

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **238123**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **425235**

(22) Data zgłoszenia: **16.04.2018**

(51) Int. Cl.

A61K 31/05 (2006.01)

A61P 13/04 (2006.01)

A61P 13/02 (2006.01)

A61P 13/10 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A23L 33/00 (2016.01)

(54)

Zastosowanie izoksantohumolu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

21.10.2019 BUP 22/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

05.07.2021 WUP 14/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODniczy
WE WROcŁAWIU, Wrocław, PL
POLITECHNIKA WROcŁAWSKA, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**EWA GREŁA, Zielęcice, PL
JOANNA KOZŁOWSKA, Rawicz, PL
MIROŚŁAW ANIOŁ, Wrocław, PL
AGNIESZKA GRABOWIECKA, Wrocław, PL
BARTŁOMIEJ POTANIEC, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 238123 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie izoksantohumolu (4',7-dihydroksy-5-metoksy-8-prenyloflawanonu) hamującego wzrost i aktywność ureolityczną patogenów układu moczowego do wytwarzania leku do leczenia i zapobiegania schorzeń układu moczowego.

Dotychczasowe doniesienia literaturowe opisują izoksantohumol jako związek o słabym działaniu antywirusowym i przeciwgrzybicznym (Mol Nutr Food Res 2005; 49: 827–831).

Z opisu patentowego US 3,839,580 znana jest kompozycja kwasu (p-nitrobenzamido)acetohydroksamowego i jego pochodnych oraz ampicyliny, sulfametoksazolu i nitrofurantoiny do leczenia infekcji układu moczowego wywołanych szczepami *Proteus*.

W opisie patentowym US 4,024,256 opisano metodę leczenia infekcji wywołanych szczepami *Proteus* z zastosowaniem źródła heksametylenotetraaminy (urotropiny) oraz źródła grup hydroksamowych, lub jedynie kwasów hydroksamowych. Z kolei pochodne kwasu hydroksamowego zostały również scharakteryzowane jako efektywne inhibitory ureazy w badaniach przeprowadzonych na szczurach. Wyniki tych badań ujawniają opisy patentowe US 4,083,996 oraz US 4,157,396.

W opisie patentowym US 4,225,526 opisano amid kwasu 8-[(4-aminofenylo)sulfonylo]-amino-2-naftalenylofosforowego, hamujący aktywność całych komórek *Proteus mirabilis* w stężeniach mikromolarnych.

Z kolei w opisie patentu US 4,222,948 ujawniono amidy fosforanów [(4-aminofenylo)-sulfonylo]-amino fenylowych o aktywności antibakteryjnej i antyureolitycznej względem *Proteus mirabilis* i *Escherichia coli*.

W amerykańskim patencie US 8,969,384B2 opisano możliwość wykorzystania pochodnych flawonoidów w profilaktyce i leczeniu zakażeń *Helicobacter pylori*.

Kolejny opis wynalazku US 5,192,277 opisuje możliwość wykorzystania flawonoidów jako składników absorbentu o właściwościach bakteriostatycznych i dezodorujących.

Kolejny opis wynalazku US 5,192,277 opisuje możliwość wykorzystania flawonoidów jako składników absorbentu o właściwościach bakteriostatycznych i dezodorujących.

W japońskim opisie patentowym JP4450355 (B2) mieszaniny flawonów, flawonoli (m.in. kwercetyny), dihydroflawonoli oraz katechin są proponowane jako środek zapobiegający odparzeniom odpieluszki i wydzieleniu amoniaku.

W kolejnym japońskim zgłoszeniu patentowym JP2005065750A uwzględniono ksantohumol jako składnik mieszaniny o właściwościach dezodorujących.

Zgodnie z dostępnymi obecnie danymi literaturowymi wiadomo, że ureaza jest istotnym czynnikiem wirulencji wielu szczepów bakteryjnych. Jako główne przykłady są tu wymieniane pałeczki *Proteus* spp. oraz szczepy *Providencia stuartii*, *Morganella morganii* (Prokaryotes 2006; 6: 245–269), *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. i *Ureaplasma ureolyticum* (Microbes Infect 2000; 2: 533–542). Posiadają one zdolność kolonizacji ludzkiego układu moczowego, a ich aktywność ureolityczna skutkuje podniesieniem pH moczu. Wzrost zasadowości jest bezpośrednio powiązany z wytrącaniem się fosforanów, dodatkowo nasilanym przez tworzenie ośrodków krystalizacji wokół złożeń bakteryjnych. Infekcje stanowią szczególnie problem w przypadku pacjentów długotrwale cewnikowanych, prowadząc w skrajnych przypadkach do całkowitej utraty drożności cewników. Związki będące aktywnymi inhibitorami ureazy są proponowane jako leczenie wspomagające, szczególnie ze względu na wzrastającą oporność patogennych szczepów bakteryjnych na popularnie stosowane antybiotyki.

Obecnie znanych jest wiele grup substancji, ograniczających aktywność ureazy bakteryjnej. Do najbardziej znanych należą amidy kwasu fosforowego, kwasy hydroksamowe, polifenole, chinony, jony metali ciężkich oraz tiole (J Med Chem 2016; 59: 8125). Do najsilniejszych inhibitorów ureazy są zaliczane pochodne fosforoamidowe, z dostępnym komercyjnie N-(diaminofosfinylo)-4-fluorobenzamidem (Flurofamid). Związek ten jest analogiem stanu przejściowego hydrolizy mocznika o IC₅₀ na poziomie nanomolarnym. Jego główną wadą jest niska stabilność hydrolityczna, znacząco ograniczająca zastosowanie terapeutyczne (J Vet Pharmacol Ther 1986; 9: 280).

Kolejnym inhibitorem ureazy stosowanym w medycynie jest kwas acetohydroksamowy, zaakceptowany w 1983 roku przez amerykański Departament Żywności i Leków do użycia w terapii zakażeń układu moczowego. Aktywność inhibitorowa związku bazuje na zdolności do kompleksowania jonów niklu, obecnych w centrum aktywnym ureazy i niezbędnych dla jej aktywności enzymatycznej. Kwas

aceto hydroksamowy jest dostępny komercyjnie pod nazwą Lithostat®, jednak możliwość jego zastosowania jest mocno ograniczona ze względu na szereg działań niepożądanych, m.in. aktywność teratogenną.

Oprócz związków syntetycznych znanych jest również wiele inhibitorów ureazy pochodzenia naturalnego. W tej grupie związków najczęściej wymieniane są pochodne terpenowe, polifenolowe, chinony oraz sfingolipidy (Arch Pharm Chem Life Sci 2016; 349: 519). Do najlepiej opisanych należą flawonoidy, ze szczególnym uwzględnieniem kwercetyny, aktywnej wobec ureazy *Helicobacter pylori* z $IC_{50} = 11,2 \mu M$ (J Agric Food Chem 2012; 60: 10575). Flawonoidy zostały opisane jako niekompetycyjne i odwracalne inhibitory ureazy bakteryjnej. Wykonane modelowanie molekularne pozwoliło na określenie mechanizmu hamowania enzymu: utworzone przez inhibitory wiązania wodorowe blokują pozycję pętli, regulującej dostęp substratu do miejsca aktywnego enzymu.

Ze względu na dużą różnorodność naturalnie występujących flawonoidów oraz możliwość syntezy nowych pochodnych, aktywność antyureolityczna wielu z nich nie została jeszcze poznana. W ostatnich latach został opisany wpływ hamujący ekstraktu z szyszek chmielowych na *Helicobacter pylori*, bez wyznaczenia głównej substancji aktywnej (Czech J Food Sci 2015; 33: 302–307). Izoksantohumol jest znanym składnikiem tego rodzaju ekstraktów, obecnym w stężeniach do kilku $mg L^{-1}$.

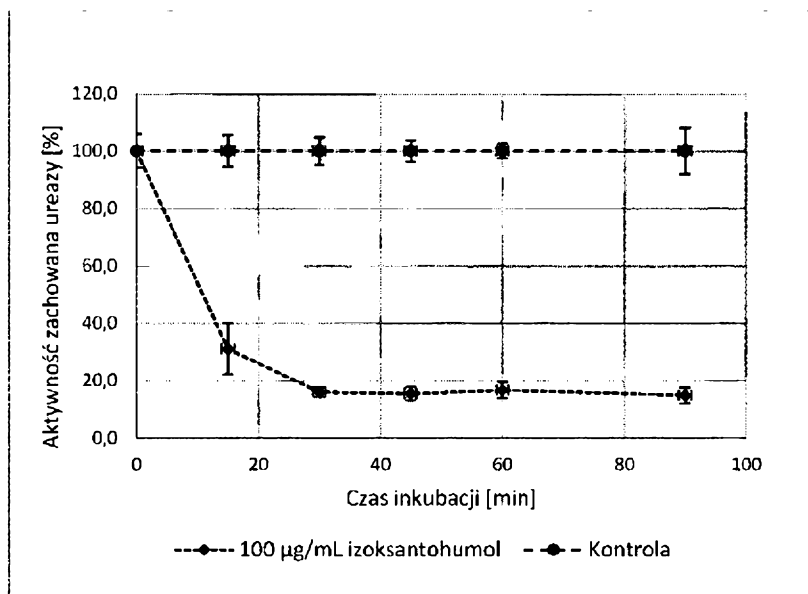
Istotą rozwiązania według wynalazku jest izoksantohumol o wzorze 1 do zastosowania w leczeniu i zapobieganiu kamicy nerkowej, kamicy moczowodu oraz kamienia w obrębie dolnych dróg moczowych, jak również zapalenia pęcherza moczowego.

Korzystnie jest gdy działanie izoksantohumolu polega na tym, że ograniczony zostaje wzrost szczepów *E. coli* i/lub wzrost i aktywność ureolityczna *Proteus* spp., *P. stuartii*, *M. morgani*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. i *Ureaplasma ureolyticum*.

Oznaczenie aktywności antyureolitycznej izoksantohumolu in vitro wobec oczyszczonej ureazy bakteryjnej.

Przykład 1. Aktywność ureolityczną monitorowano poprzez pomiar uwalnianych jonów amonowych wg metody Watherburna. Aktywność inhibitorowa związków została określona za pomocą indofenolowej kolorymetrycznej reakcji Berthelota. Wszystkie stałe kinetyczne zostały obliczone za pomocą programu komputerowego GraphPad Prism 5 wykorzystującego metodę regresji nieliniowej.

Aktywność zachowana ureazy została określona po 15, 30, 45, 60 i 90 minutach preinkubacji z izoksantohumolem o wzorze 1, o stężeniu $100 \mu g mL^{-1}$. Równolegle prowadzona była inkubacja kontrolna bez dodatku izoksantohumolu.



Ureaza *Proteus mirabilis* PCM1360

K_i [$\mu g mL^{-1}$]	$210,6 \pm 19,0$
IC_{50} [$\mu g mL^{-1}$]	$76,7 \pm 4,0$

Badania wstępne pozwoliły na zaobserwowanie efektu hamującego izoksantohumolu względem ureazy *P. mirabilis* PCM1360. Enzym po 15 minutach preinkubacji z izoksantohumolem o stężeniu $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ zachowywał 31% aktywności w stosunku do próby kontrolnej. Efekt hamujący ulegał wzmocnieniu przy wydłużonym czasie inkubacji i osiągał maksymalny poziom po 30 minutach, pozwalając na ograniczenie aktywności enzymu do 16% w badanych warunkach inkubacyjnych. Wyznaczono stężenie inhibitora, które pozwoliło na 50% ograniczenie aktywności enzymu (IC_{50}) oraz stałą inhibicji (K_i), otrzymując odpowiednio wartości $76,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ oraz $210,6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Oznaczenie właściwości antybakteryjnych izoksantohumolu.

P r z y k ł a d 2. Właściwości antybakteryjne izoksantohumolu określono wobec komórek *Proteus mirabilis* PCM1360 poprzez kolorymetryczny pomiar zmiany aktywności wewnątrzkomórkowych dehydrogenaz bakteryjnych, przekształcających rozpuszczalną sól tetrazoliową (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy; MTT) w nierozpuszczalny krystalizujący formazan, którego stężenie po rozpuszczeniu w izopropanolu mierzono spektrofotometrycznie.

Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z procedurą zoptymalizowaną i opisaną względem *P. mirabilis* PCM1360 (AJMB, 2015; 7(4): 159–167). Zawiesinę bakteryjną o gęstości około 10^8 jtk mL^{-1} inkubowano przez godzinę z izoksantohumolem o stężeniu $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, równolegle przygotowywano próbę kontrolną bez izoksantohumolu. Następnie obydwie próby inkubowano z $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ roztworem MTT przez pół godziny. Kolejno do każdej próby dodawano mieszaninę izopropanolu z 1% kwasem solnym w proporcji 1:1. Po minimum 15 minutowej inkubacji dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali 550 nm. Pomiar pozwalał na pośrednie określenie żywotności komórek w stosunku do próby kontrolnej.

Żywotność [%] (test MTT)

15 min	60 min
100	91.5 ± 3.0

Wykazano, że 15 minutowa inkubacja komórek bakteryjnych z izoksantohumolem o stężeniu $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ nie wpływa na ogólną aktywność metaboliczną *P. mirabilis* PCM1360. W przypadku dłuższej – 60 minutowej – obserwowany jest spadek aktywności w stosunku do próby kontrolnej.

P r z y k ł a d 3. Właściwości bakteriobójcze izoksantohumolu określono wobec komórek *Escherichia coli* PCM2057 – szczepu przeznaczonego do określania aktywności antybakteryjnej nowych związków chemicznych. Zastosowano zestaw barwników fluorescencyjnych BacLight®, pozwalający na ilościowe i jakościowe rozróżnienie komórek żywych i martwych w mieszaninie. Komórki inkubowano przez 60 minut z badanym związkiem, następnie przemyto i wybarwiono zgodnie z zaleceniami producenta. Ilość żywych komórek w mieszaninie [%] określono na podstawie względnej fluorescencji wybarwionych komórek bakteryjnych. Próby wykonano w obecności izoksantohumolu o stężeniu $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Żywe komórki [%] (BacLight®)

60 min
18.8 ± 0.6

Zgodnie z zastosowaną metodą, 60 minutowa inkubacja *E. coli* PCM2057 z izoksantohumolem o stężeniu $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ pozwala na uśmiercenie ponad 80% komórek obecnych w mieszaninie.

P r z y k ł a d 4. Właściwości bakteriostatyczne izoksantohumolu wobec komórek *Proteus mirabilis* PCM1360 oraz *Escherichia coli* PCM2057 zbadano zgodnie ze standardową procedurą CLSI (CLSI document M07-A9, 2012), pozwalającą na określenie Minimalnych Stężeń Hamujących (MIC).

<i>E. coli</i> PCM2057		<i>P. mirabilis</i> PCM1360	
MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀
$[\mu\text{g mL}^{-1}]$	$[\mu\text{g mL}^{-1}]$	$[\mu\text{g mL}^{-1}]$	$[\mu\text{g mL}^{-1}]$
50	>200	200	>200

W badanym zakresie stężeń scharakteryzowano wartości Minimalnego Stężenia Hamującego izoksantohumolu, które pozwalały na ograniczenie wzrostu *E. coli* PCM2057 i *P. mirabilis* PCM1360 o 50% względem próby kontrolnej (MIC_{50}). Izoksantohumol wykazał silniejsze działanie bakteriostatyczne wobec *E. coli* PCM2057 ($MIC_{50} = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$) niż względem *P. mirabilis* PCM1360 ($MIC_{50} = 200 \mu\text{g mL}^{-1}$) po 24 h inkubacji.

Oznaczanie hamującego wpływu izoksantohumolu na aktywność ureolityczną całych komórek *Proteus mirabilis*.

P r z y k ł a d 5. Efektywność redukowania aktywności ureazy w pełnych komórkach badano pośrednio, mierząc stężenie jonów amonowych powstających w reakcji hydrolizy mocznika (PLoS ONE 2017; 12(8): e0182437). Próby inkubacyjne zawierały żywe komórki szczepu *Proteus mirabilis* PCM1360 o gęstości 107 jtk mL^{-1} zawieszony w buforze fosforanowym o $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$ zawierającym 100 mM mocznik. Aktywność zachowana komórek bakteryjnych została określona po 30 minutach pre-inkubacji z izoksantohumolem o stężeniu $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Całe komórki *Proteus mirabilis* PCM1360

Aktywność zachowana [%] po 30 min	100
$IC_{50} [\mu\text{g mL}^{-1}]$	$174,6 \pm 10,6$

Określono stężenie, pozwalające na ograniczenie aktywności ureolitycznej całych komórek *P. mirabilis* o 50% względem próby kontrolnej (IC_{50}). Ze względu na wyniki otrzymane na oczyszczonej ureazie, pomiar wykonano po 30 minutach inkubacji z izoksantohumolem, uzyskując $IC_{50} = 174,6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Powyższe wyniki przedstawiają komplet oznaczeń *in vitro*, pozwalających na dokładne określenie właściwości antibakteryjnych i antyureolitycznych izoksantohumolu o wzorze **1**, względem najpopularniejszych patogenów układu moczowego. Wykazano charakterystykę antibakteryjną izoksantohumolu względem *E. coli* PCM2057. 60 minutowa inkubacja zawiesiny bakteryjnej z badanym związkiem o stężeniu $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ pozwalała na uśmiercenie 80% komórek. Standardowe oznaczenia Minimalnego Stężenia Hamującego izoksantohumolu pozwoliły na określenie wartości MIC_{50} względem *E. coli* PCM2057 na poziomie $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Wyznaczona aktywność bakteriostatyczna wobec wzorcowego szczepu *E. coli* PCM2057 jest szczególnie istotną charakterystyką, ponieważ udowadnia możliwość ograniczenia aktywności tego najpopularniejszego patogenu układu moczowego. Związek hamował również wzrost *P. mirabilis* PCM1360 z MIC_{50} równym $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

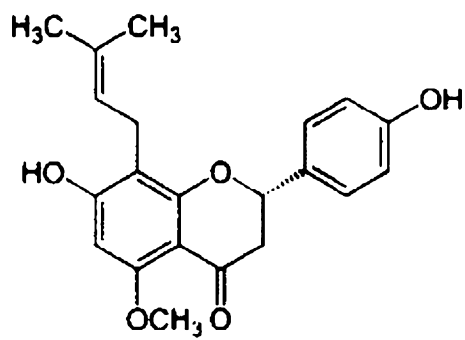
Otrzymane wartości znajdują się na poziomie porównywalnym do innych znanych, efektywnych związków antibakteryjnych pochodzenia naturalnego.

Izoksantohumol został określony jako inhibitor ureazy *P. mirabilis* PCM 1360, zarówno w układzie zawierającym oczyszczony enzym jak i całe komórki. Wyznaczone wartości IC_{50} wynosiły $76,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ w przypadku badań prowadzonych na oczyszczonym enzymie i $174,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ w badaniach na całych komórkach. Ze względu na wysoką konserwatywność budowy miejsca aktywnego bakteryjnych ureaz oraz znany mechanizm inhibicji ureazy przez flawonoidy można określić izoksantohumol jako efektywny inhibitor ureaz bakteryjnych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Izoksantohumol o wzorze **1** do zastosowania w leczeniu i zapobieganiu kamicy nerkowej, kamicy moczowodu oraz kamienia w obrębie dolnych dróg moczowych, jak również zapalenia pęcherza moczowego.
2. Izoksantohumol o wzorze **1** do zastosowania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ograniczony zostaje wzrost szczepów *E. coli* i/lub wzrost i aktywność ureolityczna *Proteus* spp., *P. stuartii*, *M. morgani*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. i *Ureaplasma ureolyticum*.

Rysunek



Wzór 1