

A co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate and a method for obtaining a co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate

The subject of the invention is a co-crystal of genistein monohydrate - nicotinamide for use in the pharmaceutical and/or cosmetic industry.

The invention also relates to a method for obtaining a co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate.

Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone, **formula 1**) is the major isoflavone present in soybeans (approx. 3 mg/g) as described in Dixon, R. A. & Ferreira, D. (2002). *Phytochemistry*. **60**, 205-211.

Also, according to Brandi, M. L. (1997). *Calcif. Tissue Int.* **61** S5-S8 genistein has estrogenic activity.

From 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**, 3780-3785, Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F. V. & Viña, J. (2010). *Biochim. Biophys. Acta*. **1802**, 205-211, Rusin, A., Krawczyk, Z., Gryniewicz, G., Gogler, A., Zawisza-Puchałka, J. & Szeja, W. (2010). *Acta Biochim. Pol.* **57**, 23-34, Park, C. E., Yun, H., Lee, E., Min, B., Bae, H., Choe, W., Kang, I., Kim, S. & Ha, J. (2010). *Journal of Medicinal Food*. **13**, 815-820, Zhang, Y., Chen, W. F., Lai, W. P. & Wong, M. S. (2008). *Inflammopharmacology*. **16**, 213-215 Genistein is known to have anti-inflammatory and antioxidant properties.

From Radzikowski, Cz., Wietrzyk, J., Gryniewicz, G. & Opolski, A. (2004). *Postepy Hig. Med. Dosw.* [Advances in hygiene and experimental medicine] **58**, 128-139, Nakagawa, H., Yamamoto, D., Kiyozuka, Y., Tsuta, K., Uemura, Y., Hioki, K., Tsutsui, Y. & Tsubura, A. (2000). *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **126**, 448-454, Polkowski, K. & Mazurek, A. P. (2000). *Acta Pol. Pharm.* **57**, 135-155, Setchell, K. D. & Cassidy, A. (1999). *J. Nutr.* **129**, 758S-767S genistein is known to have a potential multidirectional application in the treatment and prevention of cancer.

Nicotinamide (**formula 2**) is a water-soluble B3 vitamin synthesized from nicotinic acid or supplied to the body with food, as disclosed in Sauve AA. NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:883-93.

In subsequent publications Niren NM. Pharmacologic doses of nicotinamide in the treatment of inflammatory skin conditions: a review. *Cutis* 2006;77:11-6, Namazi MR. Nicotinamide: a potential addition to the anti-psoriatic weaponry. *FASEB J* 2003;17:1377-9 revealed that nicotinamide participates in a number of biological processes, such as energy production or fatty acid synthesis. Its properties allow the treatment of pellagra, psoriasis, schizophrenia and type 1 diabetes.

Nicotinamide is on the list of compounds approved for safe use as additives to food products, because of which it is widely used in the co-crystallization of pharmaceutically active carboxylic acids and can be used as an ingredient in pharmaceutical preparations and dietary supplements.

Co-crystallization has been one of the promising methods for modifying unfavorable physicochemical parameters of pharmaceutically active substances for several years. In 2011, the first publication on the co-crystallization of flavonoids in the pharmaceutical aspect was published. The obtained co-crystal of quercetin and caffeine is characterized by a 14-fold increased solubility and 10-fold increased bioavailability compared to quercetin.

The term cocrystal does not have a clear definition and is the subject of extensive debate - Aitipamula, S., *et al.* (2012). *Cryst. Growth Des.* **12**, 2147-2152. One of the definitions assumes that a co-crystal is a structurally homogeneous solid, containing two components in a specific stoichiometry, which remain in an electrically neutral form and are solids under room conditions. The main component of the co-crystal is a pharmaceutically active substance (*API*), the other is called a coformer.

The insufficient bioavailability of genistein hinders the development of effective drugs, pharmaceutical formulations and dietary supplements and is associated with low solubility in aqueous media as described in Wu, Jian-Guo, *et al.* (2010). *Journal of Chemical & Engineering Data*, **55**, 5287.

Attempts to modify the solubility of genistein have been made by complexing with β -cyclodextrins, as described in a subsequent publication by Agnes Emma Daruhazi, A. E. et al. (2008). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **48**, 636-640..

Smith, A. J., Kavuru, P., Wojtas, L., Zaworotko, M. J. & Shytle, R. D. (2011). *Mol. Pharm.* **8**, 1867-1876 describe pharmaceutical co-crystals of quercetin.

Kavuru, P. (2008). MSc Thesis, University of South Florida, USA, describes pharmaceutical co-crystals of quercetin.

In Sowa, M., Ślepokura, K. & Matczak-Jon, E. (2012). *Acta Cryst.* **C68**, 0262-o265 [*sic*] pharmaceutical cocrystals and baicaleins are described.

The U.S. patent application US20100204204 describes flavonoid co-crystals.

The subject of the invention is a co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate of formula 3.

The subject of the invention is also a method of obtaining a co-crystal of genistein - nicotinamide monohydrate of formula 3, in which genistein of formula 1 in the amount of 25 to 50 mg and nicotinamide of formula 2 in the amount of 150 to 300 mg are dissolved in 5 to 10 mL ethanol and methanol, then stirred, filtered, then allowed to slowly evaporate at room temperature, and after 2 to 4 weeks the crystals are collected.

In another method of the preparation of the co-crystal of genistein - nicotinamide monohydrate of formula 3, genistein of formula 1 and nicotinamide of formula 2 in a stoichiometric amount of 1:1 are placed in a steel vessel of a ball mill, and then water or a mixture of acetonitrile and water in an amount of 50 μ L for every 50 mg of genistein is milled for 5-45 minutes at a vibration frequency of 50-60 Hz, and the microcrystalline material thus obtained is dried at room temperature for 12 to 24 hours and analyzed on a powder diffractometer.

The invention is presented in detail in the examples of its implementation, in the reaction scheme and in the drawings, where Fig. 1 shows photos of co-crystals of genistein - nicotinamide monohydrate taken under a stereoscopic microscope, Fig. 2 shows the independent part of the unit cell of the genistein-nicotinamide monohydrate co-crystal with the numbering of atoms and hydrogen bonds (dashed lines), Fig. 3 shows the packing of molecules in the crystal lattice, showing (a) molecular tape formation, (b) interactions between tapes leading to the formation of a two-dimensional lattice, and (c) interactions leading to the formation of a three-dimensional lattice, Fig. 4 shows a comparison of the theoretical diffraction pattern of the co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate (GENNAM calc) with the experimental powder diffraction pattern (GENNAM RT MeOH) Fig. 5 shows a comparison of the theoretical diffraction pattern of the co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate (GENNAM calc) with the diffraction pattern of the product of the milling synthesis with the addition of water (GENNAM LAG H₂O), Fig. 6 shows a comparison of the diffraction pattern of the theoretical co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate (GENNAM calc) with the diffraction pattern of the synthesis product by grinding with the addition of acetonitrile/water mixture (4/1 v/v) (GENNAM LAG MeCN/H₂O, 4/1), Fig. 7 shows the experimental diffraction pattern of genistein, Fig. 8 shows the experimental diffraction pattern of nicotinamide, Fig. 9 shows the powder diffraction pattern of the mixture of genistein and nicotinamide (GEN + NAM PM) compared to the theoretical diffraction pattern of the co-crystal of genistein - nicotinamide monohydrate with marked diagnostic reflections.

Example 1

Genistein (25 mg, 0.091 mmol) and nicotinamide (200 mg, 1.638 mmol) were dissolved in 7 mL of a mixture of methanol and ethanol (1/1 v/v) with stirring. The solution was filtered into a beaker, which was sealed with parafilm and several small holes were made to allow slow evaporation of the solution. The beaker was then left at room temperature (23°C). After 21 days, plate-like crystals were collected at the bottom of the beaker (Fig. 1). From the obtained crystals, a single crystal was selected for X-ray structural analysis.

Performing a powder diffraction pattern of all the crystals obtained excludes the presence of other products apart from the intended co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate.

Example 2

Genistein (50 mg, 0.181 mmol) and nicotinamide (300 mg, 2.457 mmol) were dissolved in 10 mL of a mixture of methanol and ethanol (1/1 v/v) with stirring. The solution was filtered into a beaker, which was sealed with parafilm and several small holes were made to allow slow evaporation of the solution. The beaker was then left at room temperature (23°C). After 14 days, plate-like crystals were collected at the bottom of the beaker. Performing a powder diffraction pattern of all the crystals obtained excludes the presence of other products apart from the intended co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate.

Example 3

Genistein (50 mg, 0.1811 mmol) and nicotinamide (21.3 mg, 0.171 mmol) were placed in a 10 mL steel vessel containing two 7 mm diameter steel balls. 100 µL (about two drops) of distilled water was added to the mixture. The vessel was mounted in a Narva Vibrator Mill and milled for 30 minutes at a vibration frequency of 50 Hz. The obtained microcrystalline material was dried in room conditions for 12 hours and analyzed on a powder diffractometer. Comparison of the obtained diffraction pattern with the theoretical diffraction pattern for the genistein-nicotinamide monohydrate co-crystal allows for 100% conversion (Fig. 5).

Example 4

Genistein (50 mg, 0.1811 mmol) and nicotinamide (21.3 mg, 0.171 mmol) were placed in a 10 mL steel vessel containing two 7 mm diameter steel balls. 100 µL (about two drops) of acetonitrile/water (4/1 v/v) was added to the mixture. The vessel was mounted in a Narva Vibrator Mill and milled for 30 minutes at a vibration frequency of 50 Hz.

The obtained microcrystalline material was dried in room conditions for 12 hours and analyzed on a powder diffractometer. Comparison of the obtained diffraction pattern with the theoretical diffraction pattern for the genistein-nicotinamide monohydrate co-crystal allows for 100% conversion (Fig. 6).

Example 5

X-ray analysis was performed at -173°C, on a four-wheel Oxford Diffraction Xcalibur PX apparatus with kappa geometry, with a Ruby CCD camera, using MoK α radiation ($\lambda = 0.71073\text{\AA}$). Data registration, reduction and analysis were performed using the CrysAlisCCD and CrysAlisRED programs. The structure was solved by direct methods using the SHELXS-97 program and refined using the SHELXL-97 program.. Powder diffractograms were made at room temperature on a Bruker D8 Advance using Cu-K α radiation ($\lambda = 1.5418\text{\AA}$) at 30 kV and 40 mA and a VÅNTEC-1 detector. Each sample was analyzed between 2Θ angles of 3° and 40° , in steps of 0.01608° , and a total measurement time of 40 minutes.

The co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate crystallizes in the space group *Cc* of the monoclinic system. Selected crystallographic data are presented in Table 1.

Crystallographic data	
$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5 \cdot \text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$V = 1,761.6 (10) \text{\AA}^3$
$M_r = 410.37$	$Z = 4$
Monoclinic system, <i>Cc</i>	$T = 100 (2) \text{ K}$
$a = 3.706 (2) \text{\AA}$	
$b = 41.150 (2) \text{\AA}$	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.037$
$c = 11.564 (5) \text{\AA}$	
$\beta = 92.44 (3)^\circ$	

Table 1

Selected crystallographic data of the co-crystal of genistein monohydrate -
nicotinamide

[stamp:] PATENT

ATTORNEY [signature] Anna

Meissner, MScEng

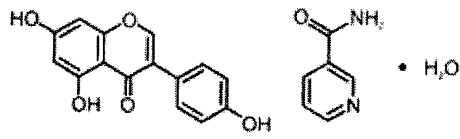
Patent claims

1. Co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate of formula 3.
2. A method for obtaining a co-crystal of genistein - nicotinamide monohydrate of formula 3, characterized in that genistein of formula 1 in an amount of 25 to 50 mg and nicotinamide of formula 2 in an amount of 150 to 300 mg are dissolved in 5 to 10 mL of ethanol and methanol, after whereupon the whole is stirred, filtered and then allowed to evaporate slowly at room temperature, and after 2 to 4 weeks the crystals are collected.
3. A method for obtaining a co-crystal of genistein - nicotinamide monohydrate of formula 3, characterized in that genistein of formula 1 and nicotinamide of formula 2 in a stoichiometric amount of 1:1 are placed in a steel vessel of a ball mill, and then water or a mixture of acetonitrile and water in an amount of 50 μ L for every 50 mg of genistein are milled for 5-45 minutes at a vibration frequency of 50-60 Hz, and the microcrystalline material thus obtained is dried at room temperature for 12 to 24 hours and analyzed on a powder diffractometer.

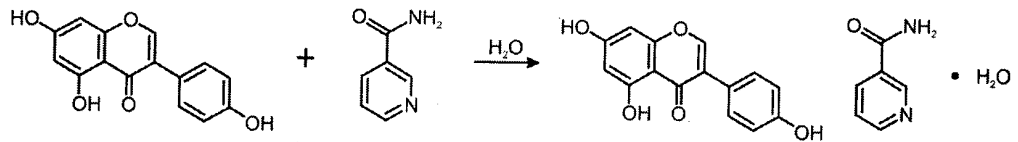
[stamp:] PATENT

ATTORNEY [signature] Anna

Meissner, MScEng



Formula 3



Formula 1

Formula 2

Formula 3

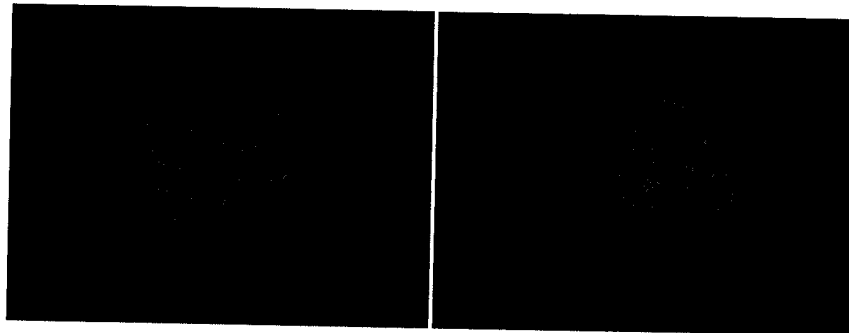


Fig. 1.

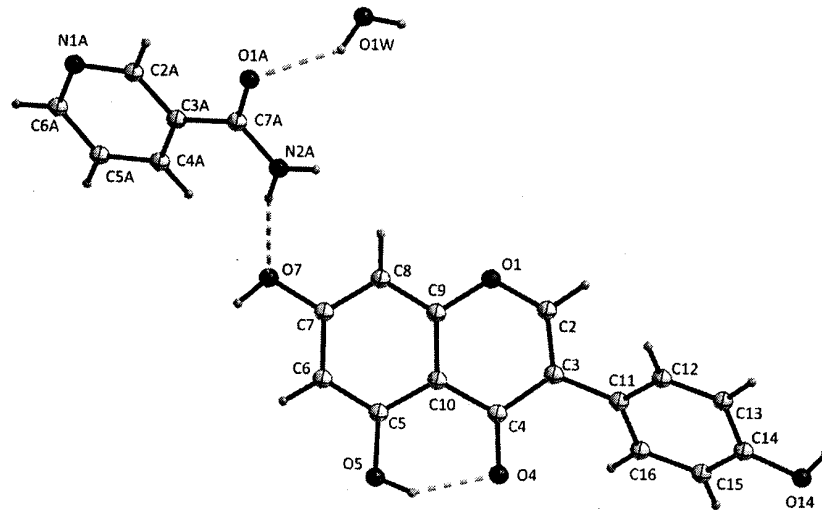


Fig. 2

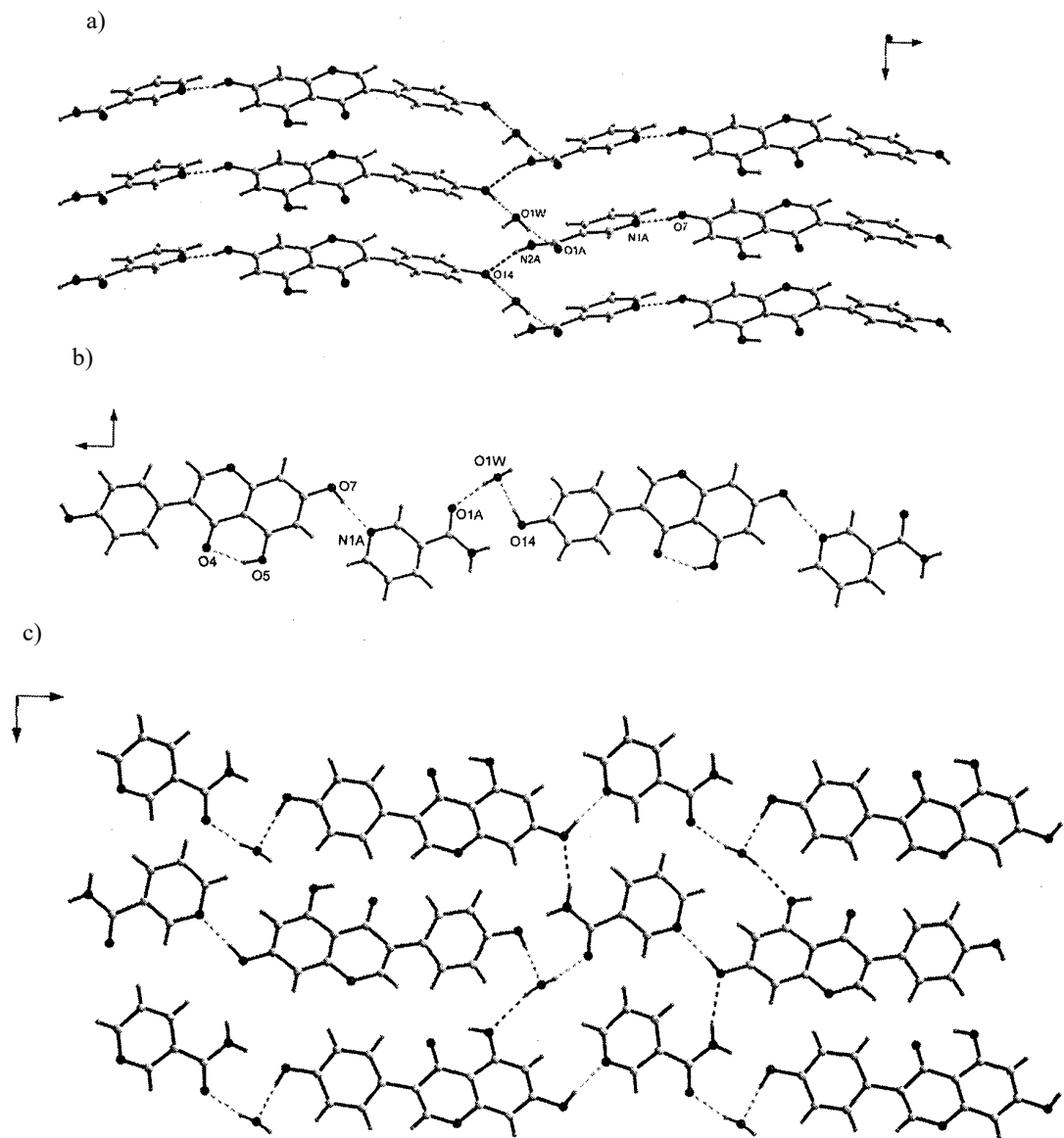


Fig. 3

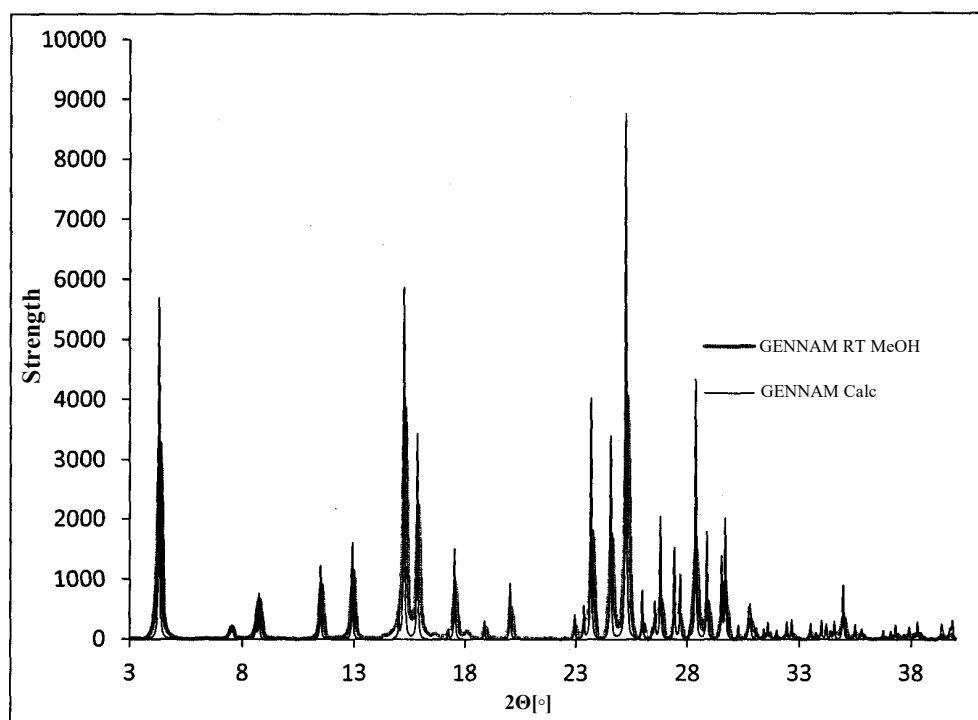


Fig. 4

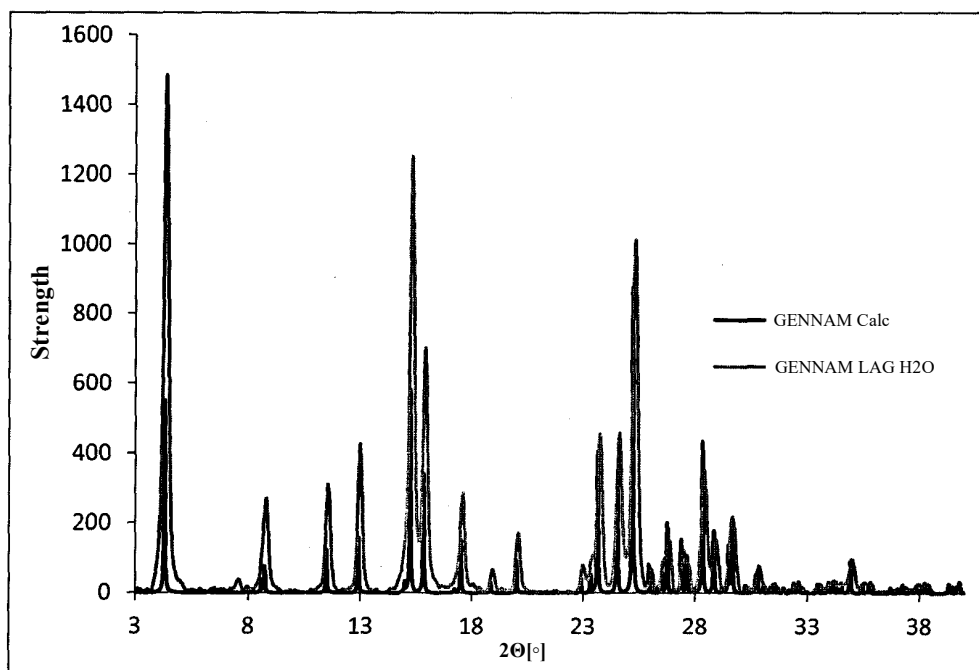


Fig. 5

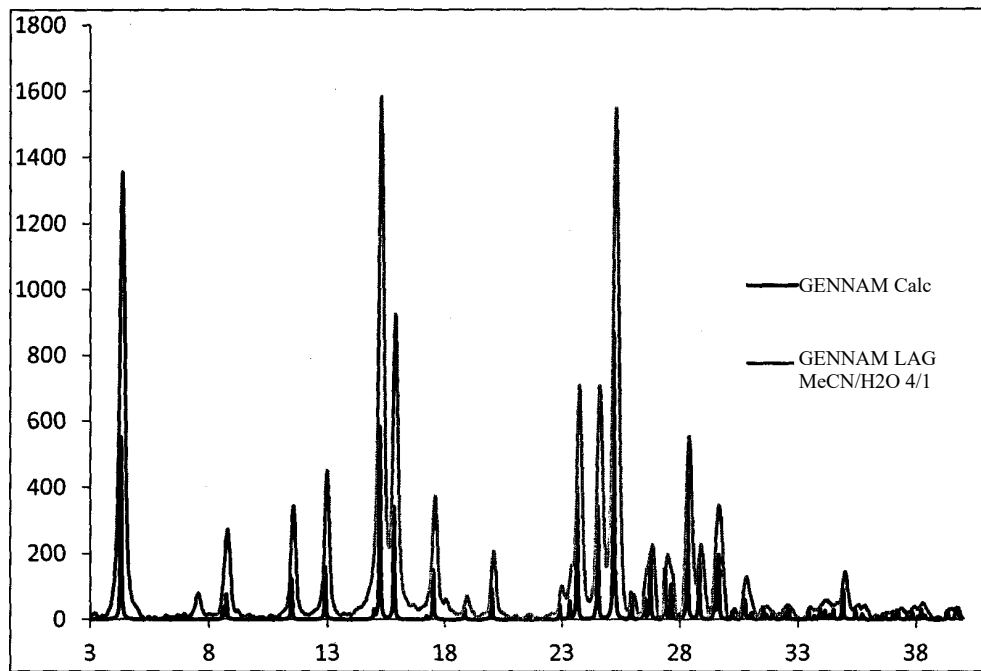


Fig. 6

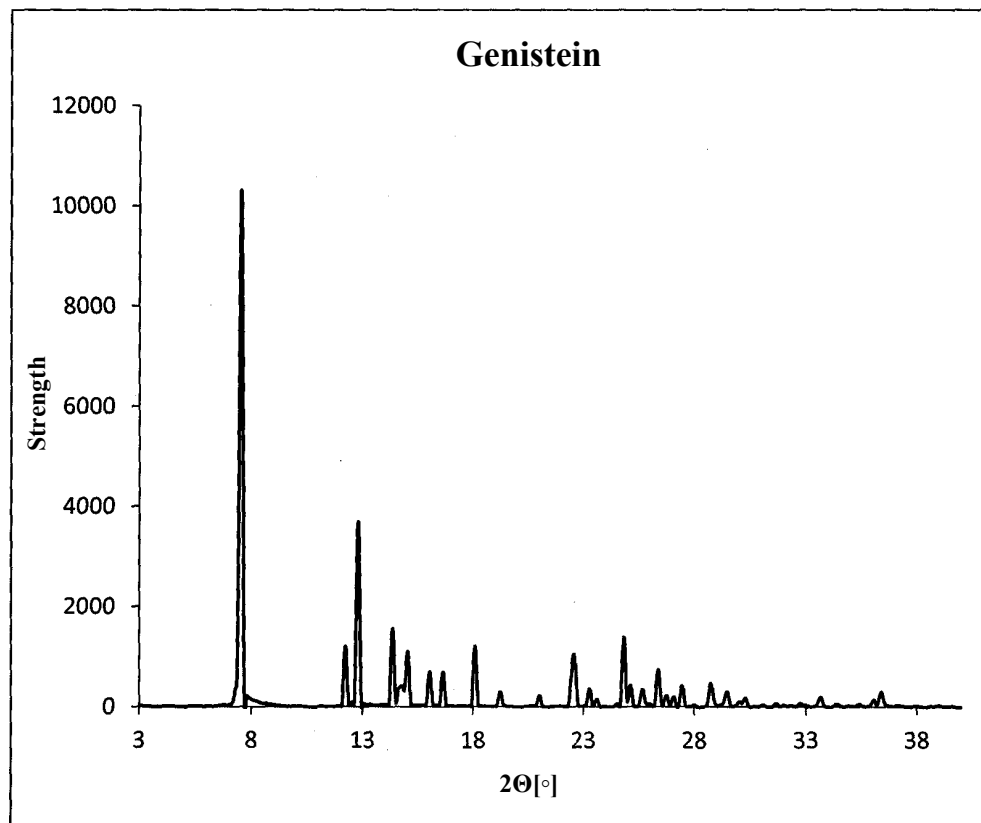


Fig. 7

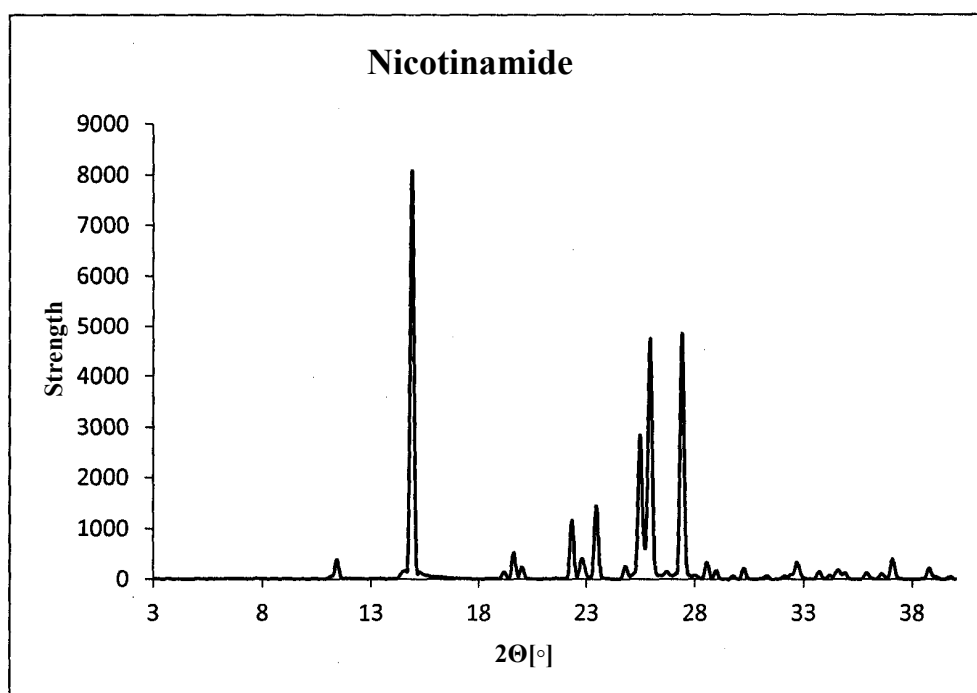


Fig. 8

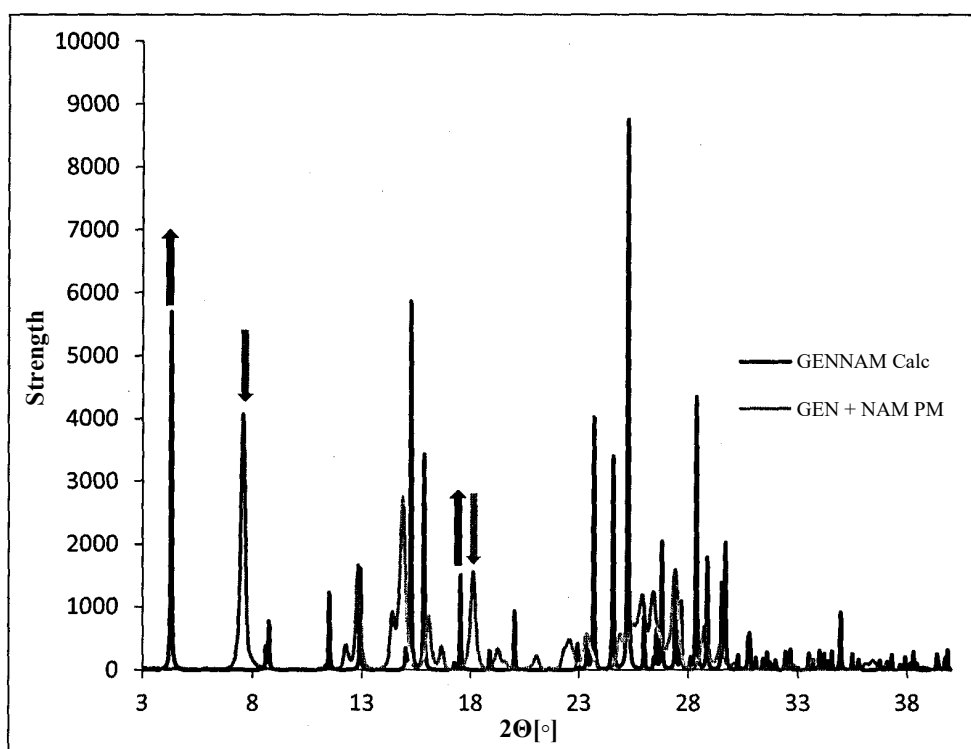


Fig. 9

REPORT ON THE STATE OF THE ART NO. P.401408

Search conducted in the following classes: C07D213/82; C07D311/36; A61K31/352; A61K31/455;		
Countries in which the search was carried out: Reaxys, Epoqnet, Ecpacenet, UPRP [Patent Office of the Republic of Poland] database (with given edition or computer base)		
Document Category	Documents - with given identification	Claim reference
Y	CN102442990/SHANGHAI CHEMOPARTNER CO LTD/ <u>05/09/2012</u> ,	1-3
Y	US2010/0204204/University of South Florida, US/ 08/21/2010	1-3
Y	WO2008/153945/ University of South Florida, US/12/18/2008	1-3
Y	WO2010/068861/AXCENTUA PHARM. AB, SE/06/17/2010	1-3
Y	Acta Cryst. (<u>06/15/2012</u>), C68, o262-o265	1-3
A	Between Sciences, Physicists and Chemists Convention, National Conference for students and doctoral students, Faculty Board of Doctoral Students' Self-Government, Faculty of Mathematics, Physics and Chemistry, University of Silesia in Katowice. Chorzów, p. 32 <u>10/05/2012</u>	1-3
A	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48 pp. 636-640, <u>2008</u> , Agnes Emma Daruhazi et.al. Utility of cyclodextrins in the formulation of genistein,	1-3
A	Bhupinder Singh Sekhon "Nutraceutical Cocrystals: An Overview" RGUHS J. Pharm. Sci. vol. 2 issue 2 p.16-25 <u>06/2012</u>	1-3
X- document undermining the novelty of the solution Y- document challenging the inventive step of the solution A- document constituting the state of the art which does not undermine the novelty and inventive step E- earlier document, but published after the date of submitting the solution		

The report was prepared by: M. Pacek

date 12/27/2012

signature

[stamp:] DEPARTMENT
HEAD[illegible] Pacek
[EXPERT]

Comments to the application*	Application investigated*
The report was prepared based on the version of patent claims of 10/30/2012.	

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

I, Teresa Adelson, hereby declare:

1. That the documents as described below (combined as a single document) are, to the best of my knowledge and belief, true and accurate translations from Polish into English:

- A document titled “Kokryształ monohydratu genisteina – nikotynamid oraz sposób otrzymywania kokryształu monohydratu genisteina – nikotynamid,” consisting of pages sequentially numbered 1 through 6 at the top, stamped with “401408” on the top right of page 1, and signed by “RZECZNIK PATENTOWY” on the bottom right of page 6, which corresponds to the translated document titled “A co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate and a method for obtaining a co-crystal of genistein-nicotinamide monohydrate,” consisting of pages sequentially numbered 1 through 6 at the top, stamped with “401408” on the top right of page 1, and signed by “PATENT ATTORNEY” on the bottom right of page 6;
- A document titled “Zastrzeżenia patentowe,” consisting of one page numbered 7 at the top, stamped with “401408” on the top right, and signed by “RZECZNIK PATENTOWY” on the bottom

right of the page, which corresponds to the translated document titled "Patent claims," consisting of one page numbered 7 at the top, stamped with "401408" on the top right, and signed by "PATENT ATTORNEY" on the bottom right of the page;

- An untitled document containing figures numbered "Fig. 1" through "Fig. 9," consisting of pages sequentially numbered 8 through 12 at the top and stamped with "401408" on the top right of each page, which corresponds to the translated untitled document containing figures numbered "Fig. 1" through "Fig. 9," consisting of pages sequentially numbered 8 through 12 at the top and stamped with "401408" on the top right of each page; and
- A document titled "SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI ZGŁOSZENIA NR P.401408," consisting of one page and signed on the bottom right of the page, which corresponds to the translated document titled "REPORT ON THE STATE OF THE ART NO. P.401408," consisting of one page and signed on the bottom right of the page.

2. That I am fluent in Polish and English and am qualified to translate these documents.

3. That all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are true, and further, that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code.

Date: August 21, 2023

Teresa M. Adelson

Teresa Adelson

Translator, TransPerfect



Notary

**Kokryształ monohydratu genisteina – nikotynamid oraz sposób
otrzymywania kokryształu monohydratu genisteina – nikotynamid**

Przedmiotem wynalazku jest kokryształ monohydratu genisteina – nikotynamid znajdujący zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i/lub kosmetycznym.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania kokryształu monohydratu genisteina – nikotynamid.

Genisteina (4',5,7-trihydroksyizoflawon, **wzór 1**) jest głównym izoflawonem obecnym w soi (ok. 3mg/g) co opisano w publikacji Dixon, R. A. & Ferreira, D. (2002). *Phytochemistry*. **60**, 205–211.

Ponadto zgodnie z publikacją Brandi, M. L. (1997). *Calcif. Tissue Int.* **61**, S5–S8 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**, 3780–3785, Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F. V. & Viña, J. (2010). *Biochim. Biophys. Acta*. **1802**, 205–211, Rusin, A., Krawczyk, Z., Gryniewicz, G., Gogler, A., Zawisza-Puchałka, J. & Szeja, W. (2010). *Acta Biochim. Pol.* **57**, 23-34, Park, C. E., Yun, H., Lee, E., Min, B., Bae, H., Choe, W., Kang, I., Kim, S. & Ha, J. (2010). *Journal of Medicinal Food*. **13**, 815-820, Zhang, Y., Chen, W. F., Lai, W. P. & Wong, M. S. (2008). *Inflammopharmacology*. **16**, 213-215 wiadomo, iż genisteina posiada właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające.

Z publikacji Radzikowski, Cz., Wietrzyk, J., Gryniewicz, G. & Opolski, A. (2004). *Postepy Hig. Med. Dosw.* **58**, 128-139, Nakagawa, H., Yamamoto, D., Kiyozuka, Y., Tsuta, K., Uemura, Y., Hioki, K., Tsutsui, Y. & Tsubura, A. (2000). *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **126**, 448-454, Polkowski, K. & Mazurek, A. P. (2000). *Acta Pol. Pharm.* **57**, 135-155, Setchell, K. D. & Cassidy, A. (1999). *J. Nutr.* **129**, 758S-767S wiadomo, iż genisteina potencjalne wielokierunkowe zastosowanie w leczeniu i prewencji chorób nowotworowych.

Nikotynamid (**wzór 2**) jest rozpuszczalną w wodzie witaminą z grupy B3, syntezowaną z kwasu nikotynowego lub dostarczaną do organizmu wraz z

pokarmem, co ujawniono w publikacji Sauve AA. NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:883–93.

W kolejnych publikacjach Niren NM. Pharmacologic doses of nicotinamide in the treatment of inflammatory skin conditions: a review. *Cutis* 2006;77:11–6, Namazi MR. Nicotinamide: a potential addition to the anti-psoriatic weaponry. *FASEB J* 2003;17:1377–9 ujawniono, iż nikotynamid uczestniczy w szeregu procesów biologicznych, takich jak produkcja energii czy synteza kwasów tłuszczowych. Jego właściwości pozwalają na leczenie pelagry, łuszczycy, schizofrenii i cukrzycy typu 1.

Nikotynamid znajduje się na liście związków dopuszczonych do bezpiecznego stosowania jako dodatki do produktów spożywczych dzięki czemu znajduje szerokie zastosowanie w kokryształizacji farmaceutycznie czynnych kwasów karboksylowych oraz może być stosowany 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 publikację 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.

Termin kokryształ nie posiada jednoznacznej definicji i jest przedmiotem rozległej debaty – publikacja Aitipamula, S., *et al.* (2012). *Cryst. Growth Des.* **12**, 2147–2152. Jedną z definicji zakłada, że kokryształ jest strukturalnie homogenicznym ciałem stałym, zawierającym dwa składniki w określonej stechiometrii, które pozostają w obojętnej elektrycznie formie a w warunkach pokojowych są ciałami stałymi. Głównym składnikiem kokryształu jest substancja farmaceutycznie czynna (*ang.* API), drugi zwany jest koformerem.

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, Jian-Guo, et al. (2010). *Journal of Chemical & Engineering Data*, **55**, 5287.

Próby modyfikacji rozpuszczalności genisteiny podejmowane były poprzez kompleksowanie β -cyklodekstrynami, co opisano w kolejnej publikacji Agnes Emma Daruhazi, A. E. et al. (2008). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **48**, 636–640..

W publikacji Smith, A. J., Kavuru, P., Wojtas, Ł., Zaworotko, M. J. & Shytle, R. D. (2011). *Mol. Pharm.* **8**, 1867–1876 opisano kokryształy farmaceutyczne kwercetyny.

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

W publikacji Sowa, M., Ślepokura, K. & Matczak-Jon, E. (2012). *Acta Cryst. C* **68**, 0262–0265 opisano kokryształy farmaceutyczne oraz bajkaleiny.

W amerykańskim zgłoszeniu patentowym US20100204204 opisano kokryształy flawonoidów.

Istotą wynalazku jest kokryształ monohydratu genisteina – nikotynamid o wzorze 3.

Istotą wynalazku jest również sposób otrzymywania kokryształu monohydratu genisteina – nikotynamid o wzorze 3 polegający na tym, że genisteinę o wzorze 1 w ilości od 25 do 50 mg oraz nikotynamid o wzorze 2 w ilości od 150 do 300 mg rozpuszcza się w od 5 do 10 mL etanolu i metanolu, po czym całość miesza się, przesącza się, a następnie pozostawia się do powolnego odparowania w temperaturze pokojowej, a po 2 do 4 tygodni zbiera się kryształy.

W innej metodzie sposobu otrzymywania kokryształu monohydratu genisteina – nikotynamid o wzorze 3 w stalowym naczyniu młyna kulowego umieszcza się genisteinę o wzorze 1 i nikotynamid o wzorze 2 w ilości stechiometrycznej 1:1, po czym dodaje się wodę lub mieszaninę acetonitrylu z wodą w ilości 50 μ L na każde 50 mg genisteiny, poddaje się mieleniu przez 5-45 minut, przy częstotliwości drgań 50-60 Hz, i tak otrzymany materiał mikrokryształiczny suszy się w temperaturze pokojowej przez czas od 12 do 24 godzin i poddaje analizie na dyfraktoметрыe proszkowym.

Wynalazek bliżej przedstawiono w przykładach jego wykonania, na schemacie reakcji oraz na rysunkach, na których Fig. przedstawia zdjęcia kokryształów monohydratu genisteina – nikotynamid wykonane pod mikroskopem stereoskopowym, Fig. 2 przedstawia część niezależną komórki elementarnej kokryształu monohydratu genisteina - nikotynamid wraz z numeracją atomów i wiązaniami wodorowymi (przerywane linie), Fig. 3 przedstawia upakowanie cząsteczek w sieci krystalicznej, ukazujące (a) tworzenie taśmy molekularnej (b) oddziaływania pomiędzy taśmami prowadzące do utworzenia sieci dwuwymiarowej oraz (c) oddziaływania prowadzące do utworzenia sieci trójwymiarowej, Fig. 4 przedstawia porównanie dyfraktogramu teoretycznego kokryształu monohydratu genisteina - nikotynamid (GENNAM calc) z eksperymentalnym dyfraktogramem proszkowym (GENNAM RT MeOH) Fig. 5 przedstawia porównanie dyfraktogramu teoretycznego kokryształu monohydratu genisteina - nikotynamid (GENNAM calc) z dyfraktogramem produktu syntezy metodą mielenia z dodatkiem wody (GENNAM LAG H₂O), Fig. 6 przedstawia porównanie dyfraktogramu teoretycznego kokryształu monohydratu genisteina - nikotynamid (GENNAM calc) z dyfraktogramem produktu syntezy metodą mielenia z dodatkiem mieszaniny acetonitryl/woda (4/1 v/v) (GENNAM LAG MeCN/H₂O, 4/1), Fig. 7 przedstawia dyfraktogram eksperymentalny genisteiny, Fig. 8 przedstawia dyfraktogram eksperymentalny nikotynamidu, Fig. 9 przedstawia dyfraktogram proszkowy mieszaniny genisteiny i nikotynamidu (GEN + NAM PM) w porównaniu do dyfraktogramu teoretycznego kokryształu monohydratu genisteina - nikotynamid wraz z zaznaczonymi refleksami diagnostycznymi.

Przykład 1

Genisteinę (25mg, 0.091mmol) oraz nikotynamid (200mg, 1.638 mmol) rozpuszczono w 7 mL mieszaniny metanolu i etanolu (1/1 v/v) za pomocą mieszania. Roztwór przesączono do zlewki, która szczelnie zaklejono parafilmem i wykonano kilka niewielkich otworów umożliwiających powolne parowanie roztworu. Następnie pozostawiono zlewkę w temperaturze pokojowej (23°C). Po 21 dniach zebrano płytkowate kryształy na dnie zlewki (Fig. 1). Spośród

otrzymanych kryształów wybrano monokryształ do analizy rentgenostrukturalnej. Wykonanie dyfraktogramu proszkowego całości otrzymanych kryształów wyklucza obecność innych produktów oprócz zamierzonego kokryształu monohydratu genisteina – nikotynamid.

Przykład 2

Genisteinę (50mg, 0.181mmol) oraz nikotynamid (300mg, 2.457mmol) rozpuszczono w 10 mL mieszaniny metanolu i etanolu (1/1 v/v) za pomocą mieszania. Roztwór przesączono do zlewki, która szczelnie zaklejono parafilmem i wykonano kilka niewielkich otworów umożliwiających powolne parowanie roztworu. Następnie pozostawiono zlewkę w temperaturze pokojowej (23°C). Po 14 dniach zebrano płytkowate kryształy na dnie zlewki. Wykonanie dyfraktogramu proszkowego całości otrzymanych kryształów wyklucza obecność innych produktów oprócz zamierzonego kokryształu monohydratu genisteina – nikotynamid.

Przykład 3

Genisteinę (50mg, 0.1811mmol) oraz nikotynamid (21.3mg, 0.171mmol) umieszczono w stalowym naczyniu o pojemności 10mL, zawierającym dwie stalowe kulki o średnicy 7mm. Do mieszaniny dodano 100µL (około dwie krople) wody destylowanej. Naczynie zamocowano w młynku kulowym Narva Vibrator Mill i poddano mieleniu przez 30 minut, przy częstotliwości drgań 50Hz. Otrzymany materiał mikrokrystaliczny wysuszono w warunkach pokojowych przez okres 12 godzin i poddano analizie na dyfraktoметрыze proszkowym. Porównanie otrzymanego dyfraktogramu z dyfraktogramem teoretycznym dla kokryształu monohydratu genisteina - nikotynamid pozwala na stwierdzenie 100% konwersji (Fig. 5).

Przykład 4

Genisteinę (50mg, 0.1811mmol) oraz nikotynamid (21.3mg, 0.171mmol) umieszczono w stalowym naczyniu o pojemności 10mL, zawierającym dwie stalowe kulki o średnicy 7mm. Do mieszaniny dodano 100µL (około dwie krople) mieszaniny acetonitrylu/woda (4/1 v/v). Naczynie zamocowano w młynku kulowym Narva Vibrator Mill i poddano mieleniu przez 30 minut, przy

częstotliwości drgań 50Hz. Otrzymany materiał mikrokryształiczny wysuszono w warunkach pokojowych przez okres 12 godzin i poddano analizie na dyfraktoметрыe proszkowym. Porównanie otrzymanego dyfraktogramu z dyfraktogramem teoretycznym dla kokryształu monohydratu genisteina - nikotynamid pozwala na stwierdzenie 100% konwersji (Fig. 6).

Przykład 5

Analizę rentgenograficzną wykonano w temperaturze -173°C , na czterokołowym aparacie Oxford Diffraction Xcalibur PX o geometrii kappa, z kamerą CCD Ruby, wykorzystując promieniowanie $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0.71073\text{\AA}$). Rejestrację, redukcję i analizę danych wykonano z wykorzystaniem programów CrysAlisCCD i CrysAlisRED. Strukturę rozwiązano metodami bezpośrednimi wykorzystując program SHELXS-97 i ułożyliano z wykorzystaniem programu SHELXL-97. Dyfraktogramy proszkowe wykonano w temperaturze pokojowej, na aparacie Bruker D8 Advance wykorzystując promieniowanie $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1.5418\text{\AA}$) przy 30 kV i 40 mA i detektor VANTEC-1. Każdą próbkę analizowano pomiędzy kątami 2θ 3° a 40° , z krokiem 0.01608° i łącznym czasem pomiaru 40 minut.

Kokryształ monohydratu genisteina - nikotynamid krystalizuje w grupie przestrzennej Cc układu jednoskośnego. Wybrane dane krystalograficzne znajdują się w tabeli 1.

Dane krystalograficzne	
$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5 \cdot \text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$V = 1761.6 (10) \text{\AA}^3$
$Mr = 410.37$	$Z = 4$
Układ jednoskośny, Cc	$T = 100 (2) \text{ K}$
$a = 3.706 (2) \text{\AA}$	
$b = 41.150 (2) \text{\AA}$	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.037$
$c = 11.564 (5) \text{\AA}$	
$\beta = 92.44 (3)^{\circ}$	

Tab. 1

Wybrane dane krystalograficzne kokryształu monohydratu genisteina -
nikotynamid

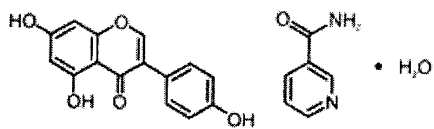
RZECZNIK PATENTOWY
Meissner
mgr inż. Anna Meissner

Zastrzeżenia patentowe

1. Kokryształ monohydratu genisteina – nikotynamid o wzorze 3.
2. Sposób otrzymywania kokryształu monohydratu genisteina – nikotynamid o wzorze 3 znamienny tym, że genisteinę o wzorze 1 w ilości od 25 do 50 mg oraz nikotynamid o wzorze 2 w ilości od 150 do 300 mg rozpuszcza się w od 5 do 10 mL etanolu i metanolu, po czym całość miesza się, przesącza się, a następnie pozostawia się do powolnego odparowania w temperaturze pokojowej, a po 2 do 4 tygodni zbiera się kryształy.
3. Sposób otrzymywania kokryształu monohydratu genisteina – nikotynamid o wzorze 3 znamienny tym, że w stalowym naczyniu młyna kulowego umieszcza się genisteinę o wzorze 1 i nikotynamid o wzorze 2 w ilości stechiometrycznej 1:1, po czym dodaje się wodę lub mieszaninę acetonitrylu z wodą w ilości 50 μ L na każde 50 mg genisteiny, poddaje się mieleniu przez 5-45 minut, przy częstotliwości drgań 50-60 Hz, i tak otrzymany materiał mikrokryształiczny suszy się w temperaturze pokojowej przez czas od 12 do 24 godzin i poddaje analizie na dyfraktometrze proszkowym.

RZECZNIK PATENTOWY

Meissner
mgr inż. Anna Meissner



Wzór 3

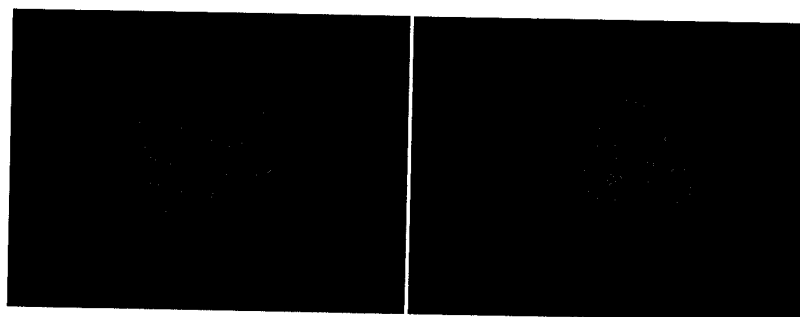
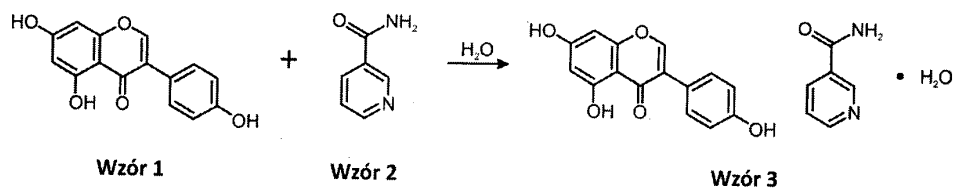


Fig. 1.

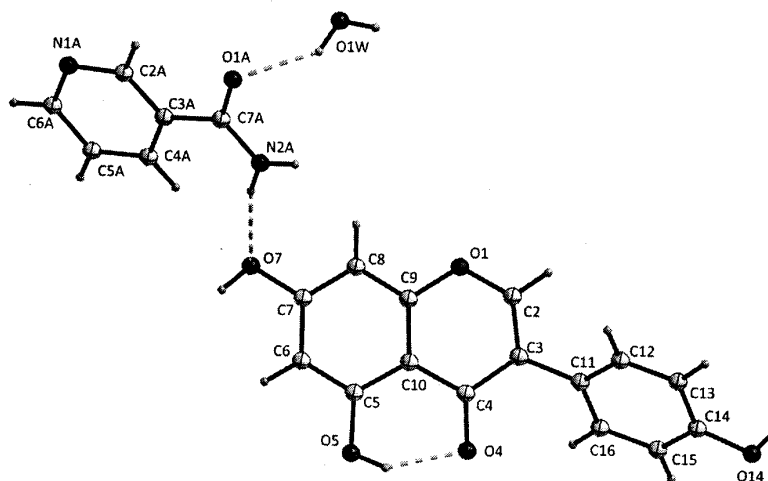


Fig. 2

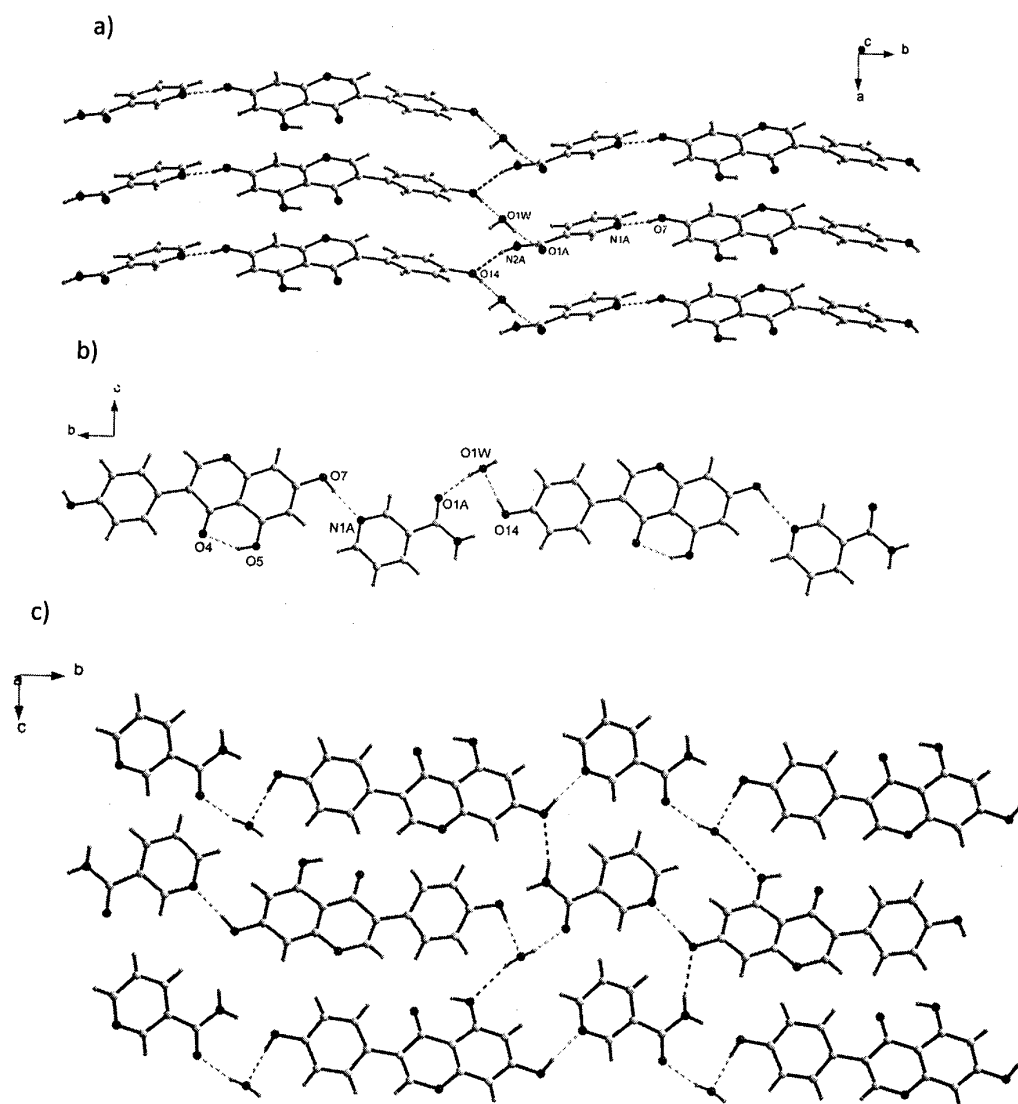


Fig. 3

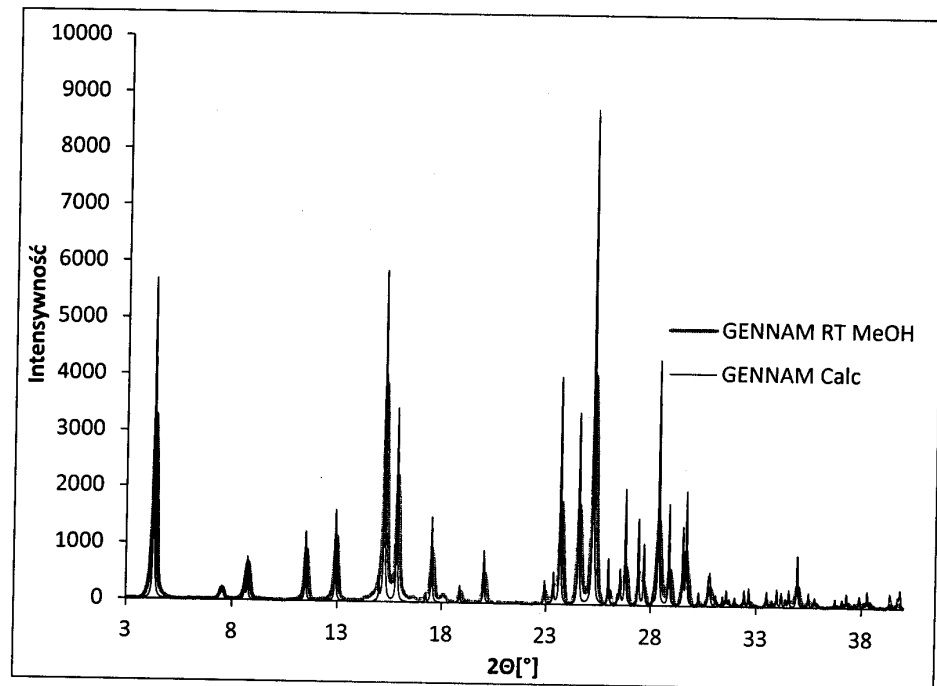


Fig. 4

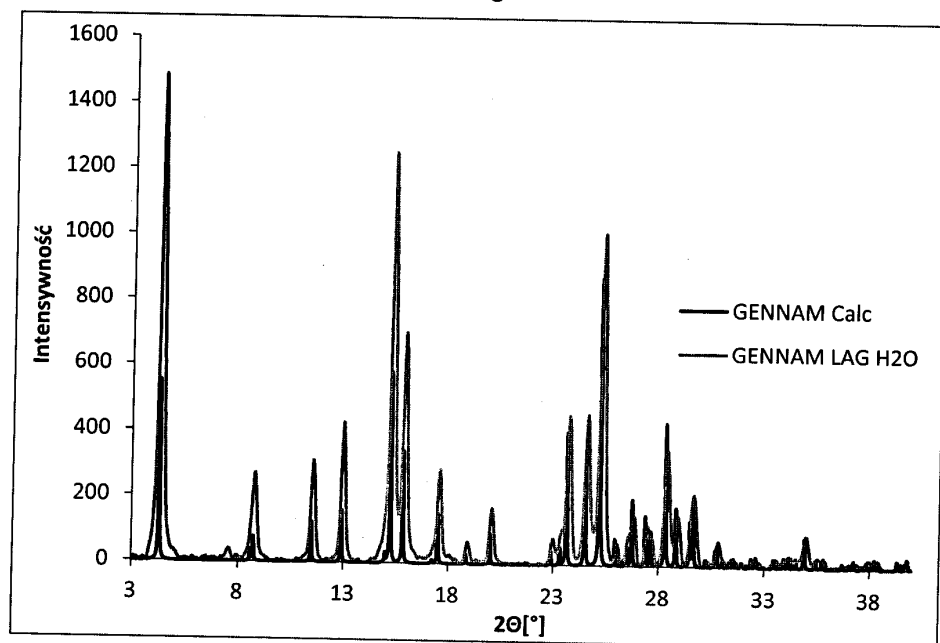


Fig. 5

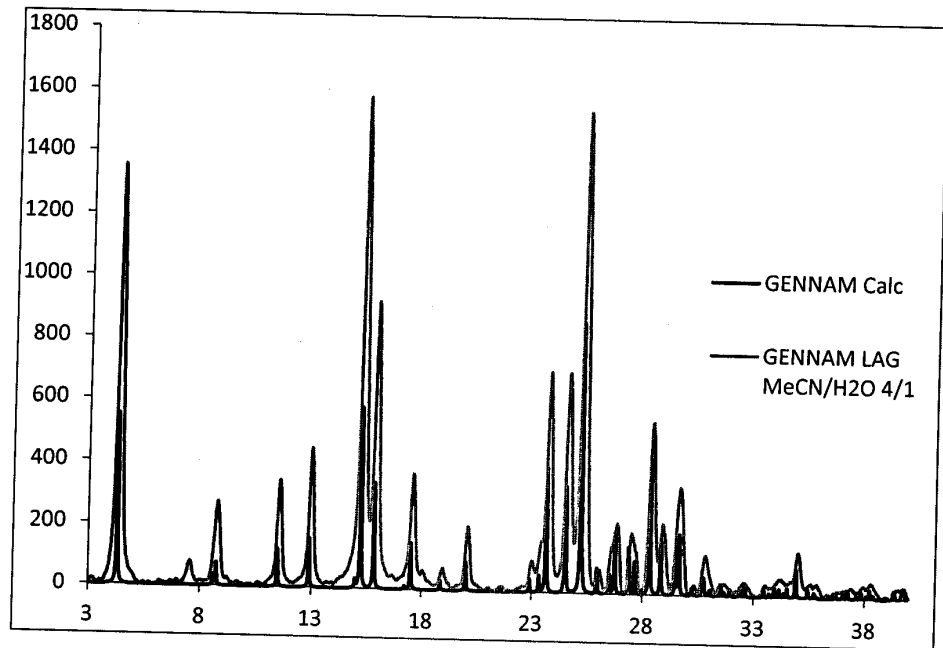


Fig. 6

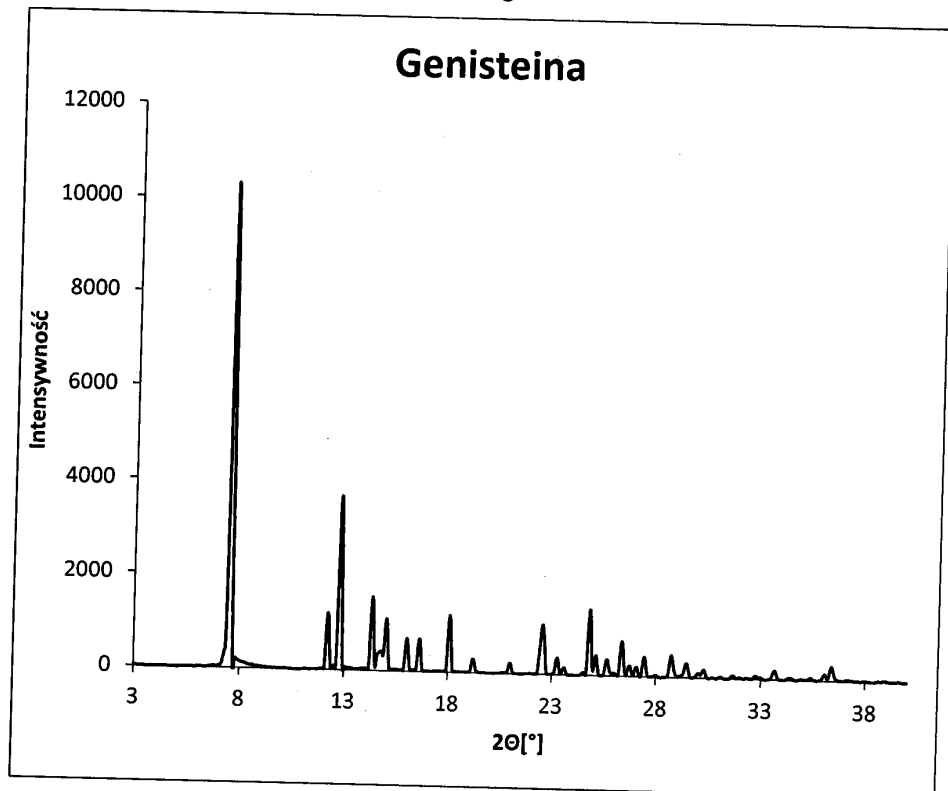


Fig. 7

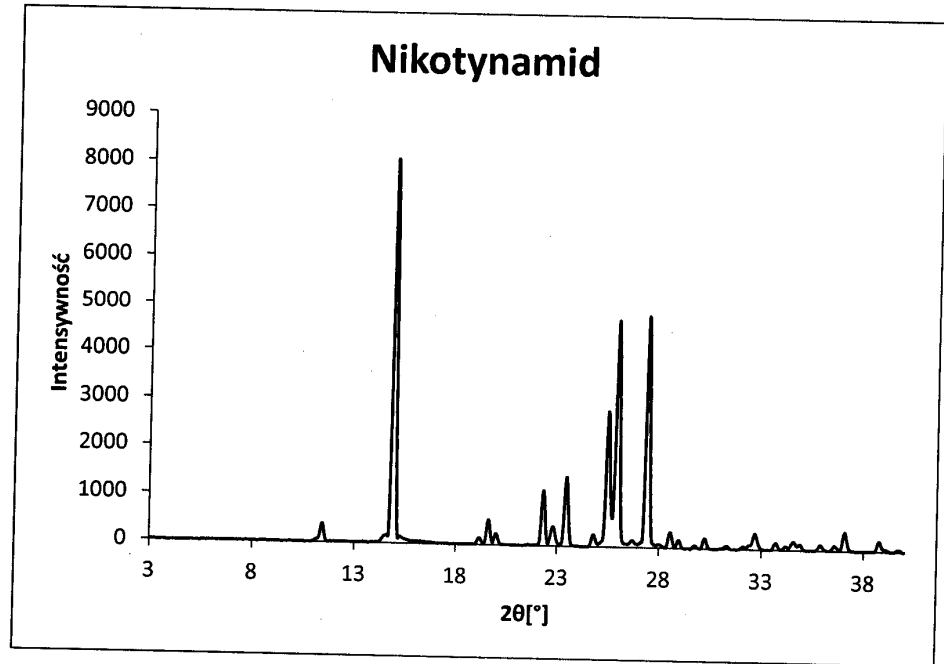


Fig. 8

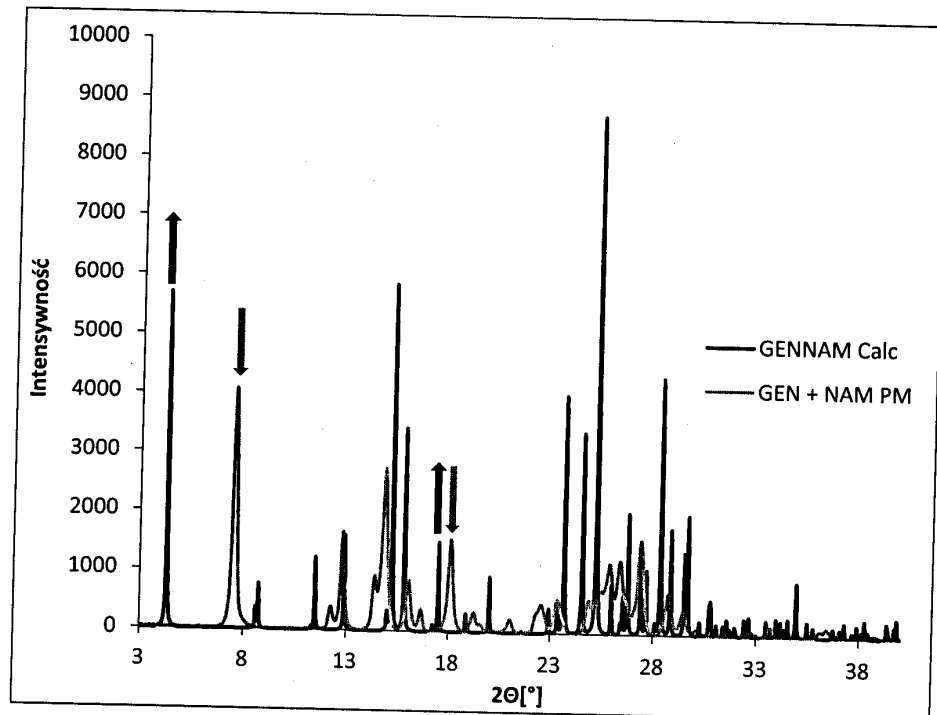


Fig 9

SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI ZGŁOSZENIA NR P.401408

Poszukiwania prowadzone w klasach: C07D213/82; C07D311/36; A61K31/352; A61K31/455;		
Kraje w jakich prowadzono poszukiwania: Reaxys, Epoqnet, ecpacenet, baza UPRP (z podaną edycją lub bazą komp.)		
Kategoria Dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
Y	CN102442990/SHANGHAI CHEMOPARTNER CO LTD/ <u>09.05.2012.</u>	1- 3
Y	US2010/0204204/University of South Florida, US/ 21.08.2010	1- 3
Y	WO2008/153945/ University of South Florida, US/18.12.2008	1-3
Y	WO2010/068861/AXCENTUA PHARM. AB, SE/17.06.2010	1-3
Y	Acta Cryst.(<u>15.06.2012</u>), C68, o262-o265	1-3
A	Pomiędzy naukami, Zjazd Fizyków i Chemików, Ogólnopolska Konferencja dla studentów i doktorantów, Wydziałowa Rada Samorządu Doktoranckiego, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Chorzów, str. 32, <u>5.10.2012</u>	1-3
A	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48, str. 636-640, <u>2008</u> , Agnes Emma Daruhazi et.al. Utility of cyclodextrins in the formulation of genistein,	1-3
A	Bhupinder Singh Sekhon „, Nuraceutical Cocrystals:An Overview”RGUHS J. Pharm. Sci. vol. 2 issue 2 p.16-25 <u>06.2012</u>	1-3
X- dokument podważający nowość rozwiązania Y- dokument podważający poziom wynalazczy rozwiązania A- Dokument stanowiący znany stan techniki nie podważający nowości i poziomu wynalazczego E- dokument wcześniejszy, ale opublikowany po dacie zgłoszenia rozwiązania		
Sprawozdanie wykonał: M.Pacek		data 27.12.12

[Signature]
M. Pacek
EXPERT

Uwagi do zgłoszenia *	Zgłoszenie badań *
Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń patentowych z dnia 30.10.2012r.	