

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10)

PL 438645 A1

(12)

## Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: 438645

(22) Data zgłoszenia: 2021.07.30

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: 2023.02.06 BUP 06/2023

(51) MKP:

C07H 15/203 (2006.01)

C12P 19/44 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(71) Zgłaszający:

UNIwersytet PRZYRODNICZY  
WE WROCLAWIU, Wrocław, PL

(72) Twórca(-y):

AGNIESZKA KRAWCZYK-ŁEBEK, Wrocław, PL  
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL  
MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL  
TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

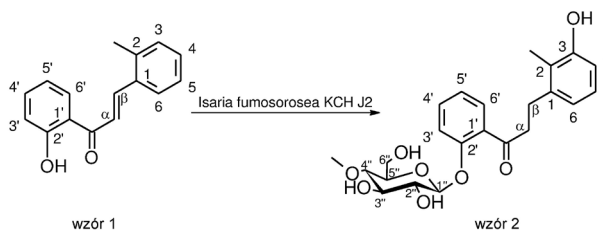
Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

**3-Hydroksy-2-metylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon i sposób wytwarzania 3-hydroksy-2-metylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu**

(57) Skróć opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest 3-hydroksy-2-metylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon o wzorze 2 oraz sposób wytwarzania 3-hydroksy-2-metylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu charakteryzujący się 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 2'-hydroksy-2-metylochalkon 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, przy czym 3-hydroksy-2-metylo-2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon o wzorze 2 znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w drugim paśmie od linii startu.



3-Hydroksy-2-metylo-2'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-  
dihydrochalkon i sposób wytwarzania  
3-hydroksy-2-metylo-2'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-  
dihydrochalkonu

Przedmiotem wynalazku jest 3-hydroksy-2-metylo-2'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania 3-hydroksy-2-metylo-2'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu.

3-Hydroksy-2-metylo-2'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon może znaleźć zastosowanie jako związek przeciwutleniający, przeciwdrobnoustrojowy, substancja wzmacniająca smak i potencjalny słodzik w preparatach farmaceutycznych, produktach spożywczych oraz formulacjach kosmetycznych.

Naturalne flawonoidy z jedną lub kilkoma grupami metylowymi występują w roślinach sporadycznie. Z azjatyckiego drzewa *Syzygium nervosum* (*Cleistocalyx operculatus*) izolowano C- i O-metylowane chalkony: (E)-4,2',4'-trihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon, (E)-2',4'-dihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon, (E)-2',4'-dihydroksy-6'-metoksy-3'-metylochalkon, (E)-2,2',4'-trihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon. Związki te wykazywały silną inhibicję wobec enzymów pochodzących od dwóch szczepów wirusa grypy: H1N1 oraz H9N2. Blokowały one działanie neuraminidaz, umożliwiających wirusom opuszczanie zakażonych komórek poprzez rozkład ich błon

komórkowych (Dao T. T., Tung B. T., Nguyen P. H., Thuong P. T., Yoo S. S., Kim E. H., Kim S. K., Oh W. K. C-methylated flavonoids from *Cleistocalyx operculatus* and their inhibitory effects on novel influenza A (H1N1) neuraminidase. *Journal of Natural Products* 2010, 73, 1636-1642).

Naturalne dihydrochalkony floretyna i jej glikozyd florydzyrna, które występują w skórce i mięszu jabłka, wykazują licznie udokumentowane właściwości prozdrowotne: antyoksydacyjną, przeciwzapalną, przeciwcukrzycową, przeciwnowotworową i kardioprotekcyjną (Choi Y. Biochemical basis of anti-cancer-effects of phloretin – a natural dihydrochalcone. *Molecules* 2018, 24, 278; Tian L., Cao J., Zhao T., Liu Y., Khan A., Cheng G. The bioavailability, extraction, biosynthesis and distribution of natural dihydrochalcone: phloridzin. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 962).

W badaniach nad dihydrochalkonem naringiny z udziałem transgenicznych myszy jako modeli zwierzęcych choroby Alzheimerera, zaobserwowano efekt złagodzenia deficytów poznawczych, co stwarza możliwość zastosowania tego związku jako środka leczniczego (Yang W., Zhou K., Zhou Y., An Y., Hu T., Lu J., Huang S., Pei G. Narindin dihydrochalcone ameliorates cognitive deficits and neuropathology in APP/PS1 Transgenic Mice. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2018, 10, 169).

Dihydrochalkony wykazują słodki smak i mogą znaleźć zastosowanie jako prozdrowotne słodziki (Janeczko T., Gładkowski W., Kostrzewa-Susłow E. Microbial transformations of chalcones to produce food sweetener derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2013, 98, 55-61; Łużny M., Kozłowska E., Kostrzewa-Susłow E., Janeczko T. Highly effective, regioselective hydrogenation of methoxychalcone by *Yarrowia lipolytica* enables production of food sweeteners. *Catalysts* 2020, 10, 1135). Najlepiej poznany i zbadany dihydrochalkon pozyskiwany ze skórek owoców cytrusowych – dihydrochalkon neohesperydyny (E-959) został dopuszczony do stosowania jako słodzik i substancja wzmacniająca smak, a jego zastosowanie reguluje Rozporządzenie Komisji Europejskiej nr

1129/2011 z 11 listopada 2011 r.

Większość flawonoidów, poza katechinami, jest obecna w roślinach w połączeniu z cukrami, jako  $\beta$ -glikozydy. Glikozylacja skutkuje: wzrostem rozpuszczalności w wodzie i stabilności cząsteczki flawonoidu oraz przyswajalności przyjmowanych z pokarmem związków flawonoidowych. Zasadniczo glukozydy są jedynymi glikozydami, które mogą być absorbowane w jelicie cienkim. Natomiast flawonoidy niezaabsorbowane w jelicie cienkim oraz zaabsorbowane flawonoidy wydzielone z żółcią ulegają degradacji wraz z rozerwaniem struktury pierścieniowej przez mikroorganizmy (Hollman, P. C. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 2004, 42, 74-83; 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. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2014, 62, 3321–3333).

Hollman i in., wykazali, że cząsteczka glukozy przyłączona w pozycji 3 kwercetyny (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon) zwiększa absorpcję tego związku w jelicie cienkim do 52%, w porównaniu z 24% absorpcją aglikonu kwercetyny i 17% rutynozydu kwercetyny (Hollman, P. C.; Bijlsman, M. N. C. P.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. P. J.; de Vries, J. H.; Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, 1999, 31, 569-573).

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 uznawane za naturalne, które uzyskano na drodze przekształceń mikrobiologicznych. 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 3-hydroksy-2-metylo-2'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu.

Istotą wynalazku jest 3-hydroksy-2-metylo-2'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon.

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 2'-hydroksy-2-metylochalkon, 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. 3-hydroksy-2-metylo-2'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w drugim paśmie od linii startu.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg:1 cm<sup>3</sup>.

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

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 9 dni.

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

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje redukcja wiązania podwójnego, hydroksylacja przy C-3 oraz hydroksylacja i przyłączenie 4-metoksy- $\beta$ -D-glukozy przy C-2'. 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-hydroksy-2-metylo-2'-*O*- $\beta$ -D-(4''-*O*-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu 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 cm<sup>3</sup>, w której znajduje się 500 cm<sup>3</sup> sterylnej pożywki zawierającej 10 g aminobaku i 30 g glukozy, wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg 2'-hydroksy-2-metylochalkonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm<sup>3</sup> dimetylosulfotlenku. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 9 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 pośredniej polarności, w drugim paśmie od linii startu.

Na tej drodze otrzymuje się 4,8 mg 3-hydroksy-2-metylo-2'-*O*- $\beta$ -D-(4''-*O*-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu (wydajność 5,3%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

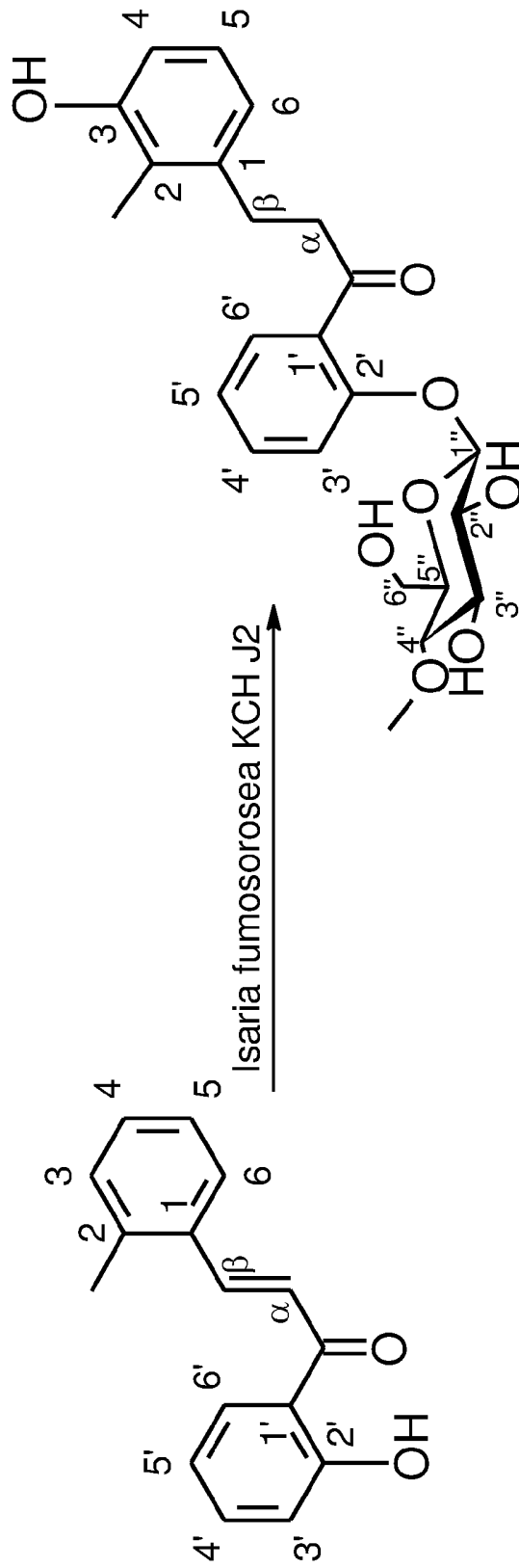
Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma <sup>1</sup>H NMR (601 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>)

Sygnały pochodzące od szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od jednostki cukrowej		
$\delta$ [ppm]	J [Hz]	H	$\delta$ [ppm]	J [Hz]	H
3,34 (m)		$\alpha$	5,04 (d)	7,8	1''
2,95 (t)	7,7	$\beta$	3,53 (m)		2''
6,68 (d)	8,0	4	3,63 (td)	9,0; 4,3	3''
6,90 (t)	7,8	5	3,20 (m)		4''
6,71 (d)	7,5	6	3,49 (ddd)	9,7; 4,6; 2,0	5''
7,30 (dd)	8,4; 0,5	3'	3,83 (ddd)	7,3; 4,7; 2,2	6''
			3,68 (m)		
7,47 (ddd)	8,5; 7,3; 1,8	4'	3,55 (s)		C4''- OCH <sub>3</sub>
7,11 (td)	7,6; 0,9	5'	4,65 (d)	4,1	C2''-OH
7,58 (dd)	7,7; 1,8	6'	4,48 (d)	4,3	C3''-OH
2,19 (s)		C2-CH <sub>3</sub>	3,71 (dd)	9,3; 4,5	C6''-OH
8,08 (s)		C3-OH			

## Zastrzeżenia patentowe

1. 3-Hydroksy-2-metylo-2'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 3-hydroksy-2-metylo-2'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu **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 2'-hydroksy-2-metylochalkon 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, przy czym 3-hydroksy-2-metylo-2'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon o wzorze 2 znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w drugim paśmie od linii startu.
3. Sposób według zastrz. 2., **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg:1 cm<sup>3</sup>.
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 9 dni.
6. Sposób według zastrz. 2., **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol w stosunku objętościowym 9:1.



WZÓR 1

WZÓR 2



SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.438645

Klasyfikacja zgłoszenia: C07H15/203 (2006.01), C12P19/44 (2006.01), C12R1/645 (2006.01)

Poszukiwania prowadzone w klasach: C07H, C12P

Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: EPODOC, WPI, BAZY DANYCH UPRP, STN: REGISTRY, CAPLUS, REAXYSFILEBib, REAXYSFILESub

Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	Krawczyk-Łebek A, Dymarska M, Janeczko T, Kostrzewa-Susłow E. Entomopathogenic Filamentous Fungi as Biocatalysts in Glycosylation of Methylflavonoids. Catalysts. 2020; 10(10):1148. <a href="https://doi.org/10.3390/catal10101148">https://doi.org/10.3390/catal10101148</a>	1-6
A	PL234086 B1 (UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu) 2020-01-31	1-6

Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie

A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie,  
E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia,  
L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu,  
O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób,  
P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa,  
T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku,  
X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie,  
Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy,  
& – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.

Sprawozdanie wykonał/-a:

Data:

Podpis:

Agnieszka Ucińska  
Ekspert

31.03.2022

/podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/  
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń patentowych z 30.07.2021 r.