

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237707**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426984**

(22) Data zgłoszenia: **10.09.2018**

(51) Int.Cl.

C07H 15/26 (2006.01)

C12P 19/44 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(54) **6-Metoksy-4'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon i sposób wytwarzania
6-metoksy-4'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
23.03.2020 BUP 07/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
17.05.2021 WUP 10/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODniczy
WE WROCLAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 237707 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 6-metoksy-4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon i sposób wytwarzania 6-metoksy-4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu 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.

Źródła literaturowe podają, że metoksyłowe pochodne flawonoidowe mają zdolność do łatwego penetrowania do wnętrza komórek, co jest cechą bardzo pożądaną przy tworzeniu nowych środków leczniczych. Po przeniesieniu linii komórkowych płuc do medium, w którym znajdowały się dimetoksyflawony, już po pięciu minutach komórki zakumulowały 30–50 razy więcej badanych związków, niż znajdowało się w otaczającym je buforze. Badania dowodzą, że związki te łatwo penetrują również komórki serca, płuc, piersi czy mózgu.

Międzykomórkowy transport 5,7-dimetoksyflawonu był około 10-krotnie wyższy niż chryzyny (5,7-dihydroksyflawonu). Może być to wynikiem faktu, że metoksyłowe pochodne flawonoidów nie są tak szybko metabolizowane, jak ich hydroksyłowe odpowiedniki. Dzięki temu ich biodostępność w podaniu doustnym przewyższa biodostępność hydroksyłowych pochodnych flawonoidów.

4',5,7-trimetoksyflawon około ośmiokrotnie skuteczniej hamował namnażanie komórek płaskonabłonkowego nowotworu jamy ustnej niż jego hydroksypochodna – apigenina (4',5,7-trihydroksyflawon). W przypadku linii komórkowych nowotworu piersi MCF-7 7-metoksyflawon działał silniej przeciwnowotworowo, niż 7-hydroksyflawon (Walle, T. Methoxylated flavones; a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin. Cancer Biol.* 2007, 17, 354–362).

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 (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon) zwiększała absorpcję tego związku 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, P. C.; Buijsman, M. N.; van Gameren, Y; Cnossen, E. P.; de Vries, J. H.; Katan, M. B. the sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic. 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 flawonoidowych (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).

W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat otrzymywania 6-metoksy-4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu na drodze syntezy chemicznej i biotransformacji.

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.

Istotą wynalazku jest 6-metoksy-4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon.

Istota sposobu 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-metoksyflawanon, 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. 6-metoksy-4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon znajduje się we frakcji o niższej polarności.

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 192 godziny.

Korzystnie również jest, gdy oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol 9:1.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje hydroksylacja i przyłączenie 4-metoksy- β -D-glukozy przy C-4'. 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 6-metoksy-4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu 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-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.

Przykład

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-metoksyflawanonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ tetrahydrofuranu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 8 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. Produkt znajduje się we frakcji o niższej polarności.

Na tej drodze otrzymuje się 5,3 mg 6-metoksy-4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu (wydajność 6 %). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

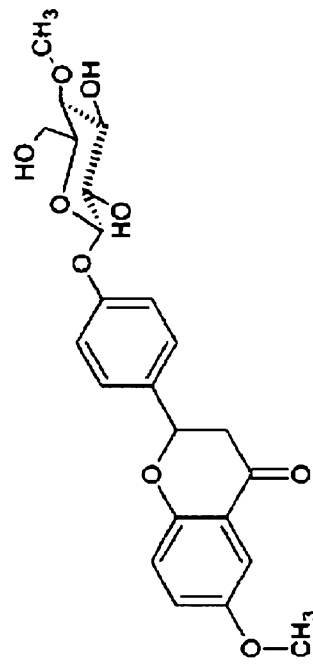
Opis sygnałów pochodzących z widma ¹H NMR (600 MHz, Aceton-d₆)

Sygnały pochodzące od szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od jednostki cukrowej		
δ [ppm]	J [Hz]	H	δ [ppm]	J [Hz]	H
7,56 (dd)	J= 13,0, 2,8	H-2	5,01 (d)	J=7,8	1C
3,17 (dd)	J=16,8, 13,0	H-3 _A	3,51 (m)		2C
2,87 (m)		H-3 _E	3,67 (t)	J=8,9	3C
7,32 (d)	J _{5,7} =3,1	H-5	3,26 (t)	J=9,3	4C
7,22 (dd)	J _{7,8} =9,0 J _{7,5} =3,2	H-7	3,53 (m)		5C
7,05 (d)	J _{8,7} =9,0	H-8	3,86 (m) 3,72 (dd)	J=12,0, 4,8	6C
7,54 (d)	J _{2',3'}} =8,6	H-2'	3,60 (s)		4C-OCH ₃
7,15 (d)	J _{3',2'}} =8,6	H-3'			
7,15 (d)	J _{5',6'}} =8,6	H-5'			
7,54 (d)	J _{6',5'}} =8,6	H-6'			
3,85 (s)		C6-OCH ₃			

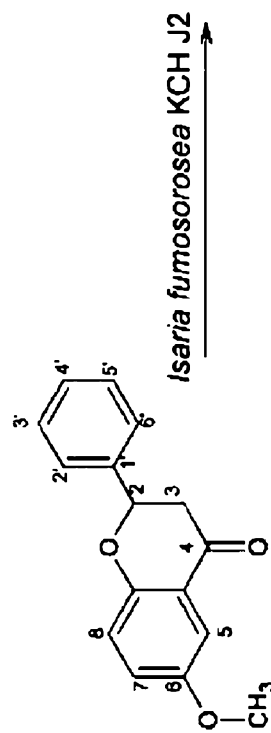
Zastrzeżenia patentowe

1. 6-Metoksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 6-metoksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu, **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-metoksyflawanon 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, przy czym 6-metoksy-4'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2 znajduje się we frakcji o niższej polarności.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 192 godziny.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowsarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol 9:1.

Rysunek



WZÓR 2



WZÓR 1