

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **236999**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424504**

(22) Data zgłoszenia: **06.02.2018**

(51) Int.Cl.

C12P 41/00 (2006.01)

C12R 1/80 (2006.01)

(54)

**Biokatalityczny sposób otrzymywania czystego izomeru
kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

22.10.2018 BUP 22/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

08.03.2021 WUP 05/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

NATALIA DUNAL, Wołów, PL

MONIKA SERAFIN-LEWAŃCZUK, Wrocław, PL

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

MAGDALENA KLIMEK-OCHAB, Wrocław, PL

EWA ŻYMAŃCZYK-DUDA, Smolec, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 236999 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania chiralnego czystego kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego z wykorzystaniem metody biokatalitycznej. Otrzymany produkt w postaci kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego znajduje zastosowanie jako chiralny blok budulcowy do dalszych syntez struktur, w tym związków o potencjalnej aktywności biologicznej.

W publikacji Boduszka B. p.t. „The acidic cleavage of pyridylmethyl(amino)phosphonates. Formation of the corresponding amines” w *Tetrahedron* 1996, 52, 12483–12494 oraz w publikacji Boduszka B., p.t. „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 kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego w postaci mieszaniny racemicznej z wykorzystaniem metod chemicznych.

Z polskiego opisu patentowego nr PL179878 (B1) znany jest sposób wytwarzania dekstranazy, który polega na tym, że szczep grzyba strzępkowego *Penicillium funiculosum* 72 z rodziny *Moniliaceae* przeszczepia się na sterylne płynne podłoże hodowlane o składzie w procentach wagowych: 2% dekstranu o masie cząsteczkowej ponad 500000, 0,16% NaNO_3 , 0,075% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,375% KH_2PO_4 , 0,0075% $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,025% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0045% $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,0044% $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,000125% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ i woda do 100%, o wyjściowym $\text{pH}=4\text{--}4,6$, stosując $10^5 - 5 \times 10^5$ zarodników na 1 ml pożywki i prowadzi hodowlę wstrząsaną w temperaturze $29\text{--}31^\circ\text{C}$ w czasie 24–30 godzin przy amplitudzie drgań wstrząsarki $200\text{--}240 \text{ min}^{-1}$. Otrzymaną zawiesinę wykiełkowanych konidiów zaszczepia się płynne podłoże hodowlane o opisanym wyżej składzie jakościowym, ilościowym i wyjściowym pH , stosując 4–8% objętościowych zawiesiny młodej grzybni na 1 część objętościową podłoża i prowadzi hodowlę inokulum w temperaturze $29\text{--}31^\circ\text{C}$ w czasie 18–24 godzin przy amplitudzie drgań wstrząsarki $200\text{--}240 \text{ min}^{-1}$, następnie otrzymanym inokulum zaszczepia się produkcyjne płynne podłoże hodowlane o opisanym wyżej składzie jakościowym, ilościowym i wyjściowym pH , stosując 4-8% objętościowych inokulum na 1 część objętościową podłoża i prowadzi hodowlę produkcyjną w warunkach wgłębnych w temperaturze $29\text{--}31^\circ\text{C}$, w czasie 72–76 godzin, doprowadzając w czasie hodowli sterylne powietrze i mieszając zawartość fermentera, po czym ciecz pohodowlaną oddziela się od biomasy, zależa, odwirowuje i łączy z 86%-owym glicerolem w stosunku objętościowym 1:1.

Kwasy α -aminofosfonowe oraz ich pochodne są przedmiotem zainteresowania z uwagi na ich aktywność biologiczną, która polega na hamowaniu aktywności enzymów, działaniu antybakteryjnym, antynowotworowym, herbicydowym czy przeciwwirusowym. Związki fosforoorganiczne zawierające heteroatom zlokalizowany w pierścieniu znalazły zastosowanie m.in. w medycynie oraz stanowią bloki budulcowe w syntezie bardziej skomplikowanych struktur takich jak na przykład fosfonowe pseudopeptydy o właściwościach inhibitorów enzymów. Z uwagi na fakt, że aktywność biologiczna związku zależy od jego konfiguracji absolutnej, opracowanie procesów transformacji i syntezy optycznie czystych produktów jest niezwykle istotne.

Biokatalityczny sposób otrzymywania optycznie czystego kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego nie został dotychczas opisany w literaturze naukowej ani patentowej.

Istotą wynalazku jest biokatalityczny sposób otrzymywania czystego izomeru kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego o wzorze 1, który polega na tym, że mieszaninę racemiczną kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego poddaje się 5-dniowej reakcji biotransformacji z wykorzystaniem biokatalizatora w postaci hodowli szczepu *Penicillium funiculosum* w której pierwszym etapem jest oksydacyjna deaminacja racemicznej mieszaniny kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego do odpowiedniego ketofosfonianu o wzorze 2, który następnie zostaje zredukowany do kwasu hydroksyfosfonowego o wzorze 3, przy czym biokatalizator stanowi wypełnienie kolumny z ciągłą recyrkulacją medium reakcyjnego.

Korzystnie biokatalizator otrzymuje się w trakcie hodowli na podłożu ziemniaczanym (PDB) z równoczesną immobilizacją na piankach poliuretanowych.

Korzystnie optymalny czas hodowli *Penicillium funiculosum* to 4 dni w 22°C , na wytrząsarce rotacyjnej (140 rpm).

Korzystnie biokatalizator immobilizowany jest na piankach poliuretanowych o średnicy porów w zakresie $1000\text{--}1600 \mu\text{m}$.

Korzystnie produkt biotransformacji w postaci optycznie czystego kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego o wzorze 1 analizowany jest za pomocą ^{31}P NMR z dodatkiem α -cyklodekstryny w środowisku zasadowym.

Mechanizm sposobu według wynalazku opiera się na kaskadowej reakcji przedstawionej na schemacie reakcji, w której pierwszym etapem jest oksydacyjna deaminacja racemicznej mieszaniny substratu do odpowiedniego ketofosfonianu o wzorze 2, który następnie zostaje zredukowany do kwasu hydroksyfosfonowego o wzorze 3.

W mieszaninie reakcyjnej pozostaje nieprzereagowany izomer kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego oraz odpowiedni kwas hydroksyfosfonowy. Reakcje utleniania i redukcji z zastosowaniem biotransformacji całymi komórkami mikroorganizmów charakteryzują się wysoką enancjoselektywnością, łagodnymi warunkami reakcji oraz obecnością systemu regeneracji kofaktorów w komórce.

Zaletą sposobu według wynalazku jest to, że umożliwia uzyskanie czystego izomeru kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego o wysokim nadmiarze enancjomeryczny (ee 100%).

Sposób według wynalazku został przedstawiony za pomocą schematu oraz w przykładzie wykonania.

P r z y k ł a d

Hodowlę badanego szczepu *Penicillium funiculosum* prowadzi się z równoczesną immobilizacją biokatalizatora na piankach poliuretanowych Filtren TM 25133 o kształcie sześciątów o długości boku 1 cm i średnicy porów (1060–1600 μm). Pianki (20 sztuk) dodaje się do kolby Erlenmayer'a (250 mL) zawierającej 100 mL podłoża PDB i razem poddaje procesowi sterylizacji. Podłoże PDB przygotowuje się 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 i dodaje się 20 g glukozy i sterylizuje w autoklawie.

Do tak przygotowanego medium dodaje się 1 mL inokulum *P. funiculosum* (10^6 zarodników/mL), przygotowanego poprzez przemycie hodowli znajdującej się na stałym podłożu ziemniaczanym (PDA) 5 mL 0,1% roztworu Tween 20. Hodowlę *P. funiculosum* prowadzi się na wytrząsarce rotacyjnej 140 rpm w temperaturze 22°C w obecności pianek poliuretanowych. Proces wzrostu biokatalizatorów prowadzi się do osiągnięcia fazy wzrostu logarytmicznego, którą wyznaczono na podstawie krzywej wzrostu – w tym wypadku hodowlę inkubowano 96 h. Następnie zimmobilizowaną biomasę oddziela się poprzez filtrację na sączku karbowanym. Biomasa przemywa się wodą destylowaną.

Tak przygotowany biokatalizator wykorzystuje się do upakowania kolumny. Proces prowadzi się 5 dni z ciągłą recyrkulacją medium reakcyjnego, które stanowi 200 mL wody destylowanej oraz 500 mg substratu – kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego w postaci mieszaniny racemicznej.

Po zakończeniu procesu mycelium *P. funiculosum* immobilizowane na piankach poliuretanowych może być wykorzystane w drugim cyklu reakcyjnym z nowym medium stanowiącym 200 mL wody destylowanej i 500 mg badanego związku. Drugi cykl procesu prowadzi się 4 dni. Natomiast mieszanina reakcyjna jest odparowywana i analizowana 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 ($\text{pD} \approx 10$). Po biotransformacji otrzymano optycznie czysty izomer dla którego zmierzono skręcalność optyczną. Wartość $[\alpha]_{\text{D}}^{\text{D}} = -2^\circ$ (2M NaOH) pozwala stwierdzić, że otrzymany związek to enancjomer S- kwasu 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metanofosfonowego. Wniosek ten wysnuto na podstawie danych zawartych w publikacji Kafarski P., Lejczak B., Szewczyk J. p.t. „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), dostępnych dla kwasu 1-aminofenylometanofosfonowego (Phg^{P}), który jest analogiem badanego związku, co pokazuje, że ujemna wartość skręcalności optycznej odpowiada izomerowi S.

Produkt otrzymany według przykładu posiada następujące dane spektralne:

$[\alpha]_{\text{D}}^{\text{D}} = -2^\circ$ (2M NaOH)

Pomiar wykonano przy długości fali $\lambda = 578$ nm w temperaturze pokojowej. Tło do pomiarów stanowił 2M roztwór NaOH.

^{31}P NMR (D_2O , δ , ppm): 8.42

^1H NMR (D_2O , δ , ppm): 8.81(s, 1H, 2-py), 8.73(d, 1H, 6-py), 8.61 (d, 1H, 4-py), 8.04 (t, 1H, 5-py), 4.69 (d, 1H, CHP, $J = 16.3\text{Hz}$)

