

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **237331**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424953**

(22) Data zgłoszenia: **19.03.2018**

(51) Int.Cl.

C12P 13/02 (2006.01)

C12P 17/06 (2006.01)

(54)

Sposób wytwarzania 7-acetamidoflawonu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

23.09.2019 BUP 20/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

06.04.2021 WUP 07/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Przyrodniczy
we Wrocławiu, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 237331 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 7-acetamidoflawonu o wzorze 2, przedstawionym na rysunku.

Związek ten może znaleźć zastosowanie jako antyoksydant w przemyśle spożywczym oraz jako składnik środków farmaceutycznych i kosmetycznych, a także dodatek do pasz.

Flawonoidy to drugorzędowe metabolity roślin, które przyjmowane wraz z pokarmami pochodzenia roślinnego odgrywają istotną rolę w prewencji wielu chorób. Związki te wykazują działanie przeciwutleniające, przeciwalergiczne, przeciwzapalne, zapobiegają chorobom układu krążenia, pomagają kontrolować wagę [Raffa, D.; Maggio, B.; Raimondi, M. V.; Plescia, R.; Daidone, G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. Eur. J. Med. Chem. 2017, 142, 213–228].

Aminoflawony są grupą zyskującą coraz większe zainteresowanie badaczy ze względu na wykazywaną przez nie silną aktywność przeciwnowotworową. Związki te wnikają do komórek rakowych, wewnątrz ulegają aktywacji tworząc pochodne uszkodzające DNA komórek. Jednocześnie aminoflawony nie wykazują działania cytotoksycznego w stosunku do komórek niezmiennych chorobowo [Moorkoth, S. Synthesis and Anti-cancer Activity of Novel Thiazolidinone Analogs of 6-Aminoflavone. Chem. Pharm. Bull 2015, 974, 974–985; Chandrasekaran, S.; Enoch, I. V. M. V. Host-guest interaction of flavanone and 7-aminoflavone with C-Hexylpyrogallol[4]arene. J. Mol. Struct. 2014, 1076, 318–325].

7-aminoflawon wykazuje działanie antybakteryjne w stosunku do *Mycobacterium tuberculosis* [Kónya, K.; Pajtás, D.; Kiss-Szikszai, A.; Patonay, T. Buchwald-Hartwig reactions of monohaloflavones. European J. Org. Chem. 2015, 2015, 828–839], a także *Staphylococcus aureus* i *Bacillus typhosus* [Bapat, D. S., Venkataraman, F.A.Sc. Potential antitubercular compounds. K. Proc. Indian Acad. Sci. 1955, 336–341, <https://doi.org/10.1007/BF03053537>].

Znana jest metoda otrzymywania 7-acetamidoflawonu na drodze syntezy chemicznej z 4-acetamido-2-hydroksydibenzoilometanu. Substrat rozpuszczony w zimnym stężonym kwasie siarkowym pozostawiono na dwie godziny. Produkt otrzymany po dodaniu lodu wykrystalizowywał z alkoholu w postaci białych igieł [Bapat, D. S., Venkataraman, F.A.Sc. Potential antitubercular compounds. K. Proc. Indian Acad. Sci. 1955, 336–341].

W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat otrzymywania 7-acetamidoflawonu na drodze biotransformacji.

W ostatnich latach w leczeniu i prewencji chorób coraz większe znaczenie zyskują związki pochodzenia naturalnego i ich odpowiedniki uzyskane na drodze biotransformacji. Dlatego istotne jest poszukiwanie nowych sposobów wytwarzania związków aktywnych biologicznie, które mogą być wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym, ale też kosmetycznym i spożywczym.

Istota wynalazku 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 7-aminoflawon o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszanym z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu co najmniej 96 godzin. Kolejny produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszanym z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.

Korzystnie także jest, gdy proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 168 godzin.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje przekształcenie grupy aminowej do acetamidowej przy C-7. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszanym z wodą (octan etylu).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 7-acetamidoflawonu w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu wykorzystując mikroorganizm niebędący patogenem ludzkim.

Wykorzystanie biotransformacji, zamiast syntezy chemicznej, umożliwia, w sposób przyjazny dla środowiska, uzyskanie związków o wyższej biodostępności i aktywności biologicznej, niż użyte substraty (E. Kostrzewa-Susłowska, J. Dmochowska-Gładysz, J. Oszmiański, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 49 (1–4), 113–117, W. A. Loughlin, Bioresource Technology, 2000, 74, 49–62).

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 10 g aminobaku i 30 g glukozy, wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2 ujawniony w zgłoszeniu patentowym o numerze P.416996. Po 96 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg 7-aminoflawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ tetrahydrofuranu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 7 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 chloroformu i metanolu w stosunku 9:1. 7-Acetamidoflawon znajduje się we frakcji o niższej polarności.

Na tej drodze otrzymuje się 6,1 mg 7-acetamidoflawonu (wydajność 10%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma ¹H NMR (600 MHz, Aceton-d₆) δ: 2.17 (s, 3H, -CH₃); 6,80 (s, 1H, 3-H); 7.41 (dd, 1H, J = 8.6, 2.0Hz, 6-H); 7.59-7.62 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H); 8.01 (d, 1H, J = 8.6 Hz, 5-H); 8.05-8.11 (m, 2H, 2'-H, 6'-H); 8.36 (d, 1H, J = 1.9 Hz, 8-H).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 7-acetamidoflawonu **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 7-aminoflawon 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 nie-mieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.
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 168 godzin.

Rysunek

