

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246965 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438506**

(22) Data zgłoszenia: **2021.07.16**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.01.23 BUP 04/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.04.07 WUP 14/2025**

(51) MKP:

C12P 19/60 (2006.01)

C07H 17/07 (2006.01)

C12R 1/65 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE
WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

TOMASZ TRONINA, Międzybórz, PL

MONIKA MROZOWSKA, Wrocław, PL

JAROSŁAW POPŁOŃSKI,

Szklarska Poręba, PL

SANDRA SORDON, Wrocław, PL

MATEUSZ ŁUŻNY, Wrocław, PL

TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL

EWA HUSZCZA, Wrocław, PL

AGNIESZKA BARTMAŃSKA, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania 7-O- β -D-glukozydu 5-hydroksy-8-metoksyflawonu

PL 246965 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 7-O- β -D-glukozydu 5-hydroksy-8-metoksyflawonu (7-O- β -D-glukozydu wogoniny).

Związek wytworzony metodą według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym jako lek przeciwzapalny, przeciwwirusowy i przeciwnowotworowy.

Substratem do wytwarzania 7-O- β -D-glukozydu 5-hydroksy-8-metoksyflawonu jest wogonina (5,7-dihydroksy-8-metoksyflawon) izolowany m.in. z korzenia tarczycy bajkalskiej *Scutellaria baicalensis*. Wogonina wykazuje szereg właściwości biologicznych w tym: przeciwzapalne (Li-Weber, M., New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer treatment reviews* 2009, 35, (1), 57-68.), przeciwwirusowe (Chu, Y.; Lv, X.; Zhang, L.; Fu, X.; Song, S.; Su, A.; Chen, D.; Xu, L.; Wang, Y.; Wu, Z., Wogonin inhibits in vitro herpes simplex virus type 1 and 2 infection by modulating cellular NF- κ B and MAPK pathways. *BMC microbiology* 2020, 20, (1), 1-11.) oraz przeciwnowotworowe (Wang, W.; Guo, Q.-L.; You, Q.-D.; Zhang, K.; Yang, Y.; Yu, J.; Liu, W.; Zhao, L.; Gu, H.-Y.; Flu, Y., The anticancer activities of wogonin in murine sarcoma S180 both in vitro and in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2006, 29, (6), 1132-1137.; Li-Weber, M., New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer treatment reviews* 2009, 35, (1), 57-68.). Aktywność biologiczna wogoniny może być jednak ograniczona, ze względu na niską biodostępność tego flawonu, związaną z jego słabą rozpuszczalnością w wodzie.

Jednym ze sposobów zwiększenia rozpuszczalności w wodzie, a co za tym idzie, biodostępności, jest sprzężanie związku bioaktywnego z polarnymi cząsteczkami takimi jak cukry.

Znany jest sposób otrzymywania 7-O- β -D-glukozydu 5-hydroksy-8-metoksyflawonu – pochodnej wogoniny sprzężonej z cząsteczką β -D-glukopiranozy, z wykorzystaniem bakterii *Escherichia coli* z wklonowanym genem 7-O-glukozylotransferazy pochodzącym z kultur korzeni włośnikowatych tarczycy bajkalskiej *Scutellaria baicalensis* Georgi (Hirotsani, M.; Kuroda, R.; Suzuki, H.; Yoshikawa, T., Cloning and expression of UDP-glucose: flavonoid 7-O-glucosyltransferase from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Planta* 2000, 210, (6), 1006-1013.)

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Absidia coerulea* AM93. Po upływie, co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 5,7-dihydroksy-8-metoksyflawon (wogonina) o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 15 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 3 dni. Kolejno produkt z hodowli ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

W wyniku regioselektywnej glikozylacji grupy hydroksylowej w pozycji C7 substratu jakim jest wogonina o wzorze 1, otrzymuje się 7-O- β -D-glukozyd 5-hydroksy-8-metoksyflawonu o wzorze 2, a reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Absidia coerulea* AM93.

Korzystnie jest, gdy rozpuszczalnikiem mieszającym się z wodą jest dimetylosulfotlenek i/lub metanol, i/lub aceton.

Korzystnie także jest, gdy proces prowadzi się w temperaturze 20-25 stopni Celsjusza.

Korzystnie jest również, gdy rozpuszczalnikiem niemieszającym się z wodą jest octan etylu albo eter dietylowy.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 7-O- β -D-glukozyd 5-hydroksy-8-metoksyflawonu o wzorze 2, w kulturze całych niemodyfikowanych genetycznie komórek, w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Przykład. Do kolby Erlenmajera o pojemności 300 cm³, w której znajduje się 100 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 1 g aminobaku i 3 g glukozy, wprowadza się szczep *Absidia coerulea* AM93. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 20 mg 5,7-dihydroksy-8-metoksyflawon (wogonina) o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ dimetylosulfotlenku (DMSO). 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 chloroform i metanol 10:1.

Na tej drodze otrzymuje się 7-O- β -D-glukozyd 5-hydroksy-8-metoksyflawonu z wydajnością izolowaną 5%.

^1H NMR 600 MHz, DMSO- d_6 , δ [ppm]: 12,53 (1H, s, 5-OH), 8,09 (2H, m, H-2',6'), 7,63 (3H, m, H-3',4',5'), 7,06 (1H, s, H-3), 6,68 (1H, s, H-6), 5,08 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1"), 3,90 (3H, s, C8-O-CH₃), 3,71 (1H, m, H-6"a), 3,47 (1H, m, H-6"b), 3,33 (1H, m, nałożone sygnały od H-2" na H-3"), 3,33 (1H, m, nałożone sygnały od H-3" na H-2"), 3,19 (1H, m, H-4").

^{13}C NMR 150 MHz, DMSO- d_6 , δ [ppm]: 182,4 (C-4), 163,6 (C-2), 156,9 (C-7), 156,1 (C-9), 149,4 (C-5), 132,2 (C-4'), 129,7 (C-8), 129,3 (C-3',C-5'), 126,4 (C-2',C-6'), 123,3 (C-1'), 105,3 (C-10), 105,2 (C-3), 100,3 (C-1"), 98,9 (C-6), 77,3 (C-5"), 76,6 (C-3"), 73,3 (C-2"), 69,6 (C-4"), 61,4 (C8-O-CH₃), 60,6 (C-6").

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 7-O- β -D-glukozydu 5-hydroksy-8-metoksyflawonu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep Absidia coerulea AM93, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 5,7-dihydroksy-8-metoksyflawon o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, zaś transformację prowadzi się w temperaturze od 15 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 5 dni, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że rozpuszczalnikiem mieszającym się z wodą jest dimetylosulfotlenek i/lub metanol, i/lub aceton.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 20-25 stopni Celsjusza.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że rozpuszczalnikiem niemieszającym się z wodą jest octan etylu albo eter dietylowy.

Rysunek

