

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **240929**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428757**

(22) Data zgłoszenia: **31.01.2019**

(51) Int.Cl.

C12P 19/44 (2006.01)

C07H 15/26 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

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

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

10.08.2020 BUP 17/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

27.06.2022 WUP 26/22

(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 240929 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 4'-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). 4'-metoksyflawon wykazuje funkcje neuroprotektoryjne poprzez hamowanie zaprogramowanej śmierci komórki (parthanatos) (Fatokun A., Liu J., Dawson V., et al. Identification through high-throughput screening of 4'-methoxyflavone and 3',4'-dimethoxyflavone as novel neuroprotective inhibitors of parthanatos. *British Journal of Pharmacology* (2013) 169 1263-1278).

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 aglycosyltransferase RhGT1 and an engineered microbial glucosyl transferase OleDPSA toward a small flavonoid library. *Carbohydr Res.* 2013; 368:73–7; Pandey R. P., Gurung R. B., Parajuli P., Koirala N., Tuoi L. T., Sohng J. K. Assessing acceptor substrate promiscuity of YjiC-mediated glycosylation toward flavonoids. *Carbohydr Res.* 2014; 393:26–31).

4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon znany jest z publikacji M. Dymarska et. al. „Bio-transformations of Flavones and an Isoflavones(Daidzein) in Cultures of Entomopathogenic Filamentous Fungi”, *Molecules* (2018), 23 (6), 1356.

Szczep *Beauveria bassiana* KCh J1.5 był wcześniej ujawniony w literaturze (Cascade biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) by *Beauveria* species (Kozłowska E., Urbaniak M., Hoc N., Grzeszczuk J., Dymarska M., Stępień Ł., Płaskowska E., Kostrzewa-Susłów E. & Janeczko T.) [*Scientific Reports* vol. 8, Article number: 13449 (2018)]).

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się *Beauveria bassiana* KCh J1.5. Po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 4'-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 niemieszącym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

W wyniku regioselektywnej O-demetylacji i 4"-O-metyloglikozylacji otrzymuje się 4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon, a reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Beauveria bassiana* KCh J1.5.

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 *Beauveria bassiana* KCh J1.5, 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 4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu, z wydajnością izolowaną na poziomie 40% (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 *Beauveria bassiana* KCh J1.5. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 4'-metoksyflawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 2 cm³ dimetylosuflotlenku (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:

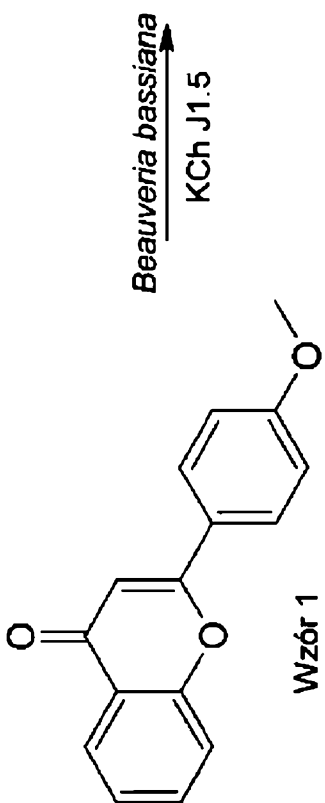
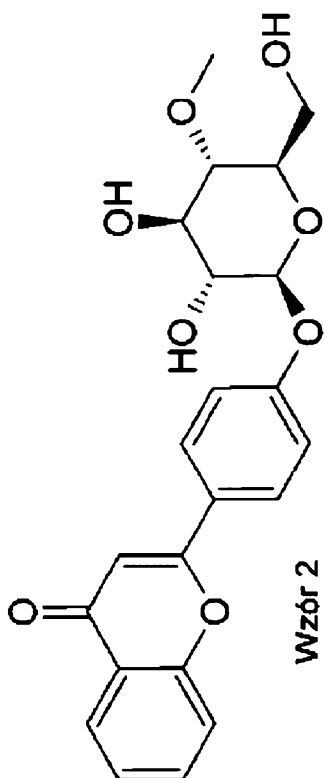
¹H NMR (600 MHz) (DMSO) δ (ppm): 3.06 (t, 1H, J = 9.3 Hz, H-4"), 3.29 (ddd, 1H, J = 9.1, 7.8, 5.2 Hz, H-2"), 3.42-3.49 (m, 2H, H-3", H-5"), 3.47 (s, 3H, C-4"-OCH₃), 3.52 (ddd, 1H, J = 11.5, 6.4, 5.1 Hz, one of H-6"), 3.65 (ddd, J = 11.4, 5.0, 1.5 Hz, one of H-6"), 4.74 (dd, 1H, J = 6.2, 5.1 Hz, C-6"-OH), 5.07 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H-1"), 5.30 (d, 1H, J = 5.5 Hz, C-3"-OH), 5.48 (d, 1H, J = 5.2 Hz, C-2"-OH), 6.99 (s, 1H, H-3), 7.18-7.22 (m, 2H, H-3', H-5'), 7.50 (ddd, 1H, J = 8.1, 6.8, 1.3 Hz, H-6), 7.78 (ddd, 1H, J = 8.5, 1.3, 0.4 Hz, H-8), 7.83 (ddd, 1H, J = 8.5, 6.8, 1.7 Hz, H-7), 8.04 (ddd, 1H, J = 7.9, 1.6, 0.5 Hz, H-5), 8.06-8.10 (m, 2H, H-2', H-6').

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ = 59.74 (C-4"-OCH₃), 60.18 (C-6"), 73.37 (C-2"), 75.69 (C-5"), 76.25 (C-3"), 78.94 (C-4"), 99.50 (C-1"), 105.76 (C-3), 116.54 (C-3' and C-5'), 118.50 (C-8), 123.33 (C-4a), 124.41 (C-5), 124.78 (C-6), 125.46 (C-1'), 128.11 (C-2' and C-6'), 134.20 (C-7), 155.65 (C-8a), 160.05 (C-4'), 162.46 (C-2), 177.02 (C-4).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 4'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCh J1.5, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 4'-metoksyflawon 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.
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



Beauveria bassiana
KCh J1.5