



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **427283**

(51) Int.Cl.

C12P 41/00 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **03.10.2018**

(54) **Biokatalityczny sposób otrzymywania czystego izomeru chlorowodoru
kwasu (R)-3-pirydylometylo(amino)fosfonowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
06.05.2019 BUP 10/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
04.05.2021 WUP 09/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

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

ANGELIKA OSIEWAŁA, Bielawa, 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

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania chiralnego optycznie czystego izomeru chlorowodoru kwasu (R)-3-pirydylometylo(amino)fosfonowego z wykorzystaniem metody biokatalitycznej. Otrzymany produkt w postaci chlorowodoru kwasu (R)-3-pirydylometylo(amino)fosfonowego znajduje zastosowanie jako chiralny blok budulcowy do dalszych syntez różnych strukturalnie związków, w tym takich o potencjalnej aktywności biologicznej.

W publikacjach Boduszka B. pt. „The acidic cleavage of pyridylmethyl(amino)phosphonates. Formation of the corresponding amines” w *Tetrahedron* 1996, 52, 12483–12494 oraz „1-aminophosphonic acids and esters bearing heterocyclic moiety. Part 2. Pyridine, pyrrole and imidazole derivatives” w *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 1996, 113, 209–218 opisano procedurę otrzymywania chlorowodoru kwasu 3-pirydylometylo(amino)fosfonowego w postaci mieszaniny racemicznej z wykorzystaniem metod chemicznych.

Badania nad otrzymaniem chiralnych aminofosfonianów z zastosowaniem komórek drożdży oraz 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 i 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 ich zróżnicowaną aktywność biologiczną, np. antybakteryjną, antynowotworową, herbicydową czy przeciwwirusową. Związki fosforoorganiczne zawierające w swojej budowie heteroatom zlokalizowany w pierścieniu znalazły zastosowanie w medycynie oraz stanowią bloki budulcowe w syntezie bardziej skomplikowanych struktur takich jak fosfonowe pseudopeptydy o właściwościach inhibitorów enzymów. Ze względu na fakt, że aktywność związków silnie zależy od konfiguracji absolutnej, synteza optycznie czystych enancjomerów jest istotnym tematem badań.

Biokatalityczny sposób otrzymywania optycznie czystego chlorowodoru kwasu (R)-3-pirydylometylo(amino)fosfonowego z wykorzystaniem wolnych komórek drożdży z rodzaju *Rhodotorula* sp. nie został dotychczas opisany w literaturze naukowej ani patentowej.

Istotą wynalazku jest biokatalityczny sposób otrzymywania czystego izomeru chlorowodoru kwasu (R)-3-pirydylometylo(amino)fosfonowego o wzorze 1, który polega na tym, że mieszaninę racemiczną chlorowodoru kwasu 3-pirydylometylo(amino)fosfonowego poddaje się 1-dniowej reakcji biotransformacji z wykorzystaniem biokatalizatora w postaci hodowli szczepu *Rhodotorula mucilaginosa* (DSM 70403).

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

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

Korzystnie biokatalizator po hodowli inkubowany jest w warunkach deficytu substancji odżywczych przez 24 godziny.

Produkt biotransformacji w postaci optycznie czystego chlorowodoru kwasu (R)-3-pirydylometylo(amino)fosfonowego o wzorze 1 analizowany jest za pomocą ^{31}P NMR z dodatkiem α -cyklodekstryny w środowisku zasadowym, przy pH 11.

Zaletą sposobu według wynalazku jest to, że umożliwia uzyskanie czystego izomeru chlorowodoru kwasu (R)-3-pirydylometylo(amino)fosfonowego o wysokim nadmiarze enancjomerycznym (e.e. 100%).

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

P r z y k ł a d

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 objętości 1 L, dodaje się 20 g glukozy i sterylizuje w autoklawie.

Do tak przygotowanego medium dodaje się 1 mL inokulum *R. mucilaginosa*, przygotowanego poprzez zaszczenie z hodowli na podłożu stałym 100 mL podłoża ziemniaczanego (PDB) i inkubacji 5 dni na wytrząsarce rotacyjnej. Hodowlę prowadzi się 5 dni z ciągłym wytrząsaniem. Po tym czasie

hodowle odwirowuje się (20°C, 5000 rpm, 10 minut), a otrzymaną biomasę zawiesza się w 100 mL wody destylowanej i inkubuje 24 h 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 – chlorowodoru kwasu 3-pirydylo-metylo(amino)fosfonowego w postaci mieszaniny racemicznej. Po 24 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, jako chiralnego odczynnika solwatującego, w środowisku zasadowym (pD \approx 11).

Konfigurację otrzymanego produktu określa się na podstawie porównania skręcalności właściwej z danymi literaturowymi zawartymi w publikacji Kafarski P., Lejczak B., Szewczyk J. pt. „Optically active 1-aminoalkanephosphonic acids. Dibenzoyl-L-tartaric anhydride as an effective agent for the resolution of racemic diphenyl 1-aminoalkanephosphonates” 1983, Canadian Journal of Chemistry, 61: 2425–2430.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 2,8^\circ$ (c = 2,5; 1M NaOH)

Produkt otrzymany według przykładu posiada następujące dane spektralne:

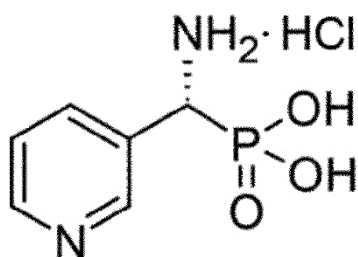
^{31}P NMR (D_2O , δ , ppm): 7.85

^1H NMR (D_2O , δ , ppm): 8.81(s, 1H, 2-py), 8.74(d, 1H, 6-py), 8.62 (d, 1H, 4-py), 8.06 (t, 1H, 5-py), 4.70 (d, 1H, CHP, J=16.3Hz)

Zastrzeżenia patentowe

1. Biokatalityczny sposób otrzymywania czystego izomeru chlorowodoru kwasu (R)-3-pirydylo-metylo(amino)fosfonowego o wzorze 1, **znamienny tym**, że mieszaninę racemiczną chlorowodoru kwasu 3-pirydylo-metylo(amino)fosfonowego poddaje się 1-dniowej reakcji biotransformacji z wykorzystaniem biokatalizatora w postaci wolnych komórek *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.
3. Biokatalityczny sposób według zastrz. 1 i 2, **znamienny tym**, że otrzymany w trakcie hodowli biokatalizator inkubowany jest 24 godziny w warunkach deficytu substancji odżywczych.

Rysunek



Wzór 1