

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235962**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **427404**

(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 2'-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 JANECZKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Kasperowicz**

**PL 235962 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 2'-hydroksyflawonu.

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

Flawony są syntetyzowane przez rośliny i wykazują istotny wpływ na ich rozwój. 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, monoooksygenazy, czy kinaz białkowych (Cao, G.; Sofic E.; Prior R.L. antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22:749–760, 1997). Szacuje się, że w codziennej diecie, dostarczane jest do organizmu ok. 1 g związków flawonoidowych (Zanden J.J.; Wortelboer H. M.; Bijlsma S.; Punta A.; Ustab M.; Bladerenc 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.).

2'-Hydroksyflawon został zsyntetyzowany już w 1912 roku. Jego strukturę potwierdzono w 1988 r. przy pomocy spektroskopii NMR. 2'-Hydroksyflawon był również wyizolowany z roślin leczniczych *Daphnopsis sellwiana* (Blasko G., Xun L., Cordell G.A., 1988. Studies in the Thymelaeaceae. V. 2'-Hydroxyflavone from *Daphnopsis sellwiana*: isolation and synthesis. *J. Nat. Prod.* 51, 60–65.) oraz *Primula veris* (Budzianowski J., Morozowska M., Wesółowska M. Lipophilic flavones of *Primula veris* L. from field cultivation and *in vitro* cultures. *Phytochemistry* 66 (2005) 1033–1039).

W literaturze nie ma doniesień dotyczących zastosowania metod biotechnologicznych do uzyskania 2'-hydroksyflawonu.

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-Susłow 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 2'-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 72 godziny. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

W wyniku regioselektywnej O-demetylacji otrzymuje się 2'-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 7 dni.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Beauveria bassiana* KCh J1, następuje regioselektywna O-demetylacja substratu.

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'-hydroksyflawonu, z wydajnością izolowaną na poziomie 3% (konwersją według HPLC > 8%), 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 cm<sup>3</sup>, w której znajduje się 500 cm<sup>3</sup> 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'-metoksyflawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 2 cm<sup>3</sup> dimetylosulfotlenku (DMSO). Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 10 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.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

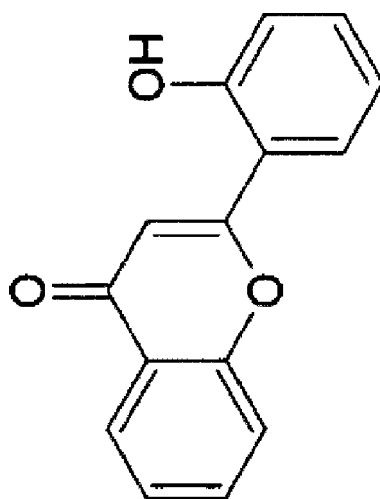
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz) (Acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 7.07 (ddd, 1H,  $J = 8.0, 7.3, 1.1$  Hz, H-5'), 7.13 (dd, 1H,  $J = 8.2, 1.0$  Hz, H-3'), 7.19 (s, 1H, H-3), 7.42 (ddd, 1H,  $J = 8.2, 7.3, 1.7$  Hz, H-4'), 7.48 (ddd, 1H,  $J = 8.1, 7.1, 1.1$  Hz, H-6), 7.70 (ddd, 1H,  $J = 8.4, 1.1, 0.5$  Hz, H-8), 7.80 (dd, 1H,  $J = 8.8, 6.9, 1.6$  Hz, H-7), 7.99 (dd, 1H,  $J = 7.9, 1.7$  Hz, H-5).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta = 112.54$  (C-3), 117.93 (C-3'), 119.18 (C-8), 119.58 (C-1'), 120.91 (C-5'), 124.71 (C-4a), 125.85 (C-6), 125.89 (C-5), 129.73 (C-6'), 133.25 (C-4'), 134.62 (C-7), 157.16 (C-2'), 157.32 (C-8a), 161.76 (C-2), 178.25 (C-4).

### Zastrzeżenia patentowe

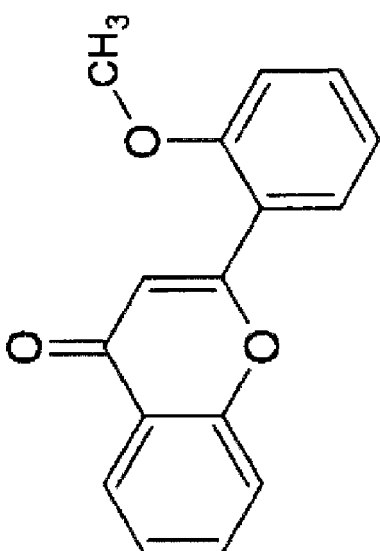
1. Sposób wytwarzania 2'-hydroksyflawonu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCh J1, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 2'-metoksyflawon o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 72 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.

## Rysunek



Wzór 2

*Beauveria bassiana*  
KCh J1



Wzór 1