



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 24 026 T2** 2006.02.09

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 151 130 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 24 026.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IT99/00339**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 954 351.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/24919**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.10.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.05.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.11.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12P 13/00** (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

C07H 19/20 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

19850426 **27.10.1998** **DE**

19850433 **27.10.1998** **DE**

(73) Patentinhaber:

**Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite
S.p.A., Rom/Roma, IT**

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**ELSSNER, Thomas, D-04159 Leipzig, DE;
KLEBER, Hans-Peter, D-04416 Grossdeuben, DE**

(54) Bezeichnung: **COENZYM ZUR HERSTELLUNG VON L-CARNITIN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die hierin beschriebene Erfindung betrifft ein Coenzym, das für die Synthese von L-Carnitin nützlich ist, insbesondere eine Verbindung von Coenzym A und mehr spezifisch Crotonobetainyl-Coenzym A, Verfahren zu dessen Herstellung und seine Verwendung für die Erzeugung von L(-)-Carnitin von Crotonobetain und D(-)-Carnitin.

[0002] Bisher haben wir keine Kenntnis von isolierten Coenzymen, die für die Synthese von L-Carnitin nützlich sind und insbesondere ist Crotonobetainyl-Coenzym A keine isolierte Substanz.

[0003] WO 95/10613 postuliert Crotonobetainyl-Coenzym A und gamma-Butyrobetainyl-Coenzym A als Zwischenprodukte beim Metabolismus vom gamma-Butyrobetain oder Crotonobetain in L(-)-Carnitin in der Zelle. Eine metabolische Synthese von Crotonobetainyl-Coenzym A ausgehend von gamma-Butyrobetain über gamma-Butyrobetainyl-Coenzym A oder direkt von Crotonobetain und eine metabolische Synthese von gamma-Butyrobetainyl-Coenzym A, ausgehend von gamma-Butyrobetain ist schematisch gezeigt. Im weiteren Verlauf des Metabolismus wird gamma-Butyrobetainyl-Coenzym A bzw. Crotonobetainyl-Coenzym A über L(-)-Carnitiny-Coenzym A abgebaut, was zu L(-)-Carnitin führt oder über L(-)-Carnitiny-Coenzym A und Dehydrocarnitiny-Coenzym A abgebaut, was zu Betain führt. Jedoch lehrt dieses Dokument nicht, wie Crotonobetainyl-Coenzym A oder gamma-Butyrobetainyl-Coenzym A erhalten wird, weil es auf die Herstellung von L(-)-Carnitin unter Verwendung von Mikroorganismen mit einem Gen gerichtet ist, das ein Enzym codiert, das erneut Crotonobetainyl-Coenzym A ebenso wie gamma-Butyrobetainyl-Coenzym A abbaut, so daß es als Ergebnis nicht möglich ist, Crotonobetainyl-Coenzym A und gamma-Butyrobetainyl-Coenzym A in Substanz entsprechend der Lehre dieses Dokumentes zu erhalten. Wenn die Fähigkeiten dieser Verbindungen zur Verwendung bei dem L(-)-Carnitin-Produktionsverfahren verifiziert werden, müssen die bekannte Technik und die Kenntnis bezüglich der L(-)-Carnitin-Produktionsverfahren berücksichtigt werden. Zahlreiche chemische und biochemische oder biotechnologische Verfahren sind für den Erhalt von L(-)-Carnitin bekannt. Die meisten der chemischen Syntheseverfahren ergeben D,L-Carnitin als Ergebnis durch Reaktion der racemischen Mischung mit optisch aktiven Trennsäuren, zum Beispiel mit optisch aktiven Isomeren von Weinsäure, Camphorsäure oder Camphorsulfonsäure, und über die anschließende fraktionierte Kristallisierung ist es möglich, das L-Carnitin-Enantiomer zu erhalten (zum Beispiel erteilte Patente DD 23 217; DD 93 347 und veröffentlichte Anmeldung DE 2 997 672). Alle bisher bekannten Syntheseverfahren haben den Nachteil, daß D-(+)-Carnitin als Abfallprodukt resultiert und verworfen werden muß und daß nur ein Maximum von 50 % des synthetisierten Produktes als L(-)-Carnitin erhalten wird. Die therapeutische Verwendung von D,L-Carnitin ist nicht substituierbar, weil D-(+)-Carnitin nicht substituierbar ist, solange D-(+)-Carnitin nicht nur bezüglich der Oxidation von Fettsäuren ineffektiv ist, sondern ebenfalls als eine Substanz mehr kompetitiv ist, die die verschiedenen Transportsysteme und spezifischen Enzyme von L(-)-Carnitin inhibiert (Life Sciences 28[191]2931-2938). Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren Verfahren für die stereospezifische Synthese von anfänglichen achiralen Stufen entwickelt (zum Beispiel Tetrahedron [1992], Bd. 48, 319-324).

[0004] Alternativen für die chemische Synthese von L(-)-Carnitin sind mikrobiologische oder enzymatische Prozesse. Auf diese Weise erweist es sich als möglich, die inverse Reaktion von L(-)-Carnitindehydrogenase (EC 1.1.1.108) zur Erzeugung von L(-)-Carnitin von 3-Dihydrocarnitin (US-Patent 4 221 869) auszunutzen. Weil es ein NADH-abhängiges Enzym ist, muß die Herstellung von Reduktionsäquivalenten garantiert werden. 3-Dihydrocarnitin ist darüber hinaus sehr instabil. Verschiedene Enterobacteriaceae-Stämme sind in der Lage, L(-)-Carnitin in gamma-Butyrobetain über Crotonobetain unter anaeroben Bedingungen zu transformieren (erteilte Patente DD 221 905, JP 6167 494, JP 61 234 794, JP 61 234 788). Die Metabolisierung von L(-)-Carnitin in Crotonobetain ist reversibel und wird durch ein stereospezifisches Enzym katalysiert, L(-)-Carnitindehydratase (erteilte Patente DD 281 735, DD 281 919). Auf diese Weise kann Crotonobetain als achirale Endverbindung für die Synthese von L(-)-Carnitin verwendet werden. Eine Anzahl von Proteus-Stämmen kann ebenfalls L(-)-Carnitin von Crotonobetain unter aeroben Bedingungen bilden (US-Patent 5 300 430). Für die enzymatische Synthese von L(-)-Carnitin aus dem Abfallprodukt D-(+)-Carnitin ist eine Racemase beschrieben (erteiltes Patent DD 300 181). Eine dritte Möglichkeit besteht in dem Erhalt von L(-)-Carnitin aus gamma-Butyrobetain über die gamma-Butyrobetainhydroxylase (EC/1.14.11.1) (veröffentlichte Anmeldung DE 3123975). In den Patenten EP 158 194, EP 195 944 und JP 61199793 sind Verfahren beschrieben, die auf der Herstellung von L(-)-Carnitin von Crotonobetain oder gamma-Butyrobetain durch Kultivieren von ausgewählten Mikroorganismen auf einer Ergänzungsquelle von C, beispielsweise Glycinbetain, in der Gegenwart von Crotonobetain oder gamma-Butyrobetain basieren.

[0005] L(-)-Carnitindehydratase (EC 4.2.1.89) katalysiert die reversible Transformation von Crotonobetain in L(-)-Carnitin nur in der Gegenwart eines niedermolekularen Faktors F, isoliert von Escherichia coli und ist bis-

her nicht identifiziert (erteiltes Patent DD 281 735). Von der Immobilisierung einer L(-)-Carnitindehydratase, isoliert von der Enterobacteriaceae-Familie, wurde ein Verfahren für die Synthese von L(-)-Carnitin ohne Bildung von Subprodukten entwickelt (DD 281 910). Der oben erwähnte niedermolekulare Faktor F ist gleichermaßen für die Racemisierung von D-(+)- in L(-)-Carnitin unverzichtbar. Die Reduktion von Crotonobetain in gamma-Butyrobetain tritt ebenfalls nur in der Gegenwart dieses Faktors auf.

[0006] L(-)-Carnitin (3-Hydroxy-4-trimethylaminobutyrate) ist eine allgegenwärtig natürlich auftretende Verbindung. Sie ist als Träger von Acyl-Gruppen für den Transport von langkettigen Fettsäuren entlang der internen mitochondrialen Membran von fundamentellem Interesse. Als Ergebnis der zentralen Rolle beim Metabolismus von höheren Organismen wird L(-)-Carnitin bei der Therapie und Prophylaxe von Patienten mit verschiedenen Herzerkrankungen ebenso wie bei der Behandlung von Patienten bei der Dialyse verwendet (vergleiche: Pathology 17 [1985], 116-169). Die L(-)-Carnitin-Ergänzung ist bei der parenteralen Ernährung von Neugeborenen in der postnatalen Periode und ebenfalls bei Erwachsenen für längere Perioden unverzichtbar (Gürtler und Löster, Carnitin (1996), 21-30). L(-)-Carnitin ist eine Diätergänzung mit zunehmender Wichtigkeit.

[0007] Die mikrobiologischen Verfahren, die für die Synthese von L(-)-Carnitin verwendet werden, weisen den Nachteil auf, daß die Mikroorganismen aufgrund ihrer sehr begrenzten Anzahl von ihrem Kulturmedium schlecht getrennt werden können und daß neue Nährmedien kontinuierlich für die Kultivierung verfügbar gemacht werden müssen. Das Ergebnis ist, daß eine wesentliche Bemühung für die Regenerierung des verdampften L(-)-Carnitin enthaltenen Kulturfluids erfolgen muß. Bei der Synthese von L(-)-Carnitin von Crotonobetain bei mikrobiologischen Systemen gibt es die Möglichkeit des Transformierens von Crotonobetain in gamma-Butyrobetain über die Crotonobetain-Reduktase als Reaktion, die mit der Synthesereaktion konkurriert.

[0008] Von keineswegs sekundärer Wichtigkeit ist das Problem der Verwendung von Mikroorganismen für die Erzeugung von Substanzen für pharmazeutische Verwendung. Hin und wieder kommen die verwendeten Mikroorganismen von pathogenen Stämmen oder sind sehr technisiert und enthalten fremde Gene, was ein Aspekt ist, dem die Aufsichtsbehörden eine große Aufmerksamkeit widmen.

[0009] Das Verfahren für die enzymatische Synthese L(-)-Carnitin von Crotonobetain präsentiert den Nachteil, daß eine Lösung, erhalten von E. coli, die frei ist von Proteinen, durch immobilisierte L(-)-Carnitindehydratase nicht nur Crotonobetain, sondern ebenfalls einen nicht identifizierten Faktor F enthalten muß, der für die Aktivierung des Enzyms essentiell ist. Einflüsse, die den Faktor F stören, der durch Komponenten der proteinfreien Lösung erzeugt ist, können nicht ausgeschlossen werden. Die enzymatische Synthese von L(-)-Carnitin kann nur in einem begrenzten Ausmaß optimiert werden, besonders angesichts der Tatsache, daß die Menge des verwendeten Faktors F nicht exakt quantifiziert werden kann. Der gleiche Faktor F ist von fundamenteller Wichtigkeit für die Racemisierung des beschriebenen D-(+)- in L(-)-Carnitin in E. coli. Faktor F kann nicht durch bekannte Coenzyme oder Cofaktoren von Enzymen ersetzt werden (Jung et al., Biochim. Biophys. Acta 1003 [1989] 270-276).

[0010] Die Ursache der erwähnten Nachteile besteht gemäß unserer geringen Kenntnis in der Struktur des Faktors F und seiner Rolle bei der Aktivierung des Apoenzyms von L(-)-Carnitindehydratase. Keine anderen Verbindungen sind bekannt, die die Aktivierung des Apoenzyms von L(-)-Carnitindehydratase auf gleiche Weise stimulieren könnten.

[0011] Der Zweck der hierin beschriebenen Erfindung liegt darin, die stereospezifische Synthese von L(-)-Carnitin von Crotonobetain in einem azellulären Medium enzymatisch möglich zu machen sowie die Racemisierung des Abfallproduktes D-(+)-Carnitin in L(-)-Carnitin. Diese enzymatisch katalysierten Reaktionen repräsentieren eine Alternative zu der reinen chemischen Synthese von L(-)-Carnitin oder zur Verwendung von mikrobiologischen Verfahren für den Erhalt von L(-)-Carnitin.

[0012] Der Zweck der Erfindung wird hier in der Realisierung der enzymatischen Synthese von L(-)-Carnitin von Crotonobetain mit Crotonobetainyl-Coenzym A und L(-)-Carnitindehydratase ohne Bildung von Subprodukten gesehen. Es ist ebenfalls möglich, die Transformation des physiologischen ineffektiven Abfallproduktes D-(+)-Carnitin in L(-)-Carnitin unter Anwendung des Systems der Racemisierung von Carnitin zusammen mit Crotonobetainyl-Coenzym A zu realisieren.

[0013] Das Subjekt der Erfindung ist eine Coenzym A-Verbindung, die nachfolgend mit Crotonobetainyl-Coenzym A bezeichnet wird, die in der Lage ist, die L(-)-Carnitindehydratase als Cofaktor auf solche Weise zu aktivieren, daß eine reversible Transformation von Crotonobetain in L(-)-Carnitin stattfinden kann. Der Cofak-

tor ist ebenfalls strikt für die Racemisierung von D-(+)- in L-(-)-Carnitin ebenso wie für die Transformation von Crotonobetain in gamma-Butyrobetain notwendig. Das Subjekt der hierin beschriebenen Erfindung ist ein Verfahren für die Synthese und Verwendung von Crotonobetainyl-Coenzym A ebenso wie das Coenzym selbst.

[0014] Die Verwendung von L-(-)-Carnitindehydratase in Kombination mit Crotonobetainyl-Coenzym A bietet eine neue Möglichkeit der Synthese von L-(-)-Carnitin aus Crotonobetain. Von der gleichzeitigen Immobilisierung von L-(-)-Carnitindehydratase und Crotonobetainyl-Coenzym A wird eine Alternative für die industriellen Verfahren, die bisher für die Erzeugung von L-(-)-Carnitin bekannt sind, entwickelt. Gleichmaßen wird das Racemisierungssystem zusammen mit Crotonobetainyl-Coenzym A als Verfahren zur Synthese von L-(-)-Carnitin von D-(+)-Carnitin verwendet.

[0015] Gemäß der hierin beschriebenen Erfindung ist es möglich, L-(-)-Carnitin von Crotonobetain mit Hilfe der L-(-)-Carnitindehydratase (EC 4.2.1.89) zu synthetisieren. Für die Aktivierung des Apoenzyms von L-(-)-Carnitindehydratase sind nur katalytische Mengen von Crotonobetainyl-Coenzym A notwendig.

[0016] Die Bedingung für die Synthese von Crotonobetainyl-Coenzym A ist, daß Crotonobetain aktiviert wird.

[0017] Getrocknetes Crotonobetainhydrochlorid wird bevorzugt als Endprodukt verwendet. Das Crotonobetainhydrochlorid wird mit Phosphortrichlorid bei 15 bis 70°C (bevorzugt 25°C) in einer Sauerstoffatmosphäre reagiert. Das gebildete Crotonobetainylchlorid wird von weiteren Produkten und Endsubstanzen durch Einblasen von Stickstoff getrennt.

[0018] Das somit erhaltene Crotonobetainylchlorid ist für die Synthese von Crotonobetainyl-Coenzym A geeignet. Coenzym A wird zunächst in einer Eismischung aus 1M Natriumbicarbonat bei pH 7,5 bis 9,5 (bevorzugt pH 8,5) suspendiert. Dazu wird eine definierte Menge an Crotonobetainylchlorid (bevorzugt im Überschuß) gegeben, wobei die pH-Werte unter Kontrolle gehalten werden. Nach 15 bis 30 Minuten ist die Reaktion vollendet. Die Bildung von Crotonobetainyl-Coenzym A wird durch HPLC (Spherisorb, C₁₈-Säule) überprüft und schließlich einer weiteren Reinigungsstufe unterworfen (Ionenaustauschchromatographie auf DOWEX 50). Die Reinheit wird erneut durch HPLC (Spherisorb, C₁₈-Säule) überprüft. Die physikochemischen Eigenschaften wurden bei dem gewaschenen Produkt bestimmt (siehe folgende Tabelle).

Eigenschaft	Crotonobetainyl-Coenzym A
Molare Masse	893,6
Maximale Absorption	208,0 und 260 nm
Molarer Extinktionskoeffizient (ϵ_{250})	20,21 mmol ⁻¹ cm ⁻¹
Wert von K _m von L-(-)-Carnitindehydratase für Crotonobetainyl-Coenzym A	8 · 10 ⁻⁶
pH-Stabilität	gut für eine Woche von pH 2 bis 10 stabil für mehrere Wochen bei pH 5
Temperaturstabilität	bei -20°C, mehrere Wochen, bei 0°C, eine Stunde
Löslichkeit	gut in Wasser, sehr schlecht in organischen Lösungsmitteln
Andere Eigenschaften	hygroskopisch

[0019] Für den L-(-)-Carnitindehydratase-Aktivierungstest gemäß der Erfindung wird gereinigtes Crotonobetainyl-Coenzym A (bevorzugt 1 bis 10 nmol) auf Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,5) zugeführt, das mit teilweise konzentrierter L-(-)-Carnitindehydratase (ohne daß Faktor F irgendeine Aktivität zeigt) und der zu metabolisierenden Crotonobetain-Lösung (1 M) versetzt und bei 37°C inkubiert wird.

[0020] Das gebildete L(-)-Carnitin wurde anschließend mit einem optischen Test mit der Hilfe von Carnitinnacetyltransferase (entsprechend BERGMEYER (1970)) untersucht. Ein ähnlicher Vorgang wurde bei dem Racemisierungsreaktionstest angewandt, bei dem eine Lösung aus D-(+)-Carnitin (1 M) anstelle von Crotonobetain zugegeben wurde. Das gebildete L(-)-Carnitin kann exakt durch vorhergehendes Testen des Systems mit bekannten Lösungen von L(-)-Carnitin bestimmt werden.

[0021] Für die Untersuchung der Aktivierung des enzymatischen Systems gemäß der hierin beschriebenen Erfindung, das Crotonobetain in gamma-Butyrobetain transformiert, wird gereinigtes Crotonobetainyl-Coenzym A (bevorzugt 1 bis 10 nmol) auf einem gemäßigten Kaliumphosphatpuffer (bevorzugt 37°C) geführt und mit Stickstoff (50 mM, bei pH 7,8) geblubbert, und das enzymatische Crotonobetain-Reduktionssystem (ohne daß Faktor F irgendeine Aktivität zeigt) wird ebenso wie Dithionit (bevorzugt 50 mM) und Benzyl-Viologen (bevorzugt 1 mM) zugegeben. Nach Zugabe der Crotonobetain-Lösung zum Metabolisieren (3,75 M) kann das gebildete gamma-Butyrobetain unter Verwendung des optischen Tests auf Basis von oxidiertem Benzyl-Viologen untersucht werden.

Beispiel 1

Bildung von L(-)-Carnitin von Crotonobetain mit Hilfe von konzentrierter L(-)-Carnitindehydratase und Crotonobetainyl-Coenzym A (CB-CoA) nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C auf Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,5).

L-Carnitin-dehydratase (μg)	CB-CoA (μmol)	Crotonobetain (μmol)	Carnitinsynthese (μmol)
10	0,002	20	0,271
10	0,002	0	0
10	0	20	0
0	0,002	20	0

Beispiel 2

Bildung von L(-)-Carnitin von D-(+)-Carnitin über das System der Racemisierung von Carnitin und Crotonobetainyl-Coenzym A (CB-CoA) nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C auf Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,5).

Carnitin-Racemisierungssystem (μg)	CB-CoA (μmol)	D-(+)-Carnitin (μmol)	L(-)-Carnitin (μmol)
30	0,002	20	0,243
30	0,002	0	0
30	0	20	0
0	0,002	20	0

Patentansprüche

1. Crotonobetainyl-Coenzym A, gekennzeichnet durch die folgenden Eigenschaften:

a) Molare Masse	893,6
b) Maximale Absorption	208,0 und 260 nm
c) Molarer Extinktionskoeffizient (ϵ_{250})	20,21 mmol ⁻¹ cm ⁻¹
d) Wert von K_m von L-(-)-Carnitin hydratase für Crotonobetainyl- Coenzym A	$8 \cdot 10^{-6}$
e) Temperaturstabilität	bei -20°C, mehrere Wochen, bei 0°C, eine Stunde
f) pH-Stabilität	gut für eine Woche von pH 2 bis 10 stabil für mehrere Wochen bei pH 5
g) Löslichkeit	gut in Wasser, sehr schlecht in organischen Lösungsmitteln
h) Andere Eigenschaften	hygroskopisch

2. Verfahren zur Erzeugung von Crotonobetainyl-Coenzym A nach Anspruch 1 von Crotonobetainhydrochlorid und Coenzym A, dadurch gekennzeichnet, daß Crotonobetainhydrochlorid mit Phosphortrichlorid reagiert wird, unter Erhalt von Crotonobetainylchlorid, das anschließend mit Coenzym A transformiert wird.

3. Verwendung von Crotonobetainyl-Coenzym A nach Anspruch 1 zur Aktivierung von L-(-)-Carnitindehydratase, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Verbindungen miteinander im Kontakt sind.

4. Verwendung von Crotonobetainyl-Coenzym A nach Anspruch 1 zur Erzeugung von L-(-)-Carnitin, dadurch gekennzeichnet, daß Crotonobetainyl-Coenzym A und L-(-)-Carnitindehydratase miteinander im Kontakt sind und dann Crotonobetain zugegeben wird.

5. Verwendung von Crotonobetainyl-Coenzym A nach Anspruch 1 zur Erzeugung von L-(-)-Carnitin, dadurch gekennzeichnet, daß Crotonobetainyl-Coenzym A und das System der Racemisierung von Carnitin miteinander in Kontakt gebracht werden und dann D-(+)-Carnitin zugegeben wird.

6. Verwendung von Crotonobetainyl-Coenzym A nach Anspruch 1 zur Herstellung von gamma-Butyrobetain, dadurch gekennzeichnet, daß Crotonobetainyl-Coenzym A und das enzymatische Crotonobetain-Reduktionssystem miteinander in Kontakt gebracht werden und Crotonobetain zugegeben wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen