



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **424944**

(22) Data zgłoszenia: **19.03.2018**

(51) Int.Cl.

C07D 311/30 (2006.01)

C07H 17/07 (2006.01)

C12P 17/06 (2006.01)

C12P 19/60 (2006.01)

(54) **5-hydroksy-4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon
i sposób wytwarzania
5-hydroksy-4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu**

(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-SUSŁÓW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 5-hydroksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawon i sposób wytwarzania 5-hydroksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu 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.

Primuletyna (5-hydroksyflawon) jest związkiem występującym w naturze, często spotykanym w roślinach z rodzajów *Primula* i *Dionysia*. Związek ten działa jako aktywator dla aktywowanych wapniem i wrażliwych na ATP kanałów potasowych; grupa hydroksylowa w pozycji 5 wydaje się być wymogiem strukturalnym dla aktywowanych wapniem kanałów potasowych. Rezultatem powyższego działania jest wykazywana przez 5-hydroksyflawon aktywność wazorelaksacyjna. Omawiany związek wykazuje także silne działanie antagonistyczne w stosunku do receptorów androgenowych, najsilniejsze spośród 25 testowanych flawonów. Aktywność 5-hydroksyflawonu była trzykrotnie wyższa niż flutamidu – znanego środka antyandrogenowego stosowanego w terapii raka prostaty (Uivarosi V, Badea M, Olar R, Drăghici C, Bărbuceanu ȘF. Synthesis and characterization of some new complexes of magnesium (II) and zinc (II) with the natural flavonoid primuletin. *Molecules*. 2013, 18(7), 7631–45). 5-Hydroksyflawon wykazuje także działanie przeciwapagregacyjne w stosunku do płytek krwi (Alkadi KAA, Adam A, Taha M, Hasan MH, Ali Shah SA. Antiplatelet aggregation activity of 5-hydroxyflavone, 2'-hydroxyflavanone, paeonol and bergenin isolated from stem bark of garcinia malaccensis in human whole blood. *Orient J Chem*. 2013, 29(3), 871–5).

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, Ml. 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).

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 (3,5,7,3',4'-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).

W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat otrzymywania 5-hydroksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu na drodze syntezy chemicznej i biotransformacji.

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.

Istotą wynalazku jest 5-hydroksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawon.

Istota otrzymywania 5-hydroksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawon-5-hydroksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawon u 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 5-hydroksyflawon 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 168 godzin.

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 niemieszącym się z wodą (octan etylu).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 5-hydroksy-4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu 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-Susłow, 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 5-hydroksyflawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ tetrahydrofuranu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 7 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.

Na tej drodze otrzymuje się 26 mg 5-hydroksy-4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu (wydajność 29%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma ¹H NMR (600 MHz, Aceton-d₆)

Sygnały pochodzące od szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od jednostki cukrowej		
δ [ppm]	J [Hz]	H	δ [ppm]	J [Hz]	H
6,87 (s)	-	H-3	5,15 (d)	7,7	1C
6,81 (d)	8,4	H-6	3,56 (m)	-	2C
7,69 (t)	8,3	H-7	3,70 (m)	-	3C
7,18 (d)	8,4	H-8	3,27 (m)	-	4C
8,10 (d)	8,6	H-2'	3,58 (m)	-	5C
7,29 (d)	8,6	H-3'	3,89 (m)	-	6C
			3,76 (m)		
7,29 (d)	8,6	H-5'	3,61 (s)	-	-OCH ₃
8,10 (d)	8,6	H-6'			

Zastrzeżenia patentowe

- 5-hydroksy-4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon o wzorze 2.
- Sposób wytwarzania 5-hydroksy-4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu **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 5-hydroksyflawon 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.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
5. Sposób według zastrzeżenia 2, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 168 godzin.

Rysunek

