

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **241672**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429214**

(22) Data zgłoszenia: **11.03.2019**

(51) Int.Cl.
C12P 19/44 (2006.01)
C07H 15/26 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(54) **Sposób wytwarzania 3'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
21.09.2020 BUP 20/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
21.11.2022 WUP 47/22

(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 241672 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 3'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu.

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 różnych 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). Zarówno 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). 3-metoksyflawon 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). 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 glycosyltransferases.

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 hybrid aglucosyltransferase* RhGT1 and an engineered microbial glucosyl transferase OleDPSA 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 Yji C-mediated glycosylation toward flavonoids. *Carbohydr Res.* 2014; 393:26–31).

Szczep *Isaria farinosa* KCh KW1.1 był wcześniej ujawniony w literaturze (Kozłowska E, Urbanik M, Grzeszczuk J, Hoc N, Sycz J, Dymarska M, Kostrzewa-Susłow E, Stępień Ł, Płaskowska E, Janeczko T. (2018) Biotransformation of steroids by entomopathogenic strains of *17:71*. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0920-0>)

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się *Isaria farinosa* KCh KW1.1. Po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 3'-metoksyflawon, 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 i 4"-O-metyloglikozytacji otrzymuje się 3'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon, a reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Isaria farinosa* KCh KW1.1.

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 farinosa* KCh KW1.1, następuje regioselektywna O-demetylacja i 4"-O-metyloglikozytacja substratu. 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, z wydajnością izolowaną na poziomie 20% (konwersją według HPLC > 99%), w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Przykład. 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 farinosa* KCh KW1.1. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 3'-metoksyflawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 2 cm³ dimetylosulfotlenku (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:

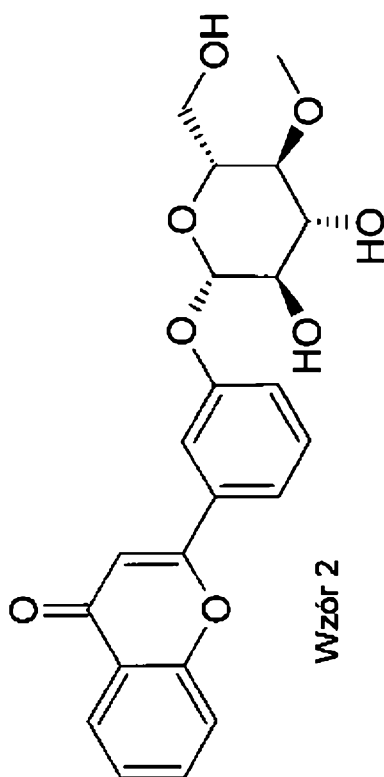
^1H NMR (600 MHz) (DMSO) δ (ppm): 3.05 (t, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-4"), 3.25-3.34 (m, 1H, H-2"), 3.42-3.57 (m, 3H, H-3", H-5" and one of H-6"), 3.47 (s, 3H, C-3"-OCH₃), 3.68 (dd, 1H, $J = 10.0, 4.9$ Hz, one of H-6"), 4.80 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, C-6"-OH), 5.07 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-1"), 5.31 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, C-3"-OH), 5.46 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, C-2"-OH), 7.07 (s, 1H, H-3), 7.26 (dd, 1H, $J = 8.2, 2.4$ Hz, H-4'), 7.47-7.55 (m, 2H, H-5' and H-6), 7.73 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.76 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-8), 7.79-7.87 (m, 2H, H-6' and H-7), 8.06 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H-5).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) $\delta = 59.76$ (C-4"-OCH₃), 60.35 (C-6"), 73.48 (C-2"), 75.75 (C-5"), 76.34 (C-3"), 79.19 (C-4'), 100.02 (C-1"), 107.24 (C-3), 113.84 (C-2'), 118.69 (C-6'), 119.79 (C-4'), 120.00 (C-8), 123.36 (C-4a), 124.81 (C-5), 125.63 (C-6), 130.31 (C-5'), 132.52 (C-1'), 134.43 (C-7), 155.72 (C-8a), 157.81 (C-3'), 162.25 (C-2), 177.23 (C-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 farinosa* KCh KW1.1, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 3'-metoksyflawon 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 1 dobę, 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 0,2 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



Isaria farinosa
KCh KW1.1

