

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102009901730251A1

Publication Date

20101108

Applicant

PRODOTTI CHIMICI E ALIMENTARI SPA

Title

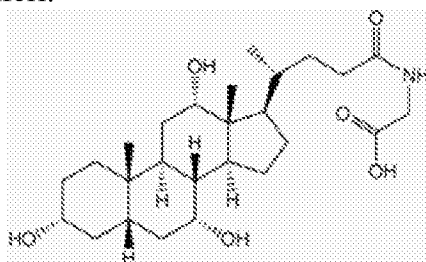
METODO DI SINTESI DELL'ACIDO GLICOCOLICO.

Descrizione della domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo "Metodo di sintesi dell'acido glicocolico" a nome Prodotti Chimici e Alimentari Spa con sede in Via Novi 78, 15060 Basaluzzo (AL)

La presente invenzione è relativa ad un nuovo processo per la sintesi dell'acido glicocolico.

STATO DELL'ARTE

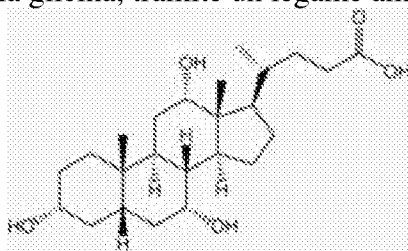
L'acido glicocolico è un sale biliare coinvolto nella formazione delle micelle miste per l'assorbimento dei grassi. E' presente come sale sodico nella bile dei mammiferi.



(I)

Acido glicocolico

L'acido glicocolico viene generalmente preparato mediante la coniugazione dell'acido colico con la glicina, tramite un legame ammidico.



(II)

Acido colico

Uno dei metodi più semplici per l'ottenimento di un legame ammidico, è

l'acilazione di una ammina, o un altro nucleofilo, con le anidridi degli acidi carbossilici, sia simmetriche che asimmetriche.

In generale, nella reazione di sostituzione tra l'anione di un aminoacido ed una anidride asimmetrica, si forma l'anidride meno reattiva, con l'eliminazione dell'anione corrispondente all'acido più forte (si veda Corby, Kenner e Todd, *J. Chem. Soc.* (1952), pag. 1234 e *Organic Reactions*, Volume 12, pag. 163-352, John Wiley & Son, New York (1962)).

Nella reazione tra un'anidride e un'ammina, l'ammina si comporta come un nucleofilo e la specie acilante come un reagente elettrofilo. L'effetto del solvente nel corso della sintesi peptidica ha molta importanza (si veda: Elkik e Gault in *Compt rend.* 238, 2428 (1954) e Emery e Gold, *J. Chem. Soc.* (1950), 1443, 1447, 1455).

Generalmente, in mezzi acquosi, la reazione di formazione del legame amidico diminuisce drasticamente.

Nella sintesi dell'acido glicocolico con la metodica dell'anidride mista sopra descritta, generalmente l'acido colico e la glicina etilestere cloridrato sono sciolti in solventi quali la dimetilformammide (DMF) o il diossano; quindi viene liberata la base della glicina etilestere cloridrato e salificato il gruppo carbossilico dell'acido colico con una base organica, sempre negli stessi solventi, ovvero DMF o diossano.

Per aggiunta sul sale dell'acido colico di un cloroformiato, si ha la formazione dell'anidride mista e conseguente precipitazione della base cloridrata.

Dopo eliminazione della base cloridrata per filtrazione, si fa avvenire

l'acilazione della glicina etil estere con l'anidride mista sintetizzata, ottenendo così l'acido biliare coniugato.

Dato l'interesse per l'acido glicocolico, è sentita l'esigenza di metodi di sintesi alternativi, in grado di fornire questo prodotto con alte rese ed un elevato grado di purezza.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

E' quindi oggetto della presente invenzione un processo per la preparazione dell'acido glicocolico di formula (I) comprendente i seguenti passaggi: a) formazione di una anidride mista dell'acido colico mediante sospensione di acido colico in acetone o acetone acquoso in presenza di una base, e successiva reazione con un alchilcloroformiato; b) amminolisi dell'anidride mista dell'acido colico così ottenuta con una soluzione acquosa di un estere della glicina, con conseguente ottenimento di un estere dell'acido glicocolico; c) idrolisi dell'estere dell'acido glicocolico così ottenuto mediante trattamento con una base forte acquosa e precipitazione di acido glicocolico mediante acidificazione del corrispondente sale sodico.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione ha come oggetto un metodo di sintesi alternativo dell'acido glicocolico che comprende i seguenti passaggi:

a) formazione di una anidride mista dell'acido colico mediante la sospensione di acido colico in acetone o in acetone acquoso in presenza di una base, e successiva reazione con un alchilcloroformiato; b) amminolisi dell'anidride mista dell'acido colico così ottenuta con una soluzione acquosa di un estere della glicina, con conseguente ottenimento di un estere dell'acido glicocolico.

Il processo oggetto della presente invenzione, può opzionalmente comprendere il seguente passaggio:

c) idrolisi dell'estere dell'acido glicocolico ottenuto nello stadio b) mediante trattamento con una base forte acquosa e precipitazione di acido glicocolico mediante acidificazione del corrispondente sale sodico.

Nello stadio di reazione a) viene effettuata la sospensione dell'acido colico in acetone o in acetone acquoso, in presenza di una base, a temperatura ambiente, ovvero compresa tra i 18 e i 25 °C. La base è preferibilmente una ammina, ancora più preferibilmente una trietilammina e ancora più preferibilmente trietilammina oppure tributilammina.

Alla sospensione così ottenuta, raffreddata ad una temperatura compresa tra -5 °C e +10 °C, preferibilmente tra 0 °C e +5°C, viene aggiunto un alchilcloroformiato, preferibilmente metilcloroformiato, etilcloroformiato e propilcloroformiato, e ancora più preferibilmente etilcloroformiato, mantenendo la sospensione raffreddata come sopra, ottenendo così una sospensione dell'anidride mista dell'acido colico e del cloridrato della base utilizzata.

Si è quindi sorprendentemente trovato che utilizzando acetone o acetone acquoso come mezzo di reazione per la sintesi dell'anidride mista dell'acido colico ed acqua come solvente per la preparazione dell'ammina, si può evitare il passaggio di filtrazione delle sintesi precedenti, necessario per la rimozione dell'ammina cloridrata che si forma durante la sintesi dell'anidride mista.

Infatti, la sospensione ottenuta nello stadio a) può essere direttamente utilizzata nello stadio di reazione b), dove l'anidride mista dell'acido colico

viene amminolizzata con una soluzione acquosa di un estere della glicina, preferibilmente estere alchilico C₁-C₄, ancora più preferibilmente estere etilico della glicina.

La soluzione acquosa di estere della glicina viene miscelata con la sospensione dell'anidride mista dell'acido colico; la miscela così ottenuta viene agitata, preferibilmente per un tempo compreso tra circa 10 e 14 ore, preferibilmente circa 12 ore.

L'acido biliare che si forma per idrolisi dell'anidride mista con la soluzione acquosa dell'estere della glicina rimane prevalentemente sciolto nella soluzione idroacetone, mentre l'acido biliare coniugato, ovvero l'acido colico coniugato con l'estere della glicina, precipita con il tempo in forma cristallina.

Opzionalmente, può essere effettuato un ulteriore passaggio di purificazione dell'acido colico coniugato con l'estere della glicina, mediante sua cristallizzazione in acetone acquoso, ottenendo un prodotto particolarmente puro, con una quantità di acido biliare libero molto minore dello 0,5%, rispetto alla quantità dell'acido biliare coniugato.

Nello stadio opzionale c), è prevista l'idrolisi dell'acido biliare coniugato esterificato con una base forte acquosa, come la soda (NaOH) o la potassa (KOH).

L'eventuale estere dell'acido biliare coniugato ancora presente dopo l'idrolisi può essere eliminato mediante lavaggi con etile acetato a pH controllato, tra 6,5 e 7,5. Si ottiene infine l'acido glicocolico per precipitazione dalla soluzione chiarificata, con torbidità minore di 3 FTU (unità torbidimetriche di formazina), del suo sale sodico, con soluzioni di

acidi forti, quali HCl 1N, fino a pH compreso tra 2,0 e 2,5.

Un impasto finale in acqua, al ricadere, cambia forma cristallina al prodotto, rendendolo ben filtrabile.

I seguenti esempi illustrano l'invenzione, senza in alcun modo limitarla.

ESEMPI

Legenda

GCAEE: acido glicocolico etilestere

CA: acido colico

GGCAEE: acido glicilglicocolico etil estere

GCA: acido glicocolico

Esempio 1

Sintesi del GCAEE grezzo.

In un pallone di vetro da 2 litri, pulito ed asciutto, si caricano:

- acido colico 80,7 g pari a 0,197 moli
- acetone 650 ml
- acqua 19 ml
- trietilammina 20,8 g

Si mette in agitazione e si raffredda la sospensione tra 0 e 5° C.

Si prepara anche in un pallone da 1 litro, una soluzione con:

- glicina etilestere HCl 30 g
- acqua 545 ml
- trietilammina 21,8 g

Quando la sospensione di acido colico è tra 0 e 5° C, si fa gocciolare etilcloroformiato 22,3 g mantenendo la temperatura della sospensione tra 0 e 5° C. Terminata la carica dell'etilcloroformiato, si lascia in agitazione per

15-20 minuti, tra 0 e 5° C. Quindi si versa la soluzione acquosa di glicina etilestere sulla sospensione dell'anidride mista dell'acido colico e si tiene in agitazione la soluzione per 12 ore circa. Infine, si filtra la sospensione e si lava il pannello con acqua/acetone 50/50 v/v 60 ml.

Si ottiene una resa umida di 89 g, ovvero 80g secchi pari all'82% stechiometrica.

Purezza TLC: CA libero circa dell'1 %; GGCAEE minore o uguale allo 0,25 %. Altre impurezze correlate: minore dello 0,2 % singolarmente, in totale minori dello 0,2 %.

Eluente TLC:

Diisopropiletere/isooottano/isopropanolo/metanolo/acido formico/acqua

50 : 20 : 15 : 12 : 3 : 1

Esempio 2

Purificazione del GCAEE grezzo.

In un pallone di vetro da 1 litro, si caricano:

- GCAEE grezzo umido 44 g
- acetone / acqua 50/50 v/v 425 ml

Si mette in agitazione la sospensione e si porta all'ebollizione 65 °C. Si mantiene all'ebollizione per circa 30 minuti e poi si raffredda alla temperatura ambiente. Si lascia in agitazione per 12 ore. Si filtra la sospensione e si lava il pannello sul filtro con 25 ml di acetone / acqua 50/50 v/v.

Si ottiene una resa umida di 33,7 g, ovvero 30,3g secchi pari al 76,5 p/p rispetto al prodotto grezzo.

Purezza TLC, eluente del grezzo: CA minore dello 0,3 %; GGCAEE

minore dello 0,2 %; altre impurezze minori dello 0,2 in totale.

Esempio 3

Idrolisi e precipitazione del GCA

In un pallone di vetro da 1 litro, pulito ed asciutto, si caricano:

- acqua 189 ml
- NaOH 1,89 g

Si tiene in agitazione per circa 1 ora in modo che tutta la soda si sciogla, alla temperatura ambiente.

A soluzione completa si aggiungono 16,9 g di GCAEE purificato umido e si tiene la sospensione in agitazione per circa 12 ore, ad una temperatura compresa tra 20 e 28°C.

Quindi si porta la soluzione limpida ad un pH compreso tra 7,0 e 7,5 con circa 50ml di HCl 1N. La soluzione acquosa è lavata per 2 volte con etilacetato 75 ml, alla temperatura tra 35 e 40 °C.

Quindi la soluzione acquosa separata è riscaldata sotto vuoto per eliminare l'etile acetato. La soluzione acquosa così ottenuta viene diluita con 100 ml di acqua, ed il GCA puro è ottenuto per riscaldamento della soluzione tra 35 e 40 °C e precipitazione con HCl 1N, fino a pH compreso tra 2,0 e 2,5.

Il prodotto umido è seccato sotto vuoto tra 50 e 60° C.

La resa secca del prodotto sesquidrato è di 14 g, pari al 92,3% stechiometrica.

Purezza TLC

CA minore dello 0.4 % - GGCAEE minore dello 0.1 % - Altre impurezze minori dello 0.2 % in totale. Glicina non rilevabile.

Il Mandatario

Dr.ssa Claudia Finetti

Della Dragotti & Associati Srl

(Iscr. Albo No. 1211 B)

RIVENDICAZIONI

1) Processo per preparare l'acido glicocolico comprendente i seguenti passaggi:

a) formazione di una anidride mista dell'acido colico mediante sospensione di acido colico in acetone o in acetone acquoso in presenza di una base, e successiva reazione con un alchilcloroformiato;

b) amminolisi dell'anidride mista dell'acido colico così ottenuta con una soluzione acquosa di un estere della glicina, con conseguente ottenimento di un estere dell'acido glicocolico.

2) Processo secondo la rivendicazione 1, in cui la base è una ammina, preferibilmente una trialchilammina e ancora più preferibilmente trietilammina oppure tributilammina.

3) Processo secondo la rivendicazione 1, in cui l'alchilcloroformiato è metilcloroformiato, etilcloroformiato o propilcloroformiato, preferibilmente etilcloroformiato.

4) Processo secondo la rivendicazione 1, dove la temperatura dello stadio a) è mantenuta tra -5 °C e +10 °C, preferibilmente tra 0 °C e +5 °C.

5) Processo secondo la rivendicazione 1, dove l'estere della glicina è un estere alchilico C₁-C₄, preferibilmente estere etilico della glicina.

6) Processo secondo la rivendicazione 1, dove l'amminolisi dello stadio b) viene effettuata sotto agitazione per un tempo compreso tra circa 10 e 14 ore, preferibilmente circa 12 ore.

7) Processo secondo la rivendicazione 1, comprendente l'idrolisi dell'estere dell'acido glicocolico mediante trattamento con una base forte acquosa e precipitazione di acido glicocolico mediante acidificazione del

corrispondente sale sodico.

8) Processo secondo la rivendicazione 7, dove la base forte acquosa è NaOH acquoso o KOH acquoso, preferibilmente NaOH acquoso.

9) Processo secondo la rivendicazione 7, dove l'acidificazione viene effettuata per arrivare a pH compreso tra 2,0 e 2,5.

10) Processo secondo la rivendicazione 7, dove l'acidificazione viene effettuata con acido cloridrico.

Il Mandatario

Dr.ssa Claudia Finetti

Della Dragotti & Associati Srl

(Iscr. Albo No. 1211 B)

CLAIMS

- 1) Process for the preparation of glycocholic acid comprising the following steps:
 - a) making a mixed anhydride of cholic acid through the suspension of cholic acid in acetone or in aqueous acetone in presence of a base, and subsequent reaction with an alkyl chloroformate;
 - b) aminolysis of the so obtained mixed anhydride of cholic acid with an aqueous solution of a glycine ester, resulting in an ester of glycocholic acid.
- 2) Process according to claim 1, wherein the base is an amine, preferably a trialkylamine and more preferably triethylamine or tributylamine.
- 3) Process according to claim 1, wherein the alkyl chloroformate is methyl chloroformate, ethyl chloroformate or propyl chloroformate, preferably ethyl chloroformate.
- 4) Process according to claim 1, wherein the temperature of the step a) is maintained between -5 °C to +10 °C, preferably between 0 °C to +5 °C.
- 5) Process according to claim 1, wherein the glycine ester is a C₁-C₄ alkyl ester, preferably glycine ethyl ester.
- 6) Process according to claim 1, wherein the aminolysis of step b) is performed under stirring, lasting for a time comprised between about 10 to 14 hours, preferably about 12 hours.
- 7) Process according to claim 1, comprising the hydrolysis of the ester of glycocholic acid through the treatment with a strong aqueous base and the precipitation of glycocholic acid through the acidification of the correspondent sodium salt.
- 8) Process according to claim 7, wherein the strong aqueous base is

aqueous NaOH or aqueous KOH, preferably aqueous NaOH.

9) Process according to claim 7, wherein the acidification is performed to arrive to a pH comprised between 2,0 to 2,5.

10) Process according to claim 7, wherein the acidification is performed with hydrochloride acid.

Il Mandatario

Dr.ssa Claudia Finetti

Della Dragotti & Associati Srl

(Iscr. Albo No. 1211 B)