

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 026**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2006 E 06783458 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 1966228**

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

30 Prioridad:

30.12.2005 KR 20050134837

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

04.05.2015

73 Titular/es:

**DAEWOONG BIO INC. (50.0%)
35-9, Jeyakgongdan 4-gil, Hyangnam-eup,
Hwaseong-si
Gyeonggi-do 445-937, KR y
DAEWOONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.
(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 2 535 026 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 del ácido quenodesoxicólico

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar ácido quenodesoxicólico (ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -cólico). En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para purificar ácido quenodesoxicólico a partir de una mezcla de ácido quenodesoxicólico de baja calidad contenido en el sólido de bilis porcina, con gran rendimiento y pureza.

Técnica antecedente

10 El ácido quenodesoxicólico está contenido generalmente en la bilis de vacas, cerdos, osos o aves de corral tales como pollos o gallinas, así como en la bilis de seres humanos. 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, colelitiasis y enfermedades crónicas del hígado, y un procedimiento típico para preparar ácido ursodesoxicólico conocido en la técnica es como sigue.

15 Un procedimiento típico para preparar ácido quenodesoxicólico comprende las etapas de: esterificar el ácido cólico (ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxicólico) con metilo; proteger el grupo hidroxilo de las posiciones 3 α y 7 α acetilándolas con ácido acético anhidro; oxidar el grupo hidroxilo de la posición 12 α a un grupo carbonilo usando ácido crómico y a continuación retirar el grupo carbonilo por la reacción de reducción de Wolff-kichner; hidrolizar y desproteger el producto obtenido para producir ácido quenodesoxicólico. El procedimiento anterior requiere que la reacción de reducción de Wolff-kichner se mantenga a una temperatura alta de más de 200 °C, y el suministro de material sin procesar puede interrumpirse por encefalopatía esponjiforme bovina, etc.

20

La bilis de las aves de corral contiene ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico y una pequeña cantidad de ácido cólico. De esta manera, el procedimiento para separar el ácido quenodesoxicólico a partir de las aves de corral se conoce bien en la técnica, pero no es económicamente razonable debido a la disminución de suministro de material sin procesar y al bajo rendimiento [véase, Windhaus et al, I Physiol. Chem., 140, 177~185 (1924)].

25 La Patente de Estados Unidos N° 4.186.143 desvela un procedimiento para separar y purificar puramente ácido quenodesoxicólico a partir de una mezcla de ácido quenodesoxicólico derivado de bilis porcina natural. Este procedimiento comprende las etapas principales de: pre-tratamiento para retirar el ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -cólico por saponificación de la bilis; esterificación del ácido biliar; acetilación del éster de ácido biliar; retirada 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 el poder rotatorio específico es $[\alpha]_D^{25} + 13,8^\circ$ (c=1, CHCl₃), y el punto de fusión es 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 un tiempo muy largo (es decir, 16-48 horas), y el procedimiento entero es complejo como ocho (8) etapas. De esta manera, cuando se purifica el compuesto de fórmula I usando el procedimiento anterior, el rendimiento del producto final se hace bajo, y el tiempo de reacción es tan largo como 12 días. Por lo tanto, el procedimiento no es económicamente razonable.

30

35

En particular, cuando el procedimiento anterior se aplica al sólido de bilis porcina que tiene un contenido del 35~55 % en peso de ácido quenodesoxicólico usado en la presente invención, la agitación y el filtrado son difíciles ya que el compuesto deseado precipita y se coagula junto con las impurezas.

40

Para superar los problemas anteriores, el objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo procedimiento para purificar el compuesto de fórmulas I y II con pureza y rendimiento altos, reduciendo el tiempo requerido para todo el procedimiento.

45 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 3- α -7- β -dihidrocolánico.

El documento US 3 919 266 desvela la desprotección del éster de metilo de ácido 3- α -7- α -dihidroxi-5- β -colánico añadiendo KOH metanólico, acidificando con HCl acuoso y a continuación extrayendo el ácido 3- α -7- α -dihidroxi-5- β -colánico con éter de etilo y cristalizando el producto a partir de acetato de etilo caliente.

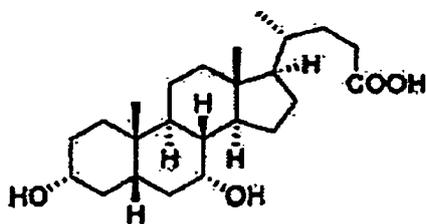
50 El documento WO 2007/069814 describe un procedimiento alternativo para la purificación del ácido quenodesoxicólico.

Divulgación de la invención

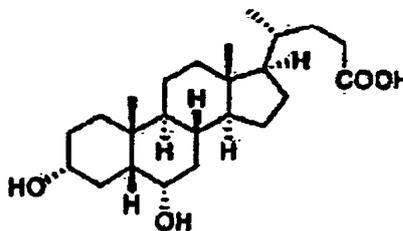
La presente invención proporciona un procedimiento para purificar el compuesto de fórmula I, que comprende las etapas de: 1) pre-tratamiento de la bilis porcina disolviendo el sólido de bilis porcina derivado de la bilis porcina, que

contiene la mezcla de ácidos quenodesoxicólicos de Fórmulas I-IV,

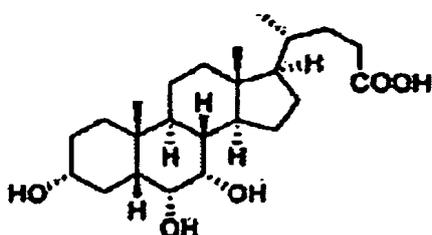
[Fórmula I]



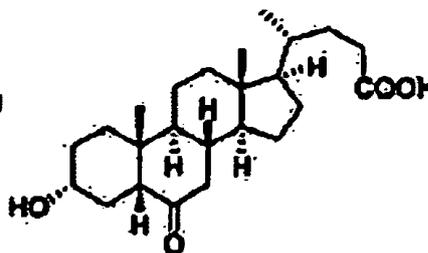
[Fórmula II]



[Fórmula III]

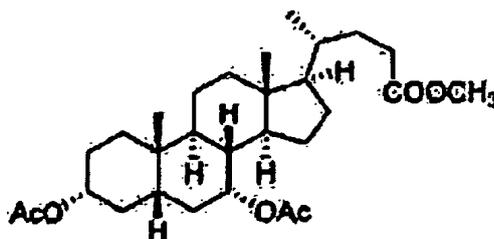


[Fórmula IV]



- 5 y que tiene un contenido del 35-55 % en peso de ácido quenodesoxicólico, en un disolvente orgánico que contiene sal, en el que el disolvente orgánico es acetato de etilo o acetona, y la sal es al menos una seleccionada del grupo que consiste en cloruro sódico, sulfato magnésico anhidro y sulfato sódico anhidro; 2) esterificación de una mezcla de ácidos quenodesoxicólicos de fórmulas I a IV añadiendo un alcohol C₁₋₄ al resto obtenido a partir de la etapa (1); 3) acetilación de la mezcla de ésteres de los ácidos quenodesoxicólicos de fórmulas I a IV añadiendo ácido acético anhidro y una base débil seleccionada de acetato sódico anhidro o piridina al resto obtenido a partir de la etapa (2); 4) añadir un disolvente orgánico no polar seleccionados de hexano, heptano, octano o isooctano al resto obtenido a partir de la etapa (3) y agitar a reflujo hasta que todo el resto se disuelva, y posteriormente cristalizar y retirar los ésteres acetilados de los ácidos quenodesoxicólicos de fórmulas III a IV, y una parte del éster acetilado del ácido quenodesoxicólico de fórmula II; 5) añadir un alcohol C₁₋₄ al resto obtenido a partir de la etapa (4) y cristalizar el compuesto de fórmula V

[Fórmula V]

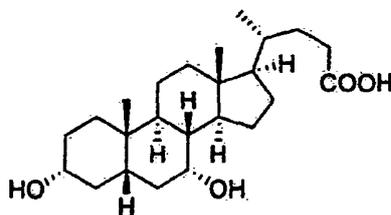


- 15 durante 2-3 horas en un intervalo de temperatura de 20 ~ 25 °C; y 6) desprotección del compuesto de fórmula V obtenido a partir de la etapa (5) añadiendo agua y una base seleccionada de hidróxido sódico o hidróxido potásico al compuesto de fórmula V, y cristalización del compuesto de fórmula I en presencia de agua añadiendo un ácido seleccionado de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

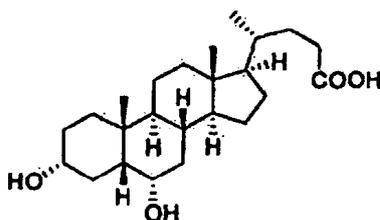
20 **Descripción detallada de la invención**

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

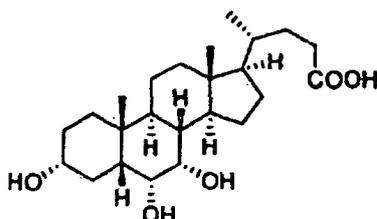
[Fórmula I]



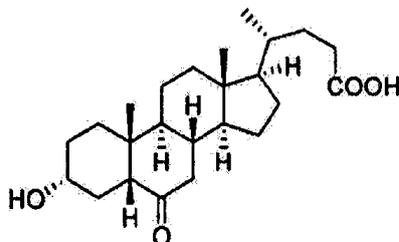
[Fórmula II]



[Fórmula III]



[Fórmula IV]



- 5 en las que, el compuesto de fórmula I representa ácido quenodesoxicólico (ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -cólico, AQDC); el compuesto de fórmula II representa ácido hidrosodesoxicólico (ácido 3 α ,6 α -dihidroxi-5 β -cólico, AHDC); el compuesto de fórmula III representa ácido hiocólico (ácido 3 α ,6 α ,7 α -trihidroxi-5 β -cólico, AHC); y el compuesto de fórmula IV representa ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-5 β -cólico (ceto).

10 En lo sucesivo en el presente documento, cada etapa para purificar ácido quenodesoxicólico de acuerdo con la presente invención se ejemplificará con detalle.

Etapa 1: Pre-tratamiento del sólido de bilis porcina

15 Para usar el sólido de bilis porcina que tiene un contenido del 35~55 % en peso de ácido quenodesoxicólico en la etapa de purificación, todo el sólido de bilis porcina se agita y se disuelve en un disolvente orgánico a reflujo. A continuación, la mezcla se enfría a temperatura ambiente, y se agita más durante 1~2 horas. A continuación, los materiales insolubles se retiran de la mezcla usando papel de filtro, preferentemente papel de filtro y tierra de diatomeas. El disolvente orgánico se retira a presión reducida para obtener restos (por ejemplo, AQDC, AHDC, AHC y ceto), que se usan en la siguiente etapa. La sal usada en la presente etapa puede seleccionarse opcionalmente siempre que no afecte a los compuestos en el reactivo. Preferentemente, la sal es al menos una seleccionada del grupo que consiste en cloruro sódico, sulfato magnésico anhidro (MgSO₄) y sulfato sódico anhidro, más preferentemente cloruro sódico. La cantidad de sal usada en la presente etapa es preferentemente un 5~10 % en peso, en base a la cantidad de disolvente orgánico. Si la cantidad de sal es menos del 5 % en peso, el agua y los materiales insolubles (tales como ácidos grasos, etc.) en el sólido de bilis porcina no se retiran suficientemente, lo

que hace difícil 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 se mantiene como impureza, lo que hace difícil la purificación. Preferentemente, el disolvente orgánico puede seleccionarse opcionalmente de aquellos que puedan disolver el ácido quenodesoxicólico del sólido de bilis porcina y no tengan efectos adversos al mismo. Más preferentemente, el disolvente es acetato de etilo o acetona.

Etapa 2: Esterificación del ácido quenodesoxicólico

Se añade alcohol al resto de mezcla de ácido quenodesoxicólico obtenido a partir de la etapa anterior, y a continuación la solución se agita a reflujo antes de que el resto se disuelva completamente. A continuación, la solución se enfría a 0~5 °C. Se añade un catalizador ácido a la solución, que se agita a temperatura ambiente hasta que la reacción de esterificación de la mezcla de ácido quenodesoxicólico se complete. Cuando se completa la reacción, la solución se neutraliza añadiendo una base, y a continuación se filtra. El material filtrado se lava con alcohol y se concentra a presión reducida para obtener una mezcla de éster de ácido quenodesoxicólico (por ejemplo, AQDC-Me, AHDC-Me, AHC-Me y ceto-Me) como resto. El alcohol usado en la presente etapa no está limitado específicamente, pero es preferentemente un alcohol inferior que tiene 1~4 átomos de carbono, más preferentemente metanol, para una reacción de esterificación fácil. El catalizador ácido usado en la presente etapa es preferentemente ácido sulfúrico o ácido para-toluenosulfónico (APTS), y la base es bicarbonato sódico, carbonato sódico o carbonato potásico.

Etapa 3: Acetilación del éster de ácido quenodesoxicólico

Todos los grupos hidroxilo en la mezcla de éster de ácido quenodesoxicólico se acetilan añadiendo ácido acético anhidro y una base débil al resto obtenido a partir de la etapa anterior a reflujo. Cuando la reacción se completa, se añade tolueno a la solución de reacción con agitación a reflujo. A continuación, el ácido acético anhidro, el ácido acético y la base que quedan después de la reacción se retiran agitando a reflujo y concentrando la solución de reacción a presión reducida, para obtener una mezcla de éster de ácido quenodesoxicólico acetilado (por ejemplo, AQDC-diAc-Me, AHDC-diAc-Me, AHC-triAc-Me y ceto-Ac-Me) como resto. La base débil usada en la presente etapa es preferentemente acetato sódico anhidro o piridina, más preferentemente acetato sódico anhidro.

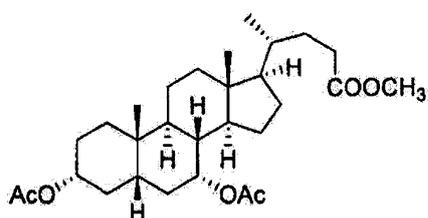
Etapa 4: Retirada de productos intermedios de fórmulas III y IV

Se añade un disolvente no polar al resto. La mezcla se agita a reflujo hasta que se disuelva todo el resto y se enfría a temperatura ambiente. Con el mantenimiento de la temperatura del disolvente dentro de 20~25 °C, los productos intermedios de fórmulas III y IV y una parte del producto intermedio de fórmula II (por ejemplo AHC-triAc-Me, ceto-Ac-Me y una parte de AHDC-diAc-Me) se cristalizan y se retiran por filtración. De esta manera, el material filtrado se lava adicionalmente con un disolvente no polar, y a continuación la solución filtrada y lavada se concentra a presión reducida o se seca al vacío. El disolvente no polar usado en la presente etapa es preferentemente hexano, heptano, octano, isooctano y similares, más preferentemente hexano o heptano.

Etapa 5: Producción de éster del compuesto acetilado de fórmula I

Para producir éster de metilo de diacetato de ácido quenodesoxicólico (AQDC-diAc-Me) de fórmula V que es un producto intermedio para preparar el compuesto de fórmula I, se añade un disolvente alcohólico al producto obtenido a partir de la etapa anterior, y a continuación el compuesto de fórmula V se cristaliza dejando la mezcla durante 2~3 horas a 20~25 °C. Si la temperatura es menor de 15 °C, la agitación y el filtrado son difíciles debido a la coagulación del compuesto de fórmula V, y si la temperatura es mayor de 25 °C, la cristalización no se produce suficientemente. Cuando el compuesto de fórmula V se cristaliza, el producto intermedio de fórmula II se retira del disolvente usando filtración. De esta manera el material filtrado se lava con disolvente alcohólico y se seca al vacío para obtener éster de metilo de diacetato de ácido quenodesoxicólico de fórmula V como producto bruto. Para purificar el compuesto de fórmula V con alta pureza, preferentemente en el contenido del 99 % o más, es preferible realizar la cristalización añadiendo un disolvente alcohólico y 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 del compuesto de fórmula V disminuye, y si la temperatura es mayor de 15 °C, el contenido del compuesto de fórmula V disminuye incluso aunque se haya producido la recristalización. El disolvente alcohólico usado en la cristalización es preferentemente un alcohol lineal o ramificado que tiene 1~4 átomos de carbono, más preferentemente etanol, metanol o isopropanol, más preferentemente metanol, considerando el contenido del compuesto de fórmula V. La cantidad de alcohol usada en la cristalización es 0,5~3 veces, preferentemente 1,0~2,0 veces, a la cantidad de resto. Si la cantidad es menor de 0,5 veces, la filtración es difícil ya que los cristales coagulan entre sí. Si la cantidad resulta mayor de 3 veces, el contenido para el compuesto de fórmula V no se ve afectado por la cantidad.

[Fórmula V]

Etapa 6: Desprotección y cristalización del ácido quenodesoxicólico

El producto intermedio del compuesto de fórmula I, el compuesto de fórmula V, obtenido a partir de la etapa anterior se desprotege en presencia de una base, y el pH de la solución de reacción se ajusta a 4 o menor, preferentemente a 2~3 en una condición ácida, para formar el ácido quenodesoxicólico de fórmula I. Simultáneamente, la solución de reacción se deja a 35~45 °C, preferentemente a 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 al vacío para refinar puramente el ácido quenodesoxicólico. La base usada para la desprotección no está limitada específicamente, pero se prefiere el hidróxido sódico o el hidróxido potásico para la etapa de post-tratamiento. Si el pH es mayor de 4, los cristales no se forman, y si el pH es menor de 2, la pureza del producto final se reduce debido al ácido superfluo. Si la temperatura de cristalización en agua es menor de 35 °C, la pureza del compuesto de fórmula I disminuye, y si la temperatura es más de 45 °C, la filtración es difícil ya que los cristales derivados del compuesto de fórmula I coagulan entre sí. El ácido usado para neutralizar la solución de reacción tampoco está limitado específicamente, pero se prefiere el ácido clorhídrico o el ácido sulfúrico para la etapa de post-tratamiento. Dado que el resto obtenido a partir de la etapa anterior contiene un 99 % o más del compuesto de fórmula V, el compuesto de fórmula I puede refinarse puramente sin cristalización adicional usando un disolvente orgánico ya que el contenido de impurezas es bajo. El producto que contiene el compuesto de fórmula I cristalizado en agua de acuerdo con la presente invención es adecuado para el procedimiento de fabricación industrial ya que su punto de fusión es aproximadamente 20 °C mayor, y tiene menor volumen, que el compuesto cristalizado de fórmula I en un disolvente orgánico.

La presente invención se explicará más específicamente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que los siguientes ejemplos están concebidos para que ilustren la presente invención, y no pueden limitar el ámbito de la presente invención de ninguna manera.

Procedimiento analítico

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

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

EjemploEtapa 1: Pre-tratamiento del sólido de bilis porcina

Se agitaron 600 g de sólido de bilis porcina que tiene un contenido 35~40 % en peso de ácido quenodesoxicólico y 240 g de cloruro sódico en 2400 ml de acetato de etilo a 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 de esta manera el material filtrado se lavó con 240 ml de acetato de etilo. La solución filtrada combinada se concentró a presión reducida para obtener la mezcla de ácido quenodesoxicólico (AQDC, AHDC, AHC y ceto) como resto.

Etapa 2: Esterificación del ácido quenodesoxicólico

Al resto obtenido a partir de la etapa anterior se añadieron 1500 ml de metanol, y la solución mezclada se agitó a reflujo durante 30 minutos hasta que el resto se disolvió completamente. Esta solución se enfrió a 0~10 °C, se añadieron 19,5 ml de ácido sulfúrico a la solución con agitación, y a continuación la reacción de esterificación de la mezcla de ácido quenodesoxicólico se completó agitando a 20~25 °C durante 2 horas. Cuando la reacción de esterificación se completó, la solución se neutralizó con 53,9 g de bicarbonato sódico, y a continuación se filtró. De esta manera el material filtrado se lavó con 600 ml de metanol, y se concentró a presión reducida para obtener 534 g de mezcla de éster de ácido quenodesoxicólico (AQDC-Me, AHDC-Me, AHC-Me y ceto-Me) como resto.

Etapa 3: Acetilación del éster de ácido quenodesoxicólico

A 534 g de una mezcla de éster de ácido quenodesoxicólico obtenida a partir de la etapa anterior se añadieron 80 g de acetato sódico anhidro y 800 ml de ácido acético anhidro. La solución mezclada se calentó a reflujo a 120~140 °C durante 5 horas, y a continuación se concentró inmediatamente a presión reducida. El ácido acético anhidro y el ácido acético se retiraron completamente añadiendo 100 ml de tolueno a la solución de reacción, agitando a reflujo durante 15 minutos, y concentrando a presión reducida, para obtener una mezcla de éster de ácido quenodesoxicólico acetilado (AQDC-diAc-Me, AHDC-diAc-Me, AHC-triAc-Me y ceto-Ac-Me) como resto. El resultado de HPLC para el resto (TA): AHC-triAc-Me (8,76 min), ceto-Ac-Me (9,05 min), AQDC-diAc-Me (12,21 min) y AHDC-diAc-Me (12,81 min).

10 Etapa 4: Retirada de productos intermedios de fórmulas III y IV

Al resto obtenido a partir de la etapa anterior se añadió un disolvente no polar (2670 ml de hexano) y a continuación la solución mezclada se agitó a reflujo durante 30 minutos. A continuación, el disolvente de hexano se enfrió a 25~35 °C, se agitó durante 3 horas y a continuación se filtró. De esta manera el material filtrado (AHC-triAc-Me y ceto-Ac-Me) se lavó adicionalmente con 534 ml de hexano, y la solución filtrada y lavada se concentró a presión reducida para obtener los productos intermedios de fórmulas I y II (AQDC-diAc-Me, AHDC-diAc-Me) como resto. El resultado de HPLC para el resto (TA): AQDC-diAc-Me (12,21 min) y AHDC-diAc-Me (12,81 min).

Etapa 5: Producción de éster de metilo de diacetato de ácido quenodesoxicólico

Al resto obtenido a partir de la etapa anterior se añadieron 801 ml de metanol y la solución mezclada se agita a reflujo durante 30 minutos, se enfrió a 20~25 °C, se agitó más durante 2 horas y a continuación se filtró. El material filtrado (AQDC-diAc-Me) se lavó con 267 ml de metanol, y se secó al vacío a 60 °C para obtener un contenido del 95~98 % de producto bruto. A continuación, al producto bruto se añadieron 288 ml de metanol, y la recristalización se realizó para la mezcla a 0~5 °C durante 2 horas para obtener un contenido del 99 % de éster de diacetato de ácido quenodesoxicólico. El rendimiento es 143 g (113,8 g + 29,2 g de licor madre). p.f.: 128~129 °C. El resultado de HPLC para el resto (TA): AQDC-diAc-Me (12,21 min).

25 Etapa 6: Desprotección y cristalización del ácido quenodesoxicólico

A 1425 ml de agua se añadieron 143 g de éster de diacetato de ácido quenodesoxicólico y 171 g de hidróxido sódico, y a continuación la solución se agitó a reflujo durante 4 horas. El pH de la solución se ajustó a 2~3 usando 342 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 142 ml de agua y se secó al vacío a 70 °C para obtener 113,8 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 1000 ml de agua caliente. A continuación, se añadieron 100 g de hidróxido sódico, y la solución se agitó a reflujo durante 20 horas. Esta solución se enfrió a 25 °C. Se añadieron 1500 ml de agua a la solución, que se mantuvo en frío durante un día. Se añadieron 10 g de tierra de diatomeas a la solución de reacción, que a continuación se agitó y se filtró para retirar el 3 α -hidroxi-6-cetocolato sódico 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 sódico. A continuación, se añadieron 400 ml de acetato de etilo a la solución, que se ajustó a continuación a pH 5 usando ácido sulfúrico diluido. La solución se agitó durante 30 minutos, y se retiró la fase acuosa de la misma por separación de fases. A la fase orgánica se añadieron 7 g de tierra de diatomeas y 7 g de carbón activado, que a continuación se agitó durante 30 minutos y se filtró. De esta manera el material filtrado se lavó con 50 ml de acetato de etilo, y se concentró a presión reducida.

Etapa 2: Esterificación del ácido biliar

El resto obtenido a partir de la etapa anterior se disolvió en 300 ml de metanol. Se añadieron 4,0 ml de ácido sulfúrico concentrado a la solución, que se agitó durante un día a temperatura ambiente. A continuación, la solución se neutralizó con bicarbonato sódico (pH 7), se filtró y a continuación se concentró a presión reducida.

Etapa 3: Retirada del éster de metilo de fórmula II

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

Etapa 4: Acetilación del éster de ácido biliar

Al resto obtenido a partir de la etapa anterior se añadieron 75 ml de ácido acético anhidro y 7,5 g de acetato sódico anhidro, y a continuación la solución mezclada se agitó a reflujo durante 5 horas. El ácido acético anhidro restante se retiró destilando el ácido acético anhidro, agitando a reflujo durante 15 minutos después de añadir 35 ml de metanol, y a continuación destilando a presión reducida.

Etapa 5: Retirada del éster acetilado de fórmula III

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

10 Etapa 6: Separación del compuesto de fórmula V

El resto obtenido a partir de la etapa anterior se disolvió en 46 ml de etanol caliente, y a continuación se mantuvo en frío durante un día. Esta solución se filtró, y de esta manera el material filtrado se lavó con 27 ml de etanol frío, y se secó al vacío a 60 °C. Se recrystalizaron 21,5 g del compuesto de fórmula V usando 3 veces de 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).

15 Etapa 7: Saponificación y neutralización

A 185 ml de agua se añadieron 18,5 g de éster de metilo de diacetato de ácido quenodesoxicólico y 18,5 g de hidróxido sódico, y a continuación la solución mezclada se agitó a 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

20 La solución de reacción se extrajo usando acetato de etilo, y la fase acuosa se descartó de la misma. La fase de acetato de etilo en la solución se lavó con solución salina al 6 %, y la solución se destiló a aproximadamente 90 ml. Esta solución se enfrió, se mantuvo en frío durante un día después de añadir 90 ml de hexano y se filtró. De esta manera el material filtrado se lavó con 20 ml de hexano, y se secó al vacío a 60 °C para producir 12,7 g de ácido quenodesoxicólico. p.f. 143~145 °C; $[\alpha]_D^{25} + 13,0^\circ$ (c=1, CHCl₃).

25 Aplicabilidad industrial

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

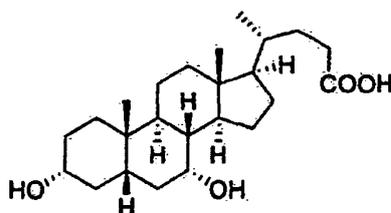
REIVINDICACIONES

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

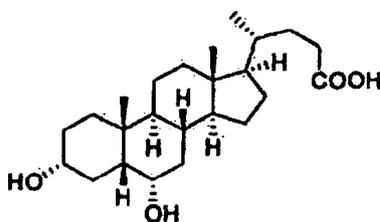
1) pre-tratamiento de la bilis porcina disolviendo sólido de bilis porcina derivado de la bilis porcina, que contiene la mezcla de los ácidos quenodesoxicólicos de las Fórmulas I-IV,

5

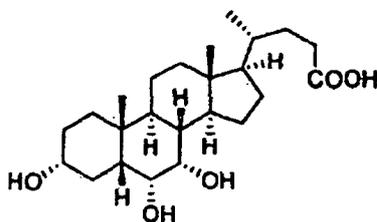
[Fórmula I]



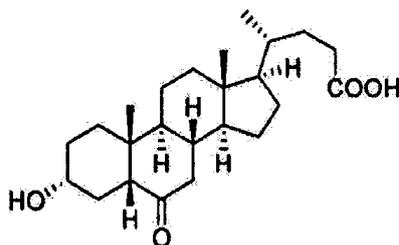
[Fórmula II]



[Fórmula III]

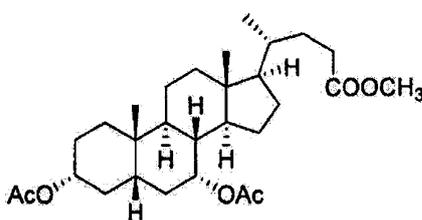


[Fórmula IV]



- 10 y que tiene un contenido del 35-55 % en peso de ácido quenodesoxicólico, en un disolvente orgánico que contiene sal, en el que el disolvente orgánico es acetato de etilo o acetona, y la sal es al menos una seleccionada del grupo que consiste en cloruro sódico, sulfato magnésico anhidro y sulfato sódico anhidro;
- 15 2) esterificación de una mezcla de ácidos quenodesoxicólicos de fórmulas I a IV añadiendo alcohol C₁₋₄ al resto obtenido a partir de la etapa (1);
- 3) acetilación de la mezcla de ésteres de los ácidos quenodesoxicólicos de fórmulas I a IV añadiendo ácido acético anhidro y una base débil seleccionada de acetato sódico anhidro o piridina al resto obtenido a partir de la etapa (2);
- 4) añadir un disolvente orgánico no polar seleccionados de hexano, heptano, octano o isooctano al resto obtenido a partir de la etapa (3) y agitar a reflujo hasta que todo el resto se disuelva, y posteriormente cristalizar y retirar los ésteres acetilados de los ácidos quenodesoxicólicos de fórmulas III a IV, y una parte del éster acetilado del ácido quenodesoxicólico de fórmula II;
- 20 5) añadir alcohol C₁₋₄ al resto obtenido a partir de la etapa (4) y cristalizar el compuesto de fórmula V

[Fórmula V]



durante 2~3 horas al intervalo de temperatura de 20 ~ 25 °C; y

- 5 6) desprotección del compuesto de fórmula V obtenido a partir de la etapa (5) añadiendo agua y una base seleccionada de hidróxido sódico o hidróxido potásico al compuesto de fórmula V, y cristalización del compuesto de fórmula I en presencia de agua añadiendo un ácido seleccionado de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad de sal es del 5-10 % en peso, en base al peso total del disolvente orgánico.
- 10 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (5) comprende adicionalmente la recristalización del compuesto de fórmula V en alcohol C₁₋₄, dentro del intervalo de temperatura de 0 ~ 15 °C después de la etapa de cristalización, y la pureza del compuesto recristalizado de fórmula V es del 99 % o mayor.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad de alcohol usada en la etapa (5) 0,5 ~ 3 veces la cantidad de resto obtenido a partir de la etapa (4).
- 15 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pH de la desprotección en la etapa (6) es 4 o menor.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cristalización en presencia de agua en la etapa (6) se lleva a cabo en el intervalo de temperatura de 35 ~ 45 °C.