

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238789**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428754**

(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)

Sposób wytwarzania 4'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawonu

(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
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 238789 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 4'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawonu.

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 pochodne flawonów 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., Often M. 2008. *World Malaria 2008*, World Health Organization (WHO): Geneva).

4'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawon był wyizolowany z endemicznej rośliny (*Strobilanthes formosanus*) stosowanej w medycynie ludowej na Tajwanie. Preparaty z tej bogatej w związki flawonoidowe rośliny są stosowane do leczenia zarówno nieżytów gardła jak i problemów związanych z funkcjonowaniem wątroby (Kuo-ChingKao, Yu-Ling Ho, I-Hsin Lin, Li-Kang Ho, Yuan-ShiunChang. Flavone Glycosides from *Strobilanthes formosanus*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2004, 51,199–204). Związek ten był również wyizolowany z *Kaempferia parviflora* – rośliny stosowanej na Tajlandii do leczenia dolegliwości związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem jelit (Toshiaki Azuma, Yasuo Tanaka, Hiroe Kikuzaki. Phenolic glycosides from *Kaempferia parviflora*. *Phytochemistry* 69 (2008) 2743–2748). Wysoką aktywność prozdrowotną posiadają również bogate w metoksyflawony ekstrakty z tej rośliny (Patanasethanont, D., Nagai, J., Yumoto, R., Murakami, T., Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B.O., Yenjai, C., Takano, M., 2006. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts and their flavone constituents on P-glycoprotein function. *J.Pharm. Sci.* 96, 223–233).

W literaturze nie ma doniesień dotyczących zastosowania metod biotechnologicznych do uzyskania 4'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawonu.

Szczep *Isaria farinosa* KCh KW1.1 był wcześniej ujawniony w literaturze (Kozłowska E, Urbaniak M, Grzeszczuk J, Hoc N, Sycz J, Dymarska M, Kostrzewa-Susłow 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 5,7,4'-trimetoksyflawon wzorzec 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.

W wyniku regioselektywnej O-demetylacji otrzymuje się 4'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawon, a reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Isaria farinosa* KCh KW1.1.

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 9 dni.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria farinosa* KCh KW1.1, 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'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawonu, z wydajnością izolowaną na poziomie 50% (konwersją według HPLC = 90%), 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 *Isaria farinosa* KCh

KW1.1. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 5,7,4'-trimetoksyflawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 2 cm³ dimetylosulfotlenku (DMSO). Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 9 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahuje się trzykrotnie chlo-roformem, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaniny heksan i aceton 9:1.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR (600 MHz) (DMSO) δ (ppm): 3.82 (s, 3H, C-5-OCH₃), 3.89 (s, 3H, C-7-OCH₃), 6.49 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.59 (s, 1H, H-3), 6.83 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.89–6.92 (m, 2H, H-3', H-5'), 7.87–7.90 (m, 2H, H-2', H-6'), 10.22 (s, 1H, C-4'-OH).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) $\delta = 55.94$ (C-7-OCH₃), 56.06 (C-5-OCH₃), 93.32 (C-8), 96.16 (C-6), 106.13 (C-3), 108.25 (C-4a), 115.83 (C-3', C-5'), 121.37 (C-1'), 127.84 (C-2', C-6'), 159.12 (C-8a), 160.06 (C-2), 160.24 (C-5), 160.51 (C-4'), 163.58 (C-7), 175.65 (C-4).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 4'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawonu, **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 5,7,4'-trimetoksyflawon 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.
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 9 dni.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że mieszaninę poreakcyjną oczyszcza się, używając jako eluentu mieszaniny heksan aceton 9:1.

Rysunek

