



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900372345
Data Deposito	08/06/1994
Data Pubblicazione	08/12/1995

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	D		

Titolo

PROCESSO PER L'OTTENIMENTO E LA SEPARAZIONE DEI SALI DIASTEREOISOMERI
DELL'ACIDO FOLINICO

- 8 GIU. 1994

- 2 -

Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.
Bianchetti Giuseppe ed altri

4395 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

FM/vm "PROCESSO PER L'OTTENIMENTO E LA SEPARAZIONE DEI SALI DIA-
STEREIOISOMERI DELL'ACIDO FOLINICO"

a nome: BRACCO S.p.A.

MI 94 A 001193

* * *

La presente invenzione si riferisce ad un processo per la preparazione, la separazione e la purificazione degli stereoisomeri dei sali dell'acido folinico che, come sale di calcio, è utilizzato, nell'ambito della terapia antitumorale, come antidoto per antagonisti dell'acido folico come l'Aminopterina o il Methotrexate, che hanno l'effetto collaterale di bloccare, nell'organismo, il metabolismo dell'acido folico impedendo la trasformazione dell'acido diidrofolico ad acido tetraidrofolico mentre in combinazione con un altro farmaco antitumorale, il 5-fluorouracile, ne aumenta l'attività. Il sale di calcio dell'acido folinico viene inoltre impiegato in tutte le forme anemiche derivanti da carenza di folati.

Detto processo consente di ottenere le due forme diastereoisomeriche di detti sali in modo economico, con buone rese e con una purezza ottica particolarmente elevata.

L'acido folinico, cioè l'acido *N*-(5-formil-(6*RS*)-5,6,7,8-tetraidropteroil)-*L*-glutammico, quando viene ottenuto per via sintetica, è costituito dalla miscela equimolare delle sue due forme diastereomere, rispettivamente (6*R*) e (6*S*).

E' noto che solamente l'isomero (6*S*), sotto forma di sale di calcio, esplica la desiderata attività farmacologica: di conseguenza è molto viva la richiesta di un processo che permetta la preparazione di detta forma (6*S*) otticamente pura.

Più di un tentativo è stato fatto per ottenere l'isomero (6*S*) tramite sintesi asimmetrica [Rees L., Valente E., Suckling C. J., Wood H.C.S. - Tetrahedron Vol. 42 - no. 1, pag. 117-136, 1986; Rees L., Suckling C. J., Wood H.C.S. - J. Chem. Soc., Chem. Commun., pag. 470-472, 1987; Brunner H., Huber C., Dublack P., EP551642-A1 (BASF-AG)], nessuno tuttavia è stato coronato da successo per quanto riguarda la applicabilità industriale. Di conseguenza la maggior parte del lavoro di ricerca e sviluppo è stata concentrata sulla

separazione dalla miscela diastereoisomerica (6RS) usualmente ottenuta con le vie di sintesi note, quale, ad esempio, quella descritta da C. Temple e Coll. [US 4,148,999; US 4,206,307; J. Med.Chem. 22, 731 (1979)].

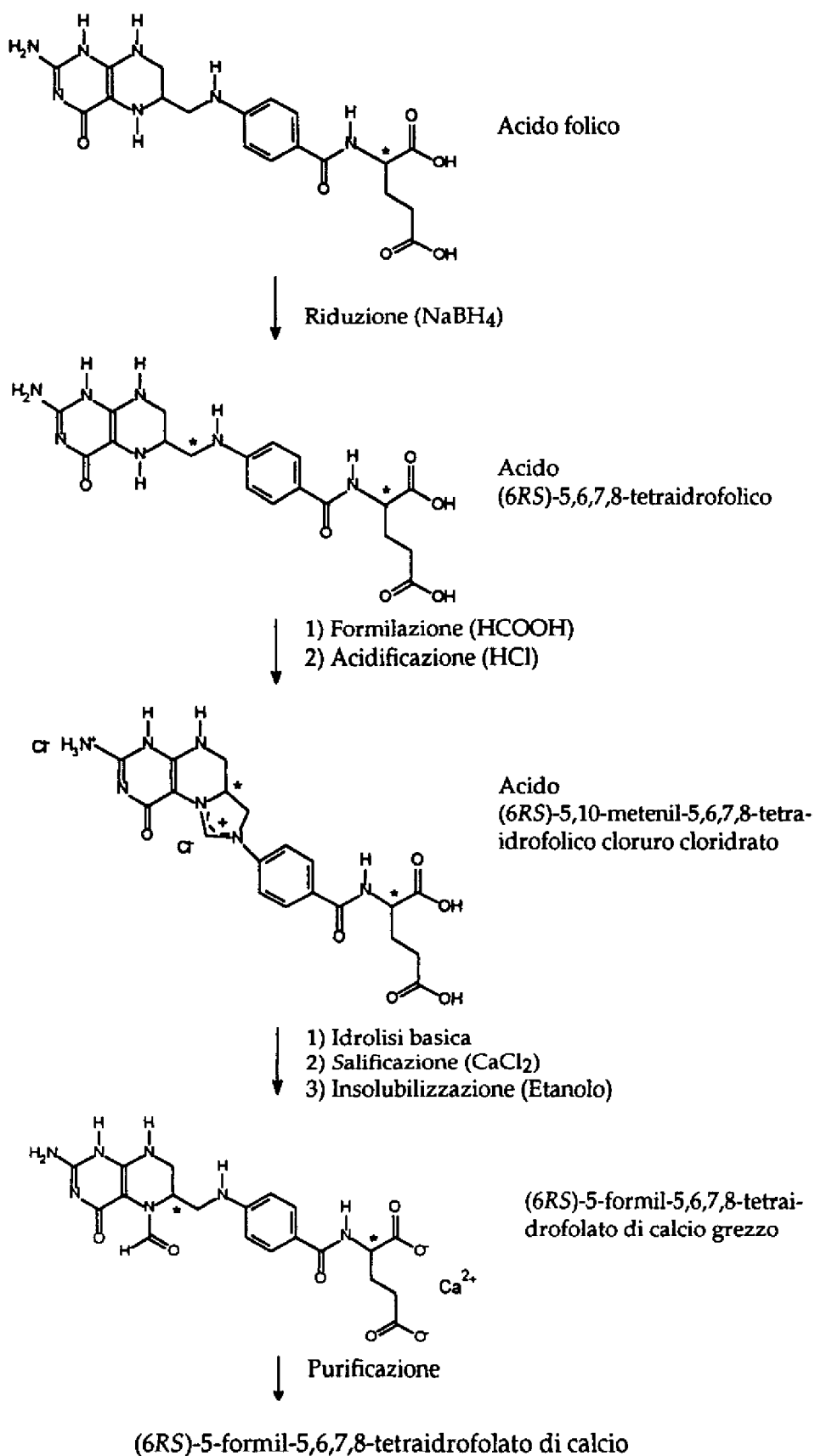
Un esempio non limitante dello stato dell'arte riguardante detta separazione dei diastereoisomeri (6R) e (6S) dalla loro miscela equimolare è fornito dal seguente elenco: US 2,688,018; EP-A 0266042; EP-A 0348641; EP-A 0356934; EP-A 0367902; EP-A 0432441; EP-A 0455013; EP-A 0495204; WO 9113890; WO 8808844; WO 9317022.

Il problema tuttavia non ha ancora ottenuto risposte pienamente soddisfacenti dal punto di vista industriale, sia per quanto riguarda la resa globale del processo, sia per quanto riguarda la purezza ottica dei diastereoisomeri ottenuti.

Oggetto della presente invenzione è un nuovo processo che consente, partendo da un intermedio chiave noto in letteratura, precisamente l'acido (6RS)-5,10-metenil-5,6,7,8-tetraidrofolicolo cloruro cloridrato [ad esempio ottenuto secondo C. Temple; US 4,148,999; US 4,206,307; J. Med.Chem. 22, 731 (1979)], di preparare, separare ed isolare i sali diastereomerici dell'acido folinico con una ammina organica almeno dibasica, con un grado di purezza chimica e ottica così elevata da permettere la loro trasformazione nei corrispondenti sali di calcio senza dover ricorrere a complessi passaggi di purificazione. Tutto ciò viene a riflettersi in modo estremamente favorevole sulla facilità di industrializzazione del processo.

Come evidenziato nello Schema 1, il sale di calcio dell'acido folinico viene usualmente preparato partendo dall'acido folico, che contiene un centro chirale (S) nella parte della molecola corrispondente all'acido (S)-glutammico. Per idrogenazione del doppio legame tra le posizioni 5 e 6 del residuo pterinico, si origina un nuovo centro chirale in posizione 6 con una configurazione (6RS). La successiva formilazione dell'atomo di azoto in posizione 5 conduce alla produzione del formiato dell'acido (6RS)-5,10-metenil-5,6,7,8-

Schema 1



tetraidrofolic. Per acidificazione con acido cloridrico si ottiene la cristallizzazione del corrispondente cloruro cloridrato.

Questo intermedio viene poi idrolizzato preferibilmente in presenza di basi forti inorganiche (ad esempio NaOH), oppure di monoamine organiche quale trietilamina, e in condizioni di pH rigorosamente controllate.

La miscela dei sali diastereomerici dell'acido folinico viene trasformata nella miscela dei corrispondenti sali di calcio (con CaCl_2). Tale miscela, viene precipitata per insolubilizzazione con etanolo a dare il (6RS) folinato di calcio grezzo che viene sottoposto a successive fasi di purificazione. Per trattamento con acidi di una soluzione acquosa di (6RS) folinato di calcio purificato precipita il (6RS) acido folinico che è avviato alla separazione diastereomerica.

La serie di operazioni testè illustrata risulta molto complessa in particolare perchè la specificità della reazione di idrolisi dell'acido (6RS)-5,10-metenil-5,6,7,8-tetraidrofolic cloruro cloridrato non è molto elevata; di conseguenza si ha la formazione di un notevole numero di impurezze che abbassano sostanzialmente la resa della reazione e rendono obbligatoria la purificazione del calcio folinato prima di poter isolare l'acido folinico e separarne i diastereoisomeri.

E' stato ora sorprendentemente trovato che, contrariamente a quanto insegnato dallo stato dell'arte, detta reazione di idrolisi può essere condotta in presenza di una opportuna quantità di una base relativamente debole, costituita da una amina organica almeno dibasica, che consente alta conversione e selettività della reazione. Tale amina inoltre, oltre che da agente idrolizzante, funge contemporaneamente da salificante dell'acido folinico che si forma.

In conseguenza di ciò è possibile utilizzare direttamente la soluzione finale grezza della reazione, che contiene la miscela dei sali diastereoisomeri dell'acido (6RS)-folinico

con la diamina, per fare cristallizzare preferenzialmente una delle due forme diastereoisomeriche con una purezza ottica mediamente superiore al 95%.

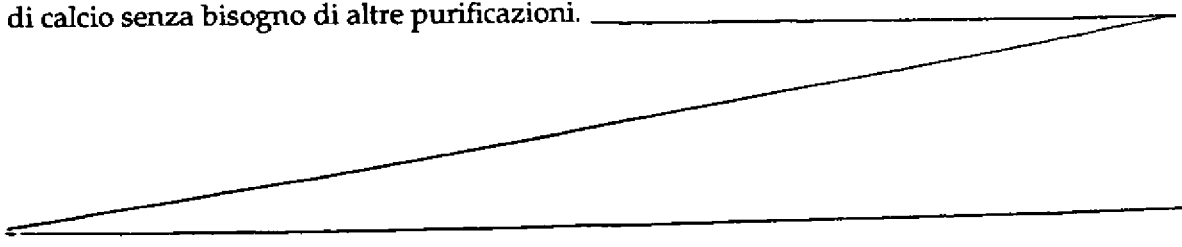
Il tipo di diamina impiegata determina l'andamento preferenziale della cristallizzazione: ad esempio è possibile isolare prima il sale di diamina avente la configurazione (6S) e poi, dalle acque madri di cristallizzazione, la corrispondente forma (6R). E' questo il caso che si verifica quando ad esempio si impiega come amina dibasica idrolizzante e salificante la piperazina.

E' ugualmente possibile ottenere l'inverso: se per esempio si utilizza come base la etilendiamina, allora cristallizza per primo il sale (6R) e la corrispondente forma (6S) può essere successivamente recuperata dalle acque madri per ulteriore cristallizzazione.

La cristallizzazione preferenziale del sale diastereoisomerico meno solubile dalla soluzione grezza della reazione di idrolisi può essere effettuata secondo metodi noti (WO 9317022, BRACCO). Preferibilmente detta soluzione viene opportunamente diluita con solventi quali un solvente dipolare aprotico o un solvente protico organico o una miscela degli stessi in modo da innescare la cristallizzazione della forma più insolubile.

Allo stesso tempo si ottiene l'allontanamento delle impurezze e dei prodotti collaterali della reazione, che rimangono in soluzione, in una misura tale che è sufficiente una sola ricristallizzazione del sale di diamina per ottenerlo con una purezza ottica superiore al 99%.

Nei casi più favorevoli, la purezza ottica e la purezza chimica del diastereoisomero del folinato di diamina cristallizzato direttamente dal grezzo derivante dall'idrolisi sono talmente elevate da permettere la facile conversione di detto sale nel corrispondente sale di calcio senza bisogno di altre purificazioni.

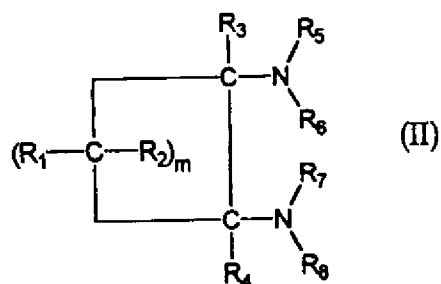
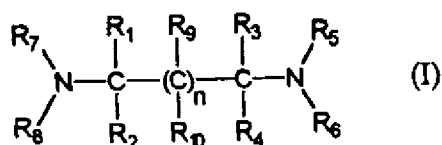


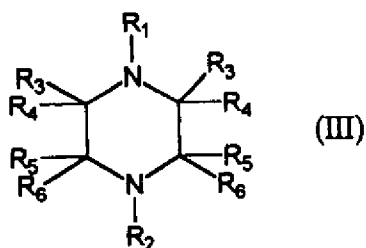
La stechiometria della reazione di idrolisi dell'acido (6RS)-5,10-metenil-5,6,7,8-tetraidrofólico cloruro cloridrato ad acido folinico sale di diamina è funzione della basicità dei gruppi aminici della base organica impiegata.

Ad esempio la etilendiamina e l'1,3-diamino-2-propanolo sono utilizzate in un rapporto molare di 2:1 rispetto al prodotto di partenza (cioè in rapporto stechiometrico rispetto alla quantità di acido da neutralizzare). Per la piperazina e la *N,N*-dimetil piperazina, meno basiche rispetto alle precedenti, è invece necessario un rapporto molare di 3:1. Anche in questo caso comunque, il sale diastereoisomerico che si ottiene è costituito da acido folinico e diamina in rapporto molare 1:1, poichè le rimanenti due moli di diamina vanno a neutralizzare ciascuna un equivalente di acido cloridrico (ad esempio come piperazina monocloridrato).

Amine organiche almeno dibasiche adatte a realizzare l'idrolisi dell'acido (6RS)-5,10-metenil-5,6,7,8-tetraidrofólico cloruro cloridrato e la contemporanea salificazione dell'acido folinico che si forma possono essere selezionate tra amine alifatiche, lineari, cicliche o eterocicliche, sostituite o non sostituite, racemiche o otticamente attive, le quali contengono almeno due gruppi aminici fra loro collegati da almeno una catena idrocarburica, sostituita o no, comprendente almeno 2 atomi di carbonio.

Amine particolarmente preferite sono le diamine di formula generale da (I) a (III):





in cui:

$R_1 \rightarrow R_8$ fra loro uguali o diversi, sono H o un gruppo alchile lineare o ramificato, che può essere o meno sostituito da 1 a 4 gruppi OH;

$R_9 \rightarrow R_{10}$ fra loro uguali o diversi, sono OH o sono definiti analogamente a R_1 ,

n è un intero da 0 a 6,

m è un intero tra 2 e 8.

Esempi di amine particolarmente preferite sono selezionabili fra: etilendiamina, 1,2-diamino-propano, 1,3-diaminopropano, 1,3-diamino-2-idrossi-propano, (cis)-1,2-diamino-cicloesano, (trans)-1,2-diamino-cicloesano, piperazina, 1,4-dimetil-piperazina, 2-metil-piperazina, 2,5-dimetilpiperazina.

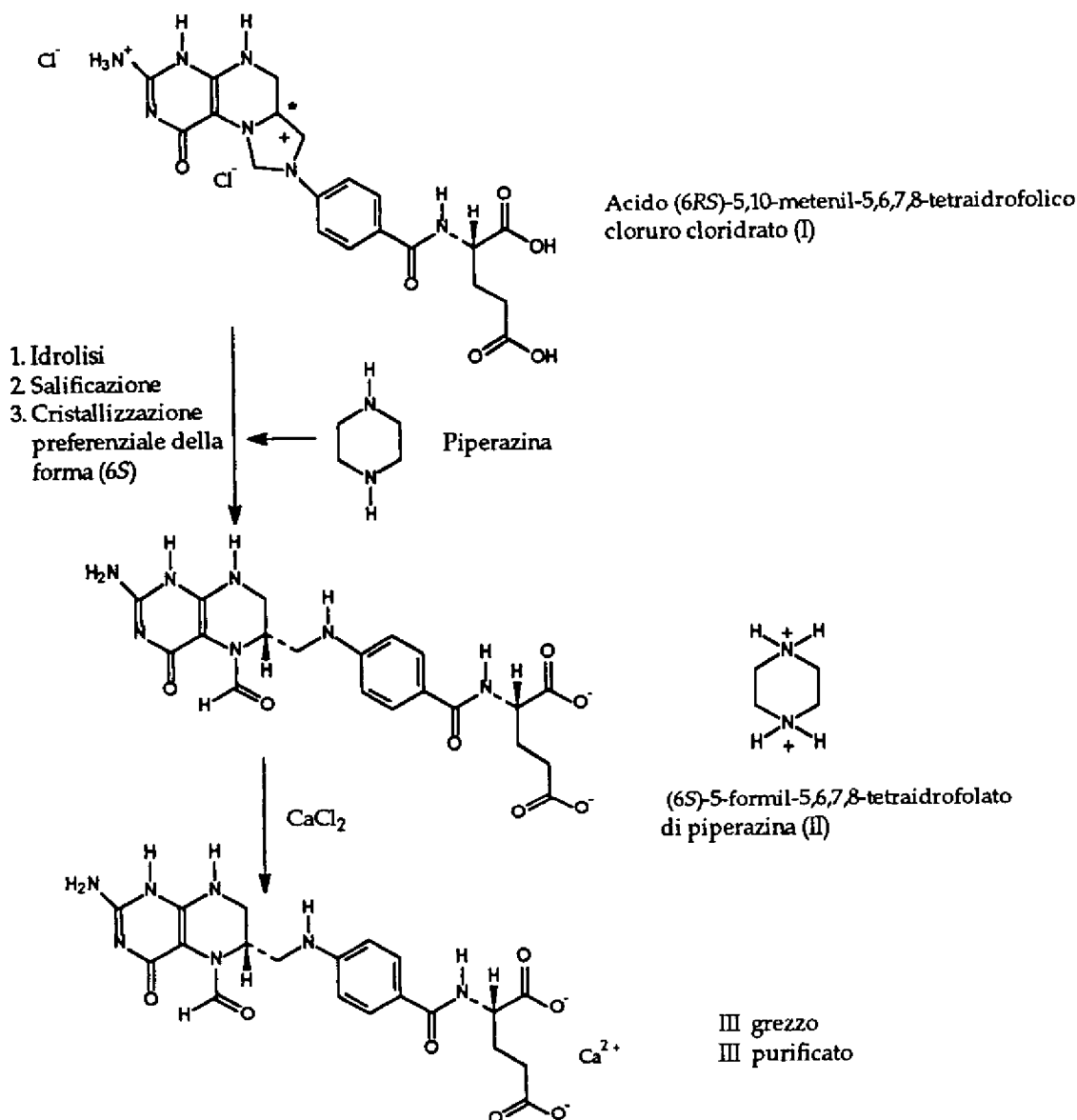
Solventi adatti alla cristallizzazione delle miscele diastereoisomeriche dei sali dell'acido folinico con dette amine sono preferibilmente miscele binarie o ternarie acqua/solvente dipolare aprotico organico o acqua/solvente dipolare aprotico organico/solvente protico organico.

Solventi dipolari aprotici organici preferiti sono ad esempio dimetilformamide (DMF), dimetilacetamide (DMAC), dimetilsolfossido (DMSO), N-metil-pirrolidone (NMP), esametilfosforamide (HMPA).

Solventi protici organici preferiti sono ad esempio metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo, etilenglicole, formamide, N-metil-formamide.

Il processo oggetto della presente invenzione è illustrato nello schema 2 seguente utilizzando come prodotti di partenza l'acido (6*RS*)-5,10-metenil-5,6,7,8-tetraidrofolico cloruro cloridrato, preferibilmente ottenuto secondo la procedura descritta da C. Temple [US 4,148,999; US 4,206,307; J. Med.Chem. 22, 731 (1979)], e, come esempio assolutamente non limitativo di diammina, la piperazina.

Schema 2



Idrolisi dell'acido (6RS)-5,10-metenil-5,6,7,8-tetraidrofolico cloruro cloridrato.

La reazione viene condotta preferibilmente nelle seguenti condizioni:

- rapporto molare acido/diamina: da 1:2 a 1:4, preferibilmente da 1:2 a 1:3,2
- solvente: acqua oppure miscela acqua/solvente dipolare aprotico (ad esempio DMAC) in rapporto ponderale da 1:0,5 a 1:20
- rapporto di diluizione acido/miscela solvente: da 1:2 a 1:80 p/p
preferibilmente da 1:4 a 1:45 p/p
- temperatura: da 60 a 100°C
- tempo di reazione: da 3 a 12 h
preferibilmente da 5 a 8 h.

La reazione è condotta preferibilmente in atmosfera di gas inerte.

Cristallizzazione preferenziale del diastereoisomero meno solubile del folinato di diamina dalla soluzione grezza di fine idrolisi.

La soluzione grezza ottenuta alla fine della reazione di idrolisi descritta in precedenza viene fatta raffreddare e successivamente viene sottoposta a uno dei seguenti trattamenti:

- eventuale diluizione con dell'altro solvente dipolare aprotico (ad esempio DMAC) in modo da elevare il rapporto acqua/solvente dipolare aprotico fino ad un massimo di 1:60 p/p
- ulteriore eventuale aggiunta di un solvente protico organico (ad es. EtOH) in quantità tale da raggiungere un massimo di 12 volte il peso della soluzione.

La temperatura di cristallizzazione varia generalmente fra 0 e 25°C e il tempo della stessa è compreso fra 10 e 120 h, preferibilmente fra 24 e 72 h.

Trasformazione del sale di diamina nel corrispondente sale di calcio.

Lo scambio avviene in soluzione acquosa in presenza di un eccesso di sale di calcio (preferibilmente CaCl₂) in condizioni di pH pressochè neutro.

- rapporto di diluizione sale di diamina/acqua: da 1:4 a 1:40 p/p

preferibilmente da 1:8 a 1:15 p/p

- rapporto sale di diamina/ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: da 1:1 a 1:6 p/p

preferibilmente da 1:3 a 1:5 p/p

- temperatura: da 5 a 25°C

- tempo di cristallizzazione: da 10 a 60 h

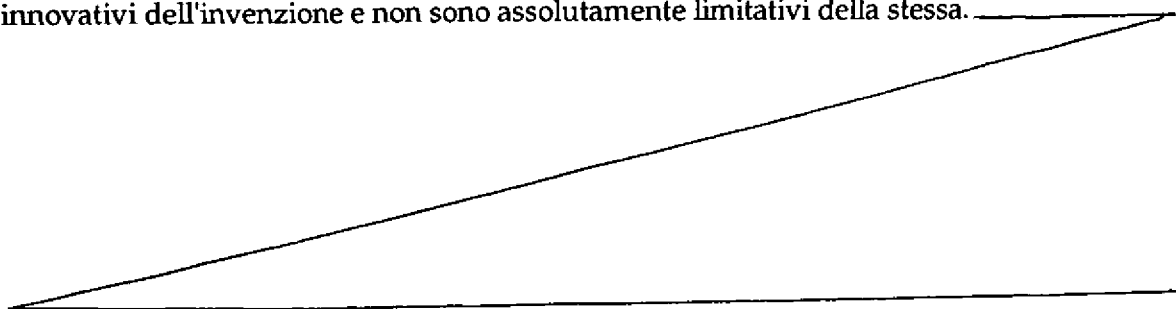
- pH: tra 6,5 a 7,5, eventualmente con aggiunta di NaOH 1N.

Dalle acque madri residue dopo la cristallizzazione preferenziale del folinato di diamina [rispettivamente (6S) o (6R) a seconda della diamina impiegata] è possibile, quando necessario, recuperare anche l'altro diastereoisomero con un grado di purezza ottica estremamente elevato.

Le condizioni preferite sono sostanzialmente simili a quelle descritte in WO 9317022, (BRACCO) e comportano la cristallizzazione del sale di diamina del diastereoisomero rimasto in soluzione tramite diluizione delle acque madri con opportuno solvente o miscele di solventi, la sua ricristallizzazione e la successiva trasformazione nel corrispondente sale di calcio.

Alternativamente è anche possibile trasformare il sale di diamina in sale di calcio direttamente nelle acque madri di partenza; è poi possibile recuperare e purificare lo stesso come descritto in letteratura (WO 9317022, BRACCO).

Gli esempi sperimentali seguenti hanno lo scopo di meglio evidenziare gli aspetti innovativi dell'invenzione e non sono assolutamente limitativi della stessa.



Esempio 1 - Idrolisi con piperazina e cristallizzazione preferenziale del (6S)-folinato di piperazina.

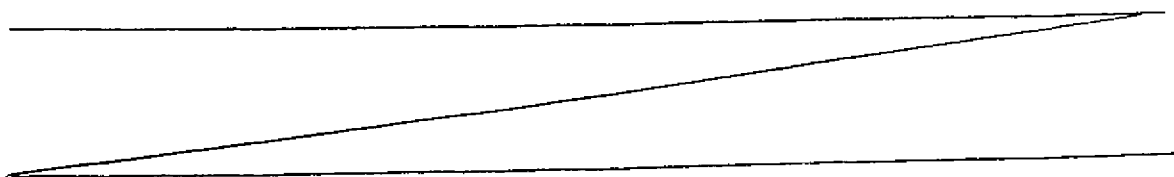
25 g di acido 5,10-metenil-5,6,7,8-tetraidrofolico cloruro cloridrato vengono sospesi in 200 g di *N,N*-dimetilacetamide ed in 49,0 g di acqua. La sospensione viene riscaldata fino a 75°C: raggiunta questa temperatura, si aggiungono 11,28 g di piperazina. Si riscalda ulteriormente fino a 80°C, quindi si mantiene a questa temperatura per 5 h. Si diluisce con 250 g di *N,N*-dimetilacetamide e si raffredda fino a 15°C. Si lascia cristallizzare a 15°C per 48 h. Il solido cristallizzato viene filtrato, lavato su filtro con 40 g di etanolo ed essiccato. Si ottengono 9 g di (6S)-folinato di piperazina di purezza ottica superiore a 98%.

Esempio 2 - Conversione di (6S)-folinato di piperazina in (6S)-folinato di calcio.

8 g di (6S)-folinato di piperazina, ottenuti come descritto nell'esempio 1, vengono sciolti in 120 g di acqua. Si aggiungono 32 g di calcio cloruro diidrato, si aggiusta il pH a 7 con NaOH 1N, quindi si lascia cristallizzare a 16°C per 24 h. Il solido cristallizzato viene filtrato, lavato su filtro con etanolo acquoso ed essiccato. Si ottengono 6 g di (6S)-folinato di calcio, di purezza ottica superiore a 99%. Il prodotto viene ridissolto in acqua e riprecipitato per aggiunta di etanolo. Si ottengono 5,7 g di (6S)-folinato di calcio, di purezza ottica superiore a 99%, esente da ioni cloruro.

Esempio 3 - Isolamento di (6R)-folinato di piperazina grezzo dalle acque madri della cristallizzazione dell'esempio 1.

Alle acque madri della filtrazione dell'esempio 1 si aggiungono 270 g di etanolo. Si lascia cristallizzare a 5°C per 64 h, quindi si filtra il solido precipitato, lavando con 40 g di etanolo. Si ottengono 8 g di (6R)-folinato di piperazina di purezza ottica superiore a 90%.



Esempio 4 - Preparazione di (6R)-folinato di piperazina di elevata purezza ottica (>99%).

6 g di (6R)-folinato di piperazina, ottenuti come descritto nell'esempio 3, vengono ridisciolti a 50°C in 20 g di acqua e 110 g di N,N-dimetilacetamide. Si raffredda fino a 25°C, si aggiungono 20 g di etanolo e si raffredda ulteriormente fino a 5°C. Si lascia cristallizzare per 64 h a 5°C. Il prodotto cristallizzato viene filtrato, lavato con etanolo ed essiccato. Si ottengono 5,0 g di (6R)-folinato di piperazina di purezza ottica superiore a 99%.

Esempio 5 - Conversione di (6R)-folinato di piperazina in (6R)-folinato di calcio.

4 g di (6R)-folinato di piperazina, ottenuti come descritto nell'esempio 4, vengono sciolti in 20 g di acqua. Si aggiungono 12 g di calcio cloruro diidrato sciolti in 20 g di acqua. Si aggiusta il pH a 7 con NaOH 1N, quindi si insolubilizza il (6R)-folinato di calcio per aggiunta di 100 g di etanolo. Si ottengono 3,2 g di (6R)-folinato di calcio di purezza ottica superiore a 99%.

Esempio 6 - Idrolisi con etilendiamina e cristallizzazione preferenziale del (6R)-folinato di etilendiamina grezza.

30 g di acido 5,10-metenil-5,6,7,8-tetraidrofolico cloruro cloridrato vengono sospesi in 176 g di acqua e 204 g di N,N-dimetilacetamide (DMAC). La sospensione viene scaldata fino a 80°C: raggiunta questa temperatura, si gocciola in 3,5 h una soluzione di 6,3 g di etilendiamina in 26,9 g di DMAC e 23,1 g di acqua. Al termine del gocciolamento, si lascia reagire a 80°C per 5 h. Si raffredda la soluzione fino a 5°C e si lascia cristallizzare per 24 h. Il solido cristallizzato viene filtrato, viene lavato su filtro con 15 g di etanolo assoluto, quindi viene essiccato. Si ottengono 10,3 g di (6R)-folinato di etilendiamina di purezza ottica 95,5%.

Esempio 7 - Isolamento di (6S)-folinato di etilendiamina a partire dalle acque madri della cristallizzazione dell'esempio 6.

Alle acque madri della cristallizzazione dell'esempio 6 si aggiungono 42,5 g di DMAC. Si raffredda la soluzione fino a 10°C e si germina con (6S)-folinato di etilendiamina. Dopo 92 h il solido cristallizzato viene filtrato, viene lavato su filtro con 10 g di etanolo assoluto, quindi viene essiccato. Si ottengono 2,6 g di (6S)-folinato di etilendiamina, di purezza ottica 99%.

Esempio 8 - Preparazione di (6S)-folinato di calcio a partire dalle acque madri della cristallizzazione dell'esempio 6.

Alle acque madri della cristallizzazione dell'esempio 6 si aggiungono 80 g di calcio cloruro diidrato, quindi si aggiungono 900 g di etanolo. Dopo 30 min di agitazione, si filtra il precipitato, lavando con 40 g di etanolo. Il prodotto viene essiccato, quindi viene ridisciolti in acqua e riprecipitato a pH 7 per aggiunta di etanolo. Si ottengono 16 g di (6S)-folinato di calcio di purezza ottica 75%. Il prodotto viene ricristallizzato 3 volte da acqua, a pH 7 ed in presenza di 1 ÷ 4 parti in peso di calcio cloruro diidrato, quindi viene ridisciolti in acqua e riprecipitato per aggiunta di etanolo. Si ottengono 5 g di (6S)-folinato di calcio, di purezza ottica superiore a 99%.

Esempio 9 - Preparazione di (6R)-folinato di etilendiamina di elevata purezza ottica (>99%).

5 g di (6R)-folinato di etilendiamina, ottenuti come descritto nell'esempio 6, vengono ricristallizzati da 100 g di acqua/N,N-dimetilacetamide 1:1,16 p/p. Si ottengono 4 g di (6R)-folinato di etilendiamina di purezza ottica superiore a 99%.

Esempio 10 - Preparazione di (6R)-folinato di calcio.

3,5 g di (6R)-folinato di etilendiamina, ottenuti come descritto nell'esempio 9, vengono sciolti in 20 g di acqua. Si aggiungono 12 g di calcio cloruro diidrato sciolti in 15 g di

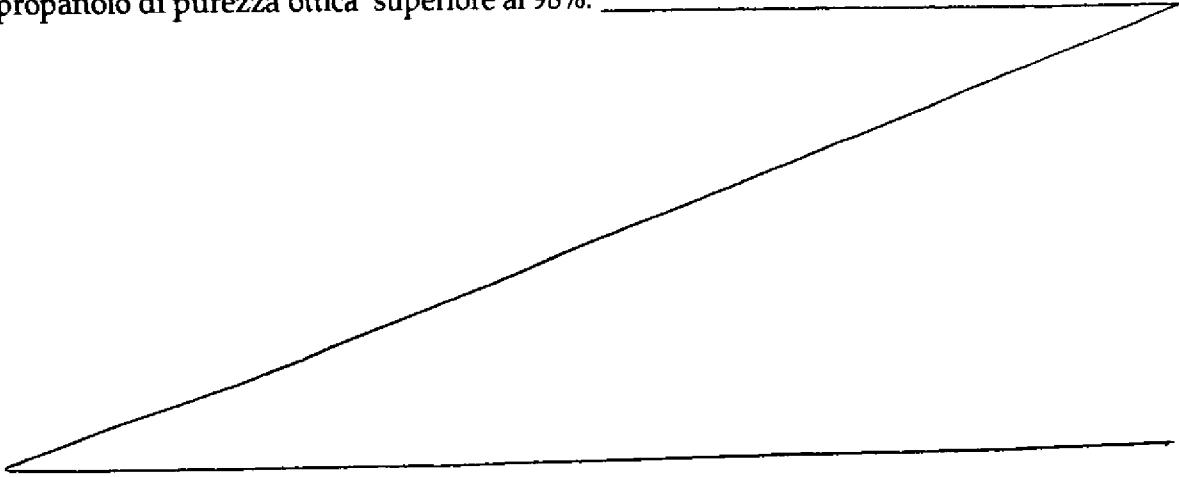
acqua. Si aggiusta il pH a 7 con NaOH 1N, quindi si insolubilizza il (6R)-folinato di calcio per aggiunta di 50 g di etanolo. Si ottengono 3 g di (6R)-folinato di calcio di purezza ottica superiore a 99%.

Esempio 11 - Idrolisi con 1,3-diamino-2-propanolo e cristallizzazione preferenziale del (6R)-folinato di 1,3-diamino-2-propanolo.

30 g di acido 5,10-metenil-5,6,7,8-tetraidrofolicolo cloruro cloridrato vengono sospesi in 100 g di acqua e 220 g di *N,N*-dimetilacetamide (DMAC). La sospensione viene scaldata fino 80°C: raggiunta questa temperatura, si gocciola in 3,5 h una soluzione di 9,5 g di 1,3-diamino-2-propanolo sciolti in 80 g di acqua. Al termine del gocciolamento, si lascia reagire a 80°C per 5 h. Si raffredda la soluzione fino a 5°C, quindi si lascia cristallizzare per 48 h. Il prodotto cristallizzato viene filtrato, viene lavato su filtro con 15 g di etanolo, quindi viene essiccato. Si ottengono 9,5 g di (6R)-folinato di 1,3-diamino-2-propanolo di purezza ottica 95%.

Esempio 12 - Preparazione di (6S)-folinato di 1,3-diamino-2-propanolo.

45 g di DMAC vengono addizionati alle acque madri della cristallizzazione dell'esempio 11. La soluzione viene raffreddata a 5°C e viene lasciata sotto agitazione per 2 giorni, sempre a 5°C. Il solido cristallizzato viene filtrato, viene lavato su filtro con 5 g di etanolo, quindi viene essiccato. Si ottengono 2,5 g di (6S)-folinato di 1,3-diamino-2-propanolo di purezza ottica superiore al 98%.



Rivendicazioni.

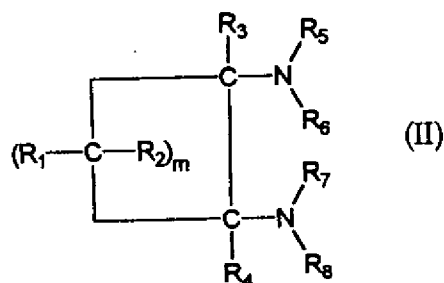
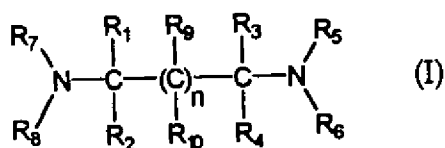
1. Processo per la preparazione, la separazione e la purificazione dei diastereoisomeri (6S) e (6R) dei sali dell'acido folinico con amine organiche almeno dibasiche caratterizzato dal fatto che in un unico step di lavorazione si eseguono le seguenti operazioni:

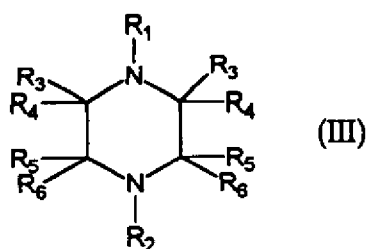
- si idrolizza l'acido (6RS)-5,10-metenil-5,6,7,8-tetraidrofolico cloruro cloridrato, in soluzione di acqua o di una miscela acqua/solvente dipolare aprotico, con una amina alifatica lineare, ciclica o eterociclica, sostituita o non sostituita, racemica o otticamente attiva, avente almeno due gruppi aminici fra loro collegati tramite almeno una catena idrocarbonica C₂-C₃, sostituita o no, a dare la corrispondente miscela dei sali diastereomeri dell'acido folinico con detta diamina;
- si fa cristallizzare preferibilmente il diastereoisomero meno solubile, (6S) o (6R), di detto diamino folinato direttamente dalla miscela grezza derivante dalla reazione di idrolisi, oppure previa diluizione della stessa con un solvente dipolare aprotico o con una miscela di quest'ultimo con un solvente polare protico;
- si filtra il precipitato ottenendo rispettivamente il (6S) o il (6R) folinato di diamina con una purezza ottica uguale o superiore al 95%.

2. Il processo secondo la rivendicazione 1 in cui:

- la reazione di idrolisi è condotta in acqua o in una miscela acqua-solvente dipolare aprotico in rapporto ponderale da 1:0,5 a 1:20;
- il rapporto di diluizione ponderale acido (6RS)-5,10-metenil-5,7,8-tetraidrofolico cloruro cloridrato-miscela solvente varia da 1:2 a 1:80;
- il rapporto molare acido (6RS)-5,10-metenil-5,7,8-tetraidrofolico cloruro cloridrato-amina varia da 1:2 a 1:4;
- la temperatura dell'idrolisi varia da 60°C a 100°C;

- il tempo della reazione varia da 3 a 12 h.
- 3. Il processo secondo la rivendicazione 1 di cui la cristallizzazione preferenziale del diastereoisomero meno solubile del folinato di diamina viene effettuata previa diluizione della miscela di fine idrolisi con solvente dipolare aprotico in modo da portare il rapporto acqua-solvente dipolare aprotico fino ad un massimo di 1:50 p/p.
- 4. Il processo secondo la rivendicazione 1 in cui la cristallizzazione preferenziale del diastereoisomero meno solubile del folinato di diamina viene effettuata previa diluizione della miscela di fine idrolisi (eventualmente già addizionata di solvente dipolare aprotico), con solvente protico polare in quantità ponderale fino a 10 volte il peso di detta soluzione.
- 5. Il processo secondo la rivendicazione 1 in cui l'ammina preferita usata per l'idrolisi dell'acido (6RS)-5,10-metenil-5,6,7,8-tetraidrofolico cloruro cloridrato e per la contemporanea salificazione dell'acido folinico che si forma è selezionata fra le diamine di formula generale da I a III.





in cui:

$R_1 \rightarrow R_8$ fra loro uguali o diversi, rappresentano H, o un gruppo alchile C_{1-6} lineare o ramificato, che può essere o meno sostituito da 1 a 4 gruppi OH e/o da 1-4 gruppi alcossi o idrossialcossi;

$R_9 \rightarrow R_{10}$ fra loro uguali o diversi, rappresentano R_1 oppure OH,

n è un intero da 0 a 6,

m è un intero tra 2 e 8.

6. Il processo secondo la rivendicazione 5 in cui le amine preferite sono selezionate fra: etilendiamina, 1,2-diamino-propano, 1,3-diamino-propano, 1,3-diamino-2-idrossi-propano, (cis)-1,2-diamino-cicloesano, (trans)-1,2-diamino-cicloesano, piperazina, 2-metil-piperazina, 1,4-dimetil-piperazina, 2,5-dimetil piperazina.
7. Il processo secondo la rivendicazione 1 in cui il solvente dipolare aprotico è selezionato fra i seguenti: dimetilformamide, dimetilacetamide, dimetilsolfossido, N-metil-pirrolidone, esametilfosforamide.
8. Il processo secondo la rivendicazione 1 in cui il solvente protico polare è selezionato fra i seguenti: metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo, glicool etilenico, 1,2-propilenglicool, 1,3-propilen-glicool, formamide, N-metil-formamide.
9. Il processo secondo la rivendicazione 1 in cui la purezza ottica del folinato di diamina cristallizzato dalla miscela di fine idrolisi è uguale o superiore al 95%.
10. Un processo secondo la rivendicazione 1 ulteriormente comprendente la ricristallizzazione del (6S), rispettivamente (6R), folinato di diamina da una miscela

acqua-solvente dipolare aprotico in rapporto variabile da 1:0,5 (v/v) a 1:20 (v/v), oppure da detta miscela addizionata di un solvente protico organico in quantità fino al 70% in volume a dare detto diastereoisomero avente purezza ottica superiore a 99%.

11. Un processo secondo la rivendicazione 1, ulteriormente comprendente la trasformazione del (6S), rispettivamente (6R), folinato di diamina nel corrispondente folinato di calcio avente purezza ottica superiore al 99%, in acqua, in presenza di CaCl_2 in un rapporto ponderale variabile da 1 a 6 parti di CaCl_2 per parte di sale di diamina, ad una temperatura variabile tra 0 e 35°C e mantenendo il pH fra 6 e 7 tramite eventuale aggiunta di sodio idrossido 1N.
12. Un processo secondo la rivendicazione 1, ulteriormente caratterizzato dal recupero dalle acque madri di cristallizzazione del diastereoisomero del folinato di diamina rimasto in soluzione, recupero consistente in:
 - diluizione di dette acque madri con un solvente dipolare aprotico o con un solvente protico organico, fino a precipitazione di detto stereoisomero;
 - filtrazione e ricristallizzazione dello stesso da miscele solventi come descritto in precedenza a dare il diastereoisomero del folinato di diamina avente purezza ottica superiore al 99%,
oppure:
 - trattamento di dette acque madri di cristallizzazione con un eccesso di CaCl_2 fino ad un rapporto in peso sale di diamina/ CaCl_2 1:6 p/p, successiva diluizione con solvente protico polare, filtrazione del sale di calcio grezzo precipitato e ricristallizzazione finale dello stesso da acqua.

Milano, 8 giugno 1994

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

Fabrizio Minoja

