



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101993900295156
Data Deposito	08/04/1993
Data Pubblicazione	08/10/1994

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C		

Titolo

PROCEDIMENTO MIGLIORATO PER LA PREPARAZIONE DI L-(-)-CARNITINA A PARTIRE DA UN PRODOTTO DI SCARTO AVENTE OPPOSTA CONFIGURAZIONE.

Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

"Procedimento migliorato per la preparazione di L-(-)-carnitina a partire da un prodotto di scarto avente opposta configurazione".

a nome: SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.a.

5 a Roma, Viale Shakespeare, 47

di nazionalità italiana.

Inventori: GIANNESI Fabio, SCAFETTA Nazareno, BERNABEI Ida,

TINTI Maria Ornella, DE ANGELIS Francesco.

RM93 A 000227

10 La presente invenzione riguarda un procedimento migliorato per la produzione di L-(-)-carnitina. Più particolarmente, il procedimento è basato sulla conversione in L-(-)-carnitina di un composto di partenza contenente un atomo di carbonio asimmetrico avente configurazione opposta a quella della L-(-)-carnitina, senza che sia
15 necessario che tale composto venga previamente trasformato in un intermedio achirale, generalmente rappresentato da crotonobetaina e gamma-butilbetaina, e che sia questo ad essere successivamente convertito in L-(-)-carnitina. Tale composto di partenza è, nel
20 procedimento secondo l'invenzione, costituito dalla D-(+)-carnitinammide.

Come noto, la carnitina contiene un centro di asimmetria e può pertanto esistere sotto forma di due enantiomeri, designati D-(+)-carnitina e L-(-)-carnitina, rispettivamente. Di questi, solo la L-(-)-carnitina è nota presentarsi negli organismi viventi ove funziona
25 da carrier per il trasporto degli acidi grassi attraverso le membrane

SIGMA - TAU
INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

mitocondriali. Mentre è la L-(-)-carnitina l'enantiomero fisiologicamente attivo, per alcuni anni si è usato il racemo DL quale agente terapeutico. Si è dovuto tuttavia riconoscere che la D-(+)-carnitina è un inibitore competitivo delle carnitine aciltransferasi e può abbassare i livelli di L-(-)-carnitina nel miocardio e nel muscolo scheletrico.

E' pertanto essenziale che soltanto la L-(-)-carnitina venga somministrata a pazienti sottoposti a trattamento emodialitico o che siano curati per disturbi cardiaci o del metabolismo lipidico.

Lo stesso principio si applica all'utilizzazione terapeutica di derivati acilati della carnitina per i trattamenti dei disturbi del metabolismo cerebrale, delle neuropatie periferiche, di arteriopatie periferiche, etc per i quali si impiegano acetil L-(-)-carnitina e propionil L-(-)-carnitina, che si ottengono per acilazione della L-(-)-carnitina.

Sono stati proposti diversi procedimenti chimici per produrre carnitina su scala industriale. Questi procedimenti non sono stereospecifici e conducono pertanto a delle miscele racemiche di isomeri D ed L. Conseguentemente, devono venir impiegati dei metodi di risoluzione per separare gli enantiomeri costituenti il racemo. Tipicamente, la miscela racemica D,L viene fatta reagire con un acido otticamente attivo, scelto ad esempio fra acido D-(-)-tartarico, acido D-(+)-canforsolfonico, acido-(+)-dibenzoil D(-) tartarico, acido N-acetil-L(+) glutammico e acido D-(+)-canforico, con l'ottenimento di due diastereomeri che possono venir separati l'uno

dall'altro. Nel classico procedimento descritto nel brevetto US 4.254.053 si utilizza l'acido D-(+)-canforico quale mezzo risolvente di una miscela racemica di D,L-carnitinammide, ottenendo D-(+)-carnitinammide quale prodotto di scarto, mentre la L-(-)-carnitinammide viene idrolizzata a L-(-)-carnitina.

Questi procedimenti di risoluzione sono pertanto complessi e costosi e conducono in ogni caso alla produzione sia di L-(-)-carnitina che di una uguale quantità di D-(+)-carnitina o di un precursore avente comunque configurazione opposta a quella della L-(-)-carnitina, quale sottoprodotto.

Nel tentativo di utilizzare le ingenti quantità di D-(+)-carnitina (o di un precursore, quale appunto la D-(+)-carnitinammide) che si ottiene quale composto di scarto nella produzione industriale di L-(-)-carnitina, sono stati recentemente proposti diversi procedimenti microbiologici che sono basati sulla sintesi stereospecifica a partire da derivati achirali ottenuti appunto da tale D-(+)-carnitina di scarto.

Tali procedimenti sono generalmente basati sull'idratazione stereospecifica della crotonobetaina e differiscono l'uno dall'altro principalmente per il particolare microorganismo impiegato per realizzare la biotrasformazione. Si vedano ad esempio i procedimenti descritti in: EP 0 12 1444 (HAMARI), EP 0 122 794 (AJINOMOTO), EP 0 148 132 (SIGMA-TAU), JP 275689/87 (BIORU), JP 61067494 (SEITETSU), JP 61234794 (SEITETSU), JP 61234788 (SEITETSU), JP 61271996 (SEITETSU), JP 61271995 (SEITETSU), EP 0 410 430 (LONZA), EP 0 195 944 (LONZA), EP

0158 194 (LONZA), e, EP 0 457 735 (SIGMA-TAU).

JP 62044189 (SEITETSU) descrive un procedimento per la produzione stereoselettiva di L-(-)-carnitina a partire invece da gamma-butirrobetaina, a sua volta ottenuta da crotonobetaina per via enzimatica.

Tutti tali procedimenti presentano degli inconvenienti e pongono rilevanti problemi tecnici.

La D-(+)-carnitina deve innanzitutto essere convertita nel composto achirale (crotonobetaina, gamma-butirrobetaina) che costituisce il composto di partenza di tutti i precitati procedimenti microbiologici.

Questi ultimi pongono poi su scala industriale uno o più dei seguenti problemi:

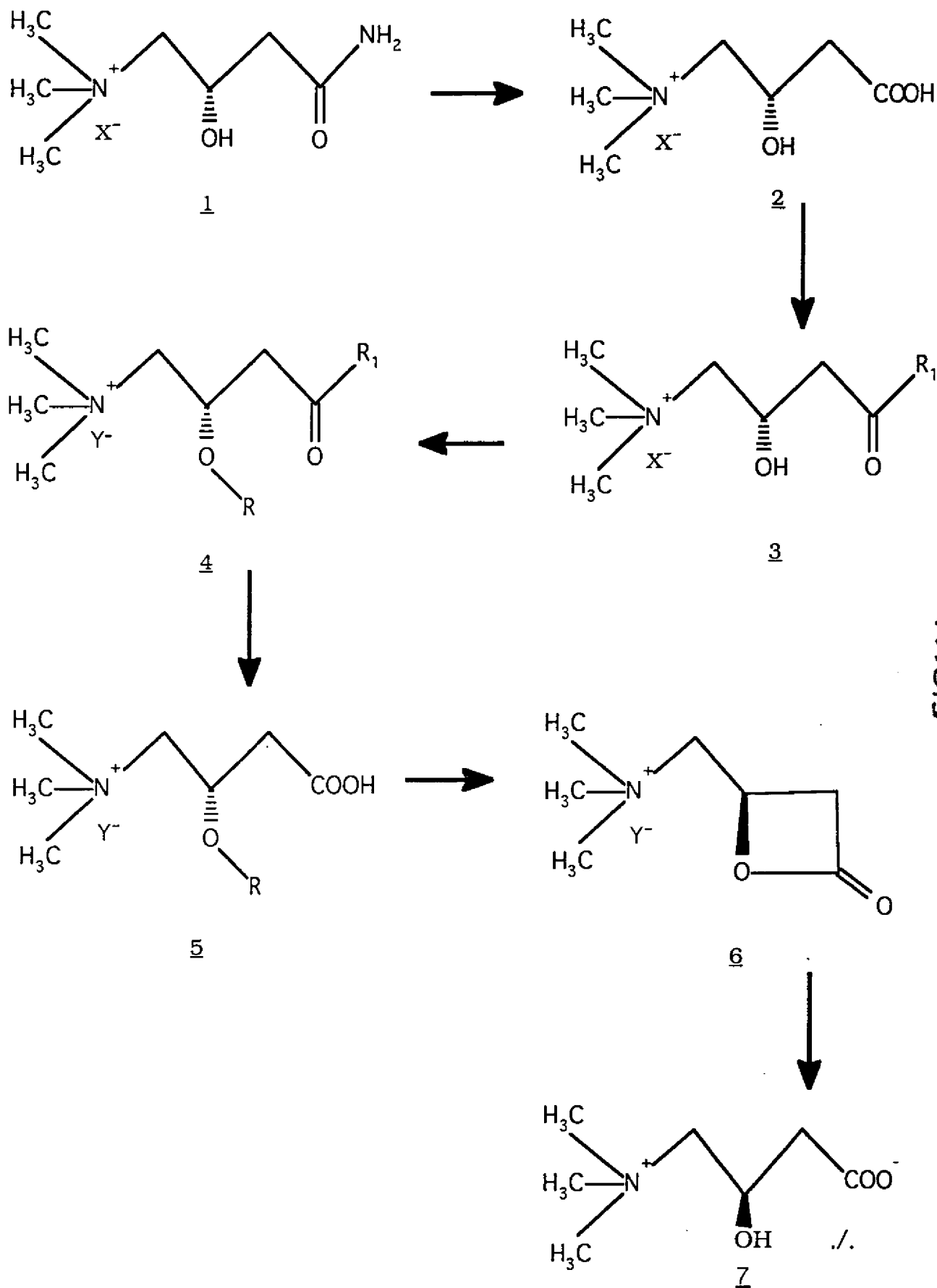
- (i) la resa in L-carnitina è estremamente bassa;
- (ii) i microorganismi devono essere coltivati su mezzi nutritivi costosi;
- (iii) i microorganismi sopportano soltanto basse concentrazioni di crotonobetaina (fino al 2-3% (p/v));
- (iv) si verificano reazioni collaterali, quali ad esempio nel caso della utilizzazione della crotonobetaina, la riduzione della stessa a gamma-butirrobetaina, oppure l'ossidazione della L-(-)-carnitina a 3-deidrocarnitina, che riducono la resa finale della L-(-)-carnitina.

Per superare tutti gli inconvenienti posti dai procedimenti noti, precedentemente menzionati, nella domanda di brevetto italiana

RM92A000915 depositata il 21 dicembre 1992 dalla stessa
richiedente e non accessibile al pubblico alla data di deposito della
presente domanda di brevetto, è stato descritto un procedimento
che consente di ottenere con alte rese L-(-)-carnitina a partire da un
5 composto di scarto di opposta configurazione (precisamente la D-(+)-
carnitinammide), evitando la necessità di convertirlo preliminar-
mente in un composto achirale.

Tale procedimento che è illustrato nel seguente schema di
reazione 1:

SCHEMA DI REAZIONE 1



comprende l'idrolisi di un sale della D-(+)-carnitinammide 1 a D-(+)-carnitina 2 e l'esterificazione di questa nell'estere 3 (secondo metodi noti) in cui R_1 è preferibilmente arilalcoosi, ad es. benzilossi.

5 L'estere 3 viene quindi convertito nell'acil derivato 4 in cui Y^- , eventualmente uguale a X^- , è preferibilmente un controione, ad es. perclorato, che impartisce solubilità al composto 4, e OR è un gruppo uscente in cui R è preferibilmente alchil solfonile avente da 1 a 12 atomi di carbonio, ad es. mesile.

10 L'acilazione di 3 in 4 viene realizzata preferibilmente in piridina, facendo reagire l'estere 3 con un agente acilante RY in cui Y è alogeno e R è uno dei gruppi precedentemente definiti. Tipicamente RY è il cloruro dell'acile prescelto.

15 Il gruppo estereo $-COR_1$ di 4 (con R_1 =benzilossi) viene idrogenato a carbossile con ottenimento dell'acil D-(+)-carnitina 5 che viene convertita nel lattone della L-(-)-carnitina 6.

20 La lattonizzazione viene effettuata in ambiente acquoso basico: o con $NaHCO_3$ in un rapporto 1:1, o con resina basica tipo Amberlite IRA-402 attivata in forma HCO_3 o con resina LA2. Il lattone viene isolato per evaporazione della soluzione acquosa o precipitandolo come sale (per esempio tetrafenilborato o reineckato).

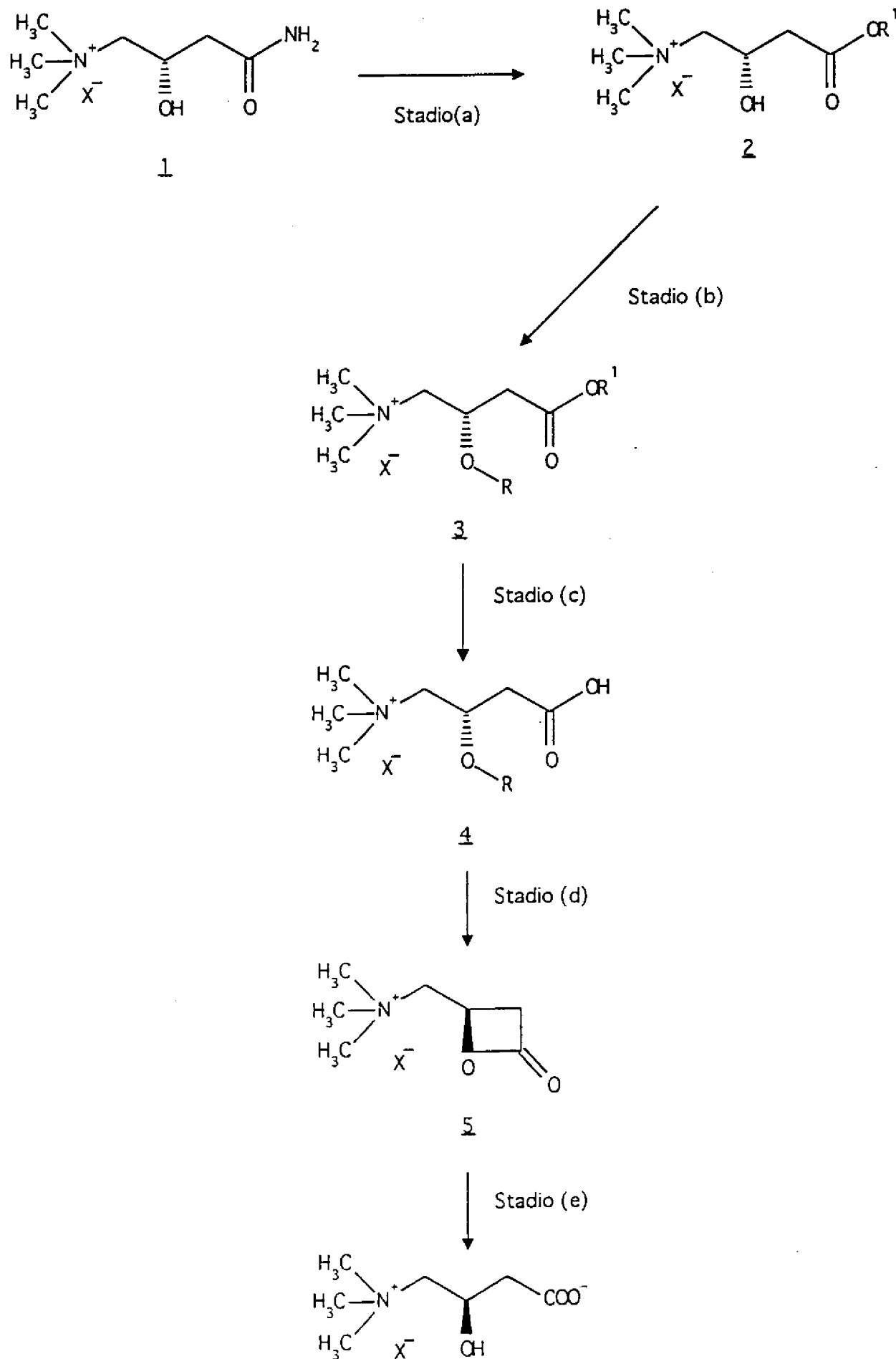
Il lattone 6 viene infine convertito in L-(-)-carnitina sale interno 7. Il lattone viene sciolto in acqua e trattato con una base quale ad es. $NaHCO_3$, in un rapporto 1:1 per tempi compresi fra 8 e 24 ore.

La L-(-)-carnitina viene purificata dai sali (originatisi dall'anione

X⁻, dall'eventuale eccesso di acil alogenuro, dalla piridina, etc.), cromatografando la soluzione acquosa su una resina acida forte tipo Amberlite IR 120, eluendo con H₂O e poi con NH₄OH, o alternativamente eluendo prima su resina basica forte tipo Amberlite IRA-
5 402 attivata in forma OH⁻ e successivamente su resina acida debole tipo Amberlite IRC-50.

Il procedimento oggetto della presente invenzione che è illustrato nel seguente schema di reazione 2 costituisce un notevole miglioramento del precedente procedimento.

Schema 2



Infatti:

- (1) la D-(+)-carnitinammide 1 viene direttamente convertita nell'estere 2 (senza intermedia conversione in D-(+)-carnitina);
- (2) l'acilazione (particolarmente la mesilazione) di 2 in 3 può venir condotta in assenza di solventi e in particolare di piridina il cui impiego provoca notevoli inconvenienti; e
- (3) il gruppo estereo dell'acil derivato 3 viene convertito nel carbossile dell'acil derivato 4 per semplice idrolisi acida, evitando gli inconvenienti, particolarmente rilevanti quando il procedimento viene condotto su scala industriale, della riduzione per idrogenazione.

Dettagliatamente, facendo riferimento allo schema di reazione 2, la D-(+)-carnitinammide 1 viene trasformata in estere 2 secondo metodi noti in presenza di un eccesso di un alcool, preferibilmente un alcanolo avente 1-4 atomi di carbonio, mediante catalisi acida, ad es. con HCl gassoso o H₂SO₄ concentrato.

X⁻ è, ad esempio, alogenuro (preferibilmente cloruro), solfato, fosfato, perclorato, metaperiodato, tetrafenilborato, alchilsolfonato avente da 1 atomo di carbonio (metansolfonato) a 12 atomi di carbonio (dodecilsolfonato), trifluoroacetato, tetraalogenoborato, fumarato, e alchilsolfato avente da 10 a 14 atomi di carbonio.

Opportuni esteri 2 sono quelli in cui il gruppo R₁ è un alchile lineare o ramificato, avente da 1 a 11 atomi di carbonio, preferibilmente n-butile o isobutile.

L'estere 2 viene quindi convertito nell'acil derivato 3 in cui OR è

un gruppo uscente e R è scelto fra alchil solfonile avente da 1 a 12 atomi di carbonio, formile e trifluoroacetile. Preferibilmente, l'alchil-solfonile è scelto fra metansolfonile (mesile), p-toluensolfonile (tosile), p-bromobenzenesolfonile (brosile), p-nitrobenzenesolfonile (nosile), trifluorometansolfonile (triflile), nonafluorometansolfonile (nonaflile), e 2,2,2-trifluoroetansolfonile (tresile). Fra questi, il mesile è particolarmente preferito.

L'acilazione di 2 in 3 viene realizzata facendo reagire l'estere 2 con R_2O , anidride dell'acido prescelto in cui R è uno dei gruppi precedentemente definiti.

La reazione di acilazione avviene in solventi anidri inerti come ad es. cloruro di metilene o acetonitrile o direttamente in miscela a fusione dei due reagenti, senza solvente. L'agente acilante viene aggiunto in rapporti variabili da 1:1 a 1:5, preferibilmente 1:3, a temperature comprese fra 40°C e 80°C, per tempi compresi fra 8 ore e 48 ore.

Il composto 3 può venir isolato (l'isolamento di 3 non è necessario, come verrà chiarito in seguito) per precipitazione con un opportuno solvente come ad esempio etere etilico o esano e purificato per cristallizzazione, oppure sciogliendo in acqua ed estraendo con un solvente organico, oppure eluendo la soluzione acquosa su una resina basica debole del tipo Amberlite IR45 o dibattendo la soluzione acquosa con resina basica debole del tipo LA2 diluita in esano, e infine liofilizzando o concentrando la soluzione acquosa.

Il gruppo estereo -COOR_1 di 3 viene convertito nel carbossile dell'acil D-(+)-carnitina 4 mediante idrolisi acida utilizzando metodi noti.

La conversione dell'acil D-(+)-carnitina 4 nel lattone 5 e la conversione di questo nella L-(-)-carnitina 6 vengono realizzate secondo quanto precedentemente descritto con riferimento alla domanda di brevetto italiana RM92A000915.

Deve essere chiaramente compreso che, mentre nello schema di reazione e nella precedente dettagliata descrizione fatta con riferimento allo schema di reazione, il procedimento è stato illustrato, a scopo di chiarezza, come una successione di cinque distinti stadi operativi, il relativo procedimento industriale è costituito da tre stadi soltanto. Infatti, nel condurre il procedimento oggetto della presente invenzione secondo le finalità e le modalità di un procedimento industriale, l'estere dell'acil D-(+)-carnitina 3 può venir opportunamente convertito direttamente in L-(-)-carnitina sale interno 6 senza isolare nè l'acil D-(+)-carnitina 4 nè il lattone 5.

Infatti, l'estere dell'acil D-(+)-carnitina 3 viene idrolizzato in ambiente acido, quindi la risultante soluzione acquosa, dopo concentrazione, viene portata a pH 7-9, preferibilmente a pH basico (8-9) e mantenuta a tale pH per 30-50 ore con ottenimento di L-(-)-carnitina.

Nell'esempio che segue e che illustra una forma di esecuzione del procedimento dell'invenzione gli intermedi 2, 3 e 4 sono stati invece isolati all'unico scopo di caratterizzarli esaurientemente dal

Esempio 1

Preparazione della D-carnitina isobutil estere cloruro 2.

Stadio (a)

La D-carnitinammide cloruro 1 (10 g; 0,05 moli) venne sospesa in 50 ml di isobutil alcol. La soluzione venne raffreddata a 4°C e venne aggiunto HCl gassoso fino a saturazione. La miscela di reazione venne tenuta a riflusso per 1 ora e successivamente filtrata a caldo, per eliminare NH₄Cl.

La soluzione alcolica venne concentrata sotto vuoto a secchezza, ripresa per 2 volte con isobutanolo, e concentrata. Al residuo ottenuto venne aggiunto Acetone e il solido venne filtrato.

Si ottennero 11,6 g del prodotto 2.

Resa 90%

HPLC

Colonna: nucleosil 5-SA 4,0 mm x 200 mm
 T: 30°C
 Eluente: CH₃CN-KH₂PO₄ 50 mM 65-35 PH 3,5
 Flusso: 0,75 ml/min
 Rivelatore I.R.
 Rt: 14,6 min

¹H NMR D₂O δ 4,7 (1H,m,CH₂OH); 4,0-3,9 (2H,m,COOCH₂-); 3,5 (2H,m,N⁺CH₂-); 3,2 (9H,s,(CH₃)₃N⁺); 2,7 (2H,m,CH₂COO); 2,0-1,9 (1H,m,CH(CH₃)₂); 0,9 (6H,d,(CH(CH₃)₂))

A. E. C ₁₁ H ₂₄ ClNO ₃	C%	H%	N %	CL%
Calcolato	52,06	9,53	5,52	13,97
Trovato	49,89	10,26	6,23	14,88
H ₂ O 0,8%				./.

[α]_D²⁵ = +15 (c=1% H₂O)

Preparazione della metansolfonil-D-carnitina isobutil estere metansolfonato 3

Stadio (b)

Una miscela di D-carnitina isobutil estere cloruro (2,5 g; 0,01 moli) e anidride metansolfonica (5,2 g; 0,03 moli), venne riscaldata a 80 °C per 24 ore.

La massa fusa venne ripresa con CH₂Cl₂ e precipitata con etere etilico. Questa operazione venne ripetuta tre volte per eliminare l'anidride metansolfonica in eccesso.

Si ottennero 3,9 g del prodotto 3.

Resa 100%

HPLC

Colonna: nucleosil 5-SA 4,0 mm x 200 mm
T: 30°C
Eluente: CH₃CN-KH₂PO₄ 50 mM 65-35 PH 3,5
Flusso: 0,75 ml/min
Rivelatore I.R.
Rt: 10,11 min

¹H NMR D₂O δ 5,5 (1H,m,-CH-O) ; 3,9 - 3,8 (3H,m,OCH₂,N+CH-H) ; 3,6 (1H,d,N+CH-H) ; 3,2 (3H,s,OSO₂CH₃) ; 3,1 (9H,s,(CH₃)₃N+); 3,0 (2H,dd,CH₂COO) ; 2,7 (3H,s,CH₃SO₃-); 1,8 (1H,m,CH(CH₃)₂); 0,8 (6H,d,CH(CH₃)₂).

A. E. C ₁₃ H ₂₉ NO ₈ S ₂	C%	H%	N%	S%
Calcolato	39,88	7,47	3,58	16,38
Trovato	39,45	7,43	3,75	16,24

[α]_D²⁵ = + 24,7 (c = 1% H₂O)

PF = 137-140 °C

./.

Preparazione della metansolfonil-D-carnitina metansolfonato 4

Stadio (c)

La metansolfonil-D-carnitina isobutil estere metansolfonato 3 (3,9 g; 0,01 moli) venne sciolta in HCl 2N 65 cc e venne tenuta per 20 ore alla temperatura di 50 °C. Sucessivamente la soluzione venne concentrata sotto vuoto a secchezza. L'olio residuo venne lavato con acetone e il solido formatosi venne filtrato.

Si ottennero 3,3 g di 4.

Resa 90%

HPLC

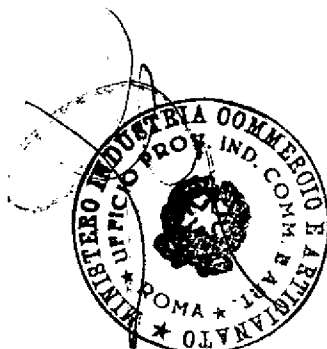
Colonna: nucleosil 5-SA 4,0 mm x 200 mm
T: 30°C
Eluente: CH₃CN-KH₂PO₄ 50 mM 65-35 PH 3,5
Flusso: 0,75 ml/min
Rivelatore I.R.
Rt: 12,60 min

¹H NMR D₂O δ 5,5 (1H,m,CH₂OSO₂CH₃); 3,9 (1H,dd,N⁺CH₂-H); 3,6 (1H,dd,N⁺CH₂-H); 3,2 (3H,s,OSO₂CH₃); 3,1 (9H,s,(CH₃)₃N⁺); 2,9(2H,m,CH₂COOH); 2,7 (3H,s,CH₃SO₃⁻)

$[\alpha]_D^{25} = +22$ (c = 1% H₂O)

PF = 148-150 °C

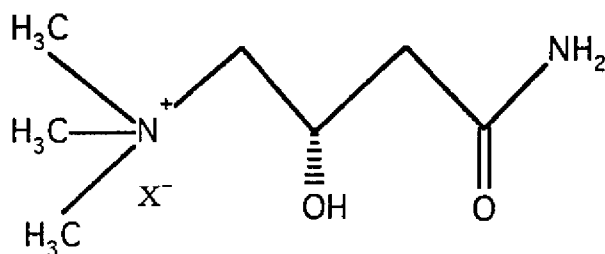
08 APR. 1993



SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE s.p.a.
Via Shakespeare, 47.
00144 ROMA

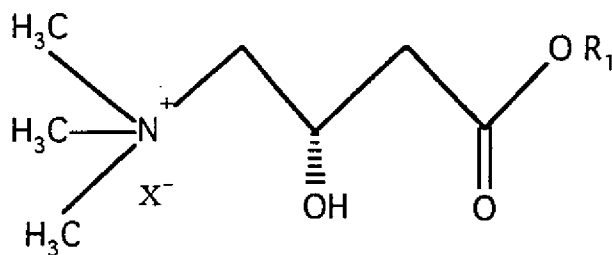
1. Procedimento per produrre L-(-)-carnitina da D-(+)-carnitinammide comprendente gli stadi consistenti nel:

5 (a) convertire D-(+)-carnitinammide 1 di formula



1

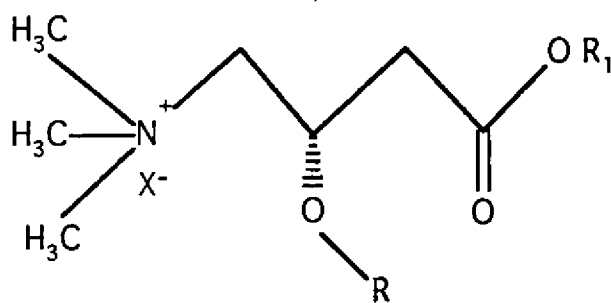
10 in cui X⁻ è un qualsiasi controione, nell'estere 2 di formula



2

15 in cui R₁ è un gruppo alchile, lineare o ramificato, avente da 1 a 11 atomi di carbonio;

(b) convertire l'estere 2 nell'acil derivato 3 di formula

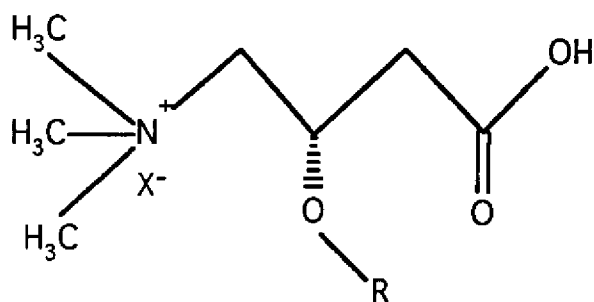


3

in cui OR è un gruppo uscente nel quale R è un gruppo scelto fra alchilsolfonile avente 1-12 atomi di carbonio, formile e trifluoroacetile,

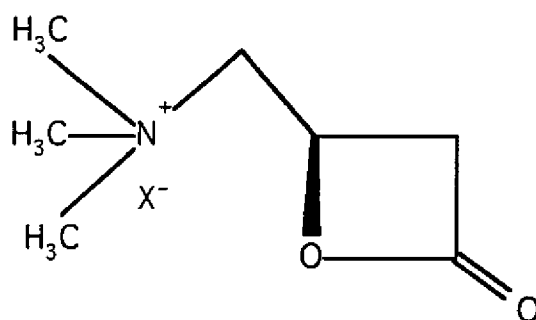
facendo reagire 2 con un'anidride di formula R_2O in cui R ha il significato precedentemente indicato, in un solvente o miscela di solventi organici inerti o preferibilmente direttamente in miscela a fusione dei due reagenti a 40°C-80°C, per 8-48 ore;

(c) convertire mediante idrolisi acida secondo metodi noti il gruppo $COOR_1$ dell'acil derivato 3 in gruppo carbossilico con ottenimento di acil D-(+)-carnitina 4 di formula;



4

(d) convertire l'acil D-(+)-carnitina 4 nel lattone della L-(-)-carnitina 5 di formula



5

5
10 mediante trattamento di 4 in ambiente basico, e
(e) convertire il lattone 5 in L-(-)-carnitina mediante trattamento di 5 in soluzione basica e isolare L-(-)-carnitina sale interno cromatografando la soluzione su resine.

15 2. Procedimento secondo le rivendicazioni 1, in cui gli stadi (c), (d) e (e) vengono realizzati in un unico stadio, senza isolamento degli intermedi 3, 4 e 5.

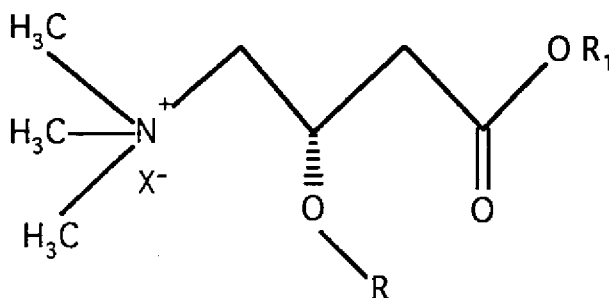
3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui

X^- è scelto fra alogenuro, preferibilmente cloruro, solfato, fosfato, perclorato, metaperiodato, tetrafenilborato, alchilsolfonato avente da 1 a 12 atomi di carbonio;

5 R_1 è n-butile o isobutile; e

R è scelto fra metansolfonile (mesile), p-toluensolfonile (tosile), p-bromobenzenesolfonile (brosile), p-nitrobenzenesolfonile (nosile), trifluorometansolfonile (triflile), nonafluorometansolfonile (nonaflile), e 2,2,2-trifluoroetansolfonile (tresile).

4. Estere di acil D-(+)-carnitina di formula



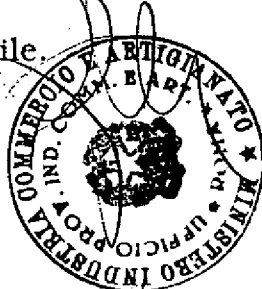
15 in cui

X^- è un qualsiasi controione, in particolare un anione scelto fra alogenuro, preferibilmente cloruro, solfato, fosfato, perclorato, metaperiodato, tetrafenilborato, alchilsolfonato;

R_1 è n-butile o isobutile; e

20 R è un gruppo alchilsolfonile avente 1-12 atomi di carbonio, preferibilmente mesile.

08 APR. 1993



SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE s.p.a.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA

./.