

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244219 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437713**

(22) Data zgłoszenia: **2021.04.27**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.10.31 BUP 44/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.12.18 WUP 51/2023**

(51) MKP:

C12P 7/02 (2006.01)

C12P 17/04 (2006.01)

C12R 1/65 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

JOANNA GACH, Bystrzyca Kłodzka, PL

TERESA OLEJNICZAK, Wrocław, PL

PIOTR KRĘŻEL, Wrocław, PL

FILIP BORATYŃSKI, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania (-)-izomeru 3-hydroksy-3-butyloftalidu

PL 244219 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania (-)-izomeru 3-hydroksy-3-butyloftalidu o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do wytwarzania leku o działaniu neuroprotekcijnym.

Ftalidy są metabolitami wtórnymi roślin z rodziny selerowatych (León A., Del-Ángel M., Ávila J.L., Delgado G. Phthalides: Distribution in Nature, Chemical Reactivity, Synthesis, and Biological Activity. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 2017, 104, 127–246).

3-*n*-Butyloftalid wykazuje pozytywny wpływ na poprawę stanu pacjentów po udarze niedokrwionym mózgu (Jia J.; Wei C.; Liang J.; Zhou A.; Zuo X.; Song H.; Wu L.; Chen X.; Chen S.; Zhang J., Wu J., Wang K., Chu L., Peng D., Lv P., Guo H., Niu X., Chen Y., Dong W., Han X., Fang B., Peng M., Li D., Jia Q., Huang L. The Effects of DL-3-*n*-Butylphthalide in Patients with Vascular Cognitive Impairment without Dementia Caused by Subcortical Ischemic Small Vessel Disease: A Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Alzheimer's & Dementia*, 2016, 12, 89–99). Stwierdzono, że 3-*n*-butylidenoftalid ogranicza wzrost zmian nowotworowych (Kan W.L.T., Cho C.H.; Rudd, J.A.; Lin, G. Study of the Anti-Proliferative Effects and Synergy of Phthalides from *Angelica Sinensis* on Colon Cancer Cells. *Journal of Ethnopharmacology* 2008, 120, 36–43; Tsai N.M., Chen Y.L., Lee C.C., Lin P.C., Cheng Y.L. Chang W.L., Lin S.Z., Harn H.J. The natural compound *n*-butylidenephthalide derived from *Angelica sinensis* inhibits malignant brain tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurochem* 2006, 99, 1251–1262). Znana jest także aktywność przeciwdrobnoustrojowa ftalidów, między innymi przeciw dermatofitom oraz drożdżom z rodzaju *Candida* (Pannek J., Gach J., Boratyński F., Olejniczak T. Antimicrobial Activity of Extracts and Phthalides Occurring in Apiaceae Plants: Antimicrobial Activity of Phthalides. *Phytother. Res.* 2018, 32, 1459–1487).

Znana jest metoda mikrobiologicznego wytwarzania 3-hydroksy-3-butyloftalidu poprzez transformację 3-*n*-butyloftalidu z użyciem szczepu *Cunninghamella blakesleana* ATCC9244 (Diao X. i wsp. Metabolism and Pharmacokinetics of 3-*n*-Butylphthalide (NBP) in Humans: The Role of Cytochrome P450s and Alcohol Dehydrogenase in Biotransformation. *Drug Metab. Dispos.* 2013, 41, 430–444). Brak jest doniesień literaturowych o otrzymywaniu (-)-izomeru 3-hydroksy-3-butyloftalidu metodami biotransformacji poprzez hydratację 3-*n*-butylidenoftalidu w hodowlach płynnych.

Szczep *Absidia cylindrospora* AM 336 został wyizolowany z nawozu króliczego w marcu 1977 r. Charakteryzuje się obfitą popielatą watowatą grzybnią, nie barwi podłoża. Szczep jest corocznie przeszczepiany i hodowany na pożywce maltozowej o pH=5,6 w temp. 27°C. Tempo wzrostu 72 h. Po oznaczeniu jako *Absidia cylindrospora* AM 336 przechowywany jest w temp. 8°C w kolekcji Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, ul. C.K Norwida 25, 50-375 Wrocław.

Opisano jego zastosowanie do otrzymywania hydroksypochodnych halolaktonów (Mazur M. i wsp. Microbial Transformations of Halolactones with P-Menthane System. *J. Biosci. Bioeng.* 2015, 119, 1–5).

Istotą wynalazku jest sposób otrzymania (-)-izomeru 3-hydroksy-3-butyloftalidu polegający na tym, że do podłoża typowego dla wzrostu grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Absidia cylindrospora* AM 336. Po upływie co najmniej 5 dni, do hodowli dodaje się racemiczny 3-*n*-butylidenoftalid o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, przez co najmniej 10 dni. Kolejno mieszaninę zakwasza się kwasem solnym do pH nie wyższego niż 4,0, ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,3 mg : 1 mL.

Korzystnie jest, gdy proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.

Korzystnie gdy transformację prowadzi się przez 14 dni.

Korzystnie także gdy oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię w układzie faz odwróconych z eluentem acetonitryl 1% kwas mrówkowy w stosunku objętościowym 7 : 3.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania enzymów pochodzących z komórek szczepu *Absidia cylindrospora* AM 336, następuje addycja cząsteczki wody do wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym 3-*n*-butylidenoftalidu. Uzyskany w ten sposób (-)-izomer 3-hydroksy-3-butyloftalidu

wydzielany jest z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą (octan etylu). Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie (-)-izomeru 3-hydroksy-3-butyloftalidu, z wydajnością izolowaną na poziomie 29,2% w temperaturze pokojowej.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Przykład. Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 5 g peptonu i 15 g glukozy, wprowadza się szczep *Absidia cylindrospora* AM 336. Po 5 dniach jego wzrostu dodaje się 150 mg 3-*n*-butylidenoftalidu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ acetonu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 14 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną zakwasza się 10% kwasem solnym do pH=4.0, ekstrahuje się octanem etylu, zebraną warstwę górną osusza się nad bezwodnym siarczanem magnezu, a następnie odparowuje się rozpuszczalnik. Ekstrakt oczyszczany jest chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaniny acetonitrylu i 1% kwasu mrówkowego w stosunku objętościowym 7 : 3.

Na tej drodze otrzymuje się (-)-izomer 3-hydroksy-3-butyloftalidu z wydajnością izolowaną równą 29,2% ($[\alpha]^{25}_D = -2.4$ ($c = 1.0$, CHCl₃)).

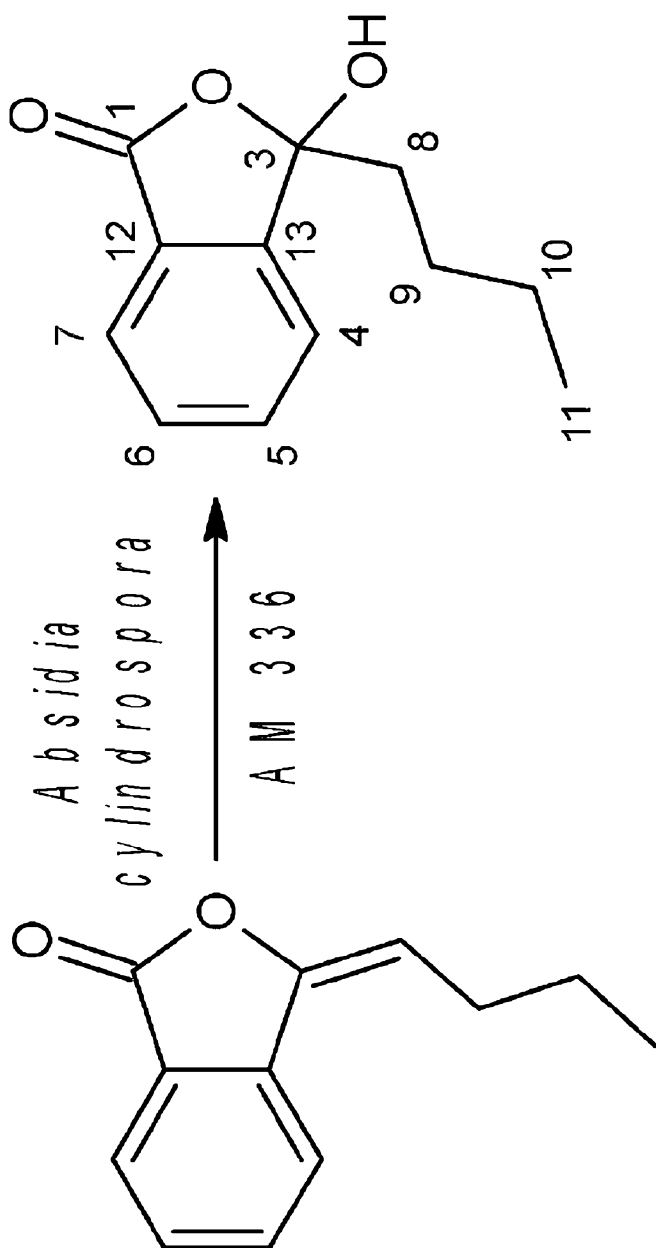
Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR: (400 MHz), δ (ppm), (CDCl₃): 0,86 (t, 3H, H-11, $J = 7,22$ Hz), 1,14 (m, 1H, jeden z H-9), 1,30 (m, 2H, H-10), 1,38 (m, 1H, jeden z H-9), 2,07 (ddd, 1H, jeden z H-8, $J = 14,0, 11,8, 4,5$ Hz), 2,20 (m, 1H, jeden z H-8) 7,56 (m, 2H, H-4, H-6), 7,70 (t, 1H, H-5, $J = 7,48$ Hz), 7,81 (d, 1H, H-7, $J = 7,52$ Hz).
¹³C NMR (101 MHz), δ (ppm), (CDCl₃): 13,9 (C-11), 22,6 (C-10), 25,5 (C-9), 38,7 (C-8), 107,9 (C-3), 122,4 (C-4), 125,6 (C-7), 126,9 (C-12), 130,7 (C-6), 134,8 (C-5), 149,0 (C-13), 168,9 (C-1).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania (-)-izomeru 3-hydroksy-3-butyloftalidu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla wzrostu grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Absidia cylindrospora* AM 336, następnie po upływie co najmniej 5 dni do hodowli wprowadza się substrat, którym jest racemiczny 3-*n*-butylidenoftalid o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszącym się z wodą, transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, przez co najmniej 10 dni, mieszaninę zakwasza się kwasem solnym do pH nie wyższego niż 4.0, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,3 mg : 1 mL.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 14 dni.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkownikową chromatografię w układzie faz odwróconych z eluentem acetonitryl : 1% kwas mrówkowy w stosunku objętościowym 7 : 3.

Rysunek



W z ó r 2

W z ó r 1