

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238127**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **425241**

(22) Data zgłoszenia: **16.04.2018**

(51) Int.Cl.

A61K 31/12 (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 2'-hydroksychalkonu

(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 GRELA, Zielęcice, PL

JOANNA KOZŁOWSKA, Rawicz, PL

MIROSŁAW ANIOŁ, Wrocław, PL

AGNIESZKA GRABOWIECKA, Wrocław, PL

BARTŁOMIEJ POTANIEC, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 238127 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie 2'-hydroksychalkonu hamującego wzrost i aktywność ureolityczną patogenów układu moczowego do wytwarzania leku do leczenia i zapobiegania schorzeń układu moczowego.

Dotychczasowe doniesienia literaturowe opisują umiarkowaną aktywność antybakteryjną 2'-hydroksychalkonu wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. (International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy 2013; 7:102–119).

Z opisu patentowego US 3,839,580 znana jest kompozycja kwasu (p-nitrobenzamido) aceto-hydroksamowego 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 US4,083,996 oraz US 4,157,396.

W opisie patentowym US 4,225,526 opisano amid kwasu 8-[(4-aminofenilo)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-aminofenilo)-sulfonylo]amino fenylowych o aktywności antybakteryjnej 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 odpiełuszkowym i wydzielaniu amoniaku.

W kolejnym japońskim zgłoszeniu patentowym JPS5488289 (A) zaproponowano (-)- α -(chalkono-4'-karbonyloamino)-benzylopenicylinę jako związek antybakteryjny, skuteczny przeciwko szczepom *Proteus*.

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 złogów bakteryjnych. Infekcje stanowią szczególny 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 aceto-hydroksamowy, 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. Wiele inhibitorów bakteryjnych ureaz zostało również zidentyfikowanych wśród chalkonów i ich pochodnych (J Iran Chem, 2014; 11:1113–1119). 2'-hydroksychalkon został określony jako nieaktywny względem ureazy roślinnej (Chemistry & Biodiversity, 2005; 2:487–496). 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 wyznaczania głównej substancji aktywnej (Czech J Food Sci 2015; 33: 302–307). Izoksantohumol jest znanym składnikiem tego rodzaju ekstraktów, obecnym w stężeniach do kilku $mg L^{-1}$.

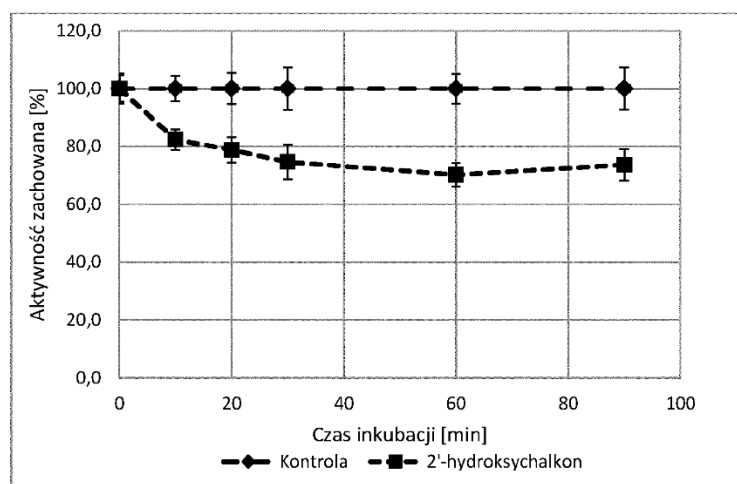
Istotą rozwiązania według wynalazku jest 2'-hydroksychalkon o wzorze 1 do zastosowania w leczeniu i zapobieganiu kamicy nerkowej, kamicy moczowodu oraz kamienia w obrębie dolnych dróg moczowych, jak również zapalenia pęcherza moczowego.

Korzystnie jest gdy działanie 2'-hydroksychalkonu polega na tym, że ograniczony zostaje wzrost szczepów *E. coli* i/lub wzrost i aktywność ureolityczna *Proteus* spp., *P. stuartii*, *M. morganii*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. i *Ureaplasma ureolyticum*.

Oznaczanie aktywności antyureolitycznej 2'-hydroksychalkonu *in vitro* wobec oczyszczonej ureazy bakteryjnej.

P r z y k ł a d 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 2'-hydroksychalkonem o wzorze 1, o stężeniu $100 \mu g mL^{-1}$. Równolegle prowadzona była inkubacja kontrolna bez dodatku 2'-hydroksychalkonu.



Ureaza *Proteus mirabilis* PCM1360

$K_i [\mu g mL^{-1}]$	$312,1 \pm 35,2$
$IC_{50} [\mu g mL^{-1}]$	$204,2 \pm 12,8$

Badania wstępne pozwoliły na zaobserwowanie efektu hamującego 2'-hydroksychalkonu względem ureazy *P. mirabilis* PCM1360. Inkubacja oczyszczonej ureazy *P. mirabilis* PCM1360 z $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 2'-hydroksychalkonem pozwoliła na ograniczenie aktywności ureolitycznej o około 25%. Wyznaczono stężenie 2'-hydroksychalkonu, pozwalające na 50% ograniczenie aktywności ureazy (IC_{50}) oraz stałą inhibicji (K_i), otrzymując odpowiednio wartości $204,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ oraz $312,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Oznaczenie właściwości antybakteryjnych 2'-hydroksychalkonu.

P r z y k ł a d 2. Właściwości antybakteryjne 2'-hydroksychalkonu 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-difenylo-1,3,4-tetrazoliowy; 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 2'-hydroksychalkonem o stężeniu $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, równolegle przygotowywano próbę kontrolną bez 2'-hydroksychalkonu. 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
69.7 ± 11.8	59.0 ± 2.4

Wykazano, że 15-minutowa inkubacja komórek bakteryjnych z 2'-hydroksychalkonem o stężeniu $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ pozwala na ograniczenie aktywności metabolicznej *P. mirabilis* PCM1360 o około 30%. Obserwowany efekt ulega wzmocnieniu w czasie – po 60 min inkubacji aktywność komórek jest ograniczona o blisko 40%.

P r z y k ł a d 3. Właściwości bakteriobójcze 2'-hydroksychalkonu 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 2'-hydroksychalkonu o stężeniu $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Żywe komórki [%] (BacLight®)

60 min

$44,9 \pm 4,8$

Zgodnie z zastosowaną metodą, 60 minutowa inkubacja *E. coli* PCM2057 z 2'-hydroksychalkonem o stężeniu $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ pozwala na uśmiercenie około 50% komórek obecnych w mieszaninie.

P r z y k ł a d 4. Właściwości bakteriostatyczne 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}
$[\mu\text{g mL}^{-1}]$	$[\mu\text{g mL}^{-1}]$	$[\mu\text{g mL}^{-1}]$	$[\mu\text{g mL}^{-1}]$
100	>200	>200	>200

W badanym zakresie stężeń scharakteryzowano wartości Minimalnego Stężenia Hamującego 2'-hydroksychalkonu, które pozwalały na ograniczenie wzrostu *E. coli* PCM2057 o 50% względem próby kontrolnej (MIC_{50}). 2'-hydroksychalkon 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 2'-hydroksychalkonu na aktywność ureolityczną całych komórek *Proteus mirabilis*.

P r z y k ł a d 4. 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 10^7 jtk mL^{-1} zawieszone w buforze fosforanowym o pH $7,2 \pm 0,2$ zawierającym 100 mM mocznik. Aktywność zachowana komórek bakteryjnych została określona po 30 minutach pre-inkubacji z 2'-hydroksychalkonem o stężeniu $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Całe komórki *Proteus mirabilis* PCM1360

Aktywność zachowana [%] po 30 min	$57,9 \pm 6,5$
$IC_{50} [\mu\text{g mL}^{-1}]$	$190,3 \pm 19,8$

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 2'-hydroksychalkonem, uzyskując $IC_{50} = 190,3 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Powyższe wyniki przedstawiają komplet oznaczeń *in vitro*, pozwalających na dokładne określenie właściwości antybakteryjnych i antyureolitycznych 2'-hydroksychalkonu o wzorze 1, względem najpopularniejszych patogenów układu moczowego. Wykazano charakterystykę antybakteryjną 2'-hydroksychalkonu względem *E. coli* PCM2057. 60 minutowa inkubacja zawiesiny bakteryjnej z badanym związkiem o stężeniu $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ pozwalała na uśmiercenie 50% komórek. Standardowe oznaczenia Minimalnego Stężenia Hamującego 2'-hydroksychalkonu pozwoliły na określenie wartości MIC_{50} względem *E. coli* PCM2057 na poziomie $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Wyznaczona aktywność bakteriostatyczna wobec wzorcowego szczepu *E. coli* PCM2057 jest szczególnie istotną charakterystyką, ponieważ udowadnia możliwość ograniczenia aktywności tego najpopularniejszego patogenu układu moczowego.

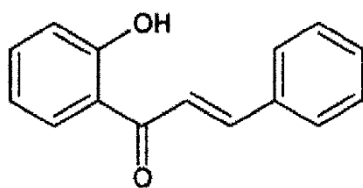
Otrzymane wartości znajdują się na poziomie porównywalnym do innych znanych, efektywnych związków antybakteryjnych pochodzenia naturalnego.

2'-hydroksychalkon został określony jako inhibitor ureazy *P. mirabilis* PCM1360, zarówno w układzie zawierającym oczyszczony enzym jak i całe komórki bakteryjne. Wyznaczone wartości IC_{50} wynosiły $204,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ w przypadku badań prowadzonych na oczyszczonym enzymie i $190,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ w badaniach na całych komórkach. Otrzymany wynik jest porównywalny z wartościami uzyskanymi dla substancji kontrolnych – kwercyiny ($IC_{50} = 229,8 \pm 18,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) i naringeniny ($IC_{50} = 262,0 \pm 35,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) – flawonoidów będących znanymi inhibitorami ureazy.

Ze względu na wysoką konserwatywność budowy miejsca aktywnego bakteryjnych ureaz oraz znany mechanizm inhibicji ureazy przez flawonoidy można określić 2'-hydroksychalkon jako efektywny inhibitor ureaz bakteryjnych.

Zastrzeżenia patentowe

1. 2'-Hydroksychalkon 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. 2'-Hydroksychalkon 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**Wzór1**