

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

140 294

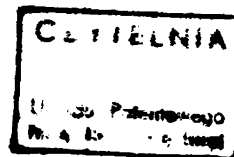
Patent dodatkowy
do patentu —

Zgłoszono: 83 07 20 (P. 243 105)

Pierwszeństwo —

Zgłoszenie ogłoszono: 85 01 30

Opis patentowy opublikowano: 88 03 30



Int. Cl.⁴ C07C 101/08

Twórcy wynalazku: Tamara Mirecka, Janina Grzegorzewska, Teresa Sikorska,
Anna Krotowska

Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa (Polska)

SPOSÓB OTRZYMYWANIA L-3,4-DWUHYDROKSYFENYLOALANINY

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny o wysokim stopniu czystości. Czysta odmiana L-dwuhydroksyfenyloalaniny jest poszukiwana ze względu na jej zastosowanie w lecznictwie jako preparat L-Dopa, stosowanego w leczeniu choroby Parkinsona.

Wydzielanie czystego izomeru L z mieszaniny racemicznej D,L, prowadzone jest według wynalazku na drodze stereospecyficznej hydrolizy enzymatycznej pochodnych estrów D,L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny, w czasie której tylko jeden z izomerów optycznych ulega hydrolizie. Znane metody stereospecyficznej hydrolizy pochodnych DL-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny posiadają szereg niedogodności. Opisane są dwie drogi hydrolizy:

1. przez działanie acylaz na acylowe pochodne DL-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny. Metody opisane w literaturze patentowej wymagają produkcji acylaz ze specjalnych szczepów bakteryjnych.

2. przez działanie esteraz na pochodne estrowe DL-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny. I tak, opis patentowy RFN nr 2 215 853 opisuje stereospecyficzną hydrolizę estrów metylowych za pomocą chymotrypsyny, deklarując wydajność 78 %. Jednakże chymotrypsyna jest enzymem otrzymywanym z trzustki zwierzęcej, drogim i dostępnym w ograniczonych ilościach.

Opisem patentowym zawierającym pewną analogię z otrzymywaniem L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny, jest opis patentowy otrzymywania L-fenyloalaniny (opis pat.europejski 80 (02421), w którym stosowany jest enzym Alkalase (Subtilisin Carlsberg) pochodzenia bakteryjnego. W opisie tym, jak i we wszystkich metodach opisanych w opisach patentowych o zbliżonym zakresie, stosuje się rozpuszczalne w wodzie pochodne estrów aminokwasów, przeważnie N-acetylowe estry metylowe. Wysokie stężenie pochodnej w roztworze wodnym stosowanym do hydrolizy, wymieniane jest we wspomnianym opisie patentowym 80/02421, jako jeden z istotnych warunków przebiegu reakcji. Estry te ze względu na szybki przebieg niespecyficznej hydrolizy samoistnej, wymagają jeszcze szybszego przebiegu reakcji enzymatycznej. Dalej, wszystkie opisane metody dla rozdziału produktów reakcji po jej zakończeniu, wymieniają

ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi, takimi jak chloroek metylenu, octan etylu, eter naftowy i podobne, a więc łatwo lotnymi i palnymi. Metoda według wynalazku omija te niedogodności, dając możliwość otrzymywania czystej L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny przy użyciu handlowo dostępnego enzymu z wydajnością ponad 90 % i z zupełnym pominięciem operacji ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi.

Istotą wynalazku jest sposób otrzymywania L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny na drodze hydrolizy enzymatycznej, znamienny tym, że estry o wzorze ogólnym 1, w którym R_1 oznacza wodór lub grupę metylową, R_2 oznacza grupę metylową, etylową lub propylową, poddaje się hydrolizie proteazami przemysłowymi w zawiesinie wodnej w zakresie pH 6-9 i w temperaturze 20-55°C, wydzielając nieprzereagowany ester przez wirowanie lub sączenie lub ekstrakcję, a pozostałą w roztworze pochodną L-N-benzoilo-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny o wzorze ogólnym 2, przeprowadzając znanymi metodami w 3,4-dwuhydroksyfenyloalaninę. Sposób otrzymywania L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny znamienny jest tym, że reakcję hydrolizy prowadzi się w zawiesinie wodnej o stężeniu substratu 5-20 %. Sposób otrzymywania L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny znamienny jest tym, że jako enzymy przemysłowe stosuje się alkaliczne proteiny bakteryjne lub enzymy proteolityczne trzustki.

W metodzie według wynalazku, w odróżnieniu od dotychczas opisanych metod, zastosowano jako substrat, trudno rozpuszczalne w wodzie pochodne: ester metylowy DL-N-benzoilo-3-/4-hydroksy-3-metoksyfenylo/alaniny lub ester metylowy DL-N-benzoilo-3-/3,4-dwumetoksyfenylo/alaniny. Estry te, w warunkach stosowanych w metodzie, nie ulegają niespecyficznej hydrolizie. Hydroliza stereospecyficzna, jako reakcja konkurująca, nie musi więc spełniać warunku obiektywnie bardzo szybkiego przebiegu, produkt nie jest, w tym przypadku, zanieczyszczony antypodem optycznym. Okazało się, że nie jest także konieczny warunek jednofazowości substratu i enzymu. Dobrane według wynalazku pochodne ulegają stereospecyficznej hydrolizie enzymatycznej w zawiesinie wodnej. Uwolniony L-kwas w formie soli sodowej przechodzi do roztworu, natomiast D-ester pozostaje nierozpuszczony i może być oddzielony przez odwirowanie lub odsączenie. Stereoizomer L po zakwaszeniu i wychłodzeniu wytrąca się z roztworu i jest wydzielony w ten sposób przez wirowanie lub sączenie. Dla ostatecznego oczyszczenia wystarcza przekrystalizowanie z wody i metanolu. Otrzymana L-N-benzoilo-3-/4-hydroksy-3-metoksyfenylo/alanina przeprowadzana jest w L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaninę przez hydrolizę kwasem bromowodorowym. Niezmieniony ester metylowy D-N-benzoilo-3-/4-hydroksy-3-metoksyfenylo/-alaniny poddawany jest racemizacji i zawracany jest do procesu.

W sposobie według wynalazku, jako enzym zastosowano proteazy przemysłowe pochodzenia bakteryjnego, produkowane w dużych ilościach do proszków piorących (np. Maxatase f-my Gist-Erocades NW Deft (Holandia)). Proces stereospecyficznej hydrolizy sposobem według wynalazku prowadzi się w zawiesinie wodnej, zawierającej 5-20 % estru (korzystnie 10 %) przy stężeniu enzymu w roztworze 0,1 - 5 % (korzystnie 0,5 %), przy temperaturze 20-50°C (korzystnie 40°C), utrzymując stałe pH 8 przez ciągłe dozowanie ługu sodowego, np. urządzeniem automatycznym takim jak titrator. Czas reakcji waha się (zależnie od warunków) w granicach 7-24 godzin. Otrzymaną L-N-benzoilo-3-/4-hydroksy-3-metoksyfenylo/-alaninę wytrąca się z roztworu przez zakwaszenie 5N kwasem solnym do pH 2-2,5 i przeprowadza się w L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaninę przez hydrolizę z kwasem bromowodorowym. Nieprzereagowany ester metylowy D-N-benzoilo-3-/4-hydroksy-3-metoksyfenylo/-alaniny poddaje się racemizacji i zawraca do procesu.

P r z y k ł a d I. 10 g (0,03 mola) estru metylowego DL-benzoilo-3-/4-hydroksy-3-metoksyfenylo/-alaniny zawieszono w 100 ml wody, mieszając, doprowadzono pH do 8,0 przy pomocy 1N NaOH i dodano 500 mg Maxatazy. Reakcję hydrolizy prowadzono w temp. 40-42°C przez 7 godzin utrzymując stałe pH przez automatyczne dodawanie 1N NaOH, cały czas mieszając. Po zakończonej reakcji mieszaninę oziębiono i odwirowano. Osad ponownie zadano 50 ml wody o pH 8,0, mieszano przez 10 min. i wirowano. Połączone supernatanty oczyszczono przez zagotowanie z węglem aktywnym i przesączenie. Celem wytrącenia produktu z roztworu, stosowano zakwaszenie 5N HCl do odczynu o wartości pH 2. Pozostawiono na noc

w lodówce. Następnie L-N-benzoilo-3-/4-hydroksy-4-metoksyfenylo/-alaninę odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszczono w 30 ml metanolu i dodano 60 ml wody. Całość pozostawiono na noc w lodówce do krystalizacji. Na drugi dzień osad odsączono i suszono w temperaturze nie większej niż 50°C. Otrzymano 4,4 g produktu (wydajność 94 %). Czystość preparatu określono na podstawie pomiaru skręcalności właściwej. ($[\alpha]_D^{20} = -32^\circ$ (c = 1,0, metanol)). Otrzymaną L-N-benzoilo-3-/4-hydroksy-3-metoksyfenylo/-alaninę przeprowadzono w L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaninę przez hydrolizę kwasem bromowodorowym. W kolbie umieszczono 5g L-N-benzoilo-3-/4-hydroksy-3-metoksyfenylo/-alaniny i 50 ml 40 % kwasu bromowodorowego. Mieszaninę reakcyjną utrzymywano w stanie wrzenia pod azotem przez 6 godzin. Po odsączeniu kwasu benzoowego, przesącz zateżano pod azotem. Do pozostałości dodano węgiel aktywny, 18 ml wody, 1,2 ml HCl i 3 krople H₂SO₄ stęż. Mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Po odsączeniu węgla aktywnego przesącz doprowadzono do pH 5,5 octanem sodu. Otrzymano 2,0 g L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny. Po rekrystalizacji z wody $[\alpha]_D^{20} = -11,7^\circ$ c = 1 (metanol).

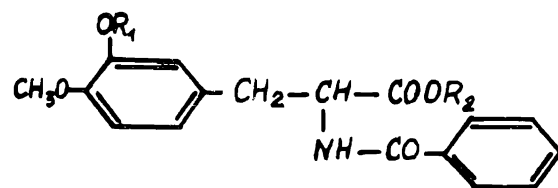
P r z y k ł a d II. 10 g (0,029 mola) estru metylowego D-N-benzoilo-3-/3,4-dwumetoksyfenylo/-alaniny zawieszono w wodzie w 100 ml, mieszając doprowadzono pH do 8,0 przy pomocy 1N NaOH i dodano 500 mg Meksatazy. Reakcję hydrolizy prowadzono w temp. 42°C przez 7 godzin, utrzymując automatycznie stałą wartość pH 8,0 1N NaOH. Po zakończeniu reakcji mieszaninę oziębiono i dwukrotnie ekstrahowano wodą, wirując za każdym razem jak w przykładzie 1. Połączone supernatanty oczyszczono przez zagotowanie z węglem aktywnym i sączenie. Celem wytrącenia produktu z roztworu, stosowano zakwaszenie 5N HCl do odczynu o wartości pH 2 i pozostawiono na noc w lodówce. Następnie L-N-benzoilo-3-/3,4-dwumetoksyfenylo/-alaninę odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszczono w 30 ml metanolu i dodano 60 ml wody. Całość pozostawiono w lodówce do krystalizacji. Na drugi dzień osad odsączono i suszono w temperaturze nie większej niż 50°C. Otrzymano 4,2 g produktu (wydajność 91 %), skręcalność $[\alpha]_D^{20} = -23,2^\circ$, c = 1 (metanol). Otrzymywanie L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny prowadzone jest tak, jak podano w przykładzie 1.

Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

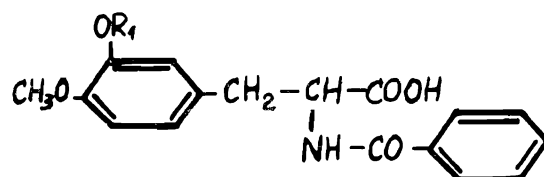
1. Sposób otrzymywania L-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny na drodze hydrolizy enzymatycznej, z n a m i e n n y t y m, że estry o wzorze ogólnym 1, w którym R₁ oznacza wodór lub grupę metylową, R₂ oznacza grupę metylową, etylową lub propylową, poddaje się hydrolizie proteazami przemysłowymi w zawieszynie wodnej w zakresie pH 6-9 i w temperaturze 20-55°C, wydzielając nieprzereagowany ester przez wirowanie lub sączenie lub ekstrakcję a pozostałą w roztworze pochodną L-N-benzoilo-3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny o wzorze ogólnym 2, przeprowadzając znanymi metodami w 3,4-dwuhydroksyfenyloalaninę.

2. Sposób według zastrzeżenia 1, z n a m i e n n y t y m, że reakcję hydrolizy prowadzi się w zawieszynie wodnej o stężeniu substratu 5-20 %.

3. Sposób według zastrzeżenia 1, z n a m i e n n y t y m, że jako enzymy przemysłowe stosuje się alkaliczne proteiny bakteryjne lub enzymy proteolityczne trzustki.



Wzór 1



Wzór 2