

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **241533**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432958**

(22) Data zgłoszenia: **20.02.2020**

(51) Int.Cl.

C07H 17/065 (2006.01)

C12P 19/60 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(54) **2-Fenylo-6-metylo-4-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chroman i sposób wytwarzania 2-fenylo-6-metylo-4-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

23.08.2021 BUP 21/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

17.10.2022 WUP 42/22

(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

PL 241533 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 2-fenyl-6-metylo-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chroman o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania 2-fenyl-6-metylo-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu.

2-fenyl-6-metylo-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chroman 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, umożliwiających 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* antioxidantizing properties, stability, and solubility in flavonoids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2014, 62, 3321–333).

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.; Buijsman, M. N. C. P.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. R. J.; de Vries, 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 *Isaria fumosorosea* KCH J2 ujawniony w zgłoszeniu patentowym o numerze P.416996.

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.

W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat otrzymywania 2-fenyl-6-metylo-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu.

Istotą wynalazku jest 2-fenyl-6-metylo-4-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-chroman.

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-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. 2-fenilo-6-metylo-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-chroman znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w szóstym 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 12 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 *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje redukcja 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 2-fenilo-6-metylo-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu 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.

P r z y k ł a d. 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 *Isaria fumosorosea* KCH J2. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg 6-metyloflawanonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ tetrahydrofuranu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 12 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 szóstym paśmie od linii startu.

Na tej drodze otrzymuje się 20,4 mg 2-fenilo-6-metylo-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu (wydajność 23,3%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma ¹H NMR (601 MHz, Aceton-d₆).

Sygnały pochodzące od szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od jednostki cukrowej		
δ [ppm]	J [Hz]	H	δ [ppm]	J [Hz]	H
5,36 (dd)	12,1; 1,9	2	4,49 (d)	7,8	1''
2,43 (dt)	14,1; 2,2	3ax	3,27 (m)		2''
2,07 (ddd)	6,0; 3,6; 1,2	3eq	3,52 (m)		3''
4,92 (t)	2,8	4	3,12 (dd)	9,6; 9,0	4''
7,22 (d)	1,9	5	3,27 (m)		5''
7,08 (dd)	8,3; 1,9	7	3,89 (m)		6''
			3,71 (dt)	11,4; 5,8	
6,80 (d)	8,3	8	3,54 (s)		C4''-OCH ₃
7,50 (d)	7,2	2'			
7,40 (t)	7,6	3'			
7,33 (m)		4'			
7,40 (t)	7,6	5'			
7,50 (d)	7,2	6'			
2,27 (s)		6-CH ₃			

Zastrzeżenia patentowe

1. 2-Fenylo-6-metylo-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-chroman o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 2-fenylo-6-metylo-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-chromanu, **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-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 2-fenylo-6-metylo-4-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-chroman o wzorze 2 znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w szóstym paśmie od linii startu.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg:1 cm³.
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 12 dni.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowsarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol w stosunku objętościowym 9:1.

Rysunek

