

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246751 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **443917**

(22) Data zgłoszenia: **2023.02.28**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.09.02 BUP 36/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.03.03 WUP 09/2025**

(51) MKP:

C07J 63/00 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

-
- (73) Uprawniony z patentu:
**UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW
ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**
- (72) Twórca(-y) wynalazku:
**EWA GRELA, Wrocław, PL
AGATA KOZIOŁ, Wrocław, PL**
- (74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Rożkowicz, Wrocław, PL
-

(54) Tytuł:

Estrowa pochodna betulinowa, sposób jej wytwarzania oraz zastosowanie w przemyśle kosmetycznym jako środka antybakteryjnego

PL 246751 B1

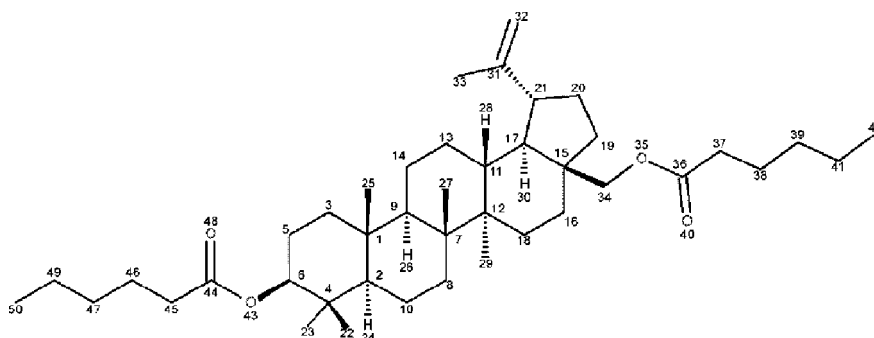
Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowa pochodna betulinowa oraz sposób wytwarzania nowej pochodnej 3 β ,28-dikaproilo-lup-20(29)-en i jej zastosowanie jako środka kosmetycznego.

Ze stanu techniki (PL 218 589 B1) znane są nowe mono- i diestry betuliny z aminokwasami potencjalnie przeznaczone do zastosowań medycznych oraz sposób wytwarzania tych związków. Dokument ujawnia sposób wytwarzania mono- oraz diestrów betuliny z aminokwasami o wzorze ogólnym 1, polegający na tym, że równoważnik molowy betuliny poddaje się reakcji z 1–4 równoważnikami molowymi aminokwasu z zablokowaną grupą aminową (Boc) i wolną grupą karboksylową, korzystnie wybranego z grupy obejmującej takie aminokwasy jak glicyna, alanina, fenyloalanina, leucyna, metionina lub lizyna oraz 1–4 równoważnikami molowymi odczynnika sprzęgającego w postaci 1,1'-karbonylodiimidazolu (CDI). Reakcję prowadzi się korzystnie przez 24–48 godzin w temperaturze wrzenia w rozpuszczalniku, w postaci bezwodnego tetrahydrofuranu (THF). Korzystnie utrzymuje się przy tym całkowitą ilość rozpuszczalnika w granicach od 2 do 5 ml na 0,25 mM betulinowego substratu.

Dokument PL 216 420 B1 ujawnia sposób otrzymywania nowych diestrów betuliny ze sprzężonymi kwasami linolowymi, o wzorze ogólnym przedstawionym na rysunku w opisie, gdzie R oznacza resztę kwasu (9c, 11t)-oktadekadienowego albo resztę kwasu (10t, 12c)-oktadekadienowego polegający na tym, że mieszaninę sprzężonych kwasów linolowych poddaje się estryfikacji z betuliną za pomocą czynnika sprzęgającego w obecności 4-dimetylamino-pirydyny w chlorku metylenu.

Przedmiotem wynalazku jest estrowa pochodna betulinowa 3 β ,28-dikaproilo-lup-20(29)-en o wzorze 1.



wzór 1

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania nowej pochodnej betulinowej 3 β ,28-dikaproilo-lup-20(29)-enu o wzorze 1, w którym betulinę poddaje się reakcji z użyciem chlorku kwasu kapronowego jako reagenta i bezwodnej pirydyny, chlorku metylenu jako środowiska reakcji, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej.

Korzystnie, po zakończeniu procesu odparowuje się rozpuszczalniki.

Korzystnie, przebieg reakcji kontroluje się przy wykorzystaniu chromatografii cienkowarstwowej.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie pochodnej betuliny 3 β ,28-dikaproilo-lup-20(29)-enu w przemyśle kosmetycznym jako środka antybakteryjnego.

Przykład 1

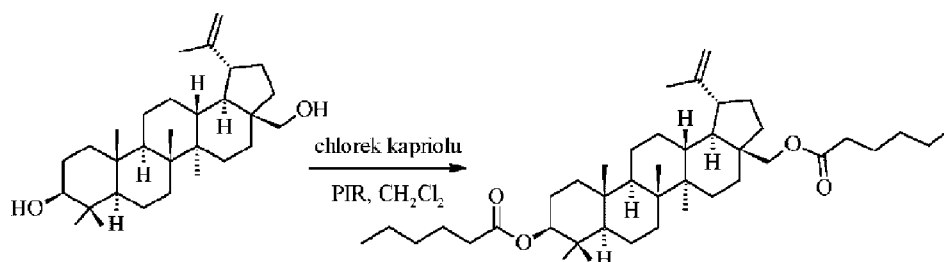
W kolbie Erlenmeyera ze szlifem umieszczono 0,5 g (1,13 mmol) betuliny, którą rozpuszczano w 3 ml bezwodnej pirydyny i 20 ml chlorku metylenu, i dodano 2 ml (15,19 mmol) chlorku kwasu kapronowego. Powstałą mieszaninę zatkało korkiem szklanym i pozostawiono na 24 h. Już po chwili bezbarwny roztwór zmienił zabarwienie na żółty, następnie pomarańczowy i dalej czerwony. Po 5 dobach nastąpiło praktycznie całkowite przereagowanie, co stwierdzono za pomocą TLC. Do kolby z roztworem dodano około 20 ml chlorku metylenu, 10 ml MeOH i 0,1 g węgla aktywnego. Po intensywnym zamieszaniu, zawartość kolby przesączono przez zwitek waty z żelazem krzemionkowym. Bezbarwny roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem (obrotowa wyparka próżniowa) na wrzącej łaźni wodnej.

Pozostałość rozpuszczono w cykloheksanie i naniesiono na kolumnę wypełnioną 20 tlenku glinu (typ 504 C, Fluka) i 3 Florsilu (Fluka). Kolumnę przemyto cykloheksanem (50 ml) i eluowano związek mieszaniną heksan–octan etylu 20 : 1. Po połączeniu odpowiednich frakcji (na podstawie TLC) i odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano czysty związek.

Wydajność syntezy wynosi 95% (po oczyszczeniu ok. 78%). Czystość po syntezie jest około 64%, do badań biologicznych pochodną należy oczyścić na kolumnie wypełnionej 20 tlenku glinu (typ 504 C, Fluka) i 3 Florsilu (Fluka).

W syntezie z wykorzystaniem bezwodnika propionowego otrzymuje się produkt o wydajność 83% (po oczyszczaniu ok. 46%). Otrzymany osad, który odsączono na lejku Büchnera, przemyto obficie wodą i kilkakrotnie przekrystalizowano z mieszaniny metanol–chlorek metylenu 4 : 1.

SCHEMAT REAKCJI



Produkt otrzymany powyższym sposobem posiada następujące właściwości fizyczne i spektralne:

Wzór sumaryczny: $C_{42}H_{70}O_4$

Masa molowa: 639,00

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm) 4.46 (dd, 1H, $J = 10.22$; $J = 5.64$; przy C-3); 2.44 (td, 1H, $J = 10.76$; $J = 5.83$; przy C-19); 3.82 i 4.25 (d, 1H, $J = 11.28$; przy C-28); 4.58 i 4.68 (m, 1H; przy C-29); 1.68 (s, 3H, przy C-30);

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm) 174.59; 173.84; 150.18; 109.86; 80.54; 62.49; 55.34; 50.23; 48.74; 47.71; 46.37; 42.65; 40.83; 38.32; 37.81; 37.52; 37.04; 34.81; 34.57; 34.48; 34.08; 31.35; 31.33; 29.76; 29.54; 27.94; 27.00; 25.11; 24.84; 24.75; 23.71; 22.33; 20.77; 19.10; 18.14; 16.56; 16.15; 16.01; 14.72; 13.9.

Przykład 2 Aktywność pochodnej betuliny

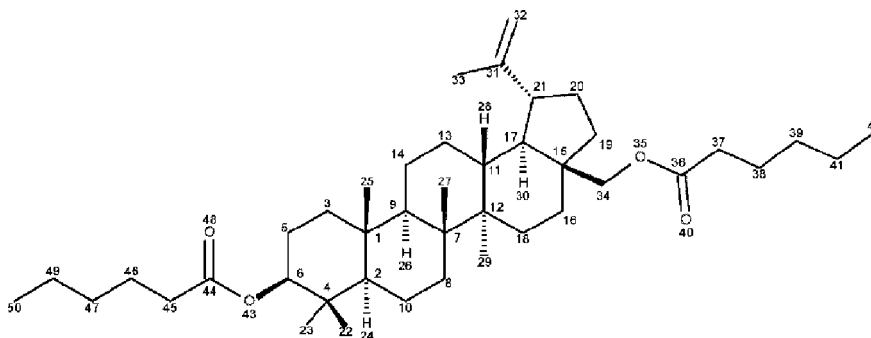
Dla powyższej pochodnej betuliny została wyznaczona wartość Minimalnego Stężenia Hamującego (MIC). Szczep gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* ATCC11632 został zakupiony z kolekcji Polskiej Akademii Nauk (Wrocław, Polska). Odczynniki chemiczne pochodziły z Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA), a podłoża mikrobiologiczne z firmy Biocorp, Polska. Szczepy bakteryjne były przechowywane na skosach z agarem odżywczym i w celu przeprowadzania oznaczeń przesiewane na zestalone podłoże Muellera-Hintona. 24-godzinne hodowle bakteryjne były zawieszane w bulionie Muellera-Hintona, a gęstość zawiesiny dostosowywana do standardu McFarlanda 0,5. Inkubacje prowadzono w minimum 3 powtórzeniach z zastosowaniem odrębnych hodowli bakteryjnych na mikroplatkach (TPP, Szwajcaria). Wyjściowa gęstość zawiesiny bakteryjnej wynosiła 10^5 jtk/mL. Płytki inkubowano przez noc w temperaturze $37^\circ C$ na wyrząsarce obrotowej ELMi DTS-4 SkyLine. Wyniki odczytywano przy długości fali 650 nm z zastosowaniem czytnika mikroplatek Tecan z oprogramowaniem Magellan. MIC był zdefiniowany jako najniższe stężenie badanego związku, całkowicie hamujące wzrost szczepu bakteryjnego.

Przeprowadzone przez nas badania pozwoliły na wykazanie aktywności antybakteryjnej badanej pochodnej betuliny względem szczepu gronkowca złocistego (patogen skóry), zalecanego przez PAN do tego typu oznaczeń mikrobiologicznych. Już dodatek 50 $\mu g/mL$ badanej pochodnej do próby inkubacyjnej pozwalał na obserwowalne zahamowanie wzrostu szczepu (do 25%), a jego stężenie wynoszące 125 $\mu g/mL$ ograniczało wzrost o połowę względem próby kontrolnej. Wartość MIC pochodnej w powyższych warunkach inkubacyjnych wynosiła 250 $\mu g/mL$. Jest to znaczący wzrost aktywności w stosunku do substancji wyjściowej – betuliny, która nie posiadała aktywności antybakteryjnej w tych warunkach inkubacyjnych.

Produkty zawierające betulinę, kwas betulinowy lub ogólnie ujęty „ekstrakt z kory brzozej” są obecnie powszechne w przemyśle kosmetycznym ze względu na wykazywane właściwości antyseptyczne i wspomagające regenerację tkanek. Charakterystyka antybakteryjna opisywanej pochodnej betuliny wskazuje również na potencjalne korzyści jej zastosowania – efektywność antybakteryjna względem gronkowca złocistego pozwoli na organicznie zmian patogennych skóry powodowanych przez tę bakterię. Ponadto dzięki aktywności bakteriostatycznej pochodna będzie mogła pełnić funkcję konserwantu, ograniczając wzrost szczepów bakteryjnych, w niepożądany sposób nanoszonych do stosowanych kosmetyków.

Zastrzeżenia patentowe

1. Estrowa pochodna betulinowa 3 β ,28-dikaproilo-lup-20(29)-en o wzorze 1.



wzór 1

2. Sposób wytwarzania nowej pochodnej betulinowej 3 β ,28-dikaproilo-lup-20(29)-enu **znamienny tym**, że betulinę poddaje się reakcji z użyciem chlorku kwasu kapronowego jako reagenta i bezwodnej pirydyny, chlorku metylenu jako środowiska reakcji, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej.
3. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że po zakończeniu procesu odparowuje się rozpuszczalniki.
4. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że przebieg reakcji kontroluje się przy wykorzystaniu chromatografii cienkowarstwowej.
5. Zastosowanie pochodnej betuliny 3 β ,28-dikaproilo-lup-20(29)-enu w przemyśle kosmetycznym jako środka antybakteryjnego.