

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240957**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428764**

(22) Data zgłoszenia: **31.01.2019**

(51) Int.Cl.
C12P 19/44 (2006.01)
C07H 15/26 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(54) **Sposób wytwarzania 2'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
10.08.2020 BUP 17/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
04.07.2022 WUP 27/22

(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 JANECZKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 240957 B1

Opis wynalazku

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

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 i 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'-metoksyflawon 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 RP, Gurung RB, Parajuli P, Koirala N, Tuoi LT, Sohng JK. Assessing acceptor substrate promiscuity of YjiC-mediated glycosylation toward flavonoids. *Carbohydr Res.* 2014; 393:26–31).

2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon znany jest z publikacji M. Dymarska et. al. „Bio-transformations of Flavones and an Isoflavones(Daidzein) in Cultures of Entomopathogenic Filamentous Fungi”, *Molecules* (2018), 23 (6), 1356.

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) *Isariafumosorosea*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 *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 1 dobę. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie. Produkt znajduje się we frakcji o niższej polarności.

W wyniku regioselektywnej O-demetylacji i 4"-O-metyloglikozylacji otrzymuje się 2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon, 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 *Isariafumosorosea* KChJ2, następuje regioselektywna O-demetylacja i 4-O-me-

tyloglukozylacja 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 2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu, z wydajnością izolowaną na poziomie 10% (konwersją według HPLC ≤40%) 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 niższej polarności.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR (600 MHz) (DMSO) δ (ppm): 3.07 (dd, 1 H, J = 9.5, 9.1 Hz, H-4"), 3.29-3.35 (m, 1H, H-2"), 3.41-3.54 (m, 3H, H-3", H-5" and one of H-6"), 3.46 (s, 3H, C-3"-OCH₃), 3.64 (ddd, 1H, J = 11.6, 4.9, 1.6 Hz, one of H-6"), 4.72 (dd, 1H, J = 6.2, 5.0 Hz, C-6"-OH), 5.16 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H-1"), 5.27 (d, 1H, J = 5.8 Hz, 3"-OH), 5.39 (d, 1H, J = 5.5 Hz, C-2"-OH), 7.08 (s, 1H, H-3), 7.22 (ddd, 1H, J = 7.3, 6.9, 1.0 Hz, H-5'), 7.35 (dd, 1H, J = 8.6, 0.8 Hz, H-3'), 7.50 (ddd, 1H, J = 8.1, 7.1, 1.1 Hz, H-6), 7.50 (ddd, 1H, J = 8.1, 7.1, 1.1 Hz, H-4'), 7.74 (dd, 1H, J = 8.5, 0.7 Hz, H-8), 7.83 (ddd, 1H, J = 8.7, 7.1, 1.7 Hz, H-7), 7.93 (dd, 1H, J = 7.9, 1.7 Hz, H-6'), 8.06 (ddd, 1H, J = 7.9, 1.6, 0.4 Hz, H-5).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ = 59.74 (C-4"-OCH₃), 60.15 (C-6"), 73.50 (C-2"), 75.70 (C-5"), 76.55 (C-3"), 78.89 (C-4"), 99.73 (C-1"), 112.17 (C-3), 115.37 (C-3'), 118.58 (C-8), 120.72 (C-1'), 122.00 (C-5'), 123.20 (C-4a), 124.75 (C-5), 125.37 (C-6), 129.26 (C-6'), 132.70 (C-4'), 134.22 (C-7), 155.30 (C-2'), 156.01 (C-8a), 160.37 (C-2), 177.27 (C-4).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu, **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, przy czym produkt znajduje się we frakcji o niższej polarności.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,2 g : 1 L.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 7 dni.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że mieszaninę poreakcyjną oczyszcza się, używając jako eluentu mieszaniny chloroform i metanol 9:1.

Rysunek

