

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 242414 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **431763**

(22) Data zgłoszenia: **2019.11.12**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.02.20 WUP 08/2023**

(51) MKP:

**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-(3R)-3-n-propyloftalidu**

**PL 242414 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania (+)-izomeru-(3R)-3-n-propyloftalidu o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym.

(+)-Izomer-(3R)-3-n-propyloftalidu jest bicyklicznym laktonem, o właściwościach przeciwbakteryjnych, grzybobójczych, przeciwzapalnych, czy też antyoksydacyjnych (Leon A., Del-Angel M., Avila J. L., Delgado G., Phthalides: distribution in nature, chemical reactivity, synthesis, and biological activity. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 2017, 104, 127–245).

Znane są metody otrzymywania racemicznego 3-n-propyloftalidu z bezwodnika ftalidowego poprzez syntezę ze związkami metaloorganicznymi (Karmakar R., Pahari P., Mal D. Phthalides and phthalans: synthetic methodologies and their applications in the total synthesis. *Chemical Reviews* 2014, 114, 6213–6284).

Brak jest doniesień literaturowych o otrzymywaniu (+) enancjomeru metodami biotransformacji, poprzez enancjoselektywne utlenienie diolu bakteriami w hodowlach płynnych lub stałych.

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 *Rhodococcus ruber* PCM2166. Po upływie co najmniej 48 godzin dodaje się do hodowli racemiczny 1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzen, o stężeniu nie większym niż 0,6 g/dm<sup>3</sup>. Następnie, po całkowitym przereagowaniu substratu, ekstrahuje się otrzymany produkt, po uprzednim zakwaszeniu kwasem solnym do pH nie wyższego niż 4, otrzymując (+)-izomer-(3R)-3-n-propyloftalidu o wzorze 2.

Otrzymuje się (+)-izomer-(3R)-3-n-propyloftalidu w wyniku enancjoselektywnego utlenienia diolu przy użyciu *Rhodococcus ruber* PCM2166.

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

Korzystnie także jest, gdy OD<sub>600</sub> 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 *Rhodococcus ruber* PCM2166 hodowany na podłożu płynnym enancjoselektywnie utlenienia izomery optyczne diolu (wzór 1) do (+) – izomeru 3-n-propyloftalidu ze stopniem przereagowania 95% i nadmiarem enancjomerycznym ee=85–96% wykorzystując dwa różne mechanizmy utlenienia.

Wynalazek jest bliżej określony na przykładzie wykonania.

Przykład: Enancjoselektywne utlenienie przy użyciu *Rhodococcus ruber* PCM2166 na podłożu płynnym.

Hodowle *Rhodococcus ruber* PCM2166 były prowadzone w bioreaktorze (Brunswick, USA) w naczyniu o pojemności 3 L, zawierającym 0,9 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 *Rhodococcus ruber* PCM2166 o OD<sub>600</sub>=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 g/dm<sup>3</sup> racemicznego 1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzenu 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 substratu produkt 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 606,2 mg (+)-enancjomeru o nadmiarze enancjomerycznym ee=90% ( $[\alpha]^{23}_D = +46,1$  (c 1,0 CHCl<sub>3</sub>). Wydajność po oczyszczeniu 62%.

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

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz),  $\delta$  (ppm): 14,16 ( $\text{CH}_3$ -), 19,70 ( $\text{CH}_3$ - $\text{CH}_2$ -), 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:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0,98 (t, 3,  $J = 7,18$  Hz,  $\text{CH}_3$ - $\text{CH}_2$ -), 1,40-1,60 (m, 2,  $\text{CH}_3$ - $\text{CH}_2$ -), 1,70-1,78 (m, 1, jeden z  $-\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $^3\text{CH}-\text{O}-$ ), 1,96-2,02 (m, 1, jeden z  $-\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $^3\text{CH}-\text{O}-$ ), 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,  $=^7\text{CH}-$ ).

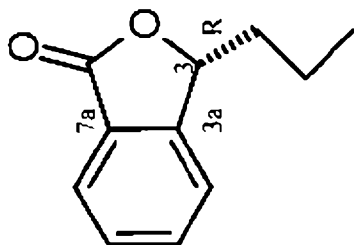
$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz),  $\delta$  (ppm): 13,95 ( $\text{CH}_3$ -), 18,38 ( $\text{CH}_3$ - $\text{CH}_2$ -), 36,96 ( $-\text{CH}_2$ - $\text{CH}-\text{O}$ ), 81,39 1 ( $-\text{CH}-\text{O}-$ ), 121,88 ( $=^4\text{CH}-$ ), 125,85 ( $=^7\text{CH}-$ ), 126,29 ( $=^7\text{aC}-\text{C}(\text{O})-$ ), 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

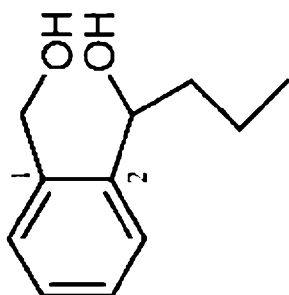
1. Sposób wytwarzania (+)-izomeru-(3R)-3-n-propyloftalidu, **znamienny tym**, że do podłoża składającego się z 1% peptonu, 0,2% kazeiny, 0,2% ekstraktu drożdżowego, 6% chlorku sodu i 2% glukozy, dodaje się inoculum hodowli *Rhodococcus ruber* PCM2166, kolejno po upływie co najmniej 48 godzin, dodaje się racemiczny 1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksybutylo)benzen o wzorze 1, o stężeniu nie większym niż 0,6 g/dm<sup>3</sup>, następnie po całkowitym przereagowaniu substratu, produkt ekstrahuje się, po uprzednim zakwaszeniu kwasem solnym do pH nie wyższego niż 4, otrzymując (+)-izomer-(3R)-3-n-propyloftalidu o wzorze 2.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dodaje się inoculum 2-dniowej hodowli bakterii.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że OD<sub>600</sub> 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 2

*Rhodococcus ruber* PCM2166



Wzór 1