

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 438720 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **438720**(22) Data zgłoszenia: **2021.08.10**(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.02.13 BUP 07/2023**

(51) MKP:

C12P 17/04 (2006.01)**C07D 307/83** (2006.01)**C12R 1/65** (2006.01)

(71) Zgłaszający:

**UNIwersytet PRZYRODniczy
WE WROCLAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y):

**MARCELINA MAZUR, Wrocław, PL
ALEKSANDRA PAWLAK, Poznań, PL
WITOLD GŁADKOWSKI, Wrocław, PL
KAROLINA PRZYSIĘŻNA,
Małomice Bobrzany, PL
BOŻENA OBMIŃSKA-MRUKOWICZ, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób otrzymywania 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu

(57) Skróty opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest sposób otrzymywania optycznie czynnego 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu polega na tym, że 1-(1'-chloroetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on o wzorze 1 poddaje się mikrobiologicznym przekształceniom w kulturze szczepu *Absidia glauca* AM177 otrzymując 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on o wzorze 2, który następnie oczyszcza się metodą chromatografii kolumnowej. 1-(1'-Hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on o wzorze 2 może znaleźć zastosowanie w farmacji jako związek o działaniu antynowotworowym.



Sposób otrzymywania 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu o wzorze 2 na drodze biotransformacji.

1-(1'-Hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on wykazuje aktywność antyproliferacyjną *in vitro* wobec linii nowotworowej (CL-1) oraz nie jest cytotoksyczny względem linii komórek prawidłowych RAW 264.7 i 3T3. Wynalazek może znaleźć zastosowanie w farmacji jako składniki leków antynowotworowych.

1-(1'-Chloroetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on znany jest w literaturze (M. Mazur, A. Włoch, F. Bahri, H. Pruchnik, A. Pawlak, B. Obmińska-Mrukowicz, G. Maciejewska, W. Gładkowski, Chemoenzymatic Synthesis of Enantiomeric, Bicyclic δ -Halo- γ -lactones with a Cyclohexane Ring, Their Biological Activity and Interaction with Biological Membranes, *Biomolecules*, 2020, 10(1), 95, doi:10.3390/biom10010095.).

Znany jest szczep *Absidia glauca* AM177, zdeponowany w kolekcji Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (...). Z publikacji Barmańskiej i innych (Transformation of isoxanthohumol by fungi, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61 (2009) 221–224) znana jest biotransformacja izoksantohumolu do glukozydu, przy udziale systemu enzymatycznego *Absidia glauca* AM177. Podobnie Sordon i inni (Regioselective O-glycosylation of flavonoids by fungi *Beauveria bassiana*, *Absidia coerulea* and *Absidia glauca*, *Bioorganic Chemistry* 93 (2019) 1027502) ujawniają właściwości tego szczepu w procesie O-glikozylacji flawonoidów. Także hydroksylacja laktonów przy udziale *Absidia glauca* AM177 znana jest z publikacji Grudniewskiej i innych (Lactones 41. synthesis and microbial hydroxylation of

unsaturated terpenoid lactones with p-menthane ring systems, *Molecules* 2013, 18, 2778-2787; doi:10.3390/molecules18032778).

Nie jest znany sposób wytwarzania 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu o wzorze 2, na drodze mikrobiologicznych przekształceń 1-(1'-chloroetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu o wzorze 1.

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Absidia glauca* AM177. Po upływie co najmniej 48h wprowadza się substrat, którym jest 1-(1'-chloroetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 37 °C, przy ciągłym mieszaniu, przynajmniej przez 48h. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikami organicznymi nie mieszającymi się z wodą i oczyszcza znanymi metodami chromatograficznymi.

Korzystne jest, gdy reakcję prowadzi się w podłożu w skład którego wchodzi 1% aminobaku i 3% glukozy

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

Korzystne jest również, gdy reakcję prowadzi się przez 9 dni.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on, z wydajnością izolowaną 12% wykazującego aktywność antyproliferacyjną in vitro.

Wynalazek jest bliżej objaśniony w przykładzie wykonania.

Do kolb Erlenmayer'a o pojemności 300 ml, zawierającej 50 ml płynnego podłoża w skład którego wchodzi aminobak 1% i glukoza 3% wprowadza się szczep *Absidia glauca* AM177. Po 72h jego wzrostu dodaje się 10 mg 1-(1'-chloroetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu o wzorze 1 rozpuszczonego w 1 ml acetonu. Transformację prowadzi się przez okres 9 dni. Następnie mieszaninę reakcyjną ekstrahuje się trzykrotnie chloroformem, osusza bezwodnym siarczanem

magnezu oraz odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymane ekstrakty oczyszcza się chromatograficznie stosując jako eluentu mieszaniny heksan i aceton 20:1.

Dane fizyczne i spektroskopowe otrzymanego 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu o wzorze 2 są następujące: $t_t = 76-77^\circ\text{C}$; **$^1\text{H NMR}$** (600MHz, CDCl_3) δ : 1.30 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, CH_3 -11), 1.31 (m, 1H, jeden z CH_2 -5), 1.39 (m, 1H, jeden z CH_2 -4), 1.48 (ddd, 1H, $J = 13.6, 4.9, 1.2$ Hz, jeden z CH_2 -2), 1.52-1.69 (m, 4H, jeden z CH_2 -4, jeden z CH_2 -2, CH_2 -3), 1.8 (s, 1H, OH), 1.93 (tt, 1H, $J = 13.8, 4.4$ Hz, jeden z CH_2 -5), 2.08 (m, 1H, H-6), 2.63 (dd, 1H, $J = 19.7, 10.5$ Hz, jeden z CH_2 -7), 2.67 (dd, 1H, $J = 19.7, 9.0$ Hz, jeden z CH_2 -7), 4.21 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-10). **$^{13}\text{C NMR}$** (600MHz, CDCl_3) δ : 13.9 (C-11), 19.1 (C-4), 20.1 (C-3), 24.3 (C-2), 25.1 (C-5), 32.4 (C-7), 37.6 (C-6), 69.2 (C-1), 82.2 (C-10), 171.2 (C-8). **IR** (KBr, cm^{-1}): 3420 (s), 2936 (m), 1147 (m), 1717 (s), 1246 (m).

W celu określenia aktywności związku będącego przedmiotem wynalazku, zbadano jego aktywność antyproliferacyjną in vitro wobec linii nowotworowej CL-1 oraz linii komórek prawidłowych RAW 264.7 i 3T3. Tabela 1 przedstawia wyniki testów biologicznych in vitro dla otrzymanego laktonu w stosunku do wybranych linii komórkowych. Testy przeprowadzono według metody opisanej w literaturze (Ferrari M., Fornasiero M. C., Isetta A.M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. Journal of Immunological Methods, 1990, 131, 165-172).

Tabela 1

hydroksylakton (Wzór 2)	IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{mL}$] \pm SD		
	Linia RAW 264.7	3T3	CL-1
	>100	>100	78,55 \pm 3,95

IC_{50} – stężenie związku, które hamuje aktywność metaboliczną 50% komórek

SD – odchylenie standardowe

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu **znamienny tym że**, do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Absidia glauca* AM177, kolejno po upływie co najmniej 48h wprowadza się substrat, którym jest 1-(1'-chloroetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, przy czym transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 37 °C, przy ciągłym mieszaniu, co najmniej przez 48h, po czym produkt jakim jest 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on o wzorze 2, ekstrahuje się rozpuszczalnikami organicznymi nie mieszającymi się z wodą i oczyszcza znanymi metodami chromatograficznymi.
2. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w podłożu w skład którego wchodzi 1% aminobaku i 3% glukozy.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się przez 9 dni.





SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.438720

Klasyfikacja zgłoszenia: C12P17/04 (2006.01), C07D307/83 (2006.01), C12R1/65 (2006.01)

Poszukiwania prowadzone w klasach: C12P, C07D

Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: EPODOC, WPI, BAZY DANYCH UPRP, STN: REGISTRY, CAPLUS, REAXYSFILEBib, REAXYSFILESub

Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	PL211934 B1 (UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU) 2012-07-31	1-4
A	PL211838 B1 (UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU) 2012-07-31	1-4
A	PL211840 B1 (UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU) 2012-07-31	1-4

Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie

A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie,
E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia,
L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu,
O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób,
P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa,
T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku,
X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie,
Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy,
& – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.

Sprawozdanie wykonał/-a:

Data:

Podpis:

Agnieszka Ucińska
Ekspert

07.04.2022

/podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń patentowych z 10.08.2021 r.