

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **239848**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428751**

(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 5'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

10.08.2020 BUP 17/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

17.01.2022 WUP 03/22

(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 239848 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 5'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawonu.

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 wielu 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). Różne naturalne, 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',5'-dimetoksyflawon 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). 2'-metoksy-5'-halogenoflawony wykazują aktywność odwrotnych agonistów kluczowego receptora sygnałowego US28 ludzkiego wirusa cytomegalii (Ana Kralj, Mai-Thao Nguyen, NuskaTschammer, Nicolette Ocampo, Quinto Gesiotto, Markus R. Heinrich, Otto Phanstiel, Development of Flavonoid-Based Inverse Agonists of the Key Signaling Receptor US28 of Human Cytomegalovirus. *J Med Chem.* 2013 Jun 27; 56(12): 5019–32). 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 glycosyl transferases. *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 hybrida* glucosyl transferase RhGT1 and an engineered microbial glucosyl transferase Ole DPSA 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).

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., Glycosylation of 6-methylflavone by the strain *Isaria fumosorosea* KCh J2. *PLoS ONE* 2017, 12, e.0184885.).

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCh J2. Po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 2',5'-dimetoksyflawono 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 1 dobę. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

W wyniku regioselektywnej O-demetylacji-4-O-metyloglukozyłacji otrzymuje się 5'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawon, 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 3 dni.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCh J2, następuje regioselektywna O-demetylacja i 4-O-metyloglukozyłacja substratu. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu,

znany sposób, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą (octan etylu).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 5'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawonu, z wydajnością izolowaną na poziomie 50% (konwersją według HPLC = 75%), 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',5'-dimetoksyflawonu 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.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR (600 MHz) (DMSO) δ (ppm): 3.02 (t, 1H, J = 9.4 Hz, H-4"), 3.26 (td, 1H, J = 9.0, 4.0 Hz, H-2"), 3.40-3.45 (m, 2H, H-3", H-5"), 3.46 (s, 3H, C-4"-OCH₃), 3.53 (ddd, 1H, J = 11.6, 6.2, 5.8 Hz, one of H-6"), 3.67 (ddd, 1H, J = 11.4, 4.7, 1.4 Hz, one of H-6"), 3.90 (s, 3H, C-2"-OCH₃), 4.77 (t, 1H, J = 5.7 Hz, C-6"-OH), 4.87 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H-1"), 5.29 (d, 1H, J = 5.4 Hz, C-3"-OH), 5.43 (d, 1H, J = 4.5 Hz, C-2"-OH), 6.99 (s, 1H, H-3), 7.20 (d, 1H, J = 9.2 Hz, H-3'), 7.27 (dd, 1H, J = 9.1, 3.1 Hz, H-4'), 7.50 (ddd, 1H, J = 8.0, 7.0, 1.0 Hz, H-6), 7.63 (dd, 1H, J = 3.0, Hz, H-6'), 7.76 (dd, 1H, J = 7.9, 0.6 Hz, H-8), 7.83 (ddd, 1H, J = 8.6, 7.0, 1.6 Hz, H-7), 8.05 (dd, 1H, J = 7.9, 1.6 Hz, H-5).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ = 56.39 (C-2'-OCH₃), 59.71 (C-4"-OCH₃), 60.39 (C-6"), 73.48 (C-2"), 75.73 (C-5"), 76.28 (C-3"), 79.20 (C-4"), 101.11 (C-1"), 111.71 (C-3), 113.68 (C-3'), 116.93 (C-6'), 118.61 (C-8), 120.14 (C-1'), 120.88 (C-4'), 123.10 (C-4a), 124.71 (C-5), 125.45 (C-6), 134.33 (C-7), 151.17 (C-5'), 152.88 (C-2'), 155.91 (C-8a), 160.05 (C-2), 177.18 (C-4).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 5'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-2'-metoksyflawonu, **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',5'-dimetoksyflawon 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.
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 3 dni.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że mieszaninę poreakcyjną oczyszcza się, używając jako eluentu mieszaniny chloroform i metanol 9 : 1.

Rysunek

