

438524

P.- 60.645

2692 ES

-6 SET. 1975

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

A nombre de STAMICARBON, B.V.

entidad holandesa

Int. Cl. ² 007B

establecida en Geleen, Holanda

por: "UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE D-FENILGLICINAMIDA Y L-FENILGLICINA"

1.7.75

La invención se refiere a un procedimiento para la resolución de DL-fenilglicinamida.

5 La fenilglicina racémica puede ser desdoblada en sus antípodas ópticamente activos mediante procedimientos convencionales, que comprenden la formación de sal de fenilglicina o un derivado o precursor de la misma, con un ácido, y cristalización selectiva u otra técnica de separación.

10 El objeto de la invención es un procedimiento para la resolución de fenilglicinamida racémica, preferentemente mediante hidrólisis enzimática selectiva.

15 Es sabido que las amidas de aminoácidos pueden ser hidrolizadas selectivamente por medio de enzimas. Las amidas de aminoácidos aromáticos, tales como la amida de la fenilalanina, pueden ser hidrolizadas, en general, por la influencia de enzimas tales como papaína, bromelina o ficina. No obstante la solicitante encontró que estas enzimas no hidrolizan
20 la fenilglicinamida.

Actualmente se ha descubierto que pueden prepararse D-fenilglicinamida y L-fenilglicinamida a partir de fenilglicinamida racémica, estando caracterizada la invención porque se hidroliza DL-fenilglicinamida por medio de una aminopeptidasa adecuada
25

y porque la D-fenilglicinamida y/o la L-fenilglicina se aísla (n). Dicho aislamiento puede ser llevado a cabo mediante cualquier técnica convencional.

5 El que una aminopeptidasa dada sea o no adecuada, puede ser comprobado con facilidad mediante una técnica descrita en los ejemplos.

10 La enzima preferida es leucina-amino peptidasa (Número de la Enzyme Commission, 3.4.1.1), que efectúa una hidrólisis altamente estereoespecífica de la amida racémica en un tiempo corto.

15 La reacción puede ser llevada a cabo bajo condiciones convencionales tales como se describen, entre otros lugares, en Dixon and Webb, 'Enzymes' p. 247 (1965) para la hidrólisis de otras amidas racémicas de aminoácidos, por medio de enzimas de aminopeptidasa.

20 Preferiblemente se mantiene la temperatura entre 20-40°C y la reacción se efectúa en una solución acuosa tamponada a un pH comprendido entre 7 y 9,5 aproximadamente. Pueden ser añadidos compuestos de activación tales como, por ejemplo, sales de manganeso y sales de magnesio.

25 El método de tratamiento para el aislamiento de los productos de reacción D-fenilglicinamida y L-fenilglicina, es independiente de si se hace

uso o no de aminopeptidasa libre o aminopeptidasa insoluble en agua. Dado que la L-fenilglicina es poco soluble en agua, el proceso ha de ser efectuado en soluciones diluidas cuando se usa una enzima insoluble con objeto de evitar la cristalización de la L-fenilglicina sobre la enzima insoluble. En ambas variantes del procedimiento, la L-fenilglicina puede ser separada de la D-fenilglicinamida mediante extracción, cristalización, o por medio de una o más resinas de cambio iónico.

La L-fenilglicina puede ser separada como tal o después de racemización. La DL-fenilglicinamida puede ser convertida por medio de un ácido y un alcohol, en la sal de éster alcohólico de fenilglicina, que puede ser tratada con amoníaco para obtener DL-fenilglicinamida, que puede ser devuelta al proceso.

El producto de partida del procedimiento conforme a la invención, puede ser preparado a partir del amino nitrilo de la fenilglicina de un modo conocido, mediante hidrólisis ácida para formar la sal de la DL-fenilglicinamida, a partir de la cual puede ser obtenida la DL-fenilglicinamida, tratándola con una cantidad equivalente de base.

La D-fenilglicinamida obtenida según el método de tratamiento, puede ser hidrolizada a sal de

D-fenilglicina sin racemización, por calentamiento de la amida con una solución acuosa de un ácido fuerte tal como el ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido bencenosulfónico o ácido toluensulfónico.

5 Esta sal puede ser tratada con amoniacó, con lo que la D-fenilglicina cristaliza en forma libre. Así pues, la invención comprende también un método de preparación de D-fenilglicina, en el que se hidroliza selectivamente DL-fenilglicinamida por me-
10 dio de una aminopeptidasa adecuada, seguido de aislamiento de D-fenilglicinamida y conversión de esta amida en D-fenilglicina o una sal de adición de ácido de la misma.

15 La D-fenilglicina se usa, entre otras aplicaciones, como compuesto de partida para la preparación de α -aminobencilpenicilina. La L-fenilglicina se usa, por ejemplo, como compuesto de partida para la preparación del éster metílico de la L-asparaguina-L-fenilglicina (un agente edulcorante).

20 La aminopeptidasa puede ser usada en estado libre o en estado insoluble, por ejemplo, unida por covalencia a un soporte insoluble.

25 La invención será aclarada con referencia a los ejemplos siguientes, pero no será restringida por ellos.

Ejemplo 1

Se disuelven a temperatura ambiente, 3,0 milimoles (560 mg) de clorhidrato de DL-fenilglicinamida, en 52,0 ml de una solución tampón (ácido bórico-cloruro potásico-hidróxido sódico) con un
5 pH de 9,0 en un recipiente de reacción provisto de agitador. Después de la adición de 2,2 ml de $MgCl_2$ 0,125 M y 0,1 ml de $MnCl_2$ 0,025 M, se ajusta el pH a un valor de 8,5 por medio de 2,0 ml de hidróxido
10 sódico aproximadamente 1N. A continuación se añade a esta solución 0,4 mg de leucina-aminopeptidasa (80 mg de suspensión de enzima de Merck 25010; procedente de riñón de cerdo), y se agita a temperatura ambiente y a un pH de 8,5 durante 1,5 horas.

15 Un análisis por cromatografía en capa delgada muestra que la L-fenilglicinamida ha sido completamente hidrolizada a L-fenilglicina. Después de un tiempo de reacción de 20 horas más, la mezcla de reacción contiene según un análisis de aminoácidos:
20 0,40% en peso de L-fenilglicina (eficacia = 100%) y 0,39 % en peso de D-fenilglicinamida (rendimiento = 99,5).

Ejemplo 2

25 Una solución de 32,3 milimoles (6,0

gramos) de clorhidrato de DL-fenilglicinamida, 300 mg de $MgCl_2$, y 1 mg de $MnCl_2$ en 80 ml de agua, se ajusta a un pH de 8,1 por medio de 25 ml de hidróxido sódico aproximadamente 1 N, en un recipiente de reacción provisto de agitador. Después de añadir 1,5 mg de leucina-aminopeptidasa (suspensión de enzima de Merck 25010) a esta solución transparente, la solución se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. Durante la reacción, el pH de la mezcla de reacción se controla en un valor comprendido entre 8,1 y 9,1, por medio de ácido clorhídrico aproximadamente 1 N y un titulador automático. Después de este periodo se ajusta el pH a 6,5 por medio de ácido clorhídrico y después se concentra la mezcla de reacción a un volumen de 50 ml por evaporación (30°C; 12 mm de Hg). La L-fenilglicina cristalizada se aísla mediante filtración. El rendimiento de L-fenilglicina es de 2,0 gramos (eficacia = 83,3%).

Rotación específica de esta L-fenilglicina:

$$[\alpha]_D^{25} = + 156^{\circ} \text{ (2,6 \% en peso de HCl; C = 1,6)}$$

Referencia: Beilstein 14 III p. 1188

$$[\alpha]_D^{25} = + 157,5^{\circ} \text{ (2,6 \% en peso de HCl; C = 1,6).}$$

Selectividad: % de L-fenilglicina = 99,5.

50 ml de ácido clorhídrico concentrado se añaden al filtrado, y el clorhidrato de D-fenilglicinamida que cristaliza entonces se aísla también por filtración.

El rendimiento de clorhidrato de D-fenilglicinamida es de 2,5 gramos (eficacia 83,6%). Rotación molar del clorhidrato de D-fenilglicinamida:

5 $[\alpha]_D^{20} = -186,5^\circ$ (agua; C = 0,8).

Referencia: Beilstein 14 III p. 1189

$[\alpha]_D^{20} = -188$ (agua; C = 0,8).

Selectividad: % de clorhidrato de D-fenilglicinamida = 99,5.

10 Una solución del clorhidrato de D-fenilglicinamida en 20 ml de ácido clorhídrico 6 N, se hierve durante 1½ horas. Después de evaporar a sequedad la mezcla de reacción, el residuo de evaporación se absorbe en 20 ml de agua. Un análisis por cromatografía en capa delgada de esta solución, muestra
15 que la D-fenilglicinamida ha sido completamente convertida en D-fenilglicina. El pH de la solución se ajusta a un valor de 6,5 por medio de amoníaco concentrado y la D-fenilglicina cristalizada se filtra a través
20 de un filtro de vidrio y se lava sobre el filtro con 5 ml de agua.

El rendimiento de D-fenilglicina es de 0,35 gramos (eficacia = 81%).

Rotación específica de esta D-fenilglicina:

25 $[\alpha]_D^{20} = -147^\circ$ (C = 0,6; HCl 2 N);

referencia: Beilstein 14 III p.1187

$$[\alpha]_D^{20} = -153^{\circ} \quad (C = 0,6; \text{HCl } 2 \text{ N}).$$

Selectividad: % de D-fenilglicina = 98.

5 Ejemplo 3

Una solución de 5,0 milimoles (930 mg) de clorhidrato de DL-fenilglicinamida, 50 mg de MgCl_2 y aproximadamente 0,2 mg de MnCl_2 en 100 ml de agua, se ajusta a un pH de 8,0 por medio de hidróxido sódico 1 N. Después de añadir a esta solución 250 mg de leucina-aminopeptidasa (Merck 25010) unida por covalencia a 3-aminopropil-trietoxisililo Bio-Glass con una carga de 0,3% en peso, obtenida según se describe en Biotechnology and Bioengineering, vol. XVI, páginas 275-77, 1974, la solución se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas.

Después de filtración de la leucina-aminopeptidasa unida a polvo de vidrio, el filtrado se somete a un análisis por cromatografía en capa delgada. Este mostró que la DL-fenilglicinamida se había convertido en cantidades equimolares de L-fenilglicina y D-fenilglicinamida mediante leucina-aminopeptidasa unida a vidrio por covalencia.

El filtrado se ajusta a un pH de 10,0 con NaOH 1 N y se hace pasar después sobre 100 gramos

de cambiador de iones Amberlite IRC-50 en forma H⁺:
Seguidamente se hacen pasar 100 ml de agua sobre el
cambiador iónico, se evapora el eluato hasta un volu-
men de 15 ml, en vacío, y se aísla por filtración la
5 L-fenilglicina. El rendimiento de L-fenilglicina,
que es pura según la cromatografía en capa delgada,
es de 0,34 gramos (eficacia 90%).

Rotación específica de esta L-fenilglicina:

$$[\alpha]_D^{25} = +157^{\circ} \text{ (2,6\% en peso de HCl; C = 1,6)}$$

10 Referencia : Beilstein 14 III, p. 1188:

$$[\alpha]_D^{25} = +157,5 \text{ (2,6\% en peso de HCl; C = 1,6).}$$

Selectividad:

$$\% \text{ de L-fenilglicina} = 99,8\%$$

15 La D-fenilglicinamida unida a la Am-
berlite IRC-50 se extrae con 150 ml de ácido sulfúri-
co 0,5 N. El eluato se concentra a 10 ml por evapo-
ración en vacío, y después se hierve durante 1 hora.
Después de enfriar y neutralizar con amoniaco acuoso
concentrado, se filtra la D-fenilglicina cristalizada
20 sobre un filtro de vidrio y se lava sobre el filtro
con 5 ml de agua. El rendimiento de D-fenilglicina
es de 0,33 gramos (eficacia 90%) Rotación específica
encontrada:

$$[\alpha]_D^{25} = -152 \text{ (C = 0,6; HCl 2 N).}$$

25 Referencia: Beilstein 14 III, p. 1187:

$$[\alpha]_D^{25} = -153 \quad (c = 0,6; \text{HCl } 2.N).$$

Selectividad: % de D-fenilglicina = 99,2%.

Ejemplo 4

- 5) 0,5 mg de leucina aminopeptidasa (Ser-
va 27717: de ojos de buey), se añaden a una solución
de 1,62 milimoles (0,3 gramos) de clorhidrato de
DL-fenilglicinamida, 12 mg de MgCl_2 y 0,3 mg de MnCl_2
10 en 35,0 ml de solución tampón (ácido bórico-cloruro
de potasio-hidróxido sódico) a temperatura ambiente
y un pH de 8,1, con agitación, en un recipiente de
reacción provisto de agitador. El pH de la mezcla de
reacción se eleva a 8,6 en un periodo de 15 minutos
y después permanece constante. Un análisis por cro-
15 matografía de capa delgada muestra que la mezcla de
reacción está constituida por cantidades equimolares
de L-fenilglicina y D-fenilglicinamida después de 45
minutos y después de 4 horas. Un análisis de amino
ácidos llevado a cabo después de un tiempo de reac-
20 ción de 6 horas dió el mismo resultado, a saber:
0,35% en peso de L-fenilglicina (rendimiento = 100%)
0,34% en peso de D-fenilglicinamida (rendimiento = 99%).

Ejemplo V

- 25 Se disuelven 1,6 milimoles (0,3 gramos)

de clorhidrato de DL-H-fenilglicinamida, en 30 ml de una solución tampón (ácido bórico-cloruro potásico-hidróxido sódico) a un pH de 7,0. Después de añadir 1,0 ml de una solución de $MgCl_2$ 0,125 molar y 0,1 ml de una solución de $MnCl_2$ 0,025 molar, se añaden 0,8 mg de aminopeptidasa M (número de Enzyme Commission 3.4.11.2 'aminopeptidasa unida a partículas', procedente de riñón de cerdo, obtenida de Sigma, nr. A-7761). El pH se ajustó a 7,1 y la mezcla se agita durante 21 horas. Durante este periodo el pH aumentó gradualmente hasta un pH de 7,45.

Se analizaron muestras de la mezcla de reacción mediante cromatografía en capa delgada. Después de 2 horas la mezcla de aminoácidos estaba constituida por 3 moles % de fenilglicina y después de 20 Horas por 50 moles % de fenilglicina.

Se continúa agitando. El análisis de aminoácidos muestra 0,34% en peso de fenilglicina y 0,40 % en peso de fenilglicinamida después de 24 horas, y 0,45 % de fenilglicina y 0,35% en peso de fenilglicinamida después de 100 horas.

Así pues, esta enzima, aún cuando no inadecuada, es inferior a la leucina-aminopeptidasa usada en los ejemplos anteriores.

La presente solicitud que corresponde

a la presentada en Holanda con fecha 14 de Junio de 1.974, bajo el número 7407941, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

REIVINDICACIONES

=====

10

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15

1ª.- Un procedimiento de preparación de D-fenilglicinamida y L-fenilglicina, caracterizado porque se hidroliza DL-fenilglicinamida con una aminopeptidasa adecuada, y se aísla D-fenilglicinamida y/o L-fenilglicina del modo habitual.

20

2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se usa leucina-aminopeptidasa como aminopeptidasa adecuada.

25

3ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª ó 2ª, caracterizado porque la hidrólisis enzimática se efectúa a una acidez de 7-9,5 y una temperatura de 20 a 40°C.

5 4ª.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1ª - 3ª, caracterizado porque se usa la aminopeptidasa en forma insoluble.

10 5ª.- Un procedimiento de preparación de D-fenilglicina, caracterizado porque se hidroliza enzimáticamente DL-fenilglicinamida mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª - 4ª, se separa la D-fenilglicinamida y se convierte la amida en D-fenilglicina.

15 6ª.- Un procedimiento de preparación de D-fenilglicinamida y L-fenilglicina.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, - 6 SET. 1975

P.A.

Alberto de ENCABURO
Por Poderes

25

JGM/.