

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **235964**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **427409**

(22) Data zgłoszenia: **15.10.2018**

(51) Int.Cl.

C12P 17/06 (2006.01)

C07D 311/30 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(54)

Sposób wytwarzania 4'-hydroksyflawonu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

20.04.2020 BUP 09/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

16.11.2020 WUP 18/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MATEUSZ ŁUŻNY, Wrocław, PL
EWA KOZŁOWSKA, Wrocław, PL
JAROSŁAW POPŁOŃSKI, Szklarska Poręba, PL
MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁÓW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 235964 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 4'-hydroksyflawonu.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do otrzymywania produktu będącego prekursorem leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych.

Flawony są syntetyzowane przez rośliny, wykazują istotny wpływ na wzrost i rozwój roślin, odpowiadają za ekspresję różnych genów, posiadają zdolność do zmiany aktywności enzymów [Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 65:337–353; 1999.] w tym hamowania aktywności lipooksygenazy, cyklooksygenazy, monooksygenazy, czy kinaz białkowych [Gao, G.; Sofic E.; Prior R.L. antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22:749–760, 1997] oraz dodatkowo nadają barwę kwiatom i owocom. Szacuje się, że w codziennej diecie, uzupełnianej suplementami diety dostarczane jest do organizmu ok. 1 g. tych związków [Zanden J.J.; Wortelboer H. M.; Bijlsma S.; Punta A.; Ustas M.; Bladeren P. J.; Rietjens I.M.C.M.; Cnubben N.H.P.; Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Biochemical Pharmacology* 69 (2005) 699–708]. Opisane są ich właściwości przeciwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwutleniające, antyarytmiczne czy przeciwnowotworowe [Yao, L. H.; Jiang, Y. M.; Shi, J.; Tomas-Barberan, F. A.; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)* 59: 113–122; 2004.].

Znany jest sposób otrzymania 4'-hydroksyflawonu w wyniku hydroksylacji flawonu katalizowany przez grzyby strzępkowe. Z konwersją 81% uzyskano ten związek w kulturze szczepu *Aspergillus niger* x172 [Ibrahim A-RS. Abul-hajj YJ. Microbiological transformation of flavone and isoflavone. *Xenobiotica*, 1990, 20, 363–373].

W literaturze nie ma doniesień dotyczących zastosowania metod biotechnologicznych do uzyskania 4'-hydroksyflawonu z 4'-metoksyflawonu.

Szczep *Beauveria bassiana* KCh J1 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-Susłowska 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 szczep *Beauveria bassiana* KCh J1. 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 24 godziny. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

W wyniku regioselektywnej O-demetylacji otrzymuje się 4'-hydroksyflawon, a reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Beauveria bassiana* KCh J1.

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 10 dni.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Beauveria bassiana* KCh J1, następuje regioselektywna O-demetylacja w substracie. 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'-hydroksyflawonu, z wydajnością izolowaną na poziomie 15% (konwersją według HPLC = 62%), w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

P r z y k ł a d. Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 5 g aminobakaru i 15 g glukozy, wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCh J1. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 4'-metoksyflawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 2 cm³ dimetylosulfotlenku (DMSO). Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 10 dni. Następnie mieszaninę po reakcji ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaniny heksanu i acetonu 9:1.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi: ^1H NMR (600 MHz) (DMSO) δ (ppm): 6.88 (s, 1H, H-3), 6.92–6.96 (m, 2H, H-3', H-5'), 7.48 (ddd, 1H, J = 8.0, 7.0, 1.2 Hz, 1H, H-6), 7.75 (ddd, 1H, J = 8.4, 1.2, 0.4 Hz, H-8), 7.81 (ddd, 1H, J = 8.5, 6.9, 1.7 Hz, H-7), 7.95–7.99 (m, 2H, H-2', H-6'), 8.03 (dd, 1H, J = 7.9, 1.7, 0.4 Hz, H-5).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ = 104.83 (C-3), 115.97 (C-3' and C-5'), 118.39 (C-8), 121.60 (C-1'), 123.34 (C-4a), 124.75 (C-5), 125.35 (C-6), (C-2' and C-6'), 134.06 (C-7), 155.61 (C-8a), 161.00 (C-4'), 163.09 (C-2), 176.91 (C-4).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób; wytwarzania 4'-hydroksyflawonu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCh J1, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 4'-metoksyflawon o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, przy czym transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 24 godziny, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym 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 zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 10 dni.

Rysunki

