

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 348**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2006 E 06783444 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 1960416**

54 Título: **Procedimiento de purificación de ácido quenodesoxicólico**

30 Prioridad:

12.12.2005 KR 20050121605

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.04.2015

73 Titular/es:

**DAEWOONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.
(50.0%)
223-23, Sangdaewon dong Joongwon-gu
Sungnam-si
Kyunggi-do 462-120, KR y
DAEWOONG BIO INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, TAE YI;
KIM, YOUNG SOO;
LIM, YOUNG MOOK;
KIM, WOL YOUNG;
YOON, YEON JUNG;
JIN, YONG SUK;
LEE, BYUNG GOO;
CHOI, SOO JIN y
LEE, SUNG JAE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 533 348 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de purificación de ácido quenodesoxicólico

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de ácido quenodesoxicólico (ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -cólico). En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de ácido quenodesoxicólico a partir de una mezcla de ácidos quenodesoxicólicos de bajo grado contenida en la bilis porcina sólida, con alto rendimiento y pureza.

Antecedentes de la técnica

10 En general, el ácido quenodesoxicólico está contenido en la bilis de vaca, cerdo, oso o aves de corral, tales como pollo o ganso, así como en la bilis humana. El ácido quenodesoxicólico se usa como material de partida para la preparación de ácido ursodesoxicólico que es eficaz para aliviar enfermedades del sistema biliar, hiperlipidemia, coleditiasis y enfermedades crónicas del hígado, y un procedimiento típico de preparación de ácido ursodesoxicólico conocido en la técnica es tal como se indica a continuación.

15 Un procedimiento típico de preparación de ácido quenodesoxicólico comprende las etapas de: esterificar ácido cólico (ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi cólico) con metilo; proteger el grupo hidroxilo de la posición 3 α y 7 α acetilándolo con ácido acético anhídrido; oxidar el grupo hidroxilo de la posición 12 α a un grupo carbonilo usando ácido crómico y, a continuación, eliminar el grupo carbonilo mediante una reacción de reducción de Wolff-Kirchner; hidrolizar y desproteger el producto obtenido para dar ácido quenodesoxicólico. El procedimiento anterior requiere que la reacción se mantenga a una alta temperatura de más de 200°C y el suministro de materia prima puede ser interrumpido por la encefalopatía esponjiforme bovina, etc.

20

La bilis de aves de corral contiene ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico y una pequeña cantidad de ácido cólico. De esta manera, el procedimiento de separación de ácido quenodesoxicólico a partir de aves de corral es bien conocido en la técnica, pero no es económicamente razonable debido a la reducción de la oferta de la materia prima y el bajo rendimiento [véase Windhaus et al, I Physiol. Chem., 140, 177~185 (1924)].

25 La patente US N° 4.186.143 divulga un procedimiento de separación y purificación de ácido quenodesoxicólico a partir de una mezcla de ácidos quenodesoxicólicos derivada de bilis porcina natural. Este procedimiento comprende las etapas principales de: pre-tratamiento para eliminar el ácido α -hidroxi-6-oxo-5 β -cólico mediante saponificación de la bilis; esterificación de ácidos biliares; acetilación de los ésteres de ácidos biliares; eliminación del producto intermedio usando un disolvente orgánico no polar; cristalización del éster acetilado de Fórmula I; desprotección; y producción del compuesto de Fórmula I usando la cristalización en un disolvente orgánico. Sin embargo, esta patente no describe el contenido de HPLC para el éster acetilado de Fórmula I, y la pureza del producto final es muy baja, ya que la energía de rotación específica es $[\alpha]_D^{25} +13,8^\circ$ (c=1, CHCl₃), y el punto de fusión es de 119~121°C [STD: $[\alpha]_D^{25} 15,2^\circ$ (c = 1, CHCl₃), punto de fusión 127~129°C]. Además, la cristalización para purificar el producto final requiere mucho tiempo (es decir, 16-48 horas), y todo el procedimiento es complejo, tal como ocho (8) etapas. De esta manera, cuando se purifica el compuesto de Fórmula I usando el procedimiento anterior, el rendimiento del producto final es bajo, y el tiempo de reacción es de hasta 12 días. Por lo tanto, el procedimiento no es económicamente razonable.

30

35

En particular, cuando se purifica el éster acetilado de Fórmula I a partir de un sólido de bilis porcina que tiene el 5-35% en peso de contenido de ácido quenodesoxicólico usado en la presente invención usando el procedimiento anterior, a pesar de dos tiempos de recristalización en disolvente etanol, el contenido del producto final es tan bajo como el 80%.

40 Para superar los problemas anteriores, el objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo procedimiento de purificación del compuesto de Fórmula I en alta pureza y rendimiento, con el cual se reduce el tiempo requerido para todo el procedimiento.

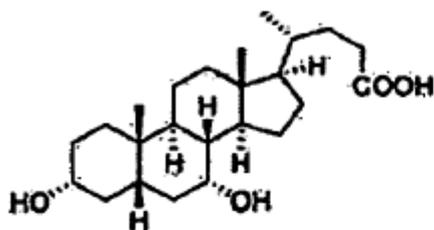
El documento EP 386 538 se refiere a un procedimiento de purificación de ácido ursodesoxicólico (ácido 3- α -7- β -dihidroxicólico), y la etapa de desprotección se lleva a cabo con éster de metilo de 3- α -7- β -dihidrocolánico.

45 El documento US 3 919 266 divulga la desprotección del éster de metilo de ácido 3- α -7- α -dihidroxi-5- β -colánico mediante la adición de KOH metanólico, acidificación con HCl acuoso y, a continuación, extracción de ácido 3- α -7- α -dihidroxi-5- β -colánico con éter etílico y cristalización del producto a partir de acetato de etilo caliente.

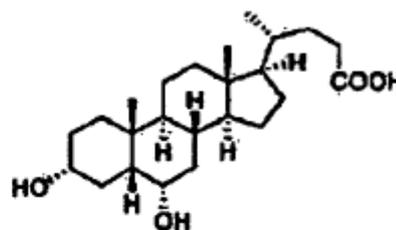
Divulgación de la invención

50 La presente invención proporciona un procedimiento de purificación del compuesto de Fórmula I, que comprende las etapas de 1) pre-tratamiento de la bilis porcina; disolviendo un sólido de bilis porcina derivado de bilis porcina, que contiene la mezcla de ácidos quenodesoxicólicos de Fórmulas I-IV,

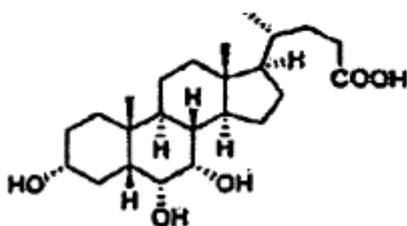
[Fórmula I]



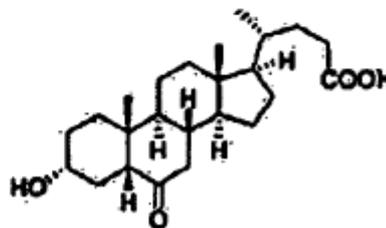
[Fórmula II]



[Fórmula III]

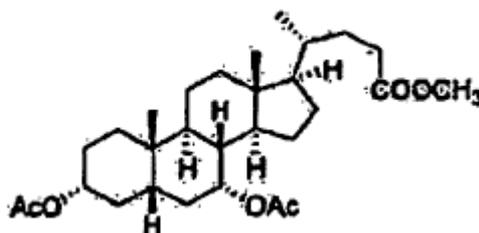


[Fórmula IV]



y que tiene el 5-35% en peso de contenido de ácido quenodesoxicólico, en sal que contiene disolvente orgánico, en el que el disolvente orgánico es acetato de etilo o acetona, y la sal es al menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en cloruro de sodio, sulfato de magnesio anhidro y sulfato de sodio anhidro; 2) esterificación de una mezcla de ácidos quenodesoxicólicos de Fórmulas I a IV añadiendo alcohol C₁₋₄ al residuo obtenido en la etapa (1); 3) acetilación de la mezcla de ésteres de ácidos quenodesoxicólicos de Fórmulas I a IV añadiendo ácido acético anhidro y una base débil seleccionada de entre acetato de sodio anhidro o piridina al residuo obtenido en la etapa (2); 4) adición de un disolvente orgánico no polar seleccionada de entre hexano, heptano, octano o isooctano al residuo obtenido en la etapa (3) y agitación bajo reflujo hasta que se disuelva todo el residuo y, posteriormente, cristalización u eliminación de los ésteres acetilados de los ácidos quenodesoxicólicos de Fórmulas I a IV y una parte de éster acetilado o ácido quenodesoxicólico de Formula II, 5) adición de metanol al residuo obtenido en la etapa (4) y cristalización del compuesto de Fórmula V

[Fórmula V]

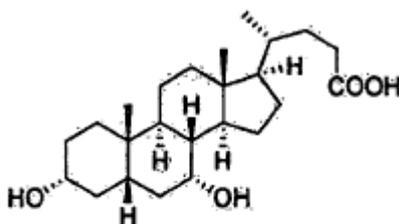


durante 2~3 horas en el intervalo de temperaturas 0~15°C; y 6) desprotección del compuesto de Fórmula V obtenido en la etapa (5) añadiendo agua y base seleccionada de entre hidróxido de sodio o hidróxido de potasio al compuesto de Fórmula V, y cristalización del compuesto de Fórmula I en presencia de agua añadiendo ácido seleccionado de entre ácido clorhídrico y ácido sulfúrico.

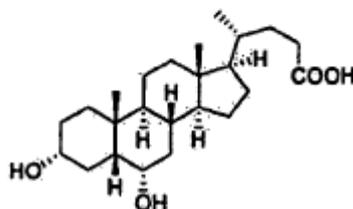
Descripción detallada de la invención

En la presente memoria descriptiva, la frase "sólido de bilis porcina" representa un sólido derivado de bilis porcina, y contiene la mezcla de ácidos quenodesoxicólicos de Fórmulas I~IV.

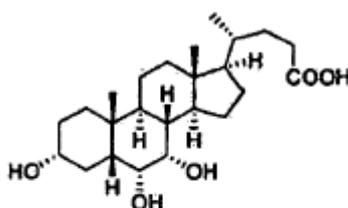
[Fórmula I]



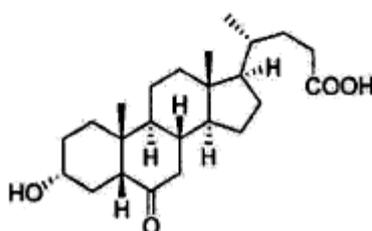
[Fórmula II]



[Fórmula III]



[Fórmula IV]



30 en las que el compuesto de Fórmula I representa ácido quenodesoxicólico (ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -cólico, CDCA); el compuesto de Fórmula II representa ácido hidesoxicólico (ácido 3 α ,6 α -dihidroxi-5 β -cólico, HDCA); el compuesto de Fórmula I representa ácido hicólico (ácido 3 α ,6 α ,7 α -trihidroxi-5 β -cólico, HCA); y el compuesto de Fórmula IV representa ácido (ceto)3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -cólico.

A continuación, se ejemplificará en detalle cada etapa de purificación del ácido quenodesoxicólico según la presente invención.

Etapa 1: Pre-tratamiento de sólido de bilis porcina

35 Para usar un sólido de bilis porcina que tiene el 5-35% en peso de contenido de ácido quenodesoxicólico en la etapa de purificación, todo el sólido de bilis porcina se agita y se disuelve en un disolvente orgánico con reflujo. A continuación, la mezcla se enfría a temperatura ambiente, y se agita adicionalmente durante 1-2 horas. A continuación, los materiales insolubles se eliminan de la mezcla usando papel de filtro, preferentemente papel de filtro y tierra de diatomeas. El

disolvente orgánico se elimina bajo presión reducida para obtener residuos (CDCA, HDCA, HCA y ceto), que se usan en la etapa siguiente. La sal usada en la presente etapa puede ser seleccionada opcionalmente siempre que no afecte a los compuestos en el reactivo. Preferentemente, la sal es al menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en cloruro de sodio, sulfato de magnesio anhidro ($MgSO_4$) y sulfato de sodio anhidro, más preferentemente cloruro de sodio.

La cantidad de sal usada en la presente etapa es preferentemente del 5~10% en peso, en base a la cantidad de disolvente orgánico. Si la cantidad de sal es menor del 5% en peso, el agua y los materiales insolubles (tales como ácidos grasos, etc.) en el sólido de bilis porcina no se eliminan suficientemente, lo que dificulta la filtración y reduce el rendimiento y la velocidad de la reacción de esterificación. Si la cantidad de sal es mayor del 10% en peso, la sal superflua permanece como impureza, lo que dificulta la purificación. Preferentemente, el disolvente orgánico puede ser seleccionado opcionalmente de entre los que pueden disolver ácido quenodesoxicólico a partir del sólido de bilis porcina y no tienen efectos adversos sobre el mismo. Más preferentemente, el disolvente es acetato de etilo o acetona.

Etapa 2: Esterificación de ácido quenodesoxicólico

Se añade alcohol a los residuos de la mezcla de ácidos quenodesoxicólicos obtenidos a partir de la etapa anterior y, a continuación, la solución se agita con reflujo antes de que el residuo sea disuelto completamente. A continuación, la solución se enfría a 0-5°C. Se añade catalizador ácido a la solución, que se agita con reflujo a temperatura ambiente hasta que se completa la reacción de esterificación de la mezcla de ácidos quenodesoxicólicos. Una vez completada la reacción, la solución se neutraliza mediante la adición de base y, a continuación, se filtra. El material filtrado se lava con alcohol y se concentra bajo presión reducida para obtener una mezcla de ésteres de ácidos quenodesoxicólicos (CDCA-Me, HDCA-Me, HCA-Me y ceto-Me) como residuo. El alcohol usado en la presente etapa no está específicamente limitado pero, preferentemente, es un alcohol inferior que tiene 1-4 de átomos de carbono, más preferentemente metanol, en aras de la facilidad de la reacción de esterificación. Preferentemente, el catalizador ácido usado en la presente etapa es ácido sulfúrico o ácido para-toluenosulfónico (PTSA), y la base es bicarbonato de sodio, carbonato de sodio o carbonato de potasio.

Etapa 3: Acetilación del éster de ácido quenodesoxicólico

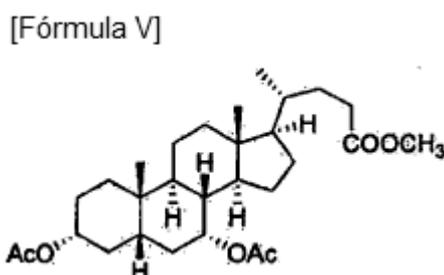
Todos los grupos hidroxilo en la mezcla de ésteres de ácidos quenodesoxicólicos son acetilados mediante la adición de ácido acético anhidro y base débil al residuo obtenido en la etapa anterior con reflujo. Cuando se completa la reacción, se añade tolueno a la solución de reacción con agitación a reflujo. A continuación, el ácido acético anhidro, el ácido acético y la base restante después de la reacción se eliminan concentrando la solución de reacción a presión reducida, para obtener una mezcla de ésteres de ácidos quenodesoxicólicos acetilados (CDCA-DiAc-Me, HDCA-DiAc-Me, HCA-TriAc-Me y ceto-Ac-Me) como residuo. Preferentemente, la base débil usada en la presente etapa es acetato de sodio anhidro o piridina, siendo más preferente el acetato de sodio anhidro.

Etapa 4: Eliminación de los productos intermedios de las Fórmulas III y IV

Se añade disolvente no polar al residuo. La mezcla se agita con reflujo hasta que se disuelve todo el residuo y se enfría a temperatura ambiente. Manteniendo la temperatura del disolvente dentro del intervalo 20~25°C, los productos intermedios de las Fórmulas III y IV; y una parte del producto intermedio de Fórmula II (HCA-triAc-Me, ceto-Ac-Me y parte de HDCA-diAc-Me) se cristalizan y se eliminan mediante filtración. El material filtrado de esta manera se lava adicionalmente con disolvente no polar y, a continuación, la solución filtrada y lavada se concentra bajo presión reducida y se seca en vacío. Preferentemente, el disolvente no polar usado en la presente etapa es hexano, heptano, octano, isooctano y similares, más preferentemente, hexano o heptano.

Etapa 5: Producción de diacetato-metil-éster de ácido quenodesoxicólico

Para producir diacetato-metil-éster de ácido quenodesoxicólico (CDCA-diAc-Me) de Fórmula V, que es un producto intermedio para preparar el compuesto de Fórmula I, se añade disolvente de alcohol al producto obtenido en la etapa anterior y, a continuación, el compuesto de Fórmula V se cristaliza dejando la mezcla durante 2~3 horas a 0°C~15°C, preferentemente 0°C~5°C.



Si la temperatura es menor de 0°C, el contenido para el compuesto de Fórmula V se reduce, y si la temperatura es mayor de 15°C, la cristalización no se realiza de manera suficiente. Cuando el compuesto de Fórmula V se cristaliza, el producto intermedio de Fórmula II se elimina del disolvente mediante filtración. El material filtrado de esta manera se lava con disolvente de alcohol, y se seca en vacío para obtener diacetato-metil-éster de ácido quenodesoxicólico de Fórmula V como un producto bruto. Para purificar el compuesto de Fórmula V con alta pureza, se realiza una recristalización hasta que el contenido para el compuesto de Fórmula V es del 98,5% o más, preferentemente del 99% o más, en las mismas condiciones. Para obtener el contenido del 99% o más, es preferente realizar la recristalización tres (3) veces o más. El alcohol usado en la cristalización es preferentemente metanol, teniendo en cuenta el contenido para el compuesto de Fórmula V. La cantidad de alcohol usado en la cristalización es de 0,5-3 veces, preferentemente de 1,5-3 veces, la cantidad de residuo. Si la cantidad es menor que 0,5 veces, la filtración es difícil ya que los cristales se coagulan entre sí. Si la cantidad es mayor que 3 veces, el contenido para el compuesto de Fórmula V no se ve afectado por la cantidad.

Etapa 6: Desprotección y cristalización de ácido quenodesoxicólico

El compuesto de Fórmula V obtenido en la etapa anterior se desprotege en presencia de una base, y el pH de la solución de reacción se ajusta a 4 o un valor menor, preferentemente 2-3 en condición ácida, para formar ácido quenodesoxicólico de Fórmula I. Simultáneamente, la solución de reacción permanece a 35~45°C, preferentemente 35~40°C, para cristalizar el compuesto de Fórmula I en presencia de agua. La solución de reacción se filtra, se lava con agua y se seca en vacío para refinar puramente el ácido quenodesoxicólico. La base usada para la desprotección no está limitada específicamente, pero es preferente el hidróxido de sodio o el hidróxido de potasio para la etapa de post-tratamiento. Si el pH es mayor de 4, no se forman cristales, y si el pH es menor de 2, la pureza del producto final disminuye debido al ácido superfluo. Si la temperatura de cristalización en el agua es menor de 35°C, la pureza del compuesto de Fórmula I disminuye, y si la temperatura es mayor de 45°C, la filtración es difícil ya que los cristales derivados del compuesto de Fórmula I coagulan entre sí. El ácido usado en la neutralización de la solución de reacción tampoco está limitado específicamente, pero preferente el ácido clorhídrico o el ácido sulfúrico para la etapa de post-tratamiento. Debido a que el residuo obtenido en la etapa anterior contiene el 98,5% o más del compuesto de Fórmula V, preferentemente el 99% o más, el compuesto de Fórmula I puede ser refinado puramente sin cristalización adicional usando disolvente orgánico ya que el contenido de impurezas es bajo. El producto que contiene el compuesto de Fórmula I cristalizado en agua según la presente invención es adecuado para el procedimiento de fabricación industrial debido a que su punto de fusión es de aproximadamente 20°C más alto, y tiene menor volumen, que el compuesto cristalizado de Fórmula I en disolvente orgánico.

La presente invención se explicará más específicamente en los ejemplos siguientes. Sin embargo, debería entenderse que los ejemplos siguientes pretenden ilustrar la presente invención, y no pueden limitar, en manera alguna, el alcance de la presente invención.

Procedimiento analítico

Se usó HPLC para confirmar los productos intermedios separados en cada etapa, y las condiciones de ensayo son las siguientes:

Columna: Capcell pak UG120 C18 (4,6 x 250 mm, Shiseido)

Fase móvil: Acetonitrilo/agua (85:15)

Detector: Espectrómetro ultravioleta (210 nm)

Caudal: 1,0 ml/min

Inserción: 20 µl

Ejemplo

Etapa 1: Pre-tratamiento de sólido de bilis porcina

150 g de sólido de bilis porcina que tenía el 30~35% en peso de contenido de ácido quenodesoxicólico y 60 g de cloruro de sodio en 600 ml de acetato de etilo se agitaron con reflujo durante 1 hora, para disolver todo el sólido de bilis porcina. A continuación, la mezcla se enfrió a 20-25°C, se agitó durante 1 hora, y se filtró a través de tierra de diatomeas, y el material filtrado de esta manera se lavó con 60 ml de acetato de etilo. El disolvente orgánico se eliminó mediante concentración del material filtrado bajo presión reducida para obtener una mezcla de ácidos quenodesoxicólicos (CDCA, HDCA, HCA y ceto) como residuo.

Etapa 2: Esterificación de ácido quenodesoxicólico

Al residuo obtenido en la etapa anterior se añadieron 375 ml de metanol, y la solución mezclada se agitó con reflujo durante 30 minutos hasta que el residuo se disolvió completamente. Esta solución se enfrió a 0~10°C, se añadieron 4,88 ml de ácido sulfúrico a la solución con agitación y, a continuación, la reacción de esterificación de la mezcla de ácidos quenodesoxicólicos se completó agitando a 20-25°C durante 2 horas. Cuando se completó la reacción de esterificación, la solución se neutralizó con 53,9 g de bicarbonato de sodio y, a continuación, se filtró. El material filtrado de esta manera se lavó con 150 ml de metanol y se concentró a presión reducida para obtener 134 g de mezcla de éster de ácido quenodesoxicólico (CDCA-Me, HDCA-Me, HCA-Me y ceto-Me) como residuo.

Etapa 3: Acetilación del éster de ácido quenodesoxicólico

A 134 g de la mezcla de éster de ácido quenodesoxicólico obtenido en la etapa anterior se añadieron 20 g de acetato de sodio anhidro y 200 ml de ácido acético anhidro. La solución mezclada se sometió a reflujo a 120~140°C durante 5 horas y, a continuación, se concentró inmediatamente bajo presión reducida. El ácido acético anhidro y el ácido acético se eliminaron completamente mediante la adición de 25 ml de tolueno a la solución de reacción, agitando a reflujo durante 15 minutos, y concentrando bajo presión reducida, para obtener una mezcla de éster de ácido quenodesoxicólico acetilado (CDCA-diAc-Me, HDCA-diAc-Me, HCA-triAc-Me y ceto-Ac-Me) como residuo. Resultado de HPLC para el residuo (RT): HCA-triAc-Me (8,76 min), ceto-Ac-Me (9,05min), CDCA-diAc-Me (12,21min) y HDCA-diAc-Me (12,81min),

Etapa 4: Extracción de productos intermedios de Fórmulas III y IV

Al residuo obtenido en la etapa anterior se añadió disolvente no polar (400ml de hexano) y, a continuación, la solución mezclada se agitó con reflujo durante 30 minutos. A continuación, el hexano disolvente se enfrió a 25-35°C, se agitó durante 3 horas y, a continuación, se filtró. El material filtrado de esta manera (HCA-triAc-Me, ceto-Ac-Me y parte de HDCA-diAc-Me) se lavó adicionalmente con 65 ml de hexano, y la solución filtrada y lavada se concentró a presión reducida para obtener los productos intermedios de Fórmulas I y II (CDCA-diAc-Me, HDCA-diAc-Me) como residuo. Resultado de HPLC para el residuo (RT): CDCA-diAc-Me (12,21 min) y HDCA-diAc-Me (12,81 min).

Etapa 5: Producción de diacetato-metil-éster de ácido quenodesoxicólico

Al residuo obtenido en la etapa anterior se añadieron 270 ml de metanol, y la solución mezclada se agitó con reflujo durante 30 minutos, se enfrió a 0~10°C, se agitó adicionalmente durante 2 horas y, a continuación, se filtró. El material filtrado (CDCA-diAc-Me) se lavó con 70 ml de metanol y se secó en vacío a 60°C para obtener el 85% de contenido de producto bruto. A continuación, se añadieron 72 ml de metanol al producto en bruto, y se realizó una recrystalización a la mezcla a 0~5°C durante 2 horas. Se lleva a cabo una recrystalización adicional de la mezcla para obtener un contenido del 99% de diacetato-éster de ácido quenodesoxicólico. El rendimiento es de 24,5 g (19,5 g + licor madre 5 g). P.f : 128~129°C. Resultado de HPLC para el residuo (RT): CDCA-diAc-Me (12,21 min).

Etapa 6: Desprotección y cristalización de ácido quenodesoxicólico

Se añadieron 24,5 g de diacetato-éster de ácido quenodesoxicólico y 29,5 g de hidróxido de sodio a 220 ml de agua y, a continuación, la solución se agitó con reflujo durante 4 horas. Se añadieron 370 ml de agua a la solución. El pH de la solución se ajustó a 2,0-3,0 usando 59 ml de ácido clorhídrico. A continuación, la solución se agitó a 35~45°C durante 1 hora y, a continuación, se filtró. El material filtrado se lavó con 24,5ml de agua y se secó en vacío a 70°C para obtener 19,5 g de ácido quenodesoxicólico puro, p.f.: 160~161°C, $[\alpha]_D^{25} +13,0^\circ$ (c = 1, CHCl₃).

Ejemplo comparativoEtapa 1: Pre-tratamiento de la bilis

Se disolvieron 150 g de bilis porcina concentrada en 1.000 ml de agua caliente. A continuación, se añadieron 10 g de hidróxido de sodio y la solución se agitó con reflujo durante 20 horas. Esta solución se enfrió a 25°C. Se añadieron 1.500 ml de agua a la solución, que se mantuvo fría durante un día. Se añadieron 10 g de tierra de diatomeas a la solución de reacción, la cual, a continuación, se agitó y se filtró para eliminar el 3 α -hidroxi-6-cetocolato de sodio precipitado de Fórmula IV. El filtrado se ajustó a pH 8 usando ácido sulfúrico concentrado y, a continuación, se agitó durante 15 minutos después de añadir 5 g de hidrosulfito de sodio. A continuación, se añadieron 400 ml de acetato de etilo a la solución, la cual, a continuación, se ajustó a pH 5 usando ácido sulfúrico diluido. La solución se agitó durante 30 minutos y la capa acuosa se eliminó de la misma mediante separación de capas. Se añadieron 7 g de tierra de diatomeas y 7 g de carbón activo a la capa orgánica, la cual, a continuación, se agitó durante 30 minutos y se filtró. El material filtrado de esta manera se lavó con 50 ml de acetato de etilo y se concentró bajo presión reducida.

Etapa 2: Esterificación de ácido biliar

El residuo obtenido en la etapa anterior se disolvió en 300 ml de metanol. A continuación, la solución se neutralizó con bicarbonato de sodio (pH 7), se filtró y, a continuación, se concentró bajo presión reducida.

Etapa 3: Eliminación de éster metílico de Fórmula II

- 5 El residuo obtenido en la etapa anterior se disolvió en 320 ml de benceno caliente, y la solución mezclada se concentró a 225 ml, y se mantuvo fría durante un día. A continuación, la solución se filtró; el material filtrado de esta manera (aducto metil éster benceno de Fórmula II) se lavó con benceno, y la solución filtrada con benceno y lavada se concentró bajo presión reducida.

Etapa 4: Acetilación de éster de ácido biliar

- 10 Al residuo obtenido en la etapa anterior se añadieron 75 ml de ácido acético anhidro y 7,5 g de acetato de sodio anhidro y, a continuación, la solución mezclada se agitó con reflujo durante 5 horas. El ácido acético anhidro restante se eliminó mediante destilación de ácido acético anhidro, agitación con reflujo durante 15 minutos después de la adición de 35 ml de metanol y, a continuación, destilación a presión reducida.

Etapa 5: Eliminación de éster acetilado de Fórmula III

- 15 El residuo obtenido en la etapa anterior se sometió a reflujo en 200 ml de disolvente de hexano, y la solución se almacenó a 20°C durante un día, y se filtró. El material filtrado de esta manera (cristal en bruto de HDC A-triAc-Me) se lavó con hexano y la solución filtrada y lavada se destiló a presión reducida.

Etapa 6: Separación del compuesto de Fórmula V

- 20 El residuo obtenido en la etapa anterior se disolvió en 46 ml de etanol caliente y, a continuación, se mantuvo frío durante un día. Esta solución se filtró, y el material filtrado de esta manera se lavó con 27 ml de etanol frío y se secó en vacío a 60°C. Se recristalizaron 21,5 g del compuesto de Fórmula V, 3 veces, usando etanol para obtener 18,5 g de producto, p.f. 119~121°C; $[\alpha]_D^{25} +10,4^\circ$ (c = 1, Dioxano); $[\alpha]_D^{25} +13,8^\circ$ (c = 1, CHCl₃).

Etapa 7: Saponificación y neutralización

- 25 Se añadieron 18,5 g de diacetato-metil-éster de ácido quenodesoxicólico y 18,5 g de hidróxido de sodio a 185 ml de agua y, a continuación, la solución mezclada se agitó con reflujo durante 14 horas. A continuación, el pH de la solución se ajustó a 4,5 usando ácido sulfúrico concentrado.

Etapa 8: Producción del compuesto de Fórmula I

- 30 La solución de reacción se extrajo usando acetato de etilo, y la capa acuosa se descartó de la misma. La capa de acetato de etilo en la solución se lavó con 6% de solución salina, y la solución se destiló a aproximadamente 90 ml. Esta solución se enfrió, se mantuvo fría durante un día después de añadir 90 ml de hexano, y se filtró. El material filtrado de esta manera se lavó con 20 ml de hexano, y se secó en vacío a 60°C para producir 12,7 g de ácido quenodesoxicólico. p.f. 142~145°C; $[\alpha]_D^{25} +13,0^\circ$ (c = 1, CHCl₃).

Aplicabilidad industrial

- 35 La presente invención puede purificar el ácido quenodesoxicólico de Fórmula I a partir de sólido de bilis porcina con alto rendimiento y pureza. Además, la presente invención es adecuada para la purificación industrial, reduciendo el tiempo de purificación.

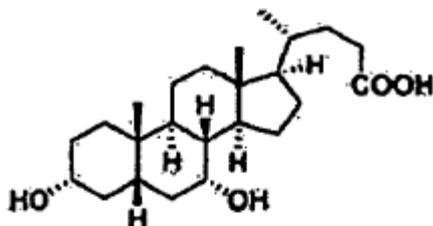
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación del compuesto de Fórmula I, que comprende las etapas de:

1) pre-tratamiento de la bilis porcina, disolviendo el sólido de bilis porcina derivado de bilis porcina, que contiene la mezcla de ácidos quenodesoxicólicos de Fórmulas I-IV,

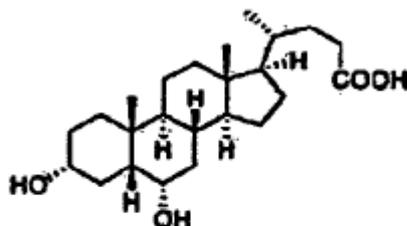
5

[Fórmula I]



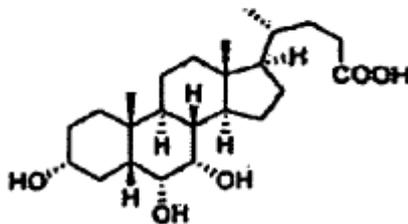
10

[Fórmula II]



15

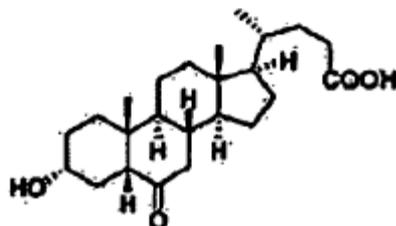
[Fórmula III]



20

25

[Fórmula IV]



30

y que tiene el 5-35% en peso de contenido de ácido quenodesoxicólico, en sal que contiene disolvente orgánico, en el que el disolvente orgánico es acetato de etilo o acetona, y la sal es al menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en cloruro de sodio, sulfato de magnesio anhidro y sulfato de sodio anhidro;

35

2) esterificación de una mezcla de ácidos quenodesoxicólicos de Fórmulas I a IV añadiendo alcohol C_{1-4} al residuo obtenido en la etapa (1);

3) acetilación de la mezcla de ésteres de ácidos quenodesoxicólicos de Fórmulas I a IV añadiendo ácido acético

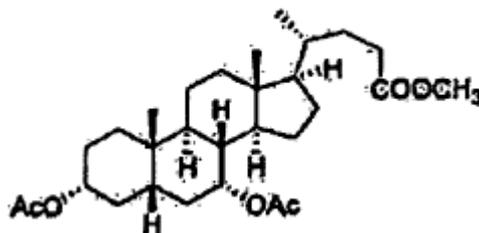
anhidro y una base débil seleccionada de entre acetato de sodio anhidro o piridina al residuo obtenido en la etapa (2);

5 4) añadir un disolvente orgánico no polar seleccionado de entre hexano, heptano, octano o isooctano al residuo obtenido en la etapa (3) y agitar bajo reflujo hasta que se disuelva todo el residuo y, posteriormente, cristalizar y eliminar los ésteres acetilados de los ácidos quenodesoxicólicos de Fórmulas I a IV y una parte del éster acetilado o ácido quenodesoxicólico de Formula II;

5) añadir metanol al residuo obtenido en la etapa (4) y cristalizar el compuesto de Fórmula V

[Fórmula V]

10



durante 2~3 horas en el intervalo de temperaturas 0~15°C; y

15

6) desprotección del compuesto de Fórmula V obtenido en la etapa (5) añadiendo agua y base seleccionada de entre hidróxido de sodio o hidróxido de potasio al compuesto de Fórmula V, y cristalización del compuesto de Fórmula I en presencia de agua añadiendo un ácido seleccionado de entre ácido clorhídrico y ácido sulfúrico.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cantidad de sal es del 5-10% en peso, en base al peso total de disolvente orgánico.

20

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la pureza del compuesto de Fórmula V obtenido en la etapa (5) es del 98,5% o superior.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de cristalización se lleva a cabo en el intervalo de temperaturas de 0-5°C.

25

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cantidad de metanol usado en la etapa (5) es 0,5~3 veces la cantidad de residuo obtenida en la etapa (4).

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pH de la desprotección en la etapa (6) es 4 o menor.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cristalización en presencia de agua en la etapa (6) se lleva a cabo en el intervalo de temperaturas de 35~45°C.