



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102008901666467
Data Deposito	09/10/2008
Data Pubblicazione	09/04/2010

Classifiche IPC

Titolo

MOLECOLA NATURALE ESTRATTA DA UN AGRUME, PROCESSO DI ESTRAZIONE E USO FARMACEUTICO

Molecola naturale estratta da un agrume, processi di estrazione e uso farmaceutico

Campo della tecnica dell'invenzione.

La presente invenzione riguarda una nuova molecola estratta da un agrume, in particolare dal bergamotto, il processo di estrazione e il suo uso come farmaco anti-colesterolemico.

Stato dell'arte

I flavonoidi sono presenti in maniera massiccia in molte specie vegetali, e possiedono doti nutrizionali e farmaceutiche notevoli; nel secolo scorso, studi epidemiologici hanno dimostrato che il consumo a lungo termine di vegetali e frutta offre una notevole protezione nei confronti di malattie croniche, come ad esempio il cancro.¹⁻⁷ Poichè la produzione incontrollata di radicali liberi è implicata nell'insorgenza del cancro,⁸⁻¹¹ si è focalizzata l'attenzione sul possibile ruolo di nutrienti di questo tipo di dieta come soppressori e/o spazzini di radicali.¹²⁻¹⁵

Studi più recenti suggeriscono che l'assunzione di flavonoli e flavoni, o altri flavonoidi ha un effetto protettivo contro malattie vascolari o alcuni tipi di cancro.¹⁶⁻²⁶

Nel documento US2008031861 è descritto un integratore per abbassare il colesterolo in una persona utilizza un integratore contenente un flavone ed un enzima.

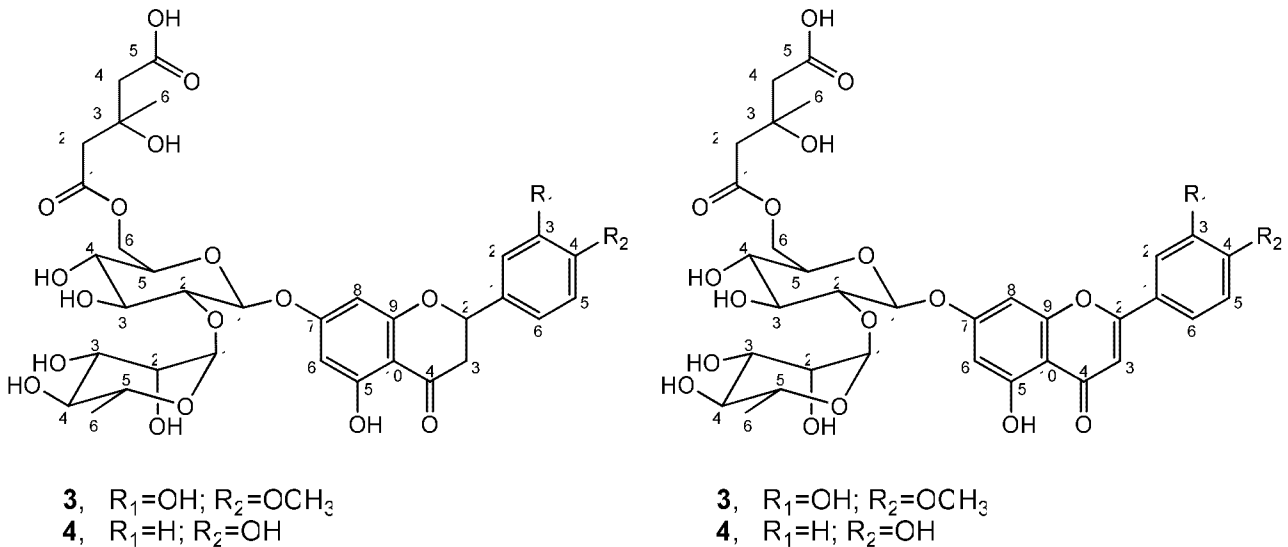
CN101073610 descrive un processo per ottenere alcaloide spino sali organici acidi di calcio contenenti flavonoidi che possono essere usati per abbassare il colesterolo.

In US2006182823 viene descritto un metodo per recuperare componenti flavonoidi ed alcaloidi da foglie di loto.

Sommario della presente invenzione

La presente invenzione riguarda l'isolamento e l'identificazione strutturale di alcuni composti presenti negli agrumi e particolarmente nel frutto della specie *Bergamia* appartenente al genere *Citrus* (Bergamotto). Essi sono presenti in quantità rilevante (ca. 300-500 mg/kg) nelle diverse parti del frutto e appartengono alla classe dei flavonoidi. Una caratteristica principale di questi nuovi composti è la presenza nella molecola del gruppo ossi-3-metil glutarile (HMG) sotto forma di estere sulla porzione zuccherina della molecola (vedi figura 1).

Arverotto

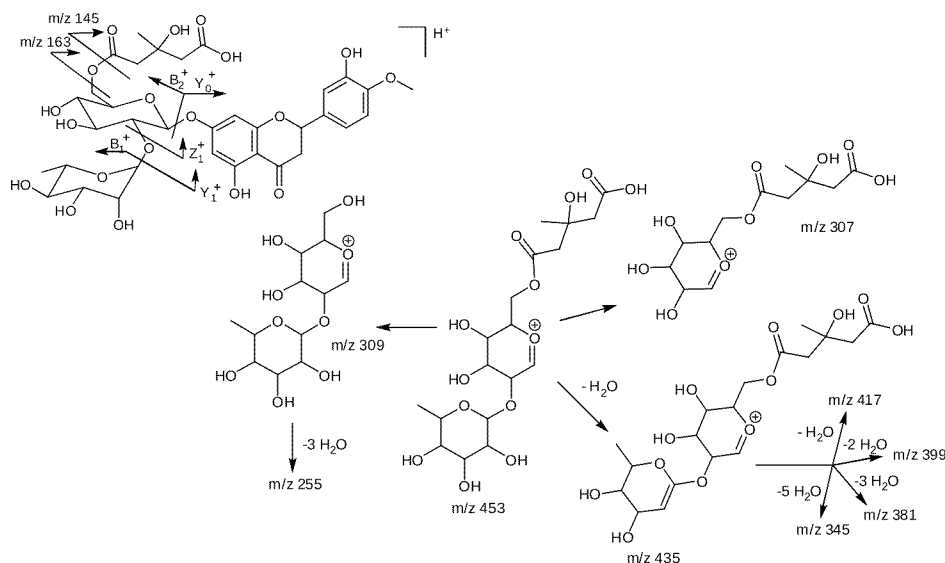


Schema 1

Il gruppo HMG, presente nelle nuove molecole individuate, ha un ruolo fondamentale nella biosintesi del colesterolo, infatti esso, in vivo, viene biosintetizzato attraverso una serie di reazioni enzimatiche. Uno di questi passaggi chiave prevede la trasformazione (riduzione) dell'acido 3-idrossi-3-metil glutarico coniugato al coenzima A (HMG-CoA) ad acido mevalonico. Normalmente per bloccare la biosintesi del colesterolo, si utilizzano farmaci denominati "statine"; questi hanno una struttura simile all'HMG-CoA e riescono a bloccare l'enzima HMG reduttasi responsabile della trasformazione (riduzione) descritta sopra. Le nuove molecole, trovate nel succo di bergamotto sono anche esse coniugate dell'HMG (3a) e possono, quindi, inibire l'enzima reduttasi. Le prove in vitro descritte in fondo a questo abstract danno credito a questa ipotesi. I composti sono stati isolati attraverso un procedimento estrattivo ed una separazione cromatografica. Il procedimento estrattivo consiste nell'aggiunta di una miscela di solventi (metanolo etanolo e cloroformio in rapporto volumetrico 65:30:5 (v/v/v)), ovvero gli stessi solventi puri od in diverse proporzioni, al frutto precedentemente sminuzzato in tutte le sue parti. Il preparato viene posto sotto agitazione per 2 ore. Alla fine il solvente viene filtrato e ridotto in volume fino a consistenza sciropposa. Il residuo, solubilizzato con acqua, viene sottoposto a estrazione in fase solida attraverso una cartuccia a fase inversa. La cartuccia viene prima attivata con metanolo ed acqua, poi il residuo viene versato sulla cartuccia ed eluito prima con acqua per rimuovere gli zuccheri e poi con metanolo o etanolo. Il residuo metanolico che contiene perlopiù flavonoidi viene evaporato a secchezza e sottoposto a separazione cromatografica. Il sistema cromatografico è un HPLC semipreparativo utilizzando una colonna in fase inversa ed un detector UV/MS oppure un sistema MPLC a fase inversa utilizzando gli stessi solventi in eluizione. Per isolare il composto si utilizza una corsa cromatografica con fase mobile acqua acetonitrile o etanolo o acetonitrile. Le frazioni

Alveto

corrispondenti agli estratti ionici m/z 755 (composto 1) e m/z 725 (composto 2) vengono raccolte e separate dal solvente per evaporazione per ottenere composti puri. Il composto 1 è stato caratterizzato attraverso esperimenti di spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) e risonanza magnetica ad alta risoluzione (NMR). Lo spettro HRMS in sorgente genera il picco pseudomolecolare $[M+H]^+$ con valore 755.2387 che corrisponde alla formula molecolare $C_{43}H_{43}O_{19}$ con uno scarto di -0.80 ppm sul valore teorico. Lo spettro HRMSMS della specie $[M+H]^+$ genera una serie di picchi interpretabili attraverso lo schema 2.



Schema 2

La molecola 1 è stata sottoposta ad esperimenti NMR sia monodimensionali che bidimensionali. La tabella 1 mostra l'assegnazione dei segnali relativi ai protoni.

Tabella 1. dati 1H -NMR (δ) per i composti 1 e 2

Posizione	Composto 1	Composto 2
2	5.38 (dd)	5.38 (dd)
3	3.09-2.77 (dd)	3.09-3.30 (dd)
6	6.17 (m, ar)	6.17 (m, ar)
8	6.14 (m, ar)	6.14 (m, ar)
2'	6.96 (m, ar)	6.96 (m, ar)
4'-OCH ₃	3.85 (s)	--
3'-H	--	6.70 (m, ar)
5'	6.90 (m, ar)	6.70 (m, ar)
6'	6.92 (m, ar)	6.97 (m, ar)
1''	5.10 (d)	5.10 (d)
2''	3.62 (dd)	3.66 (dd)
3''	3.39 (dd)	3.39 (dd)
4''	3.37 (dd)	3.37 (dd)
5''	3.69 (dd)	3.69 (dd)
6''	4.20-4.40 (dd)	4.20-4.40 (dd)
1'''	5.26 (d)	5.26 (d)
2'''	3.89 (dd)	3.94 (dd)

Arvestra

3'''	3.59 (dd)	3.59 (dd)
4'''	3.62 (dd)	3.66 (dd)
5'''	3.90 (m)	3.90 (dd)
6'''	1.31 (d)	1.31 (d)
2''''	2.65-2.52 (m)	2.65-2.52 (m)
4''''	2.65-2.52 (m)	2.65-2.52 (m)
6''''	1.26 (s)	1.26 (s)

La molecola è stata sottoposta a reazione di idrolisi basica per verificare l'esistenza di legami esterei. Dopo 4 ore di reazione con carbonato di sodio si forma una specie avente ione molecolare a m/z 611. I tempi di ritenzione cromatografici del prodotto di reazione e dello standard neoesperidina sono uguali per cui si arriva alla conclusione che il prodotto di reazione è proprio neoesperidina. La corsa mostra anche la formazione di un prodotto avente ione molecolare a m/z 163, che corrisponde all'acido eliminato dalla reazione di idrolisi. Quest'ultimo prodotto viene separato tramite cromatografia preparativa e sottoposto a spettrometri HRMS ed NMR (tabella 2), che indicano che esso corrisponde all'HMG.

Tabella 2. Dati NMR per l'acido 3-metil-3-idrossilutarico (HMG) ottenuto dopo idrolisi basica.

set	dati $^1\text{H-NMR}$ (δ (m))	dati $^{13}\text{C-NMR}$ (δ (m))
3-CH ₃	1.22 (s)	28 (q)
2,4-CH ₃	2.46 (m)	46.5 (t)
1,5-COOH	8.21 (s)	173 (s)
3-OH	--	69 (s)

Il risultato è che la molecola incognita è una molecola di neoesperidina coniugata attraverso un legame estereo in posizione 6 del glucosio all'HMG. La posizione del legame estereo è confermata dai dati NMR in tabella 1.

L'intera procedura viene ripetuta per il composto 2 che come risultato finale fornisce la struttura della naringina coniugata attraverso un legame estereo in posizione 6 del glucosio all'HMG.

Una volta isolate, le molecole 1 e 2 sono state sottoposte ad esperimenti *in vitro* per verificare il loro potenziale inibitorio del processo biosintetico di produzione del colesterolo. E' stato utilizzato un kit enzimatico reperibile in commercio; Il kit risulta composto da: 10 ml di tampone 5x; 25 mg di NADPH, 2 ml di substrato (HMG-CoA); 200 μ l di HMGR (dominio catalitico) 0,55-0,65 mg/ml, 200 μ l di soluzione dell'inibitore Pravastatina. Il kit è progettato in modo da seguire la diminuzione di assorbanza alla lunghezza d'onda di 340 nm che rappresenta l'ossidazione del NADPH ad opera della porzione catalitica di HMGR in presenza del substrato HMG-CoA ed eventualmente di un inibitore.

Il composto 1 già a concentrazioni di circa 300 μ mol/L mostra un'inibizione dell'80% dopo 8 minuti (grafico 1)

Pravastatina

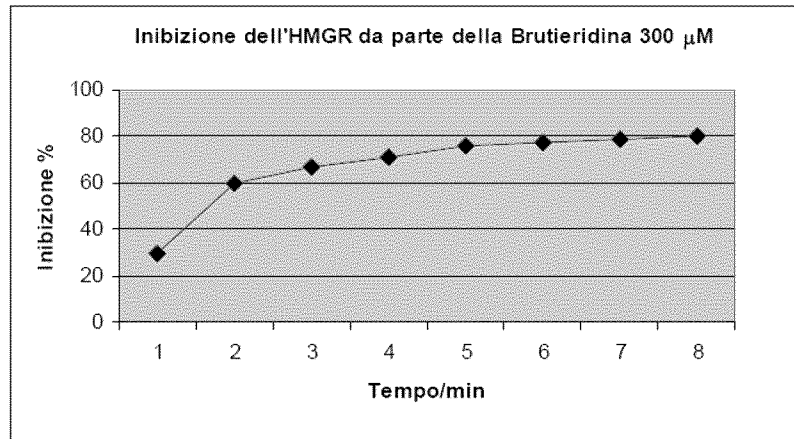


Grafico 1

Il composto 2 nelle stesse condizioni mostra un'inibizione del 75% dopo 8 minuti (grafico 2):

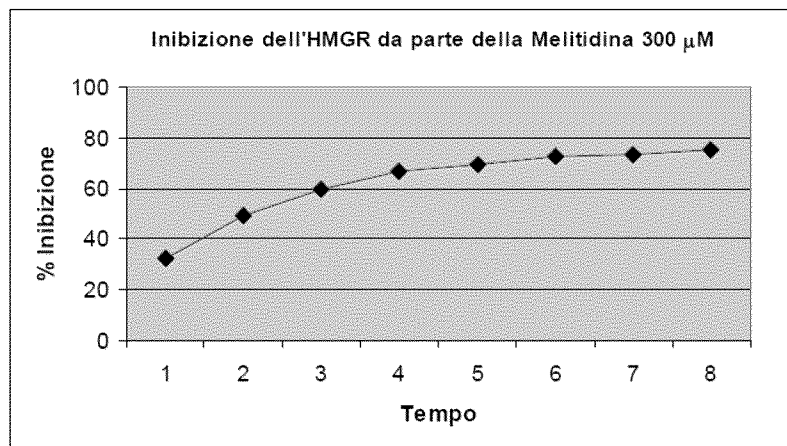


Grafico 2

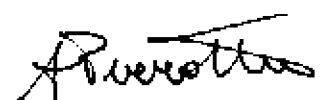
I risultati mostrano che tutte e due le molecole inibiscono l'attività dell'HMGR hanno una attività inibitoria simile, sebbene a concentrazioni molto maggiori di quelle delle statine utilizzate per combattere il colesterolo.

Riferimenti:

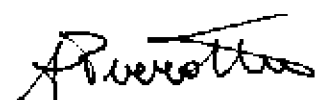
1. Lipkin, M., Uehara, K., Winawer, S., Sanchez, A., Aron, C., Phillips, R., Lynch, H.T., Blattner, W.A., and Fraumeni, J.F., Seventh-Day Adventist vegetarians have a quiescent proliferative activity in colonic mucosa, *Cancer*, 26, 139, 1985.
2. Steinmetz, K.A. and Potter, J.D., Vegetables, fruit and cancer. I. Epidemiology, *Cancer Causes Control*, 5, 325, 1991.

Arverat

3. Block, G., Patterson, B., and Subar, A., Fruit, ~~or~~ables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence, *Nutr. Cancer*, 18, 99, 1992.
4. Hertog, M.G., Bueno-de-Mesquita, H.B., Fehily, A., Sweetnam, P.M., Elwood, P.C., and Kromhout, D., Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 5, 619, 1996.
5. World Cancer Research Fund, Food, Nutrition and Prevention of Cancer: A Global Perspective, American Institute for Cancer Research, Washington DC, 1997.
6. Department of Health, Nutritional Aspects of the Development of Cancer, HMSO, London, 1998.
7. Wallstrom, P., Wirfalt, E., Janzon, L., Mattisson, Elmstahl, S., Johansson, U., and Berglund, G., Fruit and vegetable consumption in relation to risk factors for cancer: a report from the Malmo Diet and Cancer Study, *Public Health Nutr.*, 3, 263, 2000.
8. Babbs, C.F., Free radicals and the etiology of cancer, *Free Radical Biol. Med.*, 8, 191, 1990.
9. Guyton, K.Z. and Kensler, T.W., Oxidative mechanisms in carcinogenesis, *Br. Med. Bull.*, 49, 523, 1993.
10. Goldstein, B.D. and Witz, G., Free radicals in carcinogenesis, *Free Radical Res. Commun.*, 11, 3, 1990.
11. Steinmetz, K.A. and Potter, J.D., Vegetables, fruit and cancer. II. Mechanisms, *Cancer Causes Control*, 5, 427, 1991.
12. Wattenberg, L.W., Chemoprevention of cancer, *Cancer Res.*, 45, 1, 1985.
13. Wattenberg, L.W., Inhibition of carcinogenesis by natural nutrient constituents of the diet., *Proc. Nutr. Soc.*, 49, 173, 1990.
14. Weisburger, J.H., Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants and carotenoids, *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 226S, 1991. Andersen and Markham / Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications #2021_c006 Final Proof page 344 8.9.2005 8:53pm 344 Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications
15. Wattenberg, L.W., Inhibition of carcinogenesis by natural dietary constituents, *Cancer Res.*, 52, 2085, 1992.
16. Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., and Maatela, J., Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study, *Br. Med. J.*, 312, 478, 1996.
17. Keli, S.O., Hertog, M.G., Feskens, E.J., and Kromhout, D., Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen Study, *Arch. Intern. Med.*, 156, 637, 1996.



18. Yochum, L., Kushi, L.H., Meyer, K., and Folsom, A.R., Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women, *J. Epidemiol.*, 149, 943, 1999.
- Andersen and Markham / Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications
#2021_c006 Final Proof page 345 8.9.2005 8:53pm
19. Hirvonen, T., Pietinen, P., Virtanen, M., Ovaskainen, M.L., Hakkinen, S., Albanes, D., and Virtamo, J., Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers, *Epidemiology*, 12, 62, 2001.
20. Mennen, L.I., Sapinho, D., de Bree, A., Arnault, N., Bertrais, S., Galan, P., and Hercberg, S., Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreased cardiovascular risk in apparently healthy French women, *J. Nutr.*, 134, 920, 2004.
21. Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Heliövaara, E., Teppo, L., Pukkala, E., and Aromaa, A., Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms, *Am. J. Epidemiol.*, 146, 223, 1997.
22. Garcia-Closas, R., Gonzalez, C.A., Agudo, A., and Riboli, E., Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain, *Cancer Causes Control*, 10, 71, 1999.
23. Birt, D.F., Hendrich, S., and Wang, W., Dietary polyphenols in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids, *Pharmacol. Ther.*, 90, 157, 2001.
24. Hirvonen, T., Virtamo, J., Korhonen, P., Albanes, D., and Pietinen, P., Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland), *Cancer Causes Control*, 12, 789, 2001.
25. Arts, I.C., Jacobs, D.R., Gross, M., Harnack, L., and Folsom, A.R., Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Women's Health Study (United States), *Cancer Causes Control*, 13, 373, 2002.
26. Sun, C.L., Yuan, J.M., Lee, M.J., Yang, C.S., Gao, J., Ross, R.K., and Yu, M.C., Urinary tea polyphenols in relation to gastric and esophageal cancers: a prospective study of men in Shanghai, China, *Carcinogenesis*, 23, 1497, 2002.



Rivendicazioni

1. Molecola naturale estratta da un agrume caratterizzata dal fatto che la sua struttura è un flavonoide coniugato all'acido 3-idrossi-3-metilglutarile
2. Molecola naturale estratta da un agrume secondo rivendicazione 1 caratterizzata dal fatto che l'agrume è il bergamotto.
3. Molecola naturale estratta da un agrume secondo rivendicazione 1 o 2 caratterizzata dal fatto che il flavonoide è coniugato con l'acido 3-idrossi-3-metilglutarile attraverso un legame estereo sulla porzione zuccherina della mole
4. Molecola naturale estratta da un agrume secondo rivendicazione 1 o 2 o 3 caratterizzata dal fatto che il flavonoide è la neoesperidina.
5. Molecola naturale estratta da un agrume secondo rivendicazione 1 o 2 o 3 caratterizzata dal fatto che il flavonoide è la naringina.
6. Processo di estrazione di una molecola naturale da un agrume secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui:
 - l'estrazione delle parti del frutto triturate viene eseguita in un solvente costituito da metanolo, etanolo e cloroformio puri od in diverse porzioni per un tempo determinato
 - il filtrato è evaporato a secchezza
 - il residuo viene sottoposto ad estrazione in fase solida per purificare i flavonoidi dalle altre classi di composti.
 - La miscela di flavonoidi viene separata attraverso un sistema cromatografico HPLC preparativo.
7. Processo di estrazione di una molecola naturale da un agrume secondo la rivendicazione 6 in cui il solvente è costituito dalla miscela ternaria di metanolo, etanolo e cloroformio in rapporto volumetrico 65/5/30.
8. Processo di estrazione di una molecola naturale da un agrume secondo la rivendicazione 6 in cui la miscela di flavonoidi viene separata attraverso un sistema cromatografico MPLC.
9. Uso farmaceutico di una molecola naturale estratta da un agrume secondo le rivendicazioni 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 come farmaco anti-colesterolemico.

