

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243850 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438720**

(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 243850 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'-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 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'-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 48 h 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 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 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 72 h 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: $t_f = 76-77^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (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'-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 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 9 dni.

Rysunek

