

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902045465A1

Publication Date

20131026

Applicant

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Title

CRISTALLIZZAZIONE DIRETTA DI ENANTIOMERI MEDIANTE NUCLEAZIONE
STEREOSELETTIVA ETEROGENEA SU MEMBRANA

CRISTALLIZZAZIONE DIRETTA DI ENANTIOMERI MEDIANTE NUCLEAZIONE STEREOSELETTIVA ETEROGENEA SU MEMBRANA

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda un procedimento per la cristallizzazione diretta di enantiomeri mediante nucleazione stereoselettiva su membrana. Più in particolare, l'invenzione concerne una tecnica innovativa per la separazione di isomeri ottici o per la produzione di un eccesso enantiomerico, da miscela racemica o avente qualsivoglia composizione di enantiomeri D e L.

Antefatto dell'invenzione

Sono detti isomeri quei composti aventi stessa formula strutturale. Gli isomeri si dividono in due classi principali: gli isomeri costituzionali, che differiscono per il modo in cui gli atomi sono legati tra loro, e gli stereoisomeri, che si distinguono solo per la loro disposizione tridimensionale nello spazio. Appartengono a quest'ultima classe gli enantiomeri (o isomeri ottici), molecole le cui immagini speculari non sono sovrapponibili (molecole chirali). Due enantiomeri presentano proprietà chimiche e fisiche sostanzialmente identiche, ma differenti interazioni con altre molecole chirali; inoltre, essi possiedono attività ottica in quanto capaci di ruotare il piano della luce polarizzata di una eguale misura ma in direzione opposta. È detto levogiro o levorotatorio l'enantiomero (indicato dalla lettera "L" o dal segno "-") che ruota la luce piano-polarizzata in senso antiorario; viceversa, è detto destrogiro o destrorotatorio l'enantiomero (indicato dalla lettera "D" o dal segno "+") che ruota la luce piano-polarizzata in senso orario. Una miscela costituita da una coppia di enantiomeri presenti in quantità equimolare è detta racemica o racemato.

Sebbene due enantiomeri presentino proprietà chimiche e fisiche sostanzialmente identiche (e, pertanto, siano difficili da separare), è dimostrato che gli organismi reagiscono in modo differente rispetto alla somministrazioni di farmaci chirali.

Sin dalla scoperta della stereoisomeria nei sistemi biochimici, compiuta da Pasteur nel 1860, la purificazione di miscele enantiomeriche ha rivestito primaria importanza nell'ambito dell'industria farmaceutica. In genere è solo uno dei due enantiomeri ad essere attivo (ad esempio, l'enantiomero levogiro del tetramisolo - detto anche levamisolo - è un antielmintico ad ampio spettro d'azione, mentre la sua forma destrogiro è inattiva). Pertanto, l'eccesso di una forma enantiomerica rispetto al racemato accresce l'efficacia del farmaco (ad esempio l'escitalopram, enantiomero destrogiro usato come antidepressivo in quanto inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina, presenta un'attività due volte superiore rispetto al racemo citalopram). In altri casi, addirittura, la sola presenza di uno dei due enantiomeri può comportare effetti collaterali gravissimi (come nel caso della talidomide, un sedativo che - commercializzato negli anni cinquanta e sessanta nella forma racemica - si rivelò altamente teratogeno allorquando assunto in gravidanza).

La sintesi asimmetrica e la separazione di enantiomeri da miscele racemiche rappresentano i metodi usati per la preparazione di enantiomeri puri. I processi per la risoluzione delle miscele racemiche sono vari; tra i più comuni si citano:

1. tecniche di separazione cromatografiche, quali le tradizionali cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e gas-cromatografia (GC) o la più recente elettrocromatografia capillare che, pur garantendo elevata discriminazione chirale, sono costose e al momento non applicabili su vasta scala;
2. la cristallizzazione preferenziale di conglomerati (per semina di un enantiomero che agisca da germe per la nucleazione), efficace ma

limitata solo a conglomerati – ovvero una miscela di cristalli di enantiomeri puri – che ricorrono con una frequenza inferiore al 10% dei casi;

3. la tradizionale trasformazione degli enantiomeri in sali diastereoisomerici e successiva separazione per mezzo di metodi fisici: a fronte di una più semplice separazione, i sali diastomerici spesso presentano una più bassa attività farmacologica;
4. la risoluzione cinetica stereoselettiva mediata da enzimi nel caso in cui gli enantiomeri presentino una differente velocità di reazione. Il metodo è costoso, complesso e applicabile in un numero limitato di casi.

Sono altresì presenti nella letteratura scientifica e brevettuale applicazioni di processi a membrana per la purificazione di enantiomeri. Il brevetto US 6485650 (A.S. Bhowan) descrive un metodo per la separazione di enantiomeri mediante membrane liquide supportate (SLM): la membrana non ha di per sé proprietà enantioselettive, ma la sua struttura porosa è utilizzata per immobilizzare un carrier chirale in fase liquida capace di complessare selettivamente uno specifico enantiomero e di trasportarlo attraverso la membrana stessa. L'enantiomero viene quindi recuperato da un fluido di sweep.

Il brevetto US 5080795 (W.H. Pirkle et al.) differisce, rispetto al metodo descritto in precedenza, per una variante tecnica che consente di controllare la temperatura delle due fasi poste a contatto con la membrana. Numerosi sono i possibili carrier identificati in letteratura: dialchiltartrati, acido dibenzotartarico, acido polilattico ecc.. Tali metodi, peraltro, hanno trovato scarsa applicazione a livello industriale a causa della insufficiente stabilità delle SLM.

La pubblicazione di J.H. Kim e coll. (J.H. et al., Optical resolution of alpha-amino acids through enantioselective polymeric membranes based on polysaccharides, *Journal of Membrane Science*, (2003) 213, 273-283)

descrive la preparazione di membrane enantioselettive a partire da sodio alginato e chitosano e l'applicazione alla risoluzione ottica di alfa-amminoacidi. I test di filtrazione su una soluzione racemica di triptofano hanno permesso di ottenere un eccesso enantiomerico pari a circa il 98%.

La pubblicazione di M. Yoshikawa e coll. (Yoshikawa M. et al., *Molecularly imprinted polymeric membranes for optical resolution*, *Journal of Membrane Science*, (1995) 108, 171-175) descrive la preparazione di membrane polimeriche a stampo molecolare (molecularly-imprinted) partendo da resina polistirenica e utilizzando derivati tetrapeptidici quali molecole stampo. Test su soluzioni racemiche di triptofano hanno mostrato una maggiore velocità di permeazione dell'enantiomero L attraverso la membrana.

È da notare che in tutti i casi precedentemente discussi, presentati solo a scopo esemplificativo di una vasta letteratura, l'impiego della membrana è esclusivamente finalizzato al trasporto preferenziale in fase liquida di uno dei due enantiomeri attraverso la membrana stessa, e non alla cristallizzazione.

L'articolo scientifico di A. Swang-Ariyaksul e coll. (Swang-Ariyaksul A. et al., *Chiral separation using a novel combination of cooling crystallization and a membrane barrier: Resolution of DL-glutamic acid*, *Chemical Engineering Science*, (2009) 64, 1980-1984) riferisce di un processo di separazione chirale che combina cristallizzazione per raffreddamento e semina, e separazione con membrana. Nello specifico, la membrana è utilizzata per impedire che i cristalli passino da un compartimento all'altro; essa, invece, risulta permeabile ad entrambi gli enantiomeri che sono trasportati sotto gradiente di concentrazione da un compartimento all'altro e in verso opposto. Ad esempio, se nel compartimento di destra vengono prodotti mediante semina dei cristalli dell'enantiomero L e in quello di sinistra cristalli dell'enantiomero D, l'enantiomero L che è in soluzione attraversa la membrana da sinistra (maggiore concentrazione di L) a destra

(minore concentrazione di L), mentre l'enantiomero D si muove in verso opposto. In definitiva, in tale procedimento, la membrana è utilizzata per trasportare gli enantiomeri ma non ha alcun ruolo nella cristallizzazione enantioselettiva che è invece promossa da semina e raffreddamento.

Sommario dell'invenzione

Alla luce di tale tecnica anteriore, la presente invenzione si è proposta di utilizzare **membrane aventi proprietà stereoselettive** (intrinseche o indotte dalla funzionalizzazione della membrana con ricognitori chirali) capaci di riconoscere uno specifico enantiomero con lo scopo di promuovere la **nucleazione eterogenea stereospecifica** sulla superficie della membrana stessa.

Diversamente dalle soluzioni descritte nella tecnica anteriore sopra citata, la soluzione tecnica proposta secondo l'attuale invenzione: **i)** è finalizzata alla cristallizzazione diretta di uno specifico enantiomero; **ii)** non attua un trasporto selettivo degli enantiomeri attraverso la membrana (il trasporto selettivo riguarda il solvente o, eventualmente, l'antisolvente); **iii)** utilizza la membrana sia per controllare il grado di sovrassaturazione della soluzione enantiomerica, sia per promuovere la nucleazione eterogenea stereoselettiva.

È stato infatti osservato, nell'ambito degli studi condotti in relazione alla presente invenzione, come sia possibile produrre un eccesso enantiomerico utilizzando un innovativo processo di cristallizzazione diretta via nucleazione eterogenea stereoselettiva su una membrana che abbia proprietà stereoselettive, che sia cioè capace di riconoscere e interagire preferenzialmente con un dato enantiomero.

Secondo il processo proposto si ottiene pertanto una cristallizzazione diretta per nucleazione stereoselettiva su membrane funzionalizzate con selettori chirali, o preparate a partire da materiali che abbiano proprietà stereoselettive, o realizzate con tecniche di imprinting molecolare, e che

comunque mostrino la capacità di riconoscere uno specifico enantiomero. Nel processo secondo l'invenzione la membrana è utilizzata allo scopo di:

- i. controllare il grado di sovrassaturazione della soluzione enantiomerica mediante il trasporto selettivo di solvente (o, eventualmente, di antisolvente), tenendo presente che la velocità di trasporto transmembrana dipende sia dai parametri strutturali della membrana (porosità, tortuosità, diametro dei pori, spessore ecc.) che dalle condizioni operative;
- ii. promuovere, sulla superficie della membrana, la nucleazione eterogenea stereoselettiva dello specifico enantiomero che interagisce preferenzialmente con la membrana stessa.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione un procedimento per separare enantiomeri o produrre un eccesso enantiomerico mediante cristallizzazione diretta su membrana, comprendente le seguenti operazioni:

- (a) porre una soluzione enantiomerica contenente almeno un enantiomero D e un enantiomero L (a composizione racemica o avente qualsivoglia composizione) di un composto otticamente attivo in uno o più solventi in contatto con una membrana, da uno dei due lati di detta membrana;
- (b) porre una soluzione estraente costituita da un liquido puro, o una miscela di liquidi o una soluzione di uno o più solidi in uno o più liquidi, in contatto con detta membrana dal lato opposto rispetto alla soluzione enantiomerica;
- (c) ottenere un trasporto selettivo di solvente dalla soluzione enantiomerica alla soluzione estraente; e
- (d) allo stesso tempo, ottenere la formazione di nuclei cristallini di uno specifico di detti enantiomeri D o L sulla superficie o nei pori

o in qualunque altro punto della struttura di detta membrana, secondo un meccanismo di nucleazione eterogenea stereoselettiva, e recuperare i cristalli formati dalla membrana;

in cui detta membrana:

- i) è tale da promuovere un trasporto selettivo di solvente attraverso di essa; e
- ii) ha proprietà stereoselettive, cioè è capace di riconoscere e interagire preferenzialmente con uno di detti enantiomeri D o L.

Ai fini della presente descrizione si definisce “membrana” qualunque membrana convenzionale o barriera selettiva che, interposta tra due fasi, consente il trasporto specifico di uno o più componenti da una fase all'altra (“trasporto trans-membrana”). Le fasi suddette possono presentarsi in qualunque stato di aggregazione: solido, liquido o gassoso o qualunque combinazione fra essi. La membrana può essere porosa, con una dimensione media dei pori che varia tra 0,1 nm e 50 µm, o densa, cioè con pori di dimensioni inferiori a 0,1 nm.

La membrana può essere composta da materiale inorganico o organico, da materiali polimerici o da una combinazione di essi in strutture ibride o composite. Essa può essere realizzata in qualunque possibile forma; forme tipiche sono membrane piane, tubolari, a fibre cave, a fibre capillari, in forma di fogli avvolti a spirale ecc. I pori della membrana possono avere qualunque genere di forma, quali - ad esempio - a forma rotonda, a forma di fenditura, a forma esagonale, a forma irregolare, spugnosa o altro. La membrana può essere idrofila o idrofoba, o può presentare zone idrofile alternate a zone idrofobe. Dette classi di membrane possono essere applicate nel processo secondo l'invenzione in dipendenza dalla natura della soluzione enantiomerica trattata.

Si dice “funzionalizzata” la membrana nella cui struttura siano stati innestati, mediante opportuni procedimenti chimici o fisici, gruppi funziona-

li o molecole allo scopo di favorire interazioni specifiche tra la membrana stessa e uno o più componenti della soluzione.

Nel caso della presente invenzione sono di interesse specifico:

- A. membrane funzionalizzate con ricognitori molecolari specifici quali macrocicli chirali, oligosaccaridi lineari o ciclici, o qualunque altro composto che possa dare luogo a complessi di inclusione host-guest, di origine naturale o di sintesi, o che abbia la capacità di riconoscere preferenzialmente un dato enantiomero;
- B. membrane realizzate a partire da polimeri chirali, pro-chirali o sindiotattici o isotattici o atattici o eutattici aventi proprietà stereoselettive;
- C. membrane realizzate con tecniche di imprinting molecolare che determinino una preferenziale interazione con uno specifico enantiomero.

Nel processo oggetto della presente invenzione, la membrana può essere inserita in un "modulo"; per modulo si intende un'unità in grado di contenere una o più membrane posizionate in mezzo a uno o più raccordi di ingresso ed uno o più raccordi di uscita. Il modulo può essere rinforzato da un materiale come ceramica, metalli, polimeri ecc. Il modulo può, eventualmente, contenere una successione sequenziale di più membrane disposte secondo una configurazione concentrica fra di loro.

Ai fini della presente descrizione si intende in generale per "soluzione enantiomerica" (o "soluzione di cristallizzazione") una miscela in fase liquida di almeno una coppia enantiomeri e di un solvente, essendo quest'ultimo un fluido o una combinazione di più fluidi in cui gli enantiomeri abbiano una solubilità non nulla.

Si intende inoltre per "antisolvente" un fluido o una combinazione di più fluidi che differiscono in composizione chimica dal solvente e che, quando mescolati con la soluzione di cristallizzazione in qualsiasi proporzione, riduce la solubilità della sostanza di interesse. Il termine antisolven-

te può riferirsi ad un liquido, ad un fluido supercritico, ad un gas liquefatto e compresso, ad un vapore denso o ad una miscela di due o più di essi. Antisolventi preferiti includono alcoli, chetoni, acidi carbossilici, esteri, eteri, alcani, acqua, ammine, sali di ammonio quaternario, liquidi ionici, diossido di carbonio gassoso e liquidi supercritici. Esempi di antisolventi particolarmente preferiti includono acqua, metanolo, etanolo, esano, pentano, polietilenglicole, liquidi ionici che comprendono complessi (metallici) di EDTA.

Il trasporto di materia attraverso la membrana è promosso da una forza spingente rappresentata, secondo l'accezione più generale, da un gradiente di potenziale elettrochimico ovvero, secondo le accezioni più specifiche, da una differenza di attività, o di temperatura, o di pressione parziale, o di pressione idrostatica, o di potenziale elettrico tra i due lati della membrana, o da una qualunque combinazione di tali parametri.

La velocità del trasporto trans-membrana di materia dipende sia dai parametri strutturali della membrana (porosità, tortuosità, diametro dei pori, spessore ecc.) che dalle condizioni operative: ciò permette di controllare il grado di sovrassaturazione della soluzione enantiomerica.

Si dice "sovrassatura" o "in sovrassaturazione" la soluzione in cui il componente che si vuol cristallizzare sia presente, nelle condizioni di temperatura e pressione operative, in una concentrazione superiore al suo valore di solubilità. Si definisce "grado di sovrassaturazione" il rapporto tra la concentrazione del componente che si vuol cristallizzare e il suo valore di solubilità alla temperatura e alla pressione del sistema.

Il termine "nucleazione eterogenea" assume, ai fini della presente descrizione, il significato che è ad esso attribuito dalla teoria classica della nucleazione (Classical Nucleation Theory). È altresì definita "stereoselettiva" qualsiasi interazione chimica o fisica, o qualsiasi processo (inclusa la nucleazione eterogenea), che coinvolga preferenzialmente uno specifico enantiomero. La nucleazione, ovvero il processo di formazione dei nuclei

cristallini, è detta stereoselettiva (o stereospecifica) se è indirizzata verso la formazione di uno specifico enantiomero; è altresì detta “eterogenea” in quanto essa ha luogo sulla superficie, nei pori o in qualunque altro punto della membrana o perché promossa da interazioni, di qualunque tipo, tra la membrana e uno degli enantiomeri presenti nella soluzione di cristallizzazione.

Secondo la presente invenzione, la cristallizzazione diretta di uno specifico enantiomero si intende promossa dalla membrana giacché:

1. la membrana promuove il trasporto selettivo di solvente (o, eventualmente, di antisolvente) tra la soluzione enantiomerica e la soluzione estraente – come già notato, la velocità del trasporto transmembrana di materia, che dipende sia dai parametri strutturali della membrana (porosità, tortuosità, diametro dei pori, spessore ecc.) sia dalle condizioni operative, permette di controllare il grado di sovrassaturazione della soluzione enantiomerica;
2. la membrana, grazie alle sue proprietà stereoselettive, favorisce la formazione dei nuclei cristallini di uno specifico enantiomero sulla sua superficie secondo un meccanismo di nucleazione eterogenea stereoselettiva.

Secondo il procedimento proposto, una membrana avente le caratteristiche sopra richiamate viene posta in contatto con la soluzione enantiomerica da un lato. In una tipica applicazione la membrana è preferenzialmente idrofoba (impedisce il passaggio in fase liquida sia del solvente che degli enantiomeri in esso disciolti) ed è funzionalizzata con ricognitori molecolari specifici quali macrocicli chirali, od oligosaccaridi lineari o ciclici, o qualunque altro composto che possa dare luogo a complessi di inclusione host-guest o che abbia la capacità di riconoscere preferenzialmente un dato enantiomero. La membrana è posta in contatto, sul lato opposto rispetto alla soluzione enantiomerica, con una soluzione detta “estraente” costituita preferenzialmente da una soluzione acquosa di un sale. Allo

scopo possono anche utilizzarsi soluzioni di un polielettrolita (quale, ad esempio, polivinilalcol, glicole polietilenico ecc.) o di un qualsiasi composto che conferisca alla soluzione una attività minore rispetto a quella della soluzione enantiomerica (essendo l'attività definita, in accordo con le usuali nozioni di termodinamica, come prodotto tra concentrazione e coefficiente di attività).

Il gradiente di attività spinge il solvente (volatile) ad evaporare attraverso la membrana e condensare sul lato della soluzione estraente; gli enantiomeri, possedendo volatilità praticamente nulla, non attraversano la membrana. La velocità del trasporto trans-membrana di materia dipende sia dai parametri strutturali della membrana (porosità, tortuosità, diametro dei pori, spessore ecc.) che dalle condizioni operative: ciò permette di controllare il grado di sovrassaturazione della soluzione enantiomerica. La presenza sulla superficie della membrana di ricognitori molecolari aventi specifica selettività verso uno dei due enantiomeri (destrogiro oppure levogiro) determina nella soluzione enantiomerica sovrassatura la formazione preferenziale di nuclei dell'enantiomero riconosciuto (**nucleazione eterogenea stereoselettiva**). Lo stadio di crescita della fase cristallina porta con tutta evidenza sperimentale alla formazione di un prodotto solido (e, ovviamente, ad una soluzione madre) che presenta un eccesso enantiomerico.

Possibili varianti rispetto alla metodologia testé illustrata includono l'applicazione del vuoto, di un gas o di una miscela di gas al lato estraente (gradiente di pressione parziale), oppure l'applicazione di una differenza di temperatura tra i due lati della membrana, oppure l'impiego di un antisolvente che diffonda dal lato estraente verso la soluzione enantiomerica.

In particolare, secondo una forma di realizzazione specifica dell'invenzione, detta soluzione estraente è costituita da uno o più antisolventi, il cui trasporto selettivo attraverso la membrana determina il grado di sovrassaturazione della soluzione enantiomerica. Secondo una ulteriore

forma di realizzazione specifica dell'invenzione, anche la soluzione enantiomerica può contenere uno o più antisolventi, la cui concentrazione aumenta con il progressivo diffondere del solvente attraverso la membrana verso la soluzione estraente, determinando così il grado di sovrassaturazione della soluzione enantiomerica. Secondo altre forme di realizzazione specifiche del metodo proposto, la soluzione estraente è invece costituita da un gas, o una miscela di gas a qualsiasi composizione, oppure dal vuoto.

Più in generale, secondo il procedimento dell'invenzione, la rimozione di solvente o l'aggiunta di antisolvente può essere promossa da una differenza di attività tra i due lati di detta membrana, o da una differenza di temperatura, da una differenza di pressione parziale, da una differenza di pressione idrostatica, una differenza di potenziale elettrico o da una qualunque combinazione di tali parametri.

Altre possibili varianti rispetto alla metodologia testè illustrata includono l'uso di membrane idrofile, in cui il trasporto transmembrana di solvente o antisolvente avviene in fase liquida promosso da un gradiente di pressione idrostatica o da una differenza di potenziale elettrico che agisce sulle soluzioni presenti sui due lati della membrana.

Nel procedimento secondo l'invenzione, il contatto tra detta soluzione enantiomerica e la membrana può essere realizzato in modo quiescente, oppure facendo fluire una o entrambe dette soluzioni in contatto con la membrana tangenzialmente alla superficie della membrana stessa, in regime laminare o turbolento.

Il processo proposto secondo l'invenzione può essere realizzato vantaggiosamente in più stadi, pervenendo alla progressiva purificazione di un dato enantiomero. In questo caso le operazioni (a)-(d) sopra descritte sono reiterate una o più volte, a stadi, ad ottenere una progressiva purificazione di un dato enantiomero per mezzo di un procedimento che comprende una o entrambe le seguenti serie di operazioni:

- I. reiterare una o più volte il recupero dei cristalli, dissolvendoli nuovamente in detti uno o più solventi ed ottenendo una ricristallizzazione degli stessi mediante ripetizione delle operazioni (a)-(d);
- II. reiterare una o più volte le operazioni (a)-(d) sulla soluzione enantiomerica allorché sono stati da essa separati i cristalli ottenuti.

Secondo altre forme di realizzazione specifiche della procedura dell'invenzione, infine, il prodotto cristallino arricchito nell'enantiomero desiderato può anche essere recuperato in un comparto differente dal modulo contenente la membrana.

Considerando il processo proposto secondo l'invenzione, è da notare che il flusso trans-membrana di solvente o di antisolvente dipende dai parametri strutturali e morfologici della membrana, dalle caratteristiche chimico-fisiche del solvente/ estraente/ antisolvente impiegato, dalla differenza di potenziale chimico tra i lati della membrana. La possibilità di modulare tali parametri conferisce, in maniera esclusiva rispetto alle convenzionali tecniche di cristallizzazione enantioselettiva, una maggiore flessibilità operativa e l'opportunità di poter controllare in modo accurato il grado e la velocità di generazione della supersaturazione.

Un ulteriore vantaggio è determinato dal fatto che la membrana promuove, sulla sua superficie, la nucleazione eterogenea stereoselettiva dello specifico enantiomero che interagisce preferenzialmente con essa. La cinetica di nucleazione dipende da taluni parametri chimico-fisici della membrana quali, in particolare, porosità, tortuosità, energia superficiale; pertanto, essa può essere controllata in maniera esclusiva rispetto alle convenzionali tecniche di cristallizzazione enantioselettiva modulando opportunamente le proprietà della membrana in fase di manifattura.

Volendo comparare la presente invenzione con le tecniche di filtrazione a membrana di miscele racemiche, è da rilevare che - mentre l'effi-

cienza di queste ultime diminuisce nel tempo a seguito della progressiva occupazione dei siti chirali - l'efficienza della presente tecnica di cristallizzazione è stabile nel tempo in quanto i nuclei enantiopuri formati sulla superficie della membrana possono fungere da germi di nucleazione stereoselettiva per le molecole in soluzione.

Ancora, la caratteristica modularità e l'ampia gamma di tipologie delle membrane (piane, tubolari, a fibre cave ecc.) consentono una flessibilità operativa molto maggiore rispetto alle tecniche convenzionali attualmente in uso.

Alcune forme di realizzazione del procedimento secondo l'invenzione, come pure alcuni dati sperimentali riguardanti le caratteristiche dei prodotti ottenuti e il confronto con la tecnica anteriore, sono riportati a titolo meramente esemplificativo nel seguito.

ESEMPIO 1

Cristallizzazione enantioselettiva diretta di acido DL-mandelico su membrane polimeriche funzionalizzate con O-ottil-ossicarbonil-ciclodestrina β

La soluzione enantiomerica, a composizione racemica, è ottenuta sciogliendo 2,5 g di acido DL-mandelico in 10 mL di acqua ultrapura; la soluzione risultante (di seguito indicata come "soluzione racemica") è posta in agitazione per 30 minuti a 20 °C.

47,6 g di magnesio solfato anidro sono sciolti in acqua ultrapura addizionata fino a raggiungere un volume pari a 100 mL; la soluzione risultante (di seguito indicata come "soluzione estraente"), posta in agitazione per 30 minuti a 20 °C, ha una concentrazione 0.5 M.

I test di cristallizzazione sono stati condotti utilizzando le seguenti membrane polimeriche:

1. membrana densa di polidimetilsilossano caricata con O-ottilossicarbonil-ciclodestrina β in percentuale del 16,97% rispetto alla massa

totale della membrana stessa. La membrana, ottenuta mediante tecnica di inversione di fase per evaporazione del solvente (diclorometano), è nel seguito indicata con la sigla **"M1"**;

2. membrana a bassa porosità (11,2%) di poli(vinilidenfluoruro-co-esafluoropropilene) caricata con O-ottilossicarbonil-ciclodestrina β in percentuale del 12,8% rispetto alla massa totale della membrana stessa. La membrana, ottenuta mediante tecnica di inversione di fase (solvente: N,N-dimetilacetammide; non-solvente: acqua), è nel seguito indicata con la sigla **"M2"**;
3. membrana ad elevata porosità (77%) di fluoruro di polivinilidene caricata con O-ottilossicarbonil-ciclodestrina β in percentuale del 20,0% rispetto alla massa totale della membrana stessa. La membrana, ottenuta mediante tecnica di inversione di fase indotta da non-solvente (solvente: N,N-dimetilacetammide; non-solvente: acqua), è nel seguito indicata con la sigla **"M3"**;
4. membrana ad elevata porosità (80,5%) di poli(vinilidenfluoruro-co-esafluoropropilene) caricata con O-ottilossicarbonil-ciclodestrina β in percentuale del 12,8% rispetto alla massa totale della membrana stessa. La membrana, ottenuta mediante tecnica di inversione di fase (solvente: N,N-dimetilacetammide; non-solvente: acqua), è nel seguito indicata con la sigla **"M4"**;

Gli esperimenti di cristallizzazione sono stati effettuati in piastre con pozzetti del diametro di 20 mm. Su ciascuna membrana sono stati depositati 400 μ L di soluzione racemica; l'altro lato della membrana è stato, invece, posto in contatto con 5 mL di soluzione estraente. Le piastre sono state conservate per 24 ore in un incubatore refrigerato a 12°C. Al termine della prova si è provveduto preliminarmente a rimuovere il solvente dai cristalli adesi alla superficie di ciascuna membrana mediante evaporazione sotto vuoto; quindi i cristalli sono stati sciolti in 1 mL di acqua.

La soluzione così ottenuta è stata analizzata mediante cromatogra-

fia liquida HPLC [Agilent 1100 series HPLC System – USA equipaggiato con colonna CHIROBIOTIC™ T Astec-USA 250 mm x 4.6 mm (ID), eluente: 1% TEAA/metanolo (80/20 v/v) pH =4, 1 mL/min]. I risultati hanno mostrato che il processo di nucleazione eterogenea su membrane funzionalizzate con ricognitori molecolari stereoselettivi ha dato luogo alla formazione di un eccesso di cristalli della forma L (ee_L , %). I risultati ottenuti sono riportati nella seguente Tabella 1.

Tabella 1

Percentuale di eccesso enantiomerico (ee_L) della forma L dell'acido mandelico da esperimenti di cristallizzazione diretta di soluzione racemica su membrane polimeriche funzionalizzate con O-ottilossicarbonil-ciclodestrina β .

Membrana	ee_L (%)
M1 (PB)	10 $\pm$ 1,5
M2 (PSN2)	9,9 $\pm$ 2,3
M3 (PV)	5,3 $\pm$ 0,22
M4 (PSN1)	6,6 $\pm$ 1,4

ESEMPIO 2

Cristallizzazione enantioselettiva diretta di acido DL-glutammico su membrane polimeriche funzionalizzate con O-ottil-ossicarbonil-ciclodestrina β

La soluzione enantiomerica, a composizione racemica, è ottenuta sciogliendo 0,22 g di acido DL-glutammico in 10 mL di acqua ultrapura; la soluzione risultante (di seguito indicata come “soluzione racemica”) posta in agitazione per 30 minuti a 20 °C.

47,6 g di magnesio solfato anidro sono sciolti in acqua ultrapura addizionata fino a raggiungere un volume pari a 100 mL; la soluzione risultante (di seguito indicata come “soluzione estraente”), posta in agitazione per 30 minuti a 20 °C, ha una concentrazione 0.5 M.

I test di cristallizzazione sono stati condotti utilizzando le membrane

polimeriche M1, M2, M3 e M4 descritte nell'esempio 1.

Gli esperimenti di cristallizzazione sono stati effettuati in piastre con pozzetti del diametro di 20 mm. Su ciascuna membrana sono stati depositati 400 μ L di soluzione racemica; l'altro lato della membrana è stato, invece, posto in contatto con 5 mL di soluzione estraente. Le piastre sono state conservate per 24 ore in un incubatore refrigerato a 12°C. Al termine della prova si è provveduto preliminarmente a rimuovere il solvente dai cristalli adesi alla superficie di ciascuna membrana mediante evaporazione sotto vuoto; quindi i cristalli sono stati sciolti in 1 mL di acqua.

La soluzione così ottenuta è stata analizzata mediante cromatografia liquida HPLC [Agilent 1100 series HPLC System – USA equipaggiato con colonna CHIROBIOTIC™ T Astec-USA 250 mm x 4.6 mm (ID), eluente: metanolo/acqua/acido formico (80/20/0.02 v/v), 1 mL/min]. I risultati hanno mostrato che il processo di nucleazione eterogenea su membrane funzionalizzate con ricognitori molecolari stereoselettivi ha dato luogo alla formazione di un eccesso di cristalli della forma L (ee_L , %). I risultati ottenuti sono riportati nella seguente Tabella 2.

Tabella 2

Percentuale di eccesso enantiomerico (ee_L) della forma L dell'acido glutammico da esperimenti di cristallizzazione diretta di soluzione racemica su membrane polimeriche funzionalizzate con O-ottilossicarbonil-ciclodestrina β .

Membrana	ee_L (%)
M1 (PB)	7,8 $\pm$ 1,1
M2 (PSN2)	4,0 $\pm$ 0,89
M3 (PV)	37 $\pm$ 0,89
M4 (PSN1)	25 $\pm$ 1,6

La presente invenzione è stata descritta con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione specifiche, ma è da intendersi che variazioni o

modifiche potranno essere ad essa apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per separare enantiomeri o produrre un eccesso enantiomerico mediante cristallizzazione diretta su membrana, comprendente le seguenti operazioni:

- (a) porre una soluzione enantiomerica contenente almeno un enantiomero D e un enantiomero L di un composto otticamente attivo in uno o più solventi in contatto con una membrana, da uno dei due lati di detta membrana;
- (b) porre una soluzione estraente costituita da un liquido puro, o una miscela di liquidi o una soluzione di uno o più solidi in uno o più liquidi, in contatto con detta membrana dal lato opposto rispetto alla soluzione enantiomerica;
- (c) ottenere un trasporto selettivo di solvente dalla soluzione enantiomerica alla soluzione estraente; e
- (d) allo stesso tempo, ottenere la formazione di nuclei cristallini di uno specifico di detti enantiomeri D o L sulla superficie o nei pori o in qualunque altro punto della struttura di detta membrana, secondo un meccanismo di nucleazione eterogenea stereoselettiva, e recuperare i cristalli formati dalla membrana;

in cui detta membrana:

- i) è tale da consentire un trasporto selettivo di solvente attraverso di essa; e
- ii) ha proprietà stereoselettive, cioè è capace di riconoscere e interagire preferenzialmente con uno di detti enantiomeri D o L.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta membrana è una membrana funzionalizzata con ricognitori molecolari specifici scelti del gruppo consistente in: macrocicli chirali, oligosaccaridi lineari o ciclici, composti atti a dar luogo a complessi di inclusione host-guest di

origine naturale o di sintesi, composti atti a riconoscere preferenzialmente uno specifico di detti enantiomeri D o L.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta membrana è una membrana realizzata a partire da polimeri chirali, pro-chirali o sindiotattici o isotattici o atattici o eutattici aventi proprietà stereoselettive.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detta membrana è una membrana realizzata con tecniche di imprinting molecolare che determinano una preferenziale interazione con uno specifico di detti enantiomeri D o L.

5. Procedimento secondo ognuna delle rivendicazioni 2-4, in cui nella soluzione estraente e/o nella soluzione enantiomerica sono presenti uno o più antisolventi, il cui trasporto selettivo attraverso detta membrana determina il grado di sovrassaturazione della soluzione enantiomerica.

6. Procedimento secondo ognuna delle rivendicazioni 2-4, in cui detta soluzione estraente è costituita da un gas, o una miscela di gas a qualsiasi composizione, o dal vuoto.

7. Procedimento secondo ognuna delle rivendicazioni 2-4, in cui la rimozione di solvente o l'aggiunta di antisolvente è promossa da una differenza di attività tra i due lati di detta membrana, o da una differenza di temperatura, o da una differenza di pressione parziale, o da una differenza di pressione idrostatica, da una differenza di potenziale elettrico, o da una qualunque combinazione di tali parametri.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, in cui il contatto tra detta soluzione enantiomerica e la membrana è realizzato in modo quiescente, oppure facendo fluire una o entrambe dette soluzioni in contatto con la membrana tangenzialmente alla superficie della membrana stessa in regime laminare o turbolento.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in cui dette operazioni (a)-(d) sono reiterate una o più volte, a stadi, ad ottenere una progressiva purificazione di un dato enantiomero, il quale procedimento comprende

una o entrambe le seguenti serie di operazioni:

- I. reiterare una o più volte il recupero dei cristalli, dissolvendoli nuovamente in detti uno o più solventi ed ottenendo una ricristallizzazione degli stessi mediante ripetizione di dette operazioni (a)-(d);
- II. reiterare una o più volte dette operazioni (a)-(d) sulla soluzione enantiomerica allorché sono stati da essa separati i cristalli ottenuti.

10. Procedimento secondo le rivendicazioni 1 o 9, in cui il prodotto cristallino è recuperato in un comparto differente dal modulo contenente detta membrana.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

CLAIMS

1. A process for separating enantiomers or producing an entantiomeric excess by direct crystallization on a membrane, comprising the following operations:

- (a) placing a solution of enantiomers containing at least a D enantiomer and a L enantiomer of an optically active compound in one or more solvents in contact with a membrane, on one of the two sides of said membrane;
- (b) placing an extracting solution consisting of a pure liquid, or of a mixture of liquids or of a solution of one or more solids in one or more liquids, in contact with said membrane on the opposed side with respect to said solution of enantiomers;
- (c) obtaining a selective transfer of solvent from the solution of enantiomers to the extracting solution; and
- (d) at the same time, obtaining the formation of crystalline nuclei of a specific one of said D and L enantiomers on the surface or in the pores of said membrane, or in any other point of the structure of said membrane, according to a heterogeneous stereoselective nucleation mechanism, and recovering the crystals formed from the membrane;

wherein said membrane:

- i) is such as to allow a selective transfer of solvent through it; and
- ii) has stereoselective properties , i.e. it is capable of recognizing and interacting preferentially with one of said D and L enantiomers.

2. A process according to claim 1, wherein said membrane is a membrane functionalized with specific molecular recognizers selected from the group consisting of: chiral macrocycles, linear or cyclic oligosac-

charides, compounds suitable to give rise to host-guest inclusion complexes of a natural or synthetic origin, compounds suitable to preferentially recognize a specific one of said D or L enantiomers.

3. A process according to claim 1, wherein said membrane is a membrane obtained starting from chiral, pro-chiral, or syndiotactic, or isotactic, or atactic, or eutactic polymers having stereoselective properties.

4. A process according to claim 1, wherein said membrane is a membrane obtained with molecular imprinting techniques, which result in a preferential interaction with a specific one of said D or L enantiomers

5. A process according to any one of claims 2-4, wherein in the extracting solution and/or in the enantiomers solution one or more antisolvents are present, the selective transfer of which through said membrane controls the oversaturation degree of the enantiomers solution.

6. A process according to any one of claims 2-4, wherein said extracting solution consists of a gas, or a gas mixture of any composition, or is replaced by vacuum.

7. A process according to any one of claims 2-4, wherein the removal of solvent or the addition of antisolvent is promoted by a difference of activity between the two sides of said membrane, or by a temperature difference, or by a difference in partial pressure, in hydrostatic pressure, or in electric potential, or by any combination of said parameters.

8. A process according to claim 7, wherein the contact between said solution of enantiomers and the membrane is obtained statically, or by having one or both solutions tangentially flow in contact with the membrane surface, in laminar or turbulent flow.

9. A process according to claim 7, wherein said operations (a)-(d) are repeated more than once, in stages, to obtain a progressive purification of a given enantiomer, the process comprising one or both the following series of operations:

- I. repeating one or more times the recovery of the crystals, dissolving them again in said one or more solvents and obtaining a recrystallization of the same through repetition of said operations (a)-(d);
- II. repeating one or more times the said operations (a)-(d) on the enantiomers solution after separation from it of the crystals obtained.

10. A process according to claims 8 or 9, wherein the crystalline product is recovered in a compartment different from the module containing said membrane.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.