

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238786**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428742**

(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) **4'-Hydroksy-2',5'-dimetoksyflawon
i sposób wytwarzania 4'-hydroksy-2',5'- 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
MARCELINA MAZUR, Wrocław, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 238786 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 4'-hydroksy-2',5'-dimetoksyflawon i sposób wytwarzania 4'-hydroksy-2',5'-dimetoksyflawonu.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie farmaceutycznym jako składnik 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 Wesołowska. 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 (Benjawan Wudtiwai, Bungorn Sripanidkulchai, Prachya Kongtawelert, Ratana Banjerdpongchai. 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 (Ana Kralj, Mai-Thao Nguyen, NuskaTschammer, Nicolette Ocampo, Quinto Gesiotto, 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 4'-hydroksy-2',5'-dimetoksyflawonu.

Szczep *Beauveria bassiana* KCh J1 był wcześniej ujawniony w literaturze (Kozłowska E, Urbania M, Hoc N, Grzeszczuk J, Dymarska M, Stępień Ł, Płaskowska E, Kostrzewa-Susłow E, Janeczko T. (2018) Cascade biotransformation 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 wyższej polarności.

W wyniku regioselektywnej hydroksylacji otrzymuje się 4'-hydroksy-2',5'-dimetoksyflawonu, 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 hydroksylacja 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 5'-hydroksy-2'-metoksyflawonu, z wydajnością izolowaną na poziomie 5% (konwersją według HPLC = 7%), 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 wyższej polarności.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR (600 MHz) (DMSO) δ (ppm): 3.84 (s, 3H, C-5'-OCH₃), 3.85 (s, 3H, C-2'-OCH₃), 6.70 (s, 1H, H-3'), 6.95 (s, 1H, H-3), 7.47 (ddd, 1H, $J = 8.1, 6.4, 1.9$ Hz, H-6), 7.53 (s, 1H, H-6'), 7.78 (ddd, 1H, $J = 8.6, 7.2, 1.7$ Hz, H-7), 7.81 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-8), 8.02 (dd, 1H, $J = 7.9, 1.5$ Hz, H-5).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) $\delta = 56.17$ (C-5'-OCH₃), 56.64 (C-2'-OCH₃), 101.11 (C-3'), 109.36 (C-1'), 109.90 (C-3), 112.87 (C-6'), 118.51 (C-8), 123.11 (C-4a), 124.63 (C-5), 125.16 (C-6), 133.89 (C-7), 141.87 (C-4'), 151.41 (C-5'), 153.86 (C-2'), 155.74 (C-8a), 160.67 (C-2), 177.08 (C-4).

Zastrzeżenia patentowe

1. 4'-Hydroksy-2',5'-dimetoksyflawon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 4'-hydroksy-2',5'-dimetoksyflawonu, **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 frakcjach o wyższej 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

