

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **223376**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **407937**

(51) Int.Cl.
C07D 311/30 (2006.01)
C07D 473/12 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **17.04.2014**

(54) **Kokryształ genisteina-kofeina
oraz sposób otrzymywania kokryształu genisteina-kofeina**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
22.12.2014 BUP 26/14

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.10.2016 WUP 10/16

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL
UNIWERSYTET WROCŁAWSKI, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
ŁUKASZ WARDEGA, Wrocław, PL
MICHAŁ SOWA, Wrocław, PL
EWA MATCZAK-JON, Wrocław, PL
KATARZYNA ŚLEPOKURA, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 223376 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kokryształ genisteina-kofeina, charakteryzujący się zwiększoną rozpuszczalnością w stosunku do genisteiny znajdujący zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym lub kosmetycznym.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania kokryształu genisteina-kofeina metodą roztworową oraz zawieszinową.

Genisteina (4',5,7-trihydroksyizoflawon, wzór 1) jest głównym izoflawonem obecnym w soi (ok. 3 mg/g), co opisano w publikacji Dixon, R. A. & Ferreira, D. (2002). *Phytochemistry* **60**, 205.

Ponadto, zgodnie z publikacją Brandi, M. L. (1997). *Calcif. Tissue Int.* **61**, S5, genisteina wykazuje aktywność estrogenową.

Z publikacji Han, R. M., Tian, Y. X., Liu, Y., Chen, C. H., Ai, X. C., Zhang, J. P. & Skibsted, L. H. (2009). *J. Agric. Food. Chem.* **57**, 3780; Borràs, C., Gambini, J., López-Gruesso, R., Pallardó, F. V. & Vina, J. (2010). *Biochim. Biophys. Acta.* **1802**, 205; Rusin, A., Krawczyk, Z., Grynkiewicz, G., Gogler, A., Zawisza-Puchałka, J. & Szeja, W. (2010). *Acta Biochim. Pol.* **57**, 23; Park, C. E., Yun, H., Lee, E., Min, B., Bae, H., Choe, W., Kang, F., Kim, S. & Ha, J. (2010). *J. Med. Food.* **13**, 815; Zhang, Y., Chen, W. F., Lai, W. P. & Wong, M. S. (2008). *Inflammopharmacology* **16**, 213 wiadomo, że genisteina posiada właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające.

Z publikacji Radzikowski, Cz., Wietrzyk, J., Grynkiewicz, G. & Opolski, A. (2004). *Postępy Hig. Med. Dośw.* **58**, 128; Nakagawa, H., Yamamoto, D., Kiyozuka, Y., Tsuta, K., Uemura, Y., Hioki, K., Tsutsui, Y. & Tsubura, A. (2000). *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **126**, 448; Polkowski, K. & Mazurek, A. P. (2000). *Acta Pol. Pharm.* **57**, 135; Setchell, K. D. & Cassidy, A. (1999). *J. Nutr.* **129**, 758S wiadomo, że genisteina wykazuje potencjalne wielokierunkowe zastosowanie w leczeniu i prewencji chorób nowotworowych.

W publikacji Rostagno, M. A., Manchon, N., D'Arrigo, M., Guillamon, E., Yillares, A. Garcia-Lafuente, A., *et al.* (2011). *Anal. Chim. Acta*, **685**, 204 opisano, że kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna, wzór 2) jest naturalnym alkaloidem roślinnym, występującym m.in. w kawie, herbacie i nasionach kakaowca (i produktach z nich wytwarzanych, jak czekolada). Jako związek biologicznie czynny, znana jest ze stymulacji ośrodkowego układu nerwowego oraz przyspieszania metabolizmu. Kofeina jest związkiem farmaceutycznie akceptowalnym i może być stosowana jako składnik preparatów farmaceutycznych i suplementów diety.

Kokryształizacja od kilku lat jest jedną z obiecujących metod modyfikowania niekorzystnych parametrów fizykochemicznych substancji farmaceutycznie czynnych.

W roku 2011 opublikowano pierwszą pracę dotyczącą kokryształizacji flawonoidów w aspekcie farmaceutycznym.

Otrzymany kokryształ kwercetyny i kofeiny charakteryzuje się 14-krotnie zwiększoną rozpuszczalnością i 10-krotnie zwiększoną biodostępnością w porównaniu z kwercetyną (Smith, A. J., Kavuru, P., Wojtas, Ł., Zaworotko, M. J. & Shytle, R. D. (2011). *Mol. Pharm.* **8**, 1867)

Termin kokryształ nie posiada jednoznacznej definicji i jest przedmiotem rozległej debaty – publikacja Aitipamula, S., *etal.* (2012). *Cryst. Growth Des.* **12**, 2147.

Jedna z definicji zakłada, że kokryształ jest strukturalnie homogenicznym ciałem stałym, zawierającym dwa (lub więcej) składników w określonej stechiometrii, które pozostają w obojętnej elektrycznej formie, a w warunkach pokojowych są ciałami stałymi.

Głównym składnikiem kokryształu farmaceutycznego jest substancja farmaceutycznie czynna (*ang.* API), pozostałe zwane są koformerami.

Niewystarczająca biodostępność genisteiny stoi na przeszkodzie ku opracowywaniu skutecznych leków, preparatów farmaceutycznych oraz suplementów diety i jest związana z niewielką rozpuszczalnością w środowiskach wodnych, co opisano w publikacji Wu, J. G. *etal.* (2010). *J. Chem. Eng. Data*, **55**, 5287.

Próby modyfikacji rozpuszczalności genisteiny podejmowane były poprzez kompleksowanie β -cyklodekstrynami, co opisano w kolejnej publikacji Daruhazi, A. E. *etal.* (2008). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**, 636.

W publikacji Smith, A. J., Kavuru, P., Wojtas, Ł., Zaworotko, M. J. & Shytle, R. D. (2011). *Mol. Pharm.* **8**, 1867 opisano kokryształy farmaceutyczne kwercetyny.

W publikacji Kavuru, P. (2008). MSc Thesis, University of South Florida, USA opisano kokryształy farmaceutyczne hesperetyny.

W publikacji Sowa, M., Ślepokura, K. & Matczak-Jon, E. (2012). *Ada Cryst.* **C68**, o262 opisano kokryształ farmaceutyczny bajkaleiny.

Kokryształy flawonoidów fizetyny, genisteiny oraz luteoliny z nikotynamidem i izonikotynamidem zostały ujawnione w publikacjach Sowa, M., Ślepokura, K. & Matczak-Jon, E. (2013). *CrystEngComm* **15**, 7696 oraz Sowa, M., Ślepokura, K. & Matczak-Jon, E. (2013). *Ada Cryst.* **C69**, 1267.

Kokryształ flawonoidu mirycetyny i piracetamu opisano w publikacji Sowa, M., Ślepokura, K. & Matczak-Jon, E. (2014). *J. Mol. Strud.* **1058**, 114.

W amerykańskim zgłoszeniu patentowym nr US 2010 0 204 204 opisano kokryształy flawonoidów.

Istotą wynalazku jest kokryształ genisteina-kofeina o wzorze 3.

Wynalazek dotyczy również sposobu otrzymania kokryształu genisteina-kofeina o wzorze 3, który polega na tym, że genisteinę o wzorze 1 w ilości 25.0 mg do 50.0 mg oraz kofeinę o wzorze 2 w ilości od 18.1 mg do 36.2 mg w stosunku stechiometrycznym 1:1 rozpuszcza się w od 5 do 10 ml metanolu, etanolu, izopropanolu, 2-metoksyetanolu lub 1-metoksy-2-propanolu, po czym całość miesza się, przesącza, a następnie pozostawia się do powolnego odparowania w temperaturze pokojowej, natomiast po 4 do 24 dniach zbiera się kryształy.

W odmianie sposobu otrzymywania kokryształu genisteina-kofeina o wzorze 3, genisteinę o wzorze 1 i kofeinę o wzorze 2 w ilości stechiometrycznej 1:1 zawiesza się w octanie etylu lub acetonitrylu w ilości 2 ml na każde 50 mg genisteiny, całość miesza przez 24 h w temperaturze pokojowej, po czym otrzymany materiał mikrokryształiczny przesącza się i suszy w temperaturze pokojowej przez okres 12 do 24 godzin, a następnie poddaje analizie na dyfraktometrze proszkowym lub spektrometrze FT-Raman.

Przedmiot wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach jego wykonania, na schemacie reakcji oraz na rysunkach, gdzie:

Rys. 1 przedstawia część niezależną komórki elementarnej kokryształu genisteina-kofeina, wraz z numeracją atomów i wiązaniami wodorowymi (szare przerywane linie). Wiązania H-C atomów wodoru udokładnionych w dwóch alternatywnych pozycjach przy grupach metylowych C3A i C74 kofeiny zaznaczono czarnymi przerywanymi liniami.

Rys. 2 przedstawia upakowanie cząsteczek w sieci krystalicznej, ukazujące tworzenie warstwy molekularnej przez wiązania wodorowe (szare przerywane linie).

Rys. 3 przedstawia porównanie dyfraktogramu teoretycznego kokryształu genisteina-kofeina (GenCaf calc) z eksperymentalnymi dyfraktogramami kokryształu genisteina-kofeina otrzymanego przez powolne odparowanie roztworu metanolowego (GenCaf SE MeOH) oraz na drodze metody zawieszinowej z zastosowaniem octanu etylu (GenCaf SLR EtOAc). Różnice w wartościach kąta 2θ wynikają z kontrakcji kryształu, zachodzącej podczas jego chłodzenia w trakcie pomiaru dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego.

Rys. 4 przedstawia porównanie widm FT-Raman kokryształu genisteina-kofeina otrzymanego:

- przez powolne odparowanie roztworu metanolowego (GenCaf SE MeOH),
- przez powolne odparowanie roztworu etanolowego (GenCaf SE EtOH),
- przez powolne odparowanie roztworu izopropanolowego (GenCaf SE iPrOH),
- przez powolne odparowanie roztworu 2-metoksyetanolowego (GenCaf SE 2-OMe-EtOH),
- przez powolne odparowanie roztworu 1-metoksy-2-propanolowego (GenCaf, SE, 1-OMe-2-prOH),
- wykorzystując metodę zawieszinową z zastosowaniem acetonitrylu (GenCaf SLR MeCN),
- wykorzystując metodę zawieszinową z zastosowaniem octanu etylu (GenCaf SLR EtOAc).

Rys. 5 przedstawia widmo FT-IR kokryształu genisteina-kofeina.

Rys. 6 przedstawia krzywą TG-DTA kokryształu genisteina-kofeina.

Rys. 7 przedstawia krzywe rozpuszczalności genisteiny oraz kokryształu genisteina-kofeina, w mieszaninie etanol-woda 50:50 (v/v), w okresie pierwszych 2h (a) oraz w okresie 24h (b).

Rys. 8 przedstawia zdjęcie kryształu genisteina-kofeina widzianego pod mikroskopem stereoskopowym z przystawką polaryzacyjną.

P r z y k ł a d 1

Genisteinę (25,0 mg, 0,093 mmol) oraz kofeinę (18,1 mg, 0,093 mmol) rozpuszczono w 5 ml metanolu za pomocą mieszania. Roztwór przesącza do zlewki, którą szczelnie zakleiono parafilmem i wykonano kilka niewielkich otworów umożliwiających powolne parowanie roztworu. Zlewkę pozostawiono w temperaturze pokojowej, a po 4 dniach zebrano jasnożółte kryształy na dnie zlewki.

Spośród otrzymanych kryształów wybrano monokryształ do analizy rentgenostrukturalnej oraz dyfrakcji proszkowej.

Przykład 2

Genisteinę (50,0 mg, 0,186 mmol) oraz kofeinę (36,2 mg, 0,18 mmol) rozpuszczono w 10 ml 2-metoksyetanolu za pomocą mieszania. Roztwór przesączono do zlewki, którą szczelnie zaklejono parafilmem i wykonano kilka niewielkich otworów umożliwiających powolne parowanie roztworu. Zlewkę pozostawiono w temperaturze pokojowej, a po 24 dniach zebrano jasnożółte kryształy na dnie zlewki.

Przykład 3

Genisteinę (100,0 mg, 0,370 mmol) oraz kofeinę (71,9 mg, 0,370 mmol) umieszczono w zlewce i dodano 4 ml octanu etylu. Otrzymaną zawiesinę mieszano z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego, w temperaturze pokojowej, przez okres 24 godzin. Otrzymany materiał odsączono i wysuszono w warunkach pokojowych przez okres 12 godzin, a następnie poddano analizie na dyfraktometrze proszkowym i spektrometrze Ramana. Porównanie otrzymanego dyfraktogramu z dyfraktogramem kokryształu otrzymanego metodą roztworową pozwala na potwierdzenie tożsamości oraz stwierdzenie 100% konwersji (rys. 3). Porównanie widma FT-Raman uzyskanego materiału z widmem kokryształu otrzymanego metodą roztworową również pozwala na potwierdzenie struktury (rys. 4).

Przykład 4

Analizę rentgenograficzną wykonano w temperaturze -173°C , na czterokołowym dyfraktometrze Xcalibur R o geometrii kappa, z kamerą CCD, wykorzystując promieniowanie $\text{Mo-}\alpha$ ($\delta = 0,71073 \text{ \AA}$). Rejestrację, redukcję i analizę danych wykonano z wykorzystaniem programów CRYALISCCD i CRYALISRED. Strukturę rozwiązano metodami bezpośrednimi wykorzystując program SHELXS-2013 i udokładniono z wykorzystaniem programu SHELXL-2013.

Przykład 5

Dyfraktogramy proszkowe wykonano w temperaturze pokojowej, na aparacie Bruker D8 Advance wykorzystując promieniowanie $\text{Cu-}\alpha$ ($\delta = 1,5418 \text{ \AA}$, generowane przy 30 kV i 40 mA) oraz detektor VANTEC-1. Każdą próbkę analizowano pomiędzy kątami 2θ 3° a 40° , z krokiem $0,01608^{\circ}$ i łącznym czasem pomiaru 40 minut.

Przykład 6

Widmo Ramana wykonano z wykorzystaniem fourierowskiego spektrometru ramanowskiego (FT-Raman, Bruker Multi-Ram) ze wzbudzeniem laserem Nd:YAG (1064 nm) i detektorem germanowym. Próbkę skanowano w zakresie $50\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$, z rozdzielczością 2 cm^{-1} .

Przykład 7

Widmo IR wykonano z wykorzystaniem próżniowego, fourierowskiego spektrometru podczerwieni (FT-IR, Bruker Vertex 70v) działającego w technice osłabionego całkowitego odbicia, przy wykorzystaniu jednodobiciowej przystawki ATR z kryształem diamentowym. Próbkę skanowano w zakresie $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$, z rozdzielczością 2 cm^{-1} .

Przykład 8

Analizę termogravimetryczną wykonano w atmosferze azotu, na aparacie Setaram SETSYS 16/18, z prędkością ogrzewania $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ i w zakresie $20\text{-}400^{\circ}\text{C}$.

Przykład 9

Rozpuszczalność genisteiny oraz kokryształu genisteina–kofeina zbadano w mieszaninie etanol-woda 50:50 (v/v), wykorzystując technikę spektroskopii UV/Vis. Fazy stałe przesiano aby otrzymać frakcje o rozmiarze ziaren pomiędzy 50 a $90 \mu\text{m}$.

Rozpuszczalność określono zawieszając ok. 500 mg fazy stałej (genisteiny lub kokryształu genisteina-kofeina) w 50 mL mieszaniny etanol-woda, następnie mieszając zawiesinę za pomocą mieszadła magnetycznego, w termostatowanym (27°C) naczyniu.

Próbki zawiesiny pobierane były w określonych interwałach czasowych (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480 i 1440 min), przepuszczane przez nylonowy filtr o średnicy porów $0,45 \mu\text{m}$ i natychmiast rozcieńczane.

Stężenie genisteiny wyznaczono na podstawie uprzednio określonej zależności absorbancji od stężenia. Absorbancję mierzono przy długości fali 324 nm warunkującej brak interferencji ze strony koformera. Widma UV/Vis zarejestrowano wykorzystując dwuwiązkowy aparat Hitachi U-2900.

Kokryształ genisteina–kofeina krystalizuje w grupie przestrzennej $P2_1/c$ krystalograficznego układu jednoskośnego. Wybrane dane krystalograficzne znajdują się w tabeli 1.

Tabela 1
Wybrane dane krystalograficzne kokryształu genisteina–kofeina

$C_{15}H_{10}O_5 \cdot C_8H_{10}N_4O_2$	$\beta = 108,64 (3)^\circ$	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0,074$
$M_r = 464,43$	$T = 100 \text{ K}$	$wR(F^2) = 0,164$
Układ jednoskośny, $P2_1/C$	$Z = 4$	$GoF = S = 1,11$
$a = 8,455 (3) \text{ \AA}$	$V = 1984,9 (12) \text{ \AA}^3$	Refleksów zmierzonych = 23160
$b = 18,668 (6) \text{ \AA}$	$R_{int} = 0,072$	Refleksów niezależnych = 4647
$c = 13,272 (4) \text{ \AA}$		Refleksów obserwowanych = 3309

Część niezależna komórki elementarnej kokryształu genisteina-kofeina (rys. 1) zawiera jedną cząsteczkę genisteiny oraz jedną cząsteczkę kofeiny, w formach obojętnych elektrycznie. Analiza upakowania w sieci krystalicznej pokazuje tworzenie warstw molekularnych na drodze wiązań wodorowych zilustrowanych na rys. 2.

Otrzymane dyfraktogramy proszkowe oraz widma FT-Raman i FT-IR (rys. 3, 4, 5) są charakterystyczne dla kokryształu genisteina-kofeina i pozwalają na jego jednoznaczny identyfikację.

Analiza termogravimetryczna (rys. 6) wskazuje na stabilność kokryształu genisteina-kofeina do temperatury ok. 247 °C, w której następuje przemiana endotermiczna, skutkująca jego rozkładem. Brak utraty masy do momentu rozkładu potwierdza niesolwatowany charakter kokryształu oraz czystość próbki.

Porównanie krzywych rozpuszczalności genisteiny (Gen) oraz kokryształu genisteina-kofeina (GenCaf) (rys. 7) wskazuje na zwiększenie maksymalnej rozpuszczalności genisteiny z 0,549 mg/mL (genisteina) do 0,749 mg/mL (kokryształ genisteina-kofeina). Ponadto, krzywe rozpuszczalności wskazują na wyrównanie rozpuszczalności obu form po maksymalnym czasie eksperymentu (24 h, 1440 min), będąc zachowaniem typowym dla kokryształów (tzw. efekt „wybicia i spadochronu”), co opisano w publikacji Babu, N. J. & Nangia, A., (2011). *Cryst. Growth Des.* **11**, 2662.

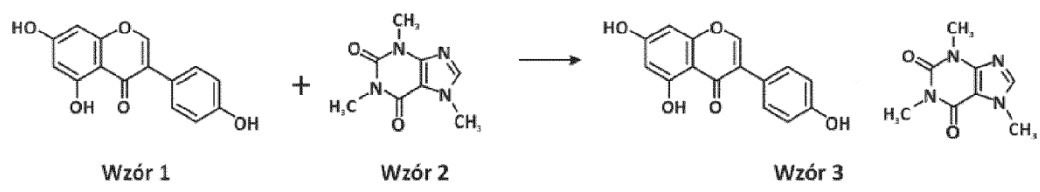
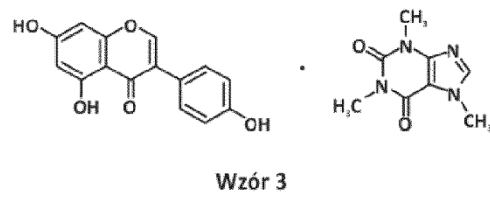
Zastrzeżenia patentowe

1. Kokryształ genisteina-kofeina o wzorze 3.

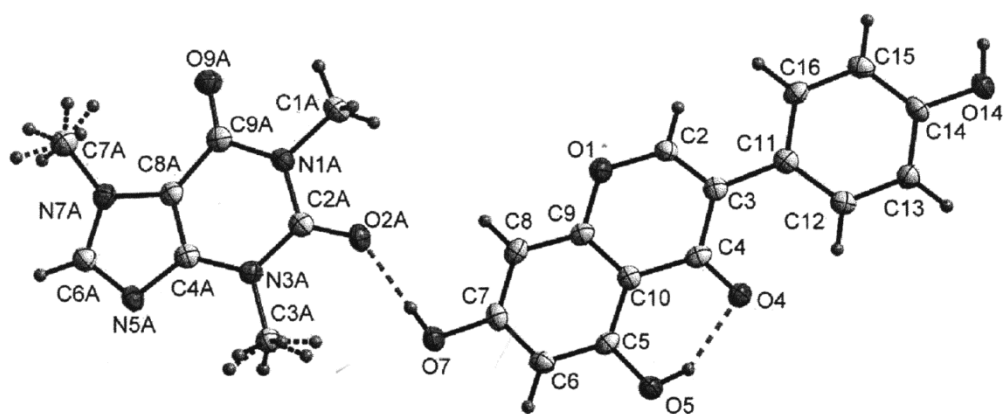
2. Sposób otrzymania kokryształu genisteina-kofeina o wzorze 3, **znamienny tym**, że genisteinę o wzorze 1 w ilości 25,0 mg do 50,0 mg oraz kofeinę o wzorze 2 w ilości od 18,1 mg do 36,2 mg w stosunku stechiometrycznym 1:1 rozpuszcza się w od 5 do 10 ml metanolu, etanolu, izopropanolu, 2-metoksyetanolu lub 1-metoksy-2-propanolu, po czym całość miesza się, przesącza, a następnie pozostawia się do powolnego odparowania w temperaturze pokojowej, natomiast po 4 do 24 dniach zbiera się kryształy.

3. Sposób otrzymywania kokryształu genisteina-kofeina o wzorze 3, **znamienny tym**, że genisteinę o wzorze 1 i kofeinę o wzorze 2 w ilości stechiometrycznej 1:1 zawiesza się w octanie etylu lub acetonitrylu w ilości 2 ml na każde 50 mg genisteiny, całość miesza przez 24 h w temperaturze pokojowej, po czym otrzymany materiał mikrokryształiczny przesącza się i suszy w temperaturze pokojowej przez okres 12 do 24 godzin, a następnie poddaje analizie na dyfraktometrze proszkowym lub spektrometrze FT-Raman.

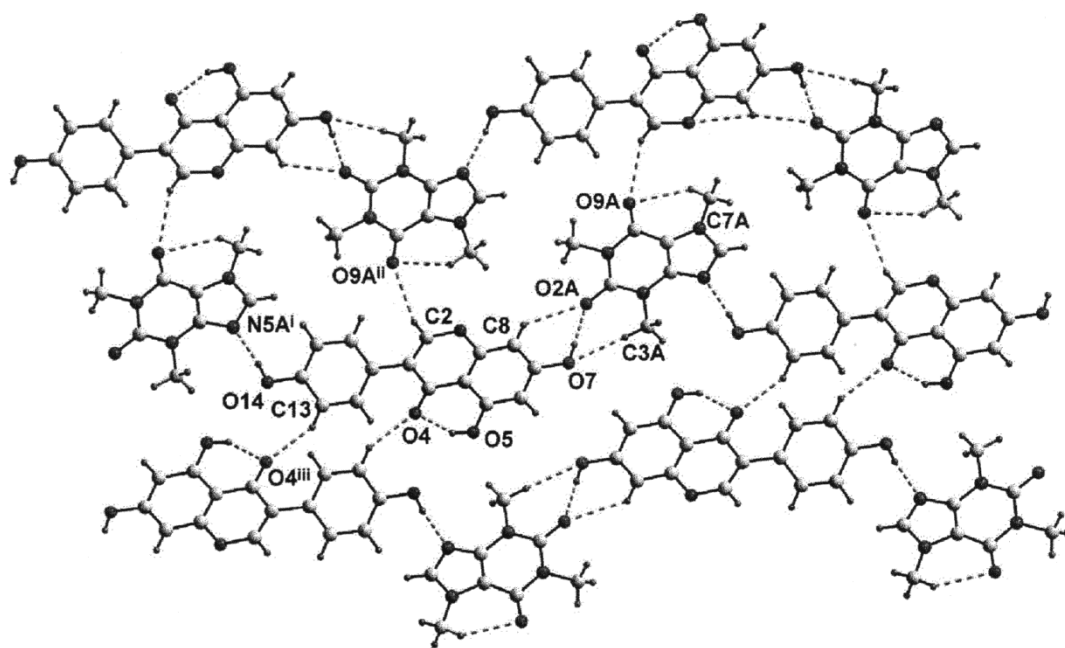
Rysunki



Schemat reakcji

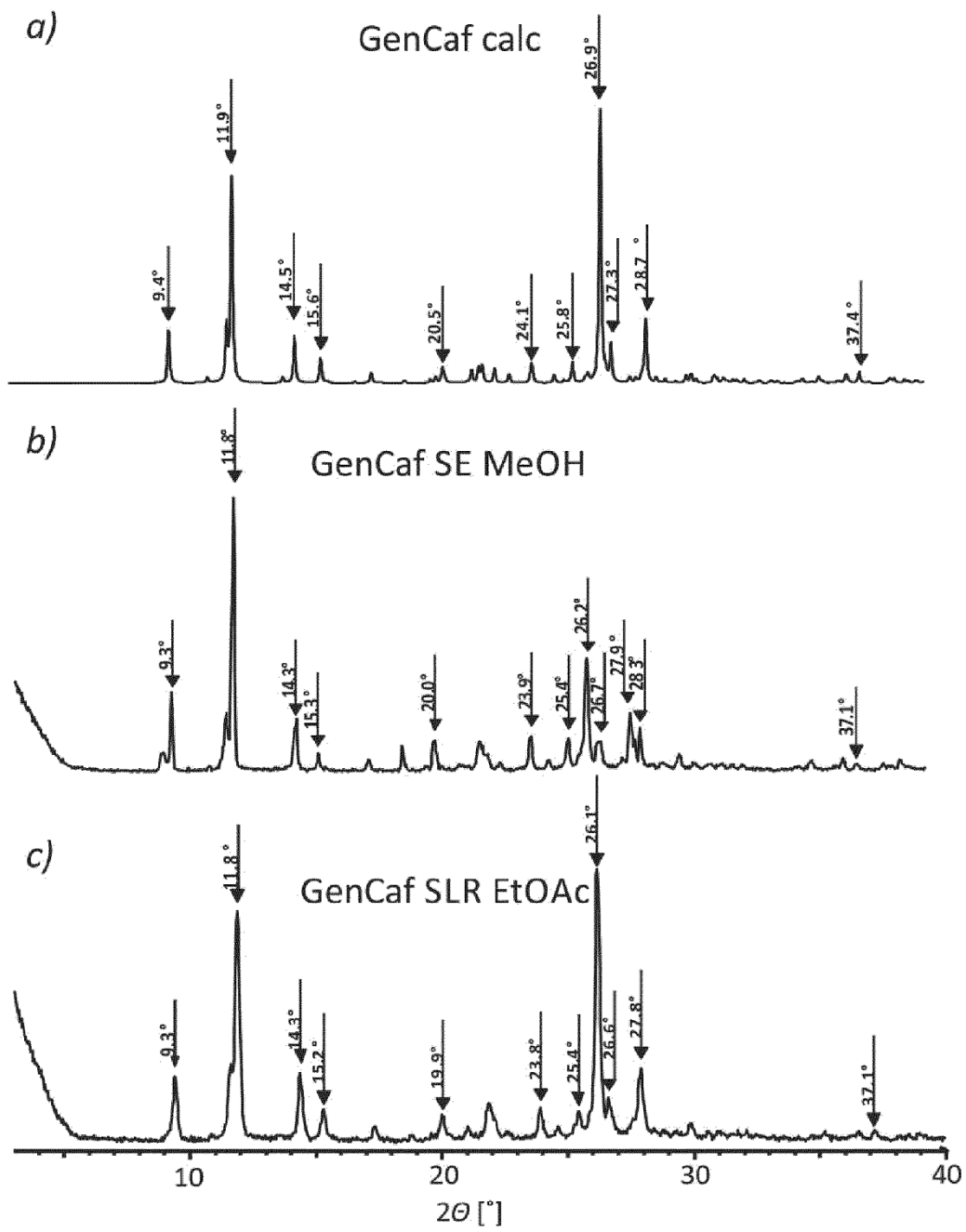


Rys. 1

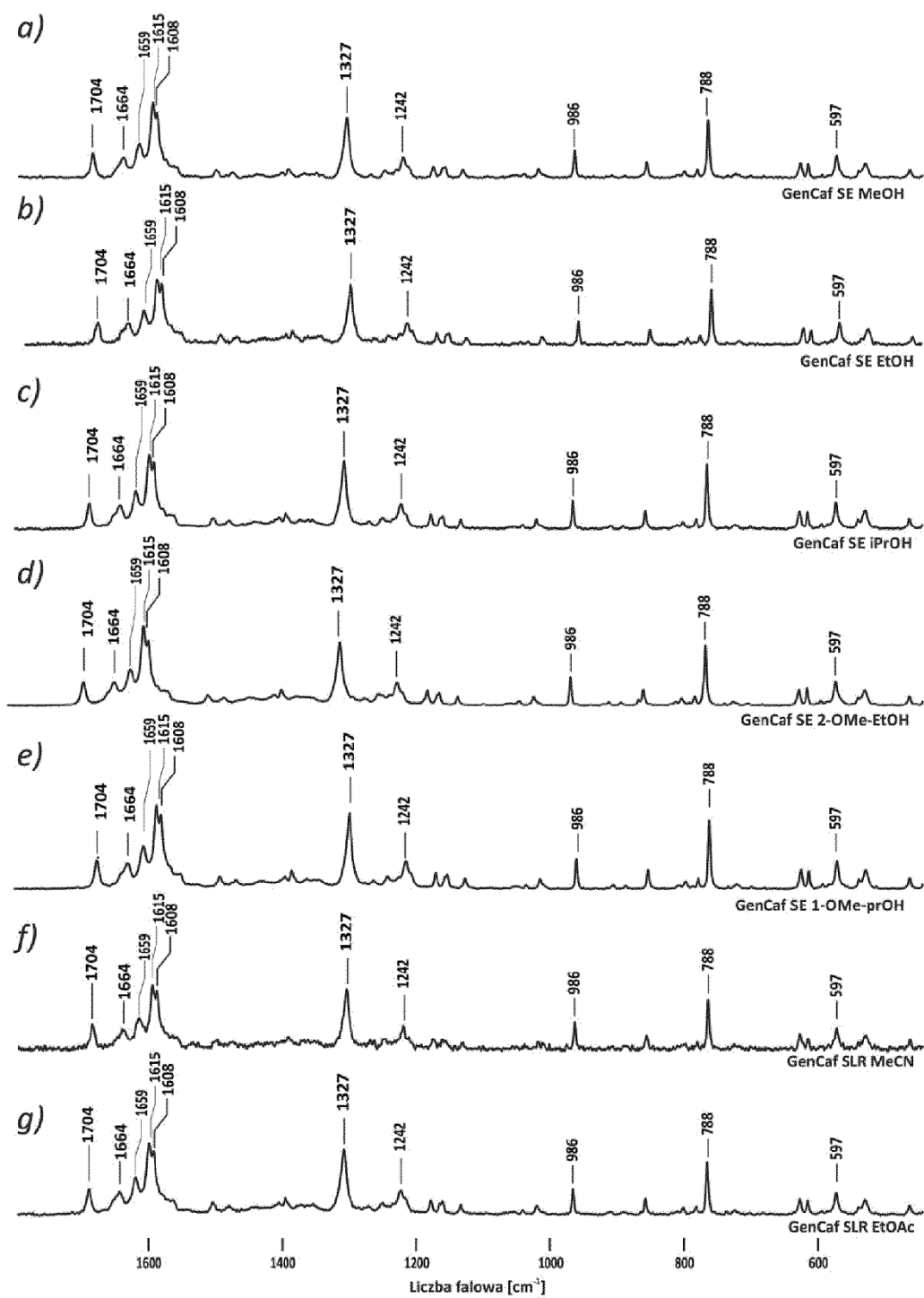


Operacje symetrii: (i) $x, y-1, z$; (ii) $-x, y-1/2, -z+1/2$; (iii) $-x+2, -y, -z+1$.

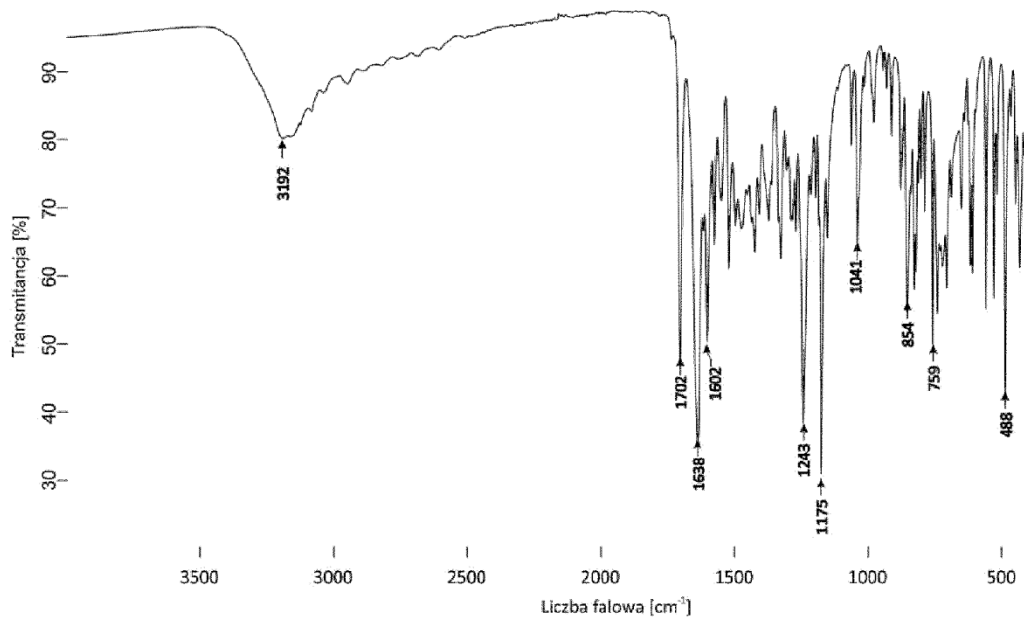
Rys. 2



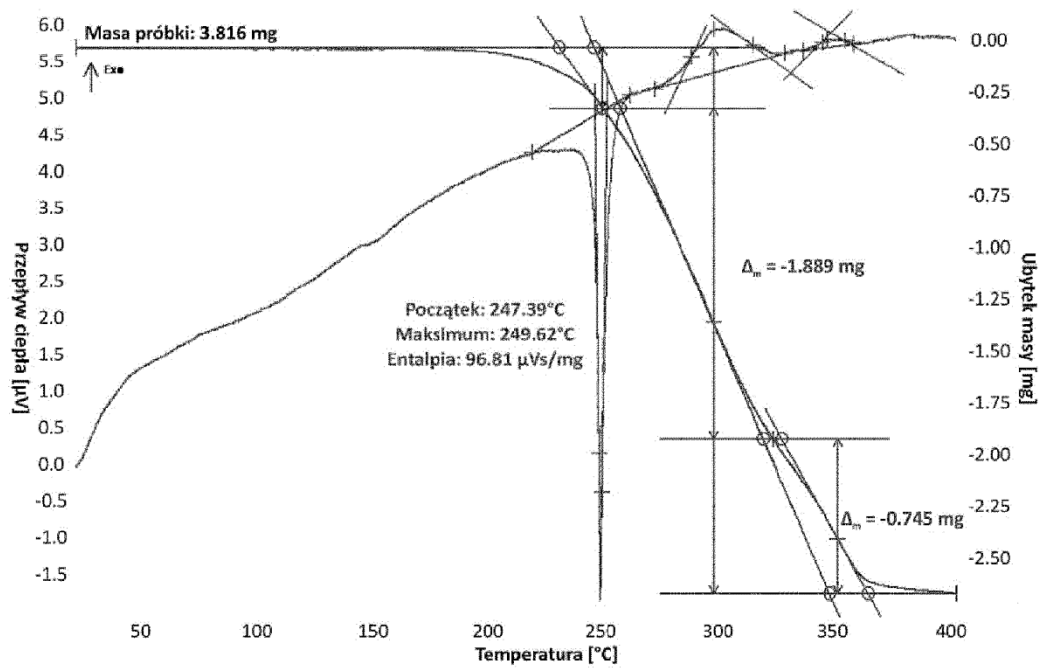
Rys. 3



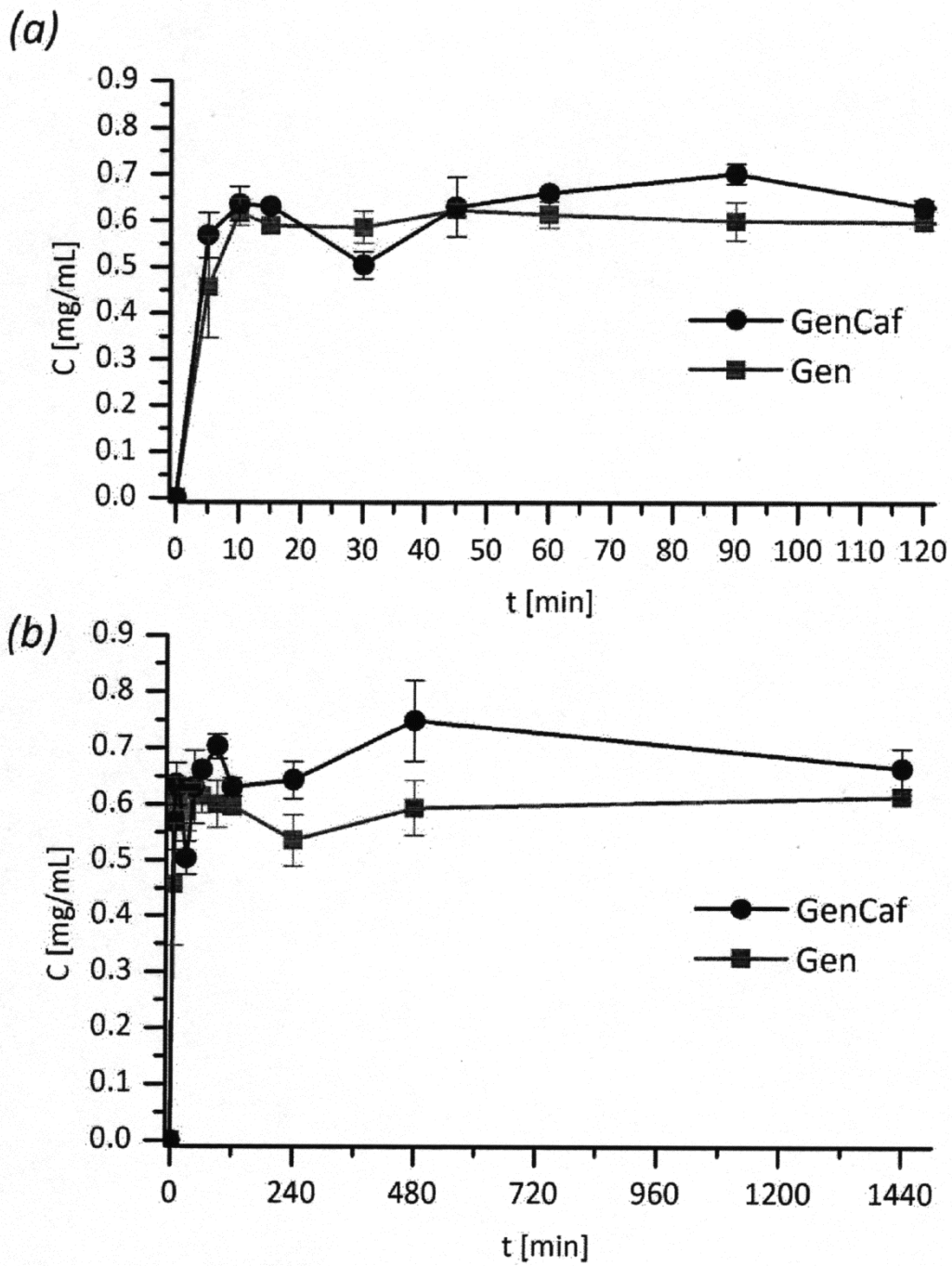
Rys. 4



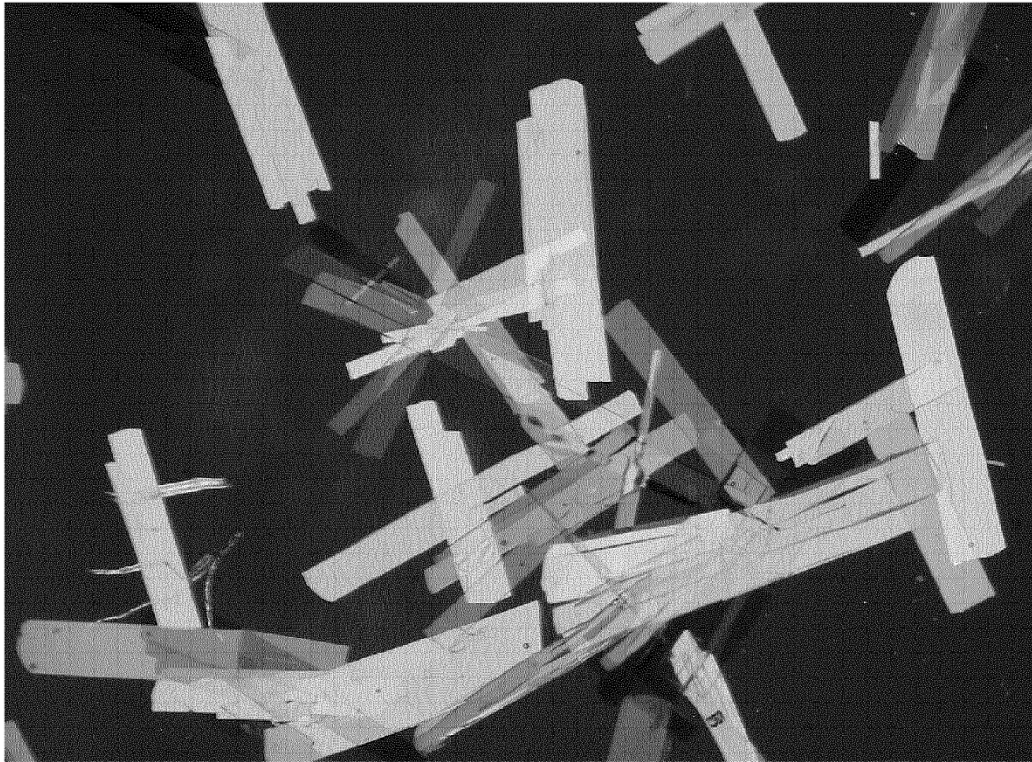
Rys. 5



Rys. 6



Rys. 7



Rys. 8