

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246026 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440843**

(22) Data zgłoszenia: **2022.04.01**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.10.02 BUP 40/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.11.18 WUP 47/2024**

(51) MKP:

C07H 15/203 (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:

AGNIESZKA KRAWCZYK-ŁEBEK, Wrocław, PL

EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL

MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL

TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

**4-Hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon i sposób
wytwarzania 4-hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu**

PL 246026 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 4-hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania 4-hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu.

4-Hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon może znaleźć zastosowanie jako związek przeciwdrobnoustrojowy, przeciwnowotworowy, hepato- i kardioprotekcyjny oraz potencjalny słodzik w preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych oraz produktach spożywczych.

Naturalne flawonoidy z jedną lub kilkoma grupami metylowymi występują w roślinach sporadycznie. Z azjatyckiego drzewa *Syzygium nervosum* (*Cleistocalyx operculatus*) izolowano C- i O-metylowane chalkony: (E)-4,2',4'-trihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon, (E)-2',4'-dihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon, (E)-2',4'-dihydroksy-6'-metoksy-3'-metylochalkon, (E)-2,2',4'-trihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon. Związki te wykazywały silną inhibicję wobec enzymów pochodzących od dwóch szczepów wirusa grypy: H1N1 oraz H9N2. Blokowały one działanie neuraminidaz, umożliwiającą wirusom opuszczanie zakażonych komórek poprzez rozkład ich błon komórkowych (Dao T. T., Tung B. T., Nguyen P. H., Thuong P. T., Yoo S. S., Kim E. H., Kim S. K., Oh W. K. C-methylated flavonoids from *Cleistocalyx operculatus* and their inhibitory effects on novel influenza A (H1N1) neuraminidase. *Journal of Natural Products* 2010, 73, 1636–1642).

Dihydrochalkony wykazują słodki smak i mogą znaleźć zastosowanie jako prozdrowotne słodziki (Janeczko T., Gładkowski W., Kostrzewa-Susłow E. Microbial transformations of chalcones to produce food sweetener derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2013, 98, 55–61; Łuźny M., Kozłowska E., Kostrzewa-Susłow E., Janeczko T. Highly effective, regiospecific hydrogenation of methoxychalcone by *Yarrowia lipolytica* enables production of food sweeteners. *Catalysts* 2020, 10, 1135). Najlepiej poznany i zbadany dihydrochalkon pozyskiwany ze skórek owoców cytrusowych – dihydrochalkon neohesperydyny (E-959) został dopuszczony do stosowania jako słodzik i substancja wzmacniająca smak, a jego zastosowanie reguluje Rozporządzenie Komisji Europejskiej nr 1129/2011 z 11 listopada 2011 r.

Większość flawonoidów, poza katechinami, jest obecna w roślinach w połączeniu z cukrami, jako β-glikozydy. Glikozylacja skutkuje: wzrostem rozpuszczalności w wodzie i stabilności cząsteczki flawonoidu oraz przyswajalności przyjmowanych z pokarmem związków flawonoidowych. Zasadniczo glikozydy są jedynymi glikozydami, które mogą być absorbowane w jelicie cienkim. Natomiast flawonoidy niezaabsorbowane w jelicie cienkim oraz zaabsorbowane flawonoidy wydzielone z żółcią ulegają degradacji wraz z rozerwaniem struktury pierścieniowej przez mikroorganizmy (Hollman, P. C. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 2004, 42, 74–83, Plaza, M.; Pozzo, T.; Liu, J.; Gulshan Ara, K. Z.; Turner, C.; Nordberg Karlsson, E. Substituent effects on *in vitro* antioxidant properties, stability, and solubility in flavonoids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2014, 62, 3321–3333).

Znany jest szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2 ujawniony w zgłoszeniu patentowym o numerze P416996.

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 4-hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu.

Istotą wynalazku jest 4-hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon.

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 2'-hydroksy-4-metylochalkon, 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. 4-Hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w drugim 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 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 przyłączenie 4-metoksy- β -D-glukozy przy C-2', hydroksylacja przy C-4- CH_3 oraz redukcja wiązania podwójnego. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą (octan etylu).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 4-hydroksymetylo-2'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu 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 2'-hydrokso-4-metylochalkonu 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, w drugim paśmie od linii startu.

Na tej drodze otrzymuje się 6,6 mg 4-hydroksymetylo-2'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu (wydajność 7,3%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

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

Sygnały pochodzące od protonów szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od protonów jednostki cukrowej		
δ [ppm]	J [Hz]	H	δ [ppm]	J [Hz]	H
3,41 (m)		α	5,06 (d)	7,8	1''
2,97 (t)	7,5	β	3,50 (m)		2''
7,26 (d)	8,3	2	3,63 (td)	9,0; 4,3	3''
7,23 (d)	8,3	3	3,22 (dd)	9,6; 9,1	4''
7,23 (d)	8,3	5	3,50 (m)		5''
7,26 (d)	8,3	6	3,84 (ddd)	11,6; 5,3; 2,2	6''
7,29 (dd)	8,4; 0,7	3'	3,56 (s)		C4''-OCH ₃
7,47 (ddd)	8,4; 7,3; 1,8	4'	4,60 (d)	4,2	2''-OH
7,10 (td)	7,6; 1,0	5'	4,39 (d)	4,4	3''-OH
7,57 (dd)	7,7; 1,8	6'	3,74 (dd)	6,8; 5,4	6''-OH
4,58 (d)	5,7	C4-CH ₂ -			
4,08 (t)	5,8	C4-CH ₂ -OH			

Symulacje komputerowe przy użyciu platformy SwissADME, służącej do oceny farmakokinetyki i przydatności małych cząsteczek jako leków, wykazały wzrost rozpuszczalności w wodzie 4-hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu względem 2'-hydroksy-4-metylochalkonu. Ponadto związek ten może być aktywnie transportowany w organizmie przez glikoproteinę P w przeciwieństwie do swojego aglikonu i w wysokim stopniu absorbowany w układzie pokarmowym człowieka. Symulacje przeprowadzone z użyciem programu PASS online służącego do przewidywania m.in. biologicznej aktywności, efektów farmakologicznych i mechanizmu działania związków chemicznych na podstawie ich struktury wykazały, 4-hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon z 94% prawdopodobieństwem będzie wykazywał działanie przeciwdrobnoustrojowe, na przykład jako inhibitor glicerofosfotransferazy CDP-glicerolu odpowiedzialnej za polimeryzację łańcuchów kwasów teichojowych, które odrywają kluczową rolę w nadawaniu kształtu komórce bakteryjnej, integracji otoczki, tworzeniu biofilmu, a w konsekwencji patogenezie bakterii gram-dodatnich (Brown S., Meredith T., Swoboda J., Walker S. *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* W23 make polyribitol wall teichoic acids using different enzymatic pathways. *Chemistry & biology* 2010, 17(10), 1101–1110).

Symulacje pokazują również, że 4-hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon może działać przeciwbakteryjnie przeciwko między innymi *Clostridium cadaveris*, *Mycobacterium ulcerans*, *Acinetobacter pittii*, czy opornemu szczepowi *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* RN4220.

Związek ten z 90% prawdopodobieństwem będzie wykazywał aktywność antykancerogenną poprzez inhibicję monoooksygenazy monofenolowej (tyrozynazy), której zwiększona aktywność związana jest z rozwojem czerniaka złośliwego (James E. Talmadge, Kenneth H. Cowan. *Gene Therapy in Oncology, Abeloff's Clinical Oncology* (Fifth Edition), 2014), a także ochronną na wątrobę oraz układ sercowo-naczyniowy (ze względu na swoją aktywność przeciwną do aktywności cholesterolu). Symulacje wskazują również, że 4-hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon może znaleźć zastosowanie jako słodzik.

Zastrzeżenia patentowe

1. 4-Hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon o wzorze 2.
2. Sposób otrzymywania 4-hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu, **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 2'-hydroksy-4-metylochalkon 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 4-hydroksymetylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon o wzorze 2 znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w drugim 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 cienkwarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform : metanol w stosunku objętościowym 9:1.

Rysunek

