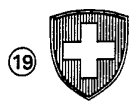


CH 682489 A5



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑪ **CH 682489 A5**

⑤① Int. Cl.⁵: **C 07 F 9/10**
B 01 D 15/02

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

⑫ **FASCICOLO DEL BREVETTO** A5

⑲ Numero della domanda: 346/92	⑦③ Titolare/Titolari: Golgi S.A., Stabio
⑳ Data di deposito: 06.02.1992	⑦② Inventore/Inventori: Bernasconi, Gerardo, Stabio
㉔ Brevetto rilasciato il: 30.09.1993	
④⑤ Fascicolo del brevetto pubblicato il: 30.09.1993	⑦④ Mandatario: Patentanwälte Schaad, Balass & Partner, Zürich

⑤④ **Procedimento per l'ottenimento di fosfatidiletanolamina e fosfatidilmioinositolo allo stato puro.**

⑤⑦ A partire da lecitina di soia con una serie di operazioni che non includono reazioni chimiche ma soltanto trattamenti con solventi alternati ad adsorbimenti su silice di qualità per cromatografia si ottengono fosfatidiletanolamina e fosfatidilmioinositolo di purezza idonea per l'uso farmaceutico.



CH 682489 A5

Descrizione

La presente invenzione riguarda un nuovo procedimento industriale per ottenere da lecitina di soia i prodotti fosfatidiletanolamina e fosfatidilmioinositolo, in forma idonea per il loro utilizzo in campo farmaceutico.

La miscela in toto dei fosfolipidi da olio di soia viene già ampiamente impiegata come tale unitamente ad olio di soia, glucosidi e pigmenti vari, che vengono precipitati per aggiunta di acqua all'olio stesso, centrifugati, essiccati e utilizzati direttamente.

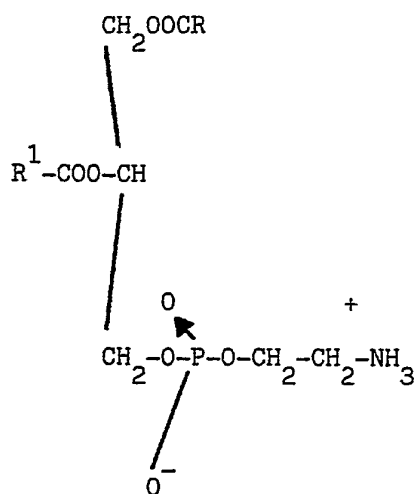
In natura i fosfolipidi si trovano, in varia misura, in tutte le cellule degli organismi viventi, animali oltre che vegetali, sempre sotto forma di miscele complesse di termini tra loro differenti per la struttura della funzione alcolica polivalente, dell'aminoalcol e soprattutto degli acidi grassi da cui derivano.

Lo studio chimico viene ulteriormente complicato in quanto intervengono oltre alla complessità delle loro miscele naturali, fenomeni di idrolisi e di transesterificazione che si verificano anche durante il lavoro di estrazione dai materiali naturali, per intervento anche di enzimi contenuti in tali materiali, ed inoltre per quelli che derivano da acidi grassi non saturi, i processi di ossidazione ad opera dell'ossigeno atmosferico che essi facilmente subiscono.

Di tutti i tipi di fosfolipidi i più abbondanti contenuti nelle specie vegetali sono i glicerofosfatidi la cui struttura deriva dall'acido alfa-glicerofosforico. Nella lecitina di soia, i glicerofosfatidi presenti in quantità piuttosto elevate sono rappresentati soprattutto dagli esteri di acidi fosfatidici con gli aminoalcol etanolamina, colina e con il polialcol mioinositolo.

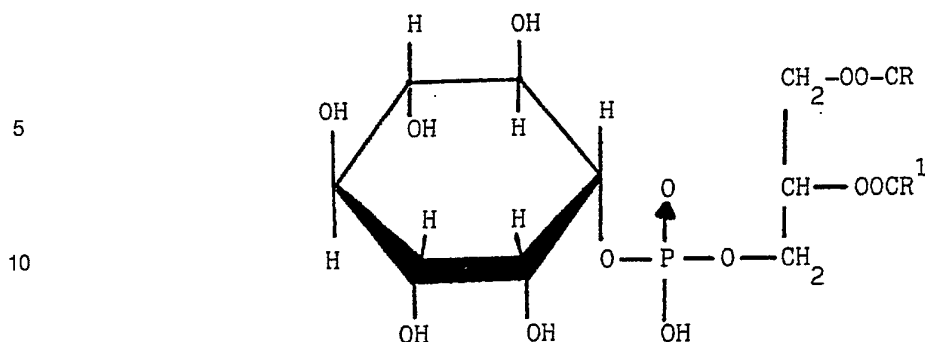
La presenza contemporanea per la etanolamina e per la colina di un raggruppamento alcolico oltre ad un raggruppamento aminico porterebbe a pensare al formarsi di un legame di natura salina tra l'acido fosfatidico e lo stesso aminogruppo. Infatti se l'intervento fosse di natura chimica senz'altro si avrebbe soprattutto la possibilità di avere un legame salino o amidico a seconda che la reazione venisse condotta a bassa o ad alta temperatura, mentre essendo l'intervento di natura enzimatica quello che si forma è un legame estereo.

Va inoltre fatto presente che la particolare natura chimica finale di questi esteri con aminoalcoli può portare a prodotti presentanti una struttura di natura betainica del tipo:



dove R ed R¹, che possono essere uguali o diversi, rappresentano un residuo di un acido grasso, saturo od insaturo, con catena di lunghezza compresa tra 15 e 20 atomi di carbonio.

Per quanto riguarda l'estere dell'acido fosfatidico con l'inositolo, delle varie forme di inositolo, solo il mioinositolo è stato per ora perfettamente caratterizzato nei fosfolipidi naturali: i fosfatidilmioinositoli presentano la seguente formula generale:



dove R ed R¹ hanno i significati precedentemente indicati.

La caratterizzazione completa del prodotto isolato ha confermato che l'ossidrile in posizione 1 dell'inositolo è quello esterificato con il raggruppamento dell'acido fosfatidico.

Scopo ed oggetto principale della presente invenzione è quello di fornire un procedimento per l'ottenimento di fosfatidiletanolamina e fosfatidimiositolo per separazione da lecitina di soia, procedimento che sia industrialmente vantaggioso sotto il profilo delle rese, della purezza dei composti risultanti e della riproducibilità di processo.

Uno scopo più specifico della presente invenzione è quello di ottenere i composti sopra indicati con un grado di purezza idoneo per un impiego terapeutico.

Lo scopo ed oggetto principale della presente invenzione viene conseguito con un procedimento che si caratterizza per gli stadi seguenti:

(a) solubilizzazione a caldo della lecitina di soia di partenza con un solvente clorurato scelto tra cloroformio, diclorometano, dicloroetano e tricloroetilene;

(b) addizione sotto agitazione alla soluzione raffreddata a temperatura ambiente di silice di qualità per cromatografia, con granulometria compresa tra 20 e 100 micron e porosità compresa tra 60 e 500 · 10⁻¹⁰ m (60 e 500 Angstrom) e riscaldamento della sospensione risultante;

(c) filtrazione della sospensione con ottenimento di un filtrato (F) e di un precipitato (P);

(d) trattamento a caldo del filtrato con una base ammoniacale quaternaria a lunga catena alchilica e silice della stessa qualità sopra definita;

(e) filtrazione della soluzione dopo raffreddamento e trattamento del filtrato sotto agitazione con idrato d'ammonio;

(f) evaporazione a pressione ridotta della soluzione fino ad ottenere un olio e trattamento con etanolo a ricadere;

(g) separazione del fosfatidimiositolo per cristallizzazione;

(h) trattamento a caldo del precipitato (P) dello stadio (c) con una miscela di un solvente clorurato quale sopra definito e di un alcool alifatico scelto tra metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo e loro miscele, e filtrazione;

(i) trattamento a caldo della silice residua dello stadio (c) con miscela solvente e filtrazione analoga a quella dello stadio (h);

(j) evaporazione a secchezza sotto pressione ridotta dei filtrati degli stadi (h) ed (i) riuniti e sospensione del residuo risultante in etanolo assoluto a caldo;

(k) filtrazione della sospensione risultante ed essiccamento sotto vuoto del precipitato con ottenimento della fosfatidiletanolamina.

Un aspetto importante e degno di nota del procedimento della presente invenzione è che esso consiste in una serie di operazioni che non includono reazioni chimiche che possono alterare o comunque comportare perdite dei composti desiderati sotto forma di sottoprodotti.

L'esempio che segue illustra una forma di realizzazione preferita del procedimento della presente invenzione, senza avere tuttavia titolo limitativo.

Si descrive qui di seguito in modo dettagliato il procedimento oggetto della presente invenzione che prevede uno sviluppo attraverso le seguenti fasi di purificazione utilizzando la lecitina di soia.

ESEMPIO

Kg. 1 di lecitina di soia grezza, umida, macinata vengono utilizzati tali e quali sciogliendola per contatto con litri 10 di cloruro di metilene o altro solvente clorurato.

Lo scioglimento avviene in un pallone di vetro munito di agitatore, termometro, bagno riscaldante e refrigerante a bolle per regolare la ebollizione del liquido. Si pone a ricadere del solvente per un tempo di circa 1 ora fino a solubilizzazione quasi completa.

Si raffredda la soluzione contenuta nel pallone alla temperatura di 20°C e sempre sotto agitazione si aggiunge una quantità pari a Kg. 1 di silice per cromatografia e si mantiene in agitazione riprendendo il riscaldamento della massa per altre 2 ore.

Si raffredda tale sospensione che viene quindi filtrata su Bukner munito di setto poroso o con l'utilizzo di una centrifuga, lavando ripetutamente la parte silicea con del cloruro di metilene. Il filtrato contiene del fosfatidilinositolo impuro di acidi fosfatidici mentre il precipitato e la parte silicea vengono messi da parte e successivamente trattati per il ricupero della fosfatidiletanolamina.

5 Il filtrato cioè la soluzione come sopra ottenuta viene riportata in un pallone addizionato di g. 50 di una base ammoniacca quaternaria a lunga catena alchilica come cetiltrimetilammonio bromuro o il benzildimetiladesecilammonio bromuro che si sciolgono nella soluzione e si aggiungono ulteriori g. 100 di silice del tipo per uso cromatografico.

10 Si pone la soluzione a ricadere per un tempo complessivo di 1 ora, si raffredda e si filtra il tutto su setto poroso.

Il filtrato viene trattato con l'1% del volume totale che ha con NH_4OH 32%: si lascia in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti e poi si filtra su un setto poroso.

15 Si evapora a pressione ridotta la soluzione risultante fino ad ottenere un olio: si aggiungono ml 1000 di alcool etilico anidro e si porta a ricadere per 30 minuti. Il prodotto, fosfatidilmiositolo, cristallizza e viene separato per filtrazione come polvere e seccato con pompa meccanica sotto vuoto. Il prodotto così ottenuto ha un titolo superiore al 98% paragonato contro standard Sigma.

20 Il precipitato precedentemente messo da parte viene trattato con ml 5000 di una soluzione 85/15 V./V. di cloruro di metilene e metanolo a ricadere per 1 ora. Si filtra su setto poroso e nella soluzione rimane la fosfatidiletanolamina insieme ad impurezze di altro materiale di natura fosfatidica comunque avente un pH intorno alla neutralità.

Anche la silice precedentemente messa da parte liberata da fosfatidilmiositolo, viene trattata con 1 litro di una soluzione di metilene cloruro/metanolo 85/15 (V/V) e posta a ricadere per 15 minuti. Trascorso tale tempo la si filtra su setto poroso in vetro. La silice viene lavata ulteriormente a caldo per 15 minuti con altri 500 ml della soluzione precedente.

25 I filtrati vengono riuniti ed evaporati a secchezza a pressione ridotta. Il residuo viene quindi sospeso in 1 litro di etanolo assoluto e si riscalda a ricadere per 30 minuti.

30 Trascorso tale tempo la sospensione viene filtrata. Il precipitato viene lavato con tre porzioni successive di 200 ml di acetone puro e quindi seccato sotto vuoto. La fosfatidiletanolamina ottenuta viene macinata e presenta una purezza di circa il 95%. L'impurezza principale (2-3%) è costituita da fosfatidilmiositolo.

Rivendicazioni

35 1. Procedimento per l'ottenimento di fosfatidiletanolamina e fosfatidilmiositolo per separazione da lecitina di soia, che si caratterizza per gli stadi seguenti:

(a) solubilizzazione a caldo della lecitina di soia di partenza con un solvente clorurato scelto tra cloroformio, diclorometano, dicloroetano e tricloroetilene;

40 (b) addizione sotto agitazione alla soluzione raffreddata a temperatura ambiente di silice di qualità per cromatografia, con granulometria compresa tra 20 e 100 micron e porosità compresa tra 60 e $500 \cdot 10^{-10}$ (60 e 500 Angstrom) e riscaldamento della sospensione risultante;

(c) filtrazione della sospensione con ottenimento di un filtrato (F) e di un precipitato (P);

(d) trattamento a caldo del filtrato con una base ammoniacca quaternaria a lunga catena alchilica e silice della stessa qualità sopra definita;

45 (e) filtrazione della soluzione dopo raffreddamento e trattamento del filtrato sotto agitazione con idrato d'ammonio;

(f) evaporazione a pressione ridotta della soluzione fino ad ottenere un olio e trattamento con etanolo a ricadere;

(g) separazione del fosfatidilmiositolo per cristallizzazione;

50 (h) trattamento a caldo del precipitato (P) dello stadio (c) con una miscela di un solvente clorurato quale sopra definito e di un alcool alifatico scelto tra metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo e loro miscele, e filtrazione;

(i) trattamento a caldo della silice residua dello stadio (c) con miscela solvente e filtrazione analoga a quella dello stadio (h);

55 (j) evaporazione a secchezza sotto pressione ridotta dei filtrati degli stadi (h) ed (i) riuniti e sospensione del residuo risultante in etanolo assoluto a caldo;

(k) filtrazione della sospensione risultante ed essiccamento sotto vuoto del precipitato con ottenimento della fosfatidiletanolamina.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto solvente clorurato è cloruro di metilene.

60 3. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta base ammoniacca quaternaria di detto stadio (d) è scelta tra cetiltrimetilammonio bromuro e benzildimetiladesecilammonio bromuro.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta miscela solvente di detto stadio (i) è una miscela di cloruro di metilene e metanolo.

65