



ESPAÑA

PATENTE DE INTRODUCCION

④⑦ FECHA DE PUBLICIDAD	⑤① CLASIFICACION INTERNACIONAL C07C
------------------------	--

⑤④ TITULO DE LA INVENCIÓN "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE D-CARBAMIL-AMINOACIDOS Y DE LOS CORRESPONDIENTES D-AMINOACIDOS"
⑤② PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION

⑦① SOLICITANTE (S) SNAMPROGETTI S.p.A., sociedad anónima italiana.
DOMICILIO DEL SOLICITANTE MILAN (Italia), Corso Venezia, 16.
⑦② INVENTOR (ES)
⑦③ TITULAR (ES)
⑦④ REPRESENTANTE Don JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de D-carbamil-aminoácidos y de los correspondientes D-aminoácidos.

5 Más particularmente, la presente invención se refiere a la separación por vía enzimática de los antípodos ópticos de aminoácidos con obtención del aminoácido de configuración D.

Algunos aminoácidos de configuración D (por ejemplo fenilglicina, p-hidroxi fenilglicina) han adquirido recientemente notable importancia como productos intermedios para la preparación de compuestos ampliamente empleados en la industria.

15 Los métodos químicos hasta ahora utilizados para la separación de los antípodos ópticos se basan en el empleo del ácido canfosulfónico.

Este producto es notablemente costoso, recuperable con bajo rendimiento y no fácil de encontrar, por lo que el costo de la operación química resulta muy elevado.

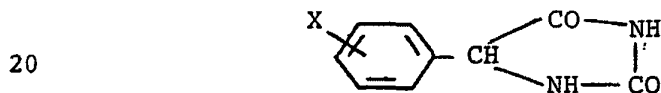
20 Otro método consiste en acilar el aminoácido racemo, hidrolizar selectivamente con enzima acilasa la forma D y aislarla. Sin embargo, las D-acilasas son relativamente raras y siempre impuras a causa de L-acilasa, por lo que durante el proceso de hidrólisis del derivado acilado se obtienen cantidades no despreciables de antípoda L y ello se traduce en la obtención de un producto de pureza óptica deficiente.

25 Es conocido, por la Patente francesa Nº 2.228.746 a nombre de la misma entidad solicitante, un procedimiento

para la preparación de L-carbamil-aminoácidos y de los correspondientes aminoácidos por vía enzimática a partir de idantoinas sustituidas, las cuales son sometidas a hidrólisis enzimática en un intervalo de pH comprendido entre 6 y 11. La reacción da lugar a la formación de los compuestos finales levógiros con eventual reciclado de la forma no hidrolizada.

Ahora se ha descubierto, y ello constituye el objeto de la presente invención, que si la idantoina es sustituida por radicales conteniendo al menos un grupo aromático ligado al carbono asimétrico y la reacción se lleva a cabo en un intervalo de pH más restringido, la misma transcurre selectiva y cuantitativamente hasta la obtención de la sola forma D.

En efecto, sorprendentemente se ha descubierto que la enzima extraída de hígado de ternera y clasificada como hidropirimidina hidrolasa (E.C. 3.5.2.2) actúa sobre la forma racema de compuestos de la siguiente fórmula:



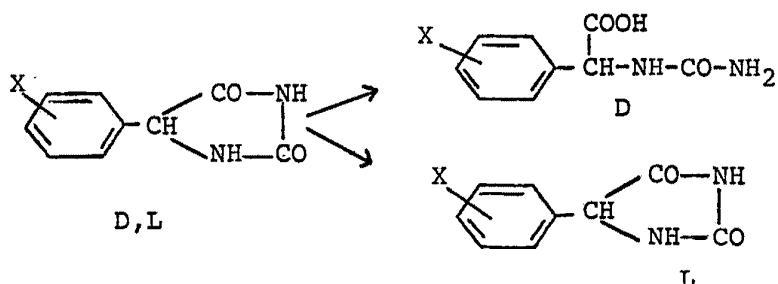
en la cual X representa OH, radicales hidrocarbúricos halógenos, alcoxílicos,  $-\text{NO}_2$ , carboxílicos, efectuándose una hidrólisis rigurosamente selectiva de la forma D.

El procedimiento según la invención comprende sustancialmente el someter a hidrólisis enzimática compuestos de la fórmula arriba indicada, conocidos como idantoinas sustituidas en la posición 5.

La hidrólisis se realiza en condiciones de pH variables entre 8-9, preferiblemente de 8,5. La temperatura puede ser mantenida entre 10 y 70°C, preferiblemente a 30°C.

La hidrólisis se lleva a cabo según el esquema:

5



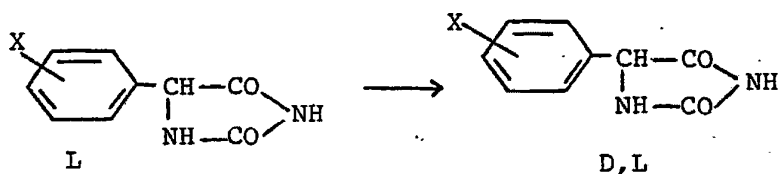
10

Como el D-carbamil derivado que se forma en la hidrólisis es de naturaleza ácida, es preciso mantener el pH en el valor inicial mediante adición de álcalis a medida que va progresando la reacción.

15

Se ha comprobado que, dentro de los valores de pH arriba indicados, mientras progresa la reacción de hidrólisis se obtiene una simultánea racemización de la L-idantoina remanente según el siguiente esquema:

20

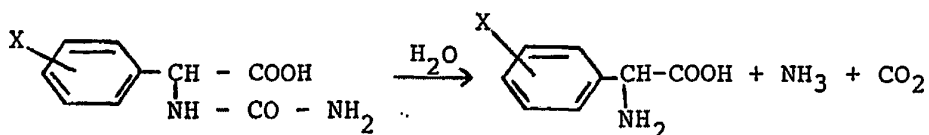


25

Por este motivo, a consecuencia de la extracción continua por hidrólisis enzimática de la D-idantoina, resulta que al final de la reacción se tiene todo carbamil derivado de forma D. La velocidad de racemización de la L-idantoina es función de la temperatura y del pH, y es tanto más elevada cuanto más alta sea la temperatura y más básico el pH. Sin embargo, operando con un pH alrededor de

8,5 es de tal magnitud que no constituye el "rate  
deterging step" de la reacción.

También se ha descubierto que el D-carbamil derivado  
disuelto en agua y calentado hasta su ebullición en parti-  
5 culares condiciones se descompone según el siguiente  
esquema:



10 dando lugar al aminoácido ópticamente activo que puede  
ser aislado fácilmente en forma de pureza química y óptica  
muy elevadas.

Finalmente, una ulterior mejora técnica y económica  
de la presente invención puede ser aportada englobando  
15 la enzima en estructuras fibrosas del tipo de las descritas  
en la Patente italiana Nº 836.462. Con este sistema, la  
enzima, en lugar de ser utilizada una sola vez, puede ser  
utilizada repetidamente, reduciendo así el costo de la  
operación. Además, la reacción se verifica de forma más  
20 limpia, no quedando restos de proteína enzimática en la  
mezcla de reacción.

Los siguientes ejemplos sirven para mejor ilustrar la  
presente invención, pero no deben considerarse como limi-  
tativos de la misma.

25 EJEMPLO 1

Con 176 g (1 mol) de D, L-5 fenilidantoina se formó  
una suspensión en 7,5 litros de tampón potasio fosfato  
0,1 M pH 8,5 a 30°C.

A la suspensión mantenida en agitación se adicionaron 125 ml de solución de hidropirimidina hidrolasa de hígado. (Actividad total 1875 micromoles/minuto a 30° a pH 8,5; proteínas totales 2,75 g).

5 Después de aproximadamente 6 horas, cuando para mantener el sistema a un pH constante se habían adicionado 250 ml de NaOH 4M, la reacción se interrumpió y la mezcla de reacción se enfrió a 4°C y el pH se llevó a 5,5 mediante adición de HCl 6 N.

10 Durante esta operación se obtuvo un precipitado mucilaginoso de proteínas desnaturalizadas que se separó por centrifugación.

La parte sobrenadante se enfrió de nuevo a 4°C y se llevó a un pH 2,5 con HCl 6 N. Durante esta operación  
15 precipitó un producto cristalino que fué lavado con aproximadamente un litro de agua fría y secado a peso constante.

El producto se cristalizó de alcohol etílico/agua 70/30 (V/V) en caliente.

20 El cristal (189 g, 97 % de rendimiento) era cromatográficamente homogéneo y, en base de los espectros I.R., N.M.R y de masa y de los análisis elementales resultó ser N-carbamil fenil glicina.

El poder óptico rotatorio específico resultó ser  
25 de  $[\alpha]_D^{25} = -137^\circ$  (C = 1 % en NH<sub>4</sub>OH 1 N), correspondiente al indicado en la literatura T. Suzuki, K. Igarashi, K. Hase Agr. Biol. Chem. 37 (2) 411 - 416 (1973) para la D (-) N-carbamil fenil glicina.

EJEMPLO 2

En un reactor provisto de camisa de termostatación, dotado de una vía de entrada para el nitrógeno, de un electrodo para la medición del pH y de una vía para la adición de sosa, se introdujeron 10 litros de tampón fosfato 0,1 M conteniendo hidropirimidina hidrolasa de hígado (Actividad total, 7500 micromoles/minuto; proteínas totales, 11 g). Después de haber hecho burbujear nitrógeno durante aproximadamente 30 minutos a través de la solución mantenida a 30°C se adicionaron 192 g (1 mol) de D, L 5-parahidroxifenil idantoina, mientras que el pH se mantenía constante mediante adición continua de NaOH 4 M. Después de 20 horas, cuando el consumo de sosa había llegado a 250 ml, se procedió al aislamiento de la D (-) N-carbamil p-hidroxifenil glicina de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 1.

El producto bruto obtenido se cristalizó de alcohol etílico/n-hexano. Se obtuvieron de este modo 152 g (rendimiento 72 %) de producto con las siguientes características: punto de fusión 170°,  $[\alpha]_D^{20} = -170^\circ$  (C = 0,5 % en agua/alcohol 50/50 V/V).

La estructura del producto fue confirmada por los resultados del análisis elemental, los espectros I.R., N.M.R. y de masa, comparados con los datos de literatura J. Eagles, W.M. Laird; E.C. Matais, Biochemical Journal 121, 425-430 (1971) Sup. Plub. No. SUP 50003. Annex 1, Annex 2.

EJEMPLO 3

Con 206 g (1 mol) de D, L 5 para-metoxi-fenil idantoina se formó una suspensión en 10 litros de tampón potasio fosfato 0,1 M pH 8,5 a 30°C conteniendo hidropirimidina hidrolasa de hígado.

(Actividad total, 7500 micromoles/minuto; proteínas totales, 11 g).

El pH se mantuvo constante mediante adición continua de NaOH 4 M.

Después de 20 horas, cuando se llegó a un consumo de sosa de 250 ml, se interrumpió la reacción y se procedió a la recuperación de la D (-) N-carbamil para-metoxi fenil glicina del modo descrito en el Ejemplo 1, con un rendimiento del 90 %. La estructura del producto fue confirmada por el análisis elemental y por los espectros I.R., N.M.R. y de masa.

EJEMPLO 4

230 ml de solución de hidropirimidina hidrolasa de hígado conteniendo una actividad igual a 10800 micromoles/minuto y 3,45 g de proteínas se adicionaron a 2,1 kg de solución de 150 g de triacetato de celulosa en cloruro de metileno mantenida bajo enérgica agitación. La emulsión así obtenida se extruyó según la técnica descrita en la Patente italiana Nº 836.462.

La fibra así obtenida (300 g) se introdujo en forma de una única madeja en una columna de vidrio encamisada (diámetro 8 cm, altura 60 cm) anclándola a las dos extremidades mediante dos sujeciones de acero inoxidable.

La fibra fue sometida a lavados mediante reciclado de 4 litros de tampón potasio fosfato 0,1 M pH 8,5 hasta la desaparición de la actividad enzimática en solución, (4 lavados durante 6 horas).

5           La columna conteniendo la fibra fue entonces introducida en un circuito que comprendía una bomba peristáltica para el reciclado de la mezcla de reacción y un recipiente encamisado provisto de un electrodo para el control continuo del pH y de una vía de adición de NaOH 4 M  
10 gobernada por un pH-stato. En el sistema se introdujeron 5 litros de tampón potasio fosfato 0,02 M pH 8,5 y 176 g (1 mol) de D, L 5-fenil idantoina, mientras se ponía en función la bomba para el reciclado de la mezcla de reacción y el pH-stato para la adición continua de la sosa.

15           Después de 6 horas, cuando el consumo de NaOH 4 M había llegado a 250 ml, se interrumpió la reacción.

          La mezcla de reacción se descargó. La fibra se lavó con 4 litros de agua.

20           La mezcla de reacción y las aguas de lavado de la fibra se concentraron bajo vacío hasta aproximadamente 3 litros, se enfriaron a 2°C y se trataron con HCl 6 N hasta un pH 2,5. Después de haberlo dejado reposar durante 30', el precipitado fue recogido por filtración y secado bajo vacío hasta un peso constante.

25           El producto obtenido, 180 g (93 %) resultó ser D (-) N-carbamil fenil glicina (punto de fusión 200°C,  $[\alpha]_D^{20} = -135^\circ$  (C = 1 % en NH<sub>4</sub>OH 1 N).

EJEMPLO 5

El mismo sistema descrito en el Ejemplo 4 se utilizó para obtener la D (-) N-carbamil parahidroxi fenil glicina de la D, L 5-parahidroxi fenil idantoina, salvo que el recipiente encamisado se cerró y se introdujo en él una vía para el nitrógeno.

De 192 g (1 mol) de D, L 5-parahidroxi fenil idantoina se obtuvieron, después de 60 horas de reacción, del modo descrito en los ejemplos precedentes, 160 g (rendimiento 76 %) de D (-) N-carbamil parahidroxi fenil glicina; (punto de fusión 200°,  $[\alpha]_D^{20} = -175^\circ$  (C = 0,5 en alcohol/agua 50/50 V/V).

EJEMPLO 6

Utilizando el mismo sistema descrito en el Ejemplo 4, de 206 g (1 mol) de D, L 5-parametoxi fenil idantoina se obtuvieron 200 g (89 %) de D (-) N-carbamil parametoxi fenil glicina.

EJEMPLO 7

Con 194 g (1 mol) de D (-) N-carbamil fenil glicina, obtenidos del modo descrito en el Ejemplo 4, se formó una suspensión en 5 litros de agua. La suspensión se llevó a un pH 4 con solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

La suspensión se dejó hervir durante 8 horas mientras que el pH, que tendía a crecer, era de tanto en tanto llevado de 5 a 4 mediante adición de Amberlite I.R. 120 ( $\text{H}^+$ ).

(La adición total fue de 400 ml de resina).

Después se separó la solución caliente de la resina,

se concentró bajo vacío hasta 1 litro, se enfrió y se trató con HCl 6 N hasta un pH 2.

El cristal obtenido se separó por filtración, se lavó con agua y se secó bajo vacío hasta un peso constante.

5 Se obtuvieron de este modo 88 g (0,45 moles) de D (-) N-carbamil fenil glicina ( $[\alpha]_D = -136,9^\circ$ ).

De las aguas de cristalización de este producto, llevadas a un pH 6 y concentradas bajo vacío, se obtuvieron 70 g (0,46 moles) de D (-) fenil glicina;  
 10 ( $[\alpha]_D^{20} = -154^\circ$ , C = 1 % en HCl 1 N).

La estructura del producto fue confirmada por el análisis elemental y por los espectros I.R., N.M.R. o de masa.

#### EJEMPLO 8

15 De manera análoga a cuanto se ha descrito en el Ejemplo 7, pero llevando a cabo la reacción en atmósfera de nitrógeno, se obtuvieron de 210 g (1 mol) de D (-) N-carbamil parahidroxi fenil glicina, después de 9 horas de ebullición, 67 g (40 %) de D (-) parahidroxi fenil  
 20 glicina ( $[\alpha]_D = -154^\circ$ , C = 0,5 % en HCl 1 N).

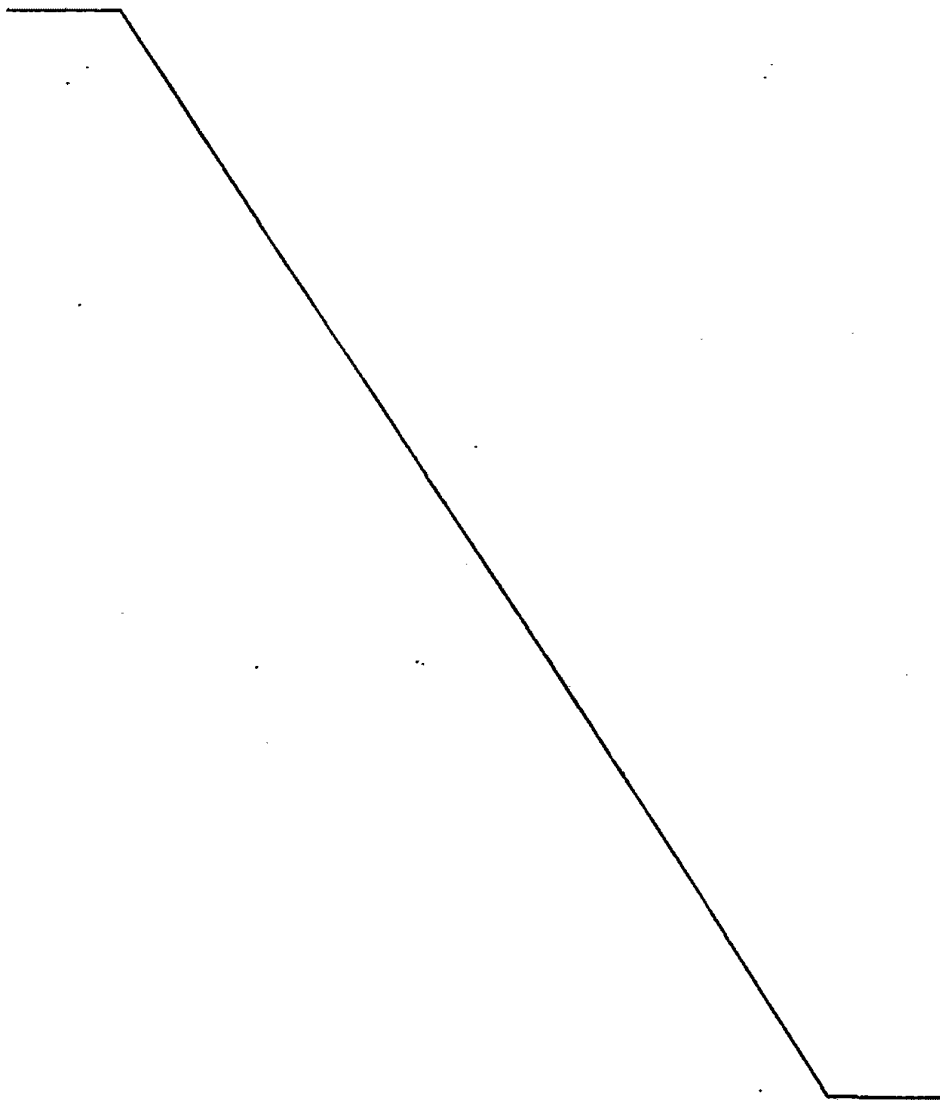
La D (-) N-carbamil parahidroxi fenil glicina no hidrolizada resultó ser de 100 g (47 %) y con  $[\alpha]_D^{20} = -175^\circ$  (C = 0,5 % en etanol/agua 50/50 V/V).

#### EJEMPLO 9

25 Del modo descrito en el Ejemplo 7 se obtuvieron, de 224 g (1 mol) de D (-) N-carbamil parametoxi fenil glicina, obtenida según se ha descrito en el Ejemplo 3,

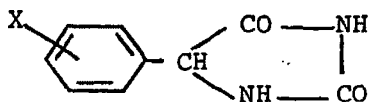
80 g (44 %) de D (-) parametoxi fenil glicina.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento,  
así como la manera de ponerlo en práctica, se hace constar  
que todo cuanto no altere, cambie o modifique su principio  
5 fundamental puede quedar sometido a variaciones de detalle,  
siendo lo esencial y por lo que se solicita Patente de  
Introducción, por diez años, lo que queda resumido en las  
siguientes reivindicaciones:



REIVINDICACIONES

1.<sup>a</sup>.- Procedimiento para la preparación de D-carbamil-aminoácidos y de los correspondientes D-aminoácidos, caracterizado porque se someten a hidrólisis enzimática compuestos de la fórmula



en la cual X representa OH, radicales hidrocarbúricos halógenos, alcofílicos,  $-NO_2$ , carboxílicos, a un pH comprendido entre 8 y 9, y después se hidroliza hasta su ebullición el carbamil-aminoácido obtenido.

2.<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación precedente, caracterizado porque la reacción de hidrólisis enzimática se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 10 y 70°C.

3.<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque como enzima se elige la hidropirimidina hidrolasa de hígado de ternera.

4.<sup>a</sup>.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE D-CARBAMIL-AMINOACIDOS Y DE LOS CORRESPONDIENTES D-AMINOACIDOS,

tal y como queda descrito y reivindicado en la presente

*to*

memoria que consta de trece hojas mecanografiadas por una sola cara.

BARCELONA, 10 de Junio de 1977.

SNAMPROGETTI S.p.A.  
P.P.

J. M. GOMEZ-ACEBO Y POMBO  
p. p. Fdo. J. M. Valentin-Fernández

Valentin

hp