

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246029 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440866**

(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 17/065 (2006.01)

C12P 19/60 (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:

**2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-chroman i sposób
wytwarzania 2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu**

PL 246029 B1

Opis wynalazku

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

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania 2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu.

2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chroman 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 2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu.

Istotą wynalazku jest 2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chroman.

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. 2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chroman 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 2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu 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 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 2-fenilo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu (wydajność 5,3%) oraz pozostałość, w skład, której wchodzi 6-metyleno-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-ol.

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
5,55 (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)	11,7; 6,0	6''
			3,91 (ddd)	11,4; 5,6; 2,1	
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 2-fenilo-6-metylo-8-nitro-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu 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 teichojowego związanego ze ścianą komórkową bakterii gram-dodatnich. Kwas teichojowy 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'-hydroksy-3-nitrochalkon 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% 2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chroman 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., Ferriotto, 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, 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 2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu 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'-hydroksyfenylydeno)-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. 2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chroman o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 2-fenylo-6-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu **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 2-fenylo-3-metylo-8-nitro-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chroman 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 0,1 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 9 dni.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując ciekową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol w stosunku objętościowym 9:1.

Rysunek

