

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 267**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2012 PCT/US2012/042440**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO2012174229**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2012 E 12800614 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2721047**

54 Título: **Métodos para la síntesis y purificación de ácido desoxicólico**

30 Prioridad:

16.06.2011 US 201161497924 P

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

06.06.2017

73 Titular/es:

**KYTHERA BIOPHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
27200 West Agoura Road, Suite 200
Calabasas, CA 91301, US**

72 Inventor/es:

**GANLEY, DANIEL J. y
WILT, JEREMY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 615 267 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

Métodos para la síntesis y purificación de ácido desoxicólico

Referencia cruzada a solicitud relacionada

Antecedentes de la invención

5 *Campo de la invención*

Esta invención se refiere a la síntesis del ácido desoxicólico y sus sales, así como a intermedios útiles en la síntesis del ácido desoxicólico. Esta invención proporciona además composiciones de ácido desoxicólico purificado y métodos para su purificación en los que el ácido desoxicólico tiene una pureza de al menos 99%.

Estado de la técnica

10 La eliminación rápida de la grasa corporal es un ideal antiguo y muchas sustancias han asegurado obtener dichos resultados, aunque pocas han demostrado resultados. La "mesoterapia", o el uso de inyectables para eliminar la grasa, no está ampliamente aceptada entre los profesionales médicos debido a preocupaciones de seguridad y eficacia, aunque se han realizado declaraciones homeopáticas y cosméticas desde los años 1950. La mesoterapia se concibió originalmente en Europa como un método de utilización de inyecciones cutáneas que contienen una
15 mezcla de compuestos para el tratamiento de estados locales médicos y cosméticos. Aunque la mesoterapia se empleó tradicionalmente para el alivio del dolor, sus aplicaciones cosméticas, particularmente la eliminación de la grasa y la celulitis, han recibido atención recientemente en los Estados Unidos. Uno de dichos tratamientos declarados para reducción de la grasa localizada, que se popularizó en Brasil y usa inyecciones de fosfatidilcolina, ha sido considerado erróneamente equivalente a la mesoterapia. A pesar de su atracción como renombrada
20 inyección "disuelve grasa", hay pocos datos sobre la seguridad y eficacia de estos tratamientos cosméticos. Véase, Rotunda, A. M. y M. Kolodney, *Dermatologic Surgery* 32: 465-480 (2006) ("*Mesotherapy and Phosphatidylcholine Injections: Historical Clarification and Review*").

La bibliografía publicada recientemente informa de que el ácido biliar, ácido desoxicólico, y sus sales, tienen propiedades eliminadoras de grasa cuando se inyectan en depósitos de grasa *in vivo*. Véanse los documentos WO
25 2005/117900 y WO 2005/112942, así como US2005/0261258; US2005/0267080; US2006/127468; y US2006/0154906. El desoxicolato inyectado en el tejido graso degrada las células grasas mediante un mecanismo citolítico. Debido a que el desoxicolato inyectado en la grasa es rápidamente inactivado por exposición a proteína y a continuación vuelve rápidamente a los contenidos intestinales, sus efectos están restringidos espacialmente. Como resultado de este efecto de atenuación que confiere seguridad clínica, las terapias de eliminación de grasa necesitan
30 habitualmente de 4-6 sesiones. Esta eliminación de grasa localizada sin necesidad de cirugía es beneficiosa no solo para el tratamiento terapéutico relacionado con los depósitos de grasa localizada patológicos (p. ej. dislipidemias incidentes a una intervención médica en el tratamiento del VIH), sino también para la eliminación de grasa cosmética sin el riesgo concomitante inherente en cirugía (p. ej. liposucción). Véase Rotunda *et al.*, *Dermatol. Surgery* 30: 1001-1008 (2004) ("*Detergent effects of sodium deoxycholate are a major feature of an injectable phosphatidylcholine formulation used for localized fat dissolution*") y Rotunda *et al.*, *J. Am. Acad. Dermatol.* (2005: 973-978) ("*Lipomas treated with subcutaneous deoxycholate injections*").
35

Además, muchos esteroides importantes tienen un sustituyente 12- α -hidroxi en el anillo C del esteroide. Dichos compuestos incluyen, como ejemplo, los ácidos biliares tales como el ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido litocólico y similares. Hasta este momento, dichos compuestos se recuperaron habitualmente de fuentes bovinas y
40 ovinas que proporcionaban una fuente fácil de ácidos biliares en cuanto a rentabilidad. Sin embargo, con el reciente descubrimiento de que patógenos tales como los priones pueden contaminar dichas fuentes, métodos alternativos para la síntesis de ácidos biliares a partir de fuentes vegetales o materiales iniciales sintéticos se han vuelto cada vez más importantes. Por ejemplo, el ácido desoxicólico de animales en Nueva Zelanda es una fuente de ácidos biliares para uso humano bajo el régimen reglamentario de Estados Unidos, con tal de que los animales sigan
45 permaneciendo aislados y en caso contrario libres de patógenos observables. Dichas condiciones estrictas imponen una limitación a la cantidad de ácidos biliares obtenidos de mamíferos adecuados y no excluye la posibilidad de que el ácido biliar esté libre de dichos patógenos. Además, el documento De Sanctis *et al.*, *Acta Cryst.* 34: 1928-1933 (1978) describe la fase hexagonal del canal 3:2:1 complejo entre el ácido desoxicólico, etanol y agua, el documento GB-A-716670 describe métodos de síntesis y purificación del ácido desoxicólico, el documento CN-A-101148468 describe un método para extraer ácido cólico, ácido desoxicólico y bilirrubina, el documento US-A-2891972 describe procedimientos de separación del ácido desoxicólico de una mezcla de ácidos biliares brutos o sus sales y el documento GB-A-695504 describe un método para aislar y purificar los ácidos cólico y desoxicólico.
50

Sigue habiendo una necesidad de cantidades adecuadas de ácidos biliares eficaces, tales como el ácido desoxicólico que se conozca desde el principio que esté libre de restos de origen animal (o restos patogénicos capaces de actuar en un animal, particularmente en un mamífero, y para uso humano, que tengan un efecto perjudicial en humanos) y otros agentes nocivos tales como metabolitos animales o microbianos, toxinas, incluyendo las toxinas bacterianas tales como pirógenos, para uso como medicamentos en humanos.
55

Además, hay una necesidad de preparar una composición de un ácido biliar libre de otros ácidos biliares. A este respecto, se sabe que el ácido desoxicólico obtenido a partir de mamíferos está contaminado con ácido cólico. A su vez, se sabe además que el ácido cólico es un componente esencial en la formación de cálculos biliares. Consecuentemente, hay una necesidad continua de proporcionar métodos para preparar y purificar ácido desoxicólico cuyos métodos no produzcan contaminación con otros ácidos biliares.

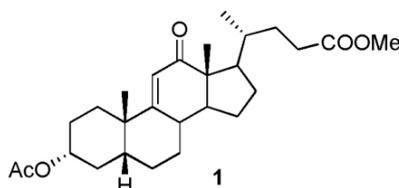
Compendio de la invención

Según un primer aspecto de esta invención, se proporciona un método para purificar ácido desoxicólico bruto o una de sus sales, cuyo método comprende:

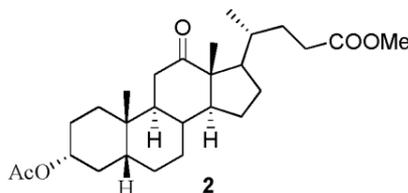
- i) una primera recristalización del ácido desoxicólico bruto o una de sus sales en un alcohol de C₁₋₃ en cloruro de metileno para proporcionar un producto; y
- ii) una segunda recristalización del producto de la etapa i) en una mezcla de agua desionizada y un alcohol de C₁₋₃ para proporcionar ácido desoxicólico o una de sus sales.

En un modo de realización de esta invención, el método comprende:

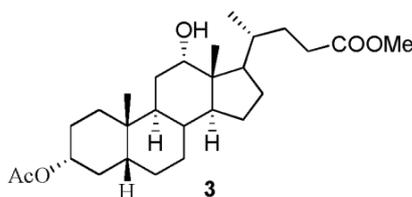
- a) poner en contacto el compuesto 1:



con hidrógeno y Pd/C en condiciones de hidrogenación que comprenden hidrógeno y Pd sobre carbón en un autoclave mantenido a elevada presión, seguido opcionalmente por oxidar cualquiera de los grupos 12-hidroxilo formados durante la hidrogenación con clorocromato de piridinio en condiciones de oxidación para proporcionar el compuesto 2:



- b) hacer reaccionar el compuesto 2 con hidruro de litio tri-t-alcoxilaluminio en condiciones reductoras para proporcionar el compuesto 3:



- c) exponer el compuesto 3 a condiciones de desprotección e hidrólisis para formar ácido desoxicólico bruto o una de sus sales;

antes de la etapa i).

En uno de sus aspectos de composición, esta invención se refiere a composiciones que comprenden ácido desoxicólico o una de sus sales y una mezcla de uno o más alcohol(es) de C₁₋₃ y cloruro de metileno.

En otro de sus aspectos de composición, esta invención se refiere a composiciones que comprenden ácido desoxicólico o una de sus sales y una mezcla de uno o más alcohol(es) de C₁₋₃ y agua desionizada.

En un modo de realización, la pureza del ácido desoxicólico puro o una de sus sales es al menos 99%. En otro modo de realización, la pureza es al menos 99,5%. En otro modo de realización, la pureza es al menos 99,75%.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en la presente memoria, algunos términos pueden tener los siguientes significados definidos. Como se usa en la descripción y en las reivindicaciones la forma “un”, “uno(una)” y “el(ella)” incluyen referencias en singular y en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se indique de otra forma, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc. usados en la descripción y en las reivindicaciones, deben entenderse como modificadas en todos los casos por el término “aproximadamente”. Consecuentemente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos descritos en la siguiente descripción y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones. Cada parámetro numérico debe ser interpretado al menos teniendo en cuenta los dígitos significativos citados y aplicando las técnicas habituales de redondeo.

Como se usa en la presente memoria, se pretende que el término “comprende” significa que los compuestos y métodos incluyen los elementos citados pero sin excluir otros. La expresión “consiste esencialmente en” cuando se usa para definir composiciones y métodos, debe significar que excluye otros elementos con cualquier importancia esencial para los compuestos o métodos. La expresión “consiste en” debe significar excluyendo más que elementos traza de otros ingredientes para los compuestos y etapas esenciales del método reivindicados. Los modos de realización definidos por cada uno de estos términos transicionales están dentro del alcance de esta invención. Consecuentemente, se pretende que los métodos y compuestos pueden incluir etapas y componentes adicionales (comprenden) o alternativamente incluyen etapas y compuestos adicionales sin importancia (consisten esencialmente en) o alternativamente, pretenden ser solo las etapas del método o los compuestos indicados (consisten en).

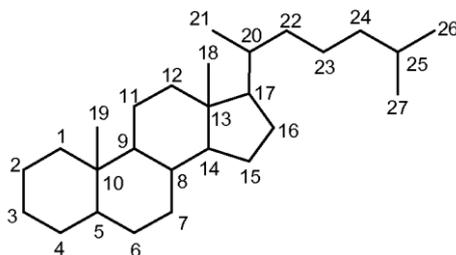
El término “agente oxidante” se refiere a un reactivo que puede aceptar electrones en una reacción de oxidación-reducción. De esta forma, se puede añadir oxígeno a una molécula o se puede eliminar hidrógeno de una molécula. Los agentes oxidantes incluyen, solo como ejemplo, el reactivo de Jones, hidroperóxido de terc-butilo, hipoclorito de sodio, clorocromato de piridinio y CrO_3 . En un ejemplo, el agente oxidante es específico para alcoholes vecinales (1,2) e incluyen compuestos de peryodato. Dichos agentes oxidantes se denominan a veces “agentes oxidantes de alcohol vecinal”.

El término “agente reductor” se refiere a un reactivo que puede donar electrones en una reacción de oxidación-reducción, permitiendo que se añada hidrógeno a una molécula. Agentes reductores adecuados incluyen hidruro de litio y aluminio, borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio y similares.

El término “condiciones de hidrogenación” se refiere a condiciones y catalizadores adecuados para introducir H_2 en uno o más enlaces dobles. Los catalizadores de hidrogenación incluyen los basados en metales del grupo del platino (platino, paladio, rodio y rutenio), tales como Pd/C y PtO_2 .

El término “sal farmacéuticamente aceptable” o “una de sus sales” se refiere a las sales farmacéuticamente aceptables del ácido desoxicólico, cuyas sales se obtienen a partir de varios contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la técnica y que incluyen, solo como ejemplo, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio y tetraalquilamonio.

La numeración del esqueleto esteroideo como se usa en la presente memoria sigue la convención general:



Se debe entender que, a menos que se especifique de otra forma, los esqueletos solo representan la posición de los átomos de carbono. Uno o más enlaces entre dos átomos de carbono adyacentes pueden ser un doble enlace y uno o más átomos de carbono pueden estar opcionalmente sustituidos.

El término “ácido desoxicólico bruto o una de sus sales” se refiere al ácido desoxicólico con una pureza de menos de 98% (determinada por HPLC).

El término “ácido desoxicólico puro o una de sus sales” se refiere al ácido desoxicólico con una pureza de al menos 99% (determinada por HPLC). Se entiende que el término “puro” no significa que las impurezas estén totalmente excluidas de la composición. Algunas impurezas están presentes, pero la cantidad total de impurezas no es más de 1%.

Procedimientos de síntesis

Los diversos materiales iniciales, intermedios y compuestos de los modos de realización preferidos pueden ser aislados y purificados cuando sea apropiado usando técnicas convencionales tales como precipitación, filtración, cristalización, evaporación, destilación y cromatografía. La caracterización de estos compuestos se puede realizar

usando métodos convencionales, tales como punto de fusión, espectro de masas, resonancia magnética nuclear y otros varios análisis espectroscópicos.

En un modo de realización, esta invención proporciona la síntesis del ácido desoxicólico a partir del compuesto 1. La síntesis del compuesto 1 ha sido descrita en el documento WO2011/075701.

5 Métodos

Según un primer aspecto de esta invención, se proporciona un método para purificar ácido desoxicólico bruto o una de sus sales, cuyo método comprende:

- i) una primera recristalización del ácido desoxicólico bruto o una de sus sales en un alcohol de C₁₋₃ en cloruro de metileno; y
- 10 ii) una segunda recristalización del producto de la etapa i) en una mezcla de agua desionizada y un alcohol de C₁₋₃ para proporcionar ácido desoxicólico puro o una de sus sales.

En un modo de realización de esta invención, el alcohol de C₁₋₃ en la etapa i) comprende metanol. En un modo de realización adicional, el alcohol de C₁₋₃ en la etapa i) comprende metanol 1% molar-5% molar en cloruro de metileno. En un modo de realización, el alcohol de C₁₋₃ en la etapa i) comprende metanol 1% molar; alternativamente metanol 15 2% molar; alternativamente metanol 3% molar; alternativamente metanol 4% molar; y alternativamente metanol 5% molar. En otro modo de realización, el alcohol de C₁₋₃ en la etapa i) comprende metanol 2% molar en cloruro de metileno. En otro modo de realización, la etapa i) comprende además una temperatura de aproximadamente 32-42°C; alternativamente aproximadamente 34-40°C; y alternativamente aproximadamente 35-37°C. En otro modo de realización, la etapa i) comprende además una temperatura de aproximadamente 35-37°C.

En otro modo de realización, esta invención proporciona un método para purificar ácido desoxicólico bruto o una de sus sales, cuyo método comprende:

- i) una primera recristalización del ácido desoxicólico bruto o una de sus sales en MeOH 2% molar en CH₂Cl₂ a una temperatura de aproximadamente 35-37°C; y
- 25 ii) una segunda recristalización del producto de la etapa i) en una mezcla de agua desionizada y un alcohol de C₁₋₃ para proporcionar ácido desoxicólico puro o una de sus sales.

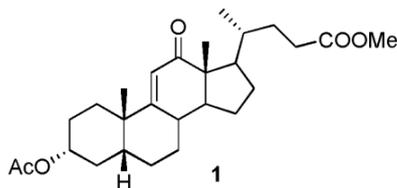
En otro modo de realización el alcohol de C₁₋₃ en la etapa ii) comprende etanol. En otro modo de realización, la etapa ii) comprende una segunda recristalización del producto de la etapa i) en una mezcla de agua desionizada al 5% en etanol; alternativamente agua desionizada al 10% en etanol; y alternativamente, agua desionizada al 15% en etanol. En otro modo de realización, la etapa ii) comprende una segunda recristalización del producto de la etapa i) en una mezcla de agua desionizada al 10% en etanol.

En otro modo de realización, esta invención proporciona un método para purificar ácido desoxicólico bruto o una de sus sales, cuyo método comprende:

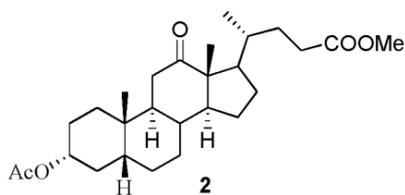
- i) una primera recristalización del ácido desoxicólico bruto o una de sus sales en metanol 2% molar en cloruro de metileno a una temperatura de aproximadamente 35-37°C; y
- 35 ii) una segunda recristalización del producto de la etapa i) en una mezcla de agua desionizada al 10% en etanol para proporcionar ácido desoxicólico puro o una de sus sales.

En otro modo de realización, esta invención proporciona un método para preparar ácido desoxicólico o una de sus sales, cuyo método comprende:

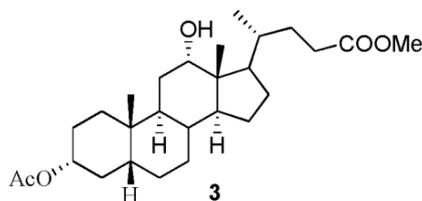
- a) poner en contacto el compuesto 1:



40 con hidrógeno y Pd/C en condiciones de hidrogenación que comprenden hidrógeno y Pd sobre carbón en un autoclave mantenido a elevada presión opcionalmente seguido por oxidar cualquiera de los grupos 12-hidroxilo formados durante la hidrogenación con clorocromato de piridinio en condiciones de oxidación para proporcionar el compuesto 2:



- b) hacer reaccionar el compuesto 2 con hidruro de litio y trialcoxialuminio en condiciones de reducción para proporcionar el compuesto 3:

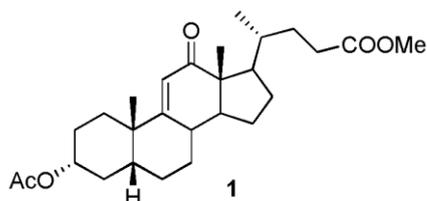


- 5 c) exponer al compuesto 3 a condiciones de desprotección e hidrólisis para formar ácido desoxicólico bruto o una de sus sales;

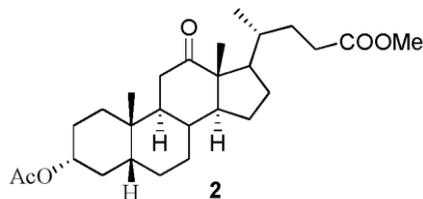
antes de la etapa i)

En otro modo de realización, esta invención proporciona un método para preparar ácido desoxicólico puro o una de sus sales, cuyo método comprende:

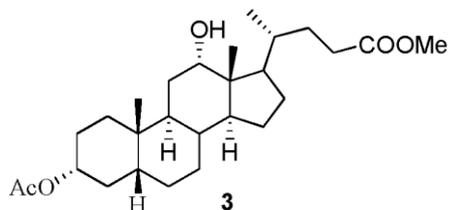
- 10 a) poner en contacto el compuesto 1:



15 con hidrógeno y Pd/C en condiciones de hidrogenación que comprenden hidrógeno y Pd sobre carbón en un autoclave mantenido a elevada presión opcionalmente seguido por oxidar cualquiera de los grupos 12-hidroxilo formados durante la hidrogenación con clorocromato de piridinio en condiciones de oxidación para proporcionar el compuesto 2:



- b) hacer reaccionar el compuesto 2 con hidruro de litio y trialcoxialuminio en condiciones de reducción para proporcionar el compuesto 3:



- 20 c) exponer al compuesto 3 a condiciones de desprotección e hidrólisis para formar ácido desoxicólico bruto o una de sus sales; y
 d) purificar el ácido desoxicólico bruto o una de sus sales por un método que comprende:
 25 i) una primera recristalización del ácido desoxicólico bruto o una de sus sales en metanol 2% molar en cloruro de metileno a una temperatura de aproximadamente 35-37°C; y
 ii) una segunda recristalización del producto de la etapa i) en una mezcla de agua desionizada al 10% en etanol para proporcionar ácido desoxicólico puro o una de sus sales.

En la presente memoria se describen composiciones que comprenden ácido desoxicólico o una de sus sales y una

mezcla de una o más alcohol(es) de C₁₋₃ y cloruro de metileno. En un modo de realización, el alcohol de C₁₋₃ comprende metanol. En otro modo de realización, el alcohol de C₁₋₃ comprende metanol 1% molar-5% molar. En otro modo de realización, la composición comprende metanol 2% molar. En otro modo de realización, la invención comprende composiciones en las que dicho ácido desoxicólico o una de sus sales son sintéticos.

- 5 En la presente memoria también se describen composiciones que comprenden ácido desoxicólico sintético o una de sus sales y una mezcla de uno o más alcohol(es) de C₁₋₃ y agua desionizada. En un modo de realización, el alcohol de C₁₋₃ comprende etanol. En otro modo de realización, la composición comprende una mezcla de agua desionizada al 5% en etanol; alternativamente, agua desionizada al 10% en etanol; y alternativamente, agua desionizada al 15% en etanol. En otro modo de realización, la composición comprende una mezcla de agua desionizada al 10% en etanol. En otro modo de realización, la invención comprende composiciones, en las que dicho ácido desoxicólico o una de sus sales son sintéticos.
- 10

Ejemplos

En los ejemplos siguientes y en cualquier otro lugar en la memoria descriptiva, las siguientes abreviaturas tienen los significados indicados. Si la abreviatura no está definida, tiene su significado generalmente aceptado.

Ac	Acetilo
ADC	Ácido desoxicólico
DCM (CH ₂ Cl ₂)	Diclorometano
ELSD	Detección evaporativa de dispersión de luz
EtOH	Etanol
EtOAc	Acetato de etilo
g	Gramos
H o h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
Hz	Hercio
LiAl(OtBu) ₃ H	Hidruro de litio y tri-terc-butoxialuminio
PAS	Pérdidas al secar
Me	Metil
MeOH	Metanol
MHz	Megahercio
Min	Minutos
mL	Mililitro
mmol	Milimol
Mol	Mol
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NMD	No más de
Pd/C	Paladio sobre carbón
PtO ₂	Óxido de platino
ATF	Ácido trifluoroacético

THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina
UV	Ultravioleta
p	Peso

General: Todas las manipulaciones de materiales sensibles al oxígeno y a la humedad se realizaron con matraces de dos bocas convencionales secados a la llama en atmósfera de argón o de nitrógeno. La cromatografía en columna se realizó usando gel de sílice (malla 60-120). La cromatografía en capa fina (TLC) analítica se realizó en placas Merck Kiesinger 60 F254 (0,25 mm). La visualización de las manchas fue bien con luz UV (254 nm) o bien carbonizándolas con una disolución de ácido sulfúrico (5%) y p-anisaldehído (3%) en etanol.

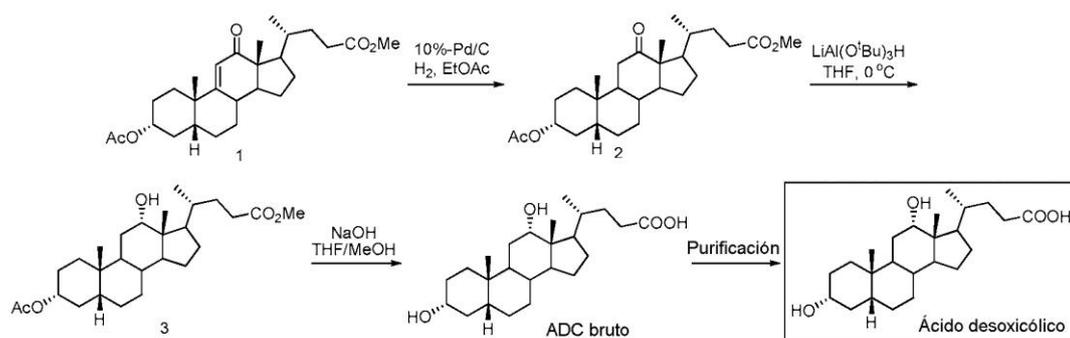
Dispositivos: Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono 13 (RMN de ^1H y RMN de ^{13}C) se registraron en un espectrómetro Varian Mercury-Gemini 200 (RMN de ^1H , 200 MHz, RMN de ^{13}C , 50 MHz) o Varian Mercury-Inova 500 (RMN de ^1H , 500 MHz, RMN de ^{13}C , 125 MHz) con las resonancias del disolvente como patrones internos (RMN de ^1H , CHCl_3 a 7,23 ppm o DMSO a 2,5 ppm y DMSO- H_2O a 3,33 ppm; RMN de ^{13}C , CDCl_3 a 77,0 ppm o DMSO a 39,5 ppm). Los datos de RMN de ^1H se dan como sigue: desplazamiento químico (δ , ppm), multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuartete, br = amplio, m = multiplete), constantes de acoplamiento (Hz) e integración. Los espectros de infrarrojo (FT-IR) se realizaron en un modelo JASCO-460⁺. Los espectros de masas se obtuvieron con un espectrómetro Perkin Elmer API-2000 usando modo ES⁺. Los puntos de fusión se determinaron usando un dispositivo de medida del punto de fusión LAB-INDIA y no están corregidos. Los cromatogramas de HPLC se registraron usando un modelo SHIMADZU-2010 con un detector PDA. Las rotaciones ópticas específicas se determinaron usando un dispositivo JASCO-1020 a 589 nm y no están corregidos.

Productos químicos: A menos que se indique de otro modo, se usaron reactivos disponibles comercialmente sin purificación. El dietil éter y el THF se destilaron en sodio/benzofenona. Se usaron DMF anhidro de grado laboratorio, DCM, acetato de etilo y hexano disponibles comercialmente.

Ejemplo 1

En el esquema 1 siguiente, se proporciona un esquema para la síntesis y purificación del ácido desoxicólico a partir del compuesto 1.

Esquema 1



Conversión del compuesto 1 en el compuesto 2

La hidrogenación del compuesto 1 en una escala de 10,0 g usando Pd/C seco al 10% (15% en peso) en acetato de etilo (20 partes) se añadió y se aplicaron aproximadamente 3,447 bares (50 psi) de presión de hidrógeno y la temperatura aumentó hasta 70°C. Después de alcanzar la temperatura de 70°C, se observó un aumento de la presión de hidrógeno a aproximadamente 4,137 bares (60 psi), se mantuvieron estas condiciones durante 60 h. Después de 60 horas, se observaron todavía 0,6% de compuesto 2 y 2,75% de alcohol alílico, por lo que se agitó adicionalmente durante 12 h adicionales (se observó 0,16% de alcohol alílico y 0,05% de compuesto 2). Después de finalización, la reacción proporcionó 9,5 g de residuo.

Otra reacción de hidrogenación con 25 g de compuesto 1 con las condiciones anteriores durante 76 h proporcionó 24,5 g de residuo.

Método A

Se añadió Pd/C al 10% (900 mg) a una disolución del compuesto 1 (2,0 g, 4,5 mmoles) en EtOAc (150 mL) y la lechada resultante se hidrogenó en un dispositivo de Parr (3,447 bares = 50 psi) a 50°C durante 16 h. En este punto, se determinó por TLC que la reacción había finalizado. La mezcla se filtró a través de un pequeño tapón de Celita® y el disolvente se eliminó a vacío proporcionando el compuesto 2 (1,6 g, rendimiento de 80%) como un sólido blanco.

TLC: carbonización con p-anisaldehído, R_f de 2 = 0,36.

Fase móvil de TLC: EtOAc al 20% en hexanos

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 4,67-4,71 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 2,45-2,50 (t, J = 15 Hz, 2H), 2,22-2,40 (m, 1H), 2,01 (s, 3H), 1,69-1,96 (m, 9H), 1,55 (s, 4H), 1,25-1,50 (m, 8H), 1,07-1,19 (m, 2H), 1,01 (s, 6H), 0,84-0,85 (d, J = 7,0 Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ = 214,4, 174,5, 170,4, 73,6, 58,5, 57,4, 51,3, 46,4, 43,9, 41,2, 38,0, 35,6, 35,5, 35,2, 34,8, 32,0, 31,2, 30,4, 27,4, 26,8, 26,2, 25,9, 24,2, 22,6, 21,2, 18,5, 11,6.

Masa (m/z) = 447,0 [$\text{M}^+ + 1$], 464,0 [$\text{M}^+ + 18$].

IR (KBr) = 3445, 2953, 2868, 1731, 1698, 1257, 1029 cm^{-1} .

P. F. = 142,2 – 144,4 QC (en mezcla de EtOAc/hexanos).

$[\alpha]_D = +92$ (c = 1% en CHCl_3).

Pureza por ELSD: 96,6%: Tiempo de retención = 9,93 (Inertsil ODS 3V, 250 x 4,6 mm, 5 μm , ACN: TFA al 0,1% en agua (90:10)).

Método B

Se añadió una lechada de Pd/C al 10% (9 g en 180 mL de acetato de etilo) a una disolución del compuesto 1 (36 g, 81 mmoles) en EtOAc (720 mL) y la lechada resultante se trató con gas hidrógeno (3,447 bares = 50 psi) a 45-50°C durante 16 h. (Se usaron un total de 1.080 mL de disolvente). En este punto se determinó que la reacción había finalizado por HPLC (NMD 1% de compuesto 1). La mezcla se filtró a través de Celita® (10 g) y se lavó con acetato de etilo (900 mL). El filtrado se concentró a 50% de su volumen por destilación a vacío por debajo de 50°C. A la disolución concentrada se añadió clorocromato de piridinio (20,8 g) a 25-35°C y la mezcla se agitó durante 2 h a 25-35°C, cuando la reacción apareció completa por HPLC (el contenido de alcohol alílico es NMD 1%).

Los siguientes procedimientos pueden ser realizados si el contenido de compuesto 1 es más de 5%. Se filtró la masa de reacción a través de Celita® (10 g) y se lavó con acetato de etilo (360 mL). Se lavó el filtrado con agua (3 x 460 mL) y a continuación con salmuera saturada (360 mL). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio (180 g), se filtró y se lavó con acetato de etilo (180 mL). Se concentró el volumen al 50% por destilación a vacío por debajo de 50°C. Se transfirió la disolución a un autoclave limpio y seco. Se añadió la lechada de paladio al 10% sobre carbón (9 g en 180 mL de acetato de etilo). Se presurizó a 3,447 bares (50 psi) con hidrógeno y se agitó la mezcla de reacción a 45-50°C durante 16 h.

Después del consumo total del compuesto 1 determinado por HPLC (siendo el contenido de compuesto 1 NMD 1%), la mezcla de reacción se filtró a través de Celita® (10 g) y la torta de filtración se lavó con acetato de etilo (900 mL). El disolvente se concentró a vacío por destilación a vacío por debajo de 50°C. Se añadió metanol (150 mL) y se concentró a sequedad por destilación a vacío por debajo de 50°C. Se añadió metanol (72 mL) al residuo y la mezcla se agitó durante 15-20 min a 10-15°C, se filtró y la torta de filtración se lavó con metanol (36 mL). El sólido blanco se secó en un secador de aire caliente a 45-50°C durante 8 h para PAS) siendo NMD 1% para proporcionar el compuesto 2 (30 g, rendimiento de 83,1%).

Conversión del compuesto 2 al compuesto 3*Método A*

Se añadió gota a gota una disolución en THF de hidruro de litio y tri-terc-butoxialuminio (1M, 22,4 mL, 22,4 mmoles) a una disolución del compuesto 2 (2,5 g, 5,6 mmoles) en THF (25 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 4-5 h adicionales, se determinó que la reacción había finalizado por TLC. Se detuvo la reacción añadiendo HCl acuoso (1M, 10 mL) y se diluyó la mezcla con EtOAc (30 mL). Se separaron las fases y la fase orgánica se lavó secuencialmente con agua (15 mL) y disolución saturada de salmuera (10 mL). La fase orgánica se secó a continuación sobre Na_2SO_4 anhidro (3 g) y se filtró. El filtrado se concentró a vacío y el sólido resultante se purificó por cromatografía en columna [29 mm (A) x 500 mm (L), sílice de malla 60-120, 50 g], eluyendo con EtOAc/hexano (2:8) [fracciones de 5 mL, monitorizado por TLC con carbonización con p-anisaldehído]. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron a vacío para dar el compuesto 3 (2,3 g, 91%) como un sólido blanco.

TLC: carbonización con p-anisaldehído, R_f para 3 = 0,45 y R_f para 2 = 0,55.

Fase móvil de TLC: EtOAc al 30% en hexanos.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 4,68-4,73 (m, 1H), 3,98 (s, 1H), 3,66 (s, 3H), 2,34-2,40 (m, 1H), 2,21-2,26 (m, 1H), 2,01 (s, 3H), 1,75-1,89 (m, 6H), 1,39-1,68 (m, 16H), 1,00-1,38 (m, 3H), 0,96-0,97 (d, J = 5,5 Hz, 3H), 0,93 (s, 3H), 0,68 (s, 3H).

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ = 174,5, 170,5, 74,1, 72,9, 51,3, 48,1, 47,2, 46,4, 41,7, 35,8, 34,9, 34,7, 34,0, 33,5, 32,0, 30,9, 30,8, 28,6, 27,3, 26,8, 26,3, 25,9, 23,4, 22,9, 21,3, 17,2, 12,6.

Masa (m/z) = 449,0 [$\text{M}^+ + 1$], 466,0 [$\text{M}^+ + 18$].

IR (KBr) = 3621, 2938, 2866, 1742, 1730, 1262, 1162, 1041, cm^{-1} .

10 P. F. = 104,2-107,7°C (en EtOAc).

$[\alpha]_D = +56$ (c = 1% en CHCl_3).

Pureza por ELSD : 97,0%. Tiempo de retención = 12,75 (Inertsil ODS 3V, 250 x 4,6 mm, 5 μm , ACN: agua (60:40)).

Método B

15 Se añadió durante 1 h una disolución en THF de hidruro de litio y tri-terc-butoxialuminio (1M, 107,6 mL, 107,6 mmoles) a una disolución del compuesto 2 (30,0 g, 67 mmoles) en THF seco (300 mL) a 0-5°C. Después de agitar durante 4 h adicionales a 5-10°C, se determinó que la reacción había finalizado por HPCL (NMD 1% del compuesto 2). La mezcla de reacción se enfrió a 0-5°C y se detuvo añadiendo HCl 4N (473 mL). Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con DCM (2 x 225 mL) y las fases orgánicas combinadas de lavaron secuencialmente con agua (300 mL) y disolución de salmuera saturada (300 mL). A continuación se concentró a sequedad la fase orgánica por destilación a vacío por debajo de 50°C. Se añadió metanol (150 mL) al residuo y se concentró a sequedad por destilación a vacío por debajo de 50°C. A continuación se añadió agua (450 mL) al residuo y la mezcla se agitó durante 15-20 min, se filtró y la torta de filtración se lavó con agua (240 mL). El sólido blanco se secó en un secador de aire caliente a 35-40°C durante 6 h para proporcionar el compuesto 3 (30 g, 99,6%).

Conversión del compuesto 3 en ADC bruto:

25 A una disolución de 3 en MeOH (4 vol.) y THF (4 vol.) se le añadió una disolución de NaOH (4,0 equiv.) en agua DI (5M) manteniendo la temperatura por debajo de 20°C. El análisis por HPLC después de 20 horas a 20-25°C indicó <0,5% AUC de 3 y que permanecían los dos intermedios. Se consideró que la reacción había finalizado, se diluyó con agua DI (10 vol.) y se concentró a ~10 volúmenes. Se preparó un azeótropo de la muestra con 2-MeTHF (2 x 10 vol.) y se analizó por RMN de ^1H para comprobar que ya no había MeOH. La fase acuosa rica se lavó con 2-MeTHF (2 x 10 vol.) y se analizó por HPLC para determinar que quedaba 0,3% AUC de impureza de alcohol. La fase acuosa se diluyó con 2-MeTHF (10 vol.) y se ajustó a pH = 1,7-2,0 usando HCl 2M (~4 vol.) Se separaron las fases y la fase de 2MeTHF se lavó con agua DI (2 x 10 vol.). La fase de 2MeTHF se filtró sobre celita y la torta de filtración se lavó con 2-MeTHF (2 vol.). El filtrado de 2-MeTHF se destiló a ~10 volúmenes y se preparó un azeótropo con n-heptano que contenía StatsafeTM 5000 (3 x 10 vol.) hasta ~10 vol. Se analizó la mezcla por RMN de ^1H para determinar que quedaba <5% molar de 2-MeTHF con respecto al n-heptano. La lechada se mantuvo durante un mínimo de 2 horas a 20-25°C y se filtró. La torta de filtración se lavó con n-heptano (2 x 10 vol.) y se acondicionó a vacío en el filtro Nütsche con N_2 durante un mínimo de 1 hora para obtener el ADC bruto como sólido blanco. Pureza = 94,6% (por HPLC). Análisis por HPLC para DS-ADC (NMD 5% AUC).

Recristalización del ácido desoxicólico (ADC)

40 Se diluyó el ADC bruto con MeOH 2% molar en CH_2Cl_2 (25 vol.) y se calentó a 35-37°C durante 1 hora. Se dejó enfriar la lechada a 28-30°C y se filtró. La torta de filtración se lavó con CH_2Cl_2 (5 vol.) y se secó a vacío a 40°C para obtener el ADC. Análisis por HPLC para DS-ADC (NMD 0,15% AUC).

45 El ADC se disolvió en agua DI 10%/EtOH (12 vol.), se realizó filtrado/pulido sobre celita y se lavó con agua DI 10%/EtOH (3 vol.). El filtrado de 15 vol. resultante se añadió agua DI (30 vol.) y se obtuvo una lechada blanca fina. La lechada se mantuvo durante 24 horas, se filtró, se lavó con agua DI (20 vol.) y se secó a vacío a 40°C para obtener ADC puro. Se realizó el análisis de OVI (impurezas volátiles orgánicas, por sus iniciales en inglés) para CH_2Cl_2 , EtOH, n-heptano, MeOH y MeTHF para asegurar que cada disolvente estaba por debajo de las directrices de la ICH. Se realizó el análisis KF (NMD 2,0%). Pureza = 99,75% (por HPLC). Rendimiento a partir del ADC bruto = 59%.

50

REIVINDICACIONES

1.- Un método para purificar ácido desoxicólico bruto o una de sus sales, cuyo método comprende:

- i) una primera recristalización del ácido desoxicólico bruto o una de sus sales en un alcohol de C₁₋₃ en cloruro de metileno para proporcionar un producto; y
- ii) una segunda recristalización del producto de la etapa i) en una mezcla de agua desionizada y un alcohol de C₁₋₃ para proporcionar ácido desoxicólico puro o una de sus sales.

2.- El método según la reivindicación 1, en el que el alcohol de C₁₋₃ en la etapa i) comprende metanol, tal como metanol 1% molar-5% molar en cloruro de metileno, por ejemplo metanol 2% molar en cloruro de metileno.

3.- El método según la reivindicación 1, en el que la etapa i) comprende además una temperatura de aproximadamente 35-37°C.

4.- El método según la reivindicación 1, en el que la etapa i) comprende una primera recristalización en metanol 2% molar en cloruro de metileno a una temperatura de aproximadamente 35-37°C.

5.- El método según la reivindicación 1, en el que el alcohol de C₁₋₃ en la etapa ii) comprende etanol.

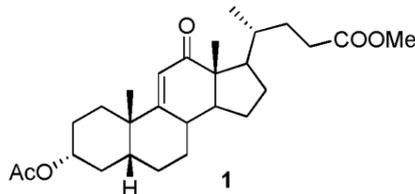
6.- El método según la reivindicación 1, en el que la etapa ii) comprende una segunda recristalización en una mezcla de agua desionizada al 10% en etanol.

7.- El método según la reivindicación 1, en el que el método comprende:

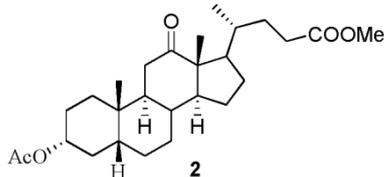
- i) una primera recristalización del ácido desoxicólico bruto o una de sus sales en metanol 2% molar en cloruro de metileno a una temperatura de aproximadamente 35-37°C; y
- ii) una segunda recristalización del producto de la etapa i) en una mezcla de agua desionizada al 10% en etanol.

8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el cual comprende:

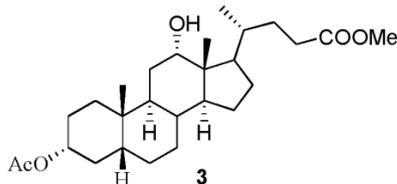
a) poner en contacto el compuesto 1:



con hidrógeno y Pd/C en condiciones de hidrogenación que comprenden hidrógeno y Pd sobre carbón en un autoclave mantenido a presión elevada seguido opcionalmente por oxidar cualquiera de los grupos 12-hidroxilo formados durante la hidrogenación con clorocromato de piridinio en condiciones de oxidación para proporcionar el compuesto 2:



b) hacer reaccionar el compuesto 2 con hidruro de litio y tri-t-alcoxialuminio en condiciones reductoras para proporcionar el compuesto 3:



c) exponer el compuesto 3 a condiciones de desprotección e hidrólisis para formar ácido desoxicólico bruto o una de sus sales;

antes de la etapa i).