

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000032252
Data Deposito	22/12/2021
Data Pubblicazione	22/06/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	685

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	25	24

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	25	28

Titolo

Processo di estrazione e purificazione industriale di fosfolipidi

“Processo di estrazione e purificazione industriale di fosfolipidi”

OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive e rivendica un nuovo processo di estrazione e purificazione industriale di fosfolipidi da cervello animale, particolarmente puri e con un alto contenuto percentuale di fosfatidilserina (PS) e fosfatidilcolina (PC), soprattutto arricchiti in PS, e l'uso di tali fosfolipidi nel trattamento della patologia definita del “Long-Covid”.

CAMPO DELL'INVENZIONE

I fosfolipidi rappresentano una classe di lipidi che contiene fosfato, sono molecole anfipatiche in quanto presentano una testa polare idrofila e una coda apolare idrofoba, e sono i principali costituenti delle membrane cellulari animali e vegetali. Si possono generalmente dividere in sfingofosfolipidi e glicerofosfolipidi (o fosfogliceridi), quest'ultimi derivati dall'*sn*-glicerolo-3-fosfato nel quale il glicerolo (CH₂OH-CHOH-CH₂OH) è esterificato in posizione 3 con acido ortofosforico (H₃PO₄) e in posizione 2 con un acido grasso, mentre in posizione 1 possono essere legati classi differenti di composti.

Si parla poi della classe dei diacil-fosfolipidi quando il glicerolo è esterificato in posizione 1 e in posizione 2 con acidi grassi e in posizione 3 con acido ortofosforico. Nei fosfolipidi di membrana si trovano due tipi di acidi grassi: quelli saturi in cui tutti gli atomi di carbonio sono saturi, e quelli insaturi nei quali sono presenti uno o più doppi legami; l'acido grasso in posizione 2 dei diacil-fosfogliceridi delle membrane cellulari è usualmente insaturo.

L'acido ortofosforico presenta, in aggiunta alla esterificazione con il glicerolo (che porta alla formazione dell'acido fosfatidico), una seconda esterificazione con un alcol (un amminoalcol o un amminoacido con gruppo alcolico o uno zucchero), di conseguenza i diacil-fosfolipidi vengono indicati con il prefisso fosfatidil- cui segue il nome del composto esterificato con il gruppo fosfato (per esempio fosfatidilserina dove la serina è il composto esterificato con il gruppo fosfato).

I fosfolipidi rappresentano circa il 70-80% del peso lipidico delle membrane cellulari, e i principali sono: la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina e la sfingomieline, che complessivamente costituiscono oltre il 50% di tutti i lipidi di membrana. Il fosfatidilinositolo è invece un
5 fosfolipide presente in minor quantità che svolge tuttavia un ruolo cruciale nella genesi dei segnali intracellulari.

Gli sfingofosfolipidi contengono un amminoalcol a lunga catena al posto del glicerolo: nella sfingosina (C18) il gruppo amminico è legato con legame ammidico al gruppo carbossilico di un acido grasso (formando un composto
10 chiamato ceramide), mentre il gruppo ossidrilico è unito con legame estereo all'ortofosfato, a sua volta esterificato con un amminoalcol, generalmente la colina, formando così un composto chiamato sfingomieline o ceramide-1-fosforilcolina; quando la ceramide è invece legata tramite il gruppo ossidrilico a un monosaccaride si ottiene un cerebroside, se la ceramide è legata tramite il gruppo ossidrilico a un
15 oligosaccaride si forma un ganglioside, entrambi gligolipidi privi di fosforo.

La fosfatidilcolina PC è il maggior fosfolipide delle cellule eucariotiche comprendendo dal 40 al 50% dei fosfolipidi di membrana: importante molecola per la proliferazione e divisione cellulare, rappresenta la principale fonte di colina per i neuroni colinergici che la utilizzano nella sintesi del neurotrasmettitore
20 acetilcolina; quando la domanda di colina supera il turnover di ri-sintesi della fosfatidilcolina, la composizione delle membrane neuronali può andare incontro a cambiamenti tali da intaccare negativamente l'integrità delle stesse e quindi la vitalità dei neuroni coinvolti. L'acetilcolina è il neurotrasmettitore che media funzioni neuronali importanti quali la respirazione, la contrazione muscolare, il
25 ritmo cardiaco, la memoria a breve termine, e la maggior parte dei neuroni pre-gangliari del sistema Simpatico e Parasimpatico, nonché i motoneuroni, usa questo neurotrasmettitore.

La fosfatidiletanolamina (PE) rappresenta dal 20 al 50% dei fosfolipidi di membrana dei mammiferi, ma rappresenta circa il 30-45% dei fosfolipidi cerebrali,

mentre la fosfatidilserina è, al contrario, uno dei fosfolipidi di più bassa concentrazione, presente solo per il 2-10% dei fosfolipidi totali (Vance JE.; Journal of Lipid Research; 2008; 49:1377-1387). La fosfatidiletanolamina si trova in particolare nella sostanza bianca del tessuto nervoso cerebrale, nei nervi e nel
5 midollo spinale, dove partecipa alla fusione della membrana durante la citochinesi della divisione cellulare; la PE è, inoltre, un importante precursore/substrato in molti e diversi processi biochimici e fisiologici cellulari dei mammiferi.

La fosfatidilserina PS è il principale fosfolipide acido di membrana, capace di influenzare la stabilità, la fluidità e l'organizzazione delle membrane cellulari, è
10 prevalentemente distribuito nella parte interna delle membrane plasmatiche dove interagisce con gli elementi citoplasmatici, risultando capace di attivare due importanti enzimi cellulari quali la sodio/potassio *ATPase* e la *protein kinasi C*.

La fosfatidilserina è forse il fosfolipide maggiormente studiato per la sua dimostrata capacità sia di stimolare il rilascio di dopamina dalle terminazioni dopaminergiche dello striato, sia di attivare l'enzima adenilato-ciclastasi dei neuroni ipotalamici, ma
15 soprattutto di prevenire la perdita delle spine dendritiche dei neuroni piramidali ippocampali legata all'invecchiamento cerebrale (Advances in Behavioral Biology; Lecithin Ed. by Hanin I. and Ansell GB.; vol.33; 1987).

Per tutti i sopraelencati motivi, la PS è stata oggetto di molteplici trials clinici nella
20 valutazione della prevenzione e/o terapia del decadimento cognitivo dell'anziano e/o del paziente malato di Alzheimer e dei disturbi depressivi in generale (Cenacchi T. et al.; Aging Clin Exp Res; 1993; 5:123-133; Biggio G. et al.; Minerva Psichiatrica; 2018; 59(1):1-10). È stato inoltre dimostrato come la fosfatidilserina può contrastare l'aumento dell'ormone cortisolo in soggetti sottoposti a stress
25 facilitando il loro recupero funzionale (Monteleone P. et al.; Neuroendocrinology; 1990; 52(3):243-8).

Generalmente i fosfolipidi animali sono estratti dalle membrane mediante l'uso di solventi o miscele di solventi, tra i quali in modo particolare il cloroformio, solvente di riconosciuta cancerogenicità, con successiva purificazione mediante

cromatografia su gel di silice (SU1,102,603; EP638083; US20120116104;); tale solvente è ampiamente usato anche nella purificazione dei gangliosidi da cui i fosfolipidi sono eliminati per partizionamento in cloroformio-metanolo (EP0150712), o per saponificazione (EP3095451).

- 5 Si sente quindi la necessità di un procedimento industriale di estrazione e purificazione dei suddetti fosfolipidi da tessuto cerebrale animale in cui non siano utilizzati solventi quali il cloroformio, per arrivare a un prodotto fosfolipidico finale privo di residui di solventi, di componenti proteiche e di contaminanti quali in modo particolare virus, e di facile attuazione poiché non richiede l'uso di processi
10 cromatografici con gel di silice.

Scopo della presente invenzione è quello di individuare un processo di estrazione e purificazione di fosfolipidi animali che superi gli inconvenienti dello stato dell'arte, soddisfi tutti i requisiti sopra elencati, e soprattutto porti alla preparazione di fosfolipidi finali arricchiti in PS.

- 15 Oggetto del presente brevetto è quindi un innovativo processo di estrazione e purificazione di fosfolipidi animali come rivendicato nella rivendicazione 1.

Tale processo soddisfa tutti i requisiti sopra elencati e soprattutto porta alla preparazione di fosfolipidi finali arricchiti in PS, poiché il rapporto finale PS/PC ottenuto al termine delle fasi di estrazione e purificazione dei fosfolipidi oggetto
20 dell'invenzione, è compreso tra 0,5-2, preferibilmente compreso tra 0,8-1,6, risultando quindi modificato in modo radicale rispetto al rapporto iniziale di PS/PC delle originali membrane dei tessuti animali da cui tali fosfolipidi vengono estratti e purificati, come in precedenza definito.

Con questo innovativo procedimento la Richiedente ha a disposizione un preparato
25 fosfolipidico di maggior efficacia nel trattamento di tutte quelle condizioni patologiche che richiedono la somministrazione di alte concentrazioni di PS/PC, in modo particolare di PS, quali la prevenzione/cura di problematiche d'origine neuroendocrina come, ad esempio, la demenza e/o il decadimento cognitivo degli anziani, e i disturbi depressivi in generale.

Ulteriore oggetto della presente invenzione sono quindi i fosfolipidi per l'uso nel trattamento della patologia definita come "Long-Covid o Post-Covid", preferibilmente i fosfolipidi arricchiti in PS ottenuti secondo il procedimento di estrazione e purificazione oggetto della presente invenzione per l'uso nel

5 trattamento della patologia definita come "Long-Covid o Post-Covid".

La malattia del Long-Covid colpisce con alta percentuale i pazienti guariti dal coronavirus Sars-CoV-2 e dalle patologie da esso causate, i quali purtroppo manifestano ancora evidenti conseguenze di tale infezione; tra i principali sintomi neurologici del Long-Covid troviamo l'anosmia e l'ageusia, la persistente

10 sensazione di fatica/astenia (intesa come la diminuzione fisica e/o mentale della *performance* del paziente), spesso il mal di testa, a volte manifestazioni psichiatriche gravi quali la psicosi, infine frequentemente si riscontra la cosiddetta "nebbia mentale", cioè uno stato di confusione mentale in cui il paziente guarito dal virus della Sars-CoV-2 non riesce a concentrarsi e ad avere il pieno controllo delle

15 sue facoltà mentali, quindi a condurre le normali attività quotidiane proprie della sua vita pre-Covid (Walitt B. et al.; Pain Reports; 2021; 6(1) 887).

L'uso dei fosfolipidi arricchiti in PS si inserisce quindi nel trattamento della patologia del Long-Covid per promuovere/ripristinare l'equilibrio psico-fisico del paziente e ridurre i sintomi di tale patologia, migliorando soprattutto la sua nebbia

20 mentale, non solo nell'adulto ma anche negli adolescenti.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La Richiedente rivendica un innovativo processo di estrazione e purificazione industriale di fosfolipidi da cervello animale (preferibilmente dalla zona ipotalamica), preferibilmente suino, che non contempla l'utilizzo di cloroformio e

25 di una fase di purificazione per cromatografia su gel di silice, che consente di ottenere un prodotto fosfolipidico finale particolarmente puro in quanto non contaminato da virus animali non convenzionali (soprattutto dai virus responsabili della encefalopatia spongiforme), privo di residui di solventi e di componenti proteiche, ad alto contenuto percentuale di PS e PC, ma arricchito soprattutto in PS,

in cui il rapporto finale PS/PC ottenuto al termine delle fasi di estrazione e purificazione varia da 0,5 a 2, preferibilmente da 0,8 a 1,6, risultando conseguentemente modificato in modo radicale rispetto al rapporto iniziale di PS/PC delle originali membrane dei tessuti animali da cui vengono estratti e
5 purificati tali fosfolipidi.

Il prodotto fosfolipidico ottenuto dall'innovativo processo oggetto dell'invenzione è costituito dai fosfolipidi Fosfatidiletanolamina PE, Acido Fosfatidico PA, Fosfatidilinositolo PI, Fosfatidilserina PS, Fosfatidilcolina PC, Sfingomieline SFM; il prodotto finale presenta solamente tracce di due glicosfingolipidi di membrana
10 quali il Cerebroside (glicolipide neutro) e il Sulfatide (glicolipide estere solfato), risultando inoltre privo di gangliosidi.

Ulteriore oggetto dell'invenzione sono le composizioni farmaceutiche comprendenti o consistenti in fosfolipidi arricchiti in PS ottenuti con il processo di estrazione e purificazione industriale di fosfolipidi da cervello animale di cui sopra,
15 e il loro uso nel trattamento di prevenzione/cura di problematiche d'origine neuroendocrina come, ad esempio, la demenza e/o il decadimento cognitivo degli anziani, e i disturbi depressivi in generale.

In tali composizioni farmaceutiche i fosfolipidi arricchiti in PS di cui sopra possono essere associati a farmaci e/o agenti farmacologicamente o biologicamente attivi
20 quali, ad esempio, steroidi, anti-infiammatori non steroidei, estratti naturali animali e/o vegetali e/o vitamine, preferibilmente vitamine del gruppo B.

Oggetto dell'invenzione sono anche i fosfolipidi e le relative composizioni farmaceutiche che comprendono o consistono in tali fosfolipidi, per l'uso nel trattamento della patologia definita "Long-Covid".

25 Particolarmente preferiti sono i fosfolipidi arricchiti in PS ottenuti con il processo di estrazione e purificazione industriale di fosfolipidi da cervello animale oggetto dell'invenzione (di cui sopra) per l'uso nel trattamento della patologia definita "Long-Covid", in quanto la Richiedente ha sorprendentemente scoperto, e di seguito dimostrato, che il trattamento con tali fosfolipidi migliora in modo

significativo, nonché risolve, i sintomi dei pazienti malati di Long-Covid.

La Richiedente di seguito descrive e rivendica il processo di estrazione e purificazione di fosfolipidi arricchiti in PS che comprende o consiste nelle seguenti fasi essenziali:

5 Estrazione, che comprende le seguenti fasi:

- a. macinare il cervello animale in toto;
- b. aggiungere al macinato una miscela di solventi comprendente acetone e metanolo;
- c. agitare e sedimentare;
- 10 d. separare l'estratto fosfolipidico grezzo umido sedimentato;

Purificazione intermedia che comprende le seguenti fasi:

- e. solubilizzare l'estratto fosfolipidico grezzo umido proveniente dalla fase d. con i sali NaCl e KCl, sedimentare, separare il sottonatante mediante filtrazione;
- 15 f. lavare il sottonatante ottenuto nella precedente fase e. con acqua purificata, sedimentare e separare il sottonatante;
- g. aggiungere acetone e CaCl₂ bi-idrato al sottonatante della fase f., agitare e sedimentare;
- h. filtrare il prodotto della fase g. mediante filtropressa per ottenere un primo
- 20 estratto fosfolipidico solido parzialmente purificato;

Purificazione finale che comprende le seguenti fasi:

- i. solubilizzare l'estratto fosfolipidico solido in solvente organico;
- j. aggiungere all'estratto della fase i. una soluzione comprendente EDTA, NaOH, KCl, e NaCl di pH 8,5-9, agitare e sedimentare;
- 25 k. separare il sottonatante della fase j., aggiungere acqua ed etanolo, agitare e sedimentare;
- l. separare il sottonatante della fase k. mediante filtrazione attraverso filtro con grado di filtrazione di 3µm e successivamente di 0,2 µm, agitare e sedimentare;

- m. lavare il sedimentato della fase l. con acetone;
- n. filtrare il prodotto della fase m. mediante filtropressa per ottenere l'estratto fosfolipidico solido purificato;
- o. trattare l'estratto finale della fase n. con azoto liquido, granulare ed essiccare a vuoto.

5

La Richiedente di seguito descrive e rivendica il processo di estrazione e purificazione di fosfolipidi arricchiti in PS che comprende o consiste nelle seguenti fasi di seguito ulteriormente dettagliate:

Estrazione che comprende le seguenti fasi:

- 10 con le fasi a-d si preparano estratti fosfolipidi grezzi umidi:
 - a. macinare il cervello animale in toto, preferibilmente la sua parte ipotalamica e/o la sua corteccia;
 - b. aggiungere al macinato della fase a. la miscela di solventi costituita da acetone/cloruro di metilene o altro solvente organico polare (SOP)/metanolo, in rapporto (Kg/L) (macinato) 1: (miscela) 1,5-3 p/v, preferibilmente 1:2,2 p/v, dove i solventi della suddetta miscela sono in rapporto tra loro di (acetone)1: (cloruro di metilene o altro SOP)1-2: (metanolo) 0,5-1 (v/v);
 - c. lasciare in agitazione per almeno 60 minuti a 30-35°C; sedimentare l'estratto per almeno 180 minuti a 30-35°C;
 - d. separare il sottonatante mediante sua filtrazione attraverso filtro con grado di filtrazione di 1µm, preferibilmente in polipropilene, eliminando il sopranatante;

15

20

Purificazione intermedia che comprende le seguenti fasi:

- 25 con le seguenti fasi si arricchisce l'estratto fosfolipidico in PS mediante l'utilizzo del CaCl₂ bi-idrato che facilita la sedimentazione di PS, si purificano gli estratti fosfolipidi da eventuali virus non convenzionali e/o eventuali pirogeni presenti nel derivato animale iniziale e, inoltre, si purifica l'estratto anche da proteine e gangliosidi, in quanto tali molecole vengono solubilizzate mediante l'aggiunta

- all'estratto grezzo dei sali NaCl e KCl, quindi separate ed eliminate dagli estratti fosfolipidici per ottenere un grezzo solido stoccabile a -20°C: in particolare, il primo estratto fosfolipidico solido parzialmente purificato ottenuto nella fase h. della purificazione intermedia, stoccabile a -20°C, consente di interrompere
5 eventualmente il procedimento al termine di tale fase h., della purificazione intermedia e di condurre in un tempo successivo la purificazione finale;
- e'. raffreddare a 0°C e solubilizzare l'estratto grezzo umido proveniente dalla fase d. mediante aggiunta di NaCl e KCl, preferibilmente in quantità uguale a 1-2 grammi (per tipo di sale)/Kg di macinato iniziale ottenuto nella fase a.
10 e in rapporto tra loro 1:1 p/p, agitare per almeno 30 minuti;
- e''. sedimentare l'estratto e separare il sottonatante mediante sua filtrazione attraverso filtro con grado di filtrazione di 1µm, preferibilmente in polipropilene, eliminando il sopranatante;
- f. aggiungere acqua purificata al sottonatante della fase e''. per almeno il 10%
15 del suo volume, lasciare in agitazione per almeno 30 minuti, sedimentare per almeno 60 minuti, separare il sottonatante ed eliminare il sopranatante;
- g'. abbassare la temperatura a 0°C: aggiungere all'estratto della fase f. acetone, preferibilmente 1L/L di estratto, e CaCl₂ bi-idrato, preferibilmente 1-2 grammi/L di estratto, agitare e sedimentare per almeno 30 minuti, eliminare
20 il sopranatante;
- g''. aggiungere acetone al sottonatante della fase g', preferibilmente 0,1-0,2 L/L di sottonatante, agitare e sedimentare; questa fase di lavaggio potendo essere ripetuta ed essendo effettuata a 10°C;
- h. filtrare il prodotto del punto g''. mediante filtropressa preferibilmente con
25 filtro/telo in polipropilene (eliminando il sopranatante) per ottenere un primo estratto fosfolipidico solido parzialmente purificato, stoccabile a -20°C;

Purificazione finale che comprende le seguenti fasi:

con le seguenti fasi l'estratto è reso estremamente fine, solubile e filtrabile mediante

filtri 0,2 µm che assicurano la sterilità batterica:

- i. solubilizzare l'estratto fosfolipidico solido ottenuto al termine della fase h. in metilene cloruro o altro SOP, preferibilmente in rapporto 100-150 grammi di estratto/L di solvente, lasciare in agitazione per almeno 60 minuti a 21-25°C;
5
- j. aggiungere all'estratto proveniente dalla fase i. la soluzione comprendente EDTA 110-130 Grammi/L, NaOH 7-9 Grammi/L, KCl 27-30 Grammi/L, NaCl 22-25 Grammi/L, preparata in acqua purificata e con un pH finale compreso tra 8,5-9, in quantità percentuale compresa tra il 21-24% rispetto al volume dell'estratto ottenuto al termine della fase i., e successivamente etanolo in quantità percentuale compresa tra il 16-20% sempre rispetto al volume dell'estratto ottenuto al termine della fase i., agitare per almeno 60 minuti e sedimentare per almeno 12 ore;
10
- k. separare il sottonatante ed eliminare il sopranatante; aggiungere acqua purificata al 10% ed etanolo all'1% del volume del sottonatante, agitare per almeno 60 minuti e sedimentare per almeno 12 ore;
15
- l. separare il sottonatante dal sopranatante (eliminato) mediante filtrazione attraverso filtro con grado di filtrazione di 3µm, preferibilmente in polipropilene, successivamente di 0,2µm, preferibilmente di politetrafluoroetilene, agitare e sedimentare, separare il sottonatante eliminando il sopranatante;
20
- m. aggiungere acetone al sedimentato ottenuto al termine della fase l., preferibilmente 0,5L/L di sottonatante, agitare per almeno 30 minuti alla temperatura di 10°C, sedimentare il precipitato fosfolipidico ed eliminare il sopranatante per sifonamento; questa operazione potendo essere ripetuta più volte;
25
- n. filtrare il prodotto ottenuto al termine della fase m. mediante filtropressa preferibilmente con filtro/telo in polipropilene (eliminando il sopranatante) per ottenere l'estratto fosfolipidico solido purificato;

- o. trattare l'estratto finale proveniente dalla fase n. con azoto liquido, granulare ed essiccare a 40°C con vuoto $\leq 0,5$ mbar.

Per evitare l'ossidazione dei fosfolipidi (come noto all'esperto), nella parte iniziale del processo di cui sopra, l'estratto grezzo fosfolipidico può essere
5 convenientemente addizionato con un antiossidante (ad esempio Oxydex® LM).
I fosfolipidi sono stati poi analizzati per la loro identificazione mediante cromatografia TLC colorata con ninidrina e/o con solfato di rame come noto all'esperto (Bitman J. & Wood DL.; Journal of Liquid Chromatography; 1982; 5:1155-1162), sono stati quindi eseguiti i test necessari alla determinazione della
10 loro purezza da biocontaminanti (sono effettuati tutti i controlli microbiologici richiesti per prodotti iniettabili secondo *Ph. Eur.* corrente) e pirogeni (*Pyrogen Test*, *Ph. Eur.* 2.6.8.), da proteine (Lowry et al.; J. Biol. Chem; 1951; 193(1):265-275) e da residui di solventi (mediante determinazione gascromatografica con la tecnica dello spazio di testa vs soluzione di riferimento, come noto all'esperto).
15 Sono poi stati preparati nella forma farmaceutica scelta con l'opportuna eccipientistica come noto all'esperto.
Per gli usi precedentemente descritti, è preferibile la composizione farmaceutica in forma iniettabile.

Esempio 1

20 Preparazione industriale di fosfolipidi arricchiti in PS da cervello suino

Sono stati pesati e macinati 2300Kg di cervello suino *in toto*, quindi è stata attuata la fase di estrazione, in particolare nel suo punto b. al macinato di cui sopra è stata aggiunta la miscela di solventi costituita da acetone/cloruro di metilene/metanolo, in rapporto macinato/miscela pari a 1:2,2 p/v, dove i solventi erano in rapporto tra
25 loro di 1:1,4:0,6 (v/v); il processo è quindi avanzato con le fasi successive descritte per arrivare alla purificazione intermedia:
fase e.: al grezzo umido della fase precedente sono stati aggiunti i sali NaCl e KCl in quantità pari a 1,5 g/Kg di macinato iniziale; il processo è quindi avanzato con le fasi successive f.-h. in cui è stato aggiunto CaCl₂ bi-idrato in quantità pari a 1,6

g/L di estratto; si è poi continuato con la fase g. in cui sono stati aggiunti 0,1L di acetone per L di sottonatante prodotto, il procedimento è quindi avanzato con la fase h., filtrando il prodotto mediante filtropressa con filtro in polipropilene ottenendo il grezzo fosfolipidico solido.

5 Purificazione finale:

Fase i.: l'estratto grezzo solido è stato solubilizzato con metilene cloruro in rapporto 125g/L di solvente; fase j.: la soluzione della fase j. è stata preparata con 122g/L di EDTA, 8g/L di NaOH, 29g/L di KCl, e 23g di NaCl/L di pH=8,5, tale soluzione è stata poi aggiunta all'estratto ottenuto nella fase i. a. in quantità del 23% rispetto al
10 suo volume, poi è stato aggiunto etanolo in quantità uguale al 18%; quindi il processo di purificazione è avanzato fino all'essiccazione a 40°C con vuoto $\leq 0,5$ mbar.

Risultato:

Identificazione: i fosfolipidi sono stati identificati tramite TCL (cromatografia su
15 strato sottile) colorata con solfato di rame, è stato quindi possibile confrontare fra loro i fosfolipidi presenti attraverso i loro **RF** (Fattori di Ritardo), i.e. in base al rapporto tra la distanza percorsa dal fosfolipide e la distanza percorsa dal solvente, e nell'ordine (dal basso) sono risultati essere: SFM, PC, PS, PI, PA e PE, con tracce di cerebrosidi e sulfatidi; assenti gangliosidi.

20 Per la determinazione delle loro quantità percentuali e del rapporto tra PS e PC, la TCL è stata letta al fotodensitometro a 450 nm:

SFM= 2,9 %

PC= 13,0 %

PS= 20,2 %

25 PI= 6,5 %

PA= 1,8 %

PE= 55,5 %

successivamente è stato calcolato il rapporto PS/PC= 1,55.

I fosfolipidi sono risultati essere oltre il 90% del preparato fosfolipidico.

Solventi residui: assenti.

Proteine: assenti.

Pirogeni e contaminanti microbiologici: assenti

- L'esempio 1 dimostra in modo inequivocabile come il processo di estrazione e purificazione di fosfolipidi da cervella animale oggetto della presente invenzione determini la produzione di fosfolipidi sostanzialmente puri arricchiti in PS.

Esempio 2:

Composizione farmaceutica fosfolipidica nel trattamento della patologia del Long-Covid

- 10 Case Report: S.M., 54 anni, di sesso femminile, nell'Aprile del 2020 aveva contratto il coronavirus Sars-Cov-2 e si era quindi ammalata di Covid in una forma di media gravità. I sintomi principali furono il deficit respiratorio medio/grave, febbre, mal di testa, anosmia e ageusia, venne curata prevalentemente con la somministrazione di FANS ad alto dosaggio.
- 15 Dopo 15 giorni la paziente risultava negativa ai tamponi nasali e guarita dalla patologia, tuttavia in pochissimo tempo sviluppava la malattia del Long-Covid per l'instaurarsi di una persistente sensazione di fatica/astenia associata alla "nebbia mentale", cioè ad uno stato di confusione mentale tale da non riuscire né a ritornare al lavoro né alle quotidiane occupazioni pre-Covid.
- 20 Alla paziente sono stati somministrati per via intramuscolare fosfolipidi preparati secondo il processo oggetto dell'invenzione (Esempio 1), formulati in base acquosa con mannitolo e sodio fosfato come eccipienti, alla dose di 28 mg/2 ml di composizione iniettiva, per un trattamento quotidiano di 20 giorni.
- Dopo circa 10 giorni la paziente ha iniziato a trarre beneficio dalla
- 25 somministrazione fosfolipidica con diminuzione progressiva sia della confusione mentale che della sensazione di fatica/astenia, guarendo completamente dopo 20 giorni dall'inizio del trattamento.
- Questo caso è dimostrativo dell'efficacia terapeutica dei fosfolipidi e delle composizioni che li contengono nel trattamento della patologia del Long-Covid.

RIVENDICAZIONI

1. Processo di estrazione e purificazione di fosfolipidi arricchiti in fosfatidilserina (PS) che comprende o consiste nelle seguenti fasi:

Estrazione che comprende le seguenti fasi:

- 5 a. macinare il cervello animale in toto;
- b. aggiungere al macinato una miscela di solventi comprendente acetone e metanolo;
- c. agitare e sedimentare;
- d. separare l'estratto fosfolipidico grezzo umido sedimentato;
- 10 Purificazione intermedia che comprende le seguenti fasi:
 - e. solubilizzare l'estratto fosfolipidico grezzo umido proveniente dalla fase d. con i sali NaCl e KCl, sedimentare, separare il sottonatante mediante filtrazione;
 - f. lavare il sottonatante ottenuto nella precedente fase e. con acqua purificata,
 - 15 sedimentare e separare il sottonatante;
 - g. aggiungere acetone e CaCl₂ bi-idrato al sottonatante della fase f., agitare e sedimentare;
 - h. filtrare il prodotto della fase g. mediante filtropressa per ottenere un primo estratto fosfolipidico solido parzialmente purificato;
- 20 Purificazione finale che comprende le seguenti fasi:
 - i. solubilizzare l'estratto fosfolipidico solido in solvente organico;
 - j. aggiungere all'estratto della fase i. una soluzione comprendente EDTA, NaOH, KCl, e NaCl di pH 8,5-9, agitare e sedimentare;
 - k. separare il sottonatante della fase j., aggiungere acqua ed etanolo, agitare e
 - 25 sedimentare;
 - l. separare il sottonatante della fase k. mediante filtrazione attraverso filtro con grado di filtrazione di 3µm e successivamente di 0,2 µm, agitare e sedimentare;
 - m. lavare il sedimentato della fase l. con acetone;

- n. filtrare il prodotto della fase m. mediante filtropressa per ottenere l'estratto fosfolipidico solido purificato;
- o. trattare l'estratto finale della fase n. con azoto liquido, granulare ed essiccare a vuoto.

- 5 2. Processo di estrazione e purificazione di fosfolipidi arricchiti in PS secondo la rivendicazione 1 che comprende o consiste nelle seguenti fasi:

Estrazione che comprende le seguenti fasi:

- a. macinare il cervello animale in toto, preferibilmente la sua parte ipotalamica e/o la sua corteccia;
- 10 b. aggiungere al macinato della fase a. la miscela di solventi costituita da acetone/cloruro di metilene o altro solvente organico polare (SOP)/metanolo, in rapporto (Kg/L) (macinato) 1: (miscela) 1,5-3 p/v, preferibilmente 1:2,2 p/v, dove i solventi della suddetta miscela sono in rapporto tra loro di (acetone)1: (cloruro di metilene o altro SOP)1-2:
15 (metanolo) 0,5-1 (v/v);
- c. lasciare in agitazione per almeno 60 minuti a 30-35°C; sedimentare l'estratto per almeno 180 minuti a 30-35°C;
- d. separare il sottonatante mediante sua filtrazione attraverso filtro con grado
20 di filtrazione di 1µm, preferibilmente in polipropilene, eliminando il sopranatante;

Purificazione intermedia che comprende le seguenti fasi:

- e'. raffreddare a 0°C e solubilizzare l'estratto grezzo umido proveniente dalla fase d. mediante aggiunta di NaCl e KCl, preferibilmente in quantità uguale a 1-2 grammi (per tipo di sale)/Kg di macinato iniziale ottenuto nella fase a.
25 e in rapporto tra loro 1:1 p/p, agitare per almeno 30 minuti;
- e''. sedimentare l'estratto e separare il sottonatante mediante sua filtrazione attraverso filtro con grado di filtrazione di 1µm, preferibilmente in polipropilene, eliminando il sopranatante;

- f. aggiungere acqua purificata al sottonatante della fase e''. per almeno il 10% del suo volume, lasciare in agitazione per almeno 30 minuti, sedimentare per almeno 60 minuti, separare il sottonatante ed eliminare il sopranatante;
- g'. abbassare la temperatura a 0°C: aggiungere all'estratto della fase f. acetone, preferibilmente 1L/L di estratto, e CaCl₂ bi-idrato, preferibilmente 1-2 grammi/L di estratto, agitare e sedimentare per almeno 30 minuti, eliminare il sopranatante;
- g''. aggiungere acetone al sottonatante della fase g'. preferibilmente 0,1-0,2 L/L di sottonatante, agitare e sedimentare; questa fase di lavaggio potendo essere ripetuta ed essendo effettuata a 10°C;
- h. filtrare il prodotto proveniente dalla fase g''. mediante filtropressa preferibilmente con filtro/telo in polipropilene (eliminando il sopranatante) per ottenere un primo estratto fosfolipidico solido parzialmente purificato;
- Purificazione finale che comprende le seguenti fasi:
- i. solubilizzare l'estratto fosfolipidico solido ottenuto al termine della fase h. in metilene cloruro o altro SOP, preferibilmente in rapporto 100-150 grammi di estratto/L di solvente, lasciare in agitazione per almeno 60 minuti a 21-25°C;
- j. aggiungere all'estratto proveniente dalla fase i. la soluzione comprendente EDTA 110-130 Grammi/L, NaOH 7-9 Grammi/L, KCl 27-30 Grammi/L, NaCl 22-25 Grammi/L, preparata in acqua purificata e con un pH finale compreso tra 8,5-9, in quantità percentuale compresa tra il 21-24% rispetto al volume dell'estratto ottenuto al termine della fase i., e successivamente etanolo in quantità percentuale compresa tra il 16-20% sempre rispetto al volume dell'estratto ottenuto al termine della fase i., agitare per almeno 60 minuti e sedimentare per almeno 12 ore;
- k. separare il sottonatante ed eliminare il sopranatante; aggiungere acqua purificata al 10% ed etanolo all'1% del volume del sottonatante, agitare per almeno 60 minuti e sedimentare per almeno 12 ore;

1. separare il sottonatante dal sopranatante (eliminato) mediante filtrazione attraverso filtro con grado di filtrazione di $3\mu\text{m}$, preferibilmente in polipropilene, successivamente di $0,2\mu\text{m}$, preferibilmente di politetrafluoroetilene, agitare e sedimentare, separare il sottonatante eliminando il sopranatante;
5
- m. aggiungere acetone al sedimentato ottenuto al termine della fase l., preferibilmente $0,5\text{L/L}$ di sottonatante, agitare per almeno 30 minuti alla temperatura di 10°C , sedimentare il precipitato fosfolipidico ed eliminare il sopranatante per sifonamento; questa operazione potendo essere ripetuta più
10 volte;
- n. filtrare il prodotto ottenuto al termine della fase m. mediante filtropressa preferibilmente con filtro/telo in polipropilene (eliminando il sopranatante) per ottenere l'estratto fosfolipidico solido purificato;
- o. trattare l'estratto finale proveniente dalla fase n. con azoto liquido, granulare
15 ed essiccare a 40°C con vuoto $\leq 0,5$ mbar.
3. Processo di estrazione e purificazione di fosfolipidi arricchiti in PS secondo una delle rivendicazioni 1-2 che non contempla l'uso di cloroformio e di una fase di purificazione per cromatografia su gel di silice.
4. Processo di estrazione e purificazione di fosfolipidi arricchiti in PS secondo
20 una o più delle rivendicazioni 1-3 in cui il rapporto finale PS/PC al termine delle fasi di estrazione e purificazione è compreso tra 0,5 e 2, preferibilmente tra 0,8 e 1,6.
5. Processo di estrazione e purificazione di fosfolipidi arricchiti in PS secondo una o più delle rivendicazioni 1-4 in cui il cervello animale processato nella fase a.
25 è cervello di suino.
6. Fosfolipidi arricchiti in PS ottenuti secondo il procedimento di estrazione e purificazione secondo una o più delle precedenti rivendicazioni 1-4.
7. Fosfolipidi arricchiti in PS secondo la rivendicazione 6 in cui il rapporto finale PS/PC al termine delle fasi di estrazione e purificazione è compreso tra 0,5 e

2, preferibilmente tra 0,8 e 1,6.

8. Composizioni farmaceutiche comprendenti o consistenti in fosfolipidi arricchiti in PS secondo una delle rivendicazioni 6 o 7.

9. Composizioni farmaceutiche comprendenti o consistenti in fosfolipidi arricchiti in PS secondo la rivendicazione 8 dove detti fosfolipidi sono in associazione a farmaci e/o agenti farmacologicamente o biologicamente attivi quali, ad esempio, steroidi, anti-infiammatori non steroidei, estratti naturali animali e/o vegetali e/o vitamine, preferibilmente vitamine del gruppo B.

10. Composizioni farmaceutiche comprendenti o consistenti in fosfolipidi arricchiti in PS secondo la rivendicazione 8 per uso nel trattamento di prevenzione/cura di problematiche d'origine neuroendocrina come, ad esempio, la demenza e/o il decadimento cognitivo degli anziani, e dei disturbi depressivi in generale.

11. Composizioni farmaceutiche comprendenti o consistenti in fosfolipidi per uso nel trattamento della patologia definita "Long-Covid".

12. Composizioni farmaceutiche comprendenti o consistenti in fosfolipidi arricchiti in PS secondo la rivendicazione 8 per uso nel trattamento della patologia definita "Long-Covid".

20

Bird & Bird