

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 440865 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **440865**(22) Data zgłoszenia: **2022.04.06**(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.10.09 BUP 41/2023**

(51) MKP:

C07H 15/26 (2006.01)**C12P 19/44** (2006.01)**C12R 1/645** (2006.01)

(71) Zgłaszający:

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

(72) Twórca(-y):

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

(74) Pełnomocnik:

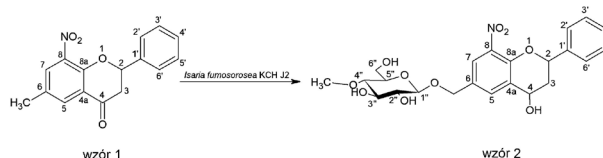
Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

**6-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**

(57) Skróć opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest 6-Metyleno-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-ol o wzorze 2. Zgłoszenie obejmuje także sposób wytwarzania 6-metyleno-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-olu, który charakteryzuje 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-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.



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

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 mieszającym 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 niemieszającym 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 niemieszającym 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-d₆)

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- <u>H</u>	3,10 (m)		4''
4,99 (s)		4-O <u>H</u>	3,83 (d) 3,66 (m)	11,6	6''
7,87 (d)	2,1	5	4,29 (s)		C2''-O <u>H</u>
7,71 (d)	2,0	7	3,73 (m)		C6''-O <u>H</u>
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-nitroflawan-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-nitroflawan-4-ol może posiadać właściwości bakteriobójcze wobec patogenów.

Według symulacji *in silico* wykazano, że z prawdopodobieństwem 65,7% 6-metyleno-*O*- β -*D*-(4"-*O*-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-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 antykancerogennych 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., Feriotto, G., Platanone, 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.).

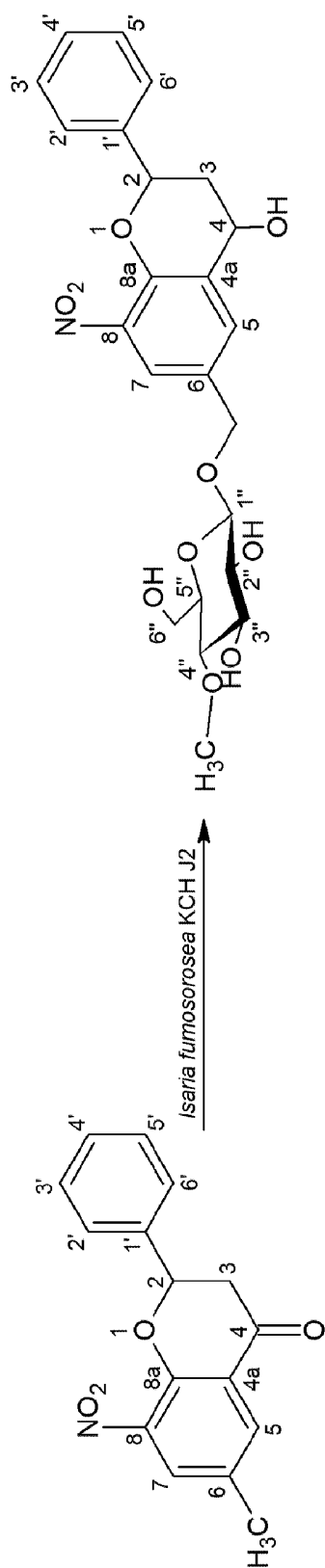
Badania *in silico* wykazały również, że związek może być inhibitorem

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 nadtlene 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-nitroflawan-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-imino flavones. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(14), 4704-4711.)

Zastrzeżenia patentowe

1. 6-Metyleno-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-4-ol o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 6-metyleno-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-8-nitroflawan-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 cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol w stosunku objętościowym 9:1.



wzór 1

wzór 2



URZĄD PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

al. Niepodległości 188/192
00-950 Warszawa, skr. poczt. 203
tel.: (+48) 22 579 05 55 | fax: (+48) 22 579 00 01
e-mail: kontakt@uprp.gov.pl | www.uprp.gov.pl

SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.440865

Klasyfikacja zgłoszenia: C07H 15/26 (2006.01) C12P 19/44 (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	PL435321 A1 (UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU) 2022-03-21	1-6
A	PL238785 B1 (UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU) 2021-10-04	1-6

☐ Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie

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.

Sprawozdanie wykonał/-a:

Agnieszka Ucińska
Eksperkt Koordynator

Data:

21.12.2022

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.