

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 242340 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **435581**

(22) Data zgłoszenia: **2020.10.05**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.04.11 BUP 15/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.02.13 WUP 07/2023**

(51) MKP:

C12P 17/06 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C07D 311/30 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(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 JANECZKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania 3'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawonu

PL 242340 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 3'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawonu.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do otrzymywania preparatów stosowanych w prewencji chorób układu krążenia oraz w profilaktyce przeciwnowotworowej.

Na dzień dzisiejszy, szacuje się, że występuje ponad 9000 związków flawonoidowych pochodzenia roślinnego (Yonekura-Sakakibara, K.; Higashi, Y.; Nakabayashi, R. The Origin and Evolution of Plant Flavonoid Metabolism. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 1–16), które jako wtórne metabolity spełniają szereg funkcji m.in. regulujących ogólny rozwój roślin, pigmentację, czy zapewniających ochronę przed UV (Gall, M.; Thomsen, M.; Peters, C.; Pavlidis, I. V.; Jonczyk, P.; Grünert, P.P.; Beutel, S.; Scheper, T.; Gross, E.; Backes, M.; et al. Enzymatic Conversion of Flavonoids using Bacterial Chalcone Isomerase and Enoate Reductase. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2014, 53, 1439–1442; Pathak, S.; Kesavan, P.; Banerjee, A.; Banerjee, A.; Celep, G.S.; Bissi, L.; Marotta, F. Metabolism of Dietary Polyphenols by Human Gut Microbiota and Their Health Benefits. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*; Elsevier, 2018; pp. 347–359 ISBN 9780128130063; Hassan, S.; Mathesius, U. Flavonoids Play Multiple Roles in Symbiotic Root-Rhizosphere Interactions. In *Biological Nitrogen Fixation*; 2015; Vol. 2–2, pp. 499–510 ISBN 9781119053095). Dodatkowo, ciągle są opisywane nowe właściwości biologiczne flawonów, które wykazują pozytywny wpływ na organizmy modelowe po ich spożyciu, w tym na organizm ludzki. Począwszy od często opisywanych zdolności antyoksydacyjnych, przeciwnowotworowych, przeciwzapalnych (Cao, H.; Chen, X.; Jassbi, A.R.; Xiao, J. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnol. Adv.* 2015, 33, 214–223; Xiao, Z.; Wang, Y.; Wang, J.; Li, P.; Ma, F. Structure-antioxidant capacity relationship of dihydrochalcone compounds in *Malus*. *Food Chem.* 2019, 275, 354–360), przeciwgrzybiczych, przeciwbakteryjnych czy przeciwwirusowych (Yao, L.H.; Jiang, Y.M.; Shi, J.; Tomás-Barberán, F. a; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S.S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2004, 59, 113–122) aż do wykorzystania tych związków do leczenia Choroby Alzheimer (Bei, D.; An, G. Pharmacokinetics and tissue distribution of 5,7-dimethoxyflavone in mice following single dose oral administration. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 119, 65–70), czy obniżania poziomu glukozy we krwi (testowane na modelach szczurzych) (Xie, Y.; Zhang, Y.; Su, X. Antidiabetic and Hypolipidemic Effects of 5,7-Dimethoxyflavone in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Med. Sci. Monit.* 2019, 25, 9893–9901), pokazując, że związki te można wykorzystać na bardzo szeroką skalę.

5,7-Dimetoksyflawon jest wytwarzany przez rośliny stosowane w medycynie naturalnej: można go wyizolować m.in. z kłącza *Boesenbergia pandurata* (Roxb.), czyli w roślinie, która jest od dawna wykorzystywana w tajskiej medycynie tradycyjnej (Panthong, A.; Tassaneeyakul, W.; Kanjanapothi, D.; Tantiwac, P.; Reutrakul, V. Anti-Inflammatory activity of 5,7-dimethoxyflavone. *Planta Medic* 1989, 55, 133–136), z liści i nasion *Piper caninum* (Salleh, W.; Ahmad, F.; Yen, K. Chemical constituents from *Piper caninum* and antibacterial activity. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2015, 5, 020–025) czy z liści *Kaempferia parviflora* (Yenjai, C.; Wanich, S.; Pitchuanom, S.; Sripanidkulchai, B. Structural modification of 5,7-dimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* and biological activities. *Arch. Pharm. Res.* 2009, 32, 1179–1184). Co więcej, związek ten, przetestowany na szczurach wykazywał bardzo niską toksyczność, praktycznie bez skutków ubocznych (nawet w dawkach do 3 g/kg masy ciała) (Panthong, A.; Tassaneeyakul, W.; Kanjanapothi, D.; Tantiwac, P.; Reutrakul, V. Anti-Inflammatory activity of 5,7-dimethoxyflavone. *Planta Medic* 1989, 55, 133–136). Autorzy porównali tutaj właściwości przeciwzapalne 5,7-DMF z aspiryną i stwierdzili, iż związek ten jednocześnie hamuje wytwarzanie prostaglandyn (działanie p/zapalne) oraz w tym przypadku obniża (rektalną) temperaturę organizmu szczura. Dodatkowo wykazano również, iż 5,7-DMF działa jako inhibitor sarcopenii oraz powoduje jednocześnie rozwój masy i objętości mięśniowej na modelu mysim – czyli wykazuje właściwości bardzo zbliżone do wykorzystywanej w badaniach biologicznych chryzyny (5,7-dihydroksyflawonu) (Kim, C.; Hwang, J.-K. The 5,7-Dimethoxyflavone Suppresses Sarcopenia by Regulating Protein Turnover and Mitochondria Biogenesis-Related Pathways. *Nutrients* 2020, 12, 1079).

Szczep *Isaria fumosorosea* KCh J2 był wcześniej ujawniony w literaturze (Dymarska M., Grzeszczuk J., Urbaniak M., Janeczko T., Płaskowska E., Stępień Ł., Kostrzewa-Susłow E.; (2017) Glycosylation of 6-methylflavone by the strain *Isaria fumosorosea* KCh J2. *Plos One*. 12, e.0184885; Kozłowska E., Dymarska M., Kostrzewa-Susłow E.; Janeczko T., (2017) *Isaria fumosorosea* KCh J2 entomopathogenic strain as an effective biocatalyst for steroid compound transformations. *Molecules*, 22, 1511, doi:10.3390).

Znana jest chemiczna metoda uzyskiwania 3'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawonu w wyniku debenzylacji 3'-benzyloksy-5,7-dimetoksyflawonu (Shaw, B. L., & Simpson, T. H. (1952). 981. Chelate systems. Part II. Journal of the Chemical Society, 5027–5032. doi:10.1039/jr9520005027). W literaturze nie ma doniesień dotyczących biotechnologicznego uzyskania 3'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawonu.

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCh J2. Po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 5,7-dimetoksyflawon o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 15 do 35 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, od 24 do 72 godzin. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

W wyniku regioselektywnej hydroksylacji otrzymuje się 3'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawon, a reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Isaria fumosorosea* KCh J2.

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.

Korzystnie także jest, gdy oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol w stosunku objętościowym 18:1.

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 3 dni.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCh J2, następuje regioselektywna hydroksylacja substratu.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 3'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawonu, z wydajnością izolowaną na poziomie 50% (konwersją według GC >70%), w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Przykład. 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 fumosorosea* KCh J2. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 5,7-dimetoksyflawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ tetrahydrofuranu (THF). 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 chloroform i metanol 18:1.

Na tej drodze otrzymuje się 3'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawon (konwersja według GC na poziomie >70%).

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹NMR (600 MHz) (CDCl₃) δ (ppm): 3.83 (s, 3H, C-5-OCH₃), 3.90 (s, 3H, C-7-OCH₃), 6.51 (d, 1H, J = 2.3 Hz, H-6), 6.64 (s, 1H, H-3), 6.82 (d, 1H, J = 2.3 Hz, H-8), 6.96 (ddd, 1H, J = 8.1, 2.4, 0.5 Hz, H-4'), 7.33 (t, 1H, J = 7.9 Hz, H-5'), 7.37 (t, 1H, J = 2.2 Hz, H-2'), 7.45 (brd, 1H, J = 7.8 Hz, H-6'), 9.87 (s, C-3'-OH).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 3'-hydroksy-5,7-dimetoksyflawonu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla drożdży wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCh J2, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 5,7-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, od 24 do 72 godzin, 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 oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol w stosunku objętościowym 18:1.

Rysunki

