

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

DOMANDA NUMERO	**102006901446994**
Data Deposito	**12/09/2006**
Data Pubblicazione	**12/03/2008**

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE DI ACIDI COLANICI

7811 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

FM/mc **"PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE DI ACIDI COLANICI"**

a nome : **DIPHARMA S.p.A.**

con sede in: Mereto di Tomba (Udine)

* * *

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda un nuovo procedimento per l'isolamento di acidi colanici ad elevata purezza, in particolare acido chenodesossicolico ed iodesossicolico, dalla bile suina. Tali acidi sono utili sia come principi farmaceutici biologicamente attivi che come intermedi per la preparazione di principi farmaceutici.

STATO DELLA TECNICA

Sono noti vari processi di preparazione di iodesossicolico e chenodesossicolico a partire da bile suina, ad esempio quelli descritti in US 2.758.120, US 3.006.927 ed US 5.349.074. I metodi fino ad ora noti sono però laboriosi e dunque poco applicabili su scala industriale, oppure non permettono di ottenere i prodotti desiderati con un grado di purezza sufficiente a renderli utilizzabili come tali in terapia o come intermedi nella preparazione di altri principi attivi farmaceutici quali, ad esempio, l'acido ursodesossicolico.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

È stato trovato un nuovo processo per la separazione di acidi colanici, in particolare acido chenodesossicolico ed iodesossicolico, dalla bile suina comprendente:

a) l'idrolisi della bile con un idrossido alcalino;

b) l'isolamento di una miscela grezza di sali di acidi colanici;

c) la separazione di questi mediante cromatografia; e

d) il recupero degli acidi in forma purificata.

Il nuovo procedimento consente con operazioni semplici e tutte applicabili su scala industriale di recuperare gli acidi colanici di interesse, in particolare l'acido iodesossicolico e l'acido chenodesossicolico, ad elevato grado di purezza così da renderli utilizzabili sia come principi attivi farmaceutici che come intermedi per la preparazione di altri principi attivi farmaceutici.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Oggetto dell'invenzione è un procedimento per la preparazione di acidi biliari, in particolare acido iodesossicolico e acido chenodesossicolico, ad elevato grado di purezza, comprendente:

a) l'idrolisi della bile con un idrossido alcalino;

b) l'isolamento della miscela grezza di sali di acidi colanici;

c) la separazione di questi mediante cromatografia; e

d) il recupero degli acidi in forma purificata.

La materia prima impiegata è la bile suina. Questa, che può avere un contenuto di acqua compreso tra il 10 e l'80%, contiene gli acidi colanici, in particolare gli acidi iodesossicolico, chenodesossicolico e iocolico sotto forma di coniugati taurinici. Alternativamente, può essere utilizzata bile suina concentrata, che viene poi diluita così che il contenuto totale di solidi (circa da 11% a 12%) sia simile a quelle della bile fresca.

L'idrolisi degli acidi colanici può essere effettuata per trattamento con idrossido alcalino, tipicamente di sodio o di potassio, preferibilmente di sodio. La quantità di idrossido impiegata è compresa tra circa il 5% ed il 20% del peso della bile, preferibilmente tra circa l'8% ed il 12%.

La saponificazione viene condotta scaldando la miscela a riflusso per un tempo compreso 10 ore e 30 ore, preferibilmente tra 18 ore e 22 ore.

L'isolamento della miscela grezza degli acidi colanici, sotto forma del corrispondente sale alcalino, può essere effettuato mediante estrazioni successive, tipicamente due, con solvente a pH controllato. In particolare, la miscela viene acidificata a pH compreso tra circa 3 e 6, preferibilmente tra 4 e 5, con un acido minerale, ad esempio acido cloridrico, e quindi estratta con un solvente non miscibile con l'acqua, tipicamente un solvente estereo, ad esempio etile acetato, butile acetato o isopropile acetato, preferibilmente etile acetato. La fase organica contenente i prodotti sotto forma di acidi liberi ed alcuni sottoprodotti viene poi trattata con acqua e la miscela viene basificata ad un pH compreso tra circa 9 e 13, preferibilmente tra circa 10 e 12, per aggiunta di una soluzione di sodio idrossido. La miscela degli acidi colanici, sotto forma del corrispondente sale sodico, viene quindi estratta in fase acquosa mentre i sottoprodotti rimangono nella fase organica. La fase acquosa viene separata e impiegata come tale nello stadio successivo.

La separazione degli acidi colanici, cioè acido iodesossicolico e acido chenodesossicolico, in forma salificata può essere effettuata con metodi cromatografici, ad esempio per eluizione su una colonna contenente una fase stazionaria. Tale fase stazionaria può essere ad esempio una resina a scambio ionico, ad esempio una resina cationica forte, cationica debole, anionica forte, anionica debole, oppure una resina adsorbente, quale ad esempio Amberlite ®, Polyclar®, Sephadex®, una resina DIAION®, in particolare la DIAION ® HP 20 SS. La fase mobile può essere l'acqua, un alcanolo C_1-C_6, preferibilmente metanolo, o loro miscele. L'eluizione può essere isocratica o in gradiente,

preferibilmente è in gradiente acqua-metanolo, partendo dal 100% di acqua ed arrivando al 100% di metanolo. In questo modo si ricuperano frazioni contenenti il sale sodico acido dell'acido chenodesossicolico puro e frazioni contenenti una miscela del sale sodico dell'acido iodesossicolico e dell'acido iocolico.

L'acido chenodesossicolico e l'acido iodesossicolico ad elevato grado di purezza possono essere recuperati dalle rispettive frazioni come qui di seguito riportato.

Per quanto riguarda l'acido chenodesossicolico, le frazioni vengono trattate con una quantità di acido organico carbossilico, ad esempio acido acetico, sufficiente a sbloccare il sale sodico ed evaporate a residuo. Il residuo viene trattato a caldo, tipicamente ad una temperatura variante da circa 30 a 60°C, preferibilmente da 45 a 55°C, con una miscela di solventi in grado di sciogliere a caldo l'acido chenodesossicolico, ad esempio una miscela di etile acetato e toluene in rapporto compreso tra circa 1:1 e 1:10, preferibilmente circa 1:5. Il materiale che non si scioglie a caldo viene rimosso per filtrazione e la soluzione così ottenuta viene raffreddata ad ottenere la cristallizzazione dell'acido chenodesossicolico con una purezza uguale o superiore al 99%.

Per quanto riguarda l'acido iodesossicolico, le frazioni vengono evaporate a residuo. Il residuo viene disciolto in acqua, basificato a pH > 12 con potassio idrossido, tipicamente intorno al 90%, e trattato a caldo, ad una temperatura variante da circa 30 a 60°C, preferibilmente da 45 a 55°C, con una soluzione di magnesio solfato. Si forma il sale di magnesio dell'acido iodesossicolico che per raffreddamento cristallizza e precipita dalla soluzione. Il prodotto viene ricuperato per filtrazione, sospeso in acqua. La miscela viene acidificata ad un pH di circa 2, quindi trattata a caldo, tipicamente ad una temperatura variante da circa 30 a 60°C,

preferibilmente da 45 a 55°C, con un solvente in grado di sciogliere a caldo l'acido iodesossicolico, ad esempio etile acetato. La fase organica così ottenuta viene separata e raffreddata per permettere la cristallizzazione dell'acido iodesossicolico con una purezza uguale o superiore al 99%.

L'invenzione fornisce quindi un metodo per l'ottenimento e la purificazione di acidi biliari, in particolare acido iodesossicolico e acido chenodesossicolico, così che questi possono essere ottenuti con elevato grado di purezza, tipicamente uguale o maggiore del 99%, in particolare uguale o maggiore del 99,9%.

L'acido chenodesossicolico così ottenuto può essere utilizzato come tale in terapia, oppure analogamente all'acido iodesossicolico può essere convertito in accordo a metodi noti nell'acido ursodesossicolico, pure utilizzato in terapia.

Esempio

1000 g di bile suina vengono scaldati a riflusso per 20 ore con 100 g di idrossido di sodio. La miscela viene raffreddata fino a temperatura di 70°C e vengono aggiunti 240 g di acetato di etile e 6 g di perossido di idrogeno. Si forma una miscela di colore verde chiaro che viene acidificata con 130 g di acido cloridrico al 37% fino ad ottenere un pH 4-5. Viene effettuata la separazione delle due fasi. Alla fase organica vengono aggiunti 140 g di acqua e la soluzione viene basificata con 67 g di idrossido di sodio al 35% fino a pH 11.

Si separa la fase acquosa dalla fase organica mediante imbuto separatore. La fase acquosa contenente gli acidi colanici salificati viene eluita su resina DIAION® HP 20SS, impiegando un gradiente di solventi per ottenere la separazione (acqua - acqua\metanolo - metanolo).

L'eluizione su resina permette la completa separazione del sale sodico

dell'acido chenodeossicolico da una miscela contenente il sale sodico degli acidi iocolico e iodeossicolico.

Le frazioni contenenti il sale dell'acido chenodeossicolico, vengono riunite, trattate con una quantità di acido acetico sufficiente per sbloccare il sale sodico ed evaporate a residuo. Il solido così ottenuto viene quindi sciolto in una miscela di acetato di etile e toluene 1 a 5. Il residuo insolubile a caldo viene rimosso per filtrazione e la soluzione ottenuta viene raffreddata per promuovere la cristallizzazione del prodotto. Si forma un precipitato che viene filtrato ed essiccato sottovuoto. Si ottengono 20 g di acido chenodeossicolico con una purezza HPLC del 99,9%.

Le frazioni contenenti la miscela del sale sodico degli acidi iodeossicolico ed acido iocolico vengono evaporate a pressione ridotta, Il residuo viene ripreso in 500 g di acqua, posto in agitazione meccanica e scaldato fino ad avere una temperatura interna di 50°C. Viene aggiunta una soluzione di idrossido di potassio al 90% fino ad ottenere un pH 12.

Si gocciola quindi una soluzione acquosa di magnesio solfato. La soluzione viene raffreddata, si forma un precipitato che viene filtrato ed essiccato a 50-60°C sottovuoto. Il precipitato risulta essere acido iodeossicolico sale di magnesio. L'acido iodeossicolico sale di magnesio viene caricato in un reattore insieme a 200 g di acqua e 600 g di acetato di etile e la miscela viene scaldata fino ad ottenere una temperatura interna di 55°C.

Viene aggiunto acido solforico al 35% fino ad ottenere un pH 2. Si separano le fasi, e la fase organica viene raffreddata a 0/-5°C. Si forma un precipitato bianco che viene filtrato ed essiccato a 50°C sottovuoto. Si ottengono 24 g acido iodeossicolico con una purezza HPLC del 99,9%.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la preparazione di acido iodesossicolico e acido chenodesossicolico, ad elevato grado di purezza, comprendente:

a) l'idrolisi della bile con un idrossido alcalino;

b) l'isolamento della miscela grezza di sali di acidi colanici;

c) la separazione di questi mediante cromatografia; e

d) il recupero degli acidi in forma purificata.

2. Procedimento in accordo alla rivendicazione 1, dove l'isolamento della miscela grezza di sali di acidi colanici è effettuata mediante estrazioni successive a pH controllato.

3. Procedimento in accordo alla rivendicazione 2, dove in una prima estrazione la miscela viene acidificata a pH compreso tra circa 3 e 6.

4. Procedimento in accordo alla rivendicazione 3, dove l'estrazione è effettuata con solvente non miscibile con l'acqua.

5. Procedimento in accordo alla rivendicazione 4, dove il solvente è un solvente estereo.

6. Procedimento in accordo alla rivendicazione 5, dove il solvente è scelto tra etile acetato, butile acetato e isopropile acetato.

7. Procedimento in accordo alla rivendicazione 2, dove in una successiva estrazione la miscela degli acidi colanici, sotto forma del corrispondente sale sodico, è estratta in fase acquosa.

8. Procedimento in accordo alla rivendicazione 1, dove la separazione cromatografia è condotta per eluizione su colonna contente una fase stazionaria.

9. Procedimento in accordo alla rivendicazione 8, dove la fase stazionaria

è una resina a scambio ionico oppure una resina adsorbente.

10. Procedimento in accordo alla rivendicazione 8, dove la resina adsorbente è scelta tra Amberlite ®, Polyclar®, Sephadex® ed una resina DIAION®.

11. Procedimento in accordo alla rivendicazione 10, dove la resina DIAION® è la DIAION ® HP 20 SS.

12. Procedimento in accordo alla rivendicazione 1, dove la fase mobile è acqua, un alcanolo C_1-C_6 o loro miscele.

13. Procedimento in accordo alla rivendicazione 12, dove l'eluizione è in gradiente acqua-metanolo.

14. Procedimento in accordo alla rivendicazione 13, dove l'eluizione è attuata partendo dal 100% di acqua ed arrivando al 100% di metanolo.

15. Procedimento in accordo alla rivendicazione 1, dove il recupero dell'acido chenodeossicolco è condotto con un procedimento comprendente il trattamento con un acido carbossilico, trattamento a caldo con una miscela di solventi in grado di scigliere l'acido chenodeossicolco e sua cristallizzazione.

16. Procedimento in accordo alla rivendicazione 15, dove l'acido è l'acido acetico.

17. Procedimento in accordo alla rivendicazione 15, dove la miscela di solventi è formata da etile acetato e toluene.

18. Procedimento in accordo alla rivendicazione 1, dove il recupero dell'acido iodesossicolico comprendente la formazione del suo sale di magnesio, trattamento a caldo con un solvente in grado di sciogliere l'acido iodesossicolico e sua cristallizzazione.

19. Procedimento in accordo alla rivendicazione 18, dove il solvente è etile

acetato.

20. Procedimento in accordo alle rivendicazioni 15 o 18, dove il trattamento a caldo è condotto ad una temperatura variante da circa 30 a 60°C.

21. Procedimento per la preparazione di acido iodesossicolico e acido chenodesossicolico con un grado di purezza uguale o maggiore del 99%, dove il procedimento è condotto in accordo a ciascuna delle precedenti rivendicazioni.

Milano, 12 settembre 2006