

### Sposób enzymatycznej syntezy glochidonu

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania odwodornionego triterpenu  $\Delta^1$ -Lupeonu (Lupa-1,20(29)-dien-3-on, nazwa zwyczajowa glochidon), o wzorze 1 na drodze enzymatycznej, regioselektywnej dehydrogenacji lupeonu, o wzorze 2. Lupeon jest związkiem stanowiącym 3-okso pochodną naturalnego alkoholu triterpenowego, lupeolu (20(29)-lupen-3 $\beta$ -olu), występującego w korze brzozy, w tym zwłaszcza brzozy brodawkowatej (*Betula pendula Ehrh.*), brzozy omszonej (*Betula pubescens Ehrh.*) i brzozy białej (*Betula Pendula Roth.*).

Sposób według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do wytwarzania związku o udowodnionej aktywności biologicznej. Glochidon jest związkiem znanym od lat 60' ubiegłego wieku i został szeroko przebadany pod kątem bioaktywności, cytotoksyczności, działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego, by w końcu przedstawić jego właściwości przeciwnowotworowe. W pracy Çulhaoğlu, i in. *Med. Chem. Res.*, 2015, 24, 3831–3837 opisano właściwości przeciwutleniające glochidonu wyizolowanego z *Salvia trichoclada* Bentham (Lamiaceae), jak również jego silne, selektywne oraz zależne od dawki działanie hamujące na acetylocholinoesterazę, co może stanowić podstawy w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. W pracy Reyes, C. P. i in. *Bioorganic Med. Chem.*, 2005 14, 1573–1579 opisano z kolei inhibicyjne działanie glochinonu na produkcję prostaglandyny E2 przez makrofagi, odpowiedzialnych za regulację produkcji cytokin przeciwzapalnych. Przy czym związkiem o znacząco wyższej aktywności była 11 $\alpha$ -hydroksylowana pochodna glochidonu. W pracy Puapairoj, P. i in. *Planta Med.*, 2005, 71, 208–213 badano wpływ lupanów pochodzenia roślinnego z drewna *Glochidion eriocarpum* i *Glochidion sphaerogynum* na linie rakowe: MCF7 (nowotwór piersi), NCI-H460 (nowotwór płuc), SF-268 (nowotwór centralnego układu nerwowego, CUN), gdzie ujawniono silną ihibicję wzrostu komórek rakowych dla pochodnych glochidonu: glochidonolu, glochidiolu oraz lup-20(29)-enu-1 $\beta$ ,3 $\beta$ -diolu. Z kolei w pracy Chen, H. i in. *Invest. New Drugs*, 2020, 578–586 przedstawiono już dla samego glochidonu potencjał antyproliferacyjny przeciw komórkom nowotworowym płuc wielu lini rakowych, proponując jako mechanizm hamowania wzrotu komórek hamowanie polimeryzacji tubulin na drodze inhibicji miejsca wiązania kolchicyny.

Glochidon najczęściej pozyskiwany jest ze środowiska naturalnego w wyniku ekstrakcji z materiału roślinnego np. z szalwii *Salvia trichoclada*, liściokwiatów, glochidionów: *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* czy moliny *Maytenus* rośliny znanej w tradycyjnej medycynie Północnej Afryki, południowej i centralnej Ameryki oraz Azji

wschodniej. Jednakże oczyszczanie glochidonu od innych pochodnych lupanolowych może stanowić wyzwanie z uwagi na niewielkie różnice w strukturach tych związków i co za tym idzie trudności w separacji pożądanej pochodnej. Ekstrakcji związków z materiału naturalnego towarzyszy wysokie zużycie roztworów organicznych i produkcja toksycznych odpadów. Ponadto wydajność takiego procesu jest raczej niska z uwagi na stosunkowo niewielką zawartość glochidonu w materiale roślinnym. Dla przykładu lupeol pozyskany z kory brzozy brodawkowatej *Betula verrucosa* stanowił 20 g na kg suchej masy (dane pochodzą z pracy Ekman, R., *Holzforschung*, 1983, **37** (4), 205–211). Z kolei glochidon pozyskany z liści *Maytenus cuzcoina* stanowił 83,3 mg na kg liści a w przypadku *Maytenus chiapensis* 11,4 mg na kg liści (dane pochodzą z pracy Reyes, C. P. i in. *Bioorganic Med. Chem.*, 2005, **14**, 1573–1579).

W literaturze, w pracy Hui, W.-H. & Li, M.-M. *Phytochemistry*, 1976, **15**, 561–562 został opisany proces chemicznego utlenienia grupy hydroksylowej przy atomie węgla C3 glochidolu do grupy ketonowej z wytworzeniem glochidonu. W procesie tym zastosowano  $MnO_2$ , a wydajność procesu wynosiła 70%.

W pracy Barton, D. H. R., Lester, D. J. & Ley, S. V., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1980, **1**, 2209–2212 opisano również odwodornienie lupeonu do glochidonu z zastosowaniem bezwodnika benzenoselenowego i wydajnością procesu 70%.

Z kolei w pracy Kundu, S. K., Chatterjee, A. & Rao, A. S., *Chem. Ber.*, 1968, **101**, 3255–3264 trzyetapowy proces odwodornienia lupanolu do lup-1-en-3-onu z wytworzeniem odpowiednio lupan-3-onu (wydajność 95%) w pierwszym i 2-bromo-lupan-3-onu (wydajność 60%) w drugim etapie. Wydajność trzeciego etapu syntezy lupan-3-onu wynosiła 67%.

Jak dotąd nie opisano w literaturze 1,2-odwodornienia lupeonu lub innej pochodnej lupanowej z zastosowaniem enzymu.

Opisana w wynalazku metoda dotyczy otrzymania glochidonu z lupeonu w wyniku reakcji enzymatycznej z nieopisaną dotąd dehydrogenazą 3-ketosteroidową (AcmB2, Anaerobic cholesterol metabolism enzyme B 2, GeneBank: SMB21450) ze *Sterolibacterium denitrificans* Chol-1S w obecności zewnętrznego re-utleniacza w środowisku wodnym.

Znana w literaturze dehydrogenaza cholest-4-en-3-onu z *S. denitrificans* (AcmB) opisana w pracach Wojtkiewicz, A. M. i in., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2020, **202**, 105731 i Chiang, Y. R. i in. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, **74**, 107–113 nie wykazuje aktywności względem lupeonu, co zostało potwierdzone w pracy Wojtkiewicz, A. M. i in., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2020, **202**, 105731.

Enzymatyczna synteza związków chemicznych cechuje się szeregiem zalet względem tradycyjnej syntezy chemicznej takimi jak: łagodne warunki pracy, ograniczenie produkcji toksycznych odpadów, wysoka regioselektywność procesu. Dodatkowo, nie jest wymagane wprowadzanie dodatkowych reakcji zabezpieczania grup funkcyjnych.

Dla znanej dehydrogenazy cholest-4-en-3-onu (AcmB) ze *Sterolibacterium denitrificans* w pracach Chiang, Y. R. i in. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, **74**, 107–113 i Wojtkiewicz, A. M. i in., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2020, **202**, 105731 opisano zdolność do 1,2-odwodornienia steroidów podstawionych różnymi podstawnikami przy C17 np. progesteron, testosteron, cholest-4-en-3-on lub diosgenonu ((25R)-spirost-4-en-3-onu). W procesie tym wykorzystano 2,6-dichloroindofenol jako re-utleniacz oraz zastosowano pH 6,5 lub 8,0.

W opisach patentowych PL 228517, PL 228070 i PL 228071 ujawniono sposób wytwarzania propionianu androsta-1,4-dien-17 $\beta$ -ol-3-onu, androsta-1,4,6-trien-17 $\beta$ -ol-3-onu i 17 $\alpha$ -metyloandrosta-1,4-dien-17 $\beta$ -ol-3-onu z wykorzystaniem preparatu enzymatycznego o aktywności AcmB uzyskanego ze szczepu bakterii *Sterolibacterium denitrificans* Chol-1S DSM: 13999 oraz K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] jako re-utleniacza.

Z kolei w zgłoszeniu patentowym P.433249 opisano zastosowanie AcmB do produkcji 1-dehydro-diosgenonu stosując różne re-utleniacze (2,6-dichloroindofenol, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], metylosiarczan fenazy).

Istota wynalazku polega na otrzymywaniu glochidonu o wzorze 1 na drodze enzymatycznej regioselektywnej  $\Delta^1$ -dehydrogenacji (tj. wprowadzeniu podwójnego wiązania pomiędzy atomy C1 i C2) w substracie, którym jest lupeon o wzorze 2. Reakcję prowadzi się według schematu 1, przedstawionego na załączonym rysunku, przy zastosowaniu biokatalizatora o aktywności dehydrogenazy 3-ketosteroidowej (AcmB2), pochodzącego ze *Sterolibacterium denitrificans* Chol-1S. Reakcję może katalizować dowolny enzym z klasy KSTD (ketosteroidowych dehydrogenaz) o sekwencji podobnej, tj. nie różniący się o więcej niż 30% aminokwasów od zaprezentowanej Sekwencji 1, pod warunkiem, że wykazuje aktywność enzymatyczną dla lupeonu.

Sekwencja 1 - Sekwencja aminokwasowa AcmB2 ze *Stereolibacterium denitrificans* Chol-1S:

MSGETFDTDIVIVGSGAGGMTAALAAHEAGLRALIVEKTQYYGGSTARSGGGIWIPNNYLMQ  
RAGVADSFEEARTYLQATVGERSPQASRDAYLTHAVDMIAWLGKETDVQCSYMLGYADYY  
PEKPGGKAEGRAVEPQLFDGKLLGEDLAFLRPPVIPTPAGLSFTAGEYKQLGLVKRTWQ GK  
ATALRIGRLIAAHL SGKKMLMMGQALIGRLRLSLKRGIPLWLDTPLQDLVIENGRVVGIEVL  
KDGQPLTIRATKGVVLAAGCFARNLEMRLKYQKQPITTEWTVASDGNTGDGIQAGMRIGAAI  
DLMDEAWWGPSSLPPNSPPFFHVAERGFPGIMVNVQKQRFTNESASYVEVVQAMYRLHT  
PDNPHVPCWFIFDQRYRDNYVFASLFPGQKIPQEMLDSGYIRKADTLAELARQLNIEPAALT  
ATVSKFNNSARQGEDVEFGRGQSAYDRYFGDPSVTPNANLAPIEQAPYYAVQVVAGDLGT  
KGGLVTDEFARVKTTDGRIIKGLYCVGNNSASVMGATYPGPGCTIGPAMAFGYIAARHAAGI  
ERSAV.

Biokatalizator może być wprowadzony do środowiska reakcji w formie oczyszczonego enzymu rekombinowanego, powstałego w procesie nadekspresji genu w zmodyfikowanej bakterii, np. *Escherichia coli*.

Produkt reakcji korzystnie oczyszcza się metodą ekstrakcji do fazy stałej, a następnie chromatografią preparatywną na kolumnie C18 w fazie acetonitryl/woda otrzymując glochidon o wzorze 1 z wydajnością co najmniej 36%, przy konwersji substratu według chromatografii cieczowej >90%.

Korzystne jest, gdy proces prowadzi się w środowisku wodno-organicznym w temperaturze od 20 do 45°C, w pH 6,5–9,0 z zastosowaniem jako utleniacza 2,6-dichlorofenoloindofenolu (DCPIP), metylosiarczanu fenazyny (PMS), heksacyjanożelazianu III potasu, witaminy K<sub>3</sub> lub mieszaniny DCPIP i PMS, w obecności 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny jako solubilizatora substratu. Dodanie rozpuszczalnika organicznego (np. 2-metoksyetanolu lub 1,4-dioksanu) umożliwia łatwiejsze rozpuszczenie substratu i ma pozytywny wpływ na konwersję.

Zasadniczymi zaletami wynalazku jest otrzymanie glochidonu z lupeonu, jako jedyne produktu reakcji z blisko 100% konwersją, z wydajnością izolowaną co najmniej 36%, w temperaturze zbliżonej do pokojowej, bez zastosowania toksycznych rozpuszczalników oraz silnych utleniaczy w procesie wytwarzania.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady realizacji.

#### **Przykład 1 Przygotowanie biokatalizatora Acmb2 ze *Stereolibacterium denitrificans* w nadekspresji w *Escherichia coli***

Gen kodujący dehydrogenazę 3-ketosteroidową z *S. denitrificans* (Acmb2) został wklonowany do wektora pMCSG7 zgodnie z procedurą opisaną w pracy Sofińskiej K. i inni (*BBA – Gen. Subjects*, 2019, 1863 (6), 1027–1039). Uzyskany konstrukt genetyczny został transformowany do komórek *Escherichia coli* (BL21(DE3)Magic), potraktowanych chlorkiem wapnia w celu nabycia kompetencji. Następnie założono pre-kulturę tak zmodyfikowanych komórek bakteryjnych na pożywkę płynnej 2% Lennox Broth (LB) z dodatkiem ampicyliny i kanamycyny tak by końcowe stężenie antybiotyków wynosiło odpowiednio 100 i 50  $\mu\text{g/ml}$ . Hodowlę pre-kultury prowadzono w inkubatorze z wytrząsaniem (180 rpm, 37°C, 12 h). Uzyskana kultura została rozcieńczona 100-krotnie w medium LB zawierającym ampicylinę i kanamycynę w takich samych stężeniach jak wyżej, a hodowla była kontynuowana aż do osiągnięcia gęstości optycznej OD<sub>600</sub> o wartości 0,6. Po osiągnięciu opisanej wartości OD<sub>600</sub> obniżono temperaturę w inkubatorze do 16°C i zaindukowano nadekspresję enzymu przez dodatek 0,25 mM  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozydu izopropylowego (IPTG). Po kolejnych 24 h hodowli komórki zostały oddzielone od pożywki hodowlanej poprzez wirowanie przy 4500 g (1 h, 4°C). Zawiesina komórek została poddana lizie metodą sonikacji (Sonics Vibra-Cell

VCX500, cykl przerywany, 5 min, amplituda 40%, energia 150 000 J), a pozostałości komórkowe oddzielono metodą ultrawiwiania przy przyspieszeniu kątowym 40 000 g przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Następnie ekstrakt komórkowy zaaplikowano na kolumnę HisTrap HP (5 mL GE Healthcare), by po przepłukaniu buforem podstawowym (50 mM chlorowodorek (tris(hydroksymetylo)aminometanowy (Tris-HCl) pH 8,5, 150 mM chlorek sodu, 10 % (w/v) glicerol i 0,5% (w/v) Triton-X 100) z dodatkiem 15 mM imidazolu, wymyc enzym w gradiencie imidazolu od 15 mM do 300 mM. Enzym Acmb2 odsolono z wykorzystaniem dializy w buforze podstawowym bez dodatku imidazolu i zamrożono w -20°C. Stężenie aktywnego enzymu oznaczono spektrofotometrycznie wykorzystując widmo FAD przy 450 nm ( $\epsilon_{450} = 13\ 100\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ).

**Przykład 2 Otrzymywanie glochidonu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego biokatalizatora Acmb2 ze *Stereolibacterium denitrificans* oraz heksacyjanożelazianu III potasu jako reutleniacza w pH 8,0 i w temperaturze 30°C**

Do reaktora o pojemności 100 ml, zawierającego 50 mM potasowy bufor ortofosforanowy o pH 8,0 wprowadzono 0,35 g heksacyjanożelazianu III potasu dającą końcowe stężenie 10 mM, 16 g 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny dającą końcowe stężenie 16% (w/v), 1,5 ml 20,3 mM roztworu lupeonu rozpuszczonego w 2-metoksyetanolu, tak by finalne stężenie lupeonu w środowisku wyniosło 0,3 mM (a tym samym stężenie 2-metoksyetanolu wynosiło 1,5% (v/v)) oraz 6,6 mg rekombinowanego Acmb2. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 30°C, przy ciągłym mieszaniu przez 72 godzin. Po 1,5 h od rozpoczęcia reakcji dodano 11,1 mg lupeonu zawieszzonego w 1,5 ml 2-metoksyetanolu, tak by finalne stężenie substratu wynosiło 0,56 mM, a 2-metoksyetanolu 3% [v/v]. Po 72 godzinach mieszaninę reakcyjną przeanalizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (90% ACN, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 30°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następowała separacja reagentów, czas retencji glochidonu wynosił 4,8 min., a lupeonu 5,7 min. Dla takich warunków uzyskano 90% konwersji substratu po 72 godzinach reakcji. A po ekstrakcji do fazy stałej stosując kolejno kolumnienki polimerowe StrataX oraz 50% metanol w wodzie w celu opłukania zanieczyszczeń oraz 100% metanol jako eluent oraz chromatografię preparatywną na kolumnie C18 w fazie acetonitryl/woda, uzyskano 15,36 mg produktu. Całkowita wydajność procesu wyniosła 64%.

**Przykład 3 Otrzymywanie glochidonu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego biokatalizatora Acmb2 ze *Stereolibacterium denitrificans* oraz heksacyjanożelazianu III potasu jako reutleniacza w pH 8,0 i w temperaturze 45°C**

Do minireaktora o pojemności 0,5 ml, zawierającego 25 mM potasowy bufor ortofosforanowy o pH 8,0 wprowadzono 10 mM heksacyjanożelazianu III potasu, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 16% (w/v), 0,010 ml 25 mM roztworu lupeonu w 2-metoksyetanolu, tak by finalne stężenie lupeonu w środowisku wyniosło 0,5 mM (a tym samym stężenie 2-metoksyetanolu wynosiło 2% (v/v)) oraz 0,3 mg rekombinowanego Acmb2 z *S. denitrificans*. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 45°C, przy ciągłym wstrząsaniu przez 22 godziny. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (90% ACN, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 30°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu$ m, 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następowała separacja reagentów, czas retencji glochidonu to 4,8 min., a lupeonu 5,7 min. Przebieg reakcji monitorowano poprzez pobranie i analizowanie próbki w czasie 0,5, 1, 1,5, 19 i 22 godziny trwania procesu. Przebieg reakcji przedstawiono na rysunku na Fig.3. Dla takich warunków uzyskano 90% konwersji substratu po 22 godzinach reakcji.

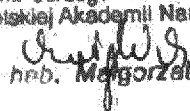
**Przykład 4 Otrzymywanie glochidonu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego biokatalizatora Acmb2 ze *Stereolibacterium denitrificans* oraz witaminy K<sub>3</sub> jako reutleniacza w pH 9,0 i w temperaturze 20°C**

Do minireaktora o pojemności 0,5 ml, zawierającego 25 mM potasowy bufor ortofosforanowy o pH 9, wprowadzono 5 mM witaminy K<sub>3</sub> z roztworu 0,25 M w 1,4-dioksanie, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 16% (w/v), 0,010 ml 25 mM roztworu lupeonu w 1,4-dioksanie, tak by finalne stężenie lupeonu w środowisku wyniosło 0,5 mM (tym samym stężenie 1,4-dioksaniu wynosiło 4% (v/v)) oraz 0,3 mg rekombinowanego Acmb2 z *S. denitrificans*. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 20°C, przy ciągłym wstrząsaniu przez 22 godziny. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (90% ACN, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 30°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu$ m, 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następowała separacja reagentów, czas retencji glochidonu to 4,8 min., a lupeonu 5,7 min. Przebieg reakcji monitorowano poprzez pobranie i przeanalizowanie próbki w czasie 0,5, 1, 1,5, 19, 22 godziny trwania procesu. Przebieg reakcji przedstawiono na rysunku na Fig.4. Dla takich warunków uzyskano 88% konwersji substratu po 22 godzinach reakcji.

**Przykład 5 Otrzymywanie glochidonu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego biokatalizatora Acmb2 ze *Stereolibacterium denitrificans* oraz 2,6-dichlorofenoloIndofenolu jako reutleniacza w pH 6,5 i w temperaturze 30°C**

Do reaktora o pojemności 50 ml, zawierającego 25 mM potasowy bufor ortofosforanowy o pH 6,5 wprowadzono 1 mM 2,6-dichlorofenolindofenolu, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 4% (w/v), 1 ml 25 mM roztworu lupeonu w 2-metoksyetanolu, tak by finalne stężenie lupeonu w środowisku wyniosło 0,5 mM (a tym samym stężenie 2-metoksyetanolu wynosiło 2% (v/v)) oraz 3,3 mg rekombinowanego AcmB2 z *S. denitrificans*. Reakcje prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 30°C, przy ciągłym mieszaniu przez 40 godzin. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (90% ACN, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 30°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu$ m, 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następowała separacja reagentów, czas retencji glochidonu wynosił 4,8 min., a lupeonu 5,7 min. Dla takich warunków uzyskano 74% konwersji substratu po 40 godzinach reakcji. A po ekstrakcji do fazy stałej stosując kolumnienki polimerowe StrataX oraz 50% metanol w wodzie w celu opłukania zanieczyszczeń oraz 100% metanol jako eluent uzyskano 3,8 mg produktu. Całkowita wydajność procesu wyniosła 36%.

Uzyskany produkt scharakteryzowano za pomocą spektrometru NMR Bruker 400 MHz w deuterowanym chloroformie ( $\text{CDCl}_3$ ) uzyskując dane spektralne  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR. Widmo protonowe  $^1\text{H}$  NMR otrzymanego glochidonu o wzorze 1 przedstawiono na rysunku Fig.1, a widmo węglowe  $^{13}\text{C}$  NMR przedstawiono na Fig.2.

DYREKTOR  
Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni  
Im. Jerzego Habera  
Polskiej Akademii Nauk  
  
prof. dr hab. Małgorzata Witko