen del mosto se ajusta a 400 litros y el pH se mantiene a 6,6.

Se introducen a continuación 2,2 litros de una solución acuosa con pH = 6,5 que contiene:

- ácido L-ascórbico 400 g

10. y se mantiene durante 2 horas a 30°C el mosto agitado por una turbina que gira a 180 vueltas/minuto y se airea con un volumen de aire esteril con un caudal de 20 m<sup>3</sup>/hora.

Se introducen además en el mosto 2,2 litros de una solución acuosa con pH = 6,5 que contiene:

15. - ácido L-ascórbico 400 g

a continuación 1,720 Kg de L-tirosina en forma de 2 soluciones acuosas la una al 6,15 % de sosa N, la otra al 6,15 % en ácido clorhídrico N.

20. Se efectúan a continuación, sucesivamente, con 1 hora de intervalo: 2 adiciones de 1,1 litro de una solución acuosa con pH 6,5 que contiene cada una:

- ácido L-ascórbico 200 g

y una adición de 2,2 litros de una solución acuosa que contiene:

25. - ácido L-ascórbico 400 g

El cultivo se prosigue durante 7 horas tras la última adición manteniendo el pH del caldo a 6,6.

El volumen final del mosto es de 430 litros. La cantidad de L-DOPA presente es de 2,79 g/litro.

30.



387501

- N O T A -

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente
5. indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Francia, con fecha 21 de enero de 1970, bajo el número 70-02129, acogiéndose por
10. lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE L BETA--(DIHIDROXI-3,4 FENIL) ALFA-ALANINA; caracterizándose por lo siguiente:
15. 1ª.- Procedimiento para la preparación de L beta--(dihidroxi-3,4 fenil) alfa-alanina (L-DOPA) por hidroxilación microbiológica de la L-tirosina, caracterizado porque se cultiva *Vibrio tyrosinaticus* ATCC 19.378 o uno
20. de sus mutantes en un medio nutritivo aireado que contiene fuentes de carbono y de nitrógeno asimilables y sales minerales, a una temperatura comprendida entre 22 y 37°C en presencia de tirosina y a continuación se extrae y purifica la L-DOPA formada.
25. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el cultivo de *Vibrio tyrosinaticus* se divide en una fase de crecimiento a pH = 6,0-7,8, y a continuación una fase de transformación de tirosina a pH 4,0-
30. 7,0.
- 3ª.- Procedimiento para la preparación de la L-DOPA

*[Handwritten signature]*

21 ENE



387501

según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque se introduce la tirosina en forma de dos soluciones la una ácida y la otra básica.

- 4<sup>a</sup>.- Procedimiento para la preparación de L-DOPA
5. según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado porque se adiciona glucosa durante la fase de transformación de la tirosina.

- 5<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado porque se adiciona ácido L-ascórbico durante la fase de transformación de la tirosina.
- 10.

6<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado porque se adiciona antioxidante en el transcurso de la fase de transformación de la tirosina.

15. 7<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado porque se adicionan sales de cobre durante la fase de transformación de la tirosina.

- 8<sup>a</sup>.- Procedimiento para la preparación de L beta-(dihidroxi-3,4 fenil) alfa-alanina, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.
- 20.

Esta Memoria consta de 15 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid

21 ENE. 1971

RHONE-POULENC S.A.

J. GOMEZ ACEBO Y MODET  
p. p. Firmado GARCIA BRAVO

h.g.