

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242600 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **431764**

(22) Data zgłoszenia: **2019.11.12**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.05.17 BUP 10/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.03.20 WUP 12/2023**

(51) MKP:

C12P 7/22 (2006.01)

C12P 17/04 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Przyrodniczy
we Wrocławiu, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**JAKUB PANNEK, Krążkowy, PL
JOANNA GACH, Bystrzyca Kłodzka, PL
TERESA OLEJNICZAK, Wrocław, PL
FILIP BORATYŃSKI, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania (-)-izomeru-(S)-1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu

PL 242600 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania (-)-izomeru-(S)-1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym.

1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzen jest cennym substratem w syntezach biologicznie aktywnych związków (Fang L., Lyu Q., Synthesis of chiral dihydrobenzofuranes and phthalides by asymmetric transfer hydrogenation via dynamic kinetic resolution: strategy for total synthesis of daldinins A, B, and C and concentricolide. *Adv. Synth. Catal.* 2016, 28, 3196–3200).

Znana jest metoda otrzymywania racemicznego 1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu poprzez redukcję 3-n-propyloftalidu związkami wodorokrzemowymi w środowisku zasadowym (Liu B., Zhou X. Synthesis of 1,2-phenylenedimethanols by base-promoted reduction of isobenzofurana-1 (3H)-ones with silane. *Chines Chemical Letters* 2019, 30, 725–728).

Brak jest doniesień literaturowych o otrzymywaniu (-)-izomeru-(3S)-1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu metodami biotransformacji, poprzez enancjoselektywne utlenienie dioli bakteriami.

Istotą wynalazku jest to, że do podłoża składającego się z 1% peptonu, 0,2% kazeiny, 0,2% ekstraktu drożdżowego, 6% chlorku sodu i 2% glukozy, dodaje się inoculum hodowli *Gordonia bronchialis* PCM2167. Po upływie co najmniej 48 godzin dodaje się do hodowli racemiczny 1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksypentylo)benzen, o stężeniu nie większym niż 0,6 g/dm³. Następnie, po całkowitym przereagowaniu (+)-izomeru substratu, ekstrahuje się otrzymane produkty, po uprzednim zakwaszeniu kwasem solnym do pH nie wyższego niż 4, otrzymując (-)-izomer-(S)-1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu o wzorze 2 i lakton o wzorze 3.

Otrzymuje się (-)-izomer-(S)-1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu w wyniku enancjoselektywnego utlenienia (+)-izomeru diolu przy użyciu *Gordonia bronchialis* PCM2167.

Korzystnie jest, gdy dodaje się inoculum 2-dniowej hodowli bakterii.

Korzystnie także jest, gdy OD₆₀₀ wynosi od 0,6 do 0,7.

Korzystne również jest, gdy proces biotransformacji prowadzony jest w temperaturze 28°C i przepływie powietrza 1 v/m.

Zasadniczą zaletą sposobu, według wynalazku, jest to, że szczep *Gordonia bronchialis* PCM2167 hodowany na podłożu płynnym enancjoselektywnie utlenienia tylko (+)izomer diolu (wzór 1) do (+) – izomeru 3-n-propyloftalidu (wzór 3) pozostawiając nieprzereagowany (-)- izomer-(S)-1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu (wzór 2) z nadmiarem enancjomerycznym ee=85–96%.

Wynalazek jest bliżej określony na przykładzie wykonania.

Przykład: Enancjoselektywne utlenienie racemicznej mieszaniny 1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu przy użyciu *Gordonia bronchialis* PCM2167 na podłożu płynnym.

Hodowle *Gordonia bronchialis* PCM2167 były prowadzone w bioreaktorze (Brunswick, USA) w naczyniu o pojemności 7 L, zawierającym 3 L wysterylizowanego podłoża o składzie: 1% peptonu, 0,2%, kazeiny, 0,2% ekstraktu drożdżowego, 6% chlorku sodu i 2% glukozy, do którego dodaje się 10% objętościowych inoculum 2-dniowej hodowli *Gordonia bronchialis* PCM2167 o OD₆₀₀=0,6–0,7. Hodowlę prowadzi się w temperaturze 28°C, przy mieszaniu 600 rpm mieszadłem łopatkowym, przy przepływie powietrza 1 v/m. Do 2-dniowej hodowli dodaje się w stężeniu 0,5–0,6 g/dm³ racemiczny 1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzen o wzorze 1. Proces kontroluje się analizując go technikami chromatografii gazowej. Nadmiar enancjomeryczny wyznacza z analiz GC na kolumnie z wypełnieniem chiralnym Cyclosil-B i L-Val. Po całkowitym przereagowaniu (+)-izomeru substratu o wzorze 1 produkt o wzorze 2 ekstrahuje się octanem etylu po uprzednim zakwaszeniu 10% kwasem solnym do pH=4. Ekstrakt jest osuszany nad bezwodnym siarczanem magnezu. Po odparowaniu rozpuszczalnika surowy produkt poddaje się chromatografii na żelu krzemionkowym stosując eluent heksan : aceton w stosunku objętościowym 3:1 uzyskując 500.2 mg (-)-izomeru-(S)-1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu ee ([α]_D²³= -20,5 (c 1,5 CHCl₃) i 470 mg 3-n-propyloftalidu. Wydajność diolu po oczyszczeniu wynosi 32%.

Użyty substrat o wzorze 1 charakteryzuje się następującymi danymi spektroskopowymi: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 0,97 (t, 3, J = 10,6 Hz, CH₃-CH₂-), 1,31-1,42 (m, 1, jeden z CH₃-CH₂-), 1,48-1,58 (m, 1, jeden z CH₃-CH₂-), 1,74-1,83 (m, 1, jeden z -CH₂-CH(OH)-), 1,85-1,94 (m, 1, jeden z -CH₂-CH(OH)-), 2,56 (s, 2, OH), 4,69 (d, 1, J = 12,1 Hz, jeden z -CH₂-OH), 4,77 (d, 1, J = 12,1 Hz, jeden z CH₂-OH), 4,94 (dwa d, 1, J = 6,8 Hz, =²C-CH(OH)CH₂-), 7,26-7,29 (m, 1, =⁴CH-), 7,31-7,35 (m, 2, =³CH-, =⁶CH-), 7,40-7,44 (m, 1, =⁵CH-).

^{13}C NMR (151 MHz), δ (ppm): 14,16 (CH_3 -), 19,70 (CH_3 - CH_2 -), 39,36 ($-\text{CH}_2$ -), 63,94 ($-\text{CH}_2$ -OH), 71,58 ($=^2\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-$), 126,69 ($=^3\text{CH}-$), 127,95 ($=^6\text{CH}-$), 128,61 ($=^5\text{CH}-$), 129,94 ($=^4\text{CH}-$), 138,29 ($=^1\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}$), 142,75 ($=^2\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-$),

GC-EIMS 180 (M+1)

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektroskopowymi: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0,98 (t, 3, $J = 7,18$ Hz, CH_3 - CH_2 -), 1,40-1,60 (m, 2, CH_3 - CH_2 -), 1,70-1,78 (m, 1, jeden z $-\text{CH}_2$ - CH_2 - $^3\text{CH}-\text{O}-$), 1,96-2,02 (m, 1, jeden z $-\text{CH}_2$ - CH_2 - $^3\text{CH}-\text{O}-$), 5,48 (dd, 1, $J = 8,07$ Hz, $J = 4,02$ Hz, $-\text{CH}-\text{O}-$), 7,44 (d, 1, $J = 7,7$, $=^4\text{CH}-$), 7,52 (t, 1, $J = 7,5$ Hz, $=^6\text{CH}-$), 7,66 (t, 1, $J = 7,5$ Hz, $=^5\text{CH}-$), 7,89 (d, 1, $J = 7,7$ Hz, $=^7\text{CH}-$).

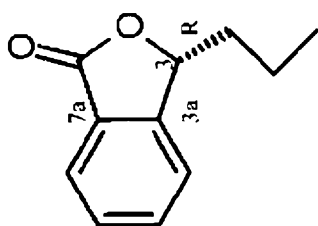
^{13}C NMR (151 MHz), δ (ppm): 13,95 (CH_3 -), 18,38 (CH_3 - CH_2 -), 36,96 ($-\text{CH}_2$ - $\text{CH}-\text{O}$), 81,39 1 ($-\text{CH}-\text{O}-$), 121,88 ($=^4\text{CH}-$), 125,85 ($=^7\text{CH}-$), 126,29 ($=^7\text{aC}-\text{C}(\text{O})-$), 129,15 ($=^6\text{CH}-$), 134,06 ($=^5\text{CH}-$), 150,28 ($=^3\text{aC}-\text{C}-\text{O}-$), 170,83 ($-\text{O}-^1\text{C}(\text{O})-\text{C}-$).

GC-EIMS 177 (M+1).

Zastrzeżenia patentowe

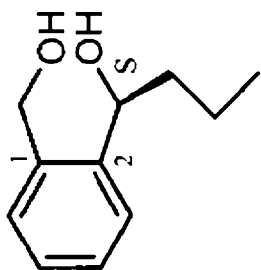
1. Sposób wytwarzania (-)-izomeru-(S)-1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu, **znamienny tym**, że do podłoża składającego się z 1% peptonu, 0,2% kazeiny, 0,2% ekstraktu drożdżowego, 6% chlorku sodu i 2% glukozy, dodaje się inoculum hodowli *Gordonia bronchialis* PCM2167, kolejno po upływie co najmniej 48 godzin, dodaje się racemiczny 1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzen o wzorze 1, o stężeniu nie większym niż 0,6 g/dm³, następnie po całkowitym przereagowaniu (+)-izomeru substratu, produkt ekstrahuje się, po uprzednim zakwaszeniu kwasem solnym do pH nie wyższego niż 4, otrzymując (-)-izomer-(S)-1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu o wzorze 2 i lakton o wzorze 3.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dodaje się inoculum 2-dniowej hodowli bakterii.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że OD₆₀₀ wynosi od 0,6 do 0,7.
4. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w temperaturze 28°C i przepływie powietrza 1 v/m.

Rysunek

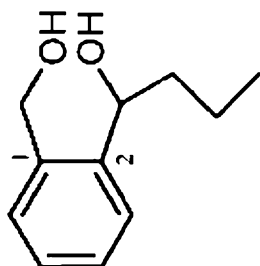


Wzór 3

+



Wzór 2



Wzór 1