



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑪ CH 650 274 A5

⑤① Int. Cl.4: C 12 P 13/04

// (C 12 P 13/04, C 12 R 1:645)

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

⑫ **FASCICOLO DEL BREVETTO** A5

⑲ Numero della domanda: 4159/81	⑦③ Titolare/Titolari: Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A., Roma (IT)
⑳ Data di deposito: 23.06.1981	
⑳ Priorità: 24.06.1980 IT 86253/80	⑦② Inventore/Inventori: Cavazza, Claudio, Roma (IT)
㉔ Brevetto rilasciato il: 15.07.1985	
④⑤ Fascicolo del brevetto pubblicato il: 15.07.1985	⑦④ Mandatario: A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel

⑤④ **Procedimento per la produzione enzimatica di L-carnitina.**

⑤⑦ Viene descritto un procedimento enzimatico per produrre L-carnitina, che comprende il porre a contatto con una preparazione sporale comprendente i prodotti liberati dalle spore della muffa *Neurospora crassa* una soluzione in un solvente donatore di gruppi ossidrilici di γ -butirrobetaina sodio-2-ossoglutarato, un agente riducente e un sale ferroso quale catalizzatore di idrossilazione.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per produrre L-carnitina per reazione di γ -butirrobetaina con un enzima idrossilasi, che comprende: mettere a contatto con un preparato sporale comprendente i prodotti liberati dalle spore di *Neurospora crassa* una soluzione in un solvente donatore di gruppi ossidrilici di
 - (a) γ -butirrobetaina;
 - (b) sodio-2-ossoglutarato;
 - (c) un agente riducente; e
 - (d) una sorgente di ioni ferrosi quali catalizzatore di ossidrilazione.
2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta soluzione comprende anche (e) catalase.
3. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detto solvente è scelto nel gruppo comprendente acqua, soluzioni tampone, alcanoli inferiori aventi da 1 a 4 atomi di carbonio e loro miscele.
4. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detto agente riducente è scelto nel gruppo comprendente un ditionato di metallo alcalino, acido ascorbico e i suoi sali di metalli alcalini.
5. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta sorgente di ioni ferrosi è scelta nel gruppo comprendente FeSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ e $\text{Fe}(\text{SCN})_2$.
6. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta *Neurospora crassa* è scelta nel gruppo comprendente i ceppi ATCC 13837, ATCC 24914, ATCC 9279 e ATCC 15514.
7. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detto preparato sporale comprendente i prodotti liberati dalle spore è ottenuto trattando dette spore con un detergente.
8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, in cui detto detergente è isottilfenilpolietossialcoole.
9. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detto preparato sporale comprendente i prodotti liberati dalle spore è ottenuto sottoponendo dette spore ad un trattamento meccanico con un disintegratore ultrasonico.

La presente invenzione riguarda un procedimento per la produzione di L-carnitina e più specificatamente riguarda un procedimento per la produzione enzimatica di L-carnitina per reazione di γ -butirrobetaina con un enzima idrossilasi.

Come noto, la carnitina (acido-beta-idrossi- γ -trimetil-aminobutirrico) contiene un atomo di carbonio asimmetrico e pertanto esistono due forme stereoisomere di carnitina, la forma D e la forma L.

La L-carnitina è normalmente presente nell'organismo, ove essa esercita la funzione di trasportatore di acidi grassi liberi a lunga catena attivati attraverso la membrana mitocondriale. Poiché la membrana mitocondriale è impermeabile ai derivati dell'acetil CoA, gli acidi grassi liberi a lunga catena possono attraversare la membrana mitocondriale soltanto quando ha avuto luogo l'esterificazione con la L-carnitina. La funzione di trasportatore della L-carnitina viene esercitata sia trasportando gli acidi grassi a lunga catena attivati dai siti della loro biosintesi, per esempio dai microsomi, ai mitocondri ove essi vengono ossidati, che trasportando l'acetil CoA dai mitocondri, ove esso viene formato, ai siti extra-mitocondriali ove si verifica la sintesi degli acidi grassi a lunga catena, ad esempio nei microsomi in cui l'acetil CoA può venir utilizzato per sintetizzare il colesterolo e gli acidi grassi.

Mentre esclusivamente l'isomero levogiro (cioè la L-carnitina) è la forma biologica (e infatti la D-carnitina non è mai stata finora individuata nei tessuti di mammiferi), la forma racemica, cioè la D,L-carnitina, viene usata da un certo numero d'anni per differenti scopi e indicazioni. Ad esempio, la D,L-carnitina viene venduta in Europa quale stimolatore dell'appe-

tito, ed è stato inoltre indicato che questo composto è attivo nell'accelerare la crescita dei bambini; si veda ad esempio Bor-niche et al., *Clinic Chemica Acta*, 5, 171-176, 1960 e Alexander et al., «Protides in the Biological Fluids», 6th Colloquium, Bruges, 1958, 306-310.

Il brevetto statunitense 3 830 931 descrive che si rilevano dei miglioramenti nella contrattilità miocardica e nel ritmo sistolico provocati dalla insufficienza cardiaca congestizia per somministrazione di D,L-carnitina. Il brevetto statunitense 3 968 241 descrive l'uso della D,L-carnitina nelle aritmie cardiache, mentre il brevetto statunitense 3 810 994 descrive l'impiego di D,L-carnitina nel trattamento dell'obesità.

Recentemente tuttavia si è giunti a comprendere sempre meglio l'importanza di utilizzare esclusivamente l'isomero levogiro della carnitina per almeno alcune applicazioni terapeutiche. Si è potuto infatti dimostrare che la D-carnitina costituisce un inibitore competitivo degli enzimi legati alla carnitina, quali ad esempio la carnitina acetil transferasi (CAT) e la carnitina palmitil transferasi (PTC). Inoltre recenti sperimentazioni suggeriscono che la D-carnitina possa diminuire il livello di L-carnitina del tessuto cardiaco. Conseguentemente, è essenziale che solamente la L-carnitina venga somministrata a pazienti sottoposti a trattamento medico per disturbi cardiaci o per abbassarne i lipidi ematici.

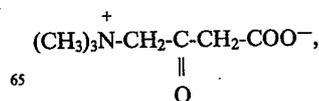
Sono stati proposti diversi procedimenti per produrre carnitina su scala industriale. Tuttavia, la sintesi chimica della carnitina conduce inevitabilmente ad una miscela racemica degli isomeri D e L. Conseguentemente, è necessario ricorrere a dei metodi di risoluzione in modo da ottenere gli antipodi ottici separati dalla miscela racemica.

Un tipico metodo di risoluzione, in cui il cloridrato di D,L-carnitinammide è usato quale composto di partenza per la risoluzione, è descritto nel brevetto belga 660 039. Tale procedimento comprende l'uso di acido D canforico per produrre il D-canforato della D,L-carnitinammide. Una soluzione alcolica di questo composto viene sottoposta a cristallizzazione frazionata in modo da fornire l'isomero L quale prima frazione che precipita dalla soluzione.

Allo scopo di ottenere il D-canforato della D,L-carnitinammide è dapprima necessario formare il sale ammonico dell'acido D-canforico per reazione con ammoniaca; il D-canforato ammonico che si forma viene quindi convertito in D-canforato d'argento per reazione con nitrato di argento. Poiché la carnitinammide è sottoforma di sale cloridrato, la formazione di questo sale d'argento è essenziale allo scopo di eliminare lo ione cloruro. Tale procedimento è pertanto molto costoso (a causa dell'uso imperativo del composto d'argento) ed è difficile da attuare su scala industriale, in quanto i vari studi del procedimento devono venire condotti lontano dalla luce allo scopo di evitare il marcato annerimento dei recipienti di reazione, a causa della grande quantità di cloruro d'argento che si forma. Il D-canforato della D,L-carnitinammide può inoltre risultare impuro per la presenza di ioni argento.

Inoltre, dopo che il D-canforato della L-carnitinammide è stato separato per cristallizzazione dalla soluzione alcolica, si rendono necessari ulteriori stadi per convertire infine tale composto in L-carnitina.

Più recentemente, nella domanda di brevetto francese 77 22 183 è stato descritto un procedimento enzimatico in cui si sintetizza L-carnitina esclusivamente per riduzione asimmetrica della deidrocarnitina,



con carnitina deidrogenasi, un coenzima utilizzabile dalla carnitina deidrogenasi per la riduzione, quale ad esempio nicotin-

ammide adenina dinucleotide (NADH), e un reagente chimico o enzimatico adatto a ridurre la forma ossidata del NAD nella sua forma ridotta NADH. La carnitina deidrogenasi viene isolata da un batterio del genere *Pseudomonas*.

Questo procedimento, così come ogni altro procedimento che, allo scopo di produrre delle sostanze farmaceutiche, è basato sull'uso di batteri, comporta diversi svantaggi:

1. I sistemi enzimatici devono venire accuratamente purificati con relative complesse procedure di purificazione ed elevati costi, particolarmente quando il procedimento viene effettuato su scala industriale.

2. Anche la L-carnitina prodotta necessita di una intensa purificazione onde separarla dai contaminanti e dai metaboliti batterici che potrebbero essere tossici e comportare dei pericoli per la salute.

Inoltre, il NADH (un reagente costoso) non è in grado di stimolare la reazione nel caso si impieghino dei batteri intatti, in quanto esso non può penetrare attraverso la parete delle cellule batteriche.

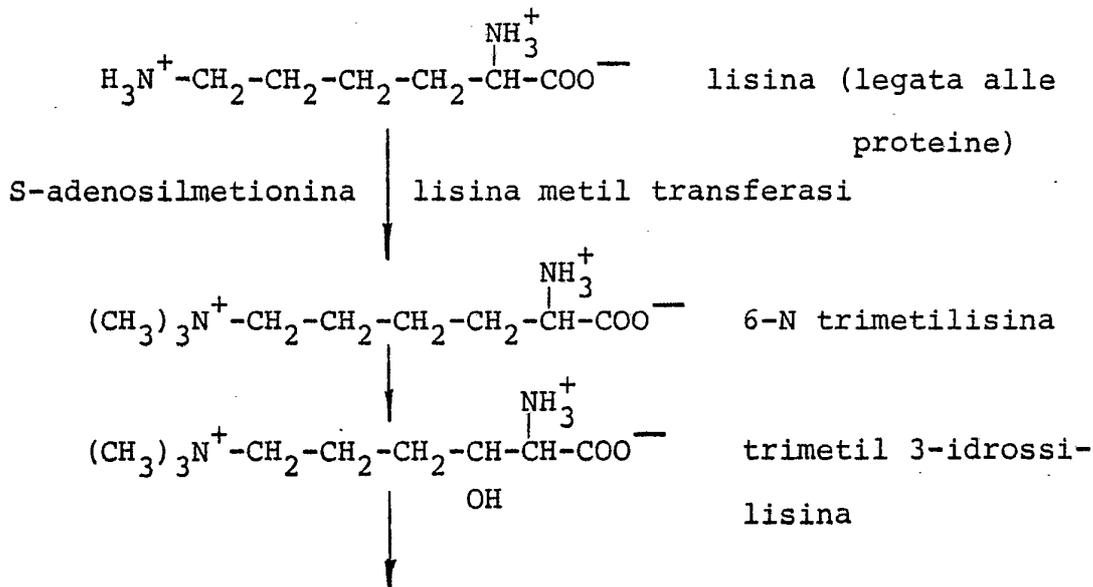
La presente invenzione fornisce un procedimento per produrre per via enzimatica esclusivamente L-carnitina, procedimento che non è basato sull'uso di batteri quale sorgente del sistema enzimatico da impiegare nel procedimento.

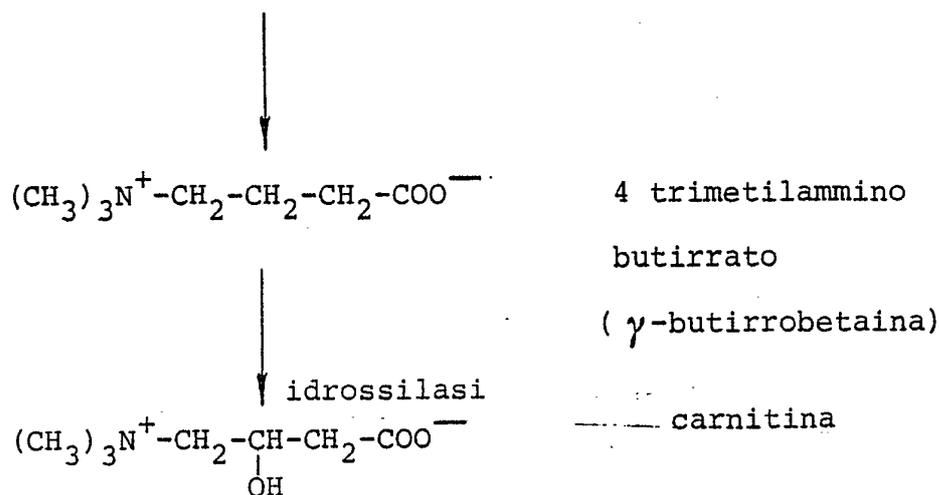
La presente invenzione è basata sulla scoperta che le spore della *Neurospora crassa* possiedono un enzima idrossilasi che, quando posto a contatto con la γ -butirrobetaina in un solvente donatore di gruppi ossidrilici in presenza di sodio-2-ossoglutarato, ioni ferrosi e un agente riducente, converte selettivamente la γ -butirrobetaina esclusivamente in L-carnitina sostanzialmente pura.

La γ -butirrobetaina, $(\text{CH}_3)_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$, è un composto noto che può venir facilmente preparato per sintesi chimica.

Un metodo per produrre la γ -butirrobetaina è ad esempio descritto in Can. J. Chem. 54 (1976) 3310-3311. Gli insegnamenti di questo articolo sono incorporati nel presente contesto per riferimento.

È noto che l'idrossilazione della γ -butirrobetaina in L-carnitina si verifica negli organismi viventi. Infatti le ricerche condotte durante gli ultimi anni hanno consentito di accertare definitivamente che la via biosintetica della carnitina è la seguente:





20

È stata altresì descritta l'idrossilazione della γ -butirrobetaina in L-carnitina mediante una frazione proteica solubile parzialmente purificata, isolata dal fegato di ratto. Si veda a tale proposito *Biochemistry*, vol. 6, no. 5 May, 1967, 1271-1282.

Non era mai stato tuttavia precedentemente descritto che nelle spore della *Neurospora crassa* è presente un enzima idrossilasi della γ -butirrobetaina e che tale enzima può venir liberato (così da rendersi disponibile per la convenzione della γ -butirrobetaina in L-carnitina) mediante un trattamento delle spore che induce una modificazione della loro struttura.

In accordo all'invenzione, il procedimento per produrre L-carnitina è basato sulla reazione della γ -butirrobetaina con un enzima idrossilasi, ed è caratterizzato dal comprendere lo stadio di porre a contatto un preparato sporale comprendente i prodotti liberati dalle spore di *Neurospora crassa* con una soluzione in un solvente donatore di gruppi ossidrilici di

- (a) γ -butirrobetaina;
- (b) sodio-2-ossoglutarato;
- (c) un agente riducente; e
- (d) una sorgente di ioni ferrosi quali catalizzatore di idrossilazione.

Il preparato sporale comprendente i prodotti liberati dalle spore di *Neurospora crassa* è ottenuto mediante un trattamento chimico-fisico delle spore con un detergente oppure sottoponendo le spore ad un trattamento meccanico, ad esempio con un disintegratore ultrasonico. Preferibilmente, allo scopo di ottimizzare la resa in L-carnitina, la soluzione comprende anche (e) catalasi.

Solvente.

Il solvente in cui la γ -butirrobetaina, l'agente riducente e il catalizzatore di idrossilazione vengono disciolti è scelto nel gruppo comprendente acqua, soluzioni tampone, alcoli inferiori aventi da 1 a 4 atomi di carbonio e loro miscele. L'acqua è il solvente preferito.

Agente riducente

L'agente riducente da utilizzarsi nel procedimento della presente invenzione è qualsiasi riducente adatto a ridurre ioni ferrici (Fe^{+3}) in ioni ferrosi (Fe^{+2}). Questi ultimi agiscono da catalizzatore per la reazione di idrossilazione della γ -butirrobetaina da parte dell'enzima idrossilasi contenuto nelle spore della *Neurospora crassa*. Conseguentemente, qualsiasi ione ferrico che potrebbe essersi formato dovrebbe venir prontamente riconvertito allo stato di ossidazione +2.

Esempi non limitativi di adatti agenti riducenti sono i ditio-

niti di metalli alcalini, l'acido ascorbico e i suoi sali di metalli alcalini, il ditionito sodico essendo il preferito.

Sorgente di ioni ferrosi

Quale sorgente di ioni ferrosi può venire impiegato qualsiasi sale ferroso idrosolubile la cui parte anionica non disattiva l'enzima idrossilasi.

Adatti sali ferrosi sono FeSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ e $\text{Fe}(\text{SCN})_2$, il primo composto essendo particolarmente preferito.

Spore

Sebbene nel procedimento della presente invenzione possano venir vantaggiosamente impiegate le spore di qualsiasi ceppo di *Neurospora crassa*, si è trovato che i ceppi ATCC 9279, ATCC 13837, ATCC 15514 e ATCC 24914 sono particolarmente preferiti. Questi ceppi erano già conosciuti e accessibili al pubblico.

Le procedure per accrescere, isolare e purificare le spore di *Neurospora crassa* sono alla portata di qualsiasi esperto di tecniche micologiche.

Tuttavia una procedura preferita è quella descritta da M. Cortat et al. in «Conidiation of *Neurospora Crassa* in Submerged Culture without Mycelial Phase», *Arch. Microbiol.* 95, 305-309 (1974).

Le spore così isolate possono venir immagazzinate indefinitamente senza che si verifichi alcuna perdita o sostanziale diminuzione della loro attività enzimatica.

Misura dell'attività della γ -butirrobetaina

L'attività della γ -butirrobetaina idrossilasi viene misurata in un recipiente di reazione contenente una quantità del preparato sporale sufficiente a fornire una concentrazione enzimatica di circa 5-30 p moli/ml, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ (0,6 - 2 mM), ascorbato sodico (10 - 14 mM), sodio-2-ossoglutarato (1,4 - 3 mM), catalasi (1 - 1,4 g/l) in tampone potassio fosfato a pH 7.

Dopo 30-60 minuti di incubazione a 37°C la miscela di reazione viene filtrata attraverso del filtri MILLIPORE da 0,7 μ per allontanare le spore e il filtrato viene analizzato per determinare la L-carnitina mediante il metodo di David J. Pearson et al. «Methods of Enzymatic Analysis» vol. 4 (2a edizione), 1974, pag. 1758, Academic Press, Inc.

Il campione in esame viene verificato nei confronti di un controllo che contiene gli stessi componenti tranne che non si aggiunge la γ -butirrobetaina.

Allo scopo di separare l'eventuale γ -butirrobetaina non reagita dalla L-carnitina, una procedura preferita è quella descritta da Göran Lindstedt in *Biochemistry*, vol. 6, no. 5, Maggio 1967, pag. 1271-1282.

Da quanto precede risulta evidente che il procedimento enzimatico della presente invenzione consente di conseguire diversi vantaggi rispetto ai procedimenti della tecnica nota.

Alcuni di questi vantaggi sono elencati di seguito:

(1) Rispetto ai procedimenti chimici della tecnica nota (che, come già indicato in precedenza, producono tutti miscele racemiche di D-carnitina e L-carnitina) il procedimento della presente invenzione presenta il vantaggio di produrre esclusivamente L-carnitina sostanzialmente pura in alte rese (circa l'80%). La risoluzione della miscela racema nella forma levogira e destrogira e la successiva conversione di quest'ultima in D,L-carnitina che viene nuovamente sottoposta a risoluzione, viene pertanto totalmente evitata.

(2) Rispetto al procedimento enzimatico della tecnica nota basato sull'uso di batteri quali fonte dell'enzima da impiegarsi nel procedimento, il procedimento della presente invenzione

presenta il vantaggio che non si devono intraprendere delle complicate e costose procedure di purificazione, né sull'enzima da impiegarsi né sulla L-carnitina prodotta.

L'enzima idrossilasi non necessita nemmeno di venir isolato dalla preparazione sporale che può venir impiegata direttamente senza pericolo, mentre la L-carnitina prodotta viene recuperata in forma cristallina e sostanzialmente pura. Per contro, nei metodi enzimatici basati sui batteri, sia l'enzima che soprattutto la L-carnitina richiedono una accurata purificazione per evitare la contaminazione da parte di batteri e di metaboliti batterici.

(3) Le spore di *Neurospora crassa* possono venir preparate in grandi quantità e immagazzinate in forma essiccata. Esse possono venir impiegate ogni qualvolta desiderato, senza che si verifichino significative perdite o diminuzioni di attività enzimatica.