

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243365 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **428750**

(22) Data zgłoszenia: **2019.01.31**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2020.08.10 BUP 17/2020**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.08.14 WUP 33/2023**

(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:

MATEUSZ ŁUŻNY, Wrocław, PL

EWA KOZŁOWSKA, Wrocław, PL

TOMASZ TRONINA, Międzybórz, PL

EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL

TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania 2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-5'-metoksyflawonu

PL 243365 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-5'-metoksyflawonu.

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 wielu 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). Różne 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). 2',5'-dimetoksyflawon 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).

2'-metoksyflawon jest aktywnym czynnikiem wywołującym apoptozę indukowaną przez TRAIL w ludzkich białaczkowych komórkach MOLT-4 (Benjawan Wudtiwai, Bungorn Sripanidkulchai, Prachya Kongtawelert, Ratana Banjerdpongchai. Methoxyflavone derivatives modulate the effect of TRAIL-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *Journal of Hematology & Oncology* 2011, 4:52). 2'-metoksy-5'-halogenoflawony wykazują aktywność odwrotnych agonistów kluczowego receptora sygnałowego US28 ludzkiego wirusa cytomegalii (Ana Kralj, Mai-Thao Nguyen, NuskaTschammer, Nicolette Ocampo, Quinto Gesiotto, Markus R. Heinrich, Otto Phanstiel, Development of Flavonoid-Based Inverse Agonists of the Key Signaling Receptor US28 of Human Cytomegalovirus. *J Med Chem.* 2013 Jun 27; 56(12): 5019-32). 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 glycosyl transferases. *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 aglucosyl-transferase RhGT1 and an engineered microbial glucosyl transferase Ole DPSA 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 YjiC-mediated glycosylation toward flavonoids. *Carbohydr Res.* 2014; 393:26-31).

W literaturze nie ma doniesień dotyczących uzyskania 2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-5'-metoksyflawonu przy udziale szczepu *Isaria farinosa* KCh KW1.1.

Szczep *Isaria farinosa* KCh KW1.1 był wcześniej ujawniony w literaturze (Kozłowska E, Urbaniak M, Grzeszczuk J, Hoc N, Sycz J, Dymarska M, Kostrzewa-Sustow E, Stępień Ł, Płaskowska E, Janeczko T. (2018) Biotransformation of steroids by entomopathogenic strains of *Isaria farinosa*. *Microbial Cell Factories* 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 szczep *Isaria farinosa* KCh KW1.1. Po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 2',5'-dimetoksyflawon 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. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie. Produkt znajduje się we frakcji o niższej polarności.

W wyniku regioselektywnej O-demetylacji i 4-O-metyloglkozytacji otrzymuje się 2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-5'-metoksyflawon, a reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Isaria farinosa* KCh KW 1.1.

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 6 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-metyloglikozylacja substratu. 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 2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-5'-metoksyflawonu, z wydajnością izolowaną na poziomie 20% (konwersją według HPLC = 26%), 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 2',5'-dimetoksyflawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 2 cm³ dimetylosuflotlenku (DMSO). Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 6 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. Produkt znajduje się we frakcji o niższej polarności.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

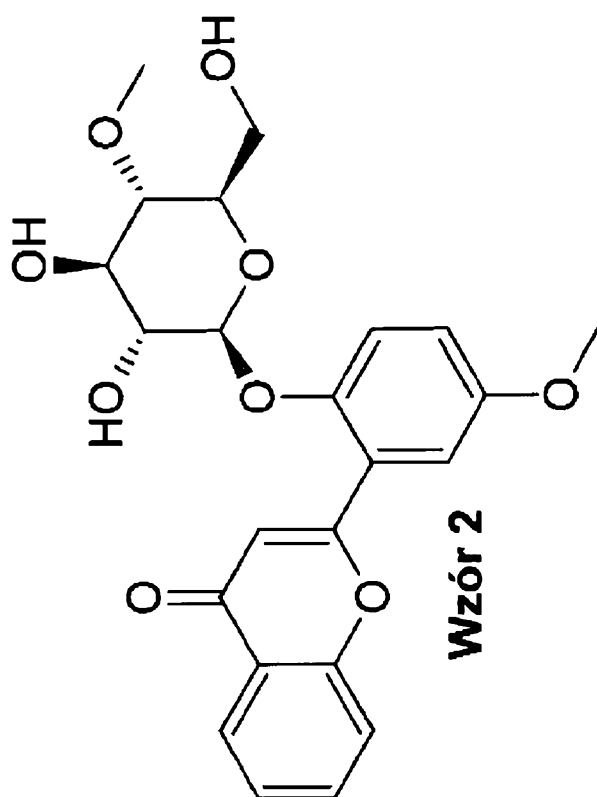
¹H NMR (600 MHz) (DMSO) δ (ppm): 3.05 (t, 1H, J = 9.4 Hz, H-4"), 3.25-3.29 (m, 1H, H-2"), 3.40-3.45 (m, 2H, H-3", H-5"), 3.45 (s, 3H, C-4"-OCH₃), 3.51-3.55 (m, 1H, one of H-6"), 3.63 (ddd, 1H, J = 12.1, 4.8, 1.7 Hz, one of H-6"), 3.81 (s, 3H, C-6"-OCH₃), 4.69 (d, 1H, J = 5.5 Hz, C-6"-OH), 5.03 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H-1"), 5.24 (d, 1H, J = 5.8 Hz, C-3"-OH), 5.34 (d, J = 5.6 Hz, C-2"-OH), 7.13 (dd, 1H, J = 9.2, 3.2 Hz, H-4'), 7.30 (d, 1H, J = 9.2 Hz, H-3'), 7.44 (d, 1H, J = 3.1 Hz, H-6'), 7.50 (ddd, 1H, J = 8.1, 7.0, 1.1 Hz, H-6), 7.77 (dd, 1H, J = 8.3, 0.7 Hz, H-8), 7.83 (ddd, 1H, J = 8.6, 7.1, 1.8 Hz, H-7), 8.05 (dd, 1H, J = 7.9, 1.8 Hz, H-5).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ = 55.73 (C-2'-OCH₃), 59.72 (C-4"-OCH₃), 60.21 (C-6"), 73.55 (C-2"), 75.70 (C-5"), 76.56 (C-3"), 78.96 (C-4"), 100.56 (C-1"), 112.36 (C-3), 113.87 (C-6'), 117.13 (C-3'), 117.99 (C-4'), 118.71 (C-8), 121.58 (C-1'), 123.20 (C-4a), 124.71 (C-5), 125.37 (C-6), 134.18 (C-7), 149.34 (C-5'), 153.94 (C-2'), 155.99 (C-8a), 160.14 (C-2), 177.27 (C-4).

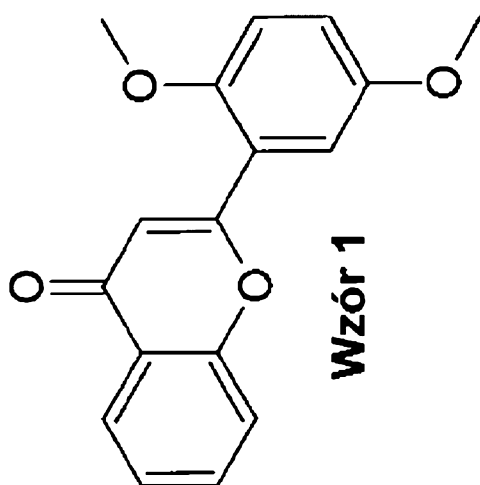
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-5'-metoksyflawonu, **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 2',5'-dimetoksyflawon 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 1 dobę, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie, otrzymując 2'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-5'-metoksyflawon o wzorze 2, który znajduje się we frakcji o niższej polarności.
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 6 dni.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że mieszaninę poreakcyjną oczyszcza się, używając jako eluentu mieszaniny chloroform i metanol 9:1.

Rysunek



Wzór 2



Wzór 1