

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244215 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **436247**

(22) Data zgłoszenia: **2020.12.06**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.06.13 BUP 24/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.12.18 WUP 51/2023**

(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:

MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL

EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL

TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

7-Metoksy-4'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon i sposób wytwarzania

7-metoksy-4'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu

PL 244215 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 7-metoksy-4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania 7-metoksy-4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu.

7-Metoksy-4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon może znaleźć zastosowanie jako związek przeciwutleniający i przeciwdrobnoustrojowy w preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych oraz produktach spożywczych.

Źródła literaturowe podają, że metoksyłowe pochodne flawonoidowe mają zdolność do łatwego penetrowania do wnętrza komórek, co jest cechą bardzo pożądaną przy tworzeniu nowych środków leczniczych. Po przeniesieniu linii komórkowych płuc do medium, w którym znajdowały się dimetoksyflawony, już po pięciu minutach komórki zakumulowały 30–50 razy więcej badanych związków, niż znajdowało się w otaczającym je buforze. Badania dowodzą, że związki te łatwo penetrują również komórki serca, płuc, piersi czy mózgu.

Międzykomórkowy transport 5,7-dimetoksyflawonu był około 10-krotnie wyższy niż chryzyny (5,7-dihydroksyflawonu). Może być to wynikiem faktu, że metoksyłowe pochodne flawonoidów nie są tak szybko metabolizowane, jak ich hydroksyłowe odpowiedniki. Dzięki temu ich biodostępność w podaniu doustnym przewyższa biodostępność hydroksyłowych pochodnych flawonoidów.

4',5,7-trimetoksyflawon około ośmiokrotnie skuteczniej hamował namnażanie komórek płaskonabłonkowego nowotworu jamy ustnej niż jego hydroksypochodna – apigenina (4',5,7-trihydroksyflawon). W przypadku linii komórkowych nowotworu piersi MCF-7 7-metoksyflawon działał silniej przeciwnowotworowo, niż 7-hydroksyflawon (Walle, T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin. Cancer Biol.* 2007, 17, 354–362).

7-Metoksyflawanon jest związkiem pochodzenia naturalnego obecnym między innymi w roślinie *Oxytropis falcate* Bunge stosowanej w tybetańskiej medycynie ludowej. Związek ten działa antyproliferacyjnie w stosunku do komórek nowotworu piersi, hamuje aromatazę cytochromu P450, co ma duże znaczenie w terapii hormonozależnych nowotworów, jest antyoksydantem. Badania na myszach wykazały, że 7-metoksyflawanon przyjmowany doustnie ma działanie przeciwzapalne i ochronne w stosunku do komórek nerwowych w mózgu (Qu, Z., Chen, Y., Luo, Z.-H., Shen, X.-L., Hu, Y.-J. 7-methoxyflavone alleviates neuroinflammation in lipopolysaccharide-stimulated microglial cells by inhibiting TLR4/MyD88/MAPK signalling and activating the Nrf2/NQO-1 pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2020, 72(3), 385–395).

7-Metoksyflawanon hamuje wzrost *Trichoderma koningii*, *Fusarium oxysporum* i *Cladosporium cladosporioides*, saprofitycznych grzybów będących potencjalnymi patogenami ludzkimi (Bernini, R., Pasqualetti, M., Provenzano, G., Tempesta, S. Ecofriendly synthesis of halogenated flavonoids and evaluation of their antifungal activity. *New Journal of Chemistry* 2015, 39, 2980–2987).

Uważa się, że glikozydy flawonoidowe przed absorpcją w układzie pokarmowym muszą zostać poddane hydrolizie przez mikroflorę jelitową do odpowiednich aglikonów. Dowiedziono jednak, że częściowa absorpcja połączeń cukrowych flawonoidów również jest możliwa.

Cząsteczka glukozy przyłączona w pozycji 3 kwercetyny (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon) zwiększała absorpcję tego związku w jelicie cienkim do 52%, w porównaniu z 24% absorpcją aglikonu kwercetyny i 17% rutynozydu kwercetyny (Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 2002, 13, 572–584, Hollman, R. C.; Bijsman, M. N.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. P.; de Vries, J. H.; Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic. Res.* 1999, 31, 569–573).

Flawonoidy w roślinach występują wyłącznie w połączeniu z jednostkami cukrowymi. Glikozylacja skutkuje wzrostem rozpuszczalności cząsteczki flawonoidu w wodzie i wzrostem jego stabilności. Dzięki temu zwiększa się przyswajalność przyjmowanych z pokarmem związków flawonoidowych (J. Xiao, T.S. Muzashvili, M.I. Georgiev, *Biotechnology Advances*, 2014, 32, 1145–1156, Plaza, M.; Pozzo, T.; Liu, J.; Gulshan Ara, K. Z.; Turner, C.; Nordberg Karlsson, E. Substituent effects on in vitro antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 3321–3333).

Znany jest szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2 ujawniony w zgłoszeniu patentowym o numerze P.416996.

W ostatnich latach, w leczeniu różnych chorób i ich zapobieganiu, coraz większe znaczenie zyskują związki pochodzenia naturalnego oraz ich odpowiedniki uzyskane metodami biotechnologicznymi. 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 7-metoksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu.

Istotą wynalazku jest 7-metoksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon.

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 7-metoksyflawanon, 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. 7-Metoksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon znajduje się we frakcji o wyższej polarności, w drugim paśmie od linii startu.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,2 mg : 1 cm³.

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

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 6 dni.

Korzystnie również jest, gdy oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym złożonym z chloroformu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje hydroksylacja i przyłączenie 4-metoksy- β -D-glukozy przy C-4'. 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 7-metoksy-4'-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 sacharozy, wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 7-metoksyflawanonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ tetrahydrofuranu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 6 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 wyższej polarności, w drugim paśmie od linii startu.

Na tej drodze otrzymuje się 4,1 mg 7-metoksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu (wydajność 3,3%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

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 glikozydowej		
δ [ppm]	J [Hz]	H	CUKIER δ [ppm]	J [Hz]	H
5,55 (dd)	$J_{2,3A}=12,8$ $J_{2,3E}=2,9$	H-2	4,98	$J=7,8$ $J=2,2$	1C
3,07 (ddd)	$J_{3A,3E}=16,0$, $J_{3A,2}=12,9$, 3,1	H-3 _A	3,48 (m)		2C
2,74 (ddd)	$J_{3E,3A}=16,8$, $J_{3E,2}=2,9$, 2,0	H-3 _E	3,63 (m)		3C
7,76 (d)	$J_{5,6}=8,8$	H-5	3,22 (t)	$J=9,3$	4C
6,65 (dd)	$J_{6,5}=8,8$ $J_{5,6,8}=2,5$	H-6	3,48 (m)		5C
		H-7	3,84 (ddd) 3,69 (ddd)	$J=11,4$, 5,0, 2,0 $J=11,5$, 6,6, 4,9	6C
3,54 (d)	$J_{8,6}=2,4$	H-8	3,56 (s)		C4-OCH ₃
7,50 (d)	$J=8,7$	H-2'			
7,12 (m)		H-3'			
-		H-4'			
7,12 (m)		H-5'			
7,50 (d)	$J=8,7$	H-6'			
3,87 (s)		7-OCH ₃			

Zastrzeżenia patentowe

1. 7-Metoksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 7-metoksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu, **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 7-metoksyflawanon o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, dalej 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 7-metoksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2 znajduje się we frakcji o wyższej polarności, w drugim paśmie od linii startu.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,2 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 6 dni.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując ciekową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform : metanol w stosunku objętościowym 9:1.

Rysunek

