

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 244302 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439101**

(22) Data zgłoszenia: **2021.09.30**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.04.03 BUP 14/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.01.08 WUP 02/2024**

(51) MKP:

C12P 19/44 (2006.01)

C07H 15/26 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

AGNIESZKA KRAWCZYK-ŁEBEK, Wrocław, PL

EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL

MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL

TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania 4'-metyleno-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu

PL 244302 B1

Opis wynalazku

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

4'-Metyleno-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon może znaleźć zastosowanie jako związek przeciwutleniający i przeciwdrobnoustrojowy w preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych oraz produktach spożywczych.

Naturalne flawonoidy z jedną lub kilkoma grupami metylowymi występują w roślinach sporadycznie. Z azjatyckiego drzewa *Syzygium nervosum* (*Cleistocalyx operculatus*) izolowano C- i O-metylowane chalkony: (E)-4,2',4'-trihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon, (E)-2',4'-dihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon, (E)-2',4'-dihydroksy-6'-metoksy-3'-metylochalkon, (E)-2,2',4'-trihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon. Związki te wykazywały silną inhibicję wobec enzymów pochodzących od dwóch szczepów wirusa grypy: H1N1 oraz H9N2. Blokowały one działanie neuraminidaz, umożliwiającich wirusom opuszczanie zakażonych komórek poprzez rozkład ich błon komórkowych (Dao T. T., Tung B. T., Nguyen P. H., Thuong P. T., Yoo S. S., Kim E. H., Kim S. K., Oh W. K. C-methylated flavonoids from *Cleistocalyx operculatus* and their inhibitory effects on novel influenza A (H1N1) neuraminidase. *Journal of Natural Products* 2010, 73, 1636-1642).

Podobnie (2S)-5,7,2'-trihydroksy-8-metyloflawanon izolowany z krzewu *Pisonia aculeata* wykazywał aktywność przeciwdrobnoustrojową podczas badania *in vitro* z udziałem szczepu *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Związek ten wywoływał inhibicję wzrostu bakterii przy minimalnym stężeniu hamującym wynoszącym 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Wu M. C., Peng C. R., Chen I. S., Tsai I. L. Antitubercular chromones and flavanoids from *Pisonia aculeata*. *Journal of Natural Products* 2011, 74, 976-982).

Aktywność antybakteryjną i antygrzybiczną potwierdzono również dla flawonoidów wyekstrahowanych z naziemnych części rośliny *Eysenhardtia texana*: (2S)-4',5,7-trihydroksy-8-metylo-6-prenyloflawanonu oraz (2S)-4',5,7-trihydroksy-6-metylo-8-prenyloflawanonu. Dowiedziono, że w stężeniu 0,1 mg/cm^3 hamowały wzrost *Staphylococcus aureus*. (2S)-4',5,7-trihydroksy-8-metylo-6-prenyloflawanon spowalniał również wzrost *Candida albicans* (Wächter G. A., Hoffmann J. J., Furbacher T. T., Blake M. E., Timmermann B. N. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* 1999, 52, 1469-1471).

Większość flawonoidów, poza katechinami, jest obecna w roślinach w połączeniu z cukrami, jako β -glikozydy. Glikozylacja skutkuje: wzrostem rozpuszczalności w wodzie i stabilności cząsteczki flawonoidu oraz przyswajalności przyjmowanych z pokarmem związków flawonoidowych. Zasadniczo glikozydy są jedynymi glikozydami, które mogą być absorbowane w jelicie cienkim. Natomiast flawonoidy niezaabsorbowane w jelicie cienkim oraz zaabsorbowane flawonoidy wydzielone z żółcią ulegają degradacji wraz z rozerwaniem struktury pierścieniowej przez mikroorganizmy (Hollman, P. C. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 2004, 42, 74-83, 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. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2014, 62, 3321-3333).

Hollman i in., wykazali, że cząsteczka glukozy przyłączona w pozycji 3 kwercetyny (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon) zwiększa absorpcję tego związku w jelicie cienkim do 52%, w porównaniu z 24% absorpcją aglikonu kwercetyny i 17% rutynozydu kwercetyny (Hollman, P. C.; Bijsman, M. N. C. P.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. P. J.; deVries, J. H.; Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, 1999, 31, 569-573).

Znany jest szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5 ujawniony w literaturze (Kozłowska E., Urbaniak M., Hoc N., Grzeszczuk J., Dymarska M., Stępień Ł., Płaskowska E., Kostrzewa-Susłow E., Janeczko T. Cascade biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) by *Beauveria species*. *Scientific Reports*, 2018, 8:13449).

W ostatnich latach, w leczeniu różnych chorób i ich zapobieganiu, coraz większe znaczenie zyskują związki pochodzenia naturalnego oraz ich odpowiedniki uznawane za naturalne, które uzyskano na drodze przekształceń mikrobiologicznych. Dlatego istotne jest opracowywanie nowych metod wytwarzania związków aktywnych biologicznie na drodze biotransformacji, użytecznych dla przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego i spożywczego.

Istotą wynalazku jest sposób wytwarzania 4'-metyleno-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu.

Istota sposobu polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5. Po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 4'-metyloflawanon, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, przez co najmniej 96 godzin. Następnie produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą oraz oczyszcza chromatograficznie. 4'-Metyleno-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w drugim paśmie od linii startu.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 cm³.

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

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 9 dni.

Korzystnie również jest, gdy oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym z chloroformem i metanolem w stosunku objętościowym 9 : 1.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Beauveria bassiana* KCH J1.5, następuje przyłączenie 4-metoksy- β -D-glukozy przy C-4'-CH₃. 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 4'-metyleno-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu oraz wykorzystując mikroorganizm niebędący patogenem ludzkim.

Wykorzystanie biotransformacji, zamiast syntezy chemicznej, umożliwia, w sposób przyjazny dla środowiska, uzyskanie związków o większej biodostępności i aktywności biologicznej, niż użyte substraty.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Przykład. Do kolby stożkowej o pojemności 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 10 g aminobaku i 30 g glukozy, wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg 4'-metyloflawanonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ dimetylosulfotlenku. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 9 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahuje się dwukrotnie octanem etylu, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie z zastosowaniem jako eluentu mieszaniny chloroformu i metanolu w stosunku objętościowym 9 : 1. Produkt znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w drugim paśmie od linii startu.

Na tej drodze otrzymuje się 47,0 mg 4'-metyleno-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu (wydajność 52,0%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

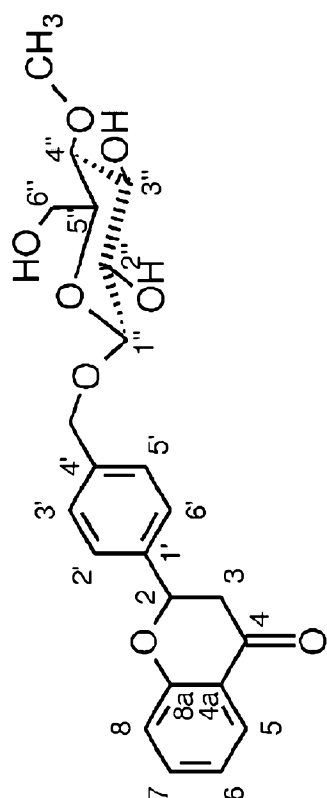
Opis sygnałów pochodzących z widma ^1H NMR (601 MHz, Aceton- d_6)

Sygnały pochodzące od protonów szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od protonów jednostki cukrowej		
δ [ppm]	J [Hz]	H	δ [ppm]	J [Hz]	H
5,63 (dd)	12,9; 2,9	2	4,39 (d)	7,7	1''
3,14 (m)		3 _{ax}	3,27 (m)		2''
2,86 (dd)	16,8; 3,0	3 _{eq}	3,51 (d)	9,0	3''
7,84 (dd)	7,8; 1,7	5	3,14 (m)		4''
7,09 (m)		6	3,27 (m)		5''
7,58 (m)		7	3,82 (dd)	11,6; 1,1	6''
			3,67 (dd)	11,6; 5,1	
7,09 (m)		8	3,53 (s)		C4''-OCH ₃
7,56 (d)	7,9	2'			
7,49 (d)	8,1	3'			
7,49 (d)	8,1	5'			
7,56 (d)	7,9	6'			
4,92 (d)	12,3	4'-CH ₂ -			
4,66 (d)	12,3				

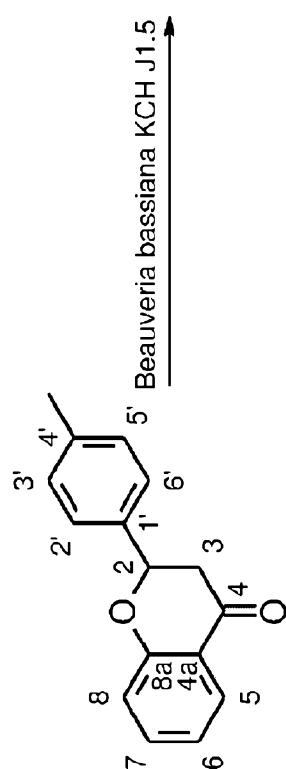
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 4'-metyleno-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5, następnie po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 4'-metyloflawanon 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 4'-metyleno-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2 znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w drugim paśmie od linii startu.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 cm³.
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 9 dni.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowsarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform : metanol w stosunku objętościowym 9 : 1.

Rysunek



wzór 2



wzór 1

Beauveria bassiana KCH J1.5