

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238532**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **421049**

(22) Data zgłoszenia: **29.03.2017**

(51) Int. Cl.

C12P 19/60 (2006.01)

C07H 17/07 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(54)

Sposób wytwarzania 3-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

08.10.2018 BUP 21/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

06.09.2021 WUP 23/21

(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:

rzec. pat. Anna Kasperowicz

PL 238532 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 3-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.

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, szczególnie w przypadku wyłapywania wolnych rodników tlenowych, czy chelatowaniu jonów żelaza.

Wykazywana przez związki flawonoidowe wysoka aktywność biologiczna jest silnie związana również z ich zdolnością do wiązania się z błonami biologicznymi (Tsuchiya, H. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. *Food Chem.* 2010, 120, 1089–1096). 3-Hydroksyflawon posiada potencjał wiązania się z biomakromolekułami. Związek ten wykazuje silną aktywność przeciwutleniającą wewnątrz błon, co sugeruje, że może on dzięki temu wykazywać działanie terapeutyczne (Jana, B.; Senapati, S.; Ghosh, D.; Bose, D.; Chattopadhyay, N. Spectroscopic exploration of mode of binding of ctDNA with 3-hydroxyflavone: A contrast to the mode of binding with flavonoids having additional hydroxyl groups. *J. Phys. Chem. B* 2012, 116, 639–645).

Kwercetyna (3,5,7,3',4'-pentahydroksyflawon) jest jednym z najsilniej przeciwcukrzycowo działających flawonoidów. Badania prowadzone na szczurach z wywołaną insulinoopornością dowodzą, że otrzymane na drodze syntezy chemicznej analogi 3-hydroksyflawonu (posiadające dodatkowe grupy metylowe, etylowe, hydroksylowe i dimetyloaminowe w różnej liczbie i pozycjach) znoszą insulinooporność, redukują hiperglikemię, dyslipidemię i wzmagają obronę antyoksydacyjną (Nayak, Y.; Venkatachalam, H.; Daroji, V. K.; Mathew, G.; Jayashree, B. S.; Unnikrishnan, M. K. Antidiabetic activity of 3-hydroxyflavone analogues in high fructose fed insulin resistant rats. *EXCLI J.* 2014, 13, 1055–1074). 3-Hydroksyflawon podawany chorym na cukrzycę szczurom w dawce 50 mg/kg masy ciała wykazywał silne działanie hipoglikemiczne i antydiabetyczne (Kim, J. H.; Song, M.; Kang, G. H.; Lee, E. R.; Choi, H. Y.; Lee, C.; Kim, J. H.; Kim, Y.; Koo, B. N.; Cho, S. G. Combined treatment of 3-hydroxyflavone and imatinib mesylate increases apoptotic cell death of imatinib mesylate-resistant leukemia cells. *Leuk. Res.* 2012, 36, 1157–1164).

W badaniach prowadzonych przez koreańskich naukowców 3-hydroksyflawon wykazał się najsilniejszą aktywnością przeciwnowotworową spośród dziewięciu testowanych związków, w stosunku do linii nowotworowych A549 (nowotwór płuc), B16F10 (czerniak myszy) i K562 (białaczka) i brakiem cytotoksyczności w stosunku do dwóch linii prawidłowych komórek.

Mezylan imatynibu jest lekiem stosowanym w terapii nowotworów. 3-hydroksyflawon podawany łącznie z tym lekiem wykazywał działanie hamujące wzrost linii komórkowej białaczki odpornej na działanie imatynibu (Kim, J. H.; Song, M.; Kang, G. H.; Lee, E. R.; Choi, H. Y.; Lee, C.; Kim, J. H.; Kim, Y.; Koo, B. N.; Cho, S. G. Combined treatment of 3-hydroxyflavone and imatinib mesylate increases apoptotic cell death of imatinib mesylate-resistant leukemia cells. *Leuk. Res.* 2012, 36, 1157–1164).

3-hydroksyflawon wykazuje silne działanie przeciwko trypanosomozie i leishmaniozie, chorobom pasożytniczym, na które cierpią miliony osób w Afryce, Azji i Ameryce Południowej. Jest on jednym z najsilniej działających związków spośród grupy badanych polifenoli, w stosunku do pasożytów *Leishmania donovani* i *Trypanosoma brucei rhodesiense*, dodatkowo wykazującym działanie bójcze w stosunku do *Trypanosoma cruzi* (Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T. J.; Tosun, F.; Rüedi, R. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50, 1352–1364).

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 glikozydu 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, R. C.; Bijsman, M. N.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. R.; deVries, J. H.; Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radio. 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* antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 3321–3333).

3-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon znany jest z publikacji Wimal Herath et al. (2006), *Microbial Metabolism, Part 6, Metabolites of 3- and 7-hydroxyflavones*, Chem and Pharm. Bull. Vol 54, No. 3, 320–324. 3-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu znany jest z publikacji Wimal Herath et al. (2008), *Microbial Metabolism, Part 9, Structure and Antioxidant Significance of the metabolites of 5,7-dihydroxyflavone (Chrysin) and 5- and 6-Hydroxyflavones*, Chem. and Pharm. Bull., Vol. 56 (2008), No. 4, 418–422.

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-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 przyłączenie 4-metoksy- β -D-glukozy przy 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-(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-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-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 37 mg 3-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu (wydajność 42.5%). 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 = 8,23 ppm (1H, d, J_{5,6} = 8,0 Hz, H-5); δ = 8,29 ppm (2H, m, H-2', H-6'); δ = 7,90 ppm (1H, t, J = 7,7 Hz, H-7); δ = 7,78 ppm (1H,

d, $J_{8,7} = 8,5$, H-8); $\delta = 7,59$ ppm (3H, m, H-3', H-4', H-5'); $\delta = 7,57$ ppm (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H-6); $\delta = 5,28$ ppm (1H, d, $J = 7,9$ Hz, H-1''); $\delta = 3,63$ ppm (1H, t, $J = 8,9$ Hz, H-3''); $\delta = 3,58$ ppm (1H, m, H-6''a); $\delta = 3,55$ ppm (3H, s, C-4''-OCH₃); $\delta = 3,52$ ppm (1H, m, H-6''b); $\delta = 3,44$ ppm (1H, t, $J = 8,5$ Hz, H-2''); $\delta = 3,24$ ppm (1H, m, C-5''); $\delta = 3,15$ ppm (1H, t, $J = 9,3$ Hz, H-4'').

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 3-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 3-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.
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 zastrz. 1, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 168 godzin.

Rysunek

