

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 440866 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: 440866

(22) Data zgłoszenia: 2022.04.06

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

(51) MKP:

C07H 17/065 (2006.01)

C12P 19/60 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(71) Zgłaszający:

UNIwersytet PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU, Wrocław, PL

(72) Twórca(-y):

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

(74) Pełnomocnik:

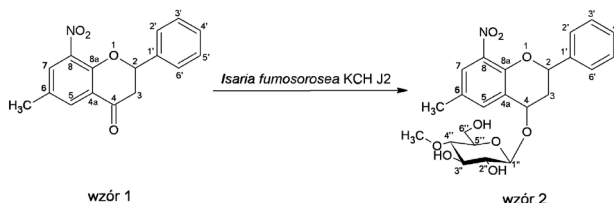
Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

6-Metylo-8-nitro-4-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon i sposób wytwarzania 6-metylo-8-nitro-4-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu

(57) Skróć opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest 6-Metylo-8-nitro-4-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2. Przedmiotem zgłoszenia jest również sposób wytwarzania 6-metylo-8-nitro-4-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu, charakteryzujący się 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-metylo-8-nitro-4-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2 znajduje się we frakcji o pośredniej polarności w czwartym paśmie od linii startu.



6-Metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon

i sposób wytwarzania

6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu

Przedmiotem wynalazku jest 6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania 6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu.

6-Metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon może znaleźć zastosowanie jako związek kontrolujący wzrost bakterii opornych na antybiotyki, przeciwnowotworowy oraz przeciwwirusowy 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.

W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat otrzymywania 6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu.

Istotą wynalazku jest 6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon.

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 mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wytrząsaniu, przez co najmniej 96 godzin. Następnie produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym nie mieszającym się z wodą oraz oczyszcza chromatograficznie. 6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon znajduje się we frakcji o pośredniej polarności w czwartym paśmie od linii startu.

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

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

Dodatkowo, korzystnie także jest, gdy transformację prowadzi się przez 9 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 i przyłączenie 4-metoksy- β -D-glukozy przy C-4. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu 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 2000cm³, w której znajduje się 500cm³ sterylnej pożywki zawierającej 10g aminobaku i 30g sacharozy 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 9 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, czwartym paśmie od linii startu.

Na tej drodze otrzymuje się 4,3 mg 6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu (wydajność 5,3%) oraz pozostałość, w skład, której wchodzi 6-metyleno-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-ol.

Stożenie konwersji substratu według HPLC >87%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma ¹H NMR (601 MHz, Aceton-d₆)

Sygnały pochodzące od szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od jednostki cukrowej		
δ [ppm]	J [Hz]	H	δ [ppm]	J [Hz]	H
5,55 (dd)	12,1; 2,0	2	4,50 (d)	7,7	1''
2,15 (m)		3eq	3,30 (ddd)	9,0; 8,0; 3,8	2''
2,60 (dt)	14,4; 2,5	3ax	3,50 (dd)	8,9; 3,8	3''
5,06 (t)	2,9	4	3,12 (dd)	9,6; 9,0	4''
7,69 (d)	1,6	5	3,36 (ddd)	9,8; 5,6; 2,1	5''
7,59 (d)	2,1	7	3,72 (dt) 3,91 (ddd)	11,7; 6,0 11,4; 5,6; 2,1	6''
7,55 (d)	7,2	2', 6'	3,54 (s)		4''-O-CH ₃
7,42 (t)	7,6	3', 5'	3,86 (m)		6''-OH
7,35 (m)		4'	4,25 (d)	3,9	3''-OH
2,37 (s)		6-CH ₃	4,43 (d)	3,9	2''-OH

Wykonane badania modelowania aktywności 6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu przy użyciu platformy PASS online wykazały, że związek może być inhibitorem glicerofosfotransferazy CDP-glicerol z wysokim prawdopodobieństwem 90,6%. Glicerofosfotransferaza CDP-glicerol odpowiada za polimeryzację głównego łańcucha kwasu tejchojowego związanego ze ścianą komórkową bakterii gram-dodatnich. Kwas tejchojowy jest ważny w patogenezie i odgrywa kluczową rolę w oporności bakterii na antybiotyki (Brown, S., Santa Maria Jr, J. P., & Walker, S. (2013). Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology*, 67, 313-336). Garcia

i współpracownicy wykazali, że 3'-metoksy-4'-hydrokso-3-nitrochalcon wykazywał działanie przeciwbakteryjne przeciwko wieloopornym szczepom *Staphylococcus aureus* 10 i *Escherichia coli* 06, gdy był powiązany odpowiednio z antybiotykami cyprofloksacyną i gentamycyną, co wskazuje, że związek ten może przyczyniać się do kontroli oporności przeciwbakteryjnej (Garcia, T. R., de Freitas, T. S., dos Santos, H. S., Bandeira, P. N., Julião, M. S.S., Rocha, J. E., Nogueira, C. E.S., Pereira, R. L.S., Barreto, A. C.H., Freire, P. T.C., Coutinho, H. D.M., Teixeira, A. M.R. (2020). Structural, vibrational and electrochemical analysis and antibiotic activity study of chalcone (2E)-1-(3',-methoxy-4',-hydroxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl) prop-2-en-1-one. *Journal of Molecular Structure*, 1216, 128358.)

Maghal i współpracownicy potwierdzili, że grupa nitrowa i siarkowa zwiększają właściwości przeciwbakteryjne co za tym idzie, działają 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.)

W badaniach *in silico* wykazano, że z prawdopodobieństwem 77,9% 6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon jest substratem CYP2H, należącego do rodziny cytochromu P450. Enzymy cytochromu P450 są szeroko zaangażowane w procesy fizjologiczne i toksykologiczne, takie jak metabolizm cząsteczek endogennych i egzogennych oraz reakcje obronne organizmu. Dowiedziono, że CYP2H występujący u ptaków jest ortologiczny do ludzkiego CYP2C62P. Co więcej, enzymy z rodziny CYP2 mogą działać jako 25-hydroksylaza witaminy D2 i D3 (CYP2R1), z kolei CYP2U1 działa w hydroksylacji kwasu arachidonowego i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, sugerując ich ważną i znaczącą rolę w procesach fizjologicznych (Kubota, A., Stegeman, J. J., Goldstone, J. V., Nelson, D. R., Kim, E. Y., Tanabe, S., & Iwata, H.

(2011). Cytochrome P450 CYP2 genes in the common cormorant: Evolutionary relationships with 130 diapsid CYP2 clan sequences and chemical effects on their expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(3), 280-289).

Badania *in silico* wykazały również, że związek może posiadać właściwości przeciwnowotworowe z prawdopodobieństwem 81,7%. Nowotwór jest uważany za chorobę związaną z przewlekłym stanem zapalnym. Jednym z mechanizmów zwalczania stanu zapalnego i proliferacji komórek nowotworowych przez flawonoidy jest stymulacja szlaku Nrf2, który odgrywa kluczową rolę w zapewnianiu odporności na stres oksydacyjny i stany zapalne poprzez hamowanie NF- κ B. (Forni, C., Rossi, M., Borromeo, I., Feriotto, G., Platamone, G., Tabolacci, C., ... & Beninati, S. (2021). Flavonoids: A Myth or a Reality for Cancer Therapy?. *Molecules*, 26(12), 3583). W badaniach nad (2S)-8-formylo-5-hydroksy-7-metoksy-6-metyloflawanonem Ye i współpracownicy wykazali właściwości antykancerogenne związku przeciwko ludzkim liniom komórek nowotworowym: SMMC-7721, 8898, K562, HeLa i 95-D (Ye, C. L., Liu, Y., & Wei, D. Z. (2007). Antioxidant and anticancer activity of 3'-formyl-4',6'-dihydroxy-2'-methoxy-5'-methylchalcone and (2S)-8-formyl-5-hydroxy-7-methoxy-6-methylflavanone. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 59(4), 553-559).

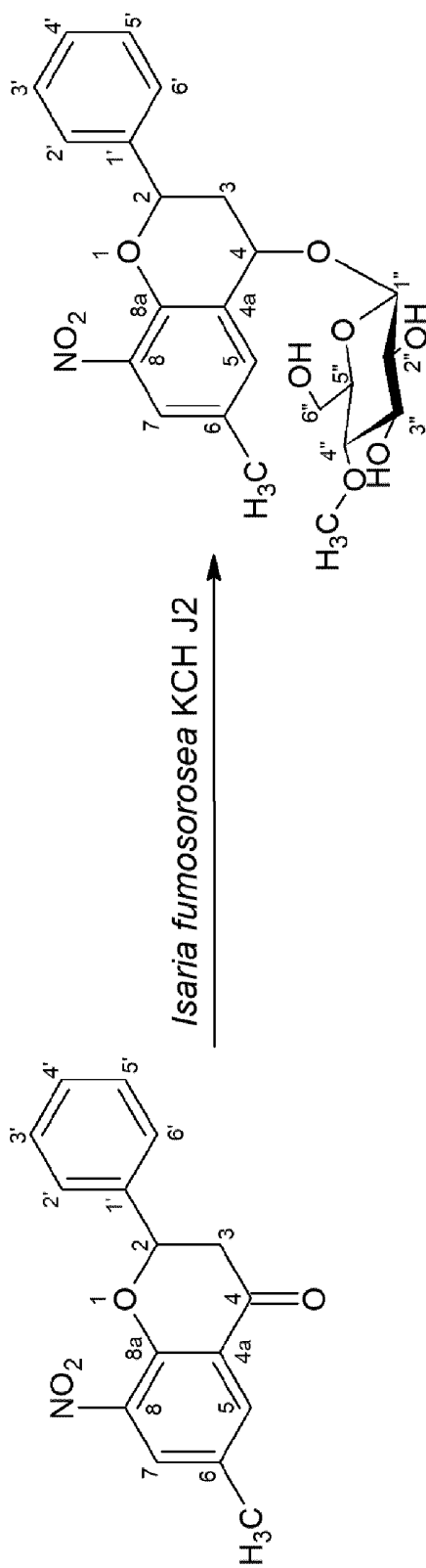
Badania aktywności 6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu wykazały, że z prawdopodobieństwem 70,6% może być stosowany jako środek przeciwwirusowy np. przeciwko grypie. Ai-Lin Liu i współpracownicy przeprowadzili test redukcji CPE (efektu cytopatycznego) indukowanego wirusem grypy A/Jinan/15/90 (H3N2) w komórkach nerki psów Madina-Darby'ego (MDCK). Wykazali, że apigenina, dinatyna, luteolina i 2-((E)-4'-hydroksyfenylideno)-6-hydroksy-2,3-dihydrobenzofuran-3-on należące do związków flawonoidowych wykazały znaczącą aktywność przeciw wirusowi grypy z IC₅₀ od 4,74 μ M do 24,70 μ M (Liu, A. L., Wang, H. D., Lee, S. M., Wang, Y. T., & Du, G. H.

(2008). Structure–activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(15), 7141-7147).

Metylacja flawonoidów poprzez ich wolne grupy hydroksylowe lub atom C radykalnie zwiększa ich stabilność metaboliczną i usprawnia transport błonowy, prowadząc do łatwiejszego wchłaniania i znacznie zwiększonej biodostępności po podaniu doustnym. Na przykład 7-O-metyloapigenina ma działanie przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i jest zmiataczem wolnych rodników. Również 4'-metylofarrerol działa przeciwnowotworowo przeciwko komórkom HL60, KB, Bel7402 oraz cytotoksycznie przeciwko liniom komórkowym HL-60 i SMMC-7721 (Koirala, N., Thuan, N. H., Ghimire, G. P., Van Thang, D., & Sohng, J. K. (2016). Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. *Enzyme and microbial technology*, 86, 103-116.).

Zastrzeżenia patentowe

1. 6-Metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu **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-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2 znajduje się we frakcji o pośredniej polarności w czwartym paśmie od linii startu.
3. Sposób według zastrz. 2., **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1mg:1cm³.
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 9 dni.
6. Sposób według zastrz. 2., **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol w stosunku objętościowym 9:1



WZÓR 1

WZÓR 2

SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.440866

Klasyfikacja zgłoszenia: C07H 17/065 (2006.01), C12P 19/60 (2006.01), C12R 1/645 (2006.01)		
Poszukiwania prowadzone w klasach: C07H, C12P, C12R		
Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: EPODOC, WPI, Patentscope, STNext: REGISTRY, bazy UPRP		
Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	PL432958 A1 (UNIwersytet przyrodniczy we Wrocławiu) 2021-08-23	1-6
<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, & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.</p>		

Sprawozdanie wykonał/-a:

 Agnieszka Ucińska
 Ekspert Koordynator

Data:

20.12.2022

Podpis:

 /podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/
 Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o zastrz. z dnia 06.04.2022 r.