

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243851 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438721**

(22) Data zgłoszenia: **2021.08.10**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.02.13 BUP 07/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.10.23 WUP 43/2023**

(51) MKP:

C12P 17/04 (2006.01)

C07D 307/83 (2006.01)

C12R 1/65 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

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

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

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

PL 243851 B1

Opis wynalazku

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 Bartmańskiej 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 48 h 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 48 h. 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 72 h 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: $t_f = 76-77^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (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 [µg/mL] ± SD		
	Linia RAW 264.7	3T3	CL-1
	>100	>100	78,55 ± 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 48 h 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 48 h, 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.

Rysunek

