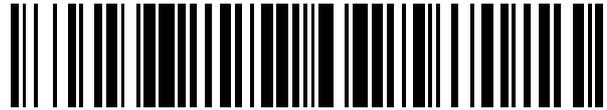


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 924**

21 Número de solicitud: 201930751

51 Int. Cl.:

C07C 49/323 (2006.01)

C07C 45/81 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.08.2019

30 Prioridad:

18.09.2018 IT 102018000008664

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.03.2020

71 Solicitantes:

FARMABIOS SPA (100.0%)

Via Pavia, 1

27027 GROPELLO CAIROLI IT

72 Inventor/es:

TORREGROSSA, Enrico ;

BRUSASCA, Marco y

MANFROTTO, Cristina

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

54 Título: **MÉTODO PARA LA PURIFICACIÓN DE ALOPREGNANOLONA**

57 Resumen:

Método para la purificación de alopregnanolona.

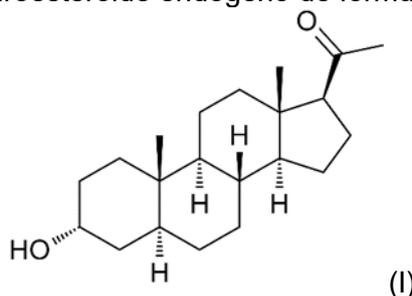
La presente invención se refiere a un método para la preparación de alopregnanolona con un alto grado de pureza que, eventualmente, se produce a través de la formación de 3 α -trifluoroacetoxi-5 α -pregnan-20-ona.

ES 2 748 924 A1

DESCRIPCIÓN**MÉTODO PARA LA PURIFICACIÓN DE ALOPREGNANOLONA**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de alopregnanolona, más particularmente para la preparación de alopregnanolona con un alto grado de pureza.

La alopregnanolona es un neuroesteroide endógeno de fórmula (I):



(I)

10 con el nombre químico 1-(3-hidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il) etanona.

La alopregnanolona es un modulador alostérico positivo de la actividad del ácido γ -aminobutírico (GABA) en el receptor ionotrópico GABA_A. Además, también actúa como
15 inhibidor de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L (L-VGCC).

Actualmente, la alopregnanolona está en estudio para el tratamiento de diferentes patologías como, por ejemplo, epilepsia, depresión posparto y trastorno por estrés
20 postraumático (TEPT).

20

Antecedentes de la invención

Varios procedimientos para la preparación de alopregnanolona son conocidos en la bibliografía.

25

La conversión de 3 β -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona (isopregnanolona) en 3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona (alopregnanolona) a través de la reacción de Mitsunobu y la posterior hidrólisis básica se describe, por ejemplo, en J. Med. Chem 1990, 33, 1572-1581. Sin embargo, el producto resultante debe someterse a una laboriosa fase de purificación que
30 consiste en su cristalización en acetato de etilo/etanol acuoso, cromatografía en columna con acetona al 2 % en diclorometano y, finalmente, cristalización en etanol acuoso.

La solicitud de patente internacional WO 2009/108804 describe un procedimiento que consiste en la hidrogenación catalítica de pregnenolona para dar isopregnanolona, purificada por cristalización en hexano/acetato de etilo, que a continuación se somete a reacción de Mitsunobu e hidrólisis para producir alopregnanolona, purificada por
5 cromatografía en columna con acetato de etilo en hexano (0-35 %).

Finalmente, en Collect. Czech. Chem. Commun. 2009, 74, 643-650, se describe la conversión de isopregnanolona en el éster fórmico de alopregnanolona a través de la reacción de Mitsunobu. El intermedio de éster resultante se somete a cromatografía en
10 columna en éter de petróleo/acetona (98:2) y, posteriormente, a cristalización en acetona. Después de la hidrólisis básica, la alopregnanolona se purifica por cristalización en acetona/acetato de etilo.

Todos los procedimientos conocidos en la materia prevén una fase de purificación laboriosa que incluye el uso de al menos una cromatografía y/o cromatografía seguida de
15 cristalización. Además, la purificación de alopregnanolona de acuerdo con las cristalizaciones conocidas en la técnica no permite eliminar eficazmente las impurezas y los subproductos de reacción.

Sin embargo, dado que el producto es para uso en terapia, se requiere un procedimiento que permita obtener alopregnanolona con una pureza de grado farmacéutico y, al mismo tiempo, que sea de fácil aplicación industrial.
20

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de un procedimiento mejorado para la preparación de alopregnanolona que supere todos los inconvenientes de los procedimientos conocidos. En particular, existe la necesidad de un método mejorado para la purificación de alopregnanolona, por ejemplo, un método que no contemple una purificación laboriosa de múltiples etapas y/o el uso de cromatografía, que no requiera mucho tiempo, sea costoso y desventajoso con respecto al rendimiento.
25

30

Sumario de la invención

Un primer objeto de la presente invención es un método para la purificación de alopregnanolona que comprende la cristalización de alopregnanolona a partir de acetonitrilo.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de alopregnanolona que se lleva a cabo a través de la formación, y la posterior purificación, de 3 α -trifluoroacetoxi-5 α -pregnan-20-ona (en lo sucesivo, también denominado 3 α -
35

trifluoroacetato de alopregnanolona).

El 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona es otro objeto de la invención.

5 Definiciones

Todos los términos utilizados en la presente descripción, a menos que se indique lo contrario, deben entenderse en su significado común tal como se conoce en la técnica.

10 La expresión "pureza de grado farmacéutico", dentro del alcance de la presente invención, significa que el producto tiene una pureza adecuada para su uso como medicamento.

La anotación "V" precedida por un número, significa cuántas veces, en términos de volumen, la cantidad de una sustancia excede la cantidad dada de otra sustancia. Por ejemplo, dados
15 7,5 g de 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona, añadir 10 V de metanol significa añadir 75 ml de metanol.

El término "aproximadamente" comprende el rango de error experimental que puede darse en una medición. En particular, cuando se hace referencia a un valor, significa el valor dado
20 más o menos el 5 % y, cuando se hace referencia a un rango, significa los valores externos más o menos el 5 %.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1: Espectro de XRPD de la alopregnanolona obtenida de acuerdo con la invención.
Figura 2: Espectro de RMN ¹H de la alopregnanolona obtenida de acuerdo con la invención.

Figura 3: Espectro de RMN ¹³C de la alopregnanolona obtenida de acuerdo con la invención.

30 Figura 4: Cromatograma de HPLC de la alopregnanolona obtenida de acuerdo con la invención.

Figura 5: Espectro de XRPD del 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona obtenido de acuerdo con la invención.

Figura 6: Espectro de RMN ¹H del 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona obtenido de
35 acuerdo con la invención.

Figura 7: Espectro de RMN ¹³C del 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona obtenido de acuerdo con la invención.

Figura 8: Cromatograma de HPLC de la alopregnanolona obtenida por cristalización en etanol acuoso.

Descripción detallada de la invención

5

Partiendo de isopregnanolona y siguiendo el procedimiento descrito en el documento WO 2009/108804, fue posible aislar la alopregnanolona. Sin embargo, la cromatografía como etapa final de purificación no permite aplicar el procedimiento a escala industrial. Además, el producto aislado muestra un contenido en óxido de trifenilfosfina (TPPO), así como otras impurezas desconocidas, en cantidades mucho más altas que el límite permitido de ICH del 0,10 % (Tabla 1).

Tabla 1

Isopregnanolona (g)	Pureza de alopregnanolona (%)	TPPO (% de A)	Rendimiento (%)
1,59	78	16,9	75

15 en el que % de A (o % de área) se refiere al porcentaje de concentración del compuesto con respecto al total en la solución inyectada y se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de A} = \left[\frac{\text{Área bajo la curva del pico (señal de interés)}}{\text{suma de las áreas totales}} \right] \%$$

20 TPPO, un subproducto de la reacción de Mitsunobu derivada de la oxidación de trifenilfosfina, es una impureza potencialmente tóxica que puede afectar significativamente la calidad y la seguridad del producto final. De hecho, para purificar el producto (alopregnanolona) o sus precursores, como, por ejemplo, su derivado de 3-formilo, y para eliminar los subproductos de la reacción de Mitsunobu, incluido el TPPO, los procedimientos conocidos en la bibliografía siempre usan cromatografía.

En un intento por obtener alopregnanolona de acuerdo con las especificaciones de ICH (es decir, impurezas desconocidas $\leq 0,10$ % e impurezas conocidas $\leq 0,15$ % según el análisis de HPLC) sin utilizar técnicas cromatográficas, los inventores de la presente invención han llevado a cabo varios experimentos de cristalización con disolventes o mezclas de disolventes conocidos en la bibliografía tales como, por ejemplo, etanol acuoso, acetona/acetato de etilo, hexano/acetato de etilo, acetato de etilo/etanol, etc. (véase el Ejemplo 1). Sin embargo, algunas impurezas, particularmente el TPPO, resultaron ser difíciles de eliminar. Cabe señalar que, en los experimentos realizados con dichos disolventes o mezclas de disolventes (experimentos B-E, Ejemplo 1), incluso la posterior

recristalización del mismo o de otro disolvente no permitió aumentar la pureza del producto final.

5 Después de una amplia experimentación, los inventores han descubierto sorprendentemente que la cristalización de la alopregnanolona a partir de acetonitrilo permite obtener el producto final de acuerdo con las especificaciones de ICH y por tanto sustancialmente libre (<< 0,10 % de A; <<< 0,10 % en p/p) de TPPO.

10 Por lo tanto, un primer objeto de la presente invención es un método para la purificación de alopregnanolona que comprende la cristalización de alopregnanolona a partir de acetonitrilo.

Dicha purificación se puede llevar a cabo de acuerdo con los métodos conocidos en la materia, en particular, mediante cristalización en frío-calor en la que la alopregnanolona primero se disuelve en caliente en acetonitrilo para facilitar y acelerar la disolución, y a 15 continuación la solución resultante se enfría para lograr la precipitación del producto.

En una realización, el método para la purificación de alopregnanolona de la presente invención comprende:

- 20
- la disolución de alopregnanolona en acetonitrilo a una temperatura cálida;
 - el enfriamiento de la solución; y
 - la separación del precipitado.

25 En particular, la alopregnanolona se disuelve en aproximadamente 5-20 V, preferentemente en aproximadamente 10 V, de acetonitrilo y la mezcla resultante se calienta a una temperatura entre 70 °C y 90 °C, preferentemente entre 75 °C ± 5 °C y 85 °C ± 5 °C, más preferentemente a aproximadamente 80 °C. Durante el calentamiento, la mezcla se puede mantener bajo agitación, por ejemplo, durante aproximadamente 15 ± 5 minutos o, si es necesario, durante 30 ± 5 minutos hasta completar la disolución del producto.

30 La solución a continuación se deja enfriar preferentemente a una temperatura entre -2 °C y 25 °C, más preferentemente a 0 °C ± 2 °C, logrando así la precipitación de cristales de alopregnanolona. Durante el enfriamiento, la mezcla se puede mantener bajo agitación durante un tiempo suficiente para asegurar la formación de cristales de alopregnanolona. En 35 una realización, la solución se mantiene bajo agitación durante aproximadamente 30 ± 5 minutos.

La separación de los cristales de alopregnanolona, obtenidos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, filtración al vacío, filtración por gravedad, destilación, centrifugación, evaporación lenta y similares. En una realización preferida, la alopregnanolona se aísla por filtración al vacío. El sólido cristalino se lava con aproximadamente 1 V de acetonitrilo frío ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se seca a una temperatura entre $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferentemente a aproximadamente $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante un período de tiempo adecuado para llevar los disolventes residuales por debajo de los límites de ICH. Un período de tiempo adecuado puede ser, por ejemplo, entre 10 y 20 horas, preferentemente de aproximadamente 16 horas. El secado se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la materia que incluyen, pero no se limitan a, horno de vacío, Rotavapor®, cámara de secado de aire, secador de lecho estático, secador de lecho fluido, secador por pulverización y similares. Preferentemente, el secado se realiza mediante secado de lecho estático al vacío a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En una realización preferida, la cristalización de alopregnanolona puede ir seguida por una recristalización del mismo disolvente o uno diferente. Preferentemente, la recristalización se lleva a cabo en acetonitrilo en las mismas condiciones indicadas anteriormente.

En una realización particularmente preferida, el procedimiento para la purificación de alopregnanolona, de acuerdo con la presente invención, comprende:

- la disolución de alopregnanolona en acetonitrilo a una temperatura de aproximadamente $85\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, manteniéndose bajo agitación durante aproximadamente 15 minutos;
- el enfriamiento de la solución a aproximadamente $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ manteniéndose bajo agitación durante aproximadamente 30 minutos;
- la separación del precipitado por filtración al vacío;
- el lavado del precipitado con acetonitrilo;
- el secado al vacío a una temperatura de aproximadamente $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 16 horas;
y, opcionalmente,
- la recristalización del precipitado en acetonitrilo.

También debe observarse que el procedimiento de la presente invención permite obtener alopregnanolona con una pureza de grado farmacéutico y también en forma cristalina (en el presente documento también denominada Forma X).

La alopregnanolona, obtenida según la presente invención, se ha caracterizado por difracción de rayos X en polvo (XRPD) y su contenido de TPPO se ha determinado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

5

Más particularmente, la alopregnanolona obtenida según la presente invención muestra, en el difractograma de XRPD (Figura 1), al menos tres de los siguientes picos de caracterización: 7,25, 8,87, 9,58, 11,43, 14,41, 14,77, 15,73, 17,78, 18,16, 18,60 y $19,98 \pm 0,2$ grados 2θ .

10

El cromatograma de HPLC (Figura 4) muestra que la alopregnanolona, obtenida según la presente invención, tiene mucho menos del 0,10 % de TPPO (tiempo de retención relacionado con la alopregnanolona $rRT =$ aproximadamente 0,59).

15

A pesar de que la invención se ha descrito en detalle, debe observarse que la única característica esencial del presente método para la purificación de alopregnanolona es el disolvente de cristalización, que es acetonitrilo.

20

Por ejemplo, se ha observado que, incluso cambiando la duración de los ciclos de frío/calor, se obtiene alopregnanolona de acuerdo con las especificaciones deseadas.

Solo el uso de acetonitrilo para dar alopregnanolona en forma cristalina X permitió desarrollar un procedimiento mejorado para la purificación de alopregnanolona.

25

Sin limitarse a ninguna teoría específica, los inventores de la presente invención creen que este sorprendente resultado se debe a las propiedades de solubilidad peculiares tanto de la alopregnanolona como del TPPO en acetonitrilo. De hecho, el producto cristaliza en acetonitrilo con un alto rendimiento y eliminación completa del óxido de trifenílfosfina que permanece en solución también después del enfriamiento de la solución. Cabe señalar que

30

ningún disolvente o mezcla de disolventes conocidos en la bibliografía puede lograr esta doble función.

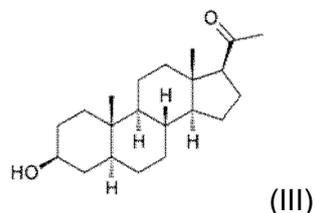
La alopregnanolona se puede obtener por cualquier método conocido en la técnica.

35

Sin embargo, en un intento por aumentar aún más la pureza del producto final, los inventores también han desarrollado un procedimiento para la preparación de alopregnanolona.

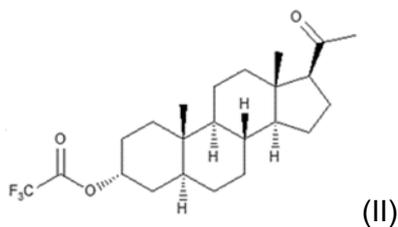
Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención es un método para la purificación de alopregnanolona que comprende además la preparación de alopregnanolona por reacción de Mitsunobu de un compuesto de fórmula

5



para dar un compuesto de fórmula

10



En particular, la isopregnanolona (III) se hace reaccionar con ácido trifluoroacético en presencia de un azodicarboxilato, trifenilfosfina y benzoato de sodio en un disolvente de reacción adecuado, preferentemente tetrahidrofurano.

15 El azodicarboxilato puede seleccionarse del grupo que consiste en dietilazodicarboxilato (DEAD), diisopropilazodicarboxilato (DIAD) y di-terc-butil azodicarboxilato (DBAD), y preferentemente es DEAD sólido o disuelto en un disolvente adecuado, en particular tolueno.

20 El compuesto intermedio de fórmula (II), que es 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona o 3 α -trifluoroacetoxi-5 α -pregnan-20-ona, es un objeto adicional de la presente invención.

Cabe señalar que la conversión de 3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona en 3 β -trifluoroacetoxi-5 α -pregnan-20-ona a través de la reacción de Mitsunobu es conocida en la bibliografía (Varasi
25 et al. "A Revised Mechanism for the Mitsunobu Reaction"). Sin embargo, el C3 del compuesto resultante tiene una configuración invertida con respecto al intermedio de la presente invención y de todos modos se aísla y purifica por cromatografía.

Después de una amplia experimentación, los inventores de la presente invención han
30 descubierto que el aislamiento y la purificación de 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona

por filtración de una solución del compuesto de fórmula (II) en diisopropil éter (DIPE) seguido de recristalización en alcohol isopropílico (IPA) puede influir ventajosamente en la pureza del producto final, la alopregnanolona.

- 5 Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención es un método para la purificación de alopregnanolona que comprende la filtración de una solución del compuesto de fórmula (II) en diisopropil éter y su recristalización en alcohol isopropílico.

10 En particular, el 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona (II) se disuelve en aproximadamente 2-10 V, preferentemente aproximadamente 6 V, de diisopropil éter. Para promover la disolución, la mezcla puede mantenerse bajo agitación durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos, hasta que se obtenga un precipitado (TPPO). El precipitado sólido se elimina de acuerdo con técnicas de filtración conocidas en la materia, tales como, por ejemplo, filtración por gravedad y filtración al vacío.

15 El filtrado, que es la solución de 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona en diisopropil éter, se concentra y a continuación se recupera con aproximadamente 2-10 V, preferentemente con aproximadamente 6 V, de alcohol isopropílico.

20 La mezcla resultante se calienta a una temperatura entre 60 °C y 90 °C, preferentemente entre 70 °C y 80 °C, más preferentemente a aproximadamente 75 °C. Mientras se calienta, la mezcla se puede mantener bajo agitación, por ejemplo, durante aproximadamente 15 \pm 5 minutos o, si es necesario, durante 30 \pm 5 minutos hasta completar la disolución del producto.

25 La solución se deja enfriar preferentemente a una temperatura entre -2 °C y 25 °C, más preferentemente a 0 °C, para obtener la precipitación de cristales de 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona. Mientras se enfría, la mezcla se puede mantener bajo agitación durante el tiempo suficiente para asegurar la formación de cristales de 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona. En una realización, la solución se mantiene bajo agitación durante

30 aproximadamente 30 \pm 5 minutos.

La separación de los cristales de 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona obtenidos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se puede realizar de acuerdo con cualquiera de los métodos conocidos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a,

35 filtración al vacío, filtración por gravedad, destilación, centrifugación, lenta evaporación y similares. En una realización preferida, se aísla 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona por filtración al vacío. El sólido cristalino se lava con aproximadamente 1 V de alcohol

isopropílico frío ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se seca a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferentemente a aproximadamente $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante un período de tiempo adecuado. El secado se puede realizar de acuerdo con métodos conocidos en la materia que incluyen, pero no se limitan a, horno de vacío, Rotavapor®, cámara de secado de aire, secador de lecho estático, secador de lecho fluido, secador por pulverización y similares. En una realización preferida, el secado se realiza mediante secado de lecho estático al vacío a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sin limitarse a ninguna teoría específica, los inventores de la presente invención observaron que sorprendentemente el 3α -trifluoroacetato de alopregnanolona es completamente soluble en diisopropil éter y el TPPO es insoluble, mientras que el 3α -trifluoroacetato de alopregnanolona cristaliza con altos rendimientos en alcohol isopropílico y el TPPO es completamente soluble.

El 3α -trifluoroacetato de alopregnanolona, obtenido según la presente invención, se ha caracterizado por difracción de rayos X en polvo (XRPD).

Más particularmente, el 3α -trifluoroacetato de alopregnanolona obtenido de acuerdo con la presente invención muestra, en el difractograma de XRPD (Figura 5), al menos tres de los siguientes picos característicos: $5,93$, $11,91$, $12,76$, $16,79$, $17,46$, $17,89$, $18,27$, $20,11$, $21,45$ y $23,93 \pm 0,2$ grados $2\text{-}\theta$.

El 3α -trifluoroacetato de alopregnanolona (II), aislado y purificado de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, a continuación se convierte en alopregnanolona (I) por reacción de hidrólisis en presencia de una base, preferentemente hidróxido de sodio, aún más preferentemente hidróxido de sodio al 28% en p/v, en un disolvente adecuado, preferentemente metanol, y purificado por cristalización en acetonitrilo de acuerdo con el primer objeto de la invención.

Sorprendentemente, la alopregnanolona resultante tiene una pureza de grado farmacéutico y, más particularmente, un contenido de TPPO inferior al $0,05\%$ en A (véase la Tabla 2).

Tabla 2

3α -trifluoroacetato de alopregnanolona (g)	Alopregnanolona (g)	Pureza de la alopregnanolona (%)	TPPO (% de A)	Rendimiento molar (%)
5,1	3,3	99,79	0,05	89

13,8	8,8	99,70	0,024	86
11,3	7,6	99,76	0,031	89
17,3	9,2	99,81	n.d.	70

*n.d. = no detectable

Además, corrigiendo (dividiendo) % de A entre el factor de respuesta relativo adecuado k (en el que $k = (A_{TPPO} * [Alopregnanolona] / A_{Alopregnanolona} * [TPPO]) = 129$), el valor % de A, representativo de la concentración residual de TPPO disminuye aún más:

$$5 \quad 0,05 \% / 129 = 0,0004 \% (<5 \text{ ppm})$$

En otras palabras, el TPPO es prácticamente indetectable (<5 ppm) en la alopregnanolona obtenida de acuerdo con la presente invención.

10 Por lo tanto, en una realización particularmente preferida, el método para la purificación de alopregnanolona de la presente invención comprende:

- la reacción de Mitsunobu de isopregnanolona (III) para dar 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona (II);
- la filtración de una solución de 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona (II) en diisopropil éter seguido de su cristalización en alcohol isopropílico;
- 15 - la reacción de hidrólisis de 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona (II) para dar alopregnanolona (I); y
- la cristalización de alopregnanolona (I) a partir de acetonitrilo.

20 Incluso si la presente invención se ha descrito en sus rasgos de caracterización, en la presente invención se incluyen los cambios y equivalentes que son evidentes para los expertos en el campo. A continuación, la presente invención se ilustrará mediante algunos ejemplos que tienen un propósito ilustrativo únicamente y no pretenden limitar el alcance de la invención.

25

Ejemplos

El punto de fusión de la alopregnanolona (I) obtenida de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se determinó experimentalmente mediante el modelo del sistema de puntos de fusión Mettler MP90 para dar un rango de 174-175 °C.

30

La rotación óptica se determinó mediante el polarímetro Jasco P2000 y se obtuvo como valor $[\alpha]_D + 96^\circ$ ($c = 0,5$, cloroformo), en el que "c" es la concentración expresada en g/100 ml y el cloroformo es el disolvente en el que se realizó la medición.

La RMN ^1H y ^{13}C se obtuvieron mediante un espectrómetro Bruker AV (300MHz) a 25 °C observando el ^1H y ^{13}C a 300,13 y 75,47 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se expresan como ppm relacionados con el tetrametilsilano y los espectros se obtuvieron disolviendo la muestra en CDCl_3 .

5

Los espectros de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la alopregnanolona se realizaron con un difractómetro Bruker D5005, usando radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), equipado con un detector de centelleo y un monocromador de grafito curvo sobre el haz difractado. Las muestras se molieron suavemente en un mortero de ágata para obtener un polvo fino y desintegrar eventuales aglomerados de partículas. Los datos se recogieron a temperatura ambiente en un soporte de muestra de bajo fondo monocristalino de silicio. Detección: 2θ grados, medición del rango angular de 3° a 40° , paso $0,03^\circ$ y tiempo de recuento de 4 s/paso.

10

15

Los espectros de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de 3α -trifluoroacetato de alopregnanolona se realizaron con un difractómetro Bruker D8, utilizando radiación $\text{Cu K}\alpha$, equipado con un detector de centelleo y un monocromador de grafito curvo sobre el haz difractado. Las muestras se molieron suavemente en un mortero de ágata para obtener un polvo fino y para separar eventuales aglomerados de partículas. Los datos se recogieron a temperatura ambiente en un soporte de muestra de bajo fondo monocristalino de silicio. Detección: 2θ grados, medición del rango angular de 3° a 35° (2θ), paso $0,04^\circ$ y tiempo de recuento de 2 s/paso.

20

25

Los cromatogramas de HPLC se obtuvieron usando equipos Agilent Serie 1100 y Agilent Serie 1200 e inyectando 10 μl de solución en un Kinetex XB C18; 150 x 4,6 mm; Columna de 5 μm . La muestra se eluyó en gradiente con una fase móvil compuesta de una mezcla de agua/acetonitrilo.

30

Los compuestos finalmente se analizaron aplicando una longitud de onda igual a 210 nm.

Los análisis de masas se realizaron utilizando un equipo Varian 500MS en ESI+.

Ejemplo 1 (comparativo)

35

Pruebas de cristalización en alopregnanolona fuertemente dopada con TPPO (10 % en p/p)
Los resultados se informan en la Tabla 3:

Tabla 3

PRUEBA	DISOLVENTE	TPPO (% de A)	Rendimiento en p/p
A	Acetonitrilo	16 %	90 %
B	Etanol acuoso	40 %	37 %
C	Acetona/acetato de etilo	51 %	50 %
D	Hexano/acetato de etilo	52 %	63 %
E	Acetato de etilo/etanol	63 %	9 %

Las pruebas B-E dan como resultado alopregnanolona que contiene aproximadamente el 50 % de impurezas de TPPO ($r_{RT} = 0,59$) como se muestra, por ejemplo, en la Figura 8.

El ejemplo comparativo demuestra que el acetonitrilo, que difiere de todos los otros disolventes o mezclas de disolventes, tiene la ventaja inesperada de proporcionar alopregnanolona con mayor rendimiento y pureza.

10

Ejemplo 2

Preparación de 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona

15 Se cargaron 15 g de isopregnanolona y 150 ml (10 V) de tetrahidrofurano en un matraz de reacción a temperatura ambiente. La suspensión resultante se agitó bajo atmósfera inerte (N_2). A continuación, se añadieron 26,51 ml de dietilazodicarboxilato (DEAD, 40 % en peso en tolueno) y 4,46 ml de ácido trifluoroacético a una temperatura de aproximadamente $5\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, se añadieron 15,3 g de trifenilfosfina, la mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación durante aproximadamente 10 minutos y la temperatura se elevó a $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. A continuación, se añadieron 8,4 g de benzoato de sodio y la mezcla se mantuvo bajo agitación durante aproximadamente 2 horas. El disolvente se eliminó por destilación al vacío hasta 4 V de disolvente residual.

25 Posteriormente, se añadieron 90 ml (6 V) de diclorometano, la temperatura se elevó a aproximadamente $30\text{ }^\circ\text{C}$ y a continuación se añadieron 90 ml (6 V) de agua y la mezcla se mantuvo bajo agitación durante 10 ± 5 minutos. Las fases se separaron y las fases orgánicas recogidas se trataron primero con una solución saturada de $NaHCO_3$ (90 ml, 6 V), a continuación con HCl 1 N (90 ml, 6 V) y, finalmente, con agua (90 ml, 6 V). Las fases orgánicas se concentraron por destilación al vacío.

30

Ejemplo 3

Purificación de 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona

5 El 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona se disolvió en 6 V diisopropil éter. La mezcla se mantuvo bajo agitación durante aproximadamente 30 minutos hasta obtener un precipitado. El sólido precipitado se eliminó por filtración al vacío. El filtrado se concentró y se recogió con 6V de alcohol isopropílico. La mezcla se calentó a 75 °C y se mantuvo bajo agitación durante aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, la mezcla se enfrió a 0 °C y se
10 mantuvo bajo agitación durante aproximadamente 30 minutos. El precipitado se filtró y se lavó con 15 ml (1 V) de alcohol isopropílico frío. A continuación, el filtrado se secó al vacío a temperatura ambiente para dar 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona (7,5 g).

15 RMN ¹H: 4,03 (1H, m, H-3 α); 2,53 (1H, m, H-17); 2,11 (3H, s, -COCH₃); 0,78 (3H, s, metil-19); 0,60 (3H, s, metil-18); 1,00 - 2,20 (m, 22H).

20 RMN ¹³C: 11,2 (CH₃); 13,3 (CH₃); 20,7 (CH₂); 22,7 (CH₂); 24,2 (CH₂); 25,6 (CH₂); 27,9 (CH₂); 31,4 (CH₃); 31,5 (CH₂); 32,2 (CH₂); 32,4 (CH₂); 35,3 (CH); 35,6; 38,8 (CH₂); 39,7 (CH); 44,1; 53,7 (CH); 56,5 (CH); 63,6 (CH-17); 75,6 (C-3); 114,0 (q, j_{C-F} = 285 Hz, -CF); 156,8 (q, j_{C-F} = 41 Hz, -COOCF₃); 209,6 (C-20).

MS-ESI positivo m/z 415,3 [M + H]⁺.

Ejemplo 4

25

Preparación de alopregnanolona

Se cargaron 7,5 g de 3 α -trifluoroacetato de alopregnanolona y 75 ml (10 V) de MeOH en un matraz de reacción a temperatura ambiente. La suspensión resultante se mantuvo bajo
30 agitación en atmósfera inerte (N₂) y se enfrió a 5 °C \pm 3 °C. Posteriormente, se añadieron 3 g de NaOH al 28 % en p/v y la mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación durante 10 \pm 5 minutos. La mezcla de reacción se trató mediante extracción en diclorometano/agua (6 V/10 V) mientras se mantenía bajo agitación constante durante 10 \pm 5 minutos. Las fases se separaron y se concentraron por destilación al vacío.

35

Ejemplo 5

Purificación de alopregnanolona

Se cargó acetonitrilo (10 V) en un matraz de reacción, la mezcla se calentó a $85\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo bajo agitación durante aproximadamente 15 minutos. A continuación, la mezcla se enfrió a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo bajo agitación durante aproximadamente 30 minutos. El precipitado se aisló por filtración a presión reducida y se lavó con 7,5 ml (1 V) de acetonitrilo frío. Finalmente, el filtrado se secó al vacío a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 16 horas para dar alopregnanolona (5,0 g).

5
10 RMN ^1H : 4,03 (1H, m, H-3 α); 2,53 (1H, m, H-17); 2,11 (3H, s, $-\text{COCH}_3$); 1,57 (1H, s, intercambio con D_2O , OH); 0,78 (3H, s, metil-19); 0,60 (3H, s, metil-18); 1,00 - 2,20 (m, 22H).

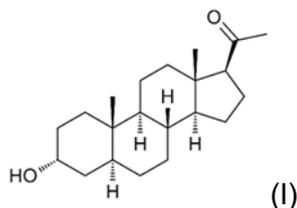
RMN ^{13}C : 11,1 (CH_3); 13,3 (CH_3); 20,7 (CH_2); 22,6 (CH_2); 24,2 (CH_2); 28,3 (CH_2); 28,8 (CH_2); 31,4 (CH_3); 31,8 (CH_2); 32,1 (CH_2); 35,3 (CH); 35,7 (CH_2); 36,0; 38,9 (CH); 38,9 (CH_2); 44,1; 15 54,1 (CH); 56,7 (CH); 63,7 (CH-17); 66,3 (CH-3); 209,6 (C-20).

MS-ESI positivo m/z 319,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 301,1 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$

REIVINDICACIONES

1. Un método para la purificación de alopregnanolona de fórmula (I)

5



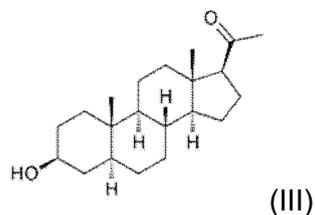
que comprende la cristalización de alopregnanolona en acetonitrilo.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la recristalización de alopregnanolona en acetonitrilo.

10

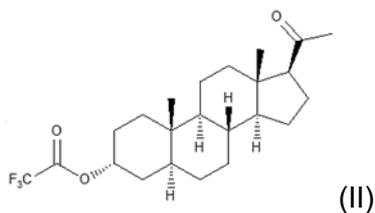
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la preparación de alopregnanolona por reacción de Mitsunobu de un compuesto de fórmula

15



para dar un compuesto de fórmula

20



4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la reacción de Mitsunobu se produce por reacción del compuesto de fórmula (III) con ácido trifluoroacético en presencia de un azodicarboxilato, trifenilfosfina y benzoato de sodio, en un disolvente de reacción adecuado, preferentemente tetrahidrofurano.

25

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el azodicarboxilato se selecciona del grupo que consiste en dietilazodicarboxilato, diisopropil azodicarboxilato y di-terc-butil

azodicarboxilato, preferentemente dietilazodicarboxilato.

- 5 6. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 3-5, que comprende además la filtración de una solución del compuesto de fórmula (II) en diisopropil éter y su recristalización en alcohol isopropílico.
- 10 7. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha preparación comprende además la conversión del compuesto de fórmula (II) en el compuesto de fórmula (I) por reacción de hidrólisis en presencia de una base, preferentemente hidróxido de sodio en un disolvente adecuado, preferentemente metanol.
8. Alopregnanolona, obtenida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene un contenido de óxido de trifenílfosfina (TPPO) inferior al 0,05 % de área.
- 15 9. Alopregnanolona obtenida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que muestra, en el difractograma de XRPD, al menos tres de los siguientes picos de caracterización: 7,25, 8,87, 9,58, 11,43, 14,41, 14,77, 15,73, 17,78, 18,16, 18,60 y $19,98 \pm 0,2$ grados 2θ .
- 20 10. El compuesto de fórmula (II).

Figura 1

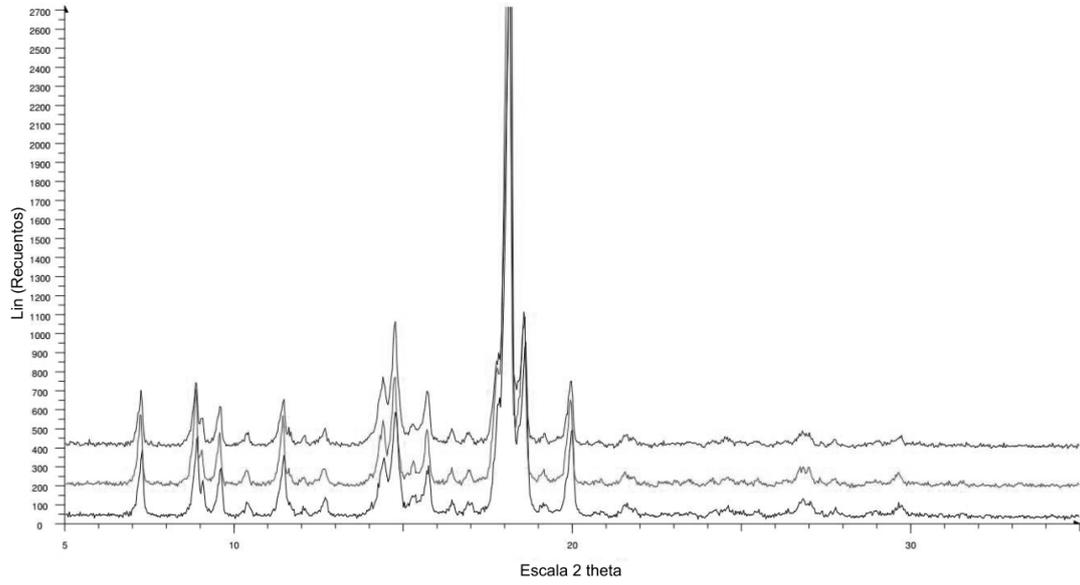


Figura 2

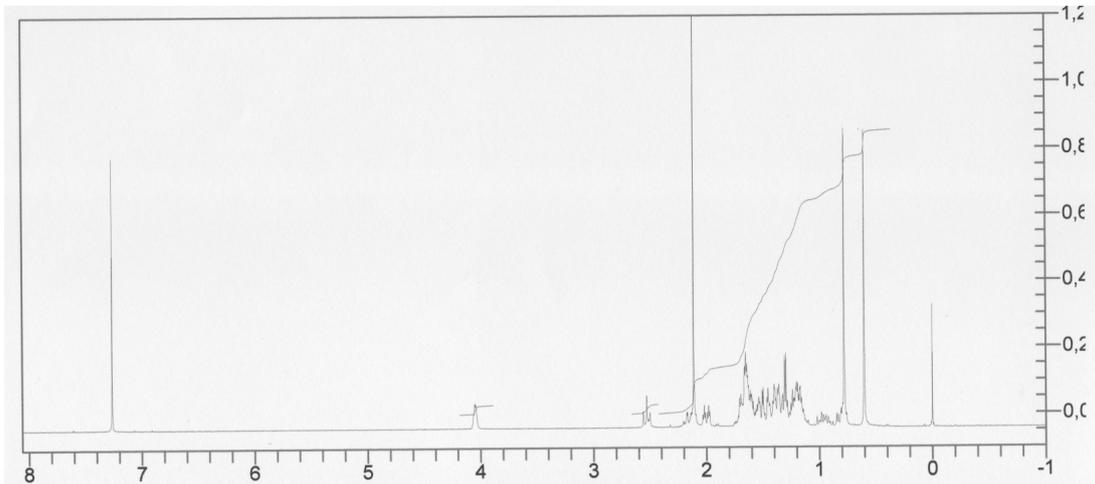


Figura 3

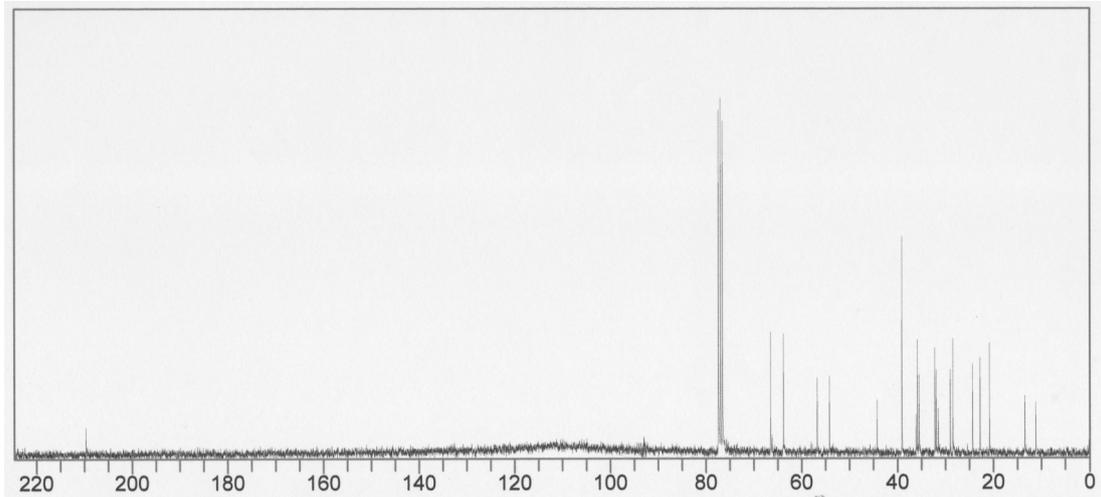


Figura 4

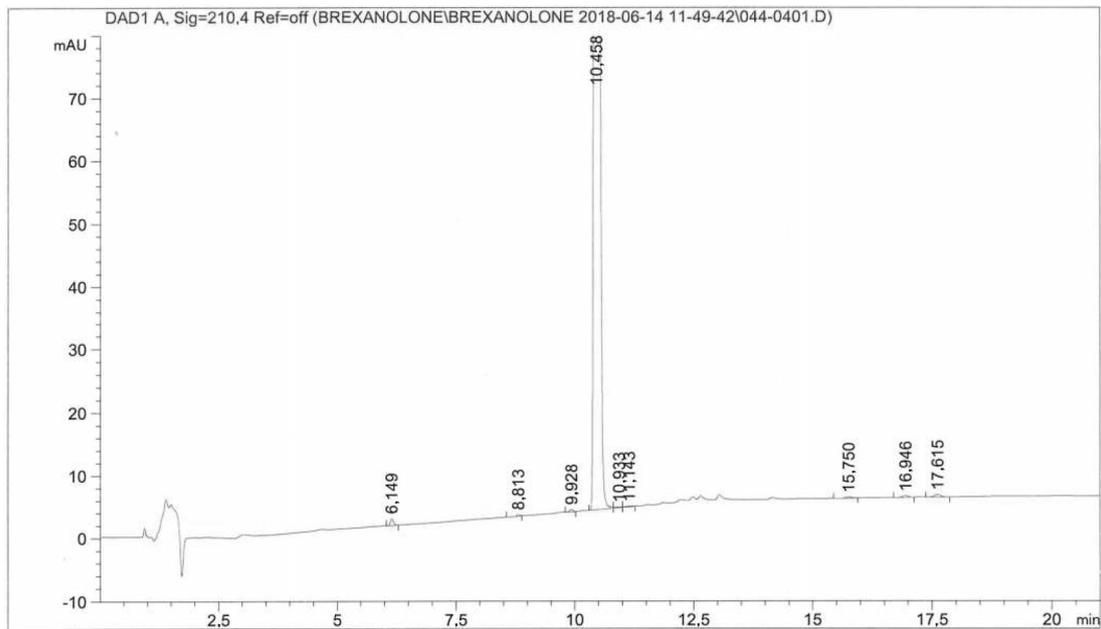


Figura 5

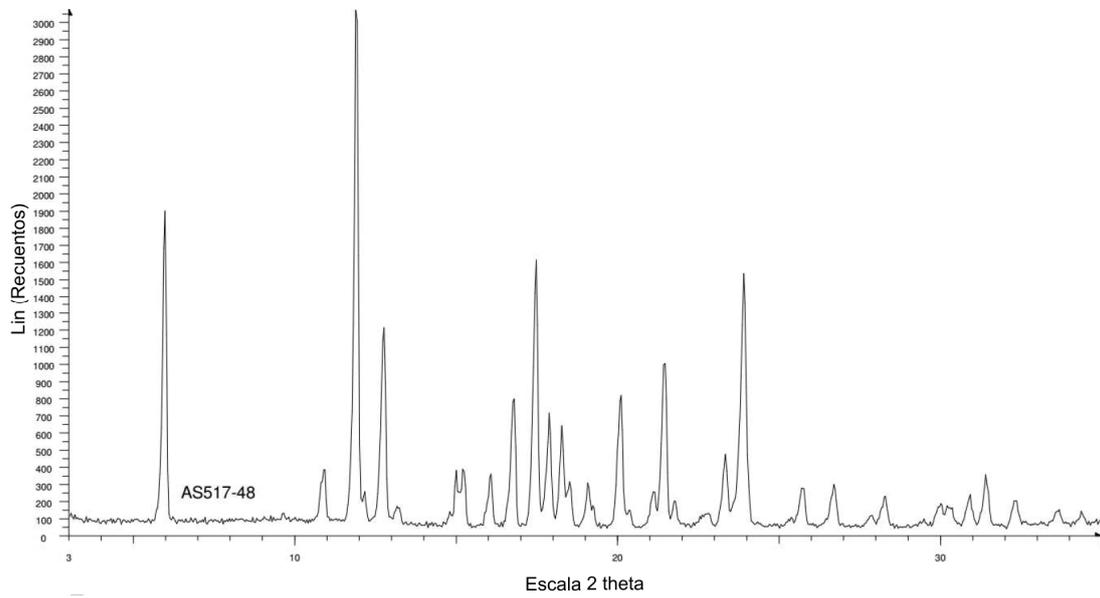


Figura 6

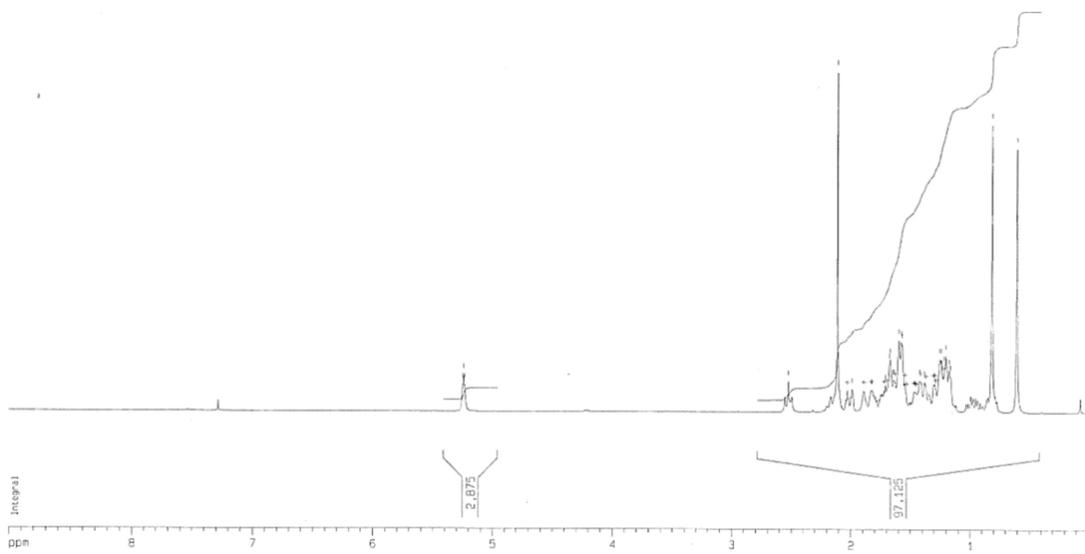


Figura 7

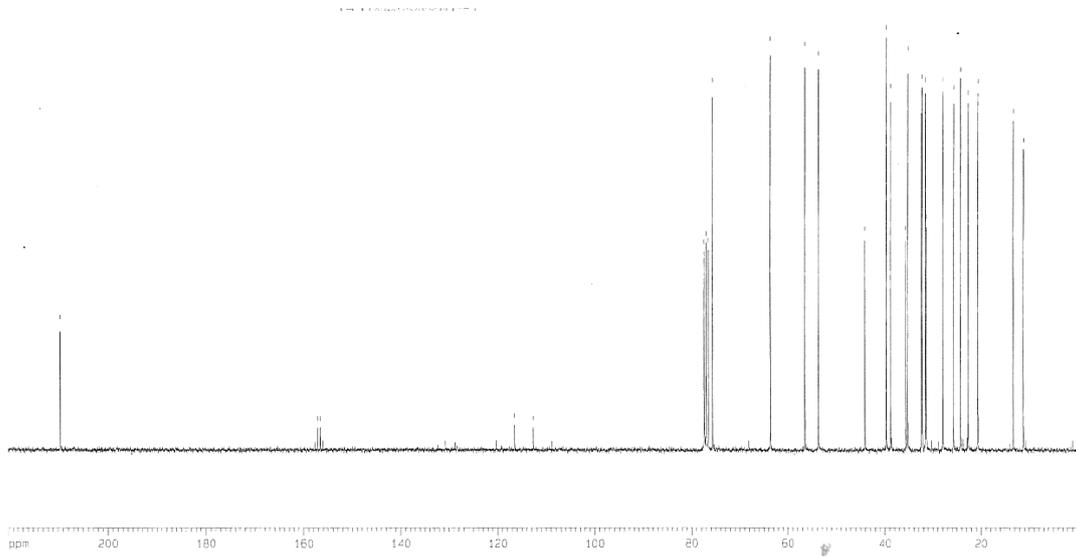
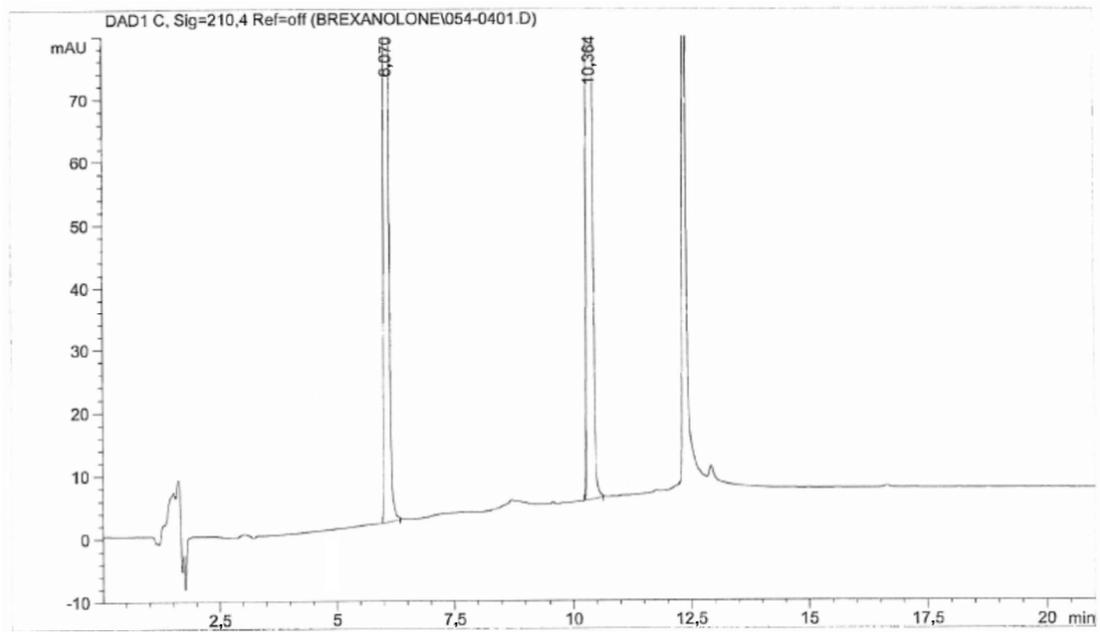


Figura 8





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201930751

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.08.2019

③② Fecha de prioridad: **18-09-2018**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07C49/323** (2006.01)
C07C45/81 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PURDY R et al. "Synthesis, Metabolism, and Pharmacological Activity of 3alpha-Hydroxy Steroids Which Potentiate GABA-Receptor-Mediated Chloride Ion Uptake in Rat Cerebral Synaptoneurosomes". J. Med. Chem, 1990, Vol. 33, N° 6, Páginas 1572 - 1581. Ver páginas 1572 y 1579 & VARASI et al. "A Revised Mechanism for the Mitsunobu Reaction". J. Org. Chem, 1987, Vol. 52, N° 19, Páginas 4235 - 4238. Ver páginas 4235 y 4238.	3-5 y 7-9
X	WO 2009108804 A2 (UNIV EMORY et al.) 03/09/2009, Página 122, esquema; página 124, párrafo1.	3-5, 7 y 8
X	VOJTECH KAPRAS et al. "Preparation of steroid sulfamates and their interaction with GABA _A receptor". COLLECTION CZECH CHEMICAL COMMUNICATIONS, 01/01/2009, Vol. 74, N° 4, Páginas 643 - 650, ISSN 0010-0765 <DOI: doi: 10.1135/cccc2008187>. Ver resumen; esquema 1; página 648, párrafo 3.	8 y 9
X	VAN DEN HEUVEL W J A et al. "Gas-chromatographic behavior of trifluoracetoxy steroids". BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 15/04/1961, Vol. 48, N° 3, Páginas 596 - 599, ISSN 0006-3002, <DOI: doi: 10.1016/0006-3002(61)90061-0>. Ver tabla 2 & RN: 906337-19-7. Base de datos REGISTRY [en línea]. Disponible el 11.09.2006 [recuperado el 03.02.2020].	10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.02.2020

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT-DB, NPL, XPESP, REGISTRY, CAS.