

(12) **Opis zgłoszeniowy wynalazku**
(z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **438721**

(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) Skróć opis:

Przedmiotem zgłoszenia jest sposób otrzymywania optycznie czynnego 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu, który polega na tym że 1-(1'-jodoetylo)-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.



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'-Jodoetylo)-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'-jodoetylo)-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'-jodoetylo)-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 11 dni.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on, z wydajnością izolowaną 10% 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'-jodoetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu o wzorze 1 rozpuszczonego w 1 ml acetonu. Transformację prowadzi się przez okres 11 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 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, CH₃-11), 1.31 (m, 1H, jeden z CH₂-5), 1.39 (m, 1H, jeden z CH₂-4), 1.48 (ddd, 1H, $J = 13.6, 4.9, 1.2$ Hz, jeden z CH₂-2), 1,52-1,69 (m, 4H, jeden z CH₂-4, jeden z CH₂-2, CH₂-3), 1.8 (s, 1H, OH), 1,93 (tt, 1H, $J = 13.8, 4.4$ Hz, jeden z CH₂-5), 2.08 (m, 1H, H-6), 2.63 (dd, 1H, $J = 19.7, 10.5$ Hz, jeden z CH₂-7), 2.67 (dd, 1H, $J = 19.7, 9.0$ Hz, jeden z CH₂-7), 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

IC₅₀ – 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'-jodoetylo)-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 11 dni.





SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.438721

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	PL219988 B1 (UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU) 2015-08-31	1-4
A	PL221651 B1 (UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU) 2016-05-31	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.