

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234608**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **417787**

(22) Data zgłoszenia: **30.06.2016**

(51) Int.Cl.
C07H 17/07 (2006.01)
C12P 19/60 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(54) **8-O-β-D-4''-metoksyglukopiranozylo-6-metyloflawon i sposób wytwarzania
8-O-β-D-4''-metoksyglukopiranozylo-6-metyloflawonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
16.01.2017 BUP 02/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.03.2020 WUP 03/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Przyrodniczy
we Wrocławiu, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
JAKUB GRZESZCZUK, Opole, PL
ELŻBIETA PŁASKOWSKA, Wrocław, PL
TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 234608 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 8-O- β -D-4"-metoksyglukopiranozylo-6-metyloflawon i sposób wytwarzania 8-O- β -D-4"-metoksyglukopiranozylo-6-metyloflawonu o wzorze 2, przedstawionym na rysunku.

Związek ten może znaleźć zastosowanie jako składnik środków farmaceutycznych.

Flawonoidy są związkami pochodzenia roślinnego przyjmowanymi przez ludzi na co dzień wraz z pożywieniem. Opisano wiele przykładów prozdrowotnego działania tych związków: przeciwalergicznego, przeciwzapalnego, czy przeciwnowotworowego. Coraz więcej dowodów wykazuje wpływ związków flawonoidowych na funkcjonowanie mózgu. Udowodniono, że niektóre flawonoidy mają zdolność do wiązania się z receptorami benzodiazepinowymi (J. Ai, K. Dekermendjian, X. Wang, M. Nielsen, M.-R. Witt, *Drug Development Research*, 1997, 41, 99–106).

Kwas gamma-aminomasłowy (GABA) jest głównym hamującym neuroprzebieżnikiem w mózgu ssaków. Benzodiazepiny, poprzez wiązanie się z receptorami GABA, wykazują działanie przeciwlękowe, uspokajające i łagodzące napięcie mięśniowe i są wykorzystywane w farmacji od lat sześćdziesiątych XX wieku. Związki te wykazują jednak wiele działań niepożądanych: zaburzają pamięć, powodują niezdolność do ruchów, nasilają działanie alkoholu i barbituranów, a także zwiększają prawdopodobieństwo rozwoju uzależnień (B. J. Hall, M. Chebib, J. R. Hanrahan, G. A.R. Johnston, *European Journal of Pharmacology*, 2004, 491, 1–8).

Dlatego istotne jest poszukiwanie związków pochodzenia naturalnego, które wykazywałyby działanie zbliżone do benzodiazepin, ale byłyby pozbawione wywoływanych przez nie skutków ubocznych.

6-metyloflawon wykazuje zdolność uwrażliwiania receptorów GABA_A na kwas gamma-aminomasłowy. Udowodniono to m.in. w przypadku modyfikowanych żabich (*Xenopus laevis*) oocytów, które wykazywały ekspresję genów kodujących receptory kwasu gamma-aminomasłowego (B. J. Hall, M. Chebib, J. R. Hanrahan, G. A.R. Johnston, *European Journal of Pharmacology*, 2004, 491, 1–8).

Ai i współpracownicy zbadali zdolność oddziaływania 17 związków flawonoidowych na receptory GABA. Spośród przetestowanych związków 6-metyloflawon był najefektywniejszym inhibitorem dla receptorów GABA_A/benzodiazepinowych w modelach ludzkich i szczurzych *in vitro* (J. Ai, K. Dekermendjian, X. Wang, M. Nielsen, M.-R. Witt, *Drug Development Research*, 1997, 41, 99–106).

Uważa się, że glikozydy flawonidów 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.

Flawonoidy w roślinach występują wyłącznie w połączeniu z jednostkami cukrowymi. Glikozylacja skutkuje wzrostem rozpuszczalności i stabilności cząsteczki. Większość wykorzystywanych obecnie farmaceutyków zawierających związki flawonoidowe wykorzystuje glikozydy, np. rutyna (3-O-rutynozyd kwercetyny) sprzedawana w formie tabletek czy pueraryna (8-C-glukozyd daidzeiny) podawana przez iniekcję (J. Xiao, T.S. Muzashvili, M.I. Georgiev, *Biotechnology Advances*, 2014, 32, 1145–1156).

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.

W dostępnej literaturze brak jest doniesień na temat chemicznej syntezy oraz otrzymywania na drodze biotransformacji 8-O- β -D-4"-metoksyglukopiranozylo-6-metyloflawonu.

Z opisu zgłoszenia wynalazku P.416996 znany jest szczep *Isaria fumosorosea* KCh J2.

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 6-metyloflawon 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. Kolejny 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-8. 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 8-O- β -D-4"-metoksyglukopiranozylo-6-metyloflawonu w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

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 6-metyloflawonu 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 6 mg 8-O- β -D-4"-metoksyglukopiranozylo-6-metyloflawonu (wydajność 6,6%). 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 (2H, d, $J_{2',3'(6',5')} = 7,0$ Hz, H-2', H-6'), δ = 7,63 ppm (3H, m, H-3', H-4', H-5'), δ = 7,58 ppm (1H, s, H-5), δ = 7,52 ppm (1H, s, H-7), δ = 6,90 ppm (1H, s, H-3), δ = 5,23 ppm (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-1"), δ = 3,89 ppm (1H, br d, $J = 11,9$ Hz, H-6"a), δ = 3,76 ppm (1H, dd, $J = 11,7$ Hz, 4,5 Hz, H-6"b), δ = 3,72 ppm (2H, m, H-2", H-3"), δ = 3,62 ppm (1H, s, C-4"- OCH₃), δ = 3,57 ppm (1H, m, H-5"), δ = 3,32 ppm (1H, m, H-4"), δ = 2,46 ppm (1H, s, C6-CH₃).

Zastrzeżenia patentowe

1. 8-O- β -D-4"-metoksyglukopiranozylo-6-metyloflawon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 8-O- β -D-4"-metoksyglukopiranozylo-6-metyloflawonu, **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 6-metyloflawon 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 96 godzin, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
5. Sposób według zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 168 godzin.

Rysunki

