

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2016-385

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07J 9/00

(2006.01)

C07F 7/18

(2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

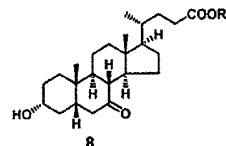
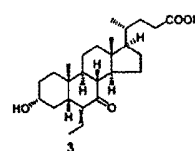
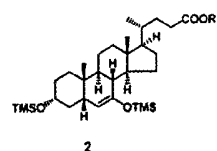
(22) Přihlášeno: **28.06.2016**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **10.01.2018**
(Věstník č. 2/2018)

(71) Přihlašovatel:
Zentiva, k.s., Praha 10 - Dolní Měcholupy, CZ

(72) Původce:
Tomáš Kubelka, Praha 4, CZ
Markéta Slavíková, Libčice nad Vltavou, CZ
Ing. Josef Zezula, Ph.D., Polná, CZ
Josef Černý, Slaný, CZ

(74) Zástupce:
Rott, Růžicka & Guttman
Patentové, známkové a advokátní kanceláře, Ing.
Jana Fuchsová, Vinohradská 37, 120 00 Praha 2



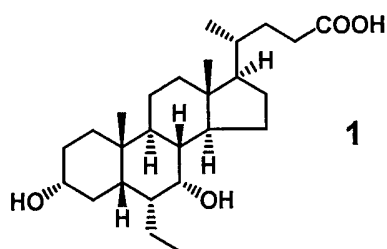
(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsoby přípravy intermediátů pro syntézu
Obeticholové kyseliny**

(57) Anotace:
Způsob přípravy klíčového intermediátu vzorce 2 (disilylovaného derivátu) a enonů vzorce 3 (směs E/Z isomerů) pro syntézu farmaceuticky aktivní látky-kyseliny obeticholové zahrnuje reakci sloučeniny vzorce 8, kde R₁ je C1 až C4 lineární nebo větvený alkyl, s trimethylsilyl jodidem v přítomnosti báze a směsi polárního aprotického a nepolárního rozpouštědla pod inertní atmosférou při teplotě v rozmezí od 40 °C do 70 °C. Způsob přípravy enonů vzorce 3 dále zahrnuje reakci sloučeniny vzorce 2 s alkylačním činidlem v přítomnosti Lewisovy kyseliny v dichlormethanu, následovanou zpracováním s vodným roztokem kyseliny nebo báze.

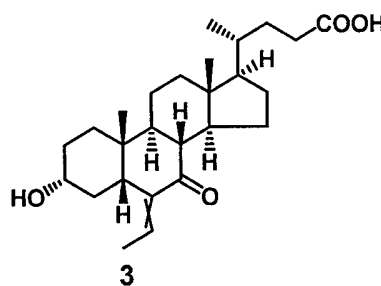
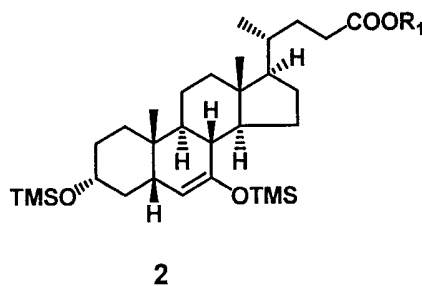
Způsoby přípravy intermediátů pro syntézu Obeticholové kyseliny

Oblast techniky

Vynález se týká nového způsobu přípravy klíčových intermediátů pro syntézu farmaceuticky aktivní látky - kyseliny obeticholové vzorce **1** (dále jen jako OCA, R. Pellicciari a kol *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3569). OCA je vysoce účinný a selektivní agonista farnesoidního X receptoru a je vyvíjena pro léčbu primární biliární cirhózy a nealkoholické steatohepatitidy.



Vynález se konkrétně týká nového způsobu přípravy klíčových intermediátů, jmenovitě disilylovaného derivátu vzorce **2** (kde R_1 je C1 až C4 lineární nebo větvený alkyl) a enonů vzorce **3** (směs E/Z isomerů).



Dosavadní stav techniky

Příhláška základního patentu WO2002072598 popisuje syntézu (Schéma 1) vycházející z ketolitocholové kyseliny **4**, která je převedena na tetrahydropyranylový derivát **5**. Následuje enolisace za extrémně nízkých teplot (méně než -70°C) a alkylace ethyl bromidem v přítomnosti toxického hexamethyl-fosforamidu (HMPA). Hlavními nevýhodami této syntézy jsou nízké výtěžky a nutnost izolace produktů pomocí kolonové chromatografie.

28.05.18

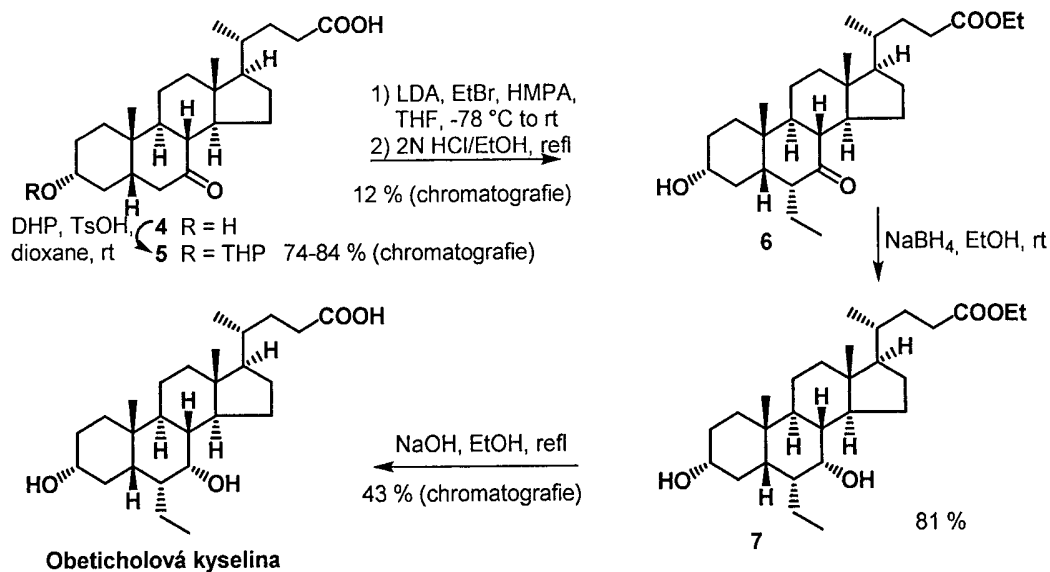


Schéma 1

První procesní patentová přihláška WO2006122977 připravuje disilylovaný intermediát **2** ve dvou oddělených reakcích a pak ho *in situ* převádí na enolát, který reaguje s acetaldehydem. Produkt této aldolové reakce pak podléhá dehydrataci a po saponifikaci methyl esteru je izolován krystalický enon **3** (převážně (*E*)-isomer). Hydrogenace dvojné vazby poskytne C6β ethyl keton **9**, který je isomerizován na žádaný α isomer **10**. V posledním kroku je pak keton zredukován na příslušný alkohol **1** (Schéma 2).

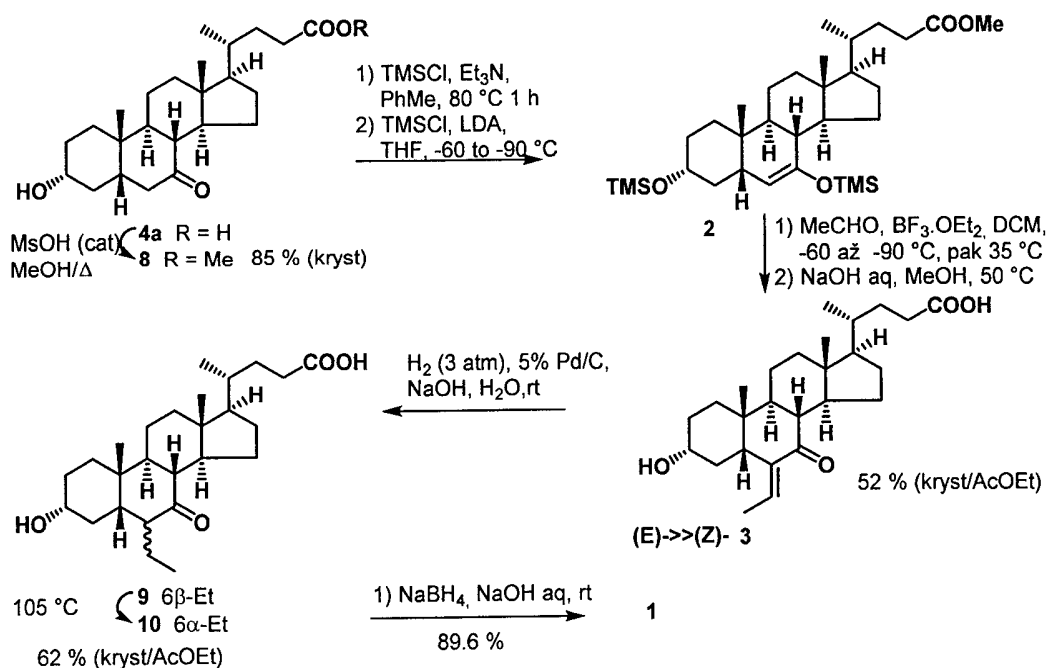


Schéma 2

Následující patentová přihláška WO2013192097 je procesním vylepšením technologie přihlášky základního patentu WO2006122977.

Hlavním zlepšením je spojení dvou krokové silylace a enolisace do jednoho kroku za použití přebytku silné báze (lithium diisopropylamid – LDA) a chlorotrimethylsilanu (TMSCl) za nízké teploty -25 °C.

Zbytek syntézy následuje dle WO2006122977 s drobnými úpravami typu změny použitého rozpouštědla, změny vodného zpracování a podobně s pozitivním dopadem na čistotu produktu.

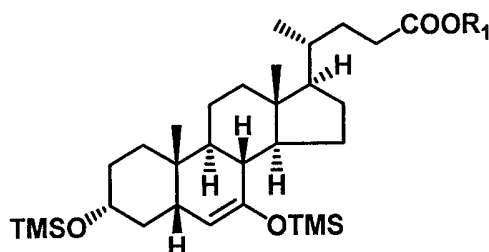
Jako prekursor ethylové skupiny je opět použit acetaldehyd, který má extrémně nízký bod varu při atmosférickém tlaku (20 °C) a je tedy nutné ho používat silně podchlazený. Manipulace s ním ve větším měřítku tedy představuje jisté riziko.

Podstata vynálezu

Byly vyvinuty průmyslově využitelné způsoby přípravy intermediátů **2** a **3**. Způsob pro přípravu bis(trimethylsilyl) derivátu **2** využívá trimethylsilyl jodidu (TMSI), s výhodou *in situ* generovaného, který v kombinaci s bází při výhodné reakční teplotě (40 až 70 °C) vede k intermediátu **2** ve vysokém výtěžku a čistotě.

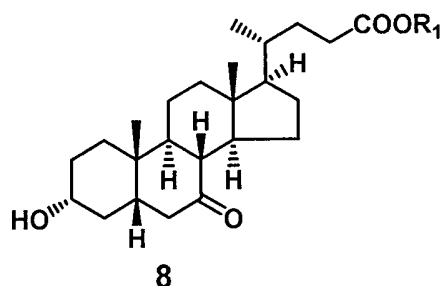
Intermediát **2** je pak využit k reakci s 1,1-dimethoxyethanem, 1,1-diethoxyethanem nebo 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxanem v přítomnosti Lewisovy kyseliny při zvýšených reakčních teplotách (-70 až 25 °C) za vzniku intermediátu **3** v dobrých výtěžcích a čistotě. Poměr *Z>>E* isomerů enonů **3** lze s výhodou obrátit isomerizací za alkalických nebo kyselých podmínek. Intermediát **3** se s výhodou izoluje ve formě soli s aminy.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy intermediátu vzorce **2**,



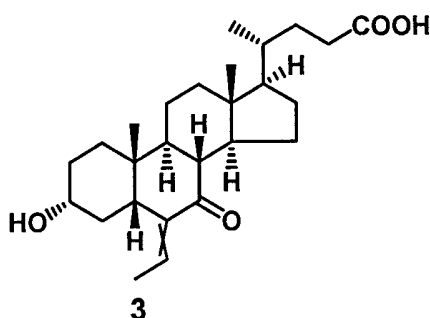
2

reakcí sloučeniny vzorce **8**,

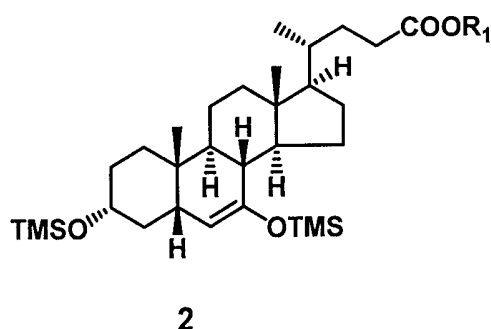


kde R_1 je C1 až C4 lineární nebo větvený alkyl, s trimethylsilyl jodidem v přítomnosti báze a směsi polárního aprotického a nepolárního rozpouštědla pod inertní atmosférou při teplotě v rozmezí od 40 °C do 70 °C. V některých provedeních je trimethylsilyl jodid generován in situ ze směsi jodidu sodného a trimethylsilyl chloridu. V některých provedeních je báze vybraná ze skupiny, kterou tvoří triethylamin, diisopropylethyl amin a tri-*n*-butylamin. V některých provedeních je polární aprotické rozpouštědlo vybráno ze skupiny, kterou tvoří acetonitril, *N,N*-dimethylformamid, dichloromethan a 1,2-dichloroethan. V některých provedeních je nepolární rozpouštědlo vybráno ze skupiny, kterou tvoří toluen, xyleny, heptan a hexan. Ve výhodném provedení je polárním aprotickým rozpouštědlem acetonitril a nepolárním rozpouštědlem toluen. V některých provedeních reakce probíhá při teplotě v rozmezí 40 až 50 °C.

Dalším předmětem vynálezu je způsob přípravy směsi enonů vzorce 3



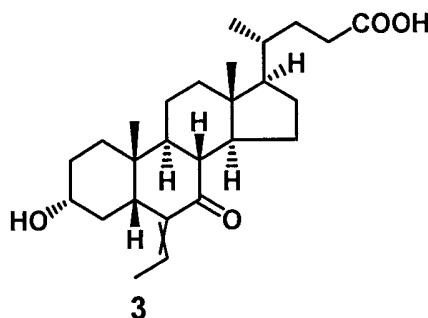
reakcí sloučeniny vzorce 2



s alkylačním činidlem vybraným ze skupiny, kterou tvoří 1,1-dimethoxyethan, 1,1-diethoxyethan a 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxan, v přítomnosti Lewisovy kyseliny

vybrané ze skupiny, kterou tvoří $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, $\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{CN}$ a TiCl_4 v dichlormethanu, přičemž reakce probíhá při teplotě v rozmezí od -70°C do 25°C , následovanou zpracováním s vodným roztokem kyseliny nebo báze. Ve výhodném provedení je alkylačním činidlem 1,1-dimethoxyethan a Lewisovou kyselinou $\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{CN}$.

Dalším předmětem vynálezu je způsob isomerizace směsi enonů vzorce **3**



s převažujícím zastoupením (*Z*)-isomeru na směs s převažujícím zastoupením (*E*)-isomeru, zahrnující zpracování směsi pomocí silné kyseliny nebo báze v alkoholickém nebo vodně alkoholickém roztoku při teplotě v rozmezí od 0 do 60°C . V některých provedeních je kyselinou kyselina chlorovodíková a alkoholem je methanol. V některých provedeních je bází hydroxid sodný nebo draselný a vodně alkoholickým roztokem je vodný methanol. V některých provedeních je bází ethoxid nebo methoxid sodný v alkoholickém roztoku ethanolu nebo methanolu.

Dalším předmětem vynálezu je způsob izolace a čištění enonu **3**, kdy je enon **3** převeden na krystalickou sůl s organickou bází. V některých provedeních je organická báze vybrána ze skupiny, kterou tvoří *i*-isopropylamin, *t*-butylamin, cyklopentylamin a cyklohexylamin. S výhodou je organickou bází *t*-butylamin.

Dalším předmětem vynálezu je krystalická sůl enonu **3** s *t*-butylaminem, *i*-isopropylaminem, cyklopentylaminem a/nebo cyklohexylaminem.

Detailní popis vynálezu

Předchozí stav techniky přípravy intermediátu **2** využíval buď dvoukrokovou metodu postupné silylace a enolisace s rozsahem reakčních teplot od 80°C do -70°C (WO2006122977) nebo jednokrokové reakce s přebytkem silné báze (LDA) a trimethylsilyl chloridu za nízkých teplot kolem -25°C (WO2013192097).

V literatuře (Arendt, M. J. *Prakt. Chem.* **1998**, 340, 760-763) je popisován systém pro generaci vysoce reaktivního trimethylsilyl jodidu reakcí jodidu sodného s trimethylsilylchloridem ve směsi toluenu a acetonitrilu při teplotě 50 °C. Tato kombinace činidel byla již s úspěchem vyzkoušena na steroidních substrátech s volnou karboxylovou skupinou (Königsberger, K. a kol *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, 6, 665-669) pro přípravu trimethylsilyl enoletherů.

Dle známých postupů byly připraveny různé estery (například methyl, ethyl) ketolitocholové kyseliny **4** a byla vyzkoušena jejich reakce s trimethylsilyl jodidem ve směsi polárního aprotického (například acetonitril, *N,N*-dimethylformamid, dichloromethan, 1,2-dichloroethan) a nepolárního rozpouštědla (například toluen, xyleny, heptan, hexan) za zvýšené teploty (40 až 70 °C) v přítomnosti vhodné báze (například triethylamin, diisopropylethyl amin, tri-*n*-butylamin) pod inertní atmosférou. Trimethylsilyl jodid byl s výhodou generován *in situ* směsí činidel popsaných výše. Tato kombinace činidel v našem případě hladce převedla estery ketolitocholové kyseliny **8** na příslušné bisTMS (bis(trimethylsilyl)) deriváty **2**, překvapivě se zachováním esterové skupiny. Výhodou tohoto způsobu je jeho jednoduchost a nenáročnost na chlazení.

S cílem jednak zvýšit teplotu následujícího reakčního kroku a také vyhnout se používání nízkovroucího a potenciálně toxického acetaldehydu a usnadnit tak průmyslovou výrobu intermediátu **3** byly vyzkoušeny 1,1-dimethoxyethan, 1,1-diethoxyethan a 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxan jako alkylační činidla (Schéma 3). Reakce bisTMS derivátů **2** s výše zmíněnými činidly v přítomnosti vhodné Lewisovy kyseliny vybrané ze skupiny, kterou tvoří diethyletherát fluoridu boritého ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$), komplex fluorid boritý/acetonitril ($\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{CN}$) a chlorid titaničitý (TiCl_4) v dichlormethanu při teplotách v rozmezí od -70 °C do 25 °C, následovanou zpracováním s vodným roztokem kyseliny nebo báze poskytly žádaný produkt – enon **3** jako směs *E/Z* isomerů.

Bylo překvapivě zjištěno, že tato činidla umožňují provádět reakci se srovnatelnými výsledky jako u acetaldehydu, a to i při daleko vyšších (-30 – 25 °C) a tedy technologicky výhodnějších reakčních teplotách.

Dále bylo překvapivě zjištěno, že v produktu je hlavním isomerem enonu **3** na dvojné vazbě (*Z*)-isomer na rozdíl od technologie předchozích patentových přihlášek WO2006122977 a WO2013192097, kde převažuje (*E*)-isomer.

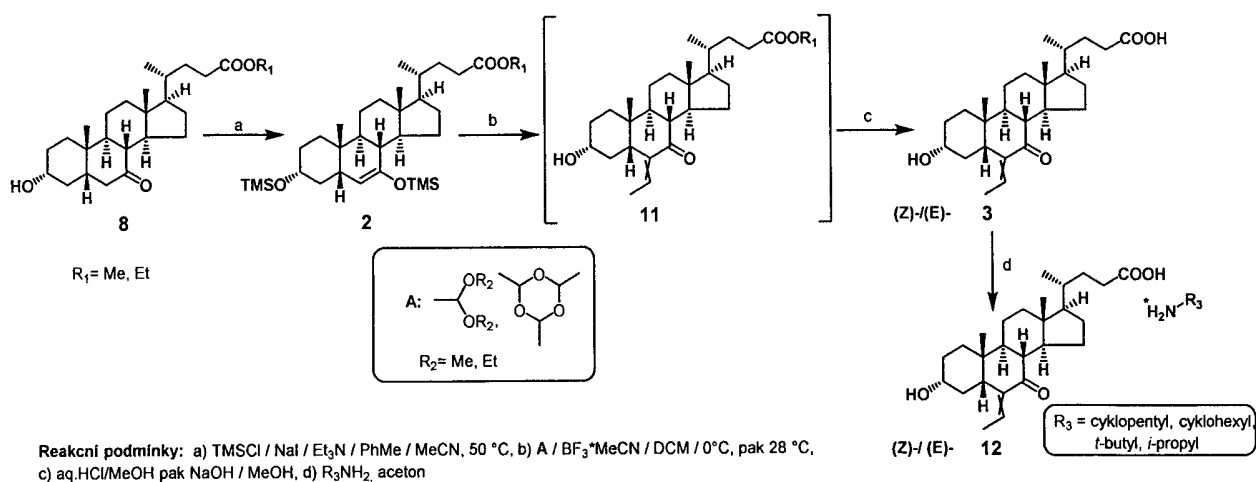


Schéma 3

Dále byla zkoumána také stabilita obou isomerů enonu **3**. Oba isomery podléhají při zahřátí ve vodném hydroxidu sodném (podmínky používané ve WO2006122977 a WO2013192097 při hydrogenaci v dalším kroku) rozkladu zpět na výchozí látku, přičemž (*Z*)-isomer je reaktivnější než (*E*)-isomer.

Bylo také zjištěno, že (*Z*)-isomer enonu **3** lze s výhodou isomerizovat buď za kontrolovaných kyselých (roztoky kyseliny chlorovodíkové) nebo alkalických (roztoky hydroxidu sodného nebo draselného, roztoky ethoxidu nebo methoxidu sodného) podmínek na lépe krystalující (*E*)-isomer. Vhodnými rozpouštědly pro isomerizace jsou nižší alkoholy (methanol, ethanol), voda a jejich směsi při reakčních teplotách od 0 do 60 °C.

Dalším podstatným zlepšením bylo nalezení krystalických solí enonů **3** s primárními aminy jako jsou *i*-isopropylamin, *t*-butylamin, cyklopentylamin a cyklohexylamin.

Tyto krystalické soli **12** umožňují získat žádaný produkt **3** ve vysoké čistotě a také ve větším výtěžku než ze způsobu s izolací volné kyseliny **3**. Z hlediska výtěžku a čistoty produktu je zejména výhodná sůl kyseliny **3** s *t*-butylaminem.

Příklady provedení**Příklad 1**

Methyl (3 α ,5 β)-3,7-bis[(trimethylsilyl)oxy]chol-6-en-24-oát vzorce 2

Reakce byla provedena v předsušené aparatuře za striktně bezvodých podmínek v dusíkové atmosféře. Do baňky byl předložen jodid sodný (4,14 g; 27,6 mmol; 5,5 ekv.) a přilít toluen (5 ml) a acetonitril (5 ml). Do vzniklé suspenze byl za míchání během 10 min přikapán TMSCl (3,18 ml; 25,1 mmol; 5 ekv.) a reakční směs byla míchána jednu hodinu při laboratorní teplotě (ca. 22 °C). Methylester 8 (2,03 g; 5,02 mmol) byl rozpuštěn v toluenu (5 ml) a acetonitrilu (5 ml) a přidán Et₃N (4,2 ml; 30,12 mmol; 6 ekv.). Roztok methylesteru 8 byl kanylou přetlačen do roztoku TMSI a reakční směs byla zahřívána 5 hodin při teplotě 50 °C. Poté byla reakční směs ochlazená na 10 °C a nalita do roztoku monohydrátu kyseliny citronové (2 g) ve vodě (21 ml) vychlazeném na 10 °C. Vzniklá směs byla míchána 10 minut. Vodná fáze byla oddělena a odstraněna. Do organické fáze byla přidána voda (10 ml), směs byla míchána 10 minut a vodná fáze byla oddělena a odstraněna. Rozpouštědla byla oddestilována při 50-60 °C a 300 hPa. Získaný intermediát 2 byl bez dalšího čištění použit pro další krok. Čistota a identita intermediátu 2 byla ověřena pomocí ¹H NMR spektroskopie.

Příklad 2

Methyl (3 α ,5 β)-3,7-bis[(trimethylsilyl)oxy]chol-6-en-24-oát vzorce 2

Reakce byla provedena v předsušené aparatuře za striktně bezvodých podmínek v dusíkové atmosféře. Do reaktoru o obsahu 2l byl předložen methylester 8 (150 g; 371 mmol), přilít toluen (350 ml) a roztok zahřát na teplotu 50-60 °C a za sníženého tlaku (300 hPa) oddestilován toluen (190 ml). Do reakční směsi byl přidán acetonitril (150 ml), jodid sodný (150 g; 371 mmol), přilít Et₃N (62 ml; 444,9 mmol; 6 ekv.), a během 10 min přikapán TMSCl (47 ml; 370,8 mmol; 5 ekv.). Reakční směs byla zahřívána 3,5 hodiny při teplotě 50 °C. Poté byla reakční směs ochlazená na 10 °C a vypuštěna. Do reaktoru byl nalit roztok monohydrátu kyseliny citronové (15,44 g; 73,5 mmol; 0,99 ekv.) ve vodě (300 ml) a vychlazen na 10 °C. Reakční směs byla nalita do vychlazeného roztoku kyseliny citronové a vzniklá směs byla míchána 10 minut. Vodná fáze byla oddělena a odstraněna. Do organické fáze byla přidána voda (80 ml), směs byla míchána 10 minut

a vodná fáze byla oddělena a odstraněna. Rozpouštědla byla oddestilována při 50-60 °C a 300 hPa. Získaný intermediát **2** byl bez dalšího čištění použit pro další krok. Čistota a identita intermediátu **2** byla ověřena pomocí ^1H NMR spektroskopie.

Příklad 3

(3 α ,5 β)-6-Ethyliden-3-hydroxy-7-oxocholan-24-ová kyselina vzorce **3**

Reakce byla provedena v předsušené aparatuře za striktně bezvodých podmínek v dusíkové atmosféře. Do reaktoru o obsahu 1l byl předložen dichlormethan (176 ml) a roztok byl vychlazen na teplotu -30 °C. Do roztoku byl přidán $\text{BF}_3 \cdot \text{MeCN}$ (145 ml; 185,35 mmol; 2,5 ekv.; 16% roztok). Poté byl při -30 °C přidán během pěti minut roztok intermediátu **2** (40,7 g; 74,14 mmol; 1 ekv.) a 1,1-dimethoxyethanu (23,5 ml; 222,4 mmol; 3 ekv.) v dichlormethanu (50 ml) vychlazený na -30 °C. Reakční směs byla míchána dvě hodiny při -30 °C a potom byla během jedné hodiny ohřáta na laboratorní teplotu a míchána další dvě hodiny při laboratorní teplotě. Potom byla reakční směs ochlazená na 10 °C a vypuštěna z reaktoru. Do reaktoru byl předložen roztok NaOH (7,57 g; 189,25 mmol; 2,55 ekv.) ve vodě (170 ml) a vychlazen na 10 °C. Reakční směs byla nalita do roztoku NaOH a míchána 10 minut. Poté byla oddělena a odstraněna vodná fáze a organická fáze byla navracena do reaktoru. Organická rozpouštědla byla odpařena při 55 °C a 800 hPa. Odparek byl ochlazen na 20 °C a suspendován v MeOH (50 ml). Do reakční směsi byl přilít roztok NaOH (5,09 g; 127,25 mmol; 1,72 ekv.) ve vodě (14 ml). Reakční směs byla zahřáta na 50 °C a míchána při této teplotě tři hodiny. Poté byla reakční směs ochlazená na 20 °C, zředěna vodou (112 ml) a byl přidán ethyl acetát (174 ml). Během pěti minut byl za míchání do reakční směsi přidán roztok monohydrátu kyseliny citronové (30,20 g; 144 mmol; 1,94 ekv.) ve vodě (60 ml). Reakční směs byla míchána 10 minut. Vodná fáze byla oddělena a odstraněna. Reakční směs byla zahuštěna destilací při 50-60 °C a 500 hPa. Po ochlazení na 20 °C byla krystalizována za míchání přes noc. Krystaly produktu byly přefiltrovány a promyty ethyl acetátem (50 ml) a sušeny při 50 °C/180 hPa. Bylo získáno 10,7 g (35%) nažloutlých krystalů, HPLC: (**Z**)-**3** – 80,70%, (**E**)-**3** – 15,34%.

Příklad 4**(3 α ,5 β)-6-Ethyliden-3-hydroxy-7-oxocholan-24-ová kyselina vzorce 3**

Reakce byla provedena v předsušené aparatuře za striktně bezvodých podmínek v dusíkové atmosféře. Do baňky byl předložen dichlormethan (9,0 ml) a roztok byl vychlazen na teplotu 0 °C. Do roztoku byl přidán BF₃*MeCN (7,58 ml; 9,53 mmol; 2,5 ekv.; 16% roztok). Poté byl při 0 °C přidán během pěti minut roztok intermediátu **2** (2,09 g; 3,81 mmol; 1 ekv.) a 1,1-dimethoxyethanu (1,21 ml; 11,42 mmol; 3 ekv.) v dichlormethanu (2,5 ml) vychlazený na 0 °C. Reakční směs byla míchána dvě hodiny při 0 °C a potom byla během jedné hodiny ohřata na RT a míchána další dvě hodiny při RT. Potom byla reakční směs ochlazena na 10 °C, nalita do roztoku NaOH (252 mg) ve vodě (8,38 ml) vychlazeném na 10 °C a míchána deset minut. Poté byla oddělena a odstraněna vodná fáze. Organická rozpouštědla byla odpařena při 55 °C a 800 mbar. Odparek reakční směsi byl suspendován v MeOH (4,2 ml). Do reakční směsi byl přilít roztok NaOH (362 mg) ve vodě (1,1 ml). Reakční směs byla zahřata na 50 °C a míchána při této teplotě po dobu tří hodin. Poté byla reakční směs ochlazena na 20 °C, zředěna vodou (10 ml) a byl přidán ethyl acetát (10 ml). Do reakční směsi byla přidána 85% hm. kyselina fosforečná (0,5 ml) a reakční směs byla míchána 10 minut. Vodná fáze byla oddělena a odstraněna. Reakční směs byla odpařena do sucha. Bylo získáno 0,8 g (50%) žluto-hnědé pěny, HPLC: **(Z)-3** – 52,77%, **(E)-3** – 13,47%.

Příklad 5**(3 α ,5 β)-6-Ethyliden-3-hydroxy-7-oxocholan-24-ová kyselina vzorce 3**

Reakce byla provedena v předsušené aparatuře za striktně bezvodých podmínek v dusíkové atmosféře. Do baňky byl předložen dichlormethan (4,25 ml) a roztok byl vychlazen na teplotu -60 °C. Do roztoku byl přidán BF₃.MeCN (3,5 ml; 4,55 mmol; 2,5 ekv.; 16% hm. roztok). Poté byl při -60 °C přidán během pěti minut roztok intermediátu **2** (1,00 g; 1,82 mmol; 1 ekv.) a 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxanu (0,484 ml; 3,64 mmol; 2 ekv.) v dichlormethanu (1,2 ml) vychlazený na -60 °C. Reakční směs byla míchána dvě hodiny při -60 °C a potom byla během jedné hodiny ohřata na laboratorní teplotu a míchána další dvě hodiny při laboratorní teplotě. Potom byla reakční směs ochlazena na 10 °C, nalita do roztoku NaOH (120 mg) ve vodě (4,00 ml) vychlazeném na 10 °C a míchána deset minut. Poté byla oddělena a odstraněna vodná fáze. Organická

rozpouštědla byla odpařena při 55 °C a 800 hPa. Odparek reakční směsi byl suspendován v MeOH (2,0 ml). Do reakční směsi byl přilít roztok NaOH (165 mg) ve vodě (0,5 ml). Reakční směs byla zahřáta na 50 °C a míchána při této teplotě po dobu tří hodin. Poté byla reakční směs ochlazena na 20 °C, zředěna vodou (10 ml) a byl přidán ethyl acetát (10 ml). Do reakční směsi byla přidána 85% hm. kyselina fosforečná (0,25 ml) a reakční směs byla míchána 10 minut. Vodná fáze byla oddělena a odstraněna. Reakční směs byla odpařena do sucha. Bylo získáno 0,31 g (41%) žlutohnědé pěny, HPLC: (**Z**)-**3** – 24,02%, (**E**)-**3** – 43,67%.

Příklad 6

(3 α ,5 β)-6-Ethyliden-3-hydroxy-7-oxocholan-24-ová kyselina vzorce **3**

Reakce byla provedena v předsušené aparatuře za striktně bezvodých podmínek v dusíkové atmosféře. Do baňky byl předložen dichlormethan (13,0 ml) a roztok byl vychlazen na teplotu 0 °C. Do roztoku byl přidán BF₃*MeCN (10,69 ml; 13,66 mmol; 2,5 ekv.; 16% hm. roztok). Poté byl při 0 °C přidán během pěti minut roztok intermediátu **2** (3,00 g; 5,47 mmol; 1 ekv.) a 1,1-dimethoxyethanu (1,73 ml; 16,40 mmol; 3 ekv.) v dichlormethanu (3,7 ml) vychlazený na 0 °C. Reakční směs byla míchána dvě hodiny při 0 °C a potom byla během jedné hodiny ohřáta na laboratorní teplotu a míchána další dvě hodiny při laboratorní teplotě. Potom byla reakční směs ochlazena na 10 °C, nalita do roztoku NaOH (360 mg) ve vodě (12 ml) vychlazeného na 10 °C a míchána deset minut. Poté byla oddělena a odstraněna vodná fáze. Organická rozpouštědla byla odpařena při 55 °C a 800 hPa. Odparek reakční směsi byl suspendován v MeOH (10 ml). Do reakční směsi byla přilita 35% hm. HCl (2 ml) a voda (1 ml). Reakční směs byla zahřáta na 50 °C a míchána při této teplotě šest hodin. Poté byla reakční směs ochlazena na 20 °C, zředěna vodou (10 ml) a byl přidán ethyl acetát (10 ml). Vodná fáze byla odstraněna. Reakční směs byla odpařena do sucha. Odparek byl suspendován v methanolu (6,0 ml). Do reakční směsi byl přilít roztok NaOH (520 mg) ve vodě (1,6 ml). Reakční směs byla zahřáta na 50 °C a míchána při této teplotě po dobu tří hodin. Poté byla reakční směs ochlazena na 20 °C, zředěna vodou (20 ml) a byl přidán ethyl acetát (10 ml). Do reakční směsi byla přidána 85% hm. kyselina fosforečná (0,5 ml) a reakční směs byla míchána 10 minut. Vodná fáze byla oddělena a odstraněna. Reakční směs byla odpařena do sucha. Bylo získáno 2,28 g (75%) žlutohnědé pěny, HPLC: (**Z**)-**3** – 20,86%, (**E**)-**3** – 61,35%.

Příklad 7

(3 α ,5 β)-6-Ethyliden-3-hydroxy-7-oxocholan-24-ová kyselina vzorce **3**

Pro reakci byl použit intermediát **3** (0,1 g; 0,24 mmol) o složení podle HPLC: (**E**)-**3**-22%, (**Z**)-**3**-71%. Výchozí materiál byl rozpuštěn v methanolu (1 ml) a byla přidána kyselina chlorovodíková (0,5 ml; 1M roztok ve vodě). Reakční směs byla zahřívána při 50 °C po dobu 19 hodin. Po ochlazení reakční směsi na 20 °C byla přidána voda (5 ml) a produkt byl extrahován do ethyl acetátu (5 ml). Organická fáze byla oddělena a odpařena do sucha. Analýza vzniklé směsi pomocí ¹H NMR určila poměr (**E**)-**3**-72%, (**Z**)-**3**-18%.

Příklad 8

(3 α ,5 β)-6-Ethyliden-3-hydroxy-7-oxocholan-24-ová kyselina vzorce **3**

Isolovaný enon **3** ((**E**)-:(**Z**)- 19 : 81; 0,017 g; 0,041 mmol) byl suspendován v 50% hm. vodném hydroxidu sodném (1 ml) a byl přidán ethanol (1 kapka). Směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 24 h. Po úpravě na pH~1 přidavkem 35% hm. kyseliny chlorovodíkové byl produkt extrahován do dichlormethanu (10 ml celkem), organika byla promyta vodou a odpařena. Analýza pomocí ¹H NMR určila poměr ((**E**)-:(**Z**)- 78 : 22), indikující účinnou isomerizaci (**Z**)-enonu na (**E**)-enon s pouze stopami ketolitocholové kyseliny **4a**.

Příklad 9

Test stability (3 α ,5 β)-6-Ethyliden-3-hydroxy-7-oxocholan-24-ové kyseliny

Isolovaný enon **3** ((**E**)-:(**Z**)- 19 : 81; 0,017 g; 0,041 mmol) byl suspendován v 50% hm. vodném hydroxidu sodném (1 ml) a byl přidán ethanol (1 kapka). Směs byla míchána za zahřívání v olejové lázni při 90 °C po dobu 24 h. Po úpravě na pH ~1 přidavkem 35% kyseliny chlorovodíkové byl produkt extrahován do dichlormethanu (10 ml celkem), organika byla promyta vodou a odpařena. Analýza pomocí ¹H NMR ukázala, že došlo k úplnému rozkladu enonů **3** na ketolitocholovou kyselinu **4a**.

Příklad 10

t-Butyl amoniová sůl (3 α ,5 β)-6-ethyliden-3-hydroxy-7-oxocholan-24-ové kyseliny vzorce **12**

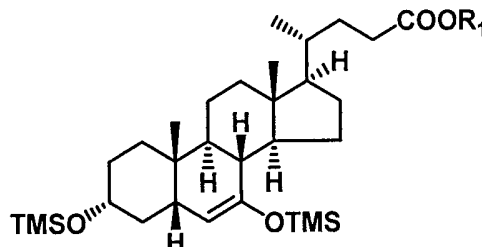
Reakce byla provedena v předsušené aparatuře za striktně bezvodých podmínek v dusíkové atmosféře. Do reaktoru o obsahu 25 l byl předložen dichlormethan (2500 ml) a roztok byl vychlazen na teplotu -30 °C. Do roztoku byl přidán BF₃·MeCN (2060 ml; 2,66 mol; 2,5 ekv.; 16% roztok). Poté byl při -30 °C přidán během pěti minut roztok intermediátu **2** (583,4 g; 1,06 mol; 1 ekv.) a 1,1-dimethoxyethanu (337 ml; 3,19 mol; 3 ekv.) v dichlormethanu (720 ml) vychlazený na -30 °C. Reakční směs byla míchána dvě hodiny při -30 °C a potom byla během jedné hodiny ohřáta na teplotu 25 °C a míchána další dvě hodiny při teplotě 25 °C. Poté byla reakční směs ochlazena na 10 °C a přečerpána k předem ochlazenému (10 °C) vodnému roztoku NaOH (108,4 g; 2,71 mol; 2,55 ekv. NaOH ve vodě 2400 ml) v reaktoru o objemu 15l. Vzniklá emulze byla míchána po dobu 15 minut, poté byla oddělena a odstraněna vodná fáze a organická fáze byla navracena do reaktoru.

Organická rozpouštědla byla odpařena při 55 °C a 800 hPa. Odparek byl suspendován v MeOH (860 ml). K vzniklému roztoku byl přilít roztok kyseliny chlorovodíkové (265 ml 36% HCl; 3,29 mol; 3 ekv) ve vodě (170 ml). Vzniklá reakční směs byla ohřáta na 50 °C a míchána po dobu 1,5 h. Následně byla reakční směs ochlazena na teplotu 40 °C. Do reakční směsi byl přilít roztok NaOH (208 g; 5,21 mol; 4,9 ekv.) ve vodě (465 ml). Reakční směs byla zahřáta na 50 °C a míchána při této teplotě dvě hodiny. Poté byla reakční směs ochlazena na 20 °C, zředěna vodou (1700 ml) a toluenem (2500 ml). Vrstvy byly odděleny a k vodné vrstvě byl přilít isopropyl acetát (3000 ml). Během pěti minut byl za míchání do reakční směsi přidán roztok kyseliny citronové (430 g; 2,23 mol; 2,1 ekv.) ve vodě (860 ml).

Reakční směs byla míchána 10 minut. Vodná fáze byla oddělena a odstraněna. Reakční směs byla zředěna acetonem (1300 ml) a ohřáta na teplotu 40 °C. Během 10 minut byl přidán *t*-butyl amin (134 ml; 1,28 mol; 1,2 ekv) při teplotě 40 °C. Vzniklá suspenze byla ochlazena na teplotu 10 °C a krystalizována za míchání po dobu 1 hodiny. Krystaly produktu byly přefiltrovány a promyty acetonem (750 ml) a sušeny při 40 °C a 180 hPa. Bylo získáno 311 g (60 %) žlutooranžových krystalů ammoniové soli **12** HPLC: (*E*)-**3** – 79,92%, (*Z*)-**3** – 13,68%.

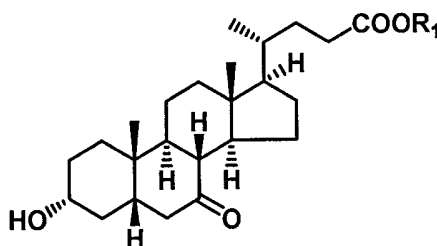
Patentové nároky

1. Způsob přípravy intermediátu vzorce 2,



2

vyznačující se tím, že zahrnuje reakci sloučeniny vzorce 8,

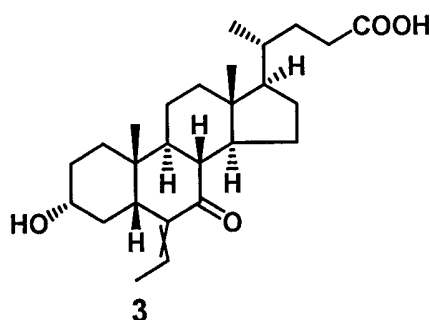


8

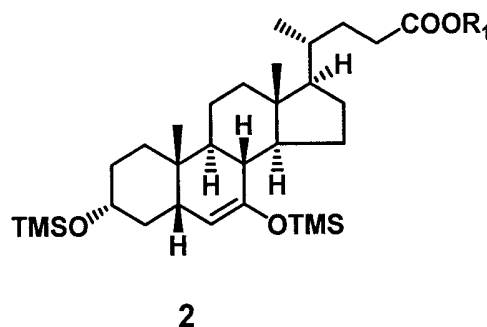
kde R_1 je C1 až C4 lineární nebo větvený alkyl, s trimethylsilyl jodidem v přítomnosti báze a směsi polárního aprotického a nepolárního rozpouštědla pod inertní atmosférou při teplotě v rozmezí od 40 °C do 70 °C.

2. Způsob přípravy podle nároku 1, vyznačující se tím, že trimethylsilyl jodid je generován in situ ze směsi jodidu sodného a trimethylsilyl chloridu.
3. Způsob přípravy podle nároku 1, vyznačující se tím, že báze je vybraná ze skupiny, kterou tvoří triethylamin, diisopropylethyl amin a tri-*n*-butylamin.
4. Způsob přípravy podle nároku 1, vyznačující se tím, že polární aprotické rozpouštědlo je vybráno ze skupiny, kterou tvoří acetonitril, *N,N*-dimethylformamid, dichloromethan a 1,2-dichloroethan.
5. Způsob přípravy podle nároku 1, vyznačující se tím, že nepolární rozpouštědlo je vybráno ze skupiny, kterou tvoří toluen, xyleny, heptan a hexan.

6. Způsob přípravy podle nároků 4 a 5, vyznačující se tím, že polární aprotické rozpouštědlo je acetonitril a nepolární rozpouštědlo je toluen.
7. Způsob přípravy podle nároku 1, vyznačující se tím, že reakce probíhá při teplotě v rozmezí 40 až 50 °C.
8. Způsob přípravy směsi enonů vzorce 3

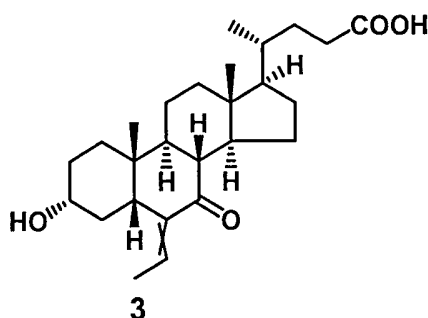


vyznačující se tím, že zahrnuje reakci sloučeniny vzorce 2



s alkylačním činidlem vybraným ze skupiny, kterou tvoří 1,1-dimethoxyethan, 1,1-diethoxyethan a 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxan, v přítomnosti Lewisovy kyseliny vybrané ze skupiny, kterou tvoří BF₃*Et₂O, BF₃*CH₃CN a TiCl₄ v dichlormethanu, přičemž reakce probíhá při teplotě v rozmezí od -70 °C do 25 °C, následovanou zpracováním s vodným roztokem kyseliny nebo báze.

9. Způsob přípravy podle nároku 8, vyznačující se tím, že alkylačním činidlem je 1,1-dimethoxyethan a Lewisovou kyselinou je BF₃*CH₃CN.
10. Způsob isomerizace směsi enonů vzorce 3



s převažujícím zastoupením (*Z*)-isomeru na směs s převažujícím zastoupením (*E*)-isomeru, vyznačující se tím, že zahrnuje zpracování směsi pomocí silné kyseliny nebo báze v alkoholickém nebo vodně alkoholickém roztoku při teplotě v rozmezí od 0 do 60 °C.

11. Způsob isomerizace podle nároku 10, vyznačující se tím, že kyselinou je kyselina chlorovodíková a alkoholem je methanol.

12. Způsob isomerizace podle nároku 10, vyznačující se tím, že báží je hydroxid sodný nebo draselný a vodně alkoholickým roztokem je vodný methanol.

13. Způsob isomerizace podle nároku 10, vyznačující se tím, že báží je ethoxid nebo methoxid sodný v alkoholickém roztoku ethanolu nebo methanolu.

14. Způsob izolace a čištění enonu **3**, vyznačující se tím, že enon **3** je převeden na krystalickou sůl s organickou báží.

15. Způsob izolace a čištění podle nároku 14, vyznačující se tím, že organická báze je vybrána ze skupiny, kterou tvoří *i*-isopropylamin, *t*-butylamin, cyklopentylamin a cyklohexylamin.

16. Způsob izolace a čištění podle nároku 15, vyznačující se tím, že organickou báží je *t*-butylamin.

17. Krystalická sůl enonu **3** s *t*-butylaminem.