

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 246030 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440867**

(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:

**8-Bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon i sposób wytwarzania
8-bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu**

PL 246030 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 8-bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania 8-bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu.

8-Bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon może znaleźć zastosowanie jako związek przeciwdrobnoustrojowy, zwłaszcza w zwalczaniu bakterii gram-dodatnich i grzybów oraz jako związek przeciwnowotworowy, zwłaszcza stosowany w preparatach farmaceutycznych.

Znany jest szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5 ujawniony w literaturze (Kozłowska E., Urbania M., Hoc N., Grzeszczuk J., Dymarska M., Stępień Ł., Płaskowska E., Kostrzewa-Susłow E., Janeczko T. Cascade biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) by *Beauveria* species. Scientific Reports, 2018, 8:13449).

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.

W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat otrzymywania 8-bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu.

Istotą wynalazku jest 8-bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon.

Istota sposobu polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5. Po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 3'-bromo-5'-chlorochalkon, 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. 8-bromo-6-chloro-3'-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 0,1 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 *Beauveria bassiana* KCH J1.5, następuje izomeryzacja 3'-bromo-5'-chlorochalkonu do 8-bromo-6-chloroflawanonu oraz przyłączenie 4-metoksy- β -D-glukozy przy C-3'. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą (octan etylu).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 8-bromo-6-chloro-3'-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 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 10 g aminobaku i 30 g glukozy, wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg 3'-bromo-5'-chlorochalkonu 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 czwartym paśmie od linii startu.

Na tej drodze otrzymuje się 4,9 mg 8-bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu o wzorze 2 (wydajność 6,24%). Stopień konwersji substratu według HPLC > 98%.

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
5,81 (dd)	12,6; 3,0	2	5,01 (d)	7,8	1"
3,26 (dd)	16,9; 12,5	3ax	3,47 (m)		2"
3,03 (dd)	17,0; 3,1	3eq	3,63 (m)		3"
7,91 (d)	2,6	5	3,22 (m)		4"
7,7 (d)	2,5	7	3,49 (dd)	4,9; 2,5	5"
7,30 (m)		2'	3,83 (ddd)	11,6; 5,2; 2,2	6"
			3,68 (m)		
7,09 (dd)	7,9; 2,1	4'	4,64 (d)	4,2	C2"-OH
7,38 (td)	7,9; 3,0	5'	4,39 (d)	4,1	C3"-OH
7,25 (d)	7,0	6'	3,73 (dd)	7,9; 2,8	C6"-OH
			3,56 (s)		C4"-OCH ₃

Wykonane badania modelowania aktywności 8-bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu przy użyciu platformy PASS online wykazały, że związek może być inhibitorem glicerofosfotransferazy CDP-glicerol z wysokim prawdopodobieństwem 90,7%. Glicerofosfotransferaza CDP-glicerol odpowiada za polimeryzację głównego łańcucha kwasu teichoowego związanego ze ścianą komórkową bakterii gram-dodatnich. Kwas teichoowy jest ważny w patogeniezie 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).

Obecność w związkach flawonoidowych atomów z grupy fluorowców (bromu, chloru) w pierścieniu A lub B nadają im dodatkowe właściwości biologiczne. W badaniach dowiedziono, że 8-chloro-5,7,3',4'-tetrametoksyepikatechina wykazała działanie przeciwgrzybicze przeciwko ludzkim patogenom, takich jak: *Trichophyton longifusus*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Microsporium canis*, *Fusarium solanii* i *Candida glabrata* nawet w niskich stężeniach. (Bernini, R., Pasqualetti, M., Provenzano, G., & Tempesta, S. (2015). Ecofriendly synthesis of halogenated flavonoids and evaluation of their antifungal activity. New Journal of Chemistry, 39(4), 2980–2987). Z kolei w innych badaniach odnotowano, że dodanie grupy -Br w pozycji 6 (6-bromo-3'-nitroflawon) nadaje właściwości uspakajające, przeciwlękowe czy przeciwdrgawkowe. (Wolfman, C., Viola, H., Marder, M., Ardenghi, P., Wasowski, C., Schröder, N., Izquierdo, I., Rúveda, E., Paladini, A. & Medina, J. H. (1998). Pharmacological characterization of 6-bromo-3'-nitroflavone, a synthetic flavonoid with high affinity for the benzodiazepine receptors. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 61 (3), 239–246.)

Badania *in silico* nad 8-bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonem donoszą, że z prawdopodobieństwem 83,9% może być antagonistą receptorów anafilatoksyn, uniemożliwiając działanie. Anafilatoksyny powstałe w dużych ilościach mogą wywołać wstrząs anafilaktyczny. Odgrywają ważną rolę w zakażeniach i stanach zapalnych. Odpowiadają między innymi za choroby

takie jak posocznica (sepsa), uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne, choroby układu immunologicznego i choroby nadwrażliwości, takie jak astma. (Haas, P. J., & van Strijp, J. (2007). Anaphylatoxins. Immunologie research, 37(3), 161–175).

Wykazano także, że 8-bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon może regulować ekspresję genów CYP3A4 (prawdopodobieństwo 78,2%) oraz CYP3A (prawdopodobieństwo 74,7%). Mediatory zapalne związane z szeregiem stanów chorobowych są zdolne do wywierania głębokiego wpływu na ekspresję genu CYP3A42. Odnotowano, że pacjenci z zapaleniem, szczególnie z podwyższonym poziomem białek ostrej fazy, takich jak białko C-reaktywne (CRP), mają zmniejszoną czynność CYP3A4. Jest to istotne klinicznie u pacjentów z rakiem, ponieważ guzy mogą być źródłem ogólnoustrojowo krążących cytokin. (Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacology & therapeutics, 138(1), 103–141). Regulacja genów CYP3A4 i CYP3A należących do enzymów cytochromu P450 przez 8-bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon, może świadczyć o właściwościach przeciwrakowych, które również potwierdzają badania PASS z prawdopodobieństwem odpowiednio 73,6%.

Zastrzeżenia patentowe

1. 8-Bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 8-bromo-6-chloro-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5, następnie po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 8-bromo-6-chlorochalkon 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 8-bromo-6-chloro-3'-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 0,1 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.

Rysunek

