



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 741**

51 Int. Cl.:
C12P 7/62 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02003627 .3**
96 Fecha de presentación : **16.02.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1239045**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.09.2002**

54 Título: **Proceso para la fabricación de un compuesto intermedio de vitamina E.**

30 Prioridad: **21.02.2001 EP 01104141**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.01.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.01.2011

73 Titular/es: **DSM IP ASSETS B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es: **Eisenkraetzer, Detlef;**
Bonrath, Werner;
Karge, Reinhard;
Enjolras, Valerie;
Schneider, Michael y
Netscher, Thomas

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 350 741 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 350 741 T3

DESCRIPCIÓN

Proceso para la fabricación de un compuesto intermedio de vitamina E.

5 La principal forma comercial de vitamina E es su derivado acetato, sintetizado por acetilación de (todo-*rac*)- α -tocoferol, v.g. con anhídrido acético.

10 Las síntesis industriales de (todo-*rac*)- α -tocoferol están basadas en la condensación de trimetil-hidroquinona (TMHQ) con isofitol, fitol, o un derivado del mismo, tal como un haluro de fitilo. La TMHQ se obtiene normalmente a partir de 2,3,6-trimetilfenol que es caro, sin embargo, y tienen que utilizarse catalizadores ácidos para la condensación de la TMHQ con isofitol, fitol o un derivado del mismo, tal como un haluro de fitilo.

15 Alternativamente, puede sintetizarse (todo-*rac*)- α -tocoferol-acetato por condensación de trimetil-hidroquinona-1-monoacetato (TMHQ-1-MA) con isofitol o un equivalente del mismo. El TMHQ-1-MA utilizado en esta síntesis alternativa puede obtenerse a partir de la mucho menos costosa α -isoforona por la vía de la cetoisoforona y trimetilhidroquinona-diacetato (TMHQ-DA), teniendo que sufrir la última una mono-desacetilación absolutamente regioselectiva que es difícil de conseguir por los métodos conocidos en la bibliografía (v.g. por tratamiento con bases acuosas alcalinas), sin embargo.

20 Se ha encontrado ahora que el TMHQ-DA puede convertirse de modo absolutamente regioselectivo en TMHQ-1-MA sometiendo el TMHQ-DA a una monosaponificación enzimática por medio de una lipasa.

25 En una realización preferida de la presente invención, la lipasa está inmovilizada sobre un material soporte sólido. Dicho material soporte puede ser un soporte hidrófobo, v.g., un soporte de polipropileno tal como ACCUREL MP1001, proporcionado por Membrana GmbH, Obernburg (Alemania). Un soporte de una naturaleza diferente, a saber el soporte alcalino de catalizadores CELITE [composición química: 87% SiO₂, 0,9% CaO, 6,1% Al₂O₃, 1,6% Fe₂O₃, 1,6% Na₂O+K₂O; pH (suspensión al 10%, 25°C) = 8,5] que se utiliza a menudo para la inmovilización de enzimas, no proporcionaba una eficiencia satisfactoria de la enzima inmovilizada, sin embargo. Lipasas que son adecuadas para los propósitos de la presente invención incluyen las pertenecientes a la clase de enzimas EC 3.1.1.3, y son la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) y la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL). Las mismas están disponibles en el mercado.

35 La monosaponificación enzimática de la invención se lleva a cabo convenientemente en un disolvente hidrófobo, v.g. en 1-metil-2-pirrolidona o, particularmente, en un disolvente etéreo tal como terc.-butil-metil-éter, butil-éter, metil-2-metil-2-butil-éter o análogos, siendo particularmente preferido terc.-butil-metil-éter.

40 Convenientemente puede añadirse al disolvente éter desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 99,5% en volumen, con preferencia aproximadamente 0,03 a aproximadamente 20% en volumen, de modo muy preferible aproximadamente 0,09 a aproximadamente 5% en volumen de agua o tampón, tal como tampón de fosfato. Puede estar presente etanol en una concentración de hasta 1%.

45 Tetrahedron 56 (2000), 317-321 describe, *inter alia*, la monosaponificación selectiva de 2-metil-1,4-diacetoxinaftaleno en el compuesto 1-acetoxi-4-hidroxi correspondiente por medio de la enzima libre PSL en terc.-butil-metil-éter en presencia de agua. Cuando se repitió este experimento durante un tiempo de hasta 185 horas se encontró, sin embargo, que se obtenían resultados inconsistentes. Adicionalmente, cuando se trató TMHQ-DA con la enzima libre PSL en las mismas condiciones de reacción durante un tiempo de hasta aproximadamente 300 horas, la velocidad de reacción inicial era sólo aproximadamente un tercio. En contraste con ello, la monosaponificación de TMHQ-DA por medio de PSL inmovilizada durante un tiempo de <100 horas daba como resultado una conversión casi cuantitativa, y se obtuvieron resultados similares con PFL inmovilizada y TLL inmovilizada.

50 La velocidad de reacción de la monosaponificación de la presente invención aumenta normalmente con las temperaturas de reacción incrementadas. La temperatura máxima está, por supuesto, limitada por el punto de ebullición del disolvente (55°C en el caso de terc.-butil-metil-éter) pero pueden alcanzarse temperaturas aún más altas cuando se realiza la monosaponificación enzimática a presión. Con respecto a algunas de las lipasas, particularmente TLL, la temperatura puede elevarse hasta aproximadamente 60 a 80°C.

55 La monosaponificación enzimática de la invención se lleva a cabo por tanto convenientemente en un intervalo de temperatura de aproximadamente 4 a aproximadamente 80°C, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 75°C.

60 La relación de enzima, tanto libre como inmovilizada, a sustrato (TMHQ-DA) puede variar dentro de un intervalo bastante amplio, de modo conveniente desde aproximadamente 0,001 g/g a aproximadamente 10 g/g, con preferencia desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2 g/g.

65 La relación de sustrato (TMHQ-DA) a disolvente puede variar análogamente dentro de un intervalo bastante amplio, siendo conveniente desde aproximadamente 0,001 g/g a aproximadamente 100 g/g, con preferencia desde aproximadamente 0,01 g/g a aproximadamente 0,8 g/g.

ES 2 350 741 T3

Cuando la enzima está inmovilizada sobre un soporte apropiado, la monosaponificación de la invención puede realizarse ventajosamente de manera continua, v.g. en un reactor de lecho fijo o un reactor continuo de tanque agitado, en lugar de por cargas.

5 Como se ha mencionado anteriormente, el TMHQ-1-MA obtenido por la monosaponificación enzimática de la invención puede convertirse en (todo-*rac*)- α -tocoferilo o su acetato, v.g. por reacción con isofitol o un equivalente del mismo. En caso de estar presente (todo-*rac*)- α -tocoferol en el producto bruto, dicho (todo-*rac*)- α -tocoferol puede convertirse, en caso deseado, en su acetato por acetilación, v.g. por medio de anhídrido acético, mientras que el acetato, en caso deseado, puede desacetilarse.

10

Los ejemplos siguientes ilustran la invención con mayor detalle, pero no deben considerarse como limitantes de su alcance en modo alguno.

Ejemplo 1

15

Experimentos por cargas en vasos de vidrio utilizando lipasas libres

Se ponen en un vaso 5 ml de terc.-butil-metil-éter, 50 μ l de agua, 1,67 mg de enzima libre [las lipasas son de Fluka Chemie AG (Buchs, Suiza)] y 80 mg de TMHQ-DA [bruto, es decir, material que resulta de la transposición-aromatización de cetisoforona y está constituido por aproximadamente 90% de TMHQ-DA y aproximadamente 9% de trimetilcatecol-diacetato (TMC-DA)]. El espacio de cabeza del vaso se purga con nitrógeno. Se dispone el vaso en una incubadora a 50°C y se agita a 700 rpm para asegurar una mezcladura satisfactoria. A fin de tomar muestras, se abren los vasos, se retiran 500 μ l, se purga el espacio en cabeza con nitrógeno y se cierra de nuevo el vaso. La muestra se diluye luego hasta una concentración de sustrato o de producto de 0,5-1,0% en peso y se analiza por GC.

25

TABLA 1

*Conversión para diversas lipasas y TLL después de 6, 12, 24 o 48 h, respectivamente
(E/S = 1/48, C_{TMHQ-DA} = 0,019 g/g)*

30

Tiempo [h]	Conversión X [%]	
	PFL	TLL
6	5	5
12	47	6
40 24	61	12
48	74	19

Ejemplo 2

45

Experimentos por cargas utilizando enzimas inmovilizadas

(a) Los soportes proporcionados por Membrana GmbH Obernburg bajo el nombre ACCUREL MP1001 tienen un tamaño de 400-1000 μ m. Antes de la inmovilización, se seleccionan por tamizado las partículas de soporte con un tamaño de 1000 μ m.

Para la inmovilización, 500 mg de ACCUREL MP1001 en 1,7 ml de etanol y 100 mg de polvo de lipasa, disueltos en 2,5 ml de tampón de fosfato de potasio (KH₂PO₄, pH 7, 20 mM), se mezclan y se agitan mediante sacudidas durante una noche en una sacudidora a la temperatura ambiente. La lipasa inmovilizada se recoge por filtración, se lava tres veces con el mismo tampón y se seca a temperatura ambiente durante unas cuantas horas. La enzima inmovilizada se guarda a 4°C hasta su utilización.

55

La cantidad de proteína, inmovilizada se determina mediante un método de Lowry modificado.

60

(b) Se ponen en un vaso 10 ml de terc.-butil-metil-éter, 100 μ l de agua, 20 mg de enzima inmovilizada (13% enzima/87% de soporte ACCUREL) [las lipasas forman parte de un estuche de cribado proporcionado por Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania) denominado "Chirazyme"] y 160 mg de TMHQ-DA. El espacio de cabeza del vaso se purga con nitrógeno. Se pone el vaso en una incubadora a 33°C y se agita a 700 rpm para asegurar una mezcladura satisfactoria. A fin de tomar muestras, se abren los vasos, se retiran 500 μ l, se purga el espacio de cabeza con nitrógeno y se cierra de nuevo el vaso. La muestra se diluye luego hasta una concentración de sustrato o producto de 0,5-1,0% en peso y se analiza por GC.

65

ES 2 350 741 T3

TABLA 2

Conversión de TMHQ-DA puro utilizando Chirazymes después de 96 h ($E_1 = 1/8$, $C_{\text{TMHQ-DA}} = 0,019$ g/g)

Lipasa	Fuente	Conversión X [%]
CAL (B)	<i>Candida antarctica</i> (fracción B)	70,0
CRL	<i>Candida rugosa</i>	65,0
CRL (pura)	<i>Candida rugosa</i> (purificada)	87,0
CAL (A)	<i>Candida antarctica</i> (fracción A)	0,7
PSL	<i>Pseudomonas spec.</i>	96,1
HPL	Páncreas de cerdo	5,0
TLL	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	100,0
MML	<i>Mucor mihei</i>	18,0
ASL	<i>Alcaligenes spec.</i>	24,0
HL1 (estera-sa)	Hígado de cerdo (fracción 1)	0,2

El uso de TMHQ-DA bruto (véase el Ejemplo 1) da como resultado una tasa de conversión relativa en el intervalo de 95% a 100% comparado con el uso de TMHQ-DA puro.

TABLA 3

Comparación entre PSL y TLL inmovilizadas ($E_1/S = 1/2$, $C_{\text{TMHQ-DA}} = 0,014$ g/g, temperatura: 50°C, otras condiciones véanse anteriormente, selectividad >99,5% para ambas enzimas)

Tiempo [h]	Conversión X [%]	
	PSL	TLL
6	10	93
12	20	99
24	37	99

Ejemplo 3

Saponificación enzimática continua en un reactor de lecho fijo

La saponificación continua de TMHQ-DA a TMHQ-1-MA se lleva a cabo en un reactor de lecho fijo [900 mg de TLL inmovilizada sobre ACCUREL MP1001; altura del lecho: 73 mm; diámetro del lecho: 12,0 mm; densidad del

ES 2 350 741 T3

lecho: 0,11 g/ml; volumen del lecho: 8,1 ml; diámetro del soporte: 0,7 mm] a 40°C, flujo de sustrato: TMHQ-DA en una concentración de 0,01 g/g en terc.-butil-metil-éter saturado con agua; flujo másico de terc.-butil-metil-éter = 0,080 mg/min; y flujo másico de TMHQ-DA = 0,85 g/d.

- 5 La TLL inmovilizada es estable y activa durante al menos 224 horas; la selectividad de la TLL en la saponificación de TMHQ-DA a TMHQ-1-MA es prácticamente 100% para conversión 100%; e incluso para tiempos de residencia largos o cuando se alimenta una solución de TMHQ-DA que tiene una concentración baja, no tiene lugar prácticamente saponificación de TMHQ-1-MA a TMHQ.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un proceso para efectuar una conversión con alta selectividad de trimetilhidroquinona-diacetato en trimetilhidroquinona-1-monoacetato, que comprende someter el trimetilhidroquinona-diacetato a una monosaponificación enzimática por medio de lipasa de *Pseudomonas fluorescens* o lipasa de *Thermomyces lanuginosus*.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la lipasa está inmovilizada sobre un material soporte sólido.

10 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la saponificación enzimática se lleva a cabo en un disolvente hidrófobo.

4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde se utiliza como disolvente terc.-butil-metil-éter.

15 5. Proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la monosaponificación enzimática se lleva a cabo continuamente.

20 6. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente convertir el trimetilhidroquinona-1-monoacetato resultante en (todo-*rac*)- α -tocoferol o su acetato por reacción con isofitol o un equivalente del mismo, sea directamente o seguido, en caso deseado, por desacetilación.

7. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las reacciones se llevan a cabo a presión.

25

30

35

40

45

50

55

60

65