



ESPAÑA

19 ES	11 21	NOMBRE <b>459858</b>	10 A3
	22	FECHA DE PRESENTACION 10-6-1977	

PATENTE DE INTRODUCCION

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D
------------------------	--

54 TITULO DE LA INVENCIÓN "PROCEDIMIENTO PARA LA TRANSFORMACION DE IDANTOINAS RACEMAS EN AMINOACIDOS OPTICAMENTE ACTIVOS"
---

58 PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION
--

71 SOLICITANTE (ES) 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 transformación de idantoinas racemas en aminoácidos ópticamente activos, y, más particularmente, para la hidrólisis de idantoinas a derivados de aminoácidos de configuración D mediante el empleo de particulares microorganismos que utilizan la idantoína como fuente de nitrógeno.

Algunos D-aminoácidos, especialmente fenil glicina y p-hidroxifenilglicina, constituyen importantes productos intermedios para la preparación de compuestos ampliamente utilizados en la industria farmacéutica.

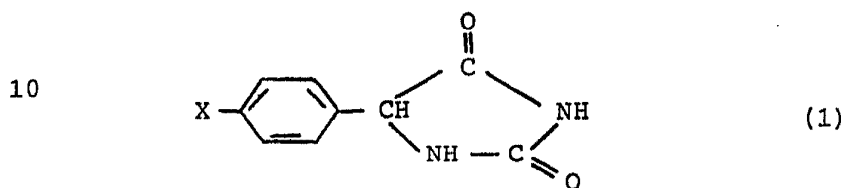
En el pasado se han llevado a cabo numerosas tentativas para obtener D-aminoácidos, pero ninguno de estos métodos era realizable mediante un proceso industrial.

Los métodos químicos utilizados hasta ahora para la separación de los antípodas ópticos son muy costosos y presentan un bajo rendimiento. Los mismos se basan en el empleo del ácido canfosulfónico.

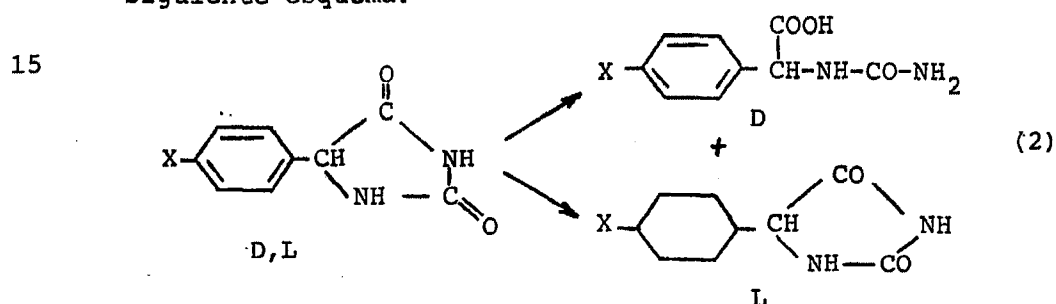
Otro método consiste en hidrolizar selectivamente el D-acil-aminoácido con la enzima acilasa. Sin embargo, las D-acilasas son relativamente raras y siempre impuras a causa de L-acilasas, lo cual dificulta el proceso y da lugar a la obtención de un producto de pureza óptica deficiente.

La hidrólisis enzimática objeto de la presente invención permite, por el contrario, la preparación de una sola forma estereoisómera de un aminoácido o de un derivado del mismo a partir de un compuesto racemo.

Un procedimiento para la resolución enzimática de D,L aminoácidos o de derivados de los mismos ha sido ya propuesto por la misma entidad solicitante en la Patente francesa Nº 2.228.746. Este procedimiento comprende sustancialmente el someter a hidrólisis enzimática, mediante hidropirimidina hidrolasa (E.C.3.5.2.2.), extraída de hígado de ternera, la forma racema de compuestos de la siguiente fórmula general;



donde X = -H, -OH. La hidrólisis se verifica según el siguiente esquema:



20 Ahora se ha descubierto que la resolución enzimática de compuestos racemos de la fórmula general (1) según el esquema (2) es también posible con hidrolasas formadas por microorganismos de la clase Pseudomonas, hasta ahora nunca empleadas en este tipo de reacciones.

25 El procedimiento según la presente invención consiste en la producción de la enzima específica que es formada durante el crecimiento de microorganismos de la clase

Pseudomonas y en la hidrólisis de idantoina a derivados de D,L aminoácidos con esta enzima, pudiendo la enzima emplearse directamente como suspensión bacteriana o medio de cultura o bien ser extraída de las células y del terreno de cultura.

El experimento para la hidrólisis selectiva de los idantoinderivados de D,L aminoácidos a través de microorganismos se realizó del siguiente modo:

Las cepas bacterianas aisladas de tierra, plantas, desechos de diverso género, etc., así como cepas de captación, fueron inoculadas de golpe en recipientes de 250 ml conteniendo 50 ml del siguiente terreno de cultura:

	peptona de carne	10 g/l
15	extracto de levadura	10 g/l
	glucosa	5 g/l
	NaCl	3 g/l
	5-(D,L)metilidantoina	1 g/l
	pH 7,2	

20 esterilización 30 min a 110°C

Después de 20-24 h de incubación (agitación orbital) a 30°C fueron incubados recipientes de 500 ml conteniendo 100 ml del mismo terreno de cultura con 5 ml de esta precultura.

25 Después de otras 18-22 h de incubación se llevó a cabo la reacción enzimática con las "células restantes": en probetas con 10 ml de tampón de fosfatos 0,07 M pH 8,5 con 20  $\mu$ M/ml de 5-(D,L)fenilidantoina se adicionó 1 ml

de las suspensiones bacterianas (peso seco aprox. 50 mg/ml). Después de 30 min de incubación a 30° se llevó a cabo la reacción con p-dimetilaminobenzaldehído para la cuantización del carbamil derivado formado (J. Biol. Chem. 238, 3325 (1963)).

5

Las cepas empleadas se indican en la Tabla 1. De entre éstas, las designadas con los números 942 y 945 han sido depositadas en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, donde han recibido los números CBS 145.75 y 146.75, respectivamente.

10

TABLA 1C e p a

N-carbamilfenilglicina

en % del rendimiento teórico

	Pseudomonas sp.	940	41
15		941	50
		942	64
		943	50
		944	50
		945	57
20		946	50
		947	15
		948	15
		949	20
		950	20
25		951	20
		952	20
		953	20
		954	20

	955	20
	Pseudomonas fluo-	
	rescens 956	10
	Pseudomonas sp. 957	41
5	" ATCC 11299	9
	Pseudomonas oleo-	
	vorans Cl 59	17
	Pseudomonas des-	
	molyticum NCIB 8859	25
10	Pseudomonas fluo-	
	rescens ATCC 11250	25
	Pseudomonas pu-	
	tida ATCC 12633	14

15 Las cepas bacterianas enumeradas en la Tabla 1 crecen bien en todos los terrenos de cultivo convencionales de laboratorio. Todas ellas son capaces de utilizar idantoina como única fuente de nitrógeno. El crecimiento se produce a una temperatura comprendida entre 5 y 40°C, con un óptimo entre 25-30°C.

20 Para la clasificación por géneros se siguió el esquema del Bergey's Manual 7<sup>a</sup> edición, así como las recomendaciones de Lysenko (J. Gen. Microbiol. 25, 379 (1961)) y de Stanier, Palleroni, Doudoroff (J. Gen. Microbiol, 43: 159-271 (1966)).

25 Se ha comprobado que durante la hidrólisis enzimática de la D-idantoina a un pH alcalino (pH 7-10) se produce simultáneamente una racemización no enzimática de la L-idantoina remanente. Por este motivo, y como consecuen-

cia de la substracción continua por hidrólisis enzimática de la D-idantoina, se tiene al final de la reacción todo el carbamil derivado de forma D.

5 La identidad de la D(-)N-carbamilfenilglicina se comprobó después de cristalización del producto de reacción a base de los espectros I.R., N.M.R. y de masa y análisis elemental.

El poder óptico rotatorio específico resulta ser de  $[\alpha]_D^{25} = -137^\circ$  (c = 1 % en  $\text{NH}_4\text{OH}$  1N), correspondiente al indicado en la literatura.

15 La velocidad de racemización de la L idantoina es función de la temperatura y del pH y es por ello tanto más elevada cuanto más alta sea la temperatura o más básico el pH. Sin embargo, operando a un pH alrededor de 7,5 es suficientemente elevada para no limitar la velocidad de reacción.

La temperatura de la reacción enzimática puede ser mantenida entre 10 y 60°C. Sin embargo, por razones prácticas se prefieren temperaturas comprendidas entre 25 y 40°C.

25 Según la presente invención, la hidrólisis de las idantoinas no se produce solamente en presencia de microorganismos en fase de crecimiento o en presencia de células intactas de los mismos, sino también en extractos de los microorganismos arriba citados. Así por ejemplo, los microorganismos pueden ser cultivados en un terreno nutritivo líquido para obtener una acumulación de hidrolasas en las células, y las DL idantoinas pueden ser

adicionadas sucesivamente a la cultura. La reacción enzimática puede ser también llevada a cabo con las denominadas "células restantes". En este caso se recuperan las células bacterianas del terreno de cultura, se lavan y se suspenden en un menstruo tamponado idóneo, añadiéndose al mismo la idantoina racema.

Además es posible utilizar preparados que contengan las hidrolasas, como extractos o concentrados de éstas, o preparados de hidrolasas brutas o purificadas que hayan sido obtenidas de células de los microorganismos arriba indicados. Finalmente, también pueden emplearse hidrolasas brutas o purificadas que hayan sido inmovilizadas mediante combinaciones con compuestos macromoleculares.

Otras modalidades operativas resultarán evidentes de los ejemplos que se describen a continuación con el solo fin de mejor ilustrar la presente invención.

#### EJEMPLO 1

A 100 ml de un caldo de cultura en el terreno arriba indicado de la cepa *Pseudomonas* sp. 942 en un recipiente de 500 ml se adicionaron, en la 24<sup>a</sup> hora de incubación (agitación orbital) y a 30°C, 100 ml de tampón de fosfatos (0,14 M) pH 8,5 conteniendo 30  $\mu$ M/ml de 5-(D,L)fenilidantoina.

Después de otras 5 horas de incubación en las mismas condiciones se determinó la N-carbamil-fenilglicina formada.

De 530 mg de 5-(D,L)fenilidantoina se habían formado 525 mg de N-carbamilfenilglicina, lo cual corresponde a un rendimiento de aproximadamente un 90 %.

EJEMPLO 2

Se preparó un caldo de cultura con una composición igual a la indicada en el Ejemplo 1, conteniendo 1 g/l de 5-(D,L)metilidantoina. El pH se ajustó a 7,2 con sosa y el terreno se distribuyó en porciones de 50 ml en recipientes de 250 ml. Después de esterilización durante 30 min a 110°C, los recipientes fueron inoculados de golpe con una cultura de la cepa *Pseudomonas* sp 942 conteniendo el mismo terreno con el 2 % de agar (DIFCO), e incubados durante 20 horas a 30°C bajo agitación orbital (220 rpm).

De esta precultura (D.O. a 550 nm: 0,400 dil. 1 : 10) se inocularon 5 ml en recipientes de 500 ml conteniendo 100 ml del mismo terreno, y la cultura se incubó a 30°C bajo agitación orbital (220 rpm) durante 18 h (última fase del crecimiento exponencial). Después se recogieron las células por centrifugación (5000 x g, 20 min) y se lavaron 3 veces en solución fisiológica tamponada, siendo finalmente suspendidas en tampón de sales de fosfatos pH 8,5 0,07 M: células restantes.

Para la hidrólisis enzimática se incubaron a 30°C bajo agitación orbital (200 rpm) en recipientes de 250 ml 64 ml de la mezcla de reacción conteniendo: 260 mg de bacterias (peso seco) y 20  $\mu$ M/ml de D,L fenilidantoina (=3,52 mg/ml). En diversos intervalos de tiempo se comprobó el producto de la hidrólisis, la D carbamil-fenilglicina, con un método colorimétrico (J. Biol. Chem. 238, 3325, (1963)) a 438 nm. En la Fig. 1 se indican

los resultados en % del rendimiento teórico del carbamil-derivado formado, indicándose en las abscisas los tiempos (horas) y en las ordenadas los porcentajes de D(-)N-carbamil-fenilglicina formada.

5 EJEMPLO 3

Se preparó un terreno semisintético con la siguiente composición:

	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,05 g/l
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,72 g/l
10	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0 g/l
	$\text{MgSO}_4$	0,2 g/l
	$\text{MnSO}_4$	0,45 mg/l
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,5 mg/l
	glucosa	10 g/l
15	Y.E.	0,2 g/l
	5-(D,L) metilidantoina	1,0 g/l

El terreno se distribuyó en porciones de 50 ml en recipientes de 250 ml y de 100 ml en recipientes de 500 ml y se esterilizó durante 30 min a 110°C.

20 Para la precultura se inocularon los recipientes de 250 ml de golpe con una cultura de la cepa *Pseudomonas* sp. 942 y se incubaron, según se ha descrito en el Ejemplo 2, durante 24 h a 30°C.

25 De esta cultura (D.O. a 550 nm: 0,245 de l. 1 : 10) se inocularon 5 ml en recipientes de 500 ml. Después de 19 horas de incubación a 30°, al igual que arriba, se prepararon las "células restantes" como en el Ejemplo 2.

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo a 30° en una

mezcla de reacción conteniendo en 64 ml de tampón 280 mg de bacterias (respecto al peso en seco) y 20  $\mu$ M/ml de 5-(D,L)fenilidantoina. Después de 5, 10 y 15 min se determinó la cantidad del carbamil derivado formado.

5

TABLA 2

<u>Tiempo en min</u>	<u>5</u>	<u>10</u>	<u>15</u>
$\mu$ M carbamil derivado formado/ml	1,15	2,05	3,00

EJEMPLO 4

10

Se prepararon células bacterianas de la cepa *Pseudomonas* sp. 942 del modo descrito en el Ejemplo 2. Una suspensión de las mismas (42 mg/ml de células secas) en tampón de sales de fosfatos 0,1 M, pH 8, se sometió a rotura mecánica utilizando el homogeneizador "Manton-Gaulin" operante a la presión de 850 kg/cm<sup>2</sup>, a una temperatura inferior a 24°C.

15

Los residuos celulares se separaron del extracto por centrifugación (25.000 xg, 30 min).

20

A 950 ml de tampón de sales de fosfatos pH 7,7 conteniendo 2,12 g de 5-(D,L) fenilidantoina se adicionaron 50 ml del extracto conteniendo 8.500 U de la enzima. [1 U es la cantidad de enzima que transforma en tampón de fosfatos, pH 7,7 a 30°C, conteniendo 12  $\mu$ M/ml de 5-(D,L)fenilidantoina, 1  $\mu$ M/ml del sustrato en 60 min.]

25

Después de 1 h a 30°C se formaron 1,7 g de D-carbamilderivado correspondientes a aproximadamente 80 % de la hidrólisis total.

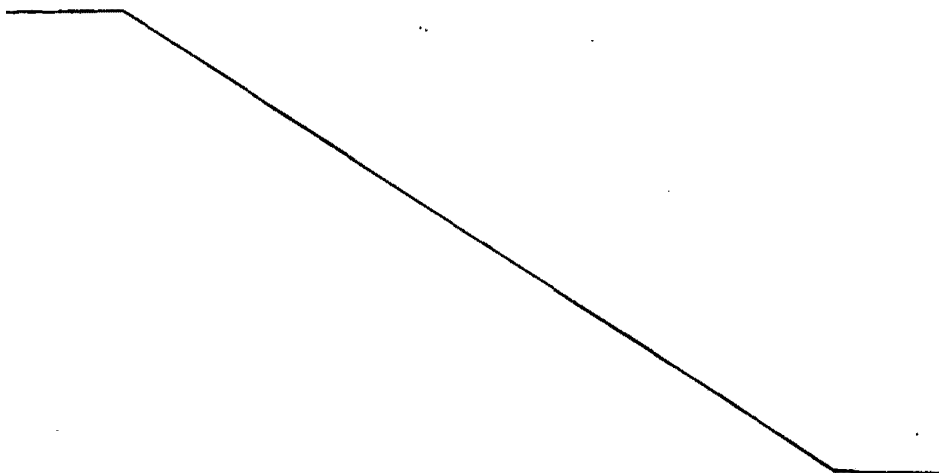
EJEMPLO 5

Al igual que en el Ejemplo 4 se adicionaron a 993 ml de substrato 7 ml de un preparado del extracto purificado unas 7 veces. Después de 1 h a 30°C se habían formado  
5 1,7 g de D-carbamilderivado, correspondientes a aproximadamente el 80 % de la hidrólisis total.

EJEMPLO 6

En las mismas condiciones del Ejemplo 2 se obtuvieron, después de 30 min a 30°C con la cepa Pseudomonas sp. 945,  
10 de 352 mg de 5-(D,L)fenilidantoina 220 mg de N-carbamilfenilglicina, lo cual corresponde a aproximadamente el 57 % del rendimiento teórico.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de ponerlo en práctica, se hace constar  
15 que todo cuanto no altere, cambie o modifique su principio 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 transformación de idantoinas racemas en aminoácidos ópticamente activos, y, más particularmente, para la hidrólisis de idantoinas o derivados de D,L aminoácidos, caracterizado porque la reacción de hidrólisis se realiza en presencia de complejos enzimáticos derivados de microorganismos de la clase Pseudomonas que utilizan la idantoina o un derivado de la misma como única fuente de nitrógeno.

2<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>, caracterizado porque la reacción se realiza a una temperatura comprendida entre 10 y 60°C.

3<sup>a</sup>.- PROCEDIMIENTO PARA LA TRANSFORMACION DE IDANTOINAS RACEMAS EN AMINOACIDOS OPTICAMENTE ACTIVOS, tal y como queda descrito y reivindicado en la presente memoria que consta de doce hojas mecanografiadas por una sola cara y de una lámina de dibujos.

BARCELONA, 10 de Junio de 1977.

SNAMPROGETTI S.p.A.  
P.P.

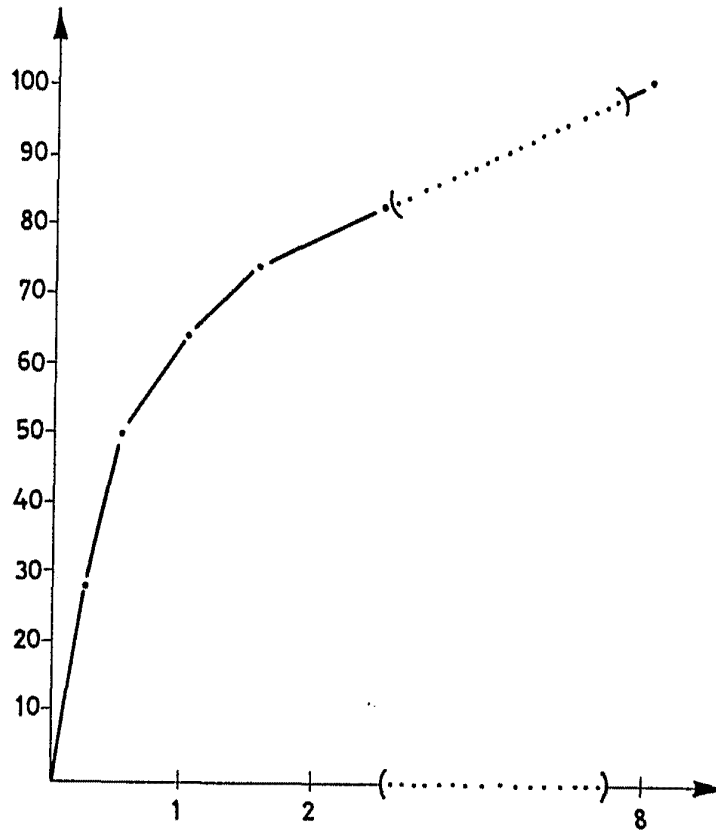
J. M. GOMEZ-ACEBO Y POMBO  
es. p. Pdo. J. M. Valente Ferrández

Valente

to

DIAGRAMA

Fig.1



BARCELONA, 10 de Junio de 1977  
SNAMPROGETTI S.p.A.  
P.P.

J. M. GOMEZ-ACEBO Y POMBO  
p. p. fdo.: J. M. Valera y Fernández

*Valera y Fernández*