

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246028 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440865**

(22) Data zgłoszenia: **2022.04.06**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.10.09 BUP 41/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.11.18 WUP 47/2024**

(51) MKP:

C07H 15/26 (2006.01)

C12P 19/44 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Przyrodniczy
we Wrocławiu, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**MARTYNA PERZ, Kalisz, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL
TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

**6-Metyleno-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-ol i sposób wytwarzania
6-metyleno-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-olu**

PL 246028 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 6-metyleno-*O*- β -*D*-(4"-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-ol o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania 6-metyleno-*O*- β -*D*-(4"-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-olu.

6-Metyleno-*O*- β -*D*-(4"-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-ol może znaleźć zastosowanie jako preparat chemoprewencyjny, hepatoprotekcyjny, bakteriostatyczny czy substancja zapobiegająca peroksydacji lipidów w preparatach farmaceutycznych.

Znany jest szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2 ujawniony w zgłoszeniu patentowym o numerze P.416996.

W ostatnich latach, w leczeniu różnych chorób i ich zapobieganiu, coraz większe znaczenie zyskują związki pochodzenia naturalnego oraz ich odpowiedniki uznawane za naturalne, które uzyskano na drodze przekształceń mikrobiologicznych. Dlatego istotne jest opracowywanie nowych metod wytwarzania związków aktywnych biologicznie na drodze biotransformacji, użytecznych dla przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego i spożywczego.

W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat otrzymywania 6-metyleno-*O*- β -*D*-(4"-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-olu.

Istotą wynalazku jest 6-metyleno-*O*- β -*D*-(4"-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-ol.

Istota sposobu polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2. Po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 6-metylo-8-nitroflawanon, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszącym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, przez co najmniej 96 godzin. Następnie produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą oraz oczyszcza chromatograficznie. 6-metyleno-*O*- β -*D*-(4"-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-ol znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w trzecim paśmie od linii startu.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg:1 cm³.

Korzystnie także jest, gdy proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 10 dni.

Korzystnie również jest, gdy oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym z chloroformem i metanolem w stosunku objętościowym 9:1.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje redukcja grupy karbonylowej do grupy hydroksylowej przy C-4 oraz przyłączenie 4-metoksy- β -*D*-glukozy do grupy CH₃ przy C-6. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 6-metyleno-*O*- β -*D*-(4"-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-olu w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu oraz wykorzystując mikroorganizm niebędący patogenem ludzkim.

Wykorzystanie biotransformacji, zamiast syntezy chemicznej, umożliwia, w sposób przyjazny dla środowiska, uzyskanie związków o większej biodostępności i aktywności biologicznej, niż użyte substraty.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Przykład. Do kolby stożkowej o pojemności 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 10 g aminobaku i 30 g glukozy, wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg 6-metylo-8-nitroflawanonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ dimetylosulfotlenku. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 10 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahuje się dwukrotnie octanem etylu, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie z zastosowaniem jako eluentu mieszaniny chloroformu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1. Produkt znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w trzecim paśmie od linii startu.

Na tej drodze otrzymuje się 12,5 mg 6-metyleno-*O*- β -*D*-(4''-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-olu o wzorze (wydajność 14,8%) oraz pozostałość, w skład której wchodzi 6-metylo-8-nitro-4-*O*- β -*D*-(4''-*O*-metyloglukopiranozylo)flawanon.

Stopień konwersji substratu według HPLC >87%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma ^1H NMR (601 MHz, Aceton- d_6)

Sygnały pochodzące od szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od jednostki cukrowej		
δ [ppm]	J [Hz]	H	δ [ppm]	J [Hz]	H
5,49 (dd)	11,8; 2,1	2	4,41 (d)	7,8	1''
2,37 (m)		3ax	3,28 (m)		2'', 5''
2,20 (ddd)	11,7; 7,6; 2,0	3eq	3,51 (d)	9,0	3''
4,90 (s)		4-H	3,10 (m)		4''
4,99 (s)		4-OH	3,83 (d) 3,66 (m)	11,6	6''
7,87 (d)	2,1	5	4,29 (s)		C2''-OH
7,71 (d)	2,0	7	3,73 (m)		C6''-OH
7,54 (d)	1,6	2'	3,53 (s)		C4''-O- CH ₃
7,43 (m)		3', 5'	4,90 (d) 4,68 (d)	12,1 12,1	C6-CH ₂ - O
7,36 (m)		4'			
7,53 (d)	0,6	6'			

Modelowanie aktywności biologicznych przy użyciu programu PASS online, wykazało że związek 6-metyleno-*O*- β -*D*-(4''-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawanon-4-ol z najwyższym prawdopodobieństwem 86,9% może być inhibitorem glicerofosfotransferazy CDP-glycerol. Enzym ten odpowiada za tworzenie kwasów tejchojowych (TA) w ścianie komórkowej bakterii gram dodatnich. Kwasy tejchojowe wiążą kationy metali jedno- i dwuwartościowych. Sieci kationów skoordynowanych przez TA wpływają na ogólną strukturę polimerów, a to z kolei wpływa na porowatość i sztywność otoczki komórki. Sugeruje się, że kwasy tejchojowe są ważne dla homeostazy kationów w organizmach gram-dodatnich. Inhibicja glicerofosfotransferazy CDP-glicerol uniemożliwia prawidłowe tworzenie kwasów tejchojowych. Brak kwasów tejchojowych może zakłócić prawidłowe funkcjonowanie bakterii gram dodatnich (Swoboda, J. G., Campbell, J., Meredith, T. C., & Walker, S. (2010). Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *ChemBiochem*, 11(1), 35–45.). Dzięki temu 6-metyleno-*O*- β -*D*-(4''-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawanon-4-ol może posiadać właściwości bakterioobójcze wobec patogenów.

Według symulacji *in silico* wykazano, że z prawdopodobieństwem 65,7% 6-metyleno-*O*- β -*D*-(4''-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawanon-4-ol może być stosowany jako związek chemoprewencyjny. Chemoprewencja polega na stosowaniu naturalnych lub syntetycznych związków chemicznych, które mogą chronić przed nowotworami. Dzięki temu związek może posiadać szereg aktywności anty-

kancerogennych składających się na profilaktykę (chemoprewencję), między innymi: właściwości przeciwzapalne, inhibicja angiogenezy, inhibicja wzrostu oraz indukcja apoptozy komórek rakowych, czy zmiatacz wolnych rodników (ROS) (Forni, C., Rossi, M., Borromeo, I., Feriotta, G., Platamone, G., Tabolacci, C., ... & Beninati, S. (2021). Flavonoids: A Myth or a Reality for Cancer Therapy?. *Molecules*, 26(12), 3583.).

Wykazano także, że z prawdopodobieństwem 68,7% związek może być stosowany jako substancja hepatoprotekcyjna. Yoshikawa i współpracownicy wyizolowali z metanolowego ekstraktu z *Anastatica hierochuntica* L Anastatynę A i Anastatynę B. Wykazali, że te związki flawonoidowe mają działanie hepatoprotekcyjne na cytotoksyczność indukowaną przez D-galaktozaminę w pierwotnie hodowanych mysich hepatocytach, a ich aktywność była silniejsza w porównaniu z pokrewnymi flawonoidami i handlową sylibiną – znaną i stosowaną komercyjnie substancją hepatoprotekcyjną (Adewusi, E. A., & Afolayan, A. J. (2010). A review of natural products with hepatoprotective activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(13), 1318–1334.).

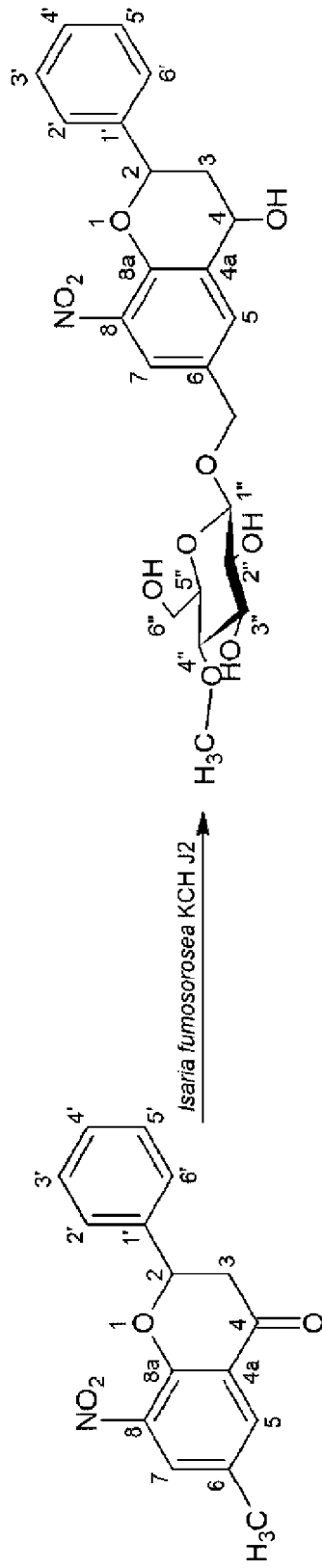
Badania *in silico* wykazały również, że związek może być inhibitorem peroksydacji lipidów (prawdopodobieństwo 62,9%). Peroksydacja lipidów błonowych znacząco zmienia fizyczne właściwości dwuwarstw lipidowych. Udział peroksydacji lipidów oraz ogólnego stresu oksydacyjnego ma ogromny wpływ na rozwój choroby Alzheimera. Alzheimer jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną charakteryzującą się pozakomórkową akumulacją amyloidu- β ($A\beta$) oraz wewnątrzkomórkową akumulacją spletków neurofibrylarnych składających się z białka tau. Wiadomo, że wstawienie $A\beta$ do błon komórkowych generuje nadtlenek wodoru oraz nadtlenki lipidów i produkty degradacji, takie jak MDA. Inhibicja peroksydacji lipidów, może stanowić jedną z metod leczenia choroby Alzheimera (Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 419–425.).

Odnosnie grupy nitrowej przedmiotowego 6-metyleno-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawanon-4-olu, badania Mughal i współpracowników potwierdziły, że grupa nitrowa albo siarkowa zwiększa właściwości przeciwbakteryjne, co za tym idzie, działa negatywnie na wzrost *E. coli*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa* and *S. typhi*. (Mughal, E. U., Ayaz, M., Hussain, Z., Hasan, A., Sadiq, A., Riaz, M., ... & Choudhary, M. I. (2006). Synthesis and antibacterial activity of substituted flavones, 4-thioflavones and 4-iminoflavones. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(14), 4704–4711.)

Zastrzeżenia patentowe

1. 6-metyleno-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawanon-4-ol o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 6-metyleno-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawanon-4-olu **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2, następnie po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 6-metylo-8-nitroflawanon o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 96 godzin, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie, przy czym 6-metyleno-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-ol o wzorze 2 znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w trzecim paśmie od linii startu.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg:1 cm³.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 10 dni.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowsłupową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol w stosunku objętościowym 9:1.

Rysunek



WZÓR 2

WZÓR 1