



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **428747**

(22) Data zgłoszenia: **31.01.2019**

(51) Int.Cl.

C12P 17/06 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C07D 311/30 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(54) **5'-Hydroksy-2'-metoksyflawon i sposób wytwarzania 5'-hydroksy-2'-metoksyflawonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

10.08.2020 BUP 17/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

04.10.2021 WUP 27/21

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MATEUSZ ŁUŻNY, Wrocław, PL
EWA KOZŁOWSKA, Wrocław, PL
MARCELINA MAZUR, Wrocław, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 5'-hydroksy-2'-metoksyflawon i sposób wytwarzania 5'-hydroksy-2'-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 Wesółowska. 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 (BenjawanWudtiwai, BungornSripanidkulchai, Prachya-Kongtawelert, RatanaBanjerdpongchai. 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 (AnaKralj, Mai- ThaoNguyen, NuskaTschammer, NicoletteOcampo, QuintoGesiotto, 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).

W literaturze nie ma doniesień dotyczących uzyskania 5'-hydroksy-2'-metoksyflawonu.

Szczep *Beauveria bassiana* KCh J1 był wcześniej ujawniony w literaturze (Kozłowska E, Urbaniak M, Hoc N, Grzeszczuk J, Dymarska M, Stępień Ł, Płaskowska E, Kostrzewa-Susłow E, Janeczko T. (2018) Cascadebiotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) by *Beauveria* species. *Scientific Reports*, 8:13449).

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 2',5'-dimetoksyflawon 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 frakcjach o niższej polarności.

W wyniku regioselektywnej O-demetylacji otrzymuje się 5'-hydroksy-2'-metoksyflawon, 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 3 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 5'-hydroksy-2'-metoksyflawonu, z wydajnością izolowaną na poziomie 50% (konwersją według HPLC – 80%), 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 aminobaku i 15 g glukozy, wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCh J1. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 2',5'-dimetoksyflawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 2 cm³ dimetylosulfotlenku (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 heksan i aceton 9:1. Produkt znajduje się we frakcjach o niższej polarności.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi

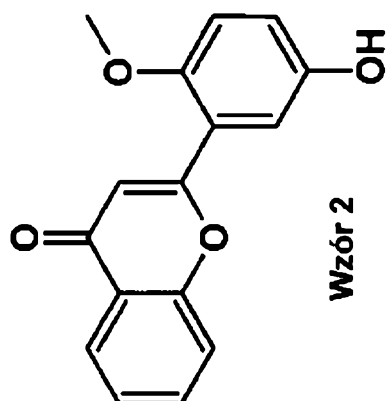
¹H NMR (600 MHz) (DMSO) δ (ppm): 3.84 (s, 3H, C-2'-OCH₃), 6.94 (s, 1H, H-3), 6.97 (dd, 1H, J = 8.9, 3.0 Hz, H-4'), 7.09 (d, 1H, J = 9.0 Hz, H-3'), 7.32 (d, 1H, J = 3.0 Hz, H-6'), 7.50 (ddd, J = 8.0, 7.1, 0.8 Hz, H-6), 7.71 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H-8), 7.83 (ddd, 1H, J = 8.6, 7.2, 1.7 Hz, H-7), 8.05 (dd, 1H, J = 7.9, 1.4 Hz, H-5).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ = 56.33 (C-2'-OCH₃), 111.57 (C-3), 114.07 (C-3'), 115.01 (C-6'), 118.43 (C-8), 119.36 (C-4'), 120.29 (C-1'), 123.13 (C-4a), 124.77 (C-5), 125.42 (C-6), 134.33 (C-7), 150.80 (C-2'), 151.12 (C-5'), 155.89 (C-8a), 160.53 (C-2), 177.16 (C-4).

Zastrzeżenia patentowe

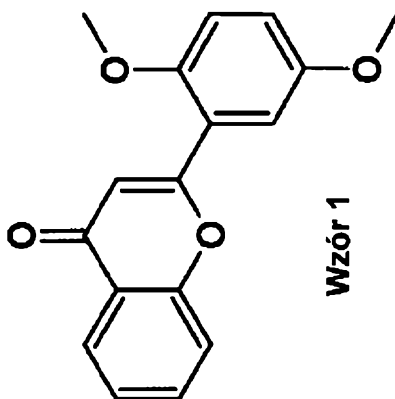
1. 5'-Hydroksy-2'-metoksyflawon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 5'-hydroksy-2'-metoksyflawonu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCh J1, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 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, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie, produkt znajduje się we frakcji o niższej polarności.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,2 g : 1 L.
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 3 dni.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że mieszaninę poreakcyjną oczyszcza się, używając jako eluentu mieszaniny heksan aceton 9:1.

Rysunek



Wzór 2

Beauveria bassiana
KCh J1



Wzór 1