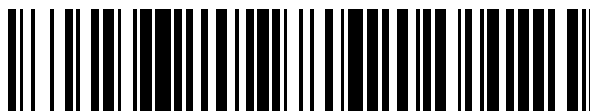


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 042**

51 Int. Cl.:

C07C 45/86 (2006.01)

C07C 49/84 (2006.01)

C07C 45/79 (2006.01)

C07C 45/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2014 PCT/IB2014/001872**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15049561**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2014 E 14792560 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 3052466**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de xantohumol**

30 Prioridad:

04.10.2013 PL 40554013

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.03.2018

73 Titular/es:

**AXEN BIO GROUP SP. Z O.O. (100.0%)
Ul. Armil Krajowej 116/19
81-824 Sopot, PL**

72 Inventor/es:

GAGOS , MARIUSZ

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 657 042 T3

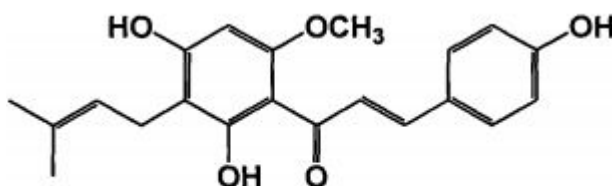
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de xantohumulol

La invención proporciona un procedimiento para la preparación de xantohumulol de alta pureza a partir de lúpulo agotado después de la extracción, gránulos de planta de lúpulo o lúpulos. Debido a la alta pureza del xantohumulol obtenido, se podría usar con éxito en suplementos dietéticos, bebidas y como ingrediente del producto terapéutico.

Xantohumulol (Xn), o ((E)-1-[2,4-dihidroxi-6-metoxi-3-(3-metilbut-2-enil)-fenil]-3-(4-hidroxifenil)-prop-2-en-1-ona) es un compuesto natural del grupo de chalconas preniladas, cuya fuente principal es la inflorescencia femenina de *Humulus Lupulus* (lúpulo). Está presente solo en los oligoelementos de la cerveza. El compuesto está compuesto por dos anillos de benceno unidos por la unidad estructural carbonilo α , β -insaturado:



Xantohumulol (Xn).

La presencia de un grupo hidroxilo libre en la molécula lo hace fácilmente isomerizable a la propia flavanona, un intermediario en la ruta de biosíntesis de flavonoides. A diferencia de otros ingredientes del lúpulo, el xantohumulol es más lipófilo, estando la característica conectada con la presencia del sustituyente prenilado en su estructura. Se debe observar que, en los sistemas biológicos vivos, las unidades estructurales preniladas (farnesilo o geranilgeranilo) facilitan la unión de numerosas moléculas intracelulares a una membrana celular, determinando sus actividades apropiadas. Asimismo, se sugiere que en el caso del xantohumulol, tales unidades estructurales pueden modular significativamente la actividad biológica del compuesto, y, lo que, es más, influir en sus propiedades fisicoquímicas y distribución subcelular.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren también que el xantohumulol reduce los procesos inflamatorios y oxidativos por medio de diversos mecanismos. Los principales son: eliminación de radicales libres de oxígeno y sus formas reactivas (RTF), inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa (COX I y COX II), reducción de la producción de prostaglandina, NO, TNF α , NF κ B y neutralización de la peroxidación de fosfolípidos en la membrana.

La actividad antioxidante y antiinflamatoria de xantohumulol está relacionada con la presencia de los grupos hidroxilo y el sustituyente prenilado en su molécula. También es importante la unidad estructural carbonilo α , β -insaturado. La unidad estructural participa en la reacción de Michel con nucleófilos biológicamente importantes, por ejemplo: L-cisteína en proteínas y otras moléculas que contienen grupos sulfhidrilos. De esa forma, se obtienen aductos covalentes que causan la pérdida de la actividad biológica de diversas moléculas unidas por xantohumulol.

El amplio espectro de actividad de xantohumulol se deriva probablemente de la capacidad del compuesto para unir importantes moléculas biológicas. Uno de los ejemplos más conocidos es la influencia del xantohumulol en la polimerasa α sintetasa, topoisomerasa I, fosfatasa alcalina, aromatasas, diacilglicerol aciltransferasa, proteínas de la ruta de señalización de MAPK, FAK quinasa, Akt y STAT o factores de transcripción NF- κ B. La reducción inducida por Xn de las actividades de dichas proteínas induce efectos de células pleiotrópicas como consecuencia de la proliferación, el ciclo celular, la adhesión y las alteraciones de migración en células tumorales.

Es digno de mención también la información relativa a sus propiedades neuroprotectoras. En el modelo de rata de isquemia focal inducido por MCAO, que refleja la isquemia cerebral focal *in vivo*, xantohumulol reduce significativamente la zona de necrosis isquémica cerebral. Se sugiere de este modo que el xantohumulol también reduce un efecto neurotóxico inducido por el péptido β -amiloides (A β). Se sabe que este mecanismo media el mecanismo de radicales libres y es una de las principales causas de la enfermedad de Alzheimer, al aumentar la producción de radicales libres y la peroxidación de lípidos en las células nerviosas, lo que consecuentemente conduce a su apoptosis.

Además, aparte de su efecto sobre los receptores, el mecanismo de la actividad de xantohumulol podría estar conectado a su actividad selectiva hacia las membranas lipídicas. Los estudios sobre los mecanismos de interacción de xantohumulol con las membranas lipídicas modelo indican una modificación importante de las propiedades dinámicas y estructurales de una membrana. Incluso concentraciones muy pequeñas de xantohumulol interactúan fuertemente con fragmentos hidrófilos de la membrana lipídica para influir en los cambios de grosor de bicapa. También se sabe que los neonicotinoides, debido a su alta hidrofobicidad, penetran las membranas lipídicas muy fácilmente. La interacción de

xantohumol con la membrana lipídica puede reducir significativamente su penetración por neonicotinoides, lo que podría explicar su fuerte actividad, además de bloquear los receptores de nicotina.

Con respecto a su estructura química, el xantohumol es un polifenol, sin embargo, a diferencia de los polifenoles, es escasamente soluble en agua caliente, pero se disuelve fácilmente en alcoholes o mezclas de agua/alcohol.

5 Una buena fuente de xantohumol es el lúpulo agotado después de la extracción, que comprende los residuos de la producción de extracto de lúpulo utilizado por la industria cervecera para la fabricación de cerveza. Se estima que el lúpulo agotado después de la extracción contiene hasta 1% de xantohumol, dependiendo de la especie de una planta de lúpulo.

10 Numerosas tecnologías para la preparación de xantohumol son conocidas en la técnica. La solicitud DE 199 39 350 A1 describe un procedimiento para la preparación de un extracto de lúpulo enriquecido en xantohumol, en el que se usaron mezclas de agua y etanol para la extracción. El extracto obtenido contenía del 5 al 15% de xantohumol.

La patente EP 1 424 385 B1 describe un procedimiento de extracción de xantohumol a partir del material que contiene xantohumol en bruto mediante el uso de CO₂ comprimido como solvente a una presión superior a 500 bar y a temperaturas por encima de 60 °C.

15 La aplicación CN 101440029 describe un procedimiento de extracción de xantohumol a partir de la planta de lúpulo y de los productos que contienen xantohumol, en el que la extracción con un solvente orgánico asistida por ultrasonidos se lleva a cabo, seguido de la mezcla con la tierra de diatomeas, filtración, lavado con mezcla de agua/metanol, concentración, precipitación y secado para obtener xantohumol con una pureza del 86%.

20 La patente EP 2 187 899 B1 describe un procedimiento para la preparación de una composición del alto contenido de xantohumol de una planta de lúpulo, en el que se adiciona una sal a una solución que contiene xantohumol a una concentración en el intervalo desde 0.05 a 5.0 M, seguido de un pH que aumenta de 10.5 a 12.0, filtrando el precipitado obtenido, acidificando el filtrado a pH 7-8 para obtener el precipitado de xantohumol con una pureza del 40-95%. La patente US 2009/258094 describe un procedimiento para la preparación de una composición de alto contenido de xantohumol a partir de una planta de lúpulo, en el que se adiciona una sal a una solución que contiene xantohumol a una concentración en el intervalo desde 0.05 a 5.0 M, seguido del ajuste del pH a 9.5-13 para realizar la formación de un primer precipitado, eliminar el primer precipitado para obtener una segunda solución, ajustar el pH de la segunda solución a 3-9 para realizar la formación de un segundo precipitado, y recoger el segundo precipitado, donde el segundo precipitado contiene 40-95% en peso de xantohumol.

30 La patente CN 101 811 950 describe un procedimiento de producción industrial para xantohumol de alta pureza que comprende lixiviar un residuo de lúpulo que se extrae con dióxido de carbono con alcohol de bajo nivel o solución de acetona para que el xantohumol en el residuo de lúpulo se disuelva por completo, después de filtrar y recoger la solución y disolver la solución clarificada con solventes polares fuertes, se extrae el xantohumol y se recrystaliza.

35 La solicitud de patente US 11/790,365 describe un procedimiento para la preparación del polvo con alto contenido de xantohumol (60-90%), que comprende suspender un extracto enriquecido en xantohumol en una solución alcalina, separar productos insolubles, neutralizar y precipitar el xantohumol disuelto con un ácido y aislar el producto.

La patente CN 101433592 describe el uso de diversas resinas de adsorción para preparar xantohumol de alta pureza.

En conclusión, el análisis de la técnica anterior describe inequívocamente que existe la necesidad de desarrollar un procedimiento simple y barato para la preparación de xantohumol de alta pureza.

40 El problema se resuelve mediante un procedimiento recientemente desarrollado para la preparación de xantohumol a partir de lúpulo agotado después de la extracción, gránulos de planta de lúpulo o lúpulos.

Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de xantohumol, en el que:

- a) un extracto que contiene xantohumol se mezcla con agua;
- b) se adiciona una solución de sal de metal de transición a la mezcla obtenida;
- c) el precipitado de xantohumol obtenido se recoge y se seca para obtener xantohumol de pureza superior al 90%.

45 Preferiblemente, en la etapa b) la concentración de la sal en la mezcla se ajusta dentro del intervalo desde 0.001 M a 10 M, más preferiblemente en la etapa b) la concentración de la sal en la mezcla se ajusta dentro del intervalo desde 0.001M a 0.05M o por encima de 5M.

Preferiblemente, adicionalmente después de adicionar la sal en la etapa b):

b1) la solución está alcalinizada al nivel de pH por encima de 7;

b2) el primer precipitado se filtra y el filtrado se acidifica al nivel de pH por debajo de 7;

b3) el filtrado acidificado se concentra para obtener el precipitado de xantohumol.

5 Preferiblemente, en la etapa b1) la solución se alcaliniza al nivel de pH en el intervalo desde 7.5 a 10.5 o por encima de 12.

Preferiblemente, el extracto que contiene xantohumol se obtiene por extracción del lúpulo agotado después de la extracción, lúpulo, gránulos de planta de lúpulo o una mezcla de los mismos con un solvente orgánico miscible en agua, utilizándose el solvente en una cantidad de 0.1 a 10 litros por 1 kg de materia prima.

10 Preferiblemente, como un solvente orgánico miscible en agua, se usan cetonas y alcoholes o una mezcla de los mismos, más preferiblemente, como un solvente orgánico miscible en agua, acetona, metanol, etanol, propanol o una mezcla de los mismos.

Preferiblemente, la extracción se realiza a una temperatura en el intervalo desde 5 a 65 °C.

15 Preferiblemente, el extracto que contiene xantohumol se mezcla con agua en una proporción en el intervalo desde 0.1 a 5 litros de agua por 1 litro del extracto, más preferiblemente el extracto que contiene xantohumol se mezcla con agua en una proporción en el intervalo desde 1 a 3 litros de agua por 1 litro del extracto.

Preferiblemente, en la etapa b) se proporciona una concentración de una sal de metal de transición dentro del intervalo desde 0.01 M a 0.05M.

Preferiblemente, como sal de metal de transición se usa una sal de cobre (II) o una sal de zinc (II).

Preferiblemente, como sal de metal de transición se usa una sal de cloruro, una sal de nitrato o una sal de sulfato.

20 Preferiblemente, como una sal de metal de transición se usa cloruro de cobre (II), sulfato de cobre (II) o cloruro de zinc (II) o sulfato de zinc (II).

El procedimiento de acuerdo con la invención permite obtener xantohumol con una pureza de al menos el 90% (habitualmente por encima del 95%) con un buen rendimiento. El procedimiento de acuerdo con la invención no requiere el uso de sistemas de cromatografía complejos o resinas soportadas.

25 La pureza del xantohumol obtenido se determinó mediante la técnica de HPLC en la columna SUPELCOSIL LC-PAH de 15 cm x 4,6 mm, tamaño de grano de 5 µm, temperatura de la columna de 20 °C, Fase A-95% de acetonitrilo HCOOH al 0,3%; Fase B-acetonitrilo al 2% HCOOH al 0,3%, velocidad de flujo de 2 ml/min, inyección de 20 µl, detección a la longitud de onda de 370 y 290 nm.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos de trabajo.

30 Ejemplo 1

Se pesaron 250 g de lúpulo agotado después de la extracción y se vertieron sobre acetona (0.75 L). Después de agitar mecánicamente durante 1 h, el extracto formado se filtró a través de un papel de filtro. El filtrado obtenido (0.65 L) se lavó abundantemente con agua (1.3 L). A continuación, la solución se adicionó con una solución acuosa de CuCl₂ (la concentración de 10 g/l) al volumen de 300 ml por 1 litro del filtrado (la concentración final de 0,022 M). Después de la adición de cloruro de cobre, el pH de la solución se estabilizó a ~4,5. Casi inmediatamente después del vertido del cloruro de cobre, se produjo la precipitación en el extracto de aglomerados de una sustancia de color verde de humulones residuales y clorofila que se separaban de una solución de color amarillo donde se encontró xantohumol. Después de una hora, se adicionó NaOH para precipitar un exceso de cobre aumentando el pH a aproximadamente 10. Después de 1 h, se observó precipitación de una masa fangosa e hidróxido de cobre precipitado en el fondo del recipiente. Los precipitados se filtraron en un papel de filtro. El filtrado obtenido se acidificó con HCl a pH 6 y se concentró en un evaporador rotatorio para producir un precipitado de xantohumol cristalino que se separó por filtración y se secó en un horno (temperatura de 50-60°C) para dar 206 mg de xantohumol con una pureza por HPLC de 97.8%. El rendimiento del procedimiento de extracción de xantohumol fue del 82% basado en el contenido total de xantohumol en el lúpulo agotado.

45 Ejemplo 2

Se obtuvo xantohumol como en el ejemplo 1, excepto que después de adicionar cloruro de cobre, el lodo de color verde precipitado se separó por filtración y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio para producir el precipitado de xantohumol cristalino con una pureza por HPLC del 90.8%.

Ejemplo 3

Se obtuvo xantohumul como en el ejemplo 1, excepto que el cloruro de cobre se sustituyó por una solución de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) a la concentración de 10 g/l. Después de la adición de la solución de sal de zinc, el pH de la solución se estabilizó a ~6 y se observó precipitación. Después de aproximadamente una hora, se adicionó NaOH con el aumento de pH a aproximadamente 10. Después de 1 h, se observó precipitado adicional en el fondo del recipiente. El precipitado se separó por filtración en un papel de filtro. El filtrado obtenido se acidificó con HCl a pH 6 y se concentró en un evaporador rotatorio para producir el precipitado de xantohumul cristalino, que se separó por filtración y se secó en un horno (la temperatura de 50-60°C) para dar xantohumul con una pureza por HPLC del 97.8% con el rendimiento del 79% basado en el contenido total de xantohumul en el lúpulo agotado.

10 Ejemplo 4

Se pesaron 250 g de lúpulo agotado después de la extracción y se vertieron sobre 0.75 litros de metanol puro. Después de agitar mecánicamente durante 1 h, el extracto formado se filtró en un papel de filtro. El filtrado obtenido se vertió sobre agua en una proporción en volumen de 1: 2 (una parte del filtrado a dos partes de agua). A continuación, se adicionó la solución con la solución acuosa de $CuCl_2$ (a la concentración de 10 g/l) en un volumen de 300 ml por 1 litro del filtrado (la concentración final de la sal de 0.022 M). Después de 1 h, se observó precipitación en el extracto de aglomerados de una sustancia de color verde que se separaba de una solución de color amarillo. Luego se adicionó NaOH para elevar el pH a 10. Después de 1 h, se observó un precipitado de color verde fangoso en el fondo del recipiente. El extracto formado se filtró en un papel de filtro. El extracto obtenido se acidificó con HCl a pH 6. Las cantidades restantes del solvente se eliminaron en un evaporador y se obtuvo una suspensión de cristales de xantohumul. La suspensión se filtró a través de un papel de filtro para producir xantohumul, que se secó en un horno a 55 °C para dar 196 mg de xantohumul de la pureza del 95.8% con un rendimiento de aproximadamente 78% basado en el contenido total de xantohumul en el lúpulo agotado.

Ejemplo 5

Se obtuvo xantohumul como en el ejemplo 4, excepto que se usó cloruro de cobre (II), sulfato de cobre (II) ($CuSO_4$) a la concentración de 10 g/l y se obtuvo xantohumul con una pureza del 94.8%.

Ejemplo 6

Se obtuvo xantohumul como en el ejemplo 1, excepto que se usaron concentraciones más altas de cloruro de cobre (II) en el intervalo de 0.022 M a 0.044 M. Se obtuvo xantohumul con una pureza que oscilaba entre 96.3-97.6%.

Ejemplo 7

Se obtuvo xantohumul como en el ejemplo 1, excepto que se utilizó la proporción del extracto de la primera etapa a la cantidad de producto adicionado de 1: 1 y la concentración de $CuCl_2$ de 0.022 M, para obtener xantohumul con una pureza del 96.3%.

Ejemplo 8

Se obtuvo xantohumul como en el ejemplo 1, excepto que se usó 2-propanol en lugar de acetona y la concentración de $CuCl_2$ de 0.022 M para producir xantohumul con una pureza del 93.2%.

Ejemplo comparativo 1

Se pesaron 250 g de lúpulo agotado después de la extracción y se vertieron sobre acetona (0.75 L). Después de agitar mecánicamente durante 1 h, el extracto formado se filtró a través de un papel de filtro. El filtrado obtenido se concentró para producir xantohumul con una pureza del 32.8%.

40 Ejemplo comparativo 2

Se pesaron 250 g de lúpulo agotado después de la extracción y se vertieron sobre acetona (0.75 L). Después de agitar mecánicamente durante 1 h, el extracto formado se filtró a través de un papel de filtro. El filtrado obtenido (0.65 L) se vertió sobre agua (1.3 L). A continuación, se adicionó la solución con la solución acuosa de NaCl (a la concentración de 30 g/l) al volumen de 300 ml por 1 litro del filtrado. Luego, se adicionó NaOH para elevar el pH a aproximadamente 12. El precipitado formado se separó por filtración a través de un papel de filtro. El filtrado obtenido se acidificó con HCl a pH 5 y se concentró en un evaporador rotatorio para obtener un precipitado de xantohumul, que se separó por filtración y se secó en un horno (la temperatura de 50-60°C) para producir xantohumul de la pureza por HPLC del 84.8%.

Ejemplo comparativo 3

Se obtuvo xantohumol como en el ejemplo comparativo 2, excepto que no se usó NaCl. Se obtuvo xantohumol con una pureza por HPLC del 58%, como resultado de la alcalinización a pH 12 solamente.

5 Con base en los ejemplos de trabajo descritos anteriormente, se pudo determinar que el procedimiento de acuerdo con la invención permite obtener xantohumol de alta pureza mediante un procedimiento excepcionalmente simple y económico. Es obvio para una persona experta en la técnica que el xantohumol obtenido por el procedimiento de la invención podría purificarse adicionalmente de acuerdo con métodos conocidos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de xantohumol, caracterizado porque:
- a) un extracto que contiene xantohumol se mezcla con agua;
 - b) se adiciona una solución de sal de metal de transición a la mezcla obtenida;
- 5 c) el precipitado de xantohumol obtenido se recoge y se seca.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa b) la concentración de la sal en la mezcla se ajusta dentro del intervalo desde 0,001 M a 10M.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, caracterizado porque en la etapa b) la concentración de la sal en la mezcla se ajusta dentro del intervalo desde 0,001 M a 0,05M.
- 10 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque adicionalmente después de adicionar la sal en la etapa b):
- b1) la solución está alcalinizada al nivel de pH por encima de 7;
 - b2) el primer precipitado se filtra y el filtrado se acidifica al nivel de pH por debajo de 7;
 - b3) el filtrado acidificado se concentra para obtener el precipitado de xantohumol.
- 15 5. El procedimiento de la reivindicación 4, caracterizado porque en la etapa b1) la solución se alcaliniza al nivel de pH en el intervalo desde 7,5 a 10,5.
- 20 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el extracto que contiene xantohumol se obtiene mediante la extracción de lúpulo agotado después de la extracción, lúpulos, gránulos de planta de lúpulo o una mezcla de los mismos con un solvente orgánico miscible en agua, dicho solvente se utiliza en una cantidad de 0,1 a 10 litros por 1 kg de materia prima.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, caracterizado porque como solvente orgánico miscible en agua, se usan cetonas y alcoholes o una mezcla de los mismos.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, caracterizado porque como solvente orgánico miscible en agua, se usa acetona, metanol, etanol, propanol o una mezcla de los mismos.
- 25 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque la extracción se realiza a una temperatura en el intervalo desde 5 a 65 °C.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque el extracto que contiene xantohumol se mezcla con agua en una proporción en el intervalo desde 0,1 a 5 litros de agua por 1 litro del extracto.
- 30 11. El procedimiento de la reivindicación 10, caracterizado porque el extracto que contiene xantohumol se mezcla con agua en una proporción en el intervalo desde 1 a 3 litros de agua por 1 litro del extracto.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque en la etapa b) la concentración de una sal de metal de transición se proporciona dentro del intervalo desde 0,01 M a 0,05 M.
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque como una sal de metal de transición, se usa una sal de cobre (II) o una sal de zinc (II).
- 35 14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque como sal de metal de transición, se usa una sal de cloruro, una sal de nitrato o una sal de sulfato.
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, caracterizado porque como sal de metal de transición, se usa cloruro de cobre (II), sulfato de cobre (II) o cloruro de zinc (II) o sulfato de zinc (II).