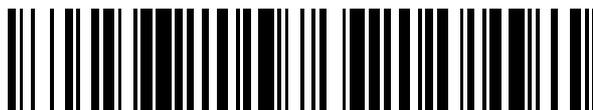


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 652**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2011 PCT/EP2011/071406**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12072689**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11788533 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2646457**

54 Título: **Síntesis optimizada de ácidos biliares puros, cristalinos, no polimórficos, con tamaño de partícula definido**

30 Prioridad:

30.11.2010 EP 10193143

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

19.01.2017

73 Titular/es:

**DR. FALK PHARMA GMBH (100.0%)
Leinenweberstrasse 5
79108 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**WILHELM, RUDOLF;
PRÖLS, MARKUS;
FISCHER, ERIK y
WAENERLUND POULSEN, HEIDI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 597 652 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

Síntesis optimizada de ácidos biliares puros, cristalinos, no polimórficos, con tamaño de partícula definido

La presente invención se refiere a una síntesis adecuada para la producción farmacéutica aplicable excepcionalmente para el tratamiento de enfermedades biliares y del hígado, que contiene ácido norursodesoxicólico (Nor-AUDC).

Antecedentes de la invención

El Nor-AUDC y el bis-Nor-AUDC son análogos del ácido ursodesoxicólico con propiedades físico-químicas modificadas, como la solubilidad, la concentración micelar crítica, o la hidrofilia (Roda y col., Dig Dis and Sciences, 1989). Un procedimiento para la síntesis del ácido 24-Nor-5 β -colan-23-oico ya fue descrito por Schteingart y Hofmann (Journal of Lipid Research, 1988). Los experimentos *in vitro* demostraron su eficacia en modelos animales de enfermedad hepática colestática (patente PCT/EP2005/052178). Un procedimiento para la preparación del Nor-AUDC se describe en la patente EP 0624595 B1. Sin embargo, el presente documento no dice nada con respecto a las propiedades físicas y químicas características, la pureza, el grado de cristalización y el tamaño de partícula del Nor-AUDC sintetizado.

La aplicación de ácidos biliares, en particular el ácido ursodesoxicólico, en el tratamiento de enfermedades hepáticas colestáticas, como la cirrosis biliar primaria, es bien conocida y ya se publicó en los años ochenta del siglo pasado (Poupon y col., Lancet, 1987). Aunque el uso de preparados farmacéuticos disponibles actuales solo da como resultado el éxito del tratamiento en un subgrupo de pacientes, existe una necesidad para pacientes que no responden al tratamiento con ácido ursodesoxicólico o sufren enfermedades hepáticas colestáticas o enfermedades metabólicas que no se pueden tratar con ácido ursodesoxicólico.

Dependiendo del valor de pH de los ácidos biliares solventes tienen baja solubilidad. Una solubilidad buena y adecuada de los ácidos biliares en el tracto intestinal es un requisito previo para un tratamiento farmacéutico con éxito. La solubilidad se puede mejorar mediante la formación de sales del Nor-AUDC.

Un segundo objetivo es un preparado con una biodisponibilidad oral suficiente. Una alta velocidad de disolución *in vitro* es un requisito previo para una biodisponibilidad oral suficiente. La micronización, por ejemplo, la producción de una preparación farmacéutica con un tamaño de partícula definido muy pequeño (> 60 % con un diámetro inferior a 10 μ m), es un procedimiento establecido para aumentar la velocidad de disolución. Un procedimiento conocido, aunque elaborado, para conseguir partículas micronizadas se realiza por molienda extensiva.

Un objetivo adicional de la presente invención era proporcionar una preparación físicamente pura, por ejemplo, cristalina, que fuera termodinámicamente estable.

El objetivo de la presente invención era sintetizar una nueva forma del Nor-AUDC de alta calidad, que tiene una pureza favorable, características de tamaño de partículas y que es aplicable para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestáticas o metabólicas. La forma cristalina deseada se debe obtener de una manera consistente y reproducible por un procedimiento de producción escalable e industrial.

Dado que las modificaciones cristalinas de una sustancia representan diferentes estructuras cristalinas con propiedades potencialmente diferentes, el objetivo principal de la invención era identificar y seleccionar la forma polimorfa/monocristalina termodinámicamente estable del Nor-AUDC que no se convierte en otra forma polimórfica. Esta modificación particular del Nor-AUDC debe presentar ventajas físicas o químicas considerables sobre las formas metaestables y por lo tanto debe ser la sustancia elegida para un posterior desarrollo químico y farmacéutico.

Además, es deseable producir Nor-AUDC con un tamaño de partícula y una morfología consistentes porque el hábito cristalino afecta a parámetros de procesamiento importantes, tales como la capacidad de flujo, la densidad aparente y la compresibilidad. Se prefiere la micronización del Nor-AUDC para aumentar la velocidad de disolución del compuesto y, por ello, la biodisponibilidad oral.

Las condiciones del procedimiento de purificación y cristalización deberían producir la forma sólida apropiada del Nor-AUDC con una pureza polimórfica, una pureza química, un hábito cristalino y un rendimiento fiables y reproducibles. Se puede evitar la micronización por molienda con el fin de controlar el tamaño de los cristales del Nor-AUDC. De esta manera, se puede prevenir un fenómeno común tras la micronización, en concreto, la amorfización.

El procedimiento publicado para la síntesis del Nor-AUDC no es adecuado para cumplir los requisitos farmacéuticos. Especialmente la ruta purificación no es eficaz para alcanzar las cualidades deseadas del producto con respecto a la pureza polimórfica, la pureza química, el hábito cristalino y el rendimiento. Los procedimientos convencionales de purificación no permiten obtener un polimorfo del Nor-AUDC que tenga una pureza química muy alta, por ejemplo, tal que la cantidad total de impurezas sea menor al 0,05 %. Además, los procedimientos conocidos no dan lugar a un tamaño de partícula tal que el valor de D50 sea inferior a 10 μ m sin micronización. Además, la micronización destruiría la pureza polimórfica del producto.

Batta y col. (1999) Steroids 64, 780-784 describe la síntesis de ácidos dinorbiliare por hidrólisis oxidativa de nitrilos de ácidos norbiliares.

Halilbasic y col. (2009) Hepatology 49, 1972-1981 investiga las propiedades fisiológicas y terapéuticas del Nor-AUDC en ratones *Mdr2^{-/-}*.

- 5 El documento WO 2009/013334 A1 desvela el uso de ácidos Nor-biliares en el tratamiento de la arteriosclerosis.

Sumario de la invención

10 La presente invención proporciona un procedimiento de producción escalable e industrial que resulta en una preparación del Nor-AUDC con atributos de calidad deseados y aplicabilidad farmacéutica. Los inventores sorprendentemente comprobaron que la purificación y recristalización opcional de la sal de potasio del Nor-AUDC con la posterior precipitación del ácido libre proporciona una nueva forma cristalina físicamente pura y termodinámicamente estable del Nor-AUDC ("Forma A").

En un primer aspecto, la presente invención se refiere por tanto a un polimorfo puro del Nor-AUDC, tal como se define en las reivindicaciones. El polimorfo es termodinámicamente estable.

15 Preferentemente, el Nor-AUDC se encuentra en su forma anhidra. Es decir, los cristales del polimorfo esencialmente no contienen agua. La cantidad de agua en los cristales en general es inferior al 1 %, preferentemente inferior al 0,5 %, más preferentemente inferior al 0,1 %, en base al peso total del cristal.

El polimorfo se caracteriza por picos de XRPD a 11,9, 14,4, 15,3, 15,8, y 16,6 ± 0,2 grados de 2-theta. Preferentemente, el polimorfo se caracteriza por el patrón de XRPD como se muestra en la Figura 4 para la "Forma A".

20 Un segundo aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el polimorfo descrito en el presente documento. La composición farmacéutica presenta una distribución específica de tamaño de partícula en la que al menos el 60 % de las partículas tienen un tamaño de <10 µm.

25 Un tercer aspecto de la invención es el uso del polimorfo de la presente invención o de la composición farmacéutica de la presente invención, para el tratamiento de una enfermedad hepática colestásica. Preferentemente, la enfermedad hepática colestásica se selecciona del grupo que consiste en cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), hepatitis autoinmune (AIH) y síndromes de superposición, incluyendo síndromes de superposición de AIH.

30 El polimorfo o la composición farmacéutica descritos en el presente documento también se pueden usar para el tratamiento de una enfermedad hepática metabólica. La enfermedad hepática metabólica puede ser esteatohepatitis no alcohólica o esteatohepatitis alcohólica.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular para su administración oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, nasal, por inhalación, tópica o rectal. Por lo general, comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

35 Un cuarto aspecto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de un polimorfo puro del Nor-AUDC, que comprende las siguientes etapas: cristalizar la sal de potasio del Nor-AUDC; y disolver opcionalmente la sal de potasio en un disolvente y acidificar la solución para obtener Nor-AUDC puro.

El disolvente en el que se disuelve la sal de potasio preferentemente es una mezcla de agua y acetona; y la precipitación se lleva a cabo mediante la acidificación de la solución para tener un pH en el intervalo de 1-2.

40 El procedimiento descrito en el presente documento da lugar a la formación de una única forma sólida del Nor-AUDC, cuya estructura cristalina se podría refinar como paquete cerrado C2 monoclinico, sin ningún hueco accesible al disolvente. El procedimiento descrito no muestra la formación del Nor-AUDC polimórfico. Tampoco se pudo observar la conversión en otras formas polimórficas. La estructura cristalina del Nor-AUDC obtenida de la vía de síntesis resulta ser la forma termodinámicamente estable.

45 Además, las condiciones de precipitación del Nor-AUDC a partir de su sal de potasio son tales que se pueden obtener directamente cristales de un tamaño de partícula deseado en un solo etapa del procedimiento de producción. Por lo tanto, no se requiere una etapa de molienda adicional para controlar el tamaño de partícula de los cristales. Esta es una gran ventaja, teniendo en cuenta que las operaciones de alta energía como la trituración y la molienda (micronización), en general, dan lugar a la amorfización del Nor-AUDC, y por lo tanto a la reducción de la pureza polimórfica y de la pureza química.

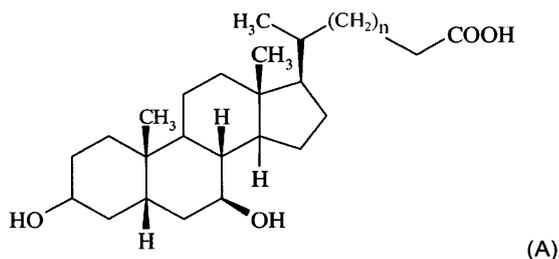
50 Además, el rendimiento del Nor-AUDC con calidad farmacéutica pura por este procedimiento es al menos el 45 % del material fuente y, por tanto, muy alta en comparación con los procedimientos publicados.

En resumen, sorprendentemente se comprobó que el procedimiento descrito de producción del Nor-AUDC da lugar

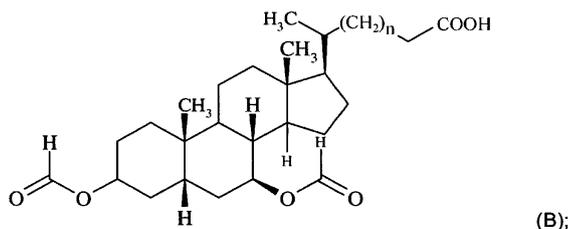
a una única sustancia polimórfica, pura y cristalina, y no necesita micronización, como se establece, por ejemplo, durante la producción de AUDC, la preparación en uso actualmente para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas. En consecuencia, el procedimiento descrito es aplicable a la preparación de bis-Nor-AUDC.

5 La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente divulgación se refiere además a los siguientes aspectos (1) a (17):

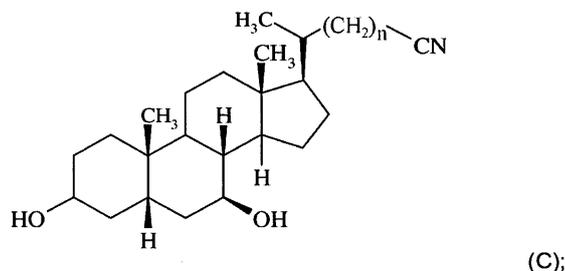
- (1) Un polimorfo puro de Nor-AUDC o bis-Nor-AUDC, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- (2) El polimorfo del punto (1), que es termodinámicamente estable.
- (3) El polimorfo del punto (1) o (2), en el que dicho Nor-AUDC, Bis-Nor-AUDC, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se encuentra en su forma anhidra.
- 10 (4) El polimorfo de cualquiera de los puntos (1) a (3), caracterizado por picos de XRPD a 11,9, 14,4, 15,3, 15,8, y $16,6 \pm 0,2$ grados de 2-theta.
- (5) El polimorfo del punto (4), caracterizado por el patrón de XRPD como se muestra en la Figura 5.
- (6) Una composición farmacéutica que comprende el polimorfo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (5).
- 15 (7) La composición farmacéutica de acuerdo con el punto (6), en el que la distribución del tamaño de partícula en la composición farmacéutica comprende al menos el 60 % de partículas con un tamaño $<10 \mu\text{m}$.
- (8) El polimorfo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (5), o la composición farmacéutica de acuerdo con el punto (6) o (7), para el tratamiento de una enfermedad hepática colestásica.
- 20 (9) El polimorfo o la composición farmacéutica de acuerdo con el punto (8), en el que la enfermedad hepática colestásica se selecciona del grupo que consiste en cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), hepatitis autoinmune (AIH) y síndromes de superposición, incluyendo síndromes de superposición de AIH.
- (10) El polimorfo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (5), o la composición farmacéutica de acuerdo con el punto (6) o (7), para el tratamiento de una enfermedad hepática metabólica y/o arteriosclerosis.
- 25 (11) El polimorfo o la composición farmacéutica de acuerdo con el punto (10), en el que la enfermedad hepática metabólica es esteatohepatitis no alcohólica.
- (12) El polimorfo o la composición farmacéutica de acuerdo con el punto (10), en el que la enfermedad hepática metabólica es esteatohepatitis alcohólica.
- 30 (13) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (6) a (12), que se formula para su administración oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, nasal, tópica o rectal.
- (14) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (6) a (13), que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- (15) Un procedimiento para la preparación de un polimorfo puro del Nor-AUDC o bis-Nor-AUDC, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende las siguientes etapas:
 - 35 – cristalizar la sal de potasio del Nor-AUDC o bis-Nor-AUDC; y
 - disolver opcionalmente la sal de potasio en un disolvente y acidificar la solución para obtener Nor-AUDC o bis-Nor-AUDC puros.
- 40 (16) El procedimiento del punto (15), en el que dicho disolvente es una mezcla de agua y acetona, y en el que dicha precipitación se lleva a cabo mediante la acidificación de la solución para obtener un pH en el intervalo de 1-2.
- (17) El procedimiento del punto (15) o (16), que comprende además las siguientes etapas:
 - convertir un compuesto de fórmula (A)



en un compuesto de fórmula (B)

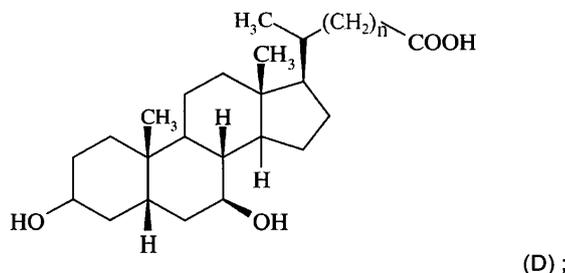


(b) convertir el compuesto de fórmula (B) en un compuesto de fórmula (C)



5

(c) convertir el compuesto de fórmula (C) en un compuesto de fórmula (D) en forma bruta



y

10 (d) tratar el compuesto de fórmula (D) en forma bruta con KOH en condiciones para cristalizar la sal de potasio del Nor-AUDC o bis-Nor-AUDC; en la que n es 0 o 1.

Descripción detallada de la invención

Polimorfo

La presente invención proporciona un polimorfo puro del Nor-AUDC.

El polimorfo es termodinámicamente estable.

15 El polimorfismo se define como la capacidad de una sustancia para cristalizar en más de una disposición reticular cristalina. El polimorfismo puede influir en muchos aspectos de las propiedades de estado sólido de un fármaco. Diferentes modificaciones cristalinas de una sustancia pueden diferir considerablemente entre sí en muchos aspectos, tales como su solubilidad, velocidad de disolución y, finalmente, su biodisponibilidad. Un tratamiento exhaustivo del polimorfismo en cristales farmacéuticos y moleculares se aborda en, por ejemplo, Byrn (Byrn, S. R., Pfeiffer, R. R., Stowell, J. G., "Solid-State Chemistry of Drugs", SSCI Inc., West Lafayette, Ind., 1999), Brittain, H. G.,
 20 "Polymorphism in Pharmaceutical Solids", Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Basilea, 1999) or Bernstein (Bernstein, J., "Polymorphism in Molecular Crystals", Oxford University Press, 2002).

El término cristalino se refiere a cualquier forma no amorfa del ingrediente farmacéutico activo (IFA). El término "forma amorfa" se refiere a una forma del IFA que no tiene ningún orden de largo alcance como estructuras cristalinas. Los átomos o moléculas de un material presente en forma amorfa están dispuestos en una matriz no uniforme. Por ejemplo, es posible distinguir formas amorfas de formas cristalinas de un compuesto por difracción de rayos X en polvo. El término "polimorfo cristalino" o "polimorfo" como se describe en el presente documento, se refiere a una forma cristalina específica de un ingrediente farmacéutico activo que se puede caracterizar mediante procedimientos analíticos, tales como por ejemplo, difracción de polvo de rayos X o espectroscopía IR.

Preferentemente, el Nor-AUDC se encuentra en su forma anhidra. Es decir, los cristales del polimorfo esencialmente no contienen agua. La cantidad de agua en los cristales en general es inferior al 1 %, preferentemente inferior al 0,5 %, más preferentemente inferior al 0,1 %, en base al peso total del cristal.

Un polimorfo es "puro", en el sentido de la presente invención si es adecuado para su aplicación farmacéutica y contiene menos del 2 % de impurezas. La cantidad de impurezas en el polimorfo de la presente invención generalmente es inferior al 2 %, preferentemente inferior al 1 %, más preferentemente inferior al 0,5 %, lo más preferentemente inferior al 0,1 % en base al peso total de la preparación. La cantidad de cualquier impureza individual en el polimorfo de la presente invención preferentemente es inferior al 0,1 %, más preferentemente inferior al 0,05 %, lo más preferentemente inferior al 0,03 % en base al peso total de la preparación. En una primera realización, la cantidad total de impurezas en el polimorfo del Nor-AUDC es inferior al 2 %, preferentemente inferior al 1 %, más preferentemente inferior al 0,5 %, lo más preferentemente inferior al 0,1 % en base al peso total del Nor-AUDC. La cantidad de cualquier impureza individual en el polimorfo del Nor-AUDC preferentemente es inferior al 0,1 %, más preferentemente inferior al 0,05 %, lo más preferentemente inferior al 0,03 % en base al peso total del Nor-AUDC.

Las impurezas se pueden determinar como se describe en el presente documento en el Ejemplo 2. El perfil de impurezas del Nor-AUDC se especifica por las impurezas conocidas y desconocidas. Las impurezas conocidas son el ácido ursodesoxicólico (AUDC) y la 3 α ,7 β -dihidroxi-24-Nor-5 β -colano-23-amida (Amida). El AUDC, también denominado impureza A, es el material de partida de la síntesis del Nor-AUDC mientras que la amida, también denominada impureza B, representa un intermedio formado en la etapa 3 de la síntesis del Nor-AUDC. Las impurezas desconocidas podrían resultar de la vía de síntesis, pero también de la degradación del Nor-AUDC.

El polimorfo de la presente invención preferentemente es un polimorfo único, es decir, esencialmente consiste en un único polimorfo, y/o que tiene pureza polimórfica. La cantidad del Nor-AUDC amorfo en el polimorfo de la presente invención normalmente es despreciable. No hay nada de Nor-AUDC amorfo detectable por XRPD en el polimorfo de la presente invención. Más preferentemente, el polimorfo de la invención esencialmente no contiene Nor-AUDC amorfo. Lo más preferentemente, el polimorfo de la invención no contiene nada de Nor-AUDC amorfo. La cantidad de polimorfo de la Forma A en el polimorfo de la presente invención preferentemente es de al menos el 99 %, más preferentemente de al menos el 99,5 %, más preferentemente de al menos el 99,9 %, lo más preferentemente de esencialmente el 100 %, en base al peso total del Nor-AUDC.

El polimorfo de la invención es termodinámicamente estable. El polimorfo de la invención fue descubierto con una alta incidencia en todos los tipos de modos de cristalización y también se forma a partir de diferentes disolventes puros y mezclas. Incluso en los experimentos de cristalización que parten de la forma amorfa de Nor-UDCA producida por molienda (por difusión de vapor en sólidos) o por evaporación de la solución crio-deseada (experimentos de enfriamiento/evaporación) para borrar los efectos de memoria de la Forma A, el análisis de XRPD realizado sobre los sólidos aislados mostraron que se obtuvo predominantemente la Forma A. Sorprendentemente, la invención permite hacer crecer cristales únicos de la Forma A.

La distribución del tamaño de partícula del polimorfo de la invención es tal que al menos el 60 % de los cristales tienen un tamaño de partícula inferior a 10 μ m.

El polimorfo de la presente invención preferentemente tiene un D50 inferior a 10 μ m. Por ejemplo, el D50 puede variar de 0,5 μ m a 10 μ m, más preferentemente de 1 μ m a 9 μ m, más preferentemente de 2 μ m a 8 μ m, lo más preferentemente de 3 μ m a 7 μ m. El polimorfo de la presente invención preferentemente tiene un D90 inferior a 30 μ m. Por ejemplo, el D90 puede variar de 2 μ m a 30 μ m, más preferentemente de 5 μ m a 25 μ m, más preferentemente de 8 μ m a 20 μ m, lo más preferentemente de 10 μ m a 18 μ m. El polimorfo de la presente invención preferentemente tiene un D95 inferior a 30 μ m. Por ejemplo, el D95 puede variar de 3 μ m a 30 μ m, más preferentemente de 6 μ m a 28 μ m, más preferentemente de 9 μ m a 25 μ m, lo más preferentemente de 10 μ m a 20 μ m.

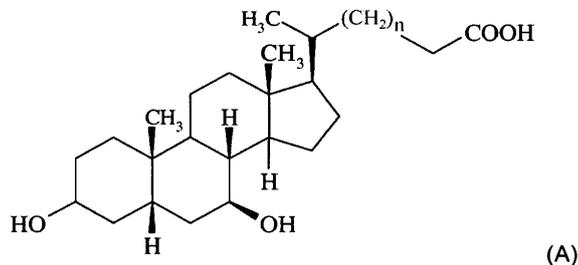
El D50, D90 y D95 representan la mediana o el percentil 50, el percentil 90 y el percentil 95 de la distribución de tamaño de partícula, respectivamente, medido en volumen. Es decir, D50 (D90; D95) es un valor de la distribución tal que el 50 % (90 %; 95 %) de las partículas tienen un volumen de este valor o menor.

La distribución del tamaño de partícula se puede determinar como se describe en el presente documento en el Ejemplo 3 y/o según la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), Edición 6.6, sección 2.9.31, preferentemente con un Mastersizer 2000 de Malvern Instruments. La evaluación se lleva a cabo normalmente con el modelo de Fraunhofer.

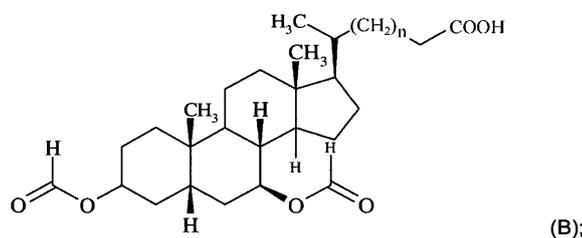
Procedimiento para preparar el polimorfo

El procedimiento para preparar el polimorfo de la invención comprende preferentemente las siguientes etapas:

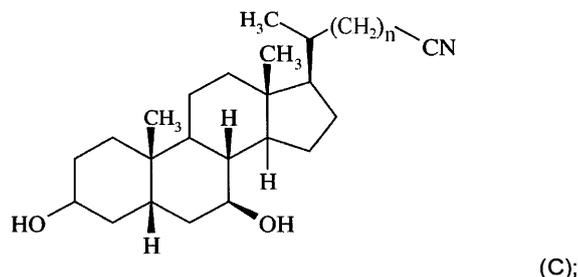
(a) convertir un compuesto de fórmula (A)



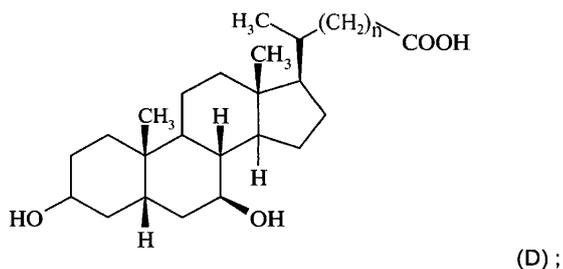
5 en un compuesto de fórmula (B)



(b) convertir el compuesto de fórmula (B) en un compuesto de fórmula (C)



(c) convertir el compuesto de fórmula (C) en un compuesto de fórmula (D) en forma bruta



10

y

(d) tratar el compuesto de fórmula (D) en forma bruta con KOH en condiciones para cristalizar la sal de potasio del Nor-AUDC; en la que n es 1.

15

La sal de potasio obtenida en la etapa (d) se puede convertir en la forma pura del compuesto (D) disolviendo la sal de potasio en un disolvente, acidificando la solución con el fin de obtener cristales de compuesto puro (D).

Cuando n = 1, el compuesto de partida de fórmula (A) es AUDC, y el producto de fórmula (D) es Nor-AUDC.

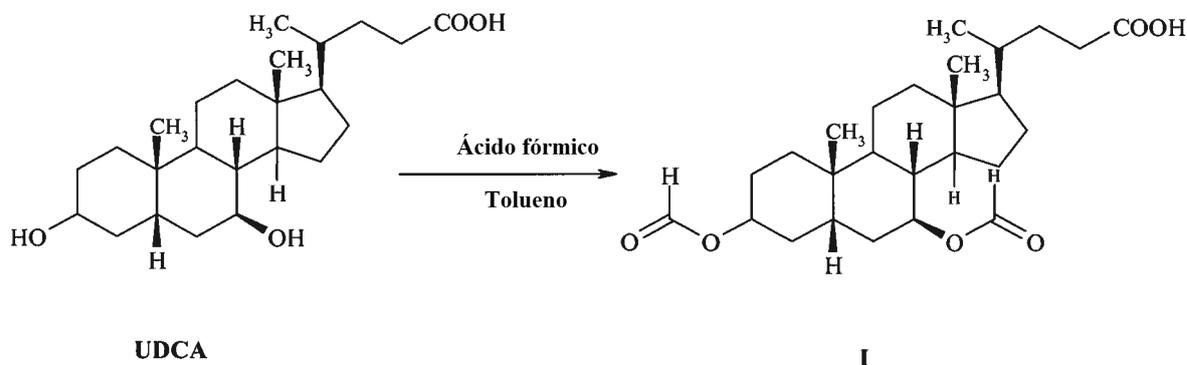
El disolvente preferentemente es una mezcla de 2-propanol y agua, en el que el 2-propanol se puede añadir primero, seguido de agua hasta que la sal de potasio se haya disuelto completamente.

20

A continuación se describen las realizaciones del procedimiento preferido de la invención, y se destacan las ventajas de la misma. Cada una de las siguientes etapas, y cada uno de sus etapas secundarias, se pueden combinar con otras realizaciones de la presente invención. En particular, cualquiera de las características de las siguientes

realizaciones se puede combinar con las realizaciones descritas anteriormente.

Etapa 1: Preparación de ácido 3 α ,7 β -diformiloxi-5 β -colan-24-oico (I)



a) Descripción del procedimiento (protección)

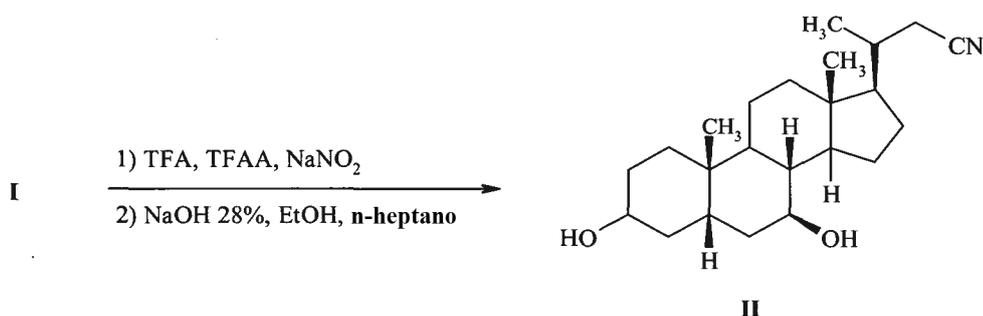
- 5 El AUCD se añade al ácido fórmico y tolueno (> 3 horas de 65 a 75 °C; reduciendo la temperatura a 18-22 °C). La fase de tolueno se separa y se descarga la fase de ácido fórmico/agua. La fase de tolueno se concentra (≤ 65 °C) y se añade rápidamente n-heptano de 55 a 65 °C para cristalizar el producto. La mezcla de reacción se enfría a 10-15 °C y se agita. La suspensión se filtra, se lava con n-heptano y se seca a un máximo de 50 °C (LOD: $\leq 1,0$ %). Se obtiene el producto I como un sólido blanco.

10 b) Diferencias en comparación con la síntesis publicada

El ácido perclórico se dejó fuera para simplificar el procedimiento y la adición de anhídrido del ácido acético se dejó fuera para evitar un gran desprendimiento de gas. Para obtener un producto más puro y un mejor procedimiento de cristalización, la mezcla de reacción se extrajo *in situ* en tolueno y el producto se cristalizó en tolueno/n-heptano. Además, se podía emplear ácido fórmico acuoso comercial y se podía evitar la necesidad de condiciones de reacción anhidras. La precipitación en tolueno/heptano sirve, además, como procedimiento de purificación adicional del producto. Esta etapa además da como resultado un mejor rendimiento de aproximadamente el 85 %.

- 15

Etapa 2: Preparación de 3 α ,7 β -dihidroxi-24-Nor-5 β -colan-23-nitrilo (II)



a) Descripción del procedimiento (reordenamiento)

- 20 Se mezclan ácido trifluoroacético, producto I, y anhídrido del ácido trifluoroacético (> 40 min a 15-25 °C). La mezcla de reacción se agita y se enfría, mientras se añade nitrito de sodio (1,5 a 3 horas de 15 a 25 °C). La mezcla de reacción se calienta suavemente a 35-40 °C y la temperatura se mantiene constante durante > 45 min. A continuación, la temperatura se eleva a 44-48 °C y se mantiene constante durante 30 min. Después de enfriar a <22 °C se añaden tolueno y agua. Se separan las fases y se descarga la fase de agua/ácido. Se añade agua a la fase de tolueno y se descarga después de la separación. El tolueno se separa por destilación a <50 °C para dar un aceite altamente viscoso. Se añade EtOH, n-heptano y NaOH al 28 % al aceite, se calienta a 55-65 °C durante 1,5 horas, y el producto II comienza a cristalizar. Se añade agua y la suspensión se enfría a 16-22 °C. La suspensión se filtra, la torta se lava con EtOH/agua, seguido de n-heptano y se seca <50 °C (LOD: <1,0 %). Se obtiene el producto II como un sólido de blanco a amarillo claro.

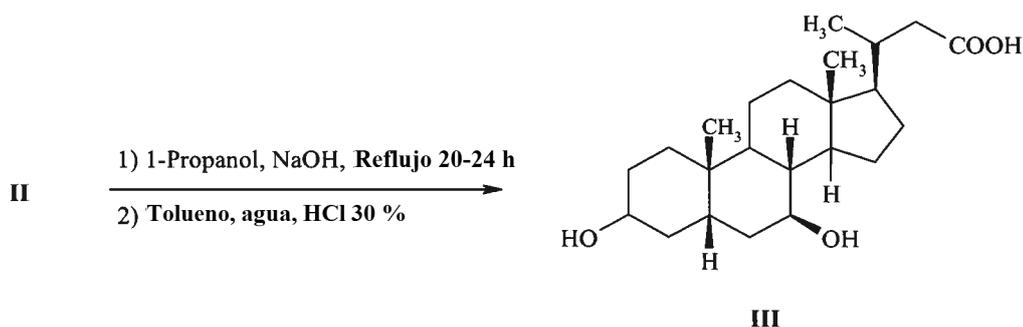
30 b) Diferencias en comparación con la síntesis publicada

El volumen de ácido trifluoroacético se redujo para minimizar el uso de productos químicos nocivos y costosos. Para optimizar la seguridad y la pureza, se modificaron los intervalos de temperatura y los intervalos de tiempo durante la

adición de nitrito de sodio y el calentamiento. El procedimiento de tratamiento se modificó con el fin de que fuese práctico a escala de producción y para aumentar la pureza. La mezcla de reacción se extrajo con tolueno y a continuación se desprotegió completamente con hidróxido de sodio en EtOH/agua/n-heptano. El producto se cristalizó en EtOH/agua/n-heptano alcalino. Esto está en contraste con el procedimiento publicado por Schteingart (1988), un procedimiento sin cristalización del producto y por lo tanto sin ningún elemento de purificación.

Los rendimientos obtenidos por el procedimiento revisado son de aproximadamente el 80 %.

Etapa 3: Preparación de ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-24-Nor-5 β -colan-23-oico (III)



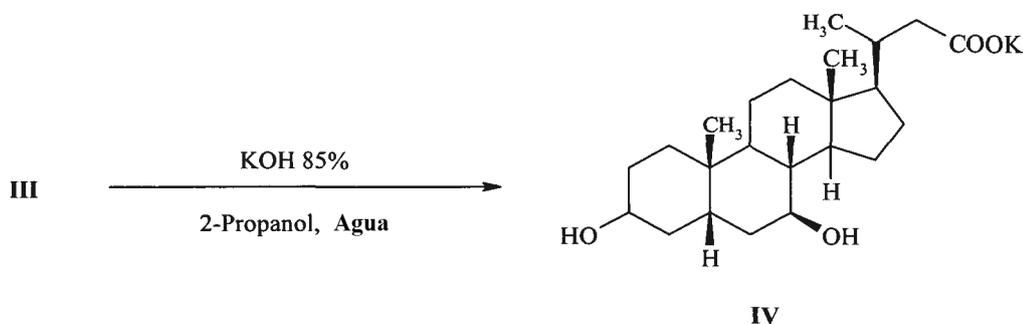
a) Descripción del procedimiento (hidrólisis)

Se mezclan producto II, n-propanol e hidróxido de sodio (gránulos) en un reactor de acero. La reacción mezclada se agita y se calienta a reflujo hasta que la hidrólisis es completa (> 20 h). Se añade agua y el n-propanol/agua se separan por destilación, manteniendo la temperatura por encima de 45 °C. Se añade tolueno-agua, mientras la mezcla de reacción se agita de manera eficiente y la temperatura se mantiene a 55-65 °C. El pH se ajusta de 1,0 a 2,0 con HCl al 30 %. El producto III (Nor-AUDC crudo que incluye impurezas a un rendimiento de aproximadamente el 95 % por detección UV a 290 nm) cristaliza en el sistema de dos fases durante el ajuste del pH. La suspensión se enfría de 18 a 22 °C. La suspensión se filtra y la torta del filtro se lava con agua y n-heptano y se seca a un máximo de 50 °C (LOD: $\leq 1,0$ %).

b) Diferencias en comparación con la síntesis publicada

El tiempo de reacción se redujo significativamente cambiando el disolvente de EtOH: agua 1: 1 a n-propanol puro y cambiando de hidróxido de potasio a hidróxido de sodio. También se redujo el volumen de disolvente. El lavado y la extracción se dejaron fuera del procedimiento de tratamiento y en su lugar el producto se cristalizó directamente en un sistema de dos fases de agua y tolueno. Este procedimiento es mucho más simple: ahorra tiempo, reduce los disolventes tóxicos, usa materiales no tóxicos y por lo tanto la cristalización está sujeta a un mejor control. La cristalización en este sistema de dos fases proporciona una excelente calidad de producto con un rendimiento de al menos el 90 %.

Etapa 4: Preparación de la sal de potasio del ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-24-Nor-5 β -colan-23-oico (sal de potasio del Nor-AUDC, IV)



a) Descripción del procedimiento (purificación)

Se mezclan el Producto III, 2-propanol y un equivalente de hidróxido de potasio y se calienta a 70-80 °C. Se añade agua lentamente hasta que se obtiene una solución. La solución es de color amarillo claro a amarillo y ligeramente turbia. Se añaden carbón activo y perlita y la solución se filtra en caliente. A presión reducida el 2-propanol/agua se separa por destilación a 40-80 °C. Mediante la adición de 2-propanolol, se prosigue con la destilación hasta que el

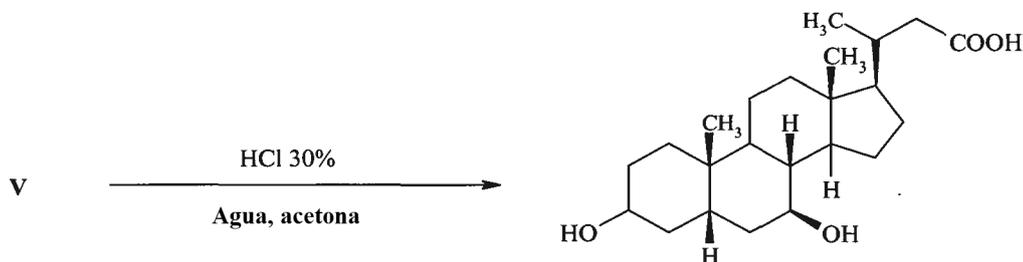
contenido de agua es $\leq 2\%$. A continuación, la suspensión se enfría a 5-15 °C (≥ 4 horas). La temperatura se baja a 0-5 °C y el producto IV se separa por filtración, se lava con 2-propanol y se seca a presión reducida a ≤ 50 °C. Se obtiene el producto IV como un sólido blanco. En el caso de la sal de potasio obtenida no es de pureza suficiente para que se pueda volver a cristalizar:

- 5 Se mezcla el producto IV y 2-propanol y se calienta a 75-80 °C. Se añade agua hasta que se obtiene una solución. El 2-propanol/agua se separan por destilación a presión reducida a 40-80 °C. Durante la destilación el producto IV comienza a cristalizar. Una vez más, se prosigue con la destilación hasta que el contenido de agua es $\leq 2\%$. Se añade 2-propanol y la suspensión se enfría a 5-15 °C (≥ 4 horas). La temperatura se baja a 0-5 °C y el producto V se separa por filtración, se lava con 2-propanol y se seca a presión reducida a ≤ 50 °C. La re-
- 10 cristalización se repite hasta que la prueba de la pureza está conforme (se obtiene el producto V farmacéutico puro y con rendimientos muy altos de $\geq 98\%$, una prueba de purificación muy eficiente).

b) Diferencias en comparación con la síntesis publicada

Se describe una nueva etapa de purificación de la síntesis, no publicada en el estado de la técnica.

Etapa 5: Preparación del Nor-AUDC puro (VI)



Nor-UDCA = VI

- 15 a) Descripción del procedimiento (precipitación final)
- Se agitó producto V, agua y acetona a 22-28 °C para obtener una solución. La solución se filtra. El pH de la mezcla de reacción se ajusta de 1,0 a 2,0 con la adición lenta de HCl al 30 %. El producto VI comienza a cristalizar inmediatamente. La suspensión se enfría a 18-24 °C, se filtra, se lava con agua para inyecciones, agua para
- 20 inyecciones/acetona, y n-heptano y se seca a presión reducida a ≤ 50 °C (LOD: $\leq 0,8\%$). El rendimiento es de al menos el 90 %.

b) Diferencias en comparación con la síntesis publicada

- 25 En el procedimiento publicado el Nor-AUDC se purifica por cromatografía en columna de intercambio iónico y recristalización en metanol/acetona. El procedimiento de purificación más eficaz se identificó como la formación y/o, como alternativa, la recristalización de la sal de potasio del Nor-AUDC en 2-propanol/agua seguido de la precipitación del ácido libre en agua/acetona. Este procedimiento de purificación demostró ser muy eficaz en la eliminación de las dos impurezas conocidas A (amida) y B (AUDC), así como de impurezas desconocidas. Finalmente, después del tamizado se sintetiza Nor-AUDC con una alta calidad con una distribución de tamaño de partícula definido ($60\% < 10\ \mu\text{m}$) como se requiere para aplicaciones farmacéuticas.

30 *Composiciones farmacéuticas*

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el polimorfo de la invención.

La composición farmacéutica puede comprender uno o más excipientes adecuados que son farmacéuticamente aceptables.

- 35 De acuerdo con una forma de realización especial de la presente invención, el polimorfo se puede formular para su administración oral o intravenosa, en el que estas formulaciones comprenden además portadores, adyuvantes, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 40 Las formas de dosificación sólidas para su administración oral pueden incluir comprimidos, preferentemente comprimidos efervescentes o masticables, cápsulas, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el polimorfo se puede mezclar con sustancias que se usan regularmente como sacarosa, manitol, sorbitol, almidón y derivados de almidón, celulosa y derivados de celulosa (por ejemplo, celulosa microcristalina), fosfato dicálcico, lactosa, sílice anhidra coloidal, talco, agentes lubricantes (por ejemplo estearato de magnesio, macrogol),

disgregantes y agentes tampón. Los comprimidos y píldoras también se pueden preparar con recubrimientos entéricos, a fin de evitar que el IFA se vea afectado por los ácidos del estómago y las enzimas.

5 Las formas de dosificación líquidas para su administración oral pueden incluir emulsiones, soluciones, suspensiones y jarabes farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como agua o mezclas de etanol/agua. Estas formas de dosificación pueden contener celulosa microcristalina, ácido algínico o alginato de sodio, metilcelulosa y similares para ajustar las propiedades reológicas, edulcorantes/agentes aromatizantes, y/o el empleo de ácido sórbico o de otros conservantes antimicrobianos adecuados. Cuando se administra por aerosol nasal o inhalación, las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, 10 promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes.

15 Los supositorios para la administración rectal del IFA se pueden preparar mezclando el polimorfo con un excipiente no irritante adecuado, tal como grasa dura, manteca de cacao y polietilenglicoles que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura del recto, de tal manera que se fundirán en el recto y liberarán el IFA y opcionalmente otros compuestos activos presentes en dichos supositorios.

20 Las preparaciones inyectables, por ejemplo suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se pueden formular según la técnica conocida usando agentes dispersantes, agentes humectantes y/o agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar están el agua y solución isotónica de cloruro de sodio. Los aceites fijos estériles también se usan convencionalmente como medio disolvente o de suspensión.

25 Las formas de dosificación que comprenden el polimorfo de la invención pueden incluir además excipientes convencionales, preferentemente sustancias de vehículos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables que no reaccionan con el compuesto activo. Los vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, aceites, preferentemente aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, agentes tensioactivos, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácido graso de éter de petróleo, hidroximetil-celulosa, polivinilpirrolidona y similares. Las preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, como 30 lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan de forma perjudicial con los compuestos activos. Para la aplicación parenteral, los vehículos particularmente adecuados consisten en soluciones, preferentemente soluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones, o implantes.

35 Se conocen varios sistemas de administración y se pueden usar para administrar el IFA, incluyendo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, emulsiones, micropartículas, microcápsulas y microgránulos (véase, por ejemplo, patente EP 1 317 925). La dosificación requerida se puede administrar como una sola unidad o en una forma de liberación sostenida. La forma de dosificación requerida además se puede administrar en una forma de unidad múltiple, en forma de liberación inmediata, sostenida, prolongada, o extendida, preparada por recubrimiento, como formulación de matriz y similares.

40 La biodisponibilidad del IFA se puede mejorar mediante la micronización de las formulaciones usando técnicas convencionales tales como trituración, molienda y secado por pulverización en presencia de excipientes o agentes adecuados tales como fosfolípidos o tensioactivos. Sin embargo, en una realización especial no se requiere trituración y molienda puesto que el polimorfo de la invención ya tiene un tamaño de partícula adecuado.

45 La composición farmacéutica comprende preferentemente una cantidad eficaz del Nor-AUDC y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica comprende de 10 a 8000 mg, preferentemente de 25 a 5000 mg, más preferentemente de 50 a 1500 mg, en particular de 250 a 500 mg, del Nor-AUDC.

50 En promedio, el Nor-AUDC se puede administrar preferentemente a un paciente en una cantidad de 25 mg a 5 g, preferentemente de 100 mg a 2,5 g, en particular, de 80,0 mg a 1,5 g por día. Sin embargo, lo más preferentemente se administra 1 g del Nor-AUDC a un paciente. Se observa además que el Nor-AUDC se puede administrar a un individuo de 1 a 3000 mg/d, preferentemente de 10 a 2000 mg/d, más preferentemente de 100 a 1500 mg/d, por ejemplo, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 o 1500 mg/d, en particular 500 o 750 o 1000 o 1500 mg/d. Dichas cantidades se administran preferentemente en una o posiblemente en más 55 de una dosis (al menos 2, 3, 4, 5 o 10 dosis) al día. El medicamento o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se pueden administrar durante más de una semana, preferentemente más de cuatro semanas, más preferentemente más de seis meses, lo más preferentemente más de un año, en particular, durante toda la vida.

El Nor-AUDC se puede administrar no solo en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables y en formas de dosificación como se describe en el presente documento, sino también, naturalmente, en combinación con uno o más ingredientes activos adicionales (por ejemplo, ácido ursodesoxicólico, AINE, como sulindac e ibuprofeno), que también se sabe que son eficaces contra la misma enfermedad o una enfermedad a tratar similar (por ejemplo, ácido ursodesoxicólico) o contra otra enfermedad, que puede ser preferentemente el resultado de una enfermedad del hígado.

Uso farmacéutico del polimorfo

La enfermedad hepática a tratar de acuerdo con la presente invención puede ser una enfermedad colestática del hígado, preferentemente colangitis esclerosante primaria (PSC), cirrosis biliar primaria (PBC) o colestasis intrahepática familiar progresiva, en particular colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 1, 2 y 3, fibrosis quística, colestasis inducida por fármacos o una enfermedad no colestática del hígado tal como hepatitis viral crónica (B, C, D), esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica, hepatitis autoinmune, hemocromatosis, enfermedad de Wilson y deficiencia de alfa-1-antitripsina.

El IFA de la invención se puede usar solo o en combinación con otros fármacos anti-inflamatorios, como AINEs (por ejemplo, ibuprofeno, sulindac) y/o en combinación con ácido ursodesoxicólico o ácido 5-aminosalicílico.

Según otra realización preferida de la presente invención, la enfermedad hepática es colangitis esclerosante primaria (PSC) y/o cirrosis biliar primaria (PBC).

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, la enfermedad a tratar es una enfermedad metabólica, por ejemplo, esteatohepatitis no alcohólica, diabetes, y/o hiperlipidemia. De acuerdo con otra realización preferida adicional de la presente invención, la enfermedad a tratar es la arteriosclerosis.

Ejemplos

Ejemplo de referencia

Se investigaron varias propiedades del Nor-AUDC sintetizado de acuerdo con Scheingart y Hofmann (1988) Journal of Lipid Research Vol. 29 (10), 1387-1395.

Pureza química

El perfil de impurezas químicas del Nor-AUDC sintetizado se evaluó mediante HPLC/RI. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Impureza A	0,15 %
Impureza B	≤0,03 % (umbral de registro)
Impureza desconocida 1 (RRT = 0,53)	0,51 %
Impureza desconocida 2 (RRT = 0,84)	0,09 %
Total	0,75 %

La cantidad total de impurezas debería ser inferior al 0,05 % si el compuesto se va a usar para fines farmacéuticos. El Nor-AUDC sintetizado de acuerdo con Scheingart y Hofmann no cumplía este requisito. Se trató de purificar aún más el compuesto por recristalizaciones repetidas. Sin embargo, no fue posible reducir la cantidad total de impurezas por debajo del 0,05 %.

Distribución del tamaño de partícula

El tamaño de partícula de los cristales obtenidos se analizó por microscopía. Se comprobó que el tamaño medio de partículas era de 13,37 μm , es decir el 50 % de los cristales tenía un tamaño de 13,37 μm o menos. El 60 % de los cristales tenía un tamaño de partícula de 15,64 μm o menos. El 95 % de las partículas tenía un tamaño de partícula de 46,64 μm o menos. Menos del 30 % de las partículas tenía un tamaño de partículas de 10 μm o menos. Esta distribución del tamaño de partícula no es adecuada para la preparación farmacéutica prevista. La molienda/micronización no es conveniente ya que esto daría lugar a una reducción de la pureza polimórfica y/o de la estabilidad termodinámica del Nor-AUDC.

Ejemplo 1: Pureza polimórfica del Nor-AUDC sintetizado

Se llevó a cabo un estudio de cribado del polimorfo en dos fases. En la Fase 1, el Nor-AUDC sintetizado, denominado Forma A, se caracterizó por XRPD, imagen digital, y análisis térmico (DSC y TGMS). La pureza del material se comprobó por HPLC/RI. Un resumen de los procedimientos de análisis se proporciona en la Tabla 1. Se

llevó a cabo la determinación de la solubilidad cualitativa con 20 disolventes con el fin de ajustar los datos para la selección de los disolventes de cristalización a emplear en el cribado del polimorfo. Además, los sólidos recuperados por evaporación de las soluciones usadas en los experimentos de solubilidad se analizaron por XRPD e imagen digital para obtener información sobre la formación potencial de nuevas formas del Nor-AUDC (véase Tabla 2). Se

- 5 llevaron a cabo pruebas de molienda con el fin de respaldar la definición del espacio experimental para este modo de cristalización. Se produjo intencionadamente material amorfo por liofilización que se usa como material de partida a partir de una solución de 1,4-dioxano/agua (95/5 %) y por molienda (molino de bolas) para el "enfriamiento/evaporación y difusión de vapor en experimentos de sólidos". En la fase 2, se realizaron 217 experimentos divididos en diferentes modos de cristalización. Los modos de cristalización aplicados fueron:
- 10
- Experimentos de refrigeración/cristalización por evaporación combinados partiendo de material amorfo
 - Cristalización con adición directa de anti-disolvente
 - Experimentos en suspensión a dos temperaturas
 - Difusión de vapor en soluciones
 - Difusión de vapor en sólidos amorfos
- 15
- Cristalización por trituración con 24 disolventes y uno seco.

Una vez concluidos los experimentos, se realizaron análisis de XRPD y de las imágenes digitales en todos los sólidos cristalizados. Tras la identificación de las formas estables, la evaluación de su naturaleza y su estabilidad relativa frente al material de partida se demostró la forma por análisis térmicos y nuevos análisis de XRPD después del almacenamiento.

- 20 Los resultados del cribado del polimorfo del Nor-AUDC mostraron que la Forma A se encontraba con una alta incidencia en todos los tipos de modos de cristalización y también se forma en diferentes disolventes puros y mezclas (véase Figura 1). Incluso en los experimentos de cristalización que parten de la forma amorfa del Nor-AUDC producido por molienda o por evaporación de la solución liofilizada para borrar los efectos de memoria de la Forma A, los análisis de XRPD realizados en los sólidos aislados mostraron que principalmente se obtenía la Forma A. Parece que es fácil cultivar cristales individuales de la Forma A, puesto que se observaron cristales individuales que han crecido en la difusión de vapor en experimentos de solución. Esto sugiere que el aumento gradual de la sobresaturación por el tiempo de difusión lenta de anti-disolvente juega un papel a la hora de permitir el crecimiento de cristales de la Forma A. El hábito cristalino observado en general era de tipo voluminoso. La estructura cristalina del Nor-AUDC se determinó a partir de datos de difracción de rayos X de un solo cristal recogidos a una temperatura de 294 K y cristalizado en el sistema monoclinico, con grupo espacial C2 ($Z' = 2$) (véase Tabla 3). La estructura cristalina del Nor-AUDC se refinó con éxito con un GOF de 1,002 (véase Tabla 3). El empaquetamiento cristalino y el esquema de puentes de H del Nor-AUDC se presenta en la Figura 2. El Nor-AUDC solamente presenta puentes de H intramoleculares que forman monómeros que se repiten periódicamente. Los puentes de H se forman entre los distintos grupos hidroxilo. Las moléculas de Nor-AUDC se encuentran en empaquetamiento cerrado siguiendo un patrón en zigzag y sin ningún hueco accesible para el disolvente (véase Figura 3).
- 25
- 30
- 35

Se identificaron tres formas inestables adicionales (Forma B, Forma C1 y Forma C2) en experimentos de enfriamiento/evaporación. La Forma C1 también se obtuvo en un anti-disolvente, seguido por un experimento de enfriamiento/evaporación combinado. Los XRPD de las tres formas son similares, incluso muy similares en el caso de las Formas C1 y C2, lo que indica la posibilidad de que sean tipos de estructuras isomorfas. La Forma C1 era suficientemente estable para permitir la determinación de su naturaleza solvatada. Debido a su inestabilidad, no se pudo determinar la naturaleza de la Forma B y la Forma C2. Habiendo similitudes en los patrones de XRPD así como similitudes en la estructura molecular de los disolventes de cristalización a partir de los cuales se cristalizaron las formas, se puede pensar que las Formas B y C2 también son estructuras solvatadas.

40

Se identificaron tres mezclas inestables adicionales (Forma A plus1, Forma A plus2 y Forma A plus3). La mezcla de la Forma A plus1 es una mezcla de la Forma A con otra posible forma obtenida a partir de experimentos de enfriamiento/evaporación. La mezcla de la Forma A plus2 es una mezcla de la Forma A con otra posible forma obtenida a partir de experimentos en suspensión a baja temperatura. La mezcla de la Forma A plus3 es una mezcla de la Forma A con otra posible forma obtenida después la desolvatación o transformación de la Forma C1 (obtenida en experimentos de refrigeración/evaporación) durante el almacenamiento en condiciones ambientales. Debido a su baja presencia en las mezclas y su inestabilidad, no se pudo determinar la naturaleza de las tres formas posibles presentes en la mezcla.

45

50

Un resumen de las formas encontradas del Nor-AUDC durante el estudio de cribado del polimorfo se presenta en la Tabla 4 y la Figura 4. Las condiciones establecidas para la síntesis del Nor-AUDC puro (purificación y recristalización de la sal de potasio del Nor-AUDC con la posterior precipitación del ácido libre), sin embargo, solo proporciona la sustancia cristalina físicamente pura y termodinámicamente estable, es decir, la Forma A.

55

Tabla 1: Procedimientos analíticos usados en el cribado del polimorfo

(a) Difracción de rayos X de polvo	
Equipo:	Las placas se montan en un difractómetro Bruker GADDS equipado con un detector de área Hi-Star.
Calibración:	La plataforma de XRPD se calibró usando behenato de plata para distancias interplanares d largas y corindón para distancias interplanares d cortas.
Recopilación de datos:	La recopilación de datos se llevó a cabo a temperatura ambiente usando radiación monocromática de CuK_α en la región 2θ entre $1,5^\circ$ y $41,5^\circ$. El patrón de difracción se recogió en dos rangos de 2θ ($1,5^\circ \leq 2\theta \leq 21,5^\circ$ para el primer fotograma y $19,5^\circ \leq 2\theta \leq 41,5^\circ$ para el segundo) con un tiempo de exposición de 90 s para cada fotograma.
(b) Análisis térmico	
• Calorimetría diferencial de barrido:	Se obtuvieron las propiedades de fusión de termogramas de DSC, registrados con un instrumento de flujo de calor DCS822e (Mettler-Toledo GmbH, Suiza). El DCS822e se calibró para la temperatura y la entalpía con un trozo pequeño de indio (punto de fusión = $156,6^\circ\text{C}$; $\Delta H_f = 28,45 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$). Las muestras se calentaron en el DSC de 25°C a 300°C , a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Se usó N_2 gaseoso seco a una velocidad de flujo de $50 \text{ ml}/\text{min}$ para purgar el equipo DSC durante la medición.
• Análisis termogravimétrico:	La pérdida de masa debido a la pérdida de disolvente o agua de los cristales se determinó por TGA/SDTA. El control del peso de la muestra, durante el calentamiento en un instrumento TGA/SDTA851e (Mettler-Toledo GmbH, Suiza), dio lugar a una curva de peso frente a temperatura. El TGA/SDTA851e se calibró para la temperatura con indio y aluminio. Los crisoles de muestras se calentaron en el TGA $25\text{-}300^\circ\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Se usó N_2 gaseoso seco para la purga.
(c) Análisis termogravimétrico/espectroscopía de masas	
Se utilizó un espectrómetro de masas cuadrupolo Thermostar GSD 301 T2 (Pfeiffer Vacuum GmbH, Asslar) acoplado con un capilar de cuarzo al instrumento TGA para identificar gases liberados. El último límite de detección es de 10^{-14} mbar, y la sensibilidad para el Ar es de 200 A/mbar. Se realizó una medición de detección de múltiples iones (MID) con una tensión del channeltron de 950 V.	
(d) Imagen digital y microscopía óptica	
Las imágenes digitales se obtuvieron empleando una cámara CCD Philips CVCP 840K. Las imágenes de microscopía óptica se realizaron usando un microscopio estereoscópico Leica MZ9.5 equipado con una cámara digital Leica DC 300.	
(e) Sorción dinámica de vapor	
Las isotermas de sorción de humedad se hicieron usando un sistema DVS-1 (Surface Measurement Systems, Londres, Reino Unido).	
(f) HPLC/RI	
• Equipo de HPLC:	Merck Amazon LC-01, LaChrom
• Columna:	Waters XBridge C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), T = 40°C
• Fase móvil:	Modo isocrático (ACN: MeOH: 5 mM de tampón de fosfato a pH 3 = 30:40:50)
• Detector de RI:	Merck L-7490

Tabla 2: Resultados de la evaluación de la solubilidad del Nor-AUDC

Solvente	Solubilidad (mg/ml)	Forma (mediante XRPD)
Pentano	<13	Forma A
Ciclohexano	<14	Forma A
N-metil-2-pirrolidona	404	Forma A
terc-butilmetiléter	<13	No determinado
1,4-dioxano	21	Forma A
1,2-dimetoxietano	<14	Forma A
2-butanona	<14	Forma A
Dimetilsulfóxido	207	No determinado
Agua	<12	Forma A
1,2-etanodiol	<14	No determinado
2,2,2-trifluoroetanol	21	Forma A
Cloroformo	<14	Forma A
Metanol	70	Forma A
Nitrobenzeno	<13	Forma A
Diclorometano	<13	Forma A
Acetona	<14	Forma A
Tetrahidrofurano	41	Forma A
Nitrometano	<13	No determinado
Tolueno	<12	Forma A
Acetonitrilo	<13	Forma A

La Figura 1 muestra el patrón de XRPD del material de partida y de la Forma A obtenida a partir de diferentes experimentos de cristalización. Nota: El material de partida de la Forma A en la Figura 1 significa ácido nor-ursodesoxicólico puro, polimorfo y cristalino con un tamaño de partícula definido, usado en los estudios de cribado del polimorfo descritos.

5

Tabla 3: Datos de un solo cristal y refinamiento de la estructura de la Forma A del Nor-AUDC

Código de identificación	Forma A
Formula empírica	$C_{23}H_{38}O_4$
Peso de la fórmula	378,53
T [K]	297 (2)
λ [Å]	0,71073
Sistema cristalino	Monoclínica

(continuación)

Código de identificación	Forma A
Grupo espacial	C 2
Dimensiones de la celda unidad	
a [Å]	23,246 (3)
b [Å]	11,197 (2)
c [Å]	19,232 (4)
β [°]	122,869 (13)
V [Å ³]	4204,4 (13)
Z	8
D _c [g/cm ³]	1,196
μ [mm ⁻¹]	0,080
F (000)	1664
Tamaño del cristal [mm ³]	0,45 x 0,35 x 0,25
Rango θ de recopilación de datos	3 → 32,6
Reflexiones recogidas	23586
Reflexiones independientes	14414 [R _{int} = 0,0541]
Compleción hasta $\theta = 32,6$	96,6 %
Transmisión máx. y mín.	0,9804 y 0,9651
Datos/restricciones/parámetros	14414/1/505
Bondad del ajuste sobre F ²	0,980
Índices R finales [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0,0679, wR2 = 0,1194
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,1760, wR2 = 0,1513
Parámetro de estructura absoluta	0,2 (9)

La Figura 2 representa el empaquetamiento cristalino y el esquema de puentes de H para la Forma A del Nor-AUDC. Nota: la caja indica el empaquetamiento de un solo cristal del Nor-AUDC (Forma A).

5 La Figura 3 representa la estructura molecular y el esquema de numeración atómico por dos moléculas independientes de forma simétrica de cristales del Nor-AUDC.

Tabla 4: Resumen de las formas encontradas del Nor-AUDC durante el estudio de cribado del polimorfo

Forma/forma potencial y mezclas	Estabilidad mediante XRPD	TGMS (%) / pérdida de disolvente <i>Naturaleza/observaciones</i>	Pérdida de masa teórica (%)	Endotermia de DSC (°C)	Pureza HPLC/RI
Forma A	Forma A	<i>Anhidrato</i>	-	Evento endotérmico que funde a 249,5	99,96 %

(continuación)

Forma/forma potencial y mezclas	Estabilidad mediante XRPD	TGMS (%) / pérdida de disolvente Naturaleza/observaciones	Pérdida de masa teórica (%)	Endoterminia de DSC (°C)	Pureza HPLC/RI
Forma A plus1	Forma A	-	-	-	-
Forma A plus2	Forma A	-	-	-	-
	Forma plus2 A	<i>Solvato potencial 26,52 % de CHCl₃ 1,14 moléculas de CHCl₃</i>	26,44	Evento endotérmico 93 Evento exotérmico 105 Evento endotérmico que funde a 251,3	-
Forma B	Forma A	-	-	-	-
Forma C1	Forma A	-	-	-	-
	Forma C ^{AS}	<i>Solvato potencial 11,18 % de tolueno 0,52 moléculas de tolueno</i>	11,24	Evento endotérmico 91,8 Evento endotérmico que funde a 250,9	-
	Forma plus3 * A	-	-	-	-
Forma C2	Forma A	-	-	-	-
Notas:					
• AS: experimento con anti-disolvente, seguido por enfriamiento/evaporación					
• *: Forma C1 desolvatada y/o transformada durante el almacenamiento en condiciones ambientales					

La Figura 4 representa la comparación del patrón de XRPD de las nuevas formas obtenidas del Nor-AUDC y el patrón de XRPD de la Forma A. Nota: el material de partida de la Forma A en la Figura 4 significa ácido nor-ursodesoxicólico puro, polimorfo y cristalino con un tamaño de partícula definido. Explicaciones de los patrones de XRPD que se muestran en la Figura 4:

5 Además de la Forma A, se aislaron tres posibles mezclas de la Forma A con otras formas. La presencia de las nuevas formas se indicó por la presencia de picos adicionales en los patrones de XRPD de los sólidos, picos que no son específicos de la XRPD de la Forma A. Debido al hecho de que los análisis de XRPD demostraron que la forma predominante en la mezcla es la Forma A, se designaron las posibles mezclas: Forma A plus1, Forma A plus2 y Forma A plus3.

10 La mezcla designada Forma plus1 A se encontró después de completar un experimento de enfriamiento/evaporación con anisol y metanol. Su patrón de XRPD mostraba tres picos adicionales (junto a los de la Forma A) a aproximadamente 8,77°, 14,70° y 20,51° (2Theta). Los nuevos análisis de XRPD de sólidos almacenados en condiciones ambientales en pocillos y viales experimentales mostraron que la mezcla se convertía completamente a la Forma A en 7 días.

15 La mezcla designada Forma A plus2 se encontró después de completar un experimento de suspensión a 5 °C con cloroformo. El patrón de XRPD del sólido muestra cinco picos adicionales a aproximadamente 6,41°, 12,75°, 12,89°, 14,72° y 17,06° (2theta) en comparación con la Forma A. Los nuevos análisis de XRPD de sólidos almacenados en condiciones ambientales en pocillos mostraban que la mezcla se convertía completamente a la Forma A en 11 días,

pero era estable en vial experimental (en el mismo intervalo de tiempo).

La mezcla designada Forma A plus3 se identificó después de la conversión de la Forma C1 (experimentos con anti-disolvente con 2,2,2-trifluoroetanol y tolueno) almacenado en condiciones ambientales durante 7 días. El patrón de XRPD de la posible mezcla de Forma A plus3 muestra tres picos adicionales a 6,74°, 7,15° y 10,25° (2Theta) en comparación con la Forma A.

La Forma B fue identificada después de completar el experimento de enfriamiento/evaporación con 1,4-dioxano y tetrahidrofurano. El patrón de XRPD de la Forma B es similar al de las Formas C1 y C2 en el sentido de que los picos intensos principales comunes a las Formas C1 y C2 también están presentes en el XRPD de la Forma B. Sin embargo, la inclusión de la Forma B en la misma clase de formas isomorfas (como la Forma C1 y C2) no fue sencilla posiblemente debido a la presencia de los efectos de orientación preferida. Los nuevos análisis de XRPD de la Forma B mostraron que en 10 días se convierte en la Forma A tras su almacenamiento en pocillos y viales experimentales en condiciones ambientales.

La Forma C1 se encontró en los experimentos de enfriamiento/evaporación con p-xileno y metanol. Los análisis de XRPD del sólido almacenado en condiciones ambientales en el pocillo de medición mostraban que la forma se convertía en la Forma A en 7 días. La Forma C1 también se encontró en los experimentos con anti-disolvente con 2,2,2-trifluoroetanol y tolueno. También en este caso, la forma se convertía en la Forma A en 7 días de almacenamiento en el pocillo.

La Figura 5 muestra por separado el patrón de XRPD de la Forma A. El polimorfo se caracteriza por picos de XRPD en 11,9, 14,4, 15,3, 15,8, 16,6 ± 0,2° de 2-theta y tiene el aspecto general que se muestra en la Figura 5.

Ejemplo 2: Pureza química del Nor-AUDC sintetizado

El perfil de impurezas químicas del Nor-AUDC sintetizado se evaluó mediante HPLC/RI. El procedimiento que incluye las condiciones instrumentales se resumen en la Tabla 5. Los posibles subproductos de la síntesis son la impureza A, la impureza B, la impureza C, la impureza D, la impureza E y la impureza F. La impureza A es el material de partida ácido ursodesoxicólico (AUDC). La impureza B es la 3 α ,7 β -dihidroxi-24-Nor-5 β -colano-23-amida, un producto intermedio formado por hidrólisis incompleta del nitrilo. La impureza C es ácido Nor-quenodesoxicólico (Nor-CDCA), que es una impureza importante en el material de partida AUDC. La impureza D es el ácido cólico (CA), otra impureza importante en el material de partida AUDC. La impureza E es el AUDC protegido por formilo que no experimenta la reacción deseada. Teóricamente es solo una impureza potencial puesto que los grupos de protección de formilo se escinden por tratamiento alcalino que da como resultado otra vez la impureza A. La impureza F es el 3 α ,7 β -dihidroxi-24-Nor-5 β -colano-23-nitrilo, otro intermedio de la síntesis. La eficiencia de los procedimientos de purificación establecidos se demuestra por los resultados del análisis de la pureza por HPLC de tres lotes del Nor-AUDC (véase Tabla 6). La eliminación eficaz de las impurezas potencialmente conocidas y desconocidas por recristalización de la sal de potasio del Nor-AUDC y posterior precipitación del ácido libre da lugar a Nor-AUDC químicamente puro.

Tabla 5: Procedimiento de pureza que incluye las condiciones instrumentales

HPLC/RI	
• Columna:	Waters Symmetry C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m
• Fase móvil:	30 de acetonitrilo
	40 de metanol
	50 de tampón de fosfato 5 mM a pH 3,0
• Temperatura:	40 °C
• Detección:	Detector del índice de refracción
• Caudal:	0,8 ml/min
• Volumen de inyección:	150 μ l

Tabla 6: Resultados de la determinación de la pureza del Nor-AUDC

	Lote 40019721	Lote 40019902	Lote 40019898
Impureza A	$\leq 0,03$ % ¹	$\leq 0,03$ %	$\leq 0,03$ %

(continuación)

	Lote 40019721	Lote 40019902	Lote 40019898
Impureza B	≤ 0,03 %	≤ 0,03 %	≤ 0,03 %
Cualquier otra impureza	≤ 0,03 %	≤ 0,03 %	≤ 0,03 %
Suma de todas las impurezas	≤ 0,03 %	≤ 0,03 %	≤ 0,03 %

[†] Que representa límite de cuantificación del procedimiento analítico

Ejemplo 3: Tamaño de partícula del Nor-AUDC sintetizado

5 La precipitación del ácido libre da lugar a partículas de Nor-AUDC de una distribución de tamaño constante y definida. Se puede evitar la micronización por molienda con el fin de controlar el tamaño de los cristales de Nor-AUDC. Los resultados de la medición del tamaño de partícula de tres lotes de Nor-AUDC demuestran que se puede obtener un tamaño de partícula deseado inferior a 10 µm directamente por las condiciones de precipitación establecidas (véase Tabla 7).

10 **Tabla 7: Resultados de la determinación del tamaño de partícula del Nor-AUDC por difracción láser (Equipo: Analizador de difracción láser Malvern; Procedimiento: seco, detalles del sistema: rango de la lente 300 mm, longitud del haz 10,00 mm)**

Tamaño de partícula	Lote 40019721	Lote 40019902	Lote 40019898
1 µm <D (v, 0,5) < 8 µm	6,4 µm	6,7 µm	5,4 µm

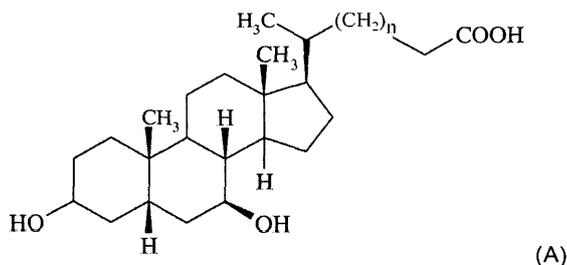
Resumen:

15 En el presente documento se presenta la formación y re-cristalización de la sal de potasio del Nor-AUDC en una mezcla de 2-propanol y agua, seguido de la precipitación del ácido libre en una mezcla de agua y acetona. Este procedimiento de purificación a través de la sal de potasio ha demostrado ser muy eficaz en la eliminación tanto de impurezas conocidas como de impurezas desconocidas.

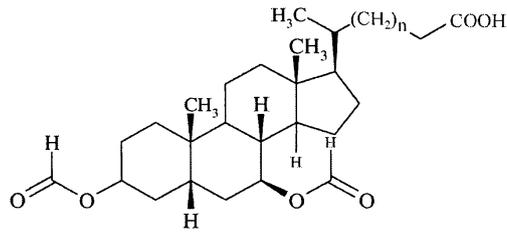
En conclusión, el procedimiento descrito es altamente eficiente para proporcionar una preparación de Nor-AUDC cristalina químicamente pura y de un solo polimorfo, con un tamaño de partícula definido.

REIVINDICACIONES

1. Un polimorfo químicamente puro del Nor-AUDC, en el que la cantidad total de impurezas químicas es inferior al 0,5 %, en base al peso total del Nor-AUDC, y al menos el 60 % de las partículas polimorfas tienen un tamaño de <10 μm , y en el que dicho polimorfo está **caracterizado por** picos de XRPD a 11,9, 14,4, 15,3, 15,8, y $16,6 \pm 0,2$ grados de 2-theta, y en el que el Nor-AUDC no amorfo en dicho polimorfo es detectable mediante XRPD.
2. El polimorfo de la reivindicación 1, en el que la cantidad total de impurezas químicas es inferior al 0,1 %, preferentemente inferior al 0,05 %.
3. El polimorfo de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho Nor-AUDC se encuentra en su forma anhidra.
4. El polimorfo de la reivindicación 1, **caracterizado por** el patrón de XRPD que se muestra en la Figura 5.
5. El polimorfo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene un diámetro de partícula promedio D50 ponderado por volumen inferior a 10 μm , y/o un diámetro de partícula promedio D95 ponderado por volumen inferior a 30 μm .
6. Una composición farmacéutica que comprende el polimorfo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la distribución del tamaño de partícula en la composición farmacéutica comprende al menos el 60 % de partículas con un tamaño <10 μm .
8. El polimorfo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, para su uso en el tratamiento de una enfermedad hepática colestásica, en el que la enfermedad hepática colestásica se selecciona preferentemente del grupo que consiste en cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), hepatitis autoinmune (HAI) y síndromes de superposición, incluyendo síndromes de superposición de AIH.
9. El polimorfo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, para su uso en el tratamiento de una enfermedad hepática metabólica y/o arteriosclerosis, en el que la enfermedad hepática metabólica se selecciona preferentemente entre esteatohepatitis no alcohólica y esteatohepatitis alcohólica.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que se formula para su administración oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, nasal, tópica o rectal, y/o que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
11. Un procedimiento para la preparación de un polimorfo puro del Nor-AUDC, que comprende las siguientes etapas:
- cristalización de la sal de potasio del Nor-AUDC; y
 - opcionalmente, la disolución de la sal de potasio en un disolvente y la acidificación de la solución para obtener Nor-AUDC puro.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho disolvente es una mezcla de agua y acetona, y en el que dicha precipitación se lleva a cabo mediante la acidificación de la solución para tener un pH en el intervalo de 1-2.
13. El procedimiento de la reivindicación 11 o 12, que comprende además las siguientes etapas:
- (a) convertir un compuesto de fórmula (A)

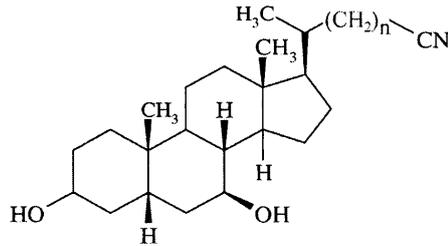


en un compuesto de fórmula (B)



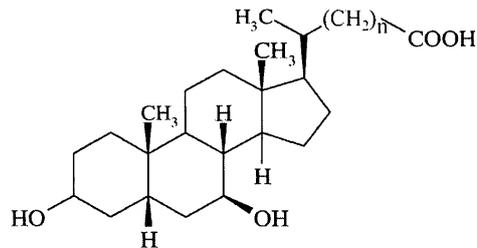
(B);

(b) convertir el compuesto de fórmula (B) en un compuesto de fórmula (C)



(C);

(c) convertir el compuesto de fórmula (C) en un compuesto de fórmula (D) en forma bruta



(D);

5

y

(d) tratar el compuesto de fórmula (D) en forma bruta con KOH en condiciones para cristalizar la sal de potasio del Nor-AUDC;

en las que n es 1.

10 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, **caracterizado porque** no comprende etapa de molienda y/o etapa de micronización.

Figura 1: Patrón de XRPD del material de partida y de la Forma A obtenida a partir de diferentes experimentos de cristalización

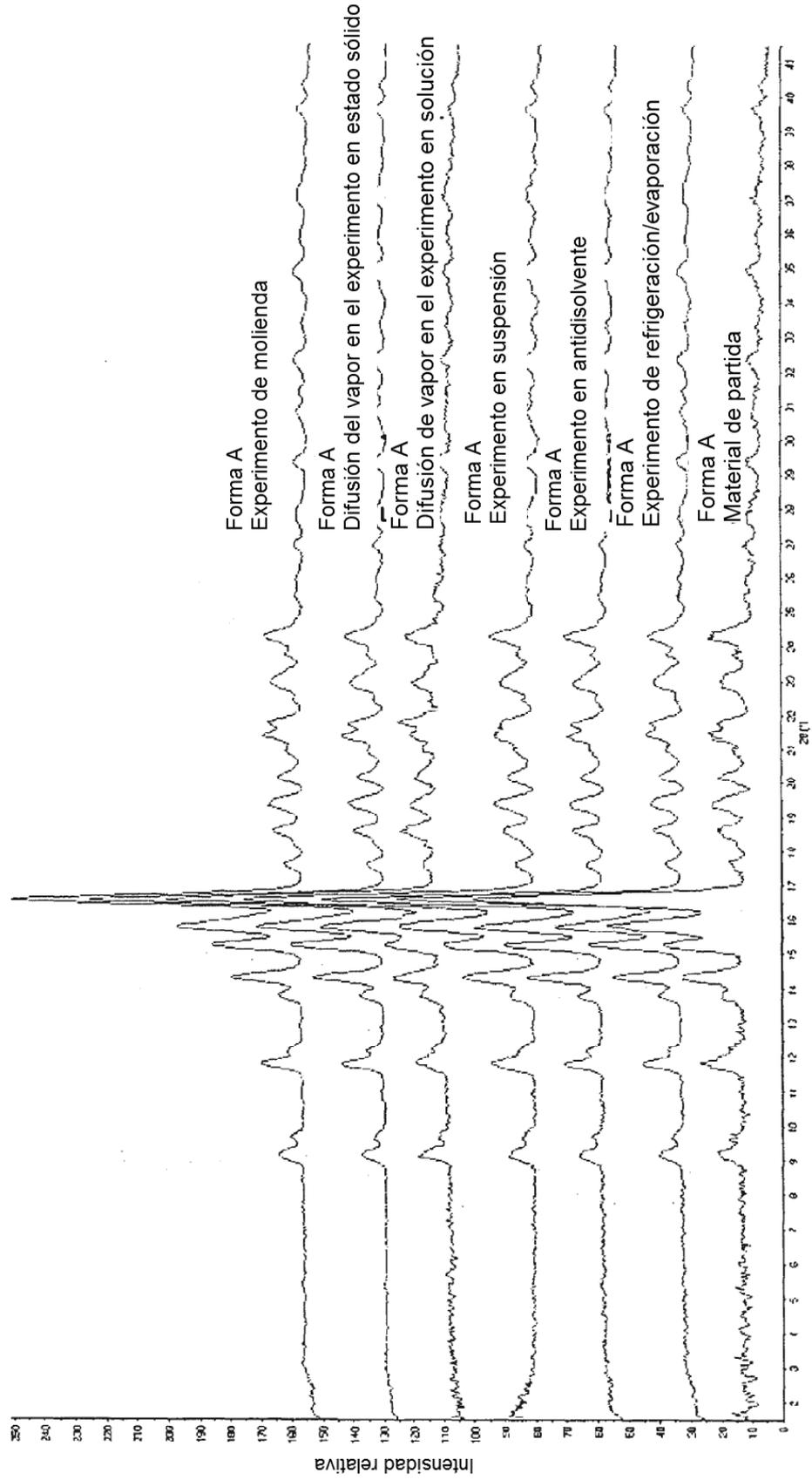


Figura 2: Empaquetamiento cristalino y esquema de puentes de H para la Forma A del Nor-AUDC

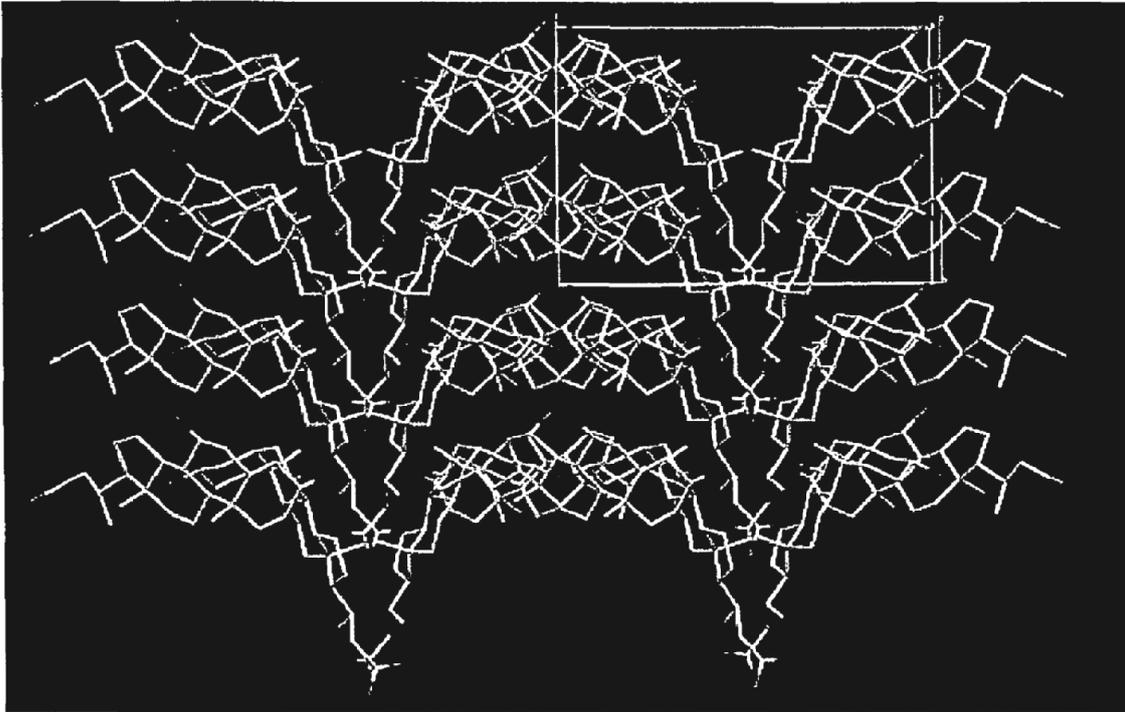


Figura 3: Estructura molecular y esquema de numeración de los átomos mediante dos moléculas simétricamente independientes de cristales de Nor-AUDC

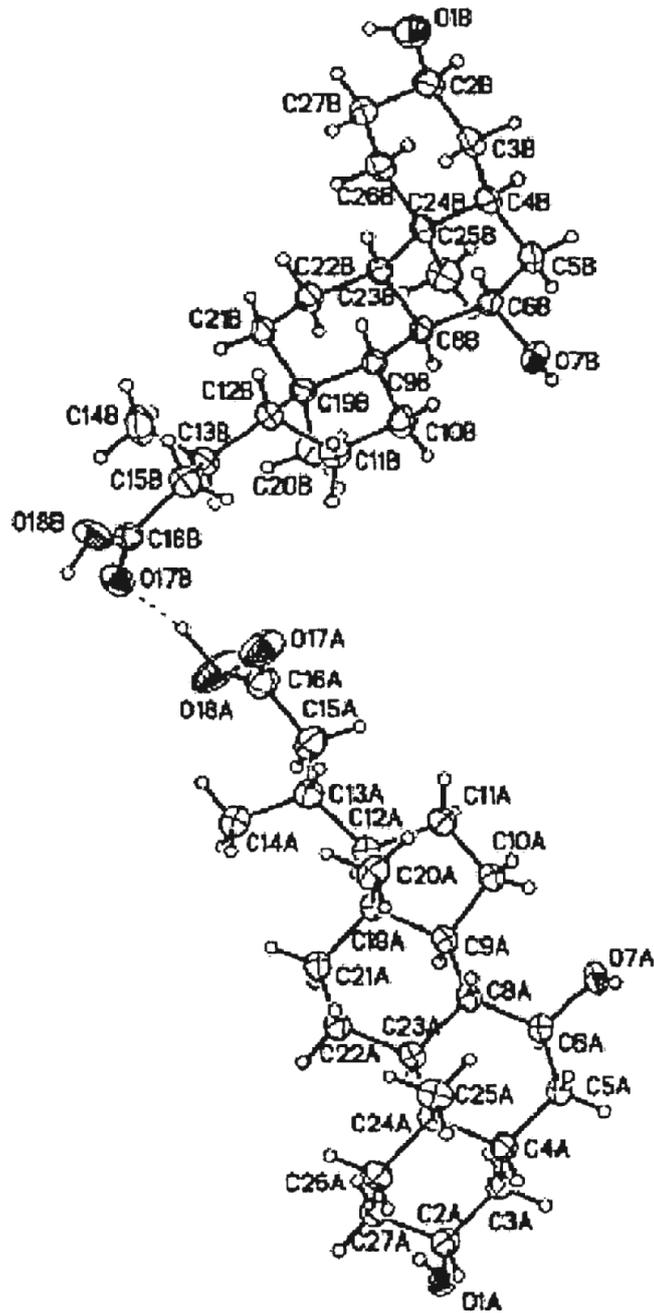


Figura 4: Comparación del patrón de XRPD de nuevas formas obtenidas de Nor-AUDC y patrón de XRPD de la Forma A

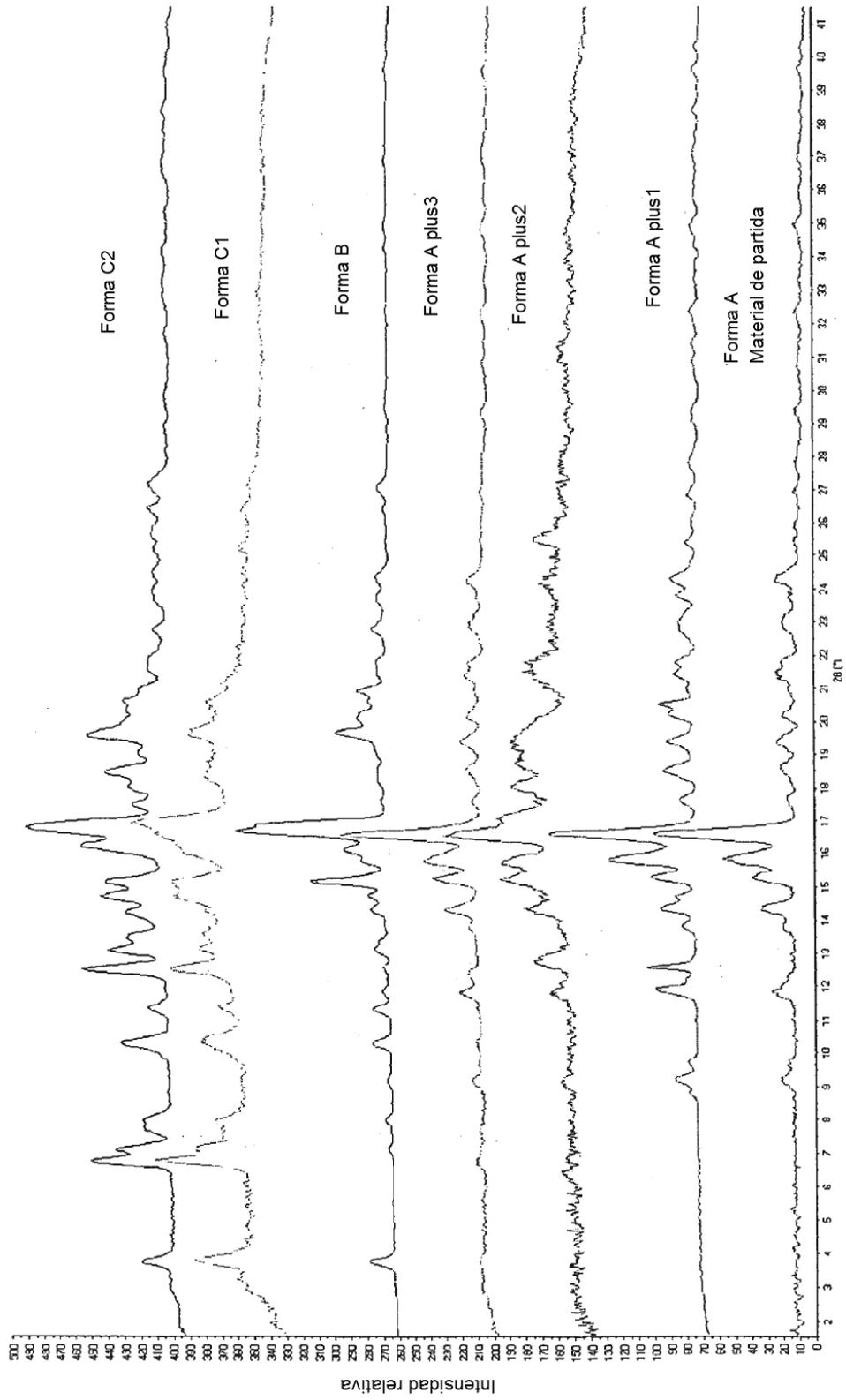


Figura 5: Patrón de XRPD de la Forma A

