

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **234709**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428189**

(22) Data zgłoszenia: **17.12.2018**

(51) Int.Cl.

C07D 333/22 (2006.01)

C07F 9/38 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(54)

**Biokatalityczny sposób otrzymywania czystego izomeru
kwasu (S)-1-amino-2-tienylometylofosfonowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

26.08.2019 BUP 18/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.03.2020 WUP 03/20

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MAŁGORZATA BRZEZIŃSKA-RODAK,
Wrocław, PL**

DOMINIKA GRZEGORCZYK, Świdnik, PL

TOMASZ OLSZEWSKI, Wrocław, PL

MONIKA SERAFIN-LEWAŃCZUK, Wrocław, PL

MAGDALENA KLIMEK-OCHAB, Wrocław, PL

EWA ŻYMAŃCZYK-DUDA, Smolec, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 234709 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania chiralnego optycznie czystego izomeru kwasu (S)-1-amino-2-tienylometylofosfonowego z wykorzystaniem metody biokatalitycznej. Otrzymany produkt w postaci kwasu (S)-1-amino-2-tienylometylofosfonowego znajduje zastosowanie jako chiralny blok budulcowy do dalszych syntez różnych strukturalnie związków, w tym takich o potencjalnej aktywności biologicznej.

W publikacji B. Boduszka pt. "An efficient synthesis of 1-aminophosphonic acids and esters bearing heterocyclic moiety" Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 1995, 104: 1, 63–70 opisano procedurę otrzymywania kwasu 1-amino-2-tienylometylofosfonowego w postaci mieszaniny racemicznej z wykorzystaniem metod chemicznych.

Badania nad otrzymaniem chiralnych aminofosfonianów z zastosowaniem komórek drożdży i grzybów strzępkowych przedstawione zostały w publikacji Żymańczyk-Dudy E., Brzezińskiej-Rodak M., Kozyry K. oraz Klimek-Ochab M. "Fungal platform for direct chiral phosphonic building blocks production. Closer look on conversion pathway" Applied Biochemistry and Biotechnology 2015, 175, 3, 1403–1411 oraz Kmiecik N., Majewskiej P., Kozyry K. oraz Żymańczyk-Dudy E.: "Bioconversion of aminophosphonates to hydroxyphosphonates via two step redox reactions employing fungi", Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements 2018, 193, 4, 232–238.

Kwasy α -aminofosfonowe oraz ich pochodne są przedmiotem zainteresowania z uwagi na różnicowaną aktywność biologiczną. Związki te posiadają wiele potencjalnych zastosowań w medycynie jako środki przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe, inhibitory enzymów czy antybiotyki oraz w rolnictwie jako herbicydy i insektycydy.

Biokatalityczny sposób otrzymywania optycznie czystego kwasu (S)-1-amino-2-tienylometylofosfonowego nie został dotychczas opisany w literaturze naukowej ani patentowej.

Istotą wynalazku jest biokatalityczny sposób otrzymywania czystego izomeru kwasu (S)-1-amino-2-tienylometylofosfonowego o wzorze 1, który polega na tym, że mieszaninę racemiczną kwasu 1-amino-2-tienylometylofosfonowego poddaje się reakcji biotransformacji z wykorzystaniem biokatalizatora w postaci hodowli szczepu *Rhodotorula mucilaginosa* (DSM 70403).

Korzystnie biokatalizator otrzymuje się w trakcie hodowli na podłożu ziemniaczanym (PDB).

Korzystnie optymalny czas hodowli *Rhodotorula mucilaginosa* to 5 dni na wytrząsarce rotacyjnej.

Produkt biotransformacji w postaci optycznie czystego kwasu (S)-1-amino-2-tienylometylofosfonowego o wzorze 1 analizowany jest za pomocą ^{31}P NMR z dodatkiem α -cyklodekstryny w środowisku obojętnym, przy pH 7.

Zaletą sposobu według wynalazku jest to, że umożliwia uzyskanie czystego optycznie izomeru kwasu (S)-1-amino-2-tienylometylofosfonowego (nadmiar enancjomeryczny – e.e. $\geq 99\%$).

Sposób według wynalazku został przedstawiony w przykładach wykonania nie ograniczając jego zakresu.

Przykład 1

Hodowlę badanego szczepu *Rhodotorula mucilaginosa* prowadzi się na podłożu PDB przygotowanym na podstawie przepisu nr 129 w bazie DSMZ. 200 g umytych, pokrojonych w kostkę ziemniaków gotuje się przez 1 h w 1 litrze wody. Następnie otrzymany wywar przesącza się przez gazę, uzupełnia wodą destylowaną do 1 L, dodaje się 20 g sacharozy i sterylizuje w autoklawie.

Do 100 mL podłoża PDB dodaje się 1 mL inokulum *R. mucilaginosa*, przygotowanego poprzez zaszczepienie z hodowli na podłożu stałym 100 mL podłoża ziemniaczanego (PDB) i inkubacji przez 3 dni na wytrząsarce rotacyjnej. Hodowlę właściwą prowadzi się w temperaturze pokojowej przez 5 dni z ciągłym wytrząsaniem. Po tym czasie hodowlę odwirowuje się (20°C, 5000 rpm, 10 minut).

Tak przygotowany biokatalizator wykorzystuje się w procesie biotransformacji. Do kolby zawierającej biomasa oraz 100 mL wody destylowanej dodaje się 30 mg substratu – kwasu 1-amino-2-tienylometylofosfonowego w postaci mieszaniny racemicznej. Po 24 h inkubacji biomasa oddziela się poprzez wirowanie, a supernatant odparowuje się i analizuje za pomocą ^{31}P NMR. Czystość optyczną produktu określa się spektroskopowo, na podstawie widm ^{31}P NMR mieszanin poreakcyjnych z dodatkiem α -cyklodekstryny (100 mM), jako chiralnego odczynnika solwatującego, w środowisku obojętnym (pH ≈ 7). Po biotransformacji przeprowadzonej w powyższy sposób otrzymano produkt z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym e.e. $\geq 99\%$.

Przykład 2

Hodowlę badanego szczepu *Rhodotorula mucilaginosa* prowadzi się na podłożu PDB przygotowanym na podstawie przepisu nr 129 w bazie DSMZ. Inokulum *R. mucilaginosa* przygotowuje się poprzez zaszczerpienie z hodowli na podłożu stałym 100 mL podłoża ziemniaczanego (PDB) i inkubacji przez 3 dni na wytrząsarce rotacyjnej. Następnie 1 mL inokulum przenosi się do świeżego medium hodowlanego i inkubuje się 5 dni z ciągłym wytrząsaniem. Po tym czasie hodowlę odwirowuje się (20°C, 5000 rpm, 10 minut), a otrzymaną biomasę zawiesza się w 100 mL wody destylowanej i inkubuje 24 lub 48 godzin w warunkach deficytu substancji odżywczych.

Tak przygotowany biokatalizator wykorzystuje się w procesie biotransformacji. Do kolby zawierającej biomasę oraz wodę destylowaną dodaje się 30 mg substratu – kwasu 1-amino-2-tienylometylofosfonowego w postaci mieszaniny racemicznej. Po 48 h inkubacji biomasę oddziela się poprzez wirowanie, a supernatant odparowuje się i analizuje za pomocą ^{31}P NMR. Czystość optyczną produktu określa się spektroskopowo, na podstawie widm ^{31}P NMR mieszanin poreakcyjnych z dodatkiem α -cyklodekstryny w środowisku obojętnym (pH \approx 7). Po biotransformacji przeprowadzonej w powyższy sposób otrzymano produkt z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym e.e. \geq 99%.

Produkt otrzymany według przykładu posiada następujące dane spektralne:

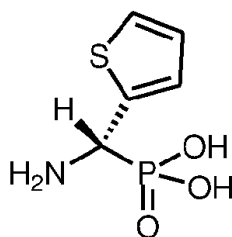
^{31}P NMR (D_2O , δ , ppm): 10.02

^1H NMR (D_2O): δ = 7.45 (m, 1H, tiofen), 7.21 (m, 1H, tiofen), 7.05 (m, 1H, tiofen), 4.70 (d, 1H, HCP, $J_{\text{CHP}} = 18$ Hz).

Zastrzeżenia patentowe

1. Biokatalityczny sposób otrzymywania czystego izomeru kwasu (S)-1-amino-2-tienylometylofosfonowego o wzorze 1, **znamienny tym**, że mieszaninę racemiczną kwasu 1-amino-2-tienylometylofosfonowego poddaje się reakcji biotransformacji z wykorzystaniem biokatalizatora w postaci hodowli szczepu *Rhodotorula mucilaginosa* (DSM 70403).
2. Biokatalityczny sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że biokatalizator otrzymuje się w trakcie hodowli na podłożu ziemniaczanym (PDB), przy czym optymalny czas hodowli *Rhodotorula mucilaginosa* wynosi 5 dni na wytrząsarce rotacyjnej.

Rysunek



Wzór 1