



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 132535

(51) Int. Cl.² C 07 C 101/30

(21) Patentsøknad nr. 173/71
(22) Inngitt 18.01.71
(23) Løpedag 18.01.71

(41) Alment tilgjengelig fra 20.07.71
(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 18.08.75

(30) Prioritet begjært 19.01.70, 25.06.70, Sverige, nr. 615/70, 8835/70, 8836/70

(54) Oppfinnelsens benevnelse Fremgangsmåte for fremstilling av L(-)-formen av terapeutisk aktive derivater av fenylalanin.

(71)(73) Søker/Patenthaver ASTRA LÄKEMEDEL AKTIEBOLAG,
Kvarnbergagatan 16, S-15185 Södertälje,
Sverige.

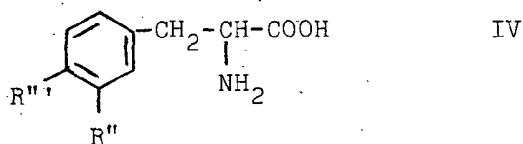
(72) Oppfinner BAMBERG, Peter, Enhörna,
SJÖBERG, Berndt Olof Harald, Södertälje,
Sverige.

(74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Svensk utl. skrift nr. 313314
Chemical Abstracts: vol. 45, 7163h og vol. 58,
11463d

Foreliggende oppfinnelse vedrører en ny fremgangsmåte for fremstilling av L(-)-formen av forbindelser som har terapeutisk aktivitet, blant annet L-dopa og L-m-tyrosin.

Ifølge oppfinnelsen fremstilles således forbindelser med formelen:



i L(-)-formen, hvor R'' er hydroksy eller alkoksy med 1 - 5 karbonatomer, R''' er hydrogen, hydroksy eller alkoksy med 1 - 5 karbonatomer, eller R'' sammen med R''' betegner en alkylen-dioksygruppe med en eller to karbonatomer.

Den nevnte forbindelse L-dopa har vist seg å være meget anvendbar mot Parkinsons sykdom, og L-meta-tyrosin, som er meget nærstående strukturelt til L-dopa og dens derivater, synes å ha slike egenskaper at også denne forbindelse kan brukes for dette formål. Det har vært foreslått en rekke forskjellige forklaringer på hvordan L-dopa virker ved behandlingen av Parkinsons sykdom. Den forklaring som er akseptert av de fleste som arbeider med sykdommen er følgende. Parkinsons sykdom hos mennesker kan i det minste delvis forklares med en degenerering av dopamin-neuron-systemet i hjernen lokalisert til nucleus caudate, putamen og substantia nigra. En virksom terapi ville således være at man erstattet det manglende dopamin ved å tilføre dette utenfra. Dessverre har det vist seg at tilført dopamin ikke er istand til å passere blod-hjerne-barrieren, og dopamin tilført peroralt eller parenteralt når derfor ikke dopamin-neuron-systemet.

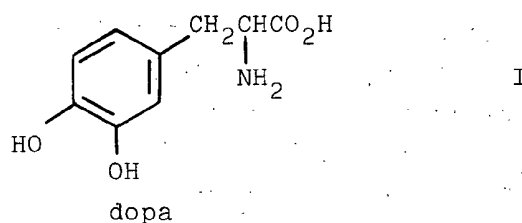
132535

Dihydroksyfenylalanin, som er forløperen for dopamin, passerer imidlertid blod-hjerne-barrieren og dekarboksyleres i hjernen til dopamin.

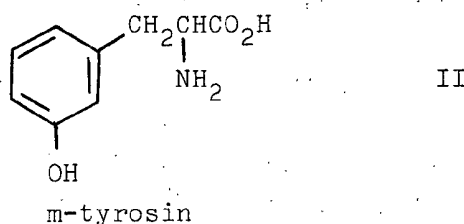
Cotzias et al. har vist at racemisk dopa har en fordelaktig effekt på Parkinsons symptomer. Bivirkninger opptrer imidlertid meget ofte. Disse bivirkninger kunne svekkes når man anvendte L-dopa. Det er anbefalt at man anvender så ren L-dopa som mulig i terapien. Cotzias et al. har også vist at L-dopa dekarboksyleres i blodsystemet, noe som gjør det nødvendig å tilføre store doser av L-dopa for å oppnå den ønskede terapeutiske effekt.

L-dopa kan tilføres peroralt og blir da vanligvis tilført i økende doser fra 100 mg 3 ganger i døgnet opp til en daglig dose på 8 g. Behandlingen med L-dopa synes å være spesielt gunstig med hensyn til den stivhet som karakteriserer Parkinsons sykdom.

L-dopa er 3-(3,4-dihydroksyfenyl)-L-alanin med følgende strukturformel:



L-m-tyrosin, 3-(3-hydroksyfenyl)-L-alanin har formelen:



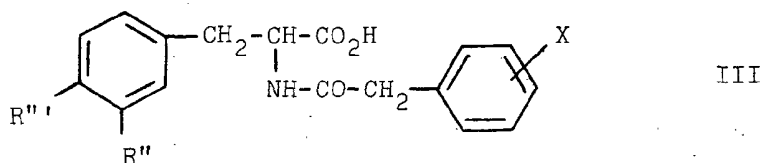
Av de to optiske former som begge forbindelser kan foreligge i, har det vist seg at bare L-formene har den ønskede effekt.

Tidligere var det meget vanskelig å oppnå tilstrekkelige mengder av L-isomeren i ren form. Man har nå overraskende funnet at det er mulig å spalte stereoselektivt visse N-acylaminosyrederivater ved å bruke en E. coli-acylase på en

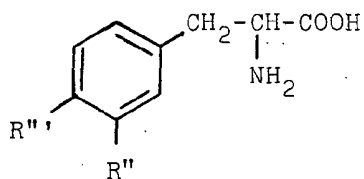
132535

slik måte at bare L-aminosyrederivatene deacyleres.

Ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilles således forbindelser med formel IV i L(-)-formen ved at man inkuberer en forbindelse med formelen:

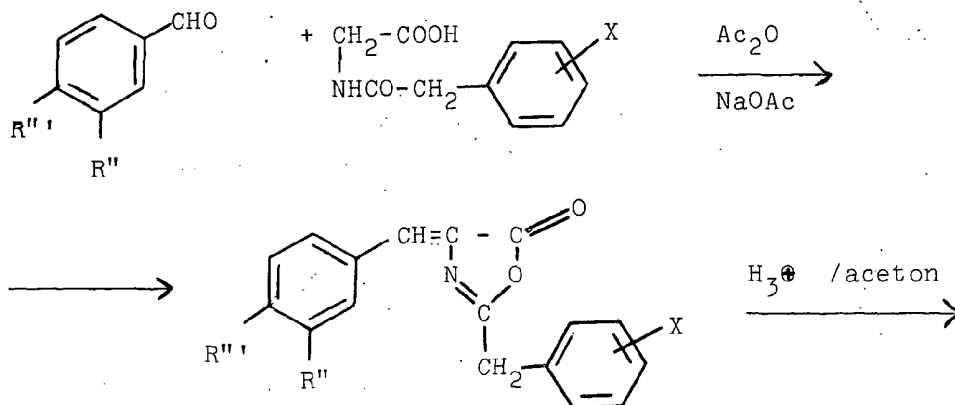


hvor R'' og R''' har den ovenfor angitte betydning, og X er hydrogen, fluor, klor, brom eller -NO₂, med en stereoselektivt virkende E. coli-acylase, hvorved man får dannet L(-)-formen av en forbindelse med formelen:

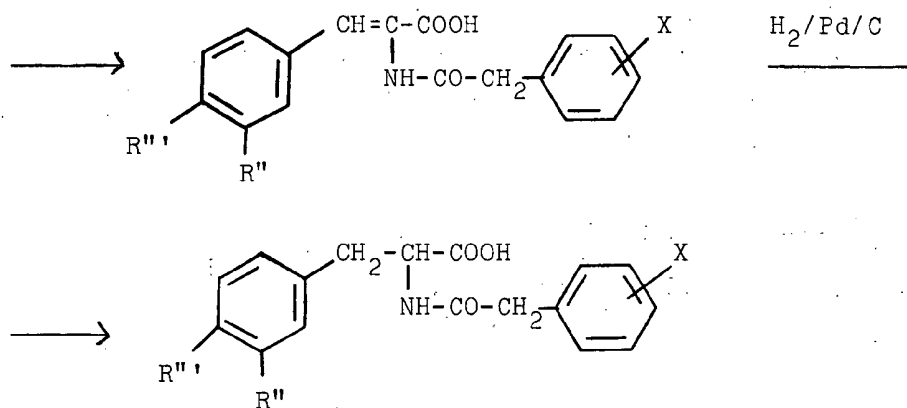


hvor R'' og R''' har den ovenfor angitte betydning, hvorefter gruppene R'' og/eller R''' eventuelt omdannes til hydroksygrupper ved i og for seg kjente fremgangsmåter.

Fremstillingen av det racemiske utgangsmateriale med formel III, som brukes ved spaltingen med E.coli-acylase, kan utføres ved hjelp av følgende reaksjonsskjema:



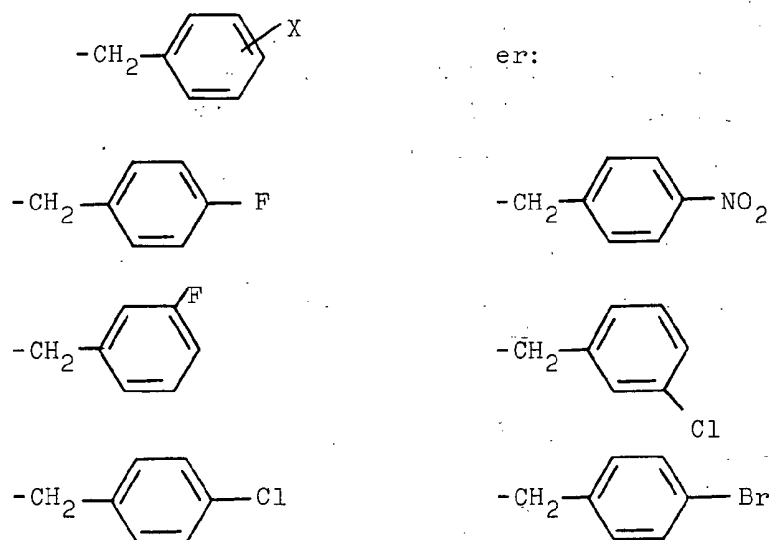
132535



hvor X, R'' og R''' har samme betydninger som angitt ovenfor.

Spaltingen til de stereoisomere former av det utgangsmateriale som fremstilles ved hjelp av de reaksjons-skjemaer som er gitt ovenfor, utføres ved å inkubere det fremstilte racemat ved en pH på mellom 6 og 8 med en E.coli-acylase i et tidsrom varierende fra ca. 1 time til ca. 72 timer. Deretter senkes pH-verdien til mellom 1 og 3, hvorefter ikke-omsatt acylaminosyre ekstraheres med etylacetat eller et annet egnet oppløsningsmiddel.

Illustrerende eksempler på radikaler med formelen



Det E.coli-acylase enzym som er nevnt er fortrinnsvis et cellefritt preparat, som dels og dels ikke kan være

bundet til et polymert bærestoff slik dette er beskrevet i belgisk patent nr. 727.506. En spesielt godt egnet E.coli-acylase er den som er beskrevet i nevnte patent. Det er imidlertid innlysende at man også kan anvende ikke-cellefrie E.coli bakteriesuspensjoner eller E.coli bakterieekstrakter eller E.coli enzymkonsentrater som inneholder nevnte stereoselektive aktive acylase for den ovenfor beskrevne stereospesifikke enzymatiske hydrolyse.

Følgende eksempler illustrerer fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen samt fremstillingen av utgangsmaterialene.

A. Fremstilling av utgangsforbindelser med formel III

Eksempel 1 - Fremstilling av DL-N-fenylacetyl-3-(3-metoksyfenyl)-alanin

a) 4-(3-metoksybenzyliden)-2-benzyloksazolon-5.

N-fenylacetylglycin (41,8 g, 0,216 mol) og 3-metoksybenzaldehyd (46,5 g, 0,342 mol) ble tilsatt en blanding av tørr natriumacetat (13,2 g) i eddiksyreanhydrid (54 ml). Etter oppvarming i 1 time på et vannbad ble blandingen helt over i 140 ml isvann hvoretter det dannede stoff ble ekstrahert med etylacetat. Etter fordampning og tørking ble resten behandlet med etanol, filtrert og vasket med vann og tørket. Sm.p. 104,5 - 105°C (etanol).

Analyse: C 73,57%, H 5,26%, N 4,69%, O 16,50%
Beregnet for $C_{18}H_{15}NO_3$: C 73,71%, H 5,15%, N 4,78%, O 16,36%

b) α -fenylacetylamido-m-metoksy kanelsyre. 4-(3-metoksybenzyliden)-2-benzyloksazolon-5 (39 g) ble suspendert i en blanding av 325 ml aceton, 115 ml vann og 3,25 ml 2N salt-syre, og blandingen ble kokt i 3 timer. Oppløsningsmidlet ble fordampet og resten oppløst ved å tilsette natriumbikarbonat. Etter vasking med etylacetat ble vannfasen surgjort til en pH mellom 2 og 3, og det utfelte produkt ble oppsamlet. Sm.p. 186,5 - 190,5°C (etanol).

Analyse: C 69,32%, H 5,67%, N 4,32%, O 20,71%
Beregnet for $C_{18}H_{17}NO_4$: C 69,44%, H 5,51%, N 4,50%, O 20,56%

c) DL-N-fenylacetyl-3-(3-metoksyfenyl)-alanin.

α -fenylacetylamido-m-metoksy kanelsyre (16 g) ble hydrogenert ved normalt trykk i 320 ml etanol idet man anvendte en 10 % Pd/C-katalysator inntil den teoretiske mengde hydrogen var

132535

absorbert. Etter å ha fjernet katalysatoren og oppløsningsmidlet ble produktet oppnådd i form av hvite krystaller. Sm.p. 130 - 132,5°C (kloroform).

Analyse: C 58,83%, H 6,29%, N 4,57%, O 20,51%

Beregnet for $C_{18}H_{19}NO_4$: C 68,99%, H 6,11%, N 4,47%, O 20,42%

Eksempel 2 - Fremstilling av N-fenylacetyl-3-(3,4-metylidendioksyfenyl)-alanin

a) 2-benzyl-4-(3,4-metylidendioksybenzyliden)-oksazon-5 ble fremstilt slik det er beskrevet i eksempel 1 ved å anvende 98 g piperonal, 85 g N-fenylacetyl-glycin, 105 ml eddiksyreanhydrid og 27 g vannfritt natriumacetat som utgangsmaterialer. Det oppnådde produkt hadde et sm.p. på 146 - 147°C (etanol) og NMR-spektrumet var i overensstemmelse med strukturen.

b) α -fenylacetamido-3,4-metylidendioksy kanelsyre ble fremstilt på analog måte ved hjelp av den fremgangsmåte som er beskrevet i eksempel 1b, idet man anvendte 2-benzyl-4-(3,4-metylidendioksybenzyliden)-oksazon-5 (36 g), 240 ml aceton, 105 ml vann og 3 ml 2-N saltsyre som utgangsforbindelser. Det oppnådde produkt hadde et sm.p. på 197 - 200°C (etanol) og et NMR-spektrum i overensstemmelse med strukturen.

c) N-fenylacetyl-3-(3,4-metylidendioksyfenyl)-alanin ble fremstilt slik det er beskrevet i eksempel 1 c ved å anvende 55 g α -fenylacetamido-3,4-metylidendioksy kanelsyre sammen med 10 % Pd/C (5,5 g) i 1000 ml etanol som katalysator. Hydrogeneringen ga et sluttprodukt med et sm.p. på 154 - 158°C (etanol/vann) og et NMR-spektrum som var i overensstemmelse med strukturen:

Analyse: C 65,94, H 5,08, N 4,37, O 24,60 %

Beregnet for $C_{18}H_{17}NO_5$: C 66,05, H 5,24, N 4,28, O 24,44 %.

Eksempel 3 - Fremstilling av N-fenylacetyl-3-(3,4-dimetoksyfenyl)-alanin

a) 2-benzyl-4-(3,4-dimetoksybenzyliden)-oksazon-5 ble fremstilt slik det er beskrevet i eksempel 1 a ved å omsette N-fenylacetyl-glycin (200 g) og 256 g 3,4-dimetoksybenzaldehyd i eddiksyreanhydrid/natriumacetat (246/46 g). Sm.p. 154 - 155,5°C (aceton/etanol), og NMR-spektrumet var i overensstemmelse med strukturen.

132535

b) α -fenylacetamido-3,4-dimetoksy kanelsyre ble fremstilt fra 2-benzyl-4-(3,4-dimetoksybenzyliden)-oksazolon-5 (69 g) på samme måte som beskrevet i eksempel 1 b. Sm.p. 211 - 217°C (etanol) og NMR-spektrumet var i overensstemmelse med strukturen.

c) N-fenylacetyl-3-(3,4-dimetoksyfenyl)-alanin ble fremstilt som beskrevet i eksempel 1c fra 70 g α -fenylacetamido-3,4-dimetoksy kanelsyre i 1,6 liter etanol og 7 g 10% Pd/C. Sm.p. 145,5 - 149,5°C (kloroform) og NMR-spektrumet var i overensstemmelse med strukturen.

Eksempel 4 - Fremstilling av N-fenylacetyl-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alanin

a) Etyl-N-fenylacetyl-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alaninat. En isavkjølt blanding av 8,3 g etyl-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alaninat hydroklorid i 250 ml oksygenfri metylenklorid i en argonatmosfære ble tilsatt 8,7 ml trietylamin og 4,2 ml fenylacetylklorid i 35 ml metylenklorid under omrøring. Etter 1 time ved 25°C ble blandingen helt over i 100 ml vann, det organiske lag utskilt og vasket suksessivt med 2N H₂SO₄, 1-molar KHCO₃, vann og saltlake. Etter tørking og fordamping av oppløsningsmidlet oppnådde man 7,1 g av en oljeaktig rest.

b) N-fenylacetyl-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alanin. En blanding av 7,1 g etyl-N-fenylacetyl-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alaninat i 32 ml 2N NaOH ble omrørt i 2 timer ved ca. 25°C. Den resulterende klare oppløsning ble vasket med etylacetat, surgjort til pH 2 med konsentrert H₂SO₄ og ekstrahert med etylacetat. Det organiske lag ble vasket med saltlake, tørket og fordampet, hvorved man fikk produktet, d.v.s. N-fenylacetyl-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alanin, som en brun olje i et nesten kvantitativt utbytte.

Eksempel 5 - Fremstilling av N-fenylacetyl-3-(3-metoksyfenyl)-alanin.

N-fenylacetyl-3-(3-metoksyfenyl)-alanin. Fenylacetylklorid (6,6 ml) i 20 ml eter ble dråpevis tilsatt en omrørt og isavkjølt blanding av 3-metoksyfenylalanin 1/2 H₂O (10,2 g) i 250 ml vann og 20 ml eter mens pH ble holdt på 11,5 ved hjelp av 5N NaOH. Den vandige fase ble utskilt, vasket med eter og surgjort til pH 2 med konsentrert saltsyre. Det utfelte krystallinske produkt ble oppsamlet og vasket med vann

132535

og eter, sm.p. 130 - 133°C (CHCl₃).

Eksempel 6 - Fremstilling av N-fenylacetyl-3-(3,4-metylendioksyfenyl)-alanin

N-fenylacetyl-3-(3,4-metylendioksyfenyl)-alanin ble fremstilt slik det er beskrevet i eksempel 5 idet man startet med 3-(3,4-metylendioksyfenyl)-alanin og fenylacetylklorid. Produktet var identisk med det som ble oppnådd i eksempel 2 c. Eksempel 7 - Fremstilling av N-(4-fluorfenyl-acetyl)-3-metoksyfenyl-alanin.

N-(4-fluorfenylacetyl)-3-metoksyfenylalanin ble fremstilt som beskrevet for ovennevnte N-fenylacetyl-forbindelse (eksempel 5) idet man startet med 3-metoksyfenylalanin (7,8 g) og 6,9 g 4-fluorfenylacetylklorid. Hvite krystaller, sm.p. 115 - 120°C (CHCl₃).

Eksempel 8 - Fremstilling av N-(4-nitrofenylacetyl)-3-metoksyfenyl-alanin

N-(4-nitrofenylacetyl)-3-metoksyfenylalanin ble oppnådd som beskrevet i eksempel 5, idet man anvendte 3-metoksyfenylalanin (7,8 g) og 8,0 g p-nitrofenylacetylklorid. Lyse gule krystaller, sm.p. 145 - 147°C (CHCl₃).

Eksempel 9 - Fremstilling av N-fenylacetyl-3-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin

N-fenylacetyl-3-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin. 3-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin (2,11 g, 0,01 mol) i 50 ml vann og 10 ml eter ble under omrøring tilsatt isavkjølt fenylacetylklorid (1,4 ml, 0,01 mol) i 10 ml eter, hvorved pH-verdien ble holdt på 11,5. Vannfasen ble utskilt, vasket to ganger med eter og surgjort til pH 1 - 2. Blandingen ble avkjølt ifra 2 - 5 timer, det utfelte produkt oppsamlet, tørket og vasket med noe kloroform. Sm.p. 172 - 173°C (aceton).

Analyse: C 65,54%, H 5,96%, N 4,24%, O 24,36%
Beregnet for C₁₈H₁₉NO₅: C 65,64%, H 5,81%, N 4,25%, O 24,49%

Eksempel 10 - Fremstilling av N-fenylacetyl-m-tyrosin

N-fenylacetyl-m-tyrosin. En blanding av etyl-N-fenylacetyl-m-tyrosinat, hvis struktur var bekreftet med NMR-spektroskopi (0,05 mol) i 2N NaOH (75 ml, 0,15 mol) ble omrørt i 2 timer ved ca. 25°C. Den resulterende klare oppløsning ble vasket med etylacetat, surgjort til pH 2 med konsentrert svovelsyre og så ekstrahert med etylacetat. Det organiske lag

132535

ble vasket med saltlake, tørket og fordampet, hvorved man fikk produktet som en gul olje i et nesten kvantitativt utbytte. NMR-spektret var i overensstemmelse med strukturen, og ved tynnsjikt-kromatografi fikk man bare ett punkt (etanol).

B Enzymatisk spalting av forbindelser med formel III

Eksempel 11 - Spalting av DL-N-fenylacetyl-3-(3,4-metylen-dioksyfenyl)-alanin

L(-)-3-(3,4-metylendioksyfenyl)-alanin og D(-)-N-fenyl-acetyl-3-(3,4-metylendioksyfenyl)-alanin ble oppnådd ved å inkubere DL-N-fenylacetyl-3-(3,4-metylendioksyfenyl)-alanin (5 g) med 6,000 enheter E.coli-acylase i 50 ml vann ved pH 7,8, og pH ble justert ved hjelp av ammoniakk, natriumhydroksyd eller litiumhydroksyd. Det ble utført forskjellige inkuberingseksperimenter, og den anvendte tid varierte mellom 1 og 72 timer, inkuberingstemperaturen varierte mellom 25 og 37°C. Da inkuberingen var ferdig, ble pH justert til 1,5 med 2N saltsyre eller svovelsyre, hvorefter den gjenværende uoppløste fenyl-acetylerede aminosyre ble ekstrahert med etylacetat. Den gjenværende vannfase ble konsentrert og ga etter en justering til pH 5,5 en L(-)-aminosyre som ikke lenger var beskyttet ved aminonitrogenatomet i form av hvite krystaller med et sm.p. på 202 - 210,5°C (vann) $[\alpha]_D^{20} = -28,12^\circ$ (vann, c = 1).

Analyse, funnet: C 57,53, H 5,26, N 6,82, O 30,70 %
beregnet for $C_{10}H_{11}NO_4$: C 57,41, H 5,30, N 6,70, O 30,59 %.
Etylacetatfasen inneholdt den N-fenyl-acetylerede D(-)aminosyre som hadde et sm.p. på 143 - 157°C (etanol) $[\alpha]_D^{20} = -59,46^\circ$ (etylacetat, c = 1).

Eksempel 12 - Spalting av DL-N-fenylacetyl-3-(3-metoksyfenyl)-alanin.

L(-)-3-(3-metoksyfenyl)-alanin og D(-)-N-fenyl-acetyl-3-(3-metoksyfenyl)-alanin ble fremstilt på samme måte som beskrevet i eksempel 11 ovenfor. Utgangsmaterialet var DL-N-fenylacetyl-3-(3-metoksyfenyl)-alanin (5 g) og oppløsningen ble utført ved hjelp av 4 ml E.coli-acylase (6.000 enheter). Man fikk derved fremstilt L(-)aminosyren uten tilknyttede beskyttende grupper som monohydratet med et sm.p. på 173 - 176,5°C: $[\alpha]_D^{20} = -27,81^\circ$ (vann, c = 1).

Analyse, funnet: C 56,18, H 6,98, N 6,70, O 30,01 %
beregnet for $C_{10}H_{13}NO_3H_2O$: C 56,33, H 7,09, N 6,57, O 30,02 %.

132535

Den D(-)-N-fenylacetylerede aminosyre hadde et sm.p. på 117,5 - 133°C, $[\alpha]_D^{20} = 43,93^\circ$ (etylacetat, c = 1).

Eksempel 13 - Spalting av DL-N-fenylacetyl-3-(3,4-dimetoksyfenyl)-alanin

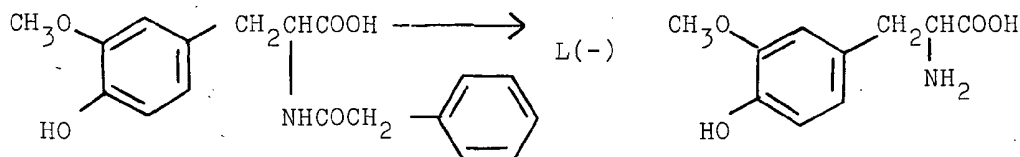
L(-)-3-(3,4-dimetoksyfenyl)-alanin og D(-)-N-fenylacetyl-3-(3,4-dimetoksyfenyl)-alanin ble fremstilt ved inkubering av 5 g DL-N-fenylacetyl-3-(3,4-dimetoksyfenyl)-alanin i 73 ml vann ved pH 6,5 eller 7,0 (NH₃ som base) med cellefri E.coli acylase (6.650 enheter) i 3 timer. Blandingen ble deretter omrørt i et par minutter med hyflo og aktivt karbon, og så filtrert. pH på filtratet ble justert til 2,3 - 3 med svovelsyre, og det utfelte D(-)-N-fenylacetyl-3-(3,4-dimetoksyfenyl)-alanin ble ekstrahert med etylacetat, hvorefter vannfasen ble fordampet til ca. 5 ml og pH-verdien hevet til 6,5. Produktet L(-)-3-(3,4-dimetoksyfenyl)-alanin ble utfelt som hvite krystaller, $[\alpha]_D^{20} = -5,64^\circ$ (N HCl, c = 1). Sm.p. 209 - 214,5°, og fra etylacetatfasen fikk man fremstilt D(-)-formen av den fenylacetylerede aminosyre, sm.p. 117 - 142°C, $[\alpha]_D^{20} = -49,75^\circ$ (etylacetat, c = 1).

Eksempel 14 - Spalting av DL-N-fenylacetyl-3-(3-metoksyfenyl)-alanin.

L(-)-3-(3-metoksyfenyl)-alanin og D(-)-N-fenylacetyl-3-(3-metoksyfenyl)-alanin ble fremstilt ved inkubering av 10 g DL-N-fenylacetyl-3-(3-metoksyfenyl)-alanin med cellefri E.coli-acylase (2,145 enheter) i 160 ml vann ved en pH 6,5 (NH₃ som base) i 3,25 timer ved en temperatur på 45°C. Blandingen ble så omrørt i et par minutter med hyflo og aktivt karbon, og deretter filtrert. Filtratets pH ble justert til 2,6 med konsentrert svovelsyre og blandingen ble ekstrahert med etylacetat. Vannfasen ble fordampet på en platefordamper til ca. 15 ml og pH-verdien justert til 6,5. Den utfelte L(-)-aminosyre ble oppnådd ved filtrering $[\alpha]_D^{20} = -6,18^\circ$ (N HCl, c = 1). Etylacetatfasen ble vasket til nøytralitet, tørket og fordampet. Resten ble behandlet med eter, hvorved man fikk utfelt D(-)-formen av den N-fenylacetylerede aminosyre som hvite krystaller. $[\alpha]_D^{20} = -44,93$ (etylacetat, c = 1) $[\alpha]_D^{20}$ etter en omkrystallisering fra etylacetat: $-51,35^\circ$ (etylacetat, c = 1).

Eksempel 15 - Spalting av DL-N-fenylacetyl-3-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin

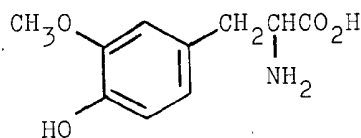
L(-)-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin



En oppløsning av N-fenylacetyl-3-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin (3,29 g, 0,01 mol) i 100 ml 0,2-molar Na_2HPO_4 og E.coli-acylase i varierende mengder ifølge tabell I ble inkubert ved forskjellige pH-verdier ifølge tabell I i 3,5 timer ved 50°C . Deretter ble oppløsningen filtrert med hyflo og aktivt karbon, hvorefter pH-verdien ble justert til 1,5 med konsentrert svovelsyre. Det øverste sjikt ble dekantert fra den utfelte olje og vasket med etylacetat. Vannfasen ble fordampet ved ca. 10 mm Hg til 25 ml, og aminosyren utfelt ved å justere pH til 5,5.

Den oljen som først var utfelt fra vannfasen samt etylacetatfasen ble slått sammen og oppløsningsmidlet fjernet under vakuum. Resten ble utrørt med kloroform og det krystallinske D(-)-N-fenylacetyl-3-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin ble oppnådd ved filtrering.

Reaksjonsbetingelsene ble variert slik det er angitt i tabell I, hvorved man oppnådde de angitte resultater.



132535

TABELL I

pH	Enheter acylase * 0,01 mol substrat	$[\alpha]_D^{20}$ (C = 2, N HCl)	Utbytte %**
6,25	1500	-5,74	68,6
6,25	1750	-5,78	85,2
6,50	1500	-6,06	83,3
6,75	1500	-5,40	81,4
6,75	1750	-6,10	76,9
7,00	1500	-5,62	69,4
7,10	1500	-5,89	71,1
7,25	1750	-6,47	75,6
7,50	1500	-5,99	49,7
7,75	1500	-6,02	34,1
8,00	1500	-6,04	30,0

* 1 acylase-enhet er den enzyzmengde som ved 35°C frembringer 0,5 mg 6-aminopenicillaninsyre fra benzylpenicillin i løpet av 90 minutter.

** En omsetning av halvparten av det rasemiske substrat ble beregnet som 100 %.

Eksempel 16 - Spalting av DL-N-fenylacetyl-m-tyrosin

L(-)-m-tyrosin. En oppløsning av N-fenylacetyl-m-tyrosin (6 g, 0,02 mol) i 0,025-molar Na_2HPO_4 ved pH 6,75 (pH justert med 2N NaOH), ble tilsatt 3000 enheter acylase, og blandingen inkubert i 4 timer ved 40°C. Deretter ble oppløsningen behandlet med trekull, surgjort til pH 2 med konsentrert svovelsyre og så vasket med etylacetat. Den vandige fase ble konsentrert til 17 ml, hvorefter produktet ble utfelt ved pH 5 ved hjelp av konsentrert ammoniakk. Etter avkjøling i 15 timer ved 4°C ble det utfelte L(-)-m-tyrosin oppsamlet ved filtrering. $[\alpha]_D^{20} = -9,25^\circ$ (c = 2, N HCl), vanninnhold 1,7 %.

Etylacetatfasen ga etter fordampning uhydrolysert D(-)-N-fenylacetyl-m-tyrosin.

Eksempel 17 - Spalting av DL-N-fenylacetyl-3-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin

L(-)-3-metoksy-4-hydroksyfenylalanin. En oppløsning av N-fenylacetyl-3-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin

132535

(3,29 g) i 0,025-molar Na_2HPO_4 ved pH 6,75 (pH justert med 2N NaOH) ble tilsatt 1500 enheter acylase hvorefter blandingen ble inkubert ved 50°C i 3,5 timer. Oppløsningen ble behandlet med trekull, surgjort til pH 2 med konsentrert svovelsyre og vasket med etylacetat. Den vandige fase ble konsentrert til 20 ml og produktet utfelt ved pH 5 - 6 med konsentrert ammoniakk. Etter avkjøling i 15 timer ved 4°C ble det fremstilte L(-)-3-metoksy-4-hydroksyfenylalanin oppsamlet ved filtrering. $[\alpha]_D^{20} = -5,27^\circ$ ($c = 2$, N HCl), vanninnhold 8,7 %.

Etylacetatfasen ga etter fordampning uhydrolysert D(-)-N-fenylacetyl-3-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin som kunne racemiseres og igjen brukes for stereospesifikk enzymatisk hydrolyse.

Eksempel 17 - Spalting av DL-N-(4-fluorfenylacetyl)-3-metoksyfenylalanin og DL-N-(4-nitrofenylacetyl)-3-metoksyfenyl-alanin

L(-)-3-metoksyfenylalanin ble fremstilt på samme måte som beskrevet for L(-)-3-metoksy-4-hydroksyfenylalanin (eksempel 17) idet man startet med N-(4-fluorfenylacetyl)-3-metoksyfenylalanin eller N-(4-nitrofenylacetyl)-3-metoksyfenylalanin henholdsvis og acylase. Det fremstilte produkt var identisk med produktet fra eksempel 13.

Eksempel 19 - Spalting av DL-N-fenylacetyl-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alanin

L(-)-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alanin og D(-)-N-fenylacetyl-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alanin ble fremstilt som beskrevet for de tilsvarende 3-hydroksyderivater, idet man startet med N-fenylacetyl-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alanin og E.coli-acylase og utførte reaksjonen i en oksygenfri argonatmosfære. Det fremstilte L(-)-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alanin hadde en optisk rotasjon $[\alpha]_D^{20} = -35,0^\circ$ ($c = 1$, etylacetat).

C. Hydrolyse av L(-)-isomere.

Eksempel 20 - Hydrolyse av L(-)-3-(3-metoksyfenyl)-alanin.

L(-)-m-tyrosin ble oppnådd ved å koke under tilbakeløp en blanding av L(-)-3-(3-metoksyfenyl)-alanin (1 g) ved en konstant koken i 57 % hydrojodsyre (5 ml), iseddik (5 ml) og 0,33 g rødt fosfor i løpet av 3 timer under argonatmosfære. Deretter ble blandingen filtrert og fordampet flere ganger med vann. Det krystallinske gjenværende stoff ble oppløst i en

132535

mindre mengde vann, og pH justert til 5 - 6. Man fikk utfelt hvite krystaller som etter en omkrystallisasjon fra vann hadde et sm.p. på 243 - 259°C. $[\alpha]_D^{20} = -8,4^\circ$ (2N HCl, c = 1).

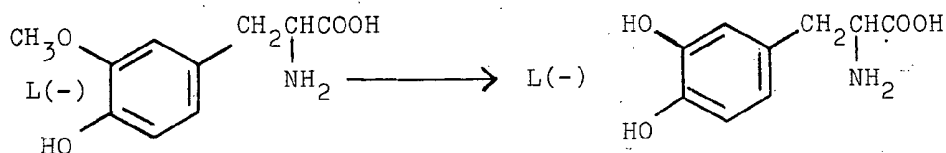
Analyse: C 59,42%, H 6,78%, N 7,59%, O 26,44%
beregnet for $C_9H_{12}NO_3$: C 59,33%, H 6,64%, N 7,69%, O 26,35%

Eksempel 21 - Hydrolyse av L(-)-3-(3,4-metylendioksyfenyl)-alanin

L(-)-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alanin ble fremstilt ved å koke 1,5 g L(-)-3-(3,4-metylendioksyfenyl)-alanin i en blanding (1 : 1) av 57 % hydrojodsyre og eddiksyreanhydrid (20 ml) samt 4 g rødt fosfor under en argonatmosfære i løpet av 3 timer. Blandingen ble så filtrert, avkjølt og fordampet flere ganger med vann under en argonatmosfære og redusert trykk. Resten ble filtrert med 10 ml vann hvorpå pH ble justert til 4,5 med ammoniakk under samtidig tilføring av argon. 10 ml heksan ble tilsatt, og etter en kald lagring i 12 timer ble produktet oppsamlet ved filtrering. Det fremstilte stoff hadde et sm.p. på 276 - 278°C.

Eksempel 22 - Hydrolyse av L(-)-3-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin.

L(-)-3-(3,4-dihydroksyfenyl)-alanin.



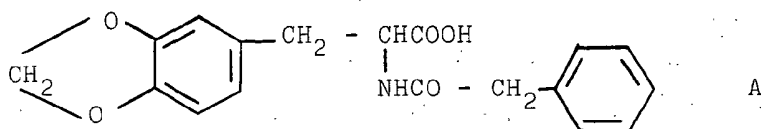
L(-)-3-(3-metoksy-4-hydroksyfenyl)-alanin (2,14 g, 0,0095 mol) ble blandet med 7,5 ml 47 % HBr og 2,3 g fenol og kokt under tilbakebøp i 3 timer. Blandingen ble fordampet under vakuum, resten oppløst i 3 ml vann og 7 ml etylacetat, vannfasen behandlet med SO_2 -behandlet aktivt karbon, noe $NaHSO_3$ ble så tilsatt, hvoretter pH ble hevet til 4 med konsentrert ammoniakk under avkjøling, hvorved man fikk utfelt aminosyren. $[\alpha]_D^{20} = -11,5^\circ$ (c = 2N HCl) (én gang fra vann).

Som støtte for den selektive effekt av E.coli-acylasen på N-fenacylestrener med formel III, har man foretatt forsøk under anvendelse av nedenstående metode.

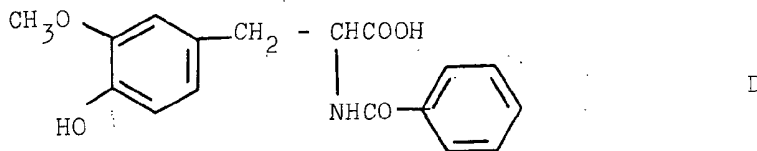
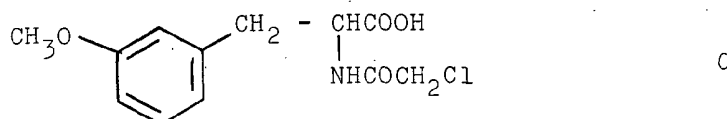
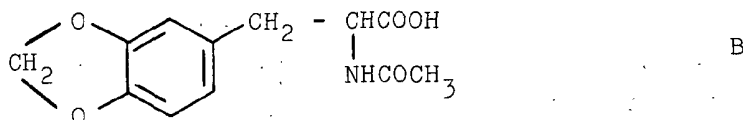
5 ml av en 0,01 M oppløsning av forsøksstoffene i 0,25 M Sørensen-buffer (pH = 7,0, 0,25 M Na_2HPO_4 + 0,25 M

132535

KH_2PO_4), ble inkubert med 1 ml E.coli-acylaseoppløsning (700 enheter) ved $35,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ i en polarimeterkyvette og vridningsforandringen ble målt med visse tidsintervaller ved 365 nm. Aktiviteten hos den benyttede E.coli-acylase overfor en forbindelse benyttet som utgangsmateriale ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse ble dermed sammenlignet med aktiviteten overfor tre sammenligningsstoffer. De testede forbindelser har følgende strukturformler:



Sammenligningsstoffene B - D har strukturformlene:



Resultatet av sammenligningsforsøket er angitt i nedenstående tabell:

132535

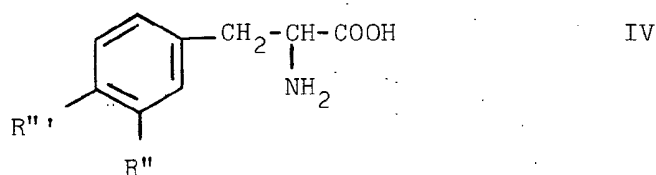
TABELL II

Inkubasjonstid (sek.)	Forandring i vridningsvinkel, $-(\alpha)_{365}^{35}$, for forbindelse			
	A	B	C	D
30	0,080			
45	0,096			
60	0,123	0,015		0,017
90	0,171		0,018	
120	0,199			
130	0,202			
240		0,015	0,018	0,017
300			0,018	

Som det fremgår av forsøksresultatene i tabellen ovenfor blir bare fenylacetylgruppen i forbindelse A avspaltet av E.coli-acylasen. Etter 130 sekunders inkubering med forbindelse A var reaksjonen sluttført, d.v.s. all L-form var spaltet. Den meget lave initiale $-(\alpha)$ for forbindelsene B - D skyldes selve det benyttede enzym, som under de angitte betingelser har en $-(\alpha)_{365}^{35}$ omtrent lik $0,015^{\circ}$.

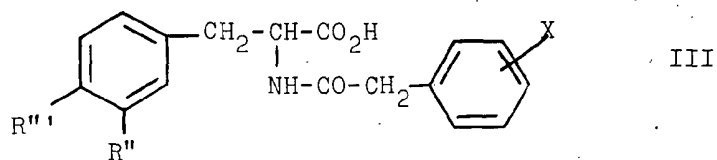
P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte for fremstilling av forbindelser med formelen:

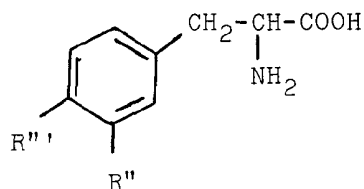


i L(-)-formen, hvor R'' er hydroksy eller alkoksy med 1 - 5 karbonatomer, R''' er hydrogen, hydroksy eller alkoksy med 1 - 5 karbonatomer, eller R'' sammen med R''' betegner en alkylendioksygruppe med en eller to karbonatomer, k a r a k t e r i s e r t v e d at man inkuberer en forbindelse med formelen:

132535



hvor R'' og R''' har den ovenfor angitte betydning, og X er hydrogen, fluor, klor, brom eller $-\text{NO}_2$, med en stereoselektivt virkende *E. coli*-acylase, hvorved man får dannet L(-)-formen av en forbindelse med formelen:



hvor R'' og R''' har den ovenfor angitte betydning, hvorefter gruppene R'' og/eller R''' eventuelt omdannes til hydroksygrupper ved i og for seg kjente fremgangsmåter.