

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

(21) Numer zgłoszenia: **438719**

(22) Data zgłoszenia: **2021.08.10**

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

(51) MKP:

**C07D 307/83** (2006.01)

**C12P 17/04** (2006.01)

**C12R 1/65** (2006.01)

(71) Zgłaszający:  
**UNIwersytet przyrodniczy  
we Wrocławiu, Wrocław, PL**

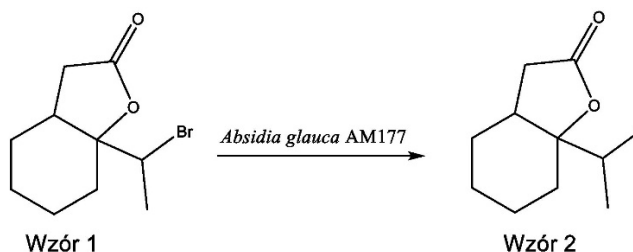
(72) Twórca(-y):  
**MARCELINA MAZUR, Wrocław, PL**  
**ALEKSANDRA PAWLAK, Poznań, PL**  
**WITOLD GŁADKOWSKI, Wrocław, PL**  
**KAROLINA PRZYSIĘŻNA,  
Małomice Bobrzany, PL**  
**BOŻENA OBMIŃSKA-MRUKOWICZ, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:  
**Anna Kasperowicz, Wrocław, PL**

(54) Tytuł:  
**1-(1'-Hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on oraz sposób otrzymywania 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu**

(57) Skróć opisu:

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'-bromoetylo)-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.



1-(1'-Hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on oraz sposób otrzymywania 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu

Przedmiotem wynalazku jest 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest także jest sposób jego otrzymywania 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'-Bromoetylo)-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  $\delta$ -Halo- $\gamma$ -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 natomiast 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on.

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania na drodze mikrobiologicznych przekształceń 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on o wzorze 2 z 1-(1'-bromoetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu o wzorze 1.

Istotą wynalazku jest 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on.

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'-bromoetylo)-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 12 dni.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on, z wydajnością izolowaną 24% 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'-bromoetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu o wzorze 1 rozpuszczonego w 1 ml acetonu. Transformację prowadzi się przez okres 12 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,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.30 (d, 3H,  $J = 6.5$  Hz, CH<sub>3</sub>-11), 1.31 (m, 1H, jeden z CH<sub>2</sub>-5), 1.39 (m, 1H, jeden z CH<sub>2</sub>-4), 1.48 (ddd, 1H,  $J = 13.6, 4.9, 1.2$  Hz, jeden z CH<sub>2</sub>-2), 1.52-1.69 (m, 4H, jeden z CH<sub>2</sub>-4, jeden z CH<sub>2</sub>-2, CH<sub>2</sub>-3), 1.8 (s, 1H, OH), 1.93 (tt, 1H,  $J = 13.8, 4.4$  Hz, jeden z CH<sub>2</sub>-5), 2.08 (m, 1H, H-6), 2.63 (dd, 1H,  $J = 19.7, 10.5$  Hz, jeden z CH<sub>2</sub>-7), 2.67 (dd, 1H,  $J = 19.7, 9.0$  Hz, jeden z CH<sub>2</sub>-7), 4.21 (q,  $J = 6.6$  Hz, 1H, H-10).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 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,  $\text{cm}^{-1}$ ): 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

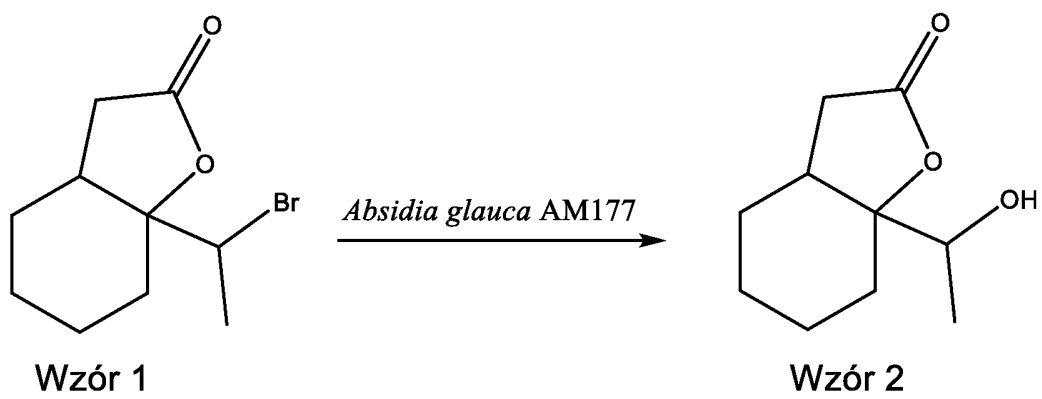
hydroksylakton (Wzór 2)	IC <sub>50</sub> [µg/mL] ± SD		
	Linia RAW 264.7	3T3	CL-1
	>100	>100	78,55 ± 3,95

IC<sub>50</sub> – stężenie związku, które hamuje aktywność metaboliczną 50% komórek

SD – odchylenie standardowe

## Zastrzeżenia patentowe

1. 1-(1'-hydroksyetylo)-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on o wzorze 2, przedstawionym na rysunku.
2. 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'-bromoetylo)-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.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w podłożu w skład którego wchodzi 1% aminobaku i 3% glukozy.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza.
5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się przez 12 dni.





SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.438719

Klasyfikacja zgłoszenia: C07D307/83 (2006.01), C12P17/04 (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	1-5
A	PL211839 B1 (UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU) 2012-07-31	1-5
<input type="checkbox"/> Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
<p>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, &amp; – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.</p>		

Sprawozdanie wykonał/-a:

Agnieszka Ucińska  
Ekspert

Data:

07.04.2022

Podpis:

/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.