

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237330**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424952**

(51) Int.Cl.
C07H 17/07 (2006.01)
C12P 19/60 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **19.03.2018**

(54) **Sposób wytwarzania 3-O-β-D-glukopiranozylo-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
23.09.2019 BUP 20/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
06.04.2021 WUP 07/21

(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

PL 237330 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 3-O- β -D-glukopiranozylo-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu (izokwercetyny) o wzorze 2, przedstawionym na rysunku.

Związek ten może znaleźć zastosowanie jako antyoksydant w przemyśle spożywczym oraz jako składnik środków farmaceutycznych i kosmetycznych, a także dodatek do pasz.

Większość prozdrowotnych korzyści ze spożywania związków flawonoidowych wynika z ich aktywności przeciwutleniającej i zdolności do chelatowania jonów metali (Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 2002, 13, 572–584). Szereg badań dowodzi wagi obecności w cząsteczce związku flawonoidowego grupy hydroksylowej w pozycji 3, a także ugrupowania katecholowego w pierścieniu B, szczególnie w przypadku wyłapywania wolnych rodników tlenowych, czy chelatowaniu jonów żelaza (Cotelle, N.; Bernier, J.L.; Henichart, J.P.; Catteau, J.P.; Gaydou, E.; Wallet, J.C.: Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Radic Biol Med.* 1992, 13, 211–219).

Wiele badań dotyczy szerokiego spektrum aktywności biologicznych wykazywanych przez izokwercetynę (3-O- β -D-glukopiranozylo-3',4',5,7-tetrahydroksyflawon). Glukozyd ten działa przeciwwirusowo, przeciwcukrzycowo, jest antyoksydantem (Wang C, Li J, Zhang L, Zhang X, Yu S, Liang X, et al. Neurochemistry International Isoquercetin protects cortical neurons from oxygen – glucose deprivation – reperfusion induced injury via suppression of TLR4 – NF- κ B signal pathway. *Neurochem Int* [Internet]. 2013; 63(8):741–9).

Izokwercetyna wykazywała silniejszą aktywność antyproliferacyjną w stosunku do pięciu linii komórek nowotworowych (m.in. jelita grubego, piersi, wątroby i płuc) niż kwercetyna – aglikon, z którego się wywodzi (2). Badania prowadzone na wirusie grypy wykazały, że izokwercetyna hamuje replikację wirusa grypy A i B. Po serii pasażu wirusa nie zaobserwowano wytwarzania się oporności w stosunku do izokwercetyny (Kim Y, Narayanan S, Chang K. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral Res* [Internet]. 2010; 88(2): 227–35). Opisany związek wykazywał również działanie neuroprotektyjne w stosunku do szczyrzych komórek nerwowych w modelu ischemii *in vitro* (Wang C, Li J, Zhang L, Zhang X, Yu S, Liang X, et al. Neurochemistry International Isoquercetin protects cortical neurons from oxygen – glucose deprivation – reperfusion induced injury via suppression of TLR4 – NF- κ B signal pathway. *Neurochem Int* [Internet], 2013; 63(8): 741–9).

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 glukozydu 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, P. C.; Buijsman, 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. (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* antioxidant properties, stability, and solubility in flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 3321–3333).

Znana jest metoda chemicznej syntezy 3-O- β -D-glukopiranozylo-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu przy wykorzystaniu soli potasowej kwercetyny (0,2 g) i acetobromoglukozy (0,4 g) jako substratów. Opisaną metodą otrzymuje się 25 mg izokwercetyny (Ice C. H., Wender S. H. The Synthesis of Isoquercitrin. CONTRIBUTION FROM THE DEPARTMENT OF CHEMISTRY OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA. 1952; 74:4606).

Znana jest metoda otrzymywania izokwercetyny na drodze biotransformacji wykorzystując rutynę jako substrat i α -ramnozydazę uzyskaną z *Aspergillus niger* jako biokatalizator. W ciągu 4-godzinnej reakcji przereagowało 99% substratu (Chem F. Transformation of Rutin to Antiproliferative Quercetin-3-glucoside by *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem.* 2010; 58:10886–92). Wykorzystując szczep *Ba-*

cillus litoralis C44 w ciągu 72-godzinnej biotransformacji uzyskano izokwercetynę z ok. 10% wydajnością (stopień przereagowania rutyny wynosił 50,36%) (Lu Z, Wang J, Lin S, Zhang Y. Degradation of Rutin into Isoquercitrin by *Bacillus litoralis* strain C44. IOSR J Eng. 2012; 2(5):1154–61).

W ostatnich latach w leczeniu i prewencji chorób coraz większe znaczenie zyskują związki pochodzenia naturalnego i ich odpowiedniki uzyskane na drodze biotransformacji. Dlatego istotne jest poszukiwanie nowych sposobów wytwarzania związków aktywnych biologicznie, które mogą być wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym, ale też kosmetycznym i spożywczym.

Istota wynalazku 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 3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon (kwercetyna) 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. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

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

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

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 240 godzin.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje przyłączenie β -D-glukozy do C-3. 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 3-O- β -D-glukopiranozylo-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu wykorzystując mikroorganizm niebędący patogenem ludzkim.

Wykorzystanie biotransformacji, zamiast syntezy chemicznej, umożliwia, w sposób przyjazny dla środowiska, uzyskanie związków o wyższej biodostępności i aktywności biologicznej, niż użyte substraty (E. Kostrzewa-Susłowska, J. Dmochowska-Gładysz, J. Oszmiański, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 49 (1–4), 113–117, W A. Loughlin, Bioresource Technology, 2000, 74, 49–62).

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 10 g aminobaku i 30 g glukozy, wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2 ujawniony w zgłoszeniu patentowym o numerze P.416996. Po 96 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg 3,3',4',5,7-pentahydroksyflawonu (kwercetyny) o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ tetrahydrofuranu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 10 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 chloroformu i metanolu w stosunku 9:1. 3-O- β -D-glukopiranozylo-3',4',5,7-tetrahydroksyflawon znajduje się we frakcji o wyższej polarności.

Na tej drodze otrzymuje się 9,3 mg 3-O- β -D-glukopiranozylo-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu (wydajność 12,1%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma ¹H NMR (600 MHz, Aceton-d₆): δ = 8,04 ppm (1H, d, $J_{2,6}$ =2.1 Hz, H-2'); δ = 7,62 ppm (1H, dd, $J_{6,5}$ =8.4 Hz, $J_{6,2}$ =2.2 Hz, H-6'); δ = 6,99 ppm (1H, d, $J_{5,6}$ =8.4 Hz, H-5'); δ = 6,55 ppm (1H, d, $J_{8,6}$ =2.1 Hz, H-8); δ = 6,32 ppm (1H, d, $J_{6,8}$ =2.0 Hz, H-6); δ = 5,30 ppm (1H, d, J =7,4 Hz, H-1"); δ = 3,78 ppm (1H, d, J =10.7 Hz, H-6"a); δ = 3,64 ppm (1H, m, H-6"b); δ = 3,52 ppm (2H, m, C-2", C-3"); δ = 3,44 ppm (1H, t, J =8.8 Hz, H-4"); δ = 3,37 ppm (1H, m, H-5").

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 3-O- β -D-glukopiranozylo-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu, **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 3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon (kwercetyna) 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.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
4. Sposób według zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 240 godzin.

Rysunek

