

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **240097**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429217**

(22) Data zgłoszenia: **11.03.2019**

(51) Int.Cl.

C07H 17/07 (2006.01)

C12P 19/60 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(54) **8-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawon i sposób wytwarzania
8-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
21.09.2020 BUP 20/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
14.02.2022 WUP 07/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MATEUSZ ŁUŻNY, Wrocław, PL
EWA KOZŁOWSKA, Wrocław, PL
TOMASZ TRONINA, Międzybórz, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 240097 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 8-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawon i sposób wytwarzania 8-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawonu.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do wytwarzania składników preparatów poprawiających funkcjonowanie przewodu pokarmowego.

Flawony są syntezowane przez rośliny i stanowią składnik naszej diety o wysokim potencjale antyoksydacyjnym oraz zdolności do modulowania różnych układów enzymatycznych związanych z wieloma chorobami (Mughal E.U., Ayaz M., Hussain Z., Hasan A., Sadiq A., Riaz M., Malik A., Hussain S., Choudhary M.I. 2006. Synthesis and antibacterial activity of substituted flavones, 4-thioflavones and 4-iminoflavones. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 4704–4711). Zarówno naturalne, jak i półsyntetyczne oraz syntetyczne flawony zostały scharakteryzowane pod kątem szeregu działań terapeutycznych, takich jak działania przeciwzapalne, przeciwestrogenowe, przeciwdrobnoustrojowe (Cushnie T.P.T., Lamb A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26: 343–35), przeciwalergiczne, przeciwutleniające, przeciwnowotworowe czy też cytotoksyczne (Havsteen B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32: 1141–1148; Aregawi M., Williams R., Dye C., Cibulskis R., Otten M. 2008. World Malaria 2008, World Health Organization (WHO): Geneva). 2',5'-dimetoksyflawon był wyizolowany z kultury tkankowej rośliny leczniczej *Primula veris*, z której wykonuje się preparaty wykrztuśne (Jaromir Budzianowski, Maria Morozowska, Maria Wesołowska. Lipophilic flavones of *Primula veris* L. from field cultivation and *in vitro* cultures. *Phytochemistry* 66 (2005) 1033–1039).

2'-metoksyflawon jest aktywnym czynnikiem wywołującym apoptozę indukowaną przez TRAIL w ludzkich białaczkowych komórkach MOLT-4 (Benjawan Wudtiwai, Bungorn Sripanidkulchai, Prachya Kongtawelert, Ratana Banjerdpongchai. Methoxyflavone derivatives modulate the effect of TRAIL-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *Journal of Hematology&Oncology* 2011, 4:52). Obecność jednostki cukrowej ma wpływ na stabilność i rozpuszczalność flawonoidów, a często także wpływa na ich biodostępność i bioaktywność (Wang X. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS Lett.* 2009; 583(20):3303–9; Wang L., Han W., Xie C., Hou J., Fang Q., Gu J., et al. Comparing the acceptor promiscuity of a *Rosa hybrid* aglucosyltransferase RhGT1 and an engineered microbial glucosyltransferase OleDPSA toward a small flavonoid library. *Carbohydr Res.* 2013; 368:73–7; Pandey R.P., Gurung R.B., Parajuli P., Koirala N., Tuoi L.T., Sohng J.K. Assessing acceptor substrate promiscuity of YjiC-mediated glycosylation toward flavonoids. *Carbohydr Res.* 2014; 393:26–31).

W literaturze nie ma doniesień dotyczących uzyskania 8-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawonu.

Szczep *Isaria fumosorosea* KCh J2 był wcześniej ujawniony w literaturze (Dymarska M., Grzeszczuk J., Urbaniak M., Janeczko T., Płaskowska E., Stępień Ł., Kostrzewa-Susłow E.; (2017) The new strain of *Isaria fumosorosea* KCh J2 efficiently biocatalyses glycosylation of 6-methylflavone. *Plos One.* 12, e.0184885; Kozłowska E., Dymarska M., Kostrzewa-Susłow E.; Janeczko T., (2017) *Isaria fumosorosea* KCh J2 entomopathogenic strain as an effective biocatalyst for steroid compound transformations. *Molecules*, 22, 1511, doi:10.3390.).

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCh J2. Po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 2'-metoksyflawon, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą.

Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 3 doby. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie. Produkt znajduje się we frakcji o wyższej polarności.

W wyniku regioselektywnej hydroksylacji i 4"-O-metyloglikozytacji otrzymuje się 8-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawon, a reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Isaria fumosorosea* KCh J2.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,2 g : 1 L.

Korzystnie także jest, gdy proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 7 dni.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCh J2, następuje regioselektywna hydroksylacja i 4"-O-metyloglikozylacja substratu. 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-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawonu, z wydajnością izolowaną na poziomie 10% (konwersją według HPLC ≤12%), w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

P r z y k ł a d. Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 5 g aminobaku i 15 g glukozy, wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCh J2. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 2'-metoksyflawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 2 cm³ dimetylosuflotlenku (DMSO).

Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 3 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaniny chloroform i metanol 9:1. Produkt znajduje się we frakcji o wyższej polarności.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR (600 MHz) (DMSO) δ (ppm):

3.27 (dd, 1H, *J* = 9.7, 8.9 Hz, H-4"), 3.53 (ddd, 1H, *J* = 9.7, 4.7, 2.1 Hz, H-5"), 3.61 (dd, 1H, *J* = 12.5, 4.4 Hz, H-2"), 3.64–3.74 (m, 2H, H-3" and one of H-6"), 3.85 (ddd, 1H, *J* = 10.9, 4.8, 2.0 Hz, one of H-6"), 4.03 (s, 3H, C-3"-OCH₃), 5.18 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H-1"), 7.10 (s, 1H, H-3), 7.16 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 7.4, 1.1 Hz, H-5'), 7.25 (dd, 1H, *J* = 8.4, 0.9 Hz, H-3'), 7.35 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-6), 7.56 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 7.4, 1.8 Hz, H-4'), 7.61 (dd, 1H, *J* = 8.1, 1.5 Hz, H-7), 7.74 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.5 Hz, H-5), 8.22 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.7 Hz, H-6').

¹³C NMR (151 MHz, Acetone-d₆) δ = 56.36 (C-4"-OCH₃), 60.58 (C-4"-OCH₃), 61.99 (C-6"), 75.02 (C-2"), 77.21 (C-5"), 78.13 (C-3"), 80.01 (C-4"), 102.24 (C-1"), 112.68 (C-3), 113.06 (C-3'), 118.59 (C-5), 120.84 (C-7), 121.26 (C-1'), 121.83 (C-5'), 125.43 (C-6), 125.76 (C-4a), 130.59 (C-6'), 133.51 (C-4'), 147.70 (C-8a), 148.02 (C-8), 159.23 (C-2'), 160.88 (C-2), 178.08 (C-4).

Zastrzeżenia patentowe

1. 8-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 8-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawonu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów stępkowych wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCh J2, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 2'-metoksyflawon o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszącym się z wodą, transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 1 dobę, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie, a produkt znajduje się we frakcji o wyższej polarności.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,2 g:1 L.
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 7 dni.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że mieszaninę poreakcyjną oczyszcza się, używając jako eluentu mieszaniny chloroform i metanol 9:1.

Rysunki

