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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101993900314583
Data Deposito	29/07/1993
Data Pubblicazione	29/01/1995

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C		

Titolo

PROCEDIMENTO PER LA PRODUZIONE DI R AMMINOCARNITINA E S AMMINOCARNITINA.

Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

"Procedimento per la produzione di R amminocarnitina e S amminocarnitina".

a nome: SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

a: Viale Shakespeare, 47

00144 ROMA

RM93 A 000502

di nazionalità italiana.

Inventori: GIANNESI Fabio, CASTAGNANI Roberto, DE ANGELIS Francesco, TINTI Maria Ornella e MISITI Domenico.

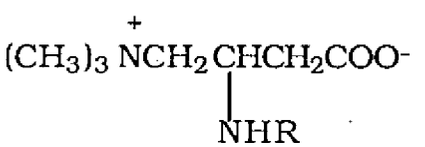
Depositato il: 29 LUG. 1993 n°

=°=°=°=°=°=°=°=°=°=

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

La presente invenzione riguarda un procedimento per la produzione di R amminocarnitina e S amminocarnitina.

Recentemente, la scoperta che l'amminocarnitina [(I), R=H] e certi alcanoil derivati dell'amminocarnitina [(I), R=acetile, decanoile, palmitoile]



(I)

possiedono proprietà farmacologiche di rilevanza terapeutica ha suscitato notevole interesse.

Ad esempio, D.L. Jenkins e O.W. Griffith hanno descritto gli effetti antichetogenici ed ipoglicemici dei composti (I) nella loro forma racemica. Anche nel brevetto statunitense 4,521,432 della Takeda si descrive l'attività antichetogenica (con possibilità quindi di

./.

applicazione nella terapia del diabete) della forma otticamente attiva (-) N-acetil amminocarnitina sale interno ($[\alpha]_D^{25}$ =-17,4, c=1,H_2O)

Analoga attività viene descritta per la (+) amminocarnitina cloruro cloridrato ($[\alpha]_D^{25}$ =+6,3; c= 1, AcOH 1N).

E' pertanto sentita la necessità di disporre di un procedimento che metta a disposizione entrambe le forme enantiomeriche della amminocarnitina.

Attualmente la R(+) amminocarnitna cloruro può venir ottenuta per idrolisi acida della R(-) N-acetilamminocarnitina isolata quale prodotto nel corso della coltivazione di un microorganismo del genere Emericella o Aspergillus o mediante un complesso procedimento chimico come descritto nel già citato brevetto U.S. 4521432 della Takeda.

La sintesi di R(+) e S(-) amminocarnitina cloruro è stata descritta a partire dalla L e dalla D asparagina da Schinagawa in J. Med. Chem., 30, 1458, (1987).

Questo metodo di sintesi è però piuttosto complesso. Esso, infatti, comprende sette stadi e prevede l'uso di reattivi particolarmente pericolosi come il diazometano. Non è quindi un metodo di produzione industriale, ed ha valore solo in quanto è servito ad assegnare la configurazione assoluta rispettivamente R e S alla (+) e alla (-) amminocarnitina cloruro.

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

./.

La R(+) e la S(-) amminocarnitina cloruro possono anche essere ottenute per risoluzione di una miscela racemica di (±) N-acetilamminocarnitina come descritto nel brevetto IT 1205758 della Sigma-Tau. In questo caso però la materia prima, (±) N-acetilamminocarnitina, è stata sintetizzata come descritto da D. Jenkins in J. Biol. Chem., 260/27, 14748, 1985 con un procedimento piuttosto complesso in cinque stadi a partire da un uracile sostituito.

Oppure la R(+) e S(-) amminocarnitina cloruro possono essere ottenute per separazione mediante cromatografia su colonna di silice o mediante cristallizzazione frazionata di una miscela di diastereoisomeri costituita da N-[S(-) α-metilbenzil]R(+) amminocarnitina benzilestere cloruro e N-[S(-) α-metilbenzil]S(-) amminocarnitina benzilestere cloruro oppure da N-[R(+) α-metilbenzil]R(+) amminocarnitina benzilestere cloruro e N-[R(+) α-metilbenzil]S(-) amminocarnitina benzilestere cloruro e successiva debenzilazione dei diasteroisomeri isolati come descritto nel brevetto IT 1231751 della Sigma-Tau. Anche in questo caso il processo è piuttosto complesso, anche perchè sono previste delle cromatografie su gel di silice che potrebbero presentare difficoltà per una produzione industriale.

Tutti gli svantaggi dei procedimenti noti vengono superati dal procedimento per la preparazione di amminocarnitina sale interno secondo l'invenzione che comprende gli stadi consistenti nel:

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

./.

(1) convertire metansolfonilcarnitina in lattone mediante trattamento della metansolfonilcarnitina in ambiente basico, ad esempio trattando la metansolfonilcarnitina con una quantità equimolare di $NaHCO_3$ in un solvente di polare aprotico come dimetilsolfossido, acetonitrile e dimetilformammide, per 3-12 ore, a 15-50°C;

(2) convertire il lattone in azidocarnitina sale interno mediante trattamento del lattone per 2-6 ore, a 20-30°C con una quantità equimolare di una azide scelta preferibilmente fra litio azide, sodio azide, difenilfosforilazide e trimetilsililazide;

(3) convertire l'azidocarnitina in amminocarnitina sale interno mediante idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C al 10%, alla pressione di 2-4 atmosfere di idrogeno, per 8-18 ore.

A seconda che si desideri ottenere quale prodotto finale la R(-) amminocarnitina sale interno, oppure la S(+) amminocarnitina sale interno il composto di partenza sarà costituito da R(-) metansolfonilcarnitina oppure da S(+) metansolfonilcarnitina, rispettivamente.

Mentre la preparazione della S(+) metansolfonilcarnitina è illustrata nella domanda di brevetto italiana RM92A000915 del 21.12.93 (il cui contenuto è incorporato per riferimento nella presente descrizione) a partire da un precursore avente la stessa configurazione sterica, sarà evidente a qualsiasi comune esperto in sintesi organiche che per preparare la R(-) metansolfonilcarnitina

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

./.

sarà sufficiente, a parità di tutte le altre condizioni operative, partire dal precursore avente opposta configurazione sterica rispetto al precedente.

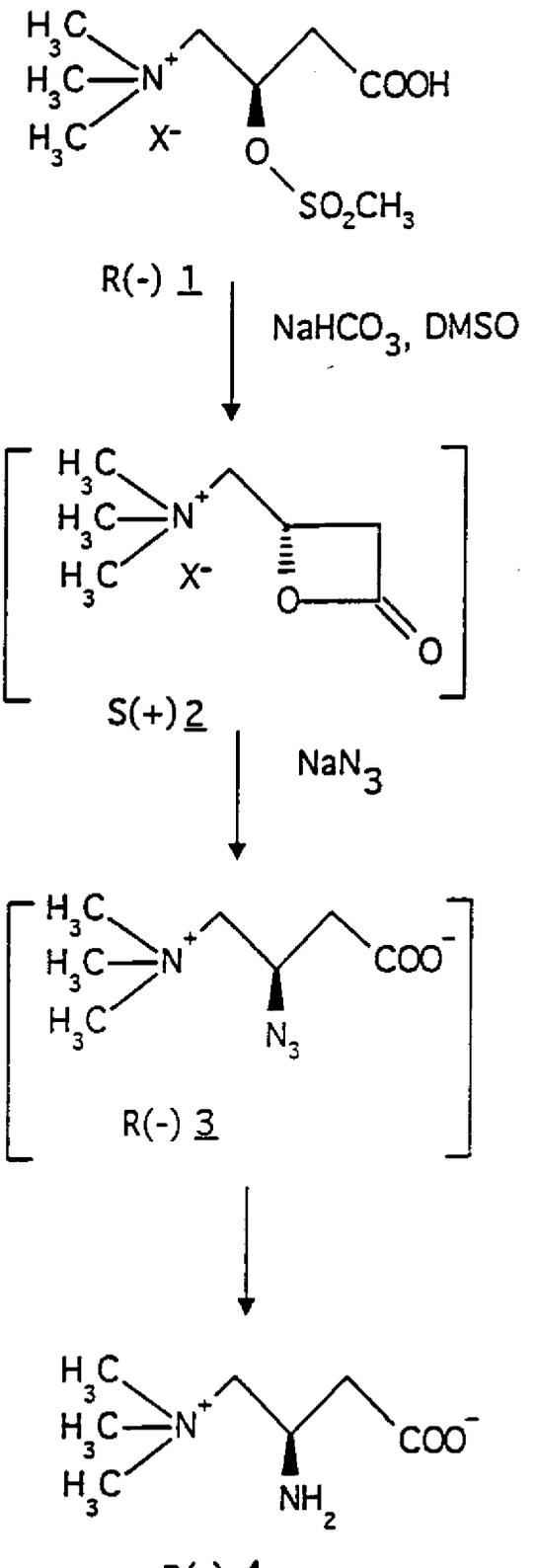
Deve essere chiaramente compreso che, mentre nello schema di reazione che segue e che mostra la preparazione della R(-) amminocarnitina sale interno 4 a partire da R(-) metansolfonilcarnitina 1, il procedimento viene illustrato, a scopo di chiarezza, come una successione di tre distinti stadi operativi, il relativo procedimento industriale può consistere di un unico stadio soltanto. Infatti, nel condurre il procedimento oggetto della presente invenzione secondo le finalità e le modalità di un procedimento industriale, non è necessario isolare nè il lattone 2 nè l'azido derivato 3.

Con riferimento allo schema di reazione, nel composto 1 X^- rappresenta un qualsiasi anione che impartisce solubilità al composto 1 nel mezzo di reazione. Ad es. X^- è metansolfonato.

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

./.

Schema di reazione



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

./.

ESEMPIO

Preparazione di R(-) amminocarntina sale interno

A metansolfonil-R(-)carnitina metansolfonato (2g; 5,96 mmoli) in DMSO (100ml) venne aggiunto sodio bicarbonato (0,5g; 5,96 mmoli). La risultante soluzione venne lasciata 6 ore sotto agitazione a temperatura ambiente (fino a completa formazione del lattone, come evidenziato da analisi HPLC e NMR). Alla miscela di reazione venne quindi aggiunta sodio azide (0,387g; 5,96 mmoli) e la risultante soluzione venne lasciata 2 ore sotto agitazione a temperatura ambiente.

Per precipitazione e ripetuti trattamenti con Et_2O si ottenne un grezzo contenente R(-) azido carnitina sale interno.

R(-) azido carnitina sale interno

^1H NMR (D_2O): δ4,48-4,38(m,1H,-C<u>H</u>N_3), 3,50-3,40(m,2H,-<u>CH_2</u>N^+Me_3),

3,2(s,9H,-N^+Me_3), 2,68-2,50(m,2H,-<u>CH_2</u>COO^-)

IR (Puro) : ν (cm^{-1}) 2121 (-C-N_3),1595(-C=0)

HPLC

Colonna = nucleosil 5-SA diametro interno=4mm L=200mm

Eluente = CH_3CN/KH_2PO_4 50mM(65/35) pH3,5 con H_3PO_4

Flusso = 0,75 ml/min

Tempo di ritenzione = 13,02 min

Rivelatore = RI Waters 410

Il grezzo cosi ottenuto venne sottoposto ad idrogenazione catalitica in MeOH (20ml) usando Pd/C al 10% (0,098g) a 3

./.

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

atmosfere di H_2. Dopo una notte la miscela venne filtrata su celite e il filtrato concentrato venne percolato su resina IRC-50 (20g) (precedentemente lavata con NH_3 acquosa al 2%, riattivata con HCl 2N ed eluita con H_2O fino a neutralità), fino a completa eluizione di impurezze neutre o acide.

Per successiva eluizione con una soluzione acquosa di NH_3 al 2% ed evaporazione dell'eluato sotto vuoto si ottenne R(-) amminocarnitina sale interno (0,53g).

Resa=55%

La configurazione venne assegnata tramite HPLC utilizzando una colonna chirale CHIRALPAK-WM per confronto con uno standard di chiralità nota.

Nelle stesse condizioni di analisi i due enantiomeri risultarono ben distinguibili.

R(-) amminocarnitina sale interno

$[\alpha]_D^{20}$ =-18,1° (c=0,4 H_2O)

DSC = Decompone nell'intervallo di temperatura compreso tra 140 e 210 °C

Analisi elementare per $C_7H_{16}N_2O_2$ (K.F.=6% H_2O)

	C	H	N
Calcolato	52,47	10,06	17,48
Calcolato con 6% di H_2O	49,33	10,13	16,43

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

./.

Trovato 49,15 10,42 16,32

^{1}H NMR (D_2O): δ3,72-3,62(m,1H,-C<u>H</u>NH_2), 3,48-3,38(m,2H,-<u>CH_2</u>N^+Me_3), 3,22(s,9H,-N^+Me_3), 2,50-2,36(m,2H,-<u>CH_2</u>COO^-)

HPLC

Colonna = CHIRALPAK-WM diametro interno=4,6mm, L=250mm t=50°C

Eluente = $CuSO_4$ 1mM+$NaClO_4$ 2mM IN H_2O pH=3 con $HClO_4$

Flusso = 1ml/min

Tempo di ritenzione = 24,32 min

[R(-) amminocarnitina sale interno standard= 24,17 min; S(+) amminocarnitina sale interno standard = 19,09 min]

Rivelatore = UV Waters 996 λ=230nm

Poiché i dati reperibili in letteratura (EP 80695 e EP 127098, Takeda) si riferiscono alla R(+) amminocarnitina cloruro cloridrato, a scopo analitico e di confronto questo sale venne ottenuto eluendo la resina IRC-50 con una soluzione di HCl 1N anzichè con NH_3.

L'eccesso di acidità presente venne eliminato dibattendo con resine a carattere debolmente basico tipo LA2 (soluzione in esano). La fase acquosa successivamente lavata con esano ed infine evaporata sotto vuoto fornì R(+) amminocarnitina cloruro cloridrato (0,7g).

Resa=50%

I dati relativi a quest'ultima risultarono conformi a quelli esistenti nella citata letteratura.

L'eccesso enantiomerico, determinato con il metodo descritto nel brevetto IT 1231751, fu del 100%.

29 LUG. 1993

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA

./.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la preparazione di amminocarnitina sale interno comprendente gli stadi consistenti nel:

   (1) convertire metansolfonilcarnitina in lattone mediante trattamento della metansolfonilcarnitina in ambiente basico;

   (2) convertire il lattone in azidocarnitina sale interno mediante trattamento del lattone con una azide per 2-6 ore, a 20-30°C; e

   (3) convertire l'azidocarnitina in amminocarnitina sale interno mediante idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C al 10%, alla pressione di 2-4 atmosfere di idrogeno per 8-18 ore.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1 per la preparazione di R amminocarnitina sale interno in cui nello stadio (1) la metansolfonilcarnitina è R metansolfonilcarnitina.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 per la preparazione di S amminocarntina sale interno in cui nello stadio (1) la metansolfonilcarnitina è S metansolfonilcarnitina.

4. Procedimento secondo le rivendicazioni 1,2 o 3 in cui nello stadio (2) l'azide è scelta fra litio azide, sodio azide, difenilfosforilazide e trimetilsililazide.

29 LUG. 1993

MINISTERO INDUSTRIA COMMERCIO E ARTIGIANATO UFFICIO BREVETTI ROMA

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

./.