



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111228278 A

(43)申请公布日 2020.06.05

(21)申请号 202010196448.0

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2013.06.17

A61K 31/575(2006.01)

(30)优先权数据

C07J 9/00(2006.01)

61/661531 2012.06.19 US

A61P 1/16(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61P 3/06(2006.01)

201380043964.8 2013.06.17

A61P 31/14(2006.01)

(71)申请人 英特塞普特医药品公司

地址 美国纽约州

(72)发明人 A.施泰纳 H.维纳伦德普尔森

E.乔利博瓦 M.雷沃林斯基

R.格罗斯 E.夏普

F.迪巴斯-费希尔 A.埃伯林

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 高瑜 郑霞

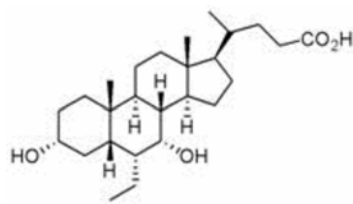
权利要求书1页 说明书68页 附图50页

(54)发明名称

奥贝胆酸的制备、用途和固体形式

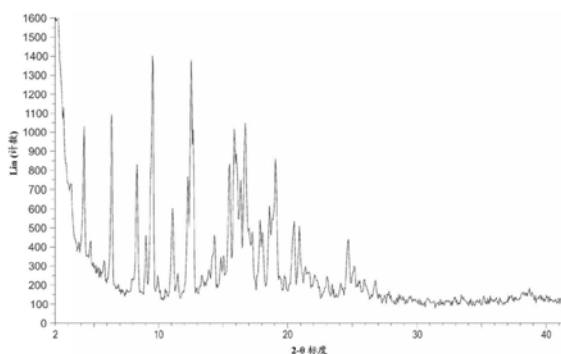
(57)摘要

本申请涉及奥贝胆酸的制备、用途和固体形式。本申请涉及奥贝胆酸：



或其药学上可接受

的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物。奥贝胆酸可用于治疗或预防FXR介导的疾病或病况、心血管疾病或胆汁郁积性肝病,并且可用于降低HDL胆固醇、降低哺乳动物的甘油三酯或抑制纤维变性。本发明还涉及奥贝胆酸的合成方法。



1. 结晶形式的奥贝胆酸在制备用于治疗或预防受试者的FXR介导的疾病或病况的药物中的用途。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述FXR介导的疾病或病况选自胆道闭锁、胆汁郁积性肝病、慢性肝病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、丙型肝炎感染、酒精性肝病、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、进行性纤维变性所致肝损伤、肝纤维变性和心血管疾病。

3. 如权利要求2所述的用途,其中所述心血管疾病选自动脉粥样硬化、动脉硬化、高胆固醇血症和高脂血症。

4. 如权利要求2或3所述的用途,其中所述结晶形式的奥贝胆酸是A型、C型、D型、G型或F型的。

5. 如权利要求4所述的用途,其中所述结晶形式的奥贝胆酸包含小于1%的鹅脱氧胆酸。

6. 如权利要求5所述的用途,其中所述结晶形式的奥贝胆酸包含小于0.5%的鹅脱氧胆酸。

7. 如权利要求6所述的用途,其中所述结晶形式的奥贝胆酸包含不超过0.15%的6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸。

8. 如权利要求7所述的用途,其中所述结晶形式的奥贝胆酸包含不超过0.15%的3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

9. 如权利要求8所述的用途,其中所述结晶形式的奥贝胆酸包含选自6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸和3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸的一种或更多种化合物,其中6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸以在0%和不超过0.05%之间的量存在,鹅脱氧胆酸以在0%和不超过0.2%之间的量存在,且3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸以在0%和不超过0.05%之间的量存在。

10. 如权利要求9所述的用途,其中所述结晶形式的奥贝胆酸是F型的。

## 奥贝胆酸的制备、用途和固体形式

[0001] 本申请是申请日为2013年6月17日,申请号为201380043964.8,发明名称为“奥贝胆酸的制备、用途和固体形式”的申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及奥贝胆酸的制备、用途和固体形式。

### 发明内容

[0003] 本申请涉及如下内容:

[0004] 1.一种结晶奥贝胆酸C型,其特征在于包括在约4.2、6.4、9.5、12.5和16.7°2 $\theta$ 处的特征峰的X射线衍射图。

[0005] 2.一种结晶奥贝胆酸C型,其特征在于基本类似于图5所示的X射线衍射图的X射线衍射图。

[0006] 3.项目1的结晶奥贝胆酸C型,其特征在于包括在约4.2、6.4、9.5、12.5、12.6、15.5、15.8、16.0、16.7和19.0°2 $\theta$ 处的特征峰的X射线衍射图。

[0007] 4.项目1或项目3的结晶奥贝胆酸C型,其特征在于包括在约4.2、6.4、8.3、9.5、11.1、12.2、12.5、12.6、15.5、15.8、16.0、16.3、16.7、18.6和19.0°2 $\theta$ 处的特征峰的X射线衍射图。

[0008] 5.项目1或3-4中任一项的结晶奥贝胆酸C型,其特征在于包括在约4.2、6.4、8.3、9.5、11.1、12.2、12.5、12.6、15.5、15.8、16.0、16.3、16.7、17.0、17.8、18.6、18.8、19.0、20.5和20.9°2 $\theta$ 处的特征峰的X射线衍射图。

[0009] 6.项目1-5中任一项的结晶奥贝胆酸C型,其中所述X射线衍射图使用Cu K $\alpha$ 辐射在衍射计上收集。

[0010] 7.项目1-6中任一项的结晶奥贝胆酸C型,其特征在于包括在约12.0-约12.8和约15.4-约21.0处的特征峰的X射线衍射图。

[0011] 8.一种结晶奥贝胆酸C型,其特征在于在约98 $\pm$ 2°C处具有吸热值的示差扫描量热法(DSC)温谱图。

[0012] 9.项目1-8中任一项的结晶奥贝胆酸C型,其特征还在于在约98 $\pm$ 2°C处具有吸热值的示差扫描量热法(DSC)温谱图。

[0013] 10.一种用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括奥贝胆酸的晶体形式作为合成中间体。

[0014] 11.一种用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。

[0015] 12.项目11的方法,所述方法包括以下步骤

[0016] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和

[0017] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。

[0018] 13.项目11-12中任一项的方法,所述方法包括以下步骤

- [0019] 使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸,
- [0020] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和
- [0021] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。
- [0022] 14. 项目11-13中任一项的方法,所述方法包括以下步骤
- [0023] 使3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与NaOH反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸,
- [0024] 使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸,
- [0025] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和
- [0026] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。
- [0027] 15. 项目11-14中任一项的方法,所述方法包括以下步骤
- [0028] 使3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯与CH<sub>3</sub>CHO反应形成3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯,
- [0029] 使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与NaOH反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸,
- [0030] 使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸,
- [0031] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和
- [0032] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。
- [0033] 16. 项目11-15中任一项的方法,所述方法包括以下步骤
- [0034] 使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与Li[N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]和Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl反应形成3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯,
- [0035] 使3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯,
- [0036] 使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与NaOH反应形成E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸,
- [0037] 使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸,
- [0038] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和
- [0039] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。
- [0040] 17. 项目11-16中任一项的方法,所述方法包括以下步骤
- [0041] 使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与CH<sub>3</sub>OH和H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>反应形成3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯,
- [0042] 使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与Li[N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]和Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl反应形成3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯,
- [0043] 使3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯,
- [0044] 使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与NaOH反应形成E-或E/



Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸,

[0045] 使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸,

[0046] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和

[0047] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。

[0048] 18. 项目10-17中任一项的方法,其中所述结晶奥贝胆酸是C型。

[0049] 19. 项目18的方法,其中结晶奥贝胆酸C型的特征在于类似于图5所示X射线衍射图的X射线衍射图。

[0050] 20. 项目18或19中任一项的方法,其中所述结晶奥贝胆酸C型从乙酸正丁酯结晶出来。

[0051] 21. 项目11-17中任一项的方法,其中将结晶奥贝胆酸C型转化为奥贝胆酸1型包括将结晶奥贝胆酸C型溶于NaOH水溶液中并加入HCl的步骤。

[0052] 22. 项目21的方法,其中将分离的结晶奥贝胆酸C型在约80°C下真空干燥。

[0053] 23. 项目12-17中任一项的方法,其中使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸在约85°C-约110°C的温度下在碱性水溶液中进行。

[0054] 24. 项目23的方法,其中所述温度为约90°C-约105°C。

[0055] 25. 项目23-24中任一项的方法,其中所述碱性水溶液是NaOH水溶液。

[0056] 26. 项目25中任一项的方法,其中所述碱性水溶液是50%wt NaOH溶液和水的混合物。

[0057] 27. 项目13-17中任一项的方法,其中使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸在约20°C-约40°C温度下和在约4-约5巴的压力下进行。

[0058] 28. 项目27的方法,其中反应混合物的有机相用活性碳处理。

[0059] 29. 项目27-28中任一项的方法,其中所述温度为约25°C-约35°C。

[0060] 30. 项目27-29中任一项的方法,其中所述压力为约4.5-约5.5巴。

[0061] 31. 项目27-30中任一项的方法,其中将氢化反应混合物搅拌约1小时。

[0062] 32. 项目27-31中任一项的方法,其中将E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气的反应加热至约100°C,并搅拌约2小时-约5小时。

[0063] 33. 项目27-32中任一项的方法,其中将E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气的反应加热至约100°C,并搅拌约3小时。

[0064] 34. 项目14-17中任一项的方法,其中使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与NaOH反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸在约20°C-约60°C的温度下进行。

[0065] 35. 项目34的方法,其中所述温度为约20°C-约25°C。

[0066] 36. 项目34-35中任一项的方法,其中使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与NaOH的反应在甲醇、水和NaOH溶液中进行。

[0067] 37. 项目34-36中任一项的方法,其中所述NaOH溶液为50%wt水性溶液。

[0068] 38. 项目15-17中任一项的方法,其中使3 $\alpha$ ,7-二甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯在约-50

℃-约-70℃的温度下在BF<sub>3</sub>存在下在极性非质子溶剂中进行。

[0069] 39. 项目38的方法,其中所述极性非质子溶剂是二氯甲烷。

[0070] 40. 项目38-39中任一项的方法,其中所述BF<sub>3</sub>为乙腈中的16%wt溶液。

[0071] 41. 项目38-40中任一项的方法,其中所述温度为约-60℃-约-65℃。

[0072] 42. 项目16-17中任一项的方法,其中使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与Li [N (CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] 和Si (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl反应形成3 $\alpha$ , 7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯在约-10℃-约-30℃的温度下在极性非质子溶剂中进行。

[0073] 43. 项目42的方法,其中所述极性非质子溶剂是四氢呋喃。

[0074] 44. 项目42-43中任一项的方法,其中所述温度为约-20℃-约-25℃。

[0075] 45. 项目42-44中任一项的方法,其中将3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与Li [N (CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] 和Si (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl的反应搅拌约2小时。

[0076] 46. 项目17的方法,其中将3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与CH<sub>3</sub>OH和H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>反应形成3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯加热约3小时,并将反应混合物的pH用碱性水溶液调节至约6.5-约8.0的pH值。

[0077] 47. 项目46的方法,其中所述3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯的分离还包括加入活性碳。

[0078] 48. 项目46-47中任一项的方法,其中3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与CH<sub>3</sub>OH和H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的反应在甲醇中进行。

[0079] 49. 项目46-48中任一项的方法,其中所述碱性溶液是NaOH水溶液。

[0080] 50. 项目46-49中任一项的方法,其中所述pH为约7.0-约7.5。

[0081] 51. 一种通过项目10-50中任一项的方法产生的化合物E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸,其中所述E/Z异构体比率大于约50%、大于约60%、大于约70%、大于约80%、大于约83%、大于约85%、大于约90%、大于约93%、大于约95%或大于约99%。

[0082] 52. 项目51的化合物,其中所述E/Z比率通过HPLC测定。

[0083] 53. 项目51-52中任一项的化合物,其中所述比率大于约80%。

[0084] 54. 项目51-53中任一项的化合物,其中所述比率大于约83%。

[0085] 55. 项目51-54中任一项的化合物,其中所述比率大于约85%。

[0086] 56. 项目51-55中任一项的化合物,其中所述比率大于约90%。

[0087] 57. 项目51-56中任一项的化合物,其中所述比率大于约93%。

[0088] 58. 项目51-57中任一项的化合物,其中所述比率大于约95%。

[0089] 59. 项目51-58中任一项的化合物,其中所述比率大于约99%。

[0090] 60. 奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物,其效能大于约98%。

[0091] 61. 项目60的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸的效能大于约98%。

[0092] 62. 项目60的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸的效能通过减去水、硫酸灰分、残余溶剂和其它有机杂质的量来确定。

[0093] 63. 项目61-62中任一项的奥贝胆酸,其效能大于约98.5%。

[0094] 64. 项目61-63中任一项的奥贝胆酸,其效能大于约99.0%。

[0095] 65. 项目61-64中任一项的奥贝胆酸,其效能大于约99.5%。

[0096] 66. 项目61-65中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有总共小于约2%的一种或多种选自以下的杂质:6-乙基乌索脱氧胆酸、3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-choleto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸、3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、鹅脱氧胆酸和3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

[0097] 67. 项目66的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有总共小于约1.5%的杂质。

[0098] 68. 项目66-67中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸1型含有总共小于约1.4%的杂质。

[0099] 69. 项目66-68中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约1.2%的水。

[0100] 70. 项目66-69中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约1.0%的水。

[0101] 71. 项目66-70中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有总共小于约0.15%的6-乙基乌索脱氧胆酸和3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

[0102] 72. 项目66-71中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有总共小于约0.06%的6-乙基乌索脱氧胆酸和3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

[0103] 73. 项目66-72中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有总共小于约0.05%的6-乙基乌索脱氧胆酸和3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

[0104] 74. 项目66-73中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约0.15%的3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-choleto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

[0105] 75. 项目66-74中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约0.06%的3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-choleto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

[0106] 76. 项目66-75中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约0.05%的3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-choleto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

[0107] 77. 项目66-76中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约0.15%的6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸。

[0108] 78. 项目66-77中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约0.06%的6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸。

[0109] 79. 项目66-78中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约0.05%的6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸。

[0110] 80. 项目66-79中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约3%的鹅脱氧胆酸。

[0111] 81. 项目66-80中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约1%的鹅脱氧胆酸。

[0112] 82. 项目66-81中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约0.2%的鹅脱氧胆酸。

[0113] 83. 项目66-82中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约0.15%的3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

[0114] 84. 项目66-83中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约0.06%的3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

[0115] 85. 项目66-84中任一项的奥贝胆酸,其中所述奥贝胆酸含有小于约0.05%的3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

- [0116] 86. 项目61-85中任一项的奥贝胆酸,其中奥贝胆酸是奥贝胆酸1型。
- [0117] 87. 结晶奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物,其中所述结晶奥贝胆酸是C型。
- [0118] 88. 项目87的结晶奥贝胆酸,其中所述结晶奥贝胆酸的效能大于约90%。
- [0119] 89. 项目88的结晶奥贝胆酸C型,其中所述奥贝胆酸C型的效能通过减去水、硫酸灰分、残余溶剂和其它有机杂质的量来确定。
- [0120] 90. 项目87的结晶奥贝胆酸C型,其中所述溶剂合物是水合物。
- [0121] 91. 项目88-90中任一项的结晶奥贝胆酸C型,其效能大于约92%。
- [0122] 92. 项目88-91中任一项的结晶奥贝胆酸C型,其效能大于约94%。
- [0123] 93. 项目88-92中任一项的结晶奥贝胆酸C型,其效能大于约96%。
- [0124] 94. 项目88-93中任一项的结晶奥贝胆酸C型,其效能大于约98%。
- [0125] 95. 项目88-94中任一项的结晶奥贝胆酸C型,其效能大于约99%。
- [0126] 96. 项目87-95中任一项的结晶奥贝胆酸C型,其中所述结晶奥贝胆酸C型含有总共小于约4%的一种或多种选自以下的杂质:6-乙基乌索脱氧胆酸、3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-choeto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸、3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、鹅脱氧胆酸和3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。
- [0127] 97. 项目96的结晶奥贝胆酸C型,其中所述总杂质小于约3.8%。
- [0128] 98. 项目96-97中任一项的结晶奥贝胆酸C型,其中所述总杂质小于约3.6%。
- [0129] 99. 一种包含通过项目10-50中任一项的方法产生的奥贝胆酸1型和药学上可接受的载体的药物组合物。
- [0130] 100. 一种包含结晶奥贝胆酸和药学上可接受的载体的药物组合物。
- [0131] 101. 项目100的药物组合物,其中所述结晶奥贝胆酸是C型。
- [0132] 102. 一种治疗或预防受试者的FXR介导的疾病或病况的方法,所述方法包括给予有效量的项目60-86中任一项的或通过项目10-50中任一项的方法产生的奥贝胆酸1型或项目99的药物组合物。
- [0133] 103. 一种治疗或预防受试者的FXR介导的疾病或病况的方法,所述方法包括给予有效量的项目1-9或87-98中任一项的结晶奥贝胆酸或项目100-101中任一项的药物组合物。
- [0134] 104. 项目102-103中任一项的方法,其中所述疾病或病况选自胆道闭锁、胆汁郁积性肝病、慢性肝病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、丙型肝炎感染、酒精性肝病、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、进行性纤维变性所致肝损伤、肝纤维变性和心血管疾病包括动脉粥样硬化、动脉硬化、高胆固醇血症和高脂血症。
- [0135] 105. 一种用于降低受试者的甘油三酯的方法,所述方法包括给予有效量的项目60-86中任一项的或通过项目10-50中任一项的方法产生的奥贝胆酸1型或项目99的药物组合物。
- [0136] 106. 一种用于降低受试者的甘油三酯的方法,所述方法包括给予有效量的项目1-9或87-98中任一项的结晶奥贝胆酸或项目100-101中任一项的药物组合物。
- [0137] 本发明涉及奥贝胆酸(obeticholic acid)(一种FXR的激动剂)、奥贝胆酸的制备

方法、包含奥贝胆酸的药物制剂及所述药物制剂的治疗用途。

[0138]



[0139] 本发明涉及特征在于包括在约4.2、6.4、9.5、12.5和16.7°2 $\theta$ 处的特征峰的X射线衍射图的结晶奥贝胆酸C型。结晶奥贝胆酸C型的特征在于基本类似于图5所示X射线衍射图的X射线衍射图,且其特征还在于在约98 $\pm$ 2°C处具有吸热值的示差扫描量热法(DSC)温谱图。

[0140] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型的步骤。

[0141] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸并将结晶奥贝胆酸转化成奥贝胆酸1型的步骤。

[0142] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸;使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸;并将结晶奥贝胆酸转化成奥贝胆酸1型的步骤。

[0143] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与NaOH反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸;使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸;使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,并将结晶奥贝胆酸转化成奥贝胆酸1型的步骤。

[0144] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括使3 $\alpha$ ,7-二甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯;使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与NaOH反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸;使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸;使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,并将结晶奥贝胆酸转化成奥贝胆酸1型的步骤。

[0145] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与Li[N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]和Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl反应形成3 $\alpha$ ,7-二甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯;使3 $\alpha$ ,7-二甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯;使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-

酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与NaOH反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸;使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸;使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,并将结晶奥贝胆酸转化成奥贝胆酸1型的步骤。

[0146] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与CH<sub>3</sub>OH和H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>反应形成3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯;使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与Li[N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]和Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl反应形成3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯;使3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯;使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与NaOH反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸;使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸;使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,并将结晶奥贝胆酸转化成奥贝胆酸1型的步骤。

[0147] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,其中将结晶奥贝胆酸C型转化为奥贝胆酸1型包括将结晶奥贝胆酸C型溶于NaOH水溶液中并加入HCl的步骤。

[0148] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,其中使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸在约85℃-约110℃的温度下在碱性水溶液中进行。

[0149] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,其中使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸在约100℃-约105℃的温度下和在约4-约5巴的压力下进行。

[0150] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,其中使E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与NaOH反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸在约20℃-约60℃的温度下进行。

[0151] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,其中使3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E-或E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯在约-50℃-约-70℃的温度下在BF<sub>3</sub>存在下在极性非质子溶剂中进行。

[0152] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,其中使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯与Li[N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]和Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl反应形成3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯在约-10℃-约-30℃的温度下在极性非质子溶剂中进行。

[0153] 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,其中将3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸与CH<sub>3</sub>OH和H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>反应形成3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯加热约3小时,并将反应混合物的pH用碱性水溶液调节至约6.5-约8.0的pH值。

[0154] 本发明涉及奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物,其效能(potency)大于约98%、大于约98.5%、大于约99.0%或大于约99.5%。本发明涉及包含通过本发明的方法产生的奥贝胆酸1型和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0155] 本发明涉及治疗或预防受试者的FXR介导的疾病或病况的方法,所述方法包括给予有效量的奥贝胆酸1型。所述疾病或病况选自胆道闭锁、胆汁郁积性肝病、慢性肝病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、丙型肝炎感染、酒精性肝病、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、进行性纤

维变性所致肝损伤、肝纤维变性和心血管疾病包括动脉粥样硬化、动脉硬化、高胆固醇血症和高脂血症。本发明涉及用于降低受试者的甘油三酯的方法,所述方法包括给予有效量的奥贝胆酸1型。

## 附图说明

[0156] 图1是实施例1步骤4的粗制化合物5的HPLC-UV/MS色谱图,以1mg/mL注入,注射体积为3 $\mu$ L。色谱图按照实施例2所述方法获得。

[0157] 图2是实施例1步骤4的化合物5的HPLC-UV/MS色谱图,以1mg/mL注入纯化参比,注射体积为20 $\mu$ L。色谱图按照实施例2所述方法获得。

[0158] 图3是采用HPLC方法的实施例1步骤4的粗制化合物5的UV色谱图。色谱图按照实施例2所述方法获得。

[0159] 图4A是来自用HPLC方法纯化分离的实施例1步骤4化合物5主峰级分(RT 29.0分钟)的m/z 850.61914 $\pm$ 3ppm的精确离子迹线(参见实施例2)。

[0160] 图4B是来自用HPLC方法纯化分离的实施例1步骤4化合物5次峰级分(RT 29.9分钟)的m/z 850.61914 $\pm$ 3ppm的精确离子迹线(参见实施例2)。

[0161] 图4C是来自实施例1步骤4粗制化合物5的m/z 850.61914 $\pm$ 3ppm的精确离子迹线(参见实施例2)。

[0162] 图4D是来自实施例1步骤4化合物5纯化参比的m/z 850.61914 $\pm$ 3ppm的精确离子迹线(参见实施例2)。

[0163] 图5是结晶奥贝胆酸C型的XRPD衍射图(参见实施例3)。

[0164] 图6显示结晶奥贝胆酸C型的TGA和DSC温谱图(参见实施例3)。

[0165] 图7显示在25 $^{\circ}$ C、110 $^{\circ}$ C和120 $^{\circ}$ C下结晶奥贝胆酸的VT-XRPD衍射图(参见实施例3)。

[0166] 图8A是结晶奥贝胆酸C型的GVS等温线图(参见实施例3)。

[0167] 图8B是结晶奥贝胆酸C型的GVS动力曲线(参见实施例3)。

[0168] 图8C显示在GVS分析前后结晶奥贝胆酸C型的XRPD衍射图(参见实施例3)。

[0169] 图9显示在40 $^{\circ}$ C/75%RH下保存前后结晶奥贝胆酸C型的XRPD衍射图(参见实施例3)。

[0170] 图10是第1批的奥贝胆酸1型的XRPD衍射图(参见实施例5)。

[0171] 图11显示第1、2、3、4、5和6批的奥贝胆酸1型的XRPD衍射图(参见实施例5)。

[0172] 图12是d<sub>6</sub>-DMSO中第1批奥贝胆酸1型的NMR波谱(参见实施例5)。

[0173] 图13显示第1、2、3、4、5和6批奥贝胆酸1型的<sup>1</sup>H NMR波谱(参见实施例5)。

[0174] 图14是来自区域10-75ppm的奥贝胆酸1型的<sup>13</sup>C DEPTQ NMR波谱的放大(参见实施例5)。

[0175] 图15是来自区域0-75ppm的奥贝胆酸1型抑制性季碳的<sup>13</sup>C DEPT135 NMR波谱的放大(参见实施例5)。

[0176] 图16是奥贝胆酸1型的定量<sup>13</sup>C NMR(参见实施例5)。

[0177] 图17是图16的32.3ppm处峰的放大图(参见实施例5)。

[0178] 图18是第1批奥贝胆酸1型的FT-IR波谱(参见实施例5)。

[0179] 图19显示第1批奥贝胆酸1型的TGA和DSC温谱图(参见实施例5)。

- [0180] 图20显示第1批奥贝胆酸1型的调整DSC温谱图(参见实施例5)。
- [0181] 图21显示第1、2、3、4、5和6批奥贝胆酸1型的TGA迹线(参见实施例5)。
- [0182] 图22显示第1、2、3、4、5和6批奥贝胆酸1型的DSC迹线(参见实施例5)。
- [0183] 图23A是偏振光显微术下的第1批奥贝胆酸1型的照片。图23B是偏振光显微术下的第2批奥贝胆酸1型的照片。图23C是偏振光显微术下的第3批奥贝胆酸1型的照片。图23D是偏振光显微术下的第4批奥贝胆酸1型的照片。图23E是偏振光显微术下的第5批奥贝胆酸1型的照片。图23F是偏振光显微术下的第6批奥贝胆酸1型的照片。
- [0184] 图24显示第1批奥贝胆酸1型的GVS等温线图(参见实施例5)。
- [0185] 图25显示第1批奥贝胆酸1型的GVS动力曲线(参见实施例5)。
- [0186] 图26显示在GVS前后第1批奥贝胆酸1型的XRPD衍射图(参见实施例5)。
- [0187] 图27是在3种不同的甲醇/水比率下奥贝胆酸1型的pKa测量的曲线图(参见实施例5)。
- [0188] 图28是奥贝胆酸1型的Yasuda-Shedlovsky曲线(参见实施例5)。
- [0189] 图29是显示奥贝胆酸1型的依赖于pH的种类分布的示图(参见实施例5)。
- [0190] 图30是显示通过电势测定法获得的奥贝胆酸1型的差异曲线的示图(参见实施例5)。
- [0191] 图31显示奥贝胆酸1型的亲油性概况(参见实施例5)。
- [0192] 图32显示在40℃/75%RH下保存后第1批奥贝胆酸1型的XRPD衍射图(参见实施例5)。
- [0193] 图33显示在25℃/97%RH下保存后第1批奥贝胆酸1型的XRPD衍射图(参见实施例5)。
- [0194] 图34显示以50%置信水平显示非氢原子的各向异性原子位移椭圆体的晶体结构的奥贝胆酸G型分子的示图(参见实施例6)。
- [0195] 图35显示奥贝胆酸G型晶体结构的分子间氢键的示图,其中氢键用虚线表示(参见实施例6)。
- [0196] 图36显示所收集的晶体的模拟粉末图、实验图和奥贝胆酸G型的XRPD重叠(参见实施例6)。
- [0197] 图37显示口服给予20mg/kg的奥贝胆酸1型和结晶F型后血清奥贝胆酸概况相对于时间的曲线图(参见实施例7)。
- [0198] 图38显示在给药后不同的时间间隔奥贝胆酸1型和结晶F型的牛磺缀合物的血清浓度的曲线(参见实施例7)。
- [0199] 图39显示F型的DSC曲线(参见实施例7)。
- [0200] 图40显示1型的DSC曲线(参见实施例7)。

### 具体实施方式

[0201] 本申请涉及具有以下化学结构的奥贝胆酸,一种药学活性成分(亦称为INT-747):



[0202]

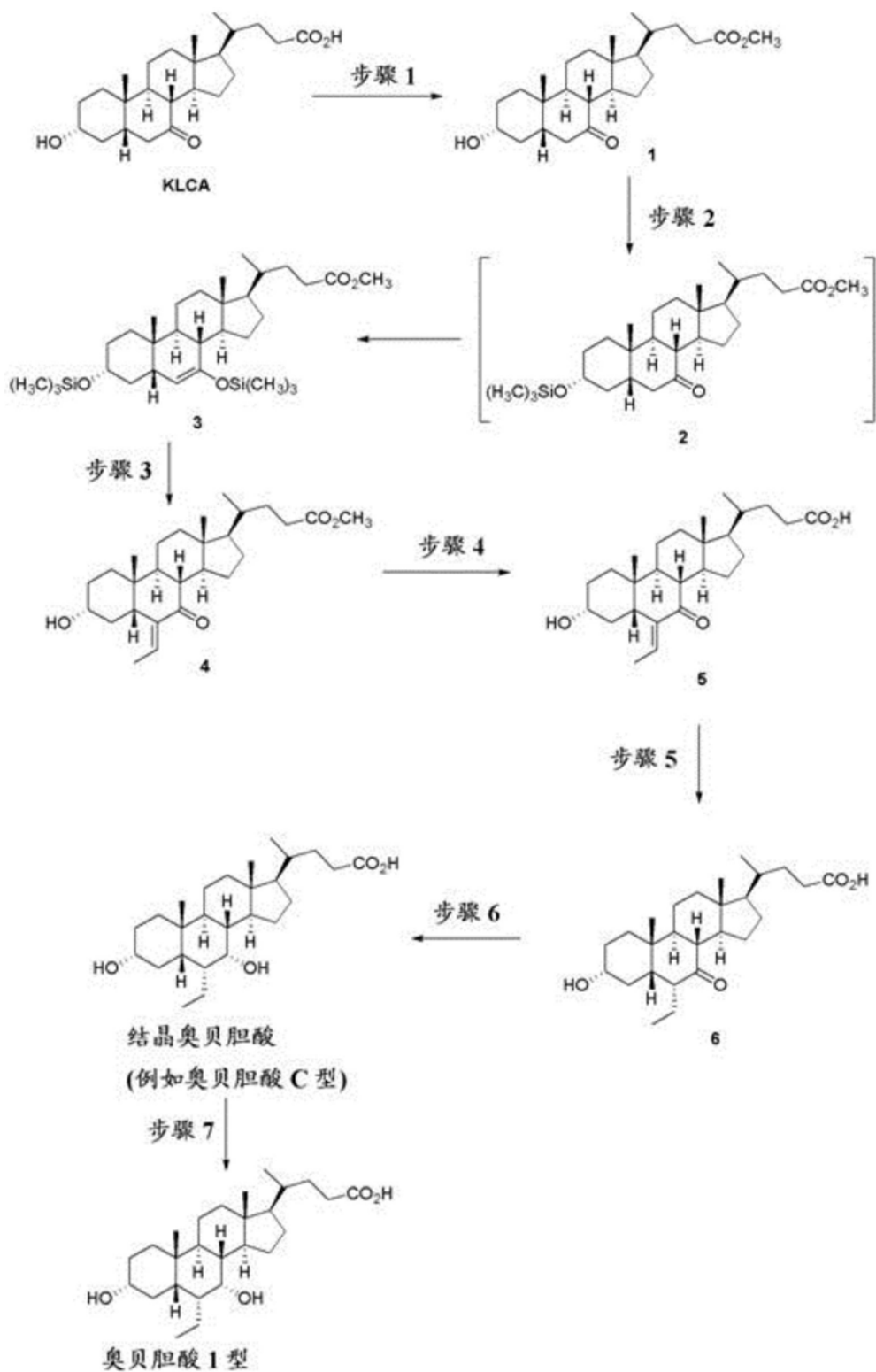


[0203] 其包括基本上纯的奥贝胆酸;包含结晶奥贝胆酸作为合成中间体的奥贝胆酸的制备方法和证实在制备奥贝胆酸的方法中奥贝胆酸和合成中间体的存在和纯度的分析方法。本申请还描述了奥贝胆酸的药物组合物和制剂以及所述组合物的用途。

[0204] 制备奥贝胆酸的方法

[0205] 本申请涉及用于制备高纯度奥贝胆酸的方法。本申请的方法见流程1。该方法是6步合成接着一个纯化步骤以产生高纯度的奥贝胆酸。

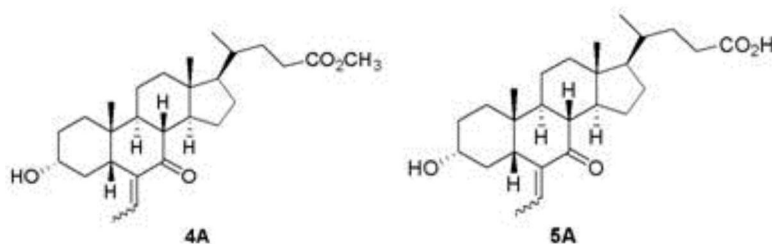
[0206] 流程1



[0207]

[0208] 本发明的方法还包括流程1的方法,其中化合物4和5各自包含通过以下化合物4A和5A的结构说明的E和Z异构体的混合物:

[0209]



[0210] 在一个实施方案中,E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4A)的E/Z异构体比率为约50%、大于约60%、大于约70%、大于约80%、大于约83%、大于约85%、大于约90%、大于约93%、大于约95%或大于约99%。在一个实施方案中,E/Z比率通过HPLC测定。在一个实施方案中,该比率大于约80%。在一个实施方案中,该比率大于约83%。在一个实施方案中,该比率大于约85%。在一个实施方案中,该比率大于约90%。在一个实施方案中,该比率大于约93%。在一个实施方案中,该比率大于约95%。在一个实施方案中,该比率大于约99%。

[0211] 在一个实施方案中,E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A)的E/Z异构体比率为约50%、大于约60%、大于约70%、大于约80%、大于约83%、大于约85%、大于约90%、大于约93%、大于约95%或大于约99%。在一个实施方案中,E/Z比率通过HPLC测定。在一个实施方案中,该比率大于约80%。在一个实施方案中,该比率大于约83%。在一个实施方案中,该比率大于约85%。在一个实施方案中,该比率大于约90%。在一个实施方案中,该比率大于约93%。在一个实施方案中,该比率大于约95%。在一个实施方案中,该比率大于约99%。

[0212] 本领域未曾报告过本申请的方法。该方法为6步合成接着一个纯化步骤。步骤1是在酸性催化剂存在下并加热使用甲醇使7-酮胆酸(KLCA)的C-24羧酸的酯化得到甲酯化合物1。步骤2是使用强碱由化合物1形成硅烯醇醚,接着用氯硅烷处理得到化合物3。步骤3是硅烯醇醚化合物3和乙醛的羟醛缩合反应形成化合物4(或化合物4A)。步骤4是酯水解,即化合物4(或化合物4A)的C-24甲酯经皂化得到羧酸化合物5(或化合物5A)。步骤5是化合物5(或化合物5A)的6-亚乙基部分的氢化,接着异构化得到化合物6。步骤6是化合物6的7-酮基选择性还原为7 $\alpha$ -羟基得到结晶奥贝胆酸。步骤7是结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。

[0213] 本发明的方法涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,其中该方法利用奥贝胆酸的晶体形式作为合成中间体。

[0214] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型的步骤。

[0215] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括以下步骤

[0216] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6)与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和

[0217] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。

[0218] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括以下步骤

[0219] 使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A)与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6),

[0220] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6)与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和

- [0221] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。
- [0222] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括以下步骤
- [0223] 使E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (5) 与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) ,
- [0224] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) 与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和
- [0225] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。
- [0226] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括以下步骤
- [0227] 使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (4A) 与NaOH反应形成E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (5A) ,
- [0228] 使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (5A) 与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) ,
- [0229] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) 与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和
- [0230] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。
- [0231] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括以下步骤
- [0232] 使E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (4) 与NaOH反应形成E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (5) ,
- [0233] 使E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (5) 与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) ,
- [0234] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) 与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和
- [0235] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。
- [0236] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括以下步骤
- [0237] 使3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯 (3) 与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (4A) ,
- [0238] 使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (4A) 与NaOH反应形成E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (5A) ,
- [0239] 使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (5A) 与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) ,
- [0240] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) 与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和
- [0241] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。
- [0242] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括以下步骤
- [0243] 使3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯 (3) 与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (4) ,
- [0244] 使E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (4) 与NaOH反应形成E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (5) ,

[0245] 使E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5)与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6),

[0246] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6)与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和

[0247] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。

[0248] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括以下步骤

[0249] 使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(1)与Li[N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]和Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl反应形成3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯(3),

[0250] 使3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯(3)与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4A),

[0251] 使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4A)与NaOH反应形成E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A),

[0252] 使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A)与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6),

[0253] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6)与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和

[0254] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。

[0255] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括以下步骤

[0256] 使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(1)与Li[N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]和Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl反应形成3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯(3),

[0257] 使3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯(3)与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4),

[0258] 使E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4)与NaOH反应形成E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5),

[0259] 使E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5)与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6),

[0260] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6)与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸,和

[0261] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。

[0262] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法,所述方法包括以下步骤

[0263] 使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(KLCA)与CH<sub>3</sub>OH和H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>反应形成3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(1),

[0264] 使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(1)与Li[N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]和Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl反应形成3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯(3),

[0265] 使3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯(3)与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4A),

[0266] 使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4A)与NaOH反应形成E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A),

[0267] 使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A)与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -

羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) ,

[0268] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) 与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸, 并将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。

[0269] 在一个实施方案中, 本发明涉及用于制备奥贝胆酸1型的方法, 所述方法包括以下步骤

[0270] 使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (KLCA) 与CH<sub>3</sub>OH和H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>反应形成3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (1) ,

[0271] 使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (1) 与Li [N (CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] 和Si (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl反应形成3 $\alpha$ , 7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯 (3) , 使3 $\alpha$ , 7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯 (3) 与CH<sub>3</sub>CHO反应形成E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (4) ,

[0272] 使E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (4) 与NaOH反应形成E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (5) ,

[0273] 使E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (5) 与Pd/C和氢气反应形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) ,

[0274] 使3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6) 与NaBH<sub>4</sub>反应形成结晶奥贝胆酸, 和

[0275] 将结晶奥贝胆酸转化为奥贝胆酸1型。

[0276] 在一个实施方案中, 本发明涉及使用结晶奥贝胆酸制备奥贝胆酸1型的方法。在另一个实施方案中, 结晶奥贝胆酸是C型。在一个实施方案中, 结晶奥贝胆酸C型的特征在于类似于图5所示X射线衍射图的X射线衍射图。在一个实施方案中, 结晶奥贝胆酸C型用乙酸正丁酯结晶和重结晶。

[0277] 步骤1

[0278] 步骤1是3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (KLCA) 与CH<sub>3</sub>OH和H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>形成3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (1) 的反应。在步骤1的一个实施方案中, 将反应混合物加热约3小时, 并用碱性水溶液调节反应混合物的pH至约6.5-约8.0的pH值。在一个实施方案中, 3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (1) 的分离还包括用活性碳处理。在一个实施方案中, 3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (1) 的分离不另包括用活性碳处理。在一个实施方案中, 不用活性碳处理的3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (1) 的分离提供较高的收率。在一个实施方案中, 使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (1) 与CH<sub>3</sub>OH和H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的反应在甲醇中进行。在一个实施方案中, 碱性溶液是NaOH水溶液。在一个实施方案中, pH值为约7.0-约7.5。

[0279] 在一个实施方案中, 甲醇用作甲基化试剂以及反应溶剂。在一个实施方案中, 含有产物的溶液用活性碳处理约30分钟并过滤除去碳固体物。在一个实施方案中, 含有产物的溶液不用活性碳处理。为了沉淀产物, 加入约5°C-约20°C的水和晶种材料。在另一个实施方案中, 水为约10°C-约15°C。在一个实施方案中, 产物以离心分离, 用甲醇和水的混合物洗涤。在一个实施方案中, 湿料的含水量通过Karl Fischer (KF) 定量测定。在一个实施方案中, 在用于下一步骤之前, 将材料在转筒式干燥机中干燥。在一个实施方案中, 在用于下一步骤之前, 不将材料干燥。

[0280] 步骤2

[0281] 步骤2是3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (1) 与Li [N (CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] 和Si (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl

形成3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯(3)的反应。在一个实施方案中,步骤2在约-10℃-约-30℃的温度下在极性非质子溶剂中进行。在一个实施方案中,极性非质子溶剂是四氢呋喃。在一个实施方案中,温度为约-20℃-约-25℃。在一个实施方案中,将3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(1)与Li[N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]和Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl的反应搅拌约2小时。

[0282] 在一个实施方案中,将化合物1装入惰性条件下的反应器中。在另一个实施方案中,残余的水和甲醇在约65℃和常压下通过重复共沸蒸馏除去。在另一个实施方案中,需要时,将THF加入残余物中,重复蒸馏约4次。在另一个实施方案中,重复蒸馏约3次、约2次或约1次。在一个实施方案中,含有产物的剩余溶液的最终含水量为 $\leq 0.05\%$ (Karl Fischer滴定)。水可以水解三甲基氯硅烷,其在稍后加入该步骤中。在一个实施方案中,使产物的溶液预先冷却至约-10℃-约-30℃,然后加入三甲基氯硅烷。在另一个实施方案中,使溶液预先冷却至约-20℃-约-25℃。在一个实施方案中,将强碱和THF装入单独的反应器中,并冷却至约-10℃-约-30℃。在一个实施方案中,强碱是二异丙基氨基锂。在另一个实施方案中,反应器是惰性的,例如在氮气氛或氩气氛下。在另一个实施方案中,使碱和THF的溶液冷却至约-20℃-约-25℃。在一个实施方案中,在约-10℃-约-30℃下,将3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯、THF和三甲基氯硅烷的冷却的无水溶液装入碱性溶液中。在另一个实施方案中,温度为约-20℃-约-25℃。在一个实施方案中,搅拌反应混合物约2小时。在一个实施方案中,对于后处理,将反应混合物加入预冷的酸性溶液中。在另一个实施方案中,酸性溶液是柠檬酸水溶液。在一个实施方案中,在加入后,分离水相并弃去。在一个实施方案中,通过在约50℃下真空蒸馏,从有机相中除去溶剂。在一个实施方案中,分离的残余物是3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯(3),在下一步骤中“照原样”使用。或者,可在步骤3前将化合物3纯化。

### [0283] 步骤3

[0284] 步骤3是3 $\alpha$ ,7-二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯(3)与CH<sub>3</sub>CHO形成3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4)的反应。在一个实施方案中,步骤3在约-50℃-约-70℃的温度下在BF<sub>3</sub>存在下在极性非质子溶剂中进行。在一个实施方案中,极性非质子溶剂是二氯甲烷。在一个实施方案中,BF<sub>3</sub>为乙腈中的16%wt溶液。在一个实施方案中,温度为约-60℃-约-65℃。

[0285] 在一个实施方案中,将含化合物3的极性非质子溶剂装入惰性反应器中。在另一个实施方案中,极性非质子溶剂是前一步骤的残余溶剂(例如THF)。在一个实施方案中,加入THF以利于馏出残余的水和二异丙胺。在约50℃的最大温度下,真空馏出残余量的极性非质子溶剂。将含化合物3的残余物中的含水量限于 $\leq 0.5\%$ (Karl Fischer滴定)。然后将含化合物3的残余物溶于极性非质子溶剂中,并预冷却至约-50℃-约-70℃。极性非质子溶剂是二氯甲烷。在另一个实施方案中,将极性非质子溶剂中的含化合物3的残余物预冷却至约-60℃-约-65℃。加入乙醛(CH<sub>3</sub>CHO)。将极性非质子溶剂和三氟化硼(BF<sub>3</sub>)溶剂化络合物装入单独的反应器中,然后冷却至约-50℃-约-70℃。在另一个实施方案中,极性非质子溶剂是二氯甲烷。在另一个实施方案中,三氟化硼溶剂化络合物是三氟化硼乙腈络合物。BF<sub>3</sub>溶液的温度为约-60℃-约-65℃。在约-60℃-约-65℃下将含有化合物3和乙醛的溶液加入BF<sub>3</sub>溶液中。在另一个实施方案中,含化合物3和乙醛的溶液是无水的。在一个实施方案中,在约-60℃-约-65℃下搅拌反应混合物约2小时,加热至23℃-约28℃,再搅拌约2小时,并冷却至

约2℃-约10℃用于水解/后处理。在一个实施方案中,加入和搅拌的总时间为约4小时。在一个实施方案中,对于后处理,将反应器中的冷却溶液加入预冷的碱性水溶液中。在另一个实施方案中,碱性水溶液为约50%wt氢氧化钠(NaOH;苛性钠)。在一个实施方案中,分离各相,将(下层)有机层转移到单独的反应器中。在一个实施方案中,尽可能地在不超过(NMT) 50℃时通过蒸馏从有机层中除去溶剂。在一个实施方案中,残余物包含3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4)和一些剩余的乙腈和二氯甲烷。要了解,步骤4可形成E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4A)。步骤3的产物直接用于步骤4。

#### [0286] 步骤4

[0287] 步骤4是3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4)与NaOH形成E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5)的反应。在一个实施方案中,在步骤4之前,将步骤3的残余物加热至约45℃-约60℃以除去残余量的溶剂。在一个实施方案中,温度为约49℃-约55℃。在一个实施方案中,使3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4)与NaOH反应的酯水解反应在约20℃-约25℃下在甲醇、水和NaOH溶液中进行。

[0288] 在一个实施方案中,将起反应的3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4)装入反应器中。在另一个实施方案中,反应器是惰性的,例如在氮气氛或氩气氛下。在NMT 50℃的温度下,真空馏出残余量的溶剂。在一个实施方案中,将残余物加热至约45℃-约60℃。在另一个实施方案中,将残余物加热至约49℃-约55℃。在另一个实施方案中,将步骤3的残余物(化合物4)溶于甲醇和水和碱性水溶液中。在另一个实施方案中,碱性水溶液为约50%wt氢氧化钠(NaOH;苛性钠)。步骤4的酯水解反应在约20℃-约60℃下进行,并搅拌直到水解反应完成。在一个实施方案中,酯水解在约20℃-约25℃下进行。检查反应混合物的pH以证实pH>12。如果pH<12,则加入另外的NaOH。反应混合物用水稀释,并调节温度至约20℃-约35℃。另一方面,反应混合物用水稀释,并调节温度至约25℃-约35℃。在一个实施方案中,对于后处理,分离各相,将下层的水层转移到单独的反应器中,弃去有机层。化合物5在水相中。在一个实施方案中,将乙酸乙酯和酸加入含化合物5的水相中,以充分搅拌进入水层中。在另一个实施方案中,酸是柠檬酸水溶液。在一个实施方案中,分离各相,弃去下层的水层。化合物5在有机层中。在一个实施方案中,乙酸乙酯从有机层中馏出,并再加入乙酸乙酯。在一个实施方案中,重复蒸馏直到馏出液的含水量为NMT 1%或直到达到恒定的沸点。在一个实施方案中,使悬浮液冷却至约10℃-约30℃,分离,并用乙酸乙酯洗涤。在另一个实施方案中,使所得的含化合物5的悬浮液冷却至约20℃-约25℃。在一个实施方案中,所得产物的干燥在约60℃下真空进行(例如转筒式干燥机)。

[0289] 在一个实施方案中,使用乙醇使粗制的E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5)结晶。在一个实施方案中,将乙醇和粗制化合物5装入反应器中。在另一个实施方案中,反应器是惰性的。在一个实施方案中,为了溶解粗制化合物5,将混合物加热至回流。在一个实施方案中,以受控制的冷却变速使混合物冷却至约15℃-约20℃。在一个实施方案中,结晶化合物5使用离心机分离,然后用乙酸乙酯洗涤。在一个实施方案中,结晶化合物5的干燥在真空下(例如转筒式干燥机)和在约60℃下进行。可取样品以测量纯化的化合物5的含量测定、纯度和水分含量。在一个实施方案中,纯化的化合物5含有3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸的E和Z异构体两者。在一个实施方案中,E/Z比率为约99:1、约98:2、约95:5、约90:10、约85:15、约80:20、约75:25、约70:30、约65:35、约60:40、约55:45或约50:



50.有关纯化的化合物5的鉴定和表征的全部详情参见实施例2。

[0290] 步骤4还可以作为E/Z异构体的混合物的化合物开始进行。例如,步骤4是E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4A)与NaOH形成E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A)的反应。在一个实施方案中,在步骤4之前,将步骤3的残余物加热约45℃-约60℃以除去残余量的溶剂。在一个实施方案中,温度为约49℃-约55℃。在一个实施方案中,涉及使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4A)与NaOH反应的酯水解反应在约20℃-约25℃下在甲醇、水和NaOH溶液中进行。在一个实施方案中,NaOH溶液是50%wt水性溶液。

[0291] 在一个实施方案中,将起反应的E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯(4A)装入反应器中。在另一个实施方案中,反应器是惰性的,例如在氮气氛或氩气氛下。在NMT 50℃的温度下,真空馏出残余量的溶剂。在一个实施方案中,将残余物加热至45℃-约60℃。在一个实施方案中,温度为约49℃-约55℃。在一个实施方案中,将步骤3的残余物(化合物4A)溶于甲醇和水和碱性水溶液中。在另一个实施方案中,碱性水溶液是约50%wt氢氧化钠(NaOH;苛性钠)。步骤4的酯水解反应在约20℃-约60℃下进行,并搅拌直到水解反应完成。在一个实施方案中,酯水解在约20℃-约25℃下进行。检查反应混合物的pH以证实pH>12。如果pH<12,则加入额外的NaOH。反应混合物用水稀释,并调节温度至约25℃-约35℃。在一个实施方案中,对于后处理,分离各相,将下层的水层转移到单独的反应器中,弃去有机层。化合物5A在水相中。在一个实施方案中,将乙酸乙酯和酸加入含化合物5A的水相中,以充分搅拌进入水层中。在另一个实施方案中,酸是柠檬酸水溶液。在一个实施方案中,分离各相,弃去下层的水层。化合物5A在有机层中。在一个实施方案中,将乙酸乙酯从有机层中馏出,并再加入乙酸乙酯。在一个实施方案中,重复蒸馏直到馏出液的含水量为NMT 1%或直到达到恒定的沸点。在一个实施方案中,使悬浮液冷却至约10℃-约30℃,分离,并用乙酸乙酯洗涤。在另一个实施方案中,使所得的含化合物5A的悬浮液冷却至约20℃-约25℃。在一个实施方案中,所得产物的干燥在约60℃下真空进行(例如转筒式干燥机)。化合物5A可无需纯化继续进行至步骤5。

[0292] 在一个实施方案中,粗制的E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A)使用乙醇结晶。在一个实施方案中,将乙醇和粗制化合物5A装入反应器中。在另一个实施方案中,反应器是惰性的。在一个实施方案中,为了溶解粗制的化合物5A,将混合物加热至回流。在一个实施方案中,以受控制的冷却变速使混合物冷却至约15℃-约20℃。在一个实施方案中,结晶化合物5A使用离心机分离,然后用乙酸乙酯洗涤。在一个实施方案中,结晶化合物5A的干燥在真空下(例如转筒式干燥机)和在约60℃下进行。在一个实施方案中,步骤4的分离结晶产物是化合物5。

#### [0293] 备选步骤4

[0294] 化合物5可按照备选方法制备。在一个实施方案中,将化合物4装入惰性反应器中。在约50℃(最大)下,可真空馏出残余量的溶剂(例如乙腈、二氯甲烷)。将残余物溶于甲醇中,并冷却。加入自来水和苛性钠(50%wtNaOH)。在一个实施方案中,在约20℃-约25℃下搅拌反应混合物约4小时。溶液用自来水稀释,并加入甲苯。在搅拌后,分离各相,将下层的水层转到惰性反应器中。弃去有机层。在充分搅拌进入水层的情况下加入乙酸乙酯和柠檬酸溶液。分离各相,弃去下层的水层。将有机层转移到惰性反应器中。从有机层中馏出乙酸乙

酯,并再加入乙酸乙酯。在一个实施方案中,重复该操作直到馏出液的含水量不超过约1%或直到达到恒定的沸点。使该悬浮液冷却至约20℃-约25℃,化合物5用惰性离心机分离,并用乙酸乙酯洗涤。干燥在转筒式干燥机中在真空和约60℃下进行。

[0295] 该备选步骤4还可以作为E/Z异构体的混合物的化合物开始进行。在一个实施方案中,将化合物4A装入惰性反应器中。在约50℃(最大)下,可真空馏出残余量的溶剂(例如乙腈、二氯甲烷)。将残余物溶于甲醇中,并冷却。加入自来水和苛性钠(50%wt,NaOH)。在一个实施方案中,在约20℃-约25℃下搅拌反应混合物约4小时。溶液用自来水稀释,并加入甲苯。在搅拌后,分离各相,将下层的水层转到惰性反应器中。弃去有机层。在充分搅拌进入水层的情况下加入乙酸乙酯和柠檬酸溶液。分离各相,弃去下层的水层。将有机层转移到惰性反应器中。从有机层中馏出乙酸乙酯,并再加入乙酸乙酯。在一个实施方案中,重复该操作直到馏出液的含水量不超过约1%或直到达到恒定的沸点。使该悬浮液冷却至20℃-25℃,化合物5A用惰性离心机分离,并用乙酸乙酯洗涤。干燥在转筒式干燥机中在真空和约60℃下进行。

#### [0296] 步骤5

[0297] 步骤5是E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5)与Pd/C和氢气形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6)的反应。步骤5可以同步(氢化和异构化同时)或分两阶段(氢化接着异构化)进行。在一个实施方案中,步骤5在约90℃-约110℃的温度下和在约4-约5巴的压力下进行。在一个实施方案中,在后处理期间,反应混合物的有机相用活性炭处理。在一个实施方案中,压力为约4.5-约5.5巴。在另一个实施方案中,压力为约5巴。在一个实施方案中,将氢化反应混合物搅拌约1小时。在一个实施方案中,将E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5)与Pd/C和氢气的反应加热至约100℃,并搅拌约2小时-约5小时。在一个实施方案中,将E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5)与Pd/C和氢气的反应加热至约100℃,并搅拌约3小时。

[0298] 在一个实施方案中,E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5)与Pd/C和氢气的反应在碱性溶液存在下进行。在一个实施方案中,碱性溶液是50%wt氢氧化钠(NaOH;苛性钠)溶液。在氢化反应后,将反应混合物加热至100℃(以进行从 $\beta$ 构型到 $\alpha$ 构型的C-6位的异构化),然后冷却至约40℃-约50℃。对于后处理,滤出Pd/C。在一个实施方案中,向滤液中加入乙酸正丁酯和酸。在另一个实施方案中,酸是盐酸(HCl)。在检查pH值以确保它是酸性的后,将水相分离并弃去。含有产物的有机相用活性炭处理。在一个实施方案中,滤出活性炭,所得的含有产物的滤液通过蒸馏浓缩,并使所得悬浮液冷却至约10℃-约30℃。在另一个实施方案中,使悬浮液冷却至约15℃-约20℃。分离含有化合物6的悬浮液,并用乙酸正丁酯洗涤。使用压力过滤器将化合物6过滤。在一个实施方案中,干燥在压力过滤器中在约80℃下真空进行。

[0299] 在步骤5的一个实施方案中,将E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5)、水、NaOH溶液(例如50%wt)和Pd/C在约5巴的H<sub>2</sub>气体中并在约100℃-约105℃的温度下混合直到H<sub>2</sub>吸收停止。使反应混合物冷却至约40℃-约50℃,并滤出Pd/C。然后将乙酸正丁酯和HCl加入含有化合物6的溶液中。在一个实施方案中,分离水相并弃去。含有化合物6的有机相用活性炭处理。滤出碳,且将滤液移到另一个反应器中,在其中通过蒸馏浓缩,然后使悬浮液冷却至约5℃-约20℃。在一个实施方案中,化合物6通过过滤分离,将滤液在压力过滤

器中在约80℃下真空干燥。

[0300] 步骤5还可以作为E/Z异构体的混合物的化合物开始进行。例如,步骤5是E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A)与Pd/C和氢气并加热形成3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6)的反应。步骤5可以同步(氢化和异构化同时)或分两阶段(氢化,接着异构化)进行。一方面,步骤5在约90℃-约110℃的温度下和在约4-约5巴的压力下进行。在一个实施方案中,在后处理期间,反应混合物的有机相用活性碳处理。在一个实施方案中,压力为约4.5-约5.5巴。在另一个实施方案中,压力为约5巴。在一个实施方案中,将氢化反应混合物搅拌约1小时。在一个实施方案中,使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A)与Pd/C和氢气的反应加热至约100℃,并搅拌约2小时-约5小时。在一个实施方案中,使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A)与Pd/C和氢气的反应加热至约100℃,并搅拌约3小时。

[0301] 在一个实施方案中,使E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A)与Pd/C和氢气的反应在碱性溶液存在下进行。在一个实施方案中,碱性溶液是50%wt氢氧化钠(NaOH;苛性钠)溶液。在氢化反应后,将反应混合物加热至100℃(以进行从 $\beta$ 构型到 $\alpha$ 构型的C-6位的异构化),然后冷却至约40℃-约50℃。对于后处理,滤出Pd/C。在一个实施方案中,向滤液中加入乙酸正丁酯和酸。在另一个实施方案中,酸是盐酸(HCl)。在检查pH值以确保它是酸性的后,将水相分离并弃去。含有产物的有机相用活性碳处理。在一个实施方案中,滤出活性碳,所得的含有产物的滤液通过蒸馏浓缩,并使所得悬浮液冷却至约10℃-约30℃。在另一个实施方案中,使悬浮液冷却至约15℃-约20℃。分离含有化合物6的悬浮液,并用乙酸正丁酯洗涤。使用压力过滤器将化合物6过滤。在一个实施方案中,干燥在压力过滤器中在约80℃下真空进行。

[0302] 在步骤5的一个实施方案中,E/Z-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5A)、水、NaOH溶液(例如50%wt)和Pd/C在约在5巴的H<sub>2</sub>气体中并在约100℃-约105℃的温度下混合直到H<sub>2</sub>吸收停止。使反应混合物冷却至约40℃-约50℃,并滤出Pd/C。然后将乙酸正丁酯和HCl加入含有化合物6的溶液中。在一个实施方案中,分离水相并弃去。含有化合物6的有机相用活性碳处理。滤出碳,且将滤液移到另一个反应器中,在其中通过蒸馏浓缩,然后使悬浮液冷却至约5℃-约20℃。在一个实施方案中,化合物6通过过滤分离,将滤液在压力过滤器中在约80℃下真空干燥。

[0303] 在另一个实施方案中,上述制备化合物6的氢化/异构化反应分两阶段进行(从化合物5或化合物5A开始)。首先,氢化在约4-5巴下进行,然后其次,将反应混合物加热至约20℃-约40℃。加热反应混合物将6-位的乙基异构化为所需的 $\alpha$ 构型。将反应混合物加热直到异构化完成。

#### [0304] 步骤6

[0305] 步骤6是3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6)与NaBH<sub>4</sub>形成结晶奥贝胆酸的反应。在一个实施方案中,步骤6在约85℃-约110℃的温度下在碱性水溶液中进行。在一个实施方案中,温度为约90℃-约95℃。在一个实施方案中,碱性水溶液是NaOH水溶液。在一个实施方案中,碱性水溶液是50%wt NaOH溶液和水的混合物。在一个实施方案中,搅拌化合物6和NaBH<sub>4</sub>的反应混合物约3小时-约5小时。在另一个实施方案中,搅拌反应混合物约4小时。

[0306] 对于后处理,在反应完成后,使混合物冷却至约80℃,并转移到冷却的反应器中。在一个实施方案中,在约20℃-约60℃下,加入乙酸正丁酯和酸。在一个实施方案中,温度为约40℃-约45℃。在另一个实施方案中,酸是柠檬酸。在检查pH值以确保它是酸性的后,将水相分离并弃去。含有产物的有机相通过蒸馏浓缩。在一个实施方案中,将乙酸正丁酯加入残余物中并再次馏出。在一个实施方案中,再次将乙酸正丁酯加入残余物中,然后慢慢冷却。在另一个实施方案中,在约50℃下向残余物中接晶种。在另一个实施方案中,在结晶出现后,将混合物加热至52℃,然后慢慢冷却至约15℃-约20℃。在另一个实施方案中,使残余物冷却至约15℃-约20℃。在一个实施方案中,所得奥贝胆酸用乙酸正丁酯洗涤。在一个实施方案中,分离奥贝胆酸,并用乙酸正丁酯洗涤(例如在压力过滤器中)。在另一个实施方案中,压力过滤器是惰性的。将结晶产物在约60℃下真空干燥。在一个实施方案中,将所得结晶奥贝胆酸从有机溶剂(例如庚烷)中分离。有关结晶奥贝胆酸C型的鉴定和表征的全部详情参见实施例3。

#### [0307] 步骤7

[0308] 步骤7是结晶奥贝胆酸C型向奥贝胆酸1型的转化。在一个实施方案中,步骤7包括将结晶奥贝胆酸C型溶于NaOH水溶液中并加入HCl的步骤。

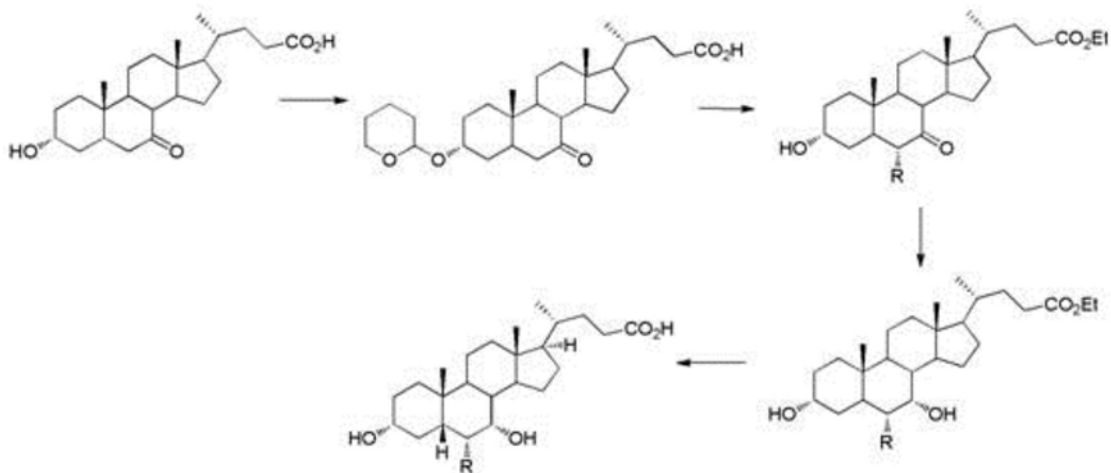
[0309] 在一个实施方案中,在约20℃-约50℃下,将结晶奥贝胆酸溶于水和苛性钠溶液(50%wt)中。在一个实施方案中,温度为约30℃-约40℃。在一个实施方案中,结晶奥贝胆酸是C型。在一个实施方案中,在约20℃-约50℃下,将所得的结晶奥贝胆酸C型溶液加入稀酸中。在另一个实施方案中,温度为约30℃-约40℃。在另一个实施方案中,酸是盐酸(例如37%)。在一个实施方案中,37%盐酸溶液用水稀释至以体积计小于约1%。在一个实施方案中,37%盐酸溶液用水稀释至以体积计约0.7%。在一个实施方案中,在约20℃-约50℃下搅拌产物在稀酸中的悬浮液约30分钟。在另一个实施方案中,温度为约30℃-约40℃。在一个实施方案中,在NMT约20℃下分离奥贝胆酸1型并用水洗涤(例如在压力过滤器中)。在一个实施方案中,在NMT约20℃下分离奥贝胆酸1型并用水洗涤(例如在压力过滤器中)。在另一个实施方案中,压力过滤器是惰性的。将产物在压力过滤器中在NMT约50℃的温度下真空干燥。

[0310] 本申请的方法在奥贝胆酸1型制备中利用结晶中间体,其出乎意料地导致总体制备和最终产物的纯度显著改进。具体地讲,合成的步骤6产生奥贝胆酸的新晶体形式。这种晶体形式的产生导致基本上纯的奥贝胆酸1型。

[0311] 本申请的方法相对于先有技术公开的方法是一种改进。奥贝胆酸的制备公开于美国公开号2009/0062526 A1(本文称为“‘526公开文本”)、美国专利号7,138,390(本文称为“‘390专利”)和WO 2006/122977(本文称为“‘977申请”)。

[0312] 以下流程3中描述了‘390专利中制备奥贝胆酸的方法(本文称为“‘390方法”)(R为乙基):

#### [0313] 流程3



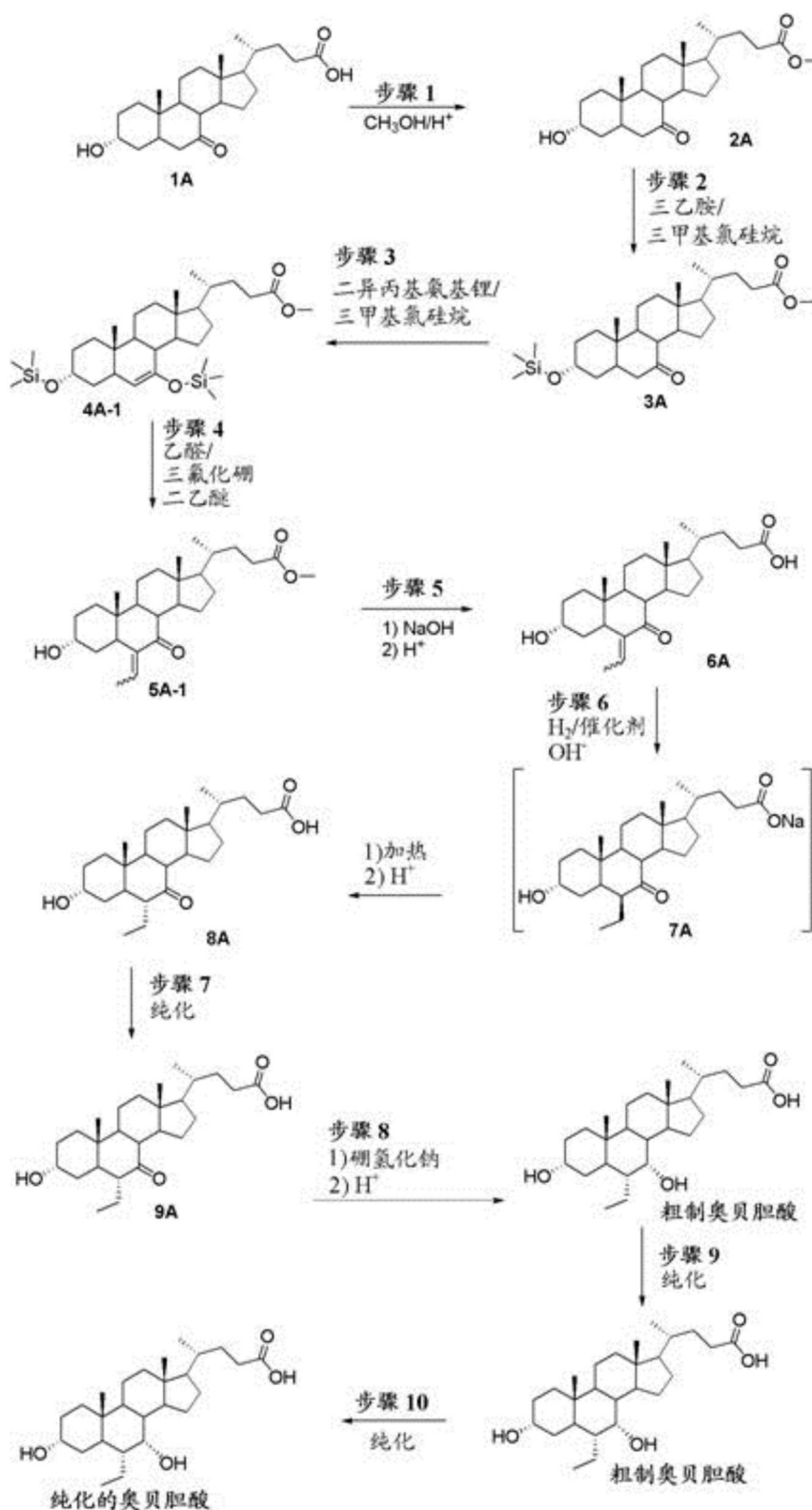
[0314]

[0315] 即使该方法包括很少的步骤,但它存在一系列缺点。在所有步骤中,反应产物在色谱柱上纯化,即一种非常昂贵的分离方法,不可用于工业规模。此外,步骤2的反应收率极低(12-13%),随之总收率大大降低,低于3.5%。该方法还使用六亚甲基磷酰胺作为反应物,这是一种已知的致癌物。

[0316] ‘977申请中制备奥贝胆酸的方法描述于流程4。

[0317] 流程4

[0318]



[0319] 制备奥贝胆酸的‘977方法是8步合成方法,其包括一个纯化步骤(步骤7)接着2个另外的纯化步骤。在‘977方法和本申请的方法之间有许多差异。下表A描述了两种方法间的至少一些差异:

[0320] 表A: ‘977方法和本申请的方法之间的差异

[0321]

合成步骤	变化		变化的优势
	‘977 方法	本申请的方法	
步骤 1	甲磺酸	硫酸	规模 and 安全性(甲磺酸盐)
	30%氨(水溶液)	NaOH (水溶液)	按比例扩大
	无纯化/处理	使用活性炭处理	改进纯度/颜色
步骤 2 (申请步骤 2 的方法组合了‘977 方法步骤 2 和 3)	三乙胺	二异丙基氨基锂 (LDA)	LDA 是该步骤合适的替代试剂
	甲苯	四氢呋喃(THF)	THF 是该步骤合适的替代试剂
	无酸性猝灭	在柠檬酸溶液中猝灭	按比例扩大
步骤 3 (申请步骤 3 的方法同‘977 步骤 4)	三氯化硼二乙醚	三氯化硼乙腈络合物	处理醚合物的安全顾虑(用乙醚的暴露危险)
步骤 4 (申请步骤 4 的方法同‘977 步骤 5)	甲苯	甲醇	安全性(甲苯); 规模
	磷酸(水溶液)猝灭	柠檬酸(水溶液)猝灭	按比例扩大
	无纯化/处理	结晶步骤是后处理的一部分	改进纯度
步骤 5 (申请步骤 5 的方法组合了‘977 方法步骤 6 和 7)	磷酸(水溶液)猝灭	盐酸(水溶液)猝灭	按比例扩大
	无纯化/处理	使用活性炭处理	改进纯度/颜色
	纯化按步骤 7 进行	结晶步骤是后处理的一部分	按比例扩大
步骤 6 (申请步骤 6 的方法组合了‘977 方法的步骤 8 和 9)	二氯甲烷	乙酸正丁酯	安全性(二氯甲烷)
	磷酸(水溶液)猝灭	柠檬酸(水溶液)猝灭	按比例扩大
	纯化按步骤 9 进行 - 使用二氯甲烷/乙酸乙酯	结晶步骤是后处理的一部分 - 使用乙酸正丁酯	规模 and 安全性(二氯甲烷)
步骤 7 (申请步骤 7 的方法同‘977 步骤 10)	氨溶液	NaOH 溶液	按比例扩大
	磷酸(水溶液)猝灭	盐酸(水溶液)猝灭	按比例扩大

[0322] 本申请的方法与 ‘977方法相比的差异导致该方法的重大改进,包括涉及规模优化、安全性以及纯度的改进和整体方法的改进。通过本申请的方法产生的奥贝胆酸的纯度是基本纯的。具体地讲,通过本申请的方法产生的奥贝胆酸基本上比通过先有技术的方法(包括 ‘390方法和 ‘977方法)产生的奥贝胆酸更纯。例如,通过本申请的方法生产的奥贝胆酸和通过 ‘977方法生产的奥贝胆酸的化验证书提供的结果比较见下表B。杂质的百分比采用HPLC方法测定。

[0323] 表B:由本申请的方法和 ‘977方法产生的奥贝胆酸的杂质的比较

[0324]

参数	规格界限	本申请的方法	‘977方法
水 (KF)	NMT4.5%	1.0%	2.1%

杂质1和杂质4	NMT 0.15%	<0.05%	<0.05%
杂质2	NMT 0.15%	<0.05%	<0.1%
杂质3	NMT 0.15%	<0.05%	<0.1%
杂质5	NMT 3.0%	0.2%	1.0%
杂质6	NMT 0.15%	<0.05%	<0.05%

[0325] 杂质1是6-乙基乌索脱氧胆酸。

[0326] 杂质2是3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-cho-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

[0327] 杂质3是6 $\beta$ -乙基蛾脱氧胆酸。

[0328] 杂质4是3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。

[0329] 杂质5是鹅脱氧胆酸。

[0330] 杂质6是3 $\alpha$  (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (6ECDCA二聚体)。

[0331] NMT是指“不超过”。

[0332] 结晶奥贝胆酸作为合成中间体

[0333] 目前正在开发奥贝胆酸作为呈非晶体固体的活性药物成分。为了促进奥贝胆酸的开发,进行了初步的结晶和多晶现象研究以确定晶体形式是否容易获得,并且如果容易获得,则它们是否适于开发。在所设计的更好理解该材料在不同溶剂中的行为的初步溶解度筛选之后,似乎该材料具有形成凝胶的趋势,并且可能结晶。然后进行了广泛的多晶型物筛选,将该材料暴露于大范围的溶剂和结晶条件中以鉴定和表征尽可能多的相关多晶型物。在该筛选期间,发现了5种不同的固体形式。

[0334] 奥贝胆酸的3种形式 (A、C和D) 是含有0.25mol eq水和不同量的各种有机溶剂的混合水合物/溶剂合物。在加热时,这些固体同时失去结晶性和溶剂,并且遗憾地是,由于其低的熔解温度和高的溶剂含量所致,这些溶剂化形式不适于进一步开发作为药物成分。还注意到,存在这种类型的类似的“不适宜”形式。例如,在稍后的实验中发现低熔点溶剂化形式,以及另一种形式的单晶,其通过SCXRD (单晶X射线衍射) 显示为一水合物/茴香醚溶剂合物。

[0335] 其余两种形式是较高熔点的,且可能更有前景,但是它们中的一种 (G型) 尽管许多尝试,但都无法按比例扩大再生产,也无法重复。仅生产这种形式的困难便使之不适于开发。可再现地制备剩余的非溶剂化F型,但它需要大量的重结晶程序并使用硝基甲烷,这是一种有毒溶剂,并且如果被胺、碱金属、强酸或高温或绝热压缩激活则可能爆炸。有关硝基甲烷的残留水平的顾虑注定F型也不适用于开发。

[0336] 初步结晶和多晶型物研究的整体结果显示,该材料可形成不同形式的结晶材料,但结晶材料或形式无一视为适于开发。

[0337] 没多久发现产生结晶奥贝胆酸在本申请方法倒数第二步中作为中间体的重要性。结晶奥贝胆酸可采用本申请的方法容易地大规模分离。从初步结晶和多晶型物研究来看,确定该结晶奥贝胆酸与C型一致。在本申请方法步骤7中作为合成中间体产生的结晶奥贝胆酸的生成、易于分离和高纯度的确对制备基本上纯的奥贝胆酸至关重要。

[0338] 在一个实施方案中,本发明涉及特征在于包括在约4.2、6.4、9.5、12.5和16.7°2 $\theta$ 处的特征峰的X射线衍射图的结晶奥贝胆酸C型。在一个实施方案中,X射线衍射图包括在约



4.2、6.4、9.5、12.5、12.6、15.5、15.8、16.0、16.7和19.0°2 $\theta$ 处的特征峰。在一个实施方案中,X射线衍射图包括在约4.2、6.4、8.3、9.5、11.1、12.2、12.5、12.6、15.5、15.8、16.0、16.3、16.7、18.6和19.0°2 $\theta$ 处的特征峰。在一个实施方案中,X射线衍射图包括在约4.2、6.4、8.3、9.5、11.1、12.2、12.5、12.6、15.5、15.8、16.0、16.3、16.7、17.0、17.8、18.6、18.8、19.0、20.5和20.9°2 $\theta$ 处的特征峰。在一个实施方案中,本发明涉及特征在于基本类似于图5所示X射线衍射图的X射线衍射图的结晶奥贝胆酸C型。在一个实施方案中,X射线衍射图在使用Cu K $\alpha$ 辐射(40kV,40mA)的衍射计上收集。在一个实施方案中,X射线衍射图包括在约12.0-约12.8和约15.4-约21.0处的特征峰。

[0339] 在一个实施方案中,本发明涉及特征在于在约98 $\pm$ 2°C处具有吸热值的示差扫描量热法(DSC)温谱图的结晶奥贝胆酸C型,如通过Mettler DSC 823e仪器测量。在一个实施方案中,示差扫描量热法(DSC)温谱图具有在约98 $\pm$ 2°C处的吸热值,如通过Mettler DSC 823e仪器测量。

[0340] 在一个实施方案中,本发明涉及结晶奥贝胆酸,其中所述结晶奥贝胆酸是C型,且具有大于约90%的纯度。在一个实施方案中,所述结晶奥贝胆酸C型的纯度通过HPLC测定。在一个实施方案中,本发明涉及结晶奥贝胆酸C型或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物。在一个实施方案中,溶剂合物是水合物。在一个实施方案中,纯度大于约92%。在一个实施方案中,纯度大于约94%。在一个实施方案中,纯度大于约96%。在一个实施方案中,纯度大于约98%。在一个实施方案中,纯度大于约99%。

[0341] 在一个实施方案中,本发明涉及结晶奥贝胆酸,其中所述结晶奥贝胆酸是C型,并具有大于约90%的效能。在一个实施方案中,所述结晶奥贝胆酸C型的纯度通过HPLC和/或本领域已知的其它分析程序测定。在一个实施方案中,本发明涉及结晶奥贝胆酸C型或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物。在一个实施方案中,溶剂合物是水合物。在一个实施方案中,效能大于约92%。在一个实施方案中,效能大于约94%。在一个实施方案中,效能大于约96%。在一个实施方案中,效能大于约98%。在一个实施方案中,效能大于约99%。

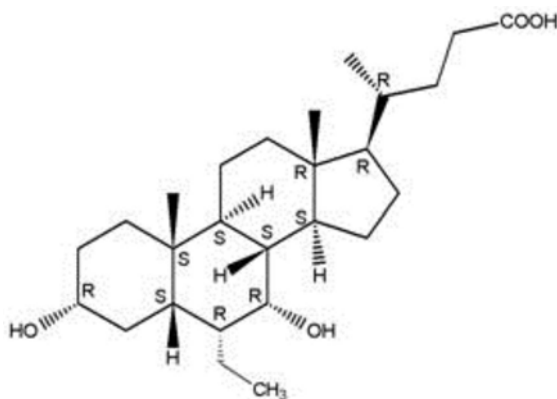
[0342] 在一个实施方案中,本发明涉及含有总共小于约4%的一种或多种选自以下杂质的结晶奥贝胆酸C型:6-乙基乌索脱氧胆酸、3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-cho-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸、3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、鹅脱氧胆酸和3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,总杂质小于约3.8%。在一个实施方案中,总杂质小于约3.6%。

[0343] 本申请的实施例3提供奥贝胆酸的这种新晶体形式的全面表征。

[0344] 获得奥贝胆酸的单晶X射线结构,并指定绝对立体化学。例如,在以0.1°C/分钟冷却至5°C接着在室温/50°C8小时周期成熟1周后,由奥贝胆酸从乙腈溶液中重结晶获得的晶体,测定结晶奥贝胆酸G型的单晶X射线结构。

[0345] 结构是正交晶系的,空间群P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>,在不对称单元中含有1分子的奥贝胆酸。最终的R1[I>2 $\sigma$ (I)]=3.22%。分子的绝对立体化学如下所示用Flack参数=-0.01(13)测定。该结构有序(no disorder)。

[0346]



[0347] 进行了奥贝胆酸1型(非晶体)与结晶奥贝胆酸F型的生物利用度研究(实施例7)。研究结果显示固体奥贝胆酸的物理状态在口服给予受试者时可在分子的生物利用度中起作用。口服给药的血浆动力学和肠吸收的效率和固体奥贝胆酸1型(非晶体)和结晶F型的药代动力学按照本领域已知方法评价。本发明的实施例8显示在给予奥贝胆酸的1型或F型后的奥贝胆酸血浆浓度相对于时间的概况、 $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 和AUC(参见图37-38)。结晶F型具有比奥贝胆酸1型(非晶体)高的生物利用度。血浆概况表明F型更有效地吸收(较高的AUC),甚至动力学更有规律,反映了药物在肠内容物中的最佳分布。

[0348] 奥贝胆酸1型(非晶体)的水溶性比F型略高。F型显得是稳定的,因为热解重量分析(TGA)在所研究的温度范围内未显示任何重量减轻。

[0349] 基本上纯的奥贝胆酸

[0350] 本申请提供基本上纯的奥贝胆酸及其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物:

[0351]



[0352] 药学活性成分奥贝胆酸的其它名称为INT-747、3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、6 $\alpha$ -乙基-鹅脱氧胆酸、6-乙基-CDCA、6ECDCA和胆烷-24-酸,6-乙基-3,7-二羟基-, (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ )-。

[0353] 本申请提供包含奥贝胆酸1型的组合物和用于合成高纯度奥贝胆酸1型的方法,其是安全的且大规模生产奥贝胆酸。一方面,奥贝胆酸1型以商业规模方法生产。术语“商业规模方法”是指以至少约100克的单批次运行的方法。一方面,本申请的方法以高收率(>80%)和有限的杂质生产奥贝胆酸1型。

[0354] 本文所用术语“纯度”是指基于HPLC的奥贝胆酸的量。纯度以化合物的“有机”纯度为基础。纯度不包括水、溶剂、金属、无机盐等的任何量的度量。一方面,通过比较峰下面积,将奥贝胆酸的纯度与参比标准的纯度进行比较。另一方面,已知的纯度标准是奥贝胆酸参

比标准。一方面,奥贝胆酸具有大于约96%的纯度。一方面,奥贝胆酸具有大于约98%的纯度。例如,奥贝胆酸1型的纯度为96.0%、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%、96.6%、96.7%、96.8%、96.9%、97.0%、97.1%、97.2%、97.3%、97.4%、97.5%、97.6%、97.7%、97.8%、97.9%、98.0%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%。例如,奥贝胆酸1型的纯度为98.0%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%。例如,奥贝胆酸的纯度为98.0%、98.5%、99.0%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%。例如,奥贝胆酸的纯度是98.5%、99.0%或99.5%。在一个实施方案中,奥贝胆酸是奥贝胆酸1型。

[0355] 在一个实施方案中,本发明涉及纯度大于约98%的奥贝胆酸。在一个实施方案中,纯度通过HPLC测定。在另一个实施方案中,本发明涉及奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物。在一个实施方案中,纯度大于约98.5%。在一个实施方案中,纯度大于约99.0%。在一个实施方案中,纯度大于约99.5%。在一个实施方案中,奥贝胆酸是奥贝胆酸1型。

[0356] 本文所用术语“效能”是基于已知标准(例如约95%–约102%的接收标准)的量的奥贝胆酸的量的度量。效能考虑所有可能的杂质包括水、溶剂、有机和无机杂质。一方面,已知标准是奥贝胆酸。一方面,奥贝胆酸具有大于约96%的效能。一方面,奥贝胆酸具有大于约98%的效能。一方面,已知标准是奥贝胆酸。另一方面,效能是100%减水、硫酸灰分、残余溶剂和其它杂质内容物的量,其它杂质内容物例如6-乙基乌索脱氧胆酸、3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-cheto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸、3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、鹅脱氧胆酸和3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在另一个实施方案中,效能说明了因水、溶剂、金属、无机盐和其它无机或有机杂质所引起的杂质。例如,奥贝胆酸1型的效能为96.0%、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%、96.6%、96.7%、96.8%、96.9%、97.0%、97.1%、97.2%、97.3%、97.4%、97.5%、97.6%、97.7%、97.8%、97.9%、98.0%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%。一方面,奥贝胆酸1型的效能为98.0%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%。例如,奥贝胆酸的效能为98.0%、98.5%、99.0%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%。例如,奥贝胆酸的效能为98.5%、99.0%或99.5%。在一个实施方案中,奥贝胆酸是奥贝胆酸1型。

[0357] 在一个实施方案中,本发明涉及含有总共小于约2%的一种或多种选自以下杂质的奥贝胆酸:6-乙基乌索脱氧胆酸、3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-cheto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸、3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、鹅脱氧胆酸和3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,杂质总共小于约1.5%。在一个实施方案中,杂质总共小于约1.4%。在一个实施方案中,奥贝胆酸是奥贝胆酸1型。

[0358] 在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约10%的水、小于约9%的水、小于8%的

水、小于7%的水、小于6%的水、小于5%的水、小于4%的水、小于3%的水、小于2%的水或小于1%的水。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约1.2%的水。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约1.0%的水。在一个实施方案中,奥贝胆酸是奥贝胆酸1型。

[0359] 在另一个实施方案中,奥贝胆酸含有不超过 (NMT) 0.15%的6-乙基乌索脱氧胆酸和3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在另一个实施方案中,奥贝胆酸含有总共小于约0.07%的6-乙基乌索脱氧胆酸和3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有总共小于约0.06%的6-乙基乌索脱氧胆酸和3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有总共小于约0.05%的6-乙基乌索脱氧胆酸和3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸是奥贝胆酸1型。

[0360] 在一个实施方案中,奥贝胆酸含有不超过 (NMT) 0.15%的3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-cheto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.07%的3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-cheto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.06%的3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-cheto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.05%的3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-cheto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸是奥贝胆酸1型。

[0361] 在一个实施方案中,奥贝胆酸含有不超过 (NMT) 0.15%的6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.07%的6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.06%的6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.05%的6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸是奥贝胆酸1型。

[0362] 在一个实施方案中,奥贝胆酸含有不超过 (NMT) 3%的鹅脱氧胆酸(CDCA)。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约1%的CDCA。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.5%的CDCA。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.3%的CDCA。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.2%的CDCA。在一个实施方案中,奥贝胆酸是奥贝胆酸1型。

[0363] 在一个实施方案中,奥贝胆酸含有不超过 (NMT) 4%的CDCA和6-乙基乌索脱氧胆酸。

[0364] 在一个实施方案中,奥贝胆酸含有不超过 (NMT) 1.5%的3 $\alpha$  (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约1%的3 $\alpha$  (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.07%的3 $\alpha$  (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.06%的3 $\alpha$  (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸含有小于约0.05%的3 $\alpha$  (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸是奥贝胆酸1型。

#### [0365] 口服制剂和给药

[0366] 奥贝胆酸用于口服给药。在一个实施方案中,制剂经口服给药以预防或治疗FXR介导的疾病和病况。在一个实施方案中,制剂包含奥贝胆酸1型。在另一个实施方案中,制剂包含基本上纯的奥贝胆酸。

[0367] 适于口服给药的制剂可作为以下提供:独立单位,例如各含有预定量的奥贝胆酸

的片剂、胶囊剂、扁囊剂(药剂师用于提供药物的糯米胶囊剂)、锭剂;散剂或颗粒剂;水性或非水性液体中的溶液剂或混悬剂;或水包油或油包水乳剂。

[0368] 本发明的制剂可通过任何合适的方法制备,通常通过将奥贝胆酸与液体或细微的固体载体或两者按所需要的比例均匀和精细地混合,然后必要时,使所得混合物做成所需形状。

[0369] 例如可通过压制包含奥贝胆酸的粉末或颗粒和一种或多种任选成分(例如粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂或表面活性分散剂)的精细混合物,或通过模压活性成分粉末和惰性液体稀释剂的精细混合物,来制备片剂。

[0370] 例如,可根据受试者的体重,例如介于约30kg-约70kg之间的人,将一种或多种片剂给予以达到目标剂量水平。

[0371] 在一个实施方案中,受试者是儿童,制剂被用于治疗胆道闭锁。胆道闭锁,亦称为“肝外肝管缺失症(extrahepatic ductopenia)”和“进行性闭塞性胆管病(progressive obliterative cholangiopathy)”,是一种先天性或获得性肝病和所移植的肝同种异基因移植物慢性排斥的主要形式之一。在先天性形式中,肝和小肠间的胆总管闭塞或缺乏。获得性类型最常发生在自身免疫性疾病的情况下,是所移植的肝同种异基因移植物慢性排斥的主要形式之一。

[0372] 患胆道闭锁的婴儿和儿童患有具有所有以下常见伴随特征的进行性胆汁郁积:黄疸、瘙痒症、吸收不良伴生长迟缓、脂溶性维生素缺乏、高脂血症和最终肝硬化伴门静脉高压。如未诊断出,则该病况导致肝衰竭—但非核黄疸,因为肝仍能够结合胆红素,且结合的胆红素不能够跨越血脑屏障。病因未知。唯一有效的治疗无疑是手术,例如肝门肠吻合术或肝移植。

[0373] 在一个实施方案中,儿童进行肝门肠吻合术,其中当儿童出生时没有胆管或在出生时胆管完全闭塞时,肝门肠吻合术有效地为他们提供功能性胆管。

[0374] 除了上文明确提到的成分以外,考虑所述制剂类型,本发明的口服制剂可包括药学领域技术人员已知的其它作用剂。合适的口服制剂可包括矫味剂。

[0375] 在一个实施方案中,本发明涉及奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物的药物制剂,其中奥贝胆酸通过本发明的方法产生(奥贝胆酸1型)。在另一个实施方案中,制剂经口服给予。

[0376] 在一个实施方案中,制剂呈片剂形式。在另一个实施方案中,制剂包含奥贝胆酸和选自以下的一种或多种组分:微晶纤维素、羟基乙酸淀粉钠、硬脂酸镁、包衣材料或胶态二氧化硅。在一个实施方案中,包衣材料是Opadry®包衣材料。

[0377] 在另一个实施方案中,制剂包含约0.1mg-约1500mg奥贝胆酸/片。在另一个实施方案中,制剂包含约1mg-约100mg。在另一个实施方案中,制剂包含约1mg-约50mg。在另一个实施方案中,制剂包含约1mg-约30mg。在另一个实施方案中,制剂包含约4mg-约26mg。在另一个实施方案中,制剂包含约5mg-约25mg。在一个实施方案中,制剂包含约1mg-约2mg。在一个实施方案中,制剂包含约1.2mg-约1.8mg。在一个实施方案中,制剂包含约1.3mg-约1.7mg。在一个实施方案中,制剂包含约1.5mg。

[0378] 在一个实施方案中,制剂包含约1mg-约25mg奥贝胆酸/片。在一个实施方案中,制剂包含约1mg奥贝胆酸、约180-约190mg微晶纤维素、约10-约15mg羟基乙酸淀粉钠、约1-约

3mg硬脂酸镁和约5mg-约10mg包衣材料。在一个实施方案中,包衣材料是Opadry®包衣材料。

[0379] 在一个实施方案中,制剂包含约1mg-约25mg奥贝胆酸/片。在一个实施方案中,制剂包含约1mg奥贝胆酸、约185.0mg微晶纤维素、约12.0mg羟基乙酸淀粉钠、约2.0mg硬脂酸镁和约8.0mg包衣材料。在一个实施方案中,包衣材料是Opadry®包衣材料。

[0380] 在一个实施方案中,制剂包含约1mg-约25mg奥贝胆酸/片。在一个实施方案中,制剂包含约5mg奥贝胆酸、约175-约190mg微晶纤维素、约10-约15mg羟基乙酸淀粉钠、约1-约3mg硬脂酸镁和约5mg-约10mg包衣材料。在一个实施方案中,包衣材料是Opadry®包衣材料。

[0381] 在一个实施方案中,制剂包含约1mg-约25mg奥贝胆酸/片。在一个实施方案中,制剂包含约5mg奥贝胆酸、约181.0mg微晶纤维素、约12.0mg羟基乙酸淀粉钠、约2.0mg硬脂酸镁和约8.0mg包衣材料。在一个实施方案中,包衣材料是Opadry®包衣材料。

[0382] 在一个实施方案中,制剂包含约1mg-约25mg奥贝胆酸/片。在一个实施方案中,制剂包含约10mg奥贝胆酸、约170mg-约180mg微晶纤维素、约10mg-约15mg羟基乙酸淀粉钠、约1mg-约3mg硬脂酸镁和约5mg-约10mg包衣材料。在一个实施方案中,包衣材料为Opadry®包衣材料。

[0383] 在一个实施方案中,制剂包含约1mg-约25mg奥贝胆酸/片。在一个实施方案中,制剂包含约10mg奥贝胆酸、约176.0mg微晶纤维素、约12.0mg羟基乙酸淀粉钠、约2.0mg硬脂酸镁和约8.0mg包衣材料。在一个实施方案中,包衣材料为Opadry®包衣材料。

[0384] 在一个实施方案中,制剂包含约1mg-约25mg奥贝胆酸/片。在一个实施方案中,制剂包含约25mg奥贝胆酸、约150mg-约160mg微晶纤维素、约10mg-约15mg羟基乙酸淀粉钠、约1mg-约3mg硬脂酸镁、约5-约10mg包衣材料和约1-约10mg胶态二氧化硅。在一个实施方案中,包衣材料为Opadry®包衣材料。

[0385] 在一个实施方案中,制剂包含约1mg-约25mg奥贝胆酸/片。在一个实施方案中,制剂包含约25mg奥贝胆酸、约157.0mg微晶纤维素、约12.0mg羟基乙酸淀粉钠、约2.0mg硬脂酸镁、约8.0mg包衣材料和约4.0mg胶态二氧化硅。在一个实施方案中,包衣材料为Opadry®包衣材料。

[0386] 除非另有说明,否则本文所用所有百分比和比率都以重量计。百分比二聚体杂质以面积百分比基础计,通常通过分析型HPLC定量。

[0387] 在整个说明书中,在组合物描述为具有、包括或包含具体组分时,预期组合物也基本上由或由所述组分组成。同样地,在方法或过程描述为具有、包括或包含具体的方法步骤时,所述方法也基本上由或由所述方法步骤组成。另外,应了解,步骤的顺序或执行某些操作的顺序并不重要,只要本发明保持可操作性即可。然而,可同时进行两个或更多个步骤或操作。

[0388] 片剂的配制

[0389]

薄膜衣片剂			
组分	每片的量	功能	参考标准
<b>1 mg 片剂</b>			
奥贝胆酸	1.0 mg*	API	HSE
微晶纤维素	185.0 mg*	填充剂/粘合剂	USP-NF/EP/JP
羟基乙酸淀粉钠	12.0 mg	崩解剂	USP-NF/EP/JP
硬脂酸镁	2.0 mg	润滑剂	USP-NF/EP/JP
Opadry® II 绿色、白色 或黄色	8.0 mg	包衣材料	HSE
总重	208.0 mg		
<b>5 mg 片剂</b>			
奥贝胆酸	5.0 mg*	API	HSE
微晶纤维素	181.0 mg*	填充剂/粘合剂	USP-NF/EP/JP
羟基乙酸淀粉钠	12.0 mg	崩解剂	USP-NF/EP/JP
硬脂酸镁	2.0 mg	润滑剂	USP-NF/EP/JP
Opadry® II 绿色、白色 或黄色	8.0 mg	包衣材料	HSE
总重	208.0 mg		
<b>10 mg 片剂</b>			
奥贝胆酸	10.0 mg*	API	HSE
微晶纤维素	176.0 mg*	填充剂/粘合剂	USP-NF/EP/JP
羟基乙酸淀粉钠	12.0 mg	崩解剂	USP-NF/EP/JP
硬脂酸镁	2.0 mg	润滑剂	USP-NF/EP/JP
Opadry® II 绿色、白色 或黄色	8.0 mg	包衣材料	HSE
总重	208.0 mg		
<b>25 mg 片剂</b>			
奥贝胆酸	25.0 mg*	API	HSE
微晶纤维素	157.0 mg*	填充剂/粘合剂	USP-NF/EP/JP
羟基乙酸淀粉钠	12.0 mg	崩解剂	USP-NF/EP/JP
硬脂酸镁	2.0 mg	润滑剂	USP-NF/EP/JP
胶态二氧化硅	4.0 mg	助流剂	USP-NF/EP/JP
Opadry® II 绿色、白色 或黄色	8.0 mg	包衣材料	HSE
总重	208.0 mg		

[0390] API: 活性药物成分

[0391] HSE= 内部规格

[0392] USP-NF= 美国药典国家处方集

[0393] Ph Eur= 欧洲药典

[0394] JP= 日本药典

[0395] \*所提供的奥贝胆酸量假设API是无水的且100%纯的; 实际量根据所用的药物批次的效能调节, 并相应减少微晶纤维素的量。

[0396] 在一个实施方案中, 片剂包含黄色Opadry®。在另一个实施方案中, 片剂包含白

色 Opadry®。在另一个实施方案中,片剂包含绿色 Opadry®。

[0397] 药物组合物

[0398] 奥贝胆酸,包括奥贝胆酸1型、奥贝胆酸的基本纯形式和奥贝胆酸的晶体形式或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物可用于多种医药目的。奥贝胆酸可用于预防或治疗FXR介导的疾病和病况的方法。在一个实施方案中,疾病或病况选自胆道闭锁、胆汁郁积性肝病、慢性肝病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、丙型肝炎感染、酒精性肝病、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、进行性纤维变性所致肝损伤、肝纤维变性和心血管疾病包括动脉粥样硬化、动脉硬化、高胆固醇血症和高脂血症。在一个实施方案中,奥贝胆酸1型可用于降低甘油三酯的方法。在一个实施方案中,结晶奥贝胆酸可用于降低甘油三酯的方法。奥贝胆酸1型或结晶奥贝胆酸可提高HDL。奥贝胆酸1型或结晶奥贝胆酸的其它作用包括降低碱性磷酸酶(ALP)、胆红素、ALT、AST和GGT。

[0399] 在一个实施方案中,本发明涉及包含奥贝胆酸和药学上可接受的载体的药物组合物,其中奥贝胆酸通过本发明的方法产生,例如,奥贝胆酸1型。在一个实施方案中,药物组合物包含基本纯的奥贝胆酸和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,药物组合物包含结晶奥贝胆酸和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,结晶奥贝胆酸是C型。

[0400] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗或预防受试者的FXR介导的疾病或病况的方法,所述方法包括给予有效量的通过本发明的方法产生的奥贝胆酸1型或其药物组合物。在一个实施方案中,本发明涉及治疗或预防受试者的FXR介导的疾病或病况的方法,所述方法包括给予有效量的通过本发明方法产生的基本纯的奥贝胆酸或其药物组合物。在一个实施方案中,本发明涉及治疗或预防受试者的FXR介导的疾病或病况的方法,所述方法包括给予有效量的结晶奥贝胆酸或其药物组合物。在另一个实施方案中,结晶奥贝胆酸是C型。在一个实施方案中,结晶奥贝胆酸是A型。在一个实施方案中,结晶奥贝胆酸是C型。在一个实施方案中,结晶奥贝胆酸是D型。在一个实施方案中,结晶奥贝胆酸是F型。在一个实施方案中,结晶奥贝胆酸是G型。

[0401] 在另一个实施方案中,疾病或病况是心血管疾病或胆汁郁积性肝病和用于降低甘油三酯。在另一个实施方案中,心血管疾病是动脉粥样硬化或高胆固醇血症。在另一个实施方案中,受试者是哺乳动物。在另一个实施方案中,哺乳动物是人。

[0402] 在另一个实施方案中,口服、胃肠外或局部给予化合物或药物组合物。在另一个实施方案中,口服给予化合物或药物组合物。

[0403] 在一个实施方案中,本发明涉及抑制患有胆汁郁积病况的受试者的纤维变性的方法,所述方法包括给予受试者有效量的奥贝胆酸或其药物组合物的步骤,其中奥贝胆酸通过本发明的方法产生。在一个实施方案中,本发明涉及抑制未患胆汁郁积病况的受试者的纤维变性的方法,所述方法包括给予受试者有效量的奥贝胆酸或其药物组合物的步骤,其中奥贝胆酸通过本发明的方法产生。在实施方案中,待受抑制的纤维变性存在于其中表达FXR的器官中。

[0404] 在一个实施方案中,胆汁郁积病况定义为具有异常升高的碱性磷酸酶、7-谷氨酰转肽酶(GGT)和5'核苷酸酶的血清水平。在另一个实施方案中,胆汁郁积病况进一步定义为呈现至少一个临床症状。在另一个实施方案中,症状为瘙痒(瘙痒症)。在另一个实施方案中,纤维变性选自肝纤维变性、肾纤维变性和肠纤维变性。在另一个实施方案中,胆汁郁积



病况选自原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、药物诱发性胆汁郁积、遗传性胆汁郁积和妊娠肝内胆汁淤积症。在另一个实施方案中,受试者未患与选自以下疾病或病况有关的胆汁郁积病况:原发性肝癌和胆道癌、转移性癌、脓毒症、长期胃肠道外全面营养、囊性纤维化和肉芽肿肝病。

[0405] 在另一个实施方案中,受试者患有与选自以下疾病有关的肝纤维变性:乙型肝炎;丙型肝炎;寄生虫性肝病;移植后细菌、病毒和真菌感染;酒精性肝病 (ALD);非酒精性脂肪肝病 (NAFLD);非酒精性脂肪性肝炎 (NASH);由甲氨蝶呤、异烟肼、酚丁、甲基多巴、氯丙嗪、甲苯磺丁脲或胺碘达隆诱发的肝病;自身免疫性肝炎;结节病;肝豆状核变性 (Wilson's disease);血色素沉积症;戈谢病 (Gaucher's disease);III、IV、VI、IX和X型糖原贮积病; $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶缺乏;泽尔韦格综合征 (Zellweger syndrome);酪氨酸血症;果糖血症;半乳糖血症;与巴德-基亚里综合征 (Budd-Chiari syndrome)、静脉闭塞性病或门静脉血栓形成有关的血管紊乱;和先天性肝纤维变性。

[0406] 在另一个实施方案中,受试者患有与选自以下疾病有关的肠纤维变性:克罗恩病 (Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、放射后结肠炎和显微镜下结肠炎。

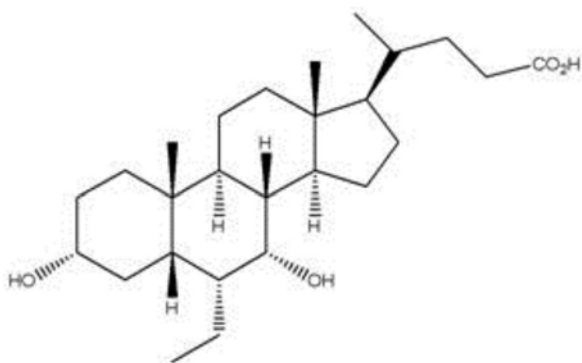
[0407] 在另一个实施方案中,受试者患有与选自以下疾病有关的肾纤维变性:糖尿病性肾病、高血压肾硬化、慢性肾小球性肾炎、慢性移植物肾小球病、慢性间质性肾炎和多囊肾病。

[0408] 定义

[0409] 为方便起见,在此汇集了用于本说明书、实施例和随附权利要求书中的某些术语。

[0410] 本文所用术语“奥贝胆酸”或“OCA”是指具有以下化学结构的化合物:

[0411]

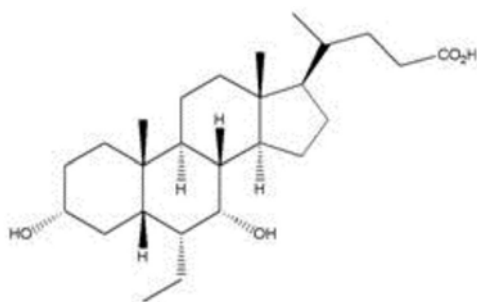


。奥贝胆酸的其它化学名称包括:3 $\alpha$ ,7

$\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、6 $\alpha$ -乙基-鹅脱氧胆酸、6-乙基-CDCA、6ECDCA、胆烷-24-酸、6-乙基-3,7-二羟基-, (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ )-和INT-747。奥贝胆酸的CAS登记号是459789-99-2。该术语是指奥贝胆酸的所有形式,例如非晶体、晶体和基本纯的。

[0412] 本文所用术语“结晶奥贝胆酸”是指具有以下化学结构的化合物的任何晶体形式:

[0413]



。结晶奥贝胆酸意指化合物在三维空间中结晶

成为特定的晶体堆积排列或具有外面平面的化合物。奥贝胆酸(或其药学上可接受的盐、氨基酸缀合物、溶剂合物)的晶体形式可结晶成不同的晶体堆积排列,其全部都具有相同的奥贝胆酸的元素组成。不同的晶体形式通常具有不同的X射线衍射图、红外线谱、熔点、密度硬度、晶形、光学性质和电性质、稳定性和溶解度。重结晶溶剂、结晶速率、保存温度和其它因素可使一种晶体形式占优势。奥贝胆酸的晶体可通过在不同条件下(例如不同溶剂、温度等)结晶来制备。

[0414] 本文所用术语“结晶奥贝胆酸C型”是指具有基本类似于图5所示X射线衍射图的X射线衍射图的奥贝胆酸的晶体形式,例如实施例3中表征的晶体形式。

[0415] 本文所用术语“基本上纯的奥贝胆酸”是指具有大于约95%的效能的奥贝胆酸。奥贝胆酸的效能考虑奥贝胆酸样品中的杂质,包括例如水、溶剂和其它有机和无机杂质。在另一个实施方案中,效能的已知标准为100%奥贝胆酸,通过从100%的已知标准减去杂质(例如溶剂、水和其它有机和无机杂质)的百分比,求出效能。一方面,无机杂质包括例如无机盐和硫酸灰分。一方面,有机杂质包括6-乙基乌索脱氧胆酸、3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-choleto-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、6 $\beta$ -乙基鹅脱氧胆酸、3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6-亚乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸、鹅脱氧胆酸和3 $\alpha$ (3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酰基氧基)-7 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸。杂质的量可通过本领域已知方法测定,例如HPLC、NMR或出自美国药典或欧洲药典的方法或这些方法中两种或更多种的组合。

[0416] 本文所用术语“纯度”是指获自例如HPLC的化合物的化学分析。在一个实施方案中,通过用于比较的各个峰的峰下面积,对化合物的纯度与参比标准(例如奥贝胆酸)的纯度进行比较。在一个实施方案中,纯度说明样品中的有机杂质。

[0417] 本文所用术语“反应混合物”是指一种或多种物质混合在一起的混合物。在一个实施方案中,物质的混合或组合引起一种或多种原始物质的化学转化或改变。

[0418] 本文所用术语“奥贝胆酸1型”是指非晶奥贝胆酸。在一个实施方案中,奥贝胆酸的这种形式通过结晶奥贝胆酸作为合成中间体来产生。例如,奥贝胆酸的这种形式通过结晶奥贝胆酸C型作为合成中间体,通过本申请的方法产生。在一个实施方案中,奥贝胆酸1型是用作药理学活性成分的形式。有关更多详情参见实施例5。

[0419] “治疗”包括导致病况、疾病、病症等改善的任何作用,例如减轻、降低、调节或消除。疾病状态的“治疗”或“医治”包括:抑制疾病状态,即阻止疾病状态或其临床症状的发展;或缓解疾病状态,即引起疾病状态或其临床症状的暂时或永久消退。

[0420] “预防”疾病状态包括在可能暴露于疾病状态或有疾病状态倾向,但尚未遭受或显示疾病状态的症状的受试者中使疾病状态的临床症状不发生。

[0421] “疾病状态”意指任何疾病、病症、病况、症状或适应症。

[0422] 本文所用术语“有效量”是指在给予适当剂量后产生急性或慢性治疗作用的奥贝胆酸(例如FXR激活性配体)的量。作用包括预防、纠正、抑制或逆转疾病/病况(例如肝、肾或肠的纤维变性)的症状、病征和基础病理和相关并发症至任何可检测的程度。

[0423] “治疗有效量”意指当给予哺乳动物用于治疗疾病时,足以对疾病实现所述治疗的奥贝胆酸的量。“治疗有效量”将随奥贝胆酸、疾病及其严重程度和待治疗的哺乳动物的年龄、体重等而变化。

[0424] 奥贝胆酸的治疗有效量可与用于给予人或动物的药学上可接受的载体一起配制。

因此,可通过例如口服、胃肠外或局部途径给予奥贝胆酸或其制剂,以提供有效量的化合物。在备选实施方案中,按照本发明制备的奥贝胆酸可用来包覆或浸渍医疗装置,例如支架。

[0425] 本文所用“药理作用”包括在达到预期治疗目的的受试者中产生的作用。在一个实施方案中,药理作用意指接受治疗的受试者的主要适应症受到防止、缓解或减轻。例如,药理作用是在受治疗的受试者中导致主要适应症受到防止、缓解或减轻的药理作用。在另一个实施方案中,药理作用意指接受治疗的受试者的主要适应症的病症或症状受到防止、缓解或减轻。例如,药理作用是在受治疗的受试者中导致主要适应症受到防止或减轻的药理作用。

[0426] 本发明还包括同位素标记的奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物,其与本发明化学式和下文所述的那些相同,只是一个或多个原子被原子质量或质量数不同于天然最常见的原子质量或质量数的原子置换。可掺入奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氟的同位素,例如<sup>3</sup>H、<sup>11</sup>C、<sup>14</sup>C和<sup>18</sup>F。

[0427] 含有上述同位素和/或其它原子的其它同位素的奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物在本发明的范围内。同位素标记的奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物,例如放射性同位素例如<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C掺入其中的那些,可用于药物和/或底物组织分布测定法。因其容易制备和可检测所致,氚化(即<sup>3</sup>H)和碳-14(即<sup>14</sup>C)同位素是特别优选的。另外,被较重同位素(例如氘即<sup>2</sup>H)取代,可提供产生自较大代谢稳定性的某些治疗优势,例如体内半寿期延长或剂量需要量降低,因此,在某些情况下可能是优先的,一般可用容易获得的同位素标记的试剂取代非同位素标记的试剂,通过进行本发明的流程和/或实施例中公开的程序,来制备同位素标记的奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物。在一个实施方案中,奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物不是同位素标记的。在一个实施方案中,氚化奥贝胆酸可用于生物分析法。在另一个实施方案中,奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物是放射性标记的。

[0428] “几何异构体”意指其存在归因于双键周围的位阻旋转的非对映异构体。这些构型在其名称中通过前缀顺式和反式或Z和E区分,它表明了按照Cahn-Ingold-Prelog原则,基团位于分子双键的同侧或相对侧。

[0429] “溶剂合物”意指含有化学计算量或非化学计算量的溶剂的溶剂加成形式。奥贝胆酸可具有在结晶固体状态中截留固定摩尔比率的溶剂分子的趋势,因此形成溶剂合物。如果溶剂为水,则所形成的溶剂合物是水合物,在溶剂是醇时,所形成的溶剂合物是醇化物。水合物通过水的一个或多个分子与水在其中保持其分子状态为H<sub>2</sub>O的物质之一结合而形成,所述结合能够形成一种或多种水合物。另外,本发明的化合物,例如化合物的盐,可以水合或未水合的(无水)形式或作为与其它溶剂分子的溶剂合物存在。水合物的非限制性实例包括一水合物、二水合物等。溶剂合物的非限制性实例包括乙醇溶剂合物、丙酮溶剂合物等。

[0430] “互变异构体”是指其结构在原子排列中显著不同,但以容易和快速平衡存在的化合物。要理解,奥贝胆酸可描述为不同的互变异构体。还应理解,当本发明的奥贝胆酸和合

成中间体具有互变异构形式时,所有互变异构形式预期落入本发明的范围内,奥贝胆酸的命名不排除任何互变异构体形式。本发明的奥贝胆酸和合成中间体可以几种互变异构形式存在,包括酮-烯醇。例如,在酮-烯醇互变异构中,发生电子和氢原子的同时位移。互变异构体作为在溶液中互变异构体组的混合物存在。在固体形式中,通常一种互变异构体占优势。虽然可能描述了一种互变异构体,但本发明包括本发明化合物的全部互变异构体。

[0431] 因此要理解的是,产生于不对称碳原子的异构体(例如所有对映异构体和非对映异构体)包括在本发明的范围内,除非另有说明。可通过经典分离技术并通过立体化学上控制的合成,以基本上纯的形式获得所述异构体。此外,本申请书中论述的结构和其它化合物和部分还包括其全部互变异构体。适当时,烯烃可包括E-或Z-几何结构。奥贝胆酸和合成中间体可以立体异构体形式存在,因此可作为各个立体异构体或作为混合物产生。

[0432] “药物组合物”是含有奥贝胆酸的呈适于给予受试者的形式的制剂。在一个实施方案中,药物组合物是散装形式或单位剂型。以剂量单位形式配制组合物以易于给药和剂量均匀性,将是有利的。本文所用剂量单位形式是对于待治疗的受试者适于作为单位剂量的物理独立单位;每个单位含有经计算以产生所需治疗作用的预定量的活性试剂以及所需的药用载体。本发明的剂量单位形式的规格受制于或直接取决于活性试剂的特殊性质和待实现的特定治疗作用,以及调节用于治疗个体的所述活性剂领域的内在限制。

[0433] 单位剂型是多种形式的任一种,包括例如胶囊剂、IV袋、片剂、气雾剂吸入器上的单流向泵或小瓶。组合物的单位剂量中的奥贝胆酸(例如奥贝胆酸或其药学上可接受的盐、溶剂合物或氨基酸缀合物的制剂)的量是有效量,并随所涉及的具体治疗而变化。本领域的技术人员应认识到,有时需要根据患者的年龄和病况对剂量作例行变化。剂量还将取决于给药途径。考虑多种途径,包括口服、经肺、直肠、胃肠外、经皮、皮下、静脉内、肌内、腹膜内、吸入、含服、舌下、胸膜内、鞘内、鼻内等。用于本发明化合物的局部或经皮给药的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶、溶液剂、贴剂和吸入剂。在一个实施方案中,奥贝胆酸在无菌情况下与药学上可接受的载体混合,并与需要的任何防腐剂、缓冲剂或抛射剂混合。

[0434] 术语“闪释剂量(flash dose)”是指是快速分散性剂型的奥贝胆酸制剂。

[0435] 术语“即释”定义为奥贝胆酸以相对短的时间(一般至多约60分钟)从剂型中释放。术语“改良释放”的定义包括延缓释放、延长释放和脉冲释放。术语“脉冲释放”定义为药物从剂型中的一系列释放。术语“延时释放”或“延长释放”定义为奥贝胆酸在一段长的时间内从剂型中持续释放。

[0436] “受试者”包括哺乳动物,例如人、伴侣动物(例如狗、猫、鸟等)、农场动物(例如牛、绵羊、猪、马、禽等)和实验动物(例如大鼠、小鼠、豚鼠、鸟等)。在一个实施方案中,受试者是人。在一个实施方案中,受试者是儿童(例如约30kg-约70kg)。在一个实施方案中,儿童进行肝门肠吻合术,其中当儿童出生时没有胆管或在出生时胆管完全闭塞时,肝门肠吻合术有效地为他们提供功能性胆管。

[0437] 本文所用短语“药学上可接受的”是指在合理医学判断的范围内,适用于与人类和动物的组织接触而无过度毒性、刺激性、变态反应或其它问题或并发症、与合理的受益风险比相当的那些化合物、材料、组合物、载体和/或剂型。

[0438] “药学上可接受的赋形剂”意指可用于制备药物组合物的基本上安全、无毒且生物

学或其它方面都无不良的赋形剂,包括对于兽药用以及人药物使用是可接受的赋形剂。用于本说明书和权利要求书的“药学上可接受的赋形剂”包括一种和一种以上所述赋形剂。

[0439] 虽然可在没有任何配制的情况下直接给予奥贝胆酸,但奥贝胆酸通常以包含药学上可接受的赋形剂和奥贝胆酸的药物制剂的形式给予。这些制剂可通过多种途径给予,包括口服、含服、直肠、鼻内、经皮、皮下、静脉内、肌内和鼻内。本文在题为“口服制剂和给药”的部分中进一步描述了奥贝胆酸的口服制剂。

[0440] 在一个实施方案中,可经皮给予奥贝胆酸。为了经皮给予,需要经皮递送装置(“贴剂”)。所述经皮贴剂可用来提供本发明化合物的受控量的连续或不连续的输注。用于递送药剂的经皮贴剂的制备和使用是本领域众所周知的。参见例如美国专利号5,023,252。可制备所述贴剂用于药剂的连续、脉动或按需递送。

[0441] 在本发明的一个实施方案中,提供制剂中包含适于含服和/或舌下或经鼻给药的至少上述奥贝胆酸的药物制剂。该实施方案提供以避免胃并发症的方式给予奥贝胆酸,例如通过胃系统和/或经过肝的首过代谢。该给药途径还可减少吸收时间,提供更快速起效的治疗益处。本发明的化合物可提供特别有利的溶解特征以利于舌下/含服制剂。所述制剂通常需要相对高浓度的活性成分以将足量的活性成分递送到舌下/口腔黏膜的有限表面积上达制剂与所述表面积接触的相对短的持续时间,以供吸收活性成分。因此,非常高的奥贝胆酸活性,结合其高溶解度,有利于其舌下/含服制剂的适合性。

[0442] 奥贝胆酸优选以单位剂型配制,各个剂量含有约0.1mg-约1500mg。在另一个实施方案中,制剂包含约1mg-约100mg。在另一个实施方案中,制剂包含约1mg-约50mg。在另一个实施方案中,制剂包含约1mg-约30mg。在另一个实施方案中,制剂包含约4mg-约26mg。在另一个实施方案中,制剂包含约5mg-约25mg。在一个实施方案中,制剂包含约1mg-约2mg。在一个实施方案中,制剂包含约1.2mg-约1.8mg。在一个实施方案中,制剂包含约1.3mg-约1.7mg。在一个实施方案中,制剂包含约1.5mg。术语“单位剂型”是指适于作为单位剂量用于人类受试者和其它哺乳动物的物理独立单位,每个单位含有经计算产生所需治疗作用的预定量的活性物质以及合适的上述药用赋形剂。

[0443] 奥贝胆酸通常在广泛的剂量范围内有效。例如,每日剂量通常落入约0.0001-约30mg/kg体重的范围内。在治疗成人时,呈单剂量或分剂量的约0.1-约15mg/kg/天的范围是特别优选的。在实施方案中,制剂包含约0.1mg-约1500mg。在另一个实施方案中,制剂包含约1mg-约100mg。在另一个实施方案中,制剂包含约1mg-约50mg。在另一个实施方案中,制剂包含约1mg-约30mg。在另一个实施方案中,制剂包含约4mg-约26mg。在另一个实施方案中,制剂包含约5mg-约25mg。在一个实施方案中,制剂包含约1mg-约2mg。在一个实施方案中,制剂包含约1.2mg-约1.8mg。在一个实施方案中,制剂包含约1.3mg-约1.7mg。在一个实施方案中,制剂包含约1.5mg。然而,应理解,实际给予的奥贝胆酸的量可通过医生根据相关情况,包括待治疗的病况、所选的给药途径、所给予的奥贝胆酸的形式、各个患者的年龄、体重和反应及患者症状的严重程度来决定,因此上述剂量范围无意以任何方式限制本发明的范围。在某些情况下,低于上述范围下限的剂量水平可能就足够,而在其它情况下,可应用还更大的剂量而不引起任何有害副作用,前提是首先将所述较大的剂量分成几个较小的剂量以在一整天内给予。

[0444] “本发明的方法”是指如本文所述制备奥贝胆酸的方法,其中所述方法包括结晶奥

贝胆酸。

[0445] “纤维变性”是指涉及组织或器官中发生的过量纤维结缔组织(例如疤痕组织)的病况。这种疤痕组织的产生可在响应因疾病、创伤、化学毒性等造成的感染、炎症或器官损伤而发生。纤维变性可发生在多个不同的组织和器官中,包括肝、肾、肠、肺、心脏等。

[0446] 本文所用术语“抑制”或“阻止”是指对疾病或病况的发生或发展的任何可检测的积极作用。所述积极作用可包括延缓或防止疾病或病况的至少一个症状或病征的发作,缓解或逆转症状或病征,且减慢或防止症状或病征进一步恶化。

[0447] 本文所用“胆汁郁积病况”是指其中发生在肝或胆管中的胆汁从肝中的分泌受损或受阻的任何疾病或病况。肝内胆汁郁积和肝外胆汁郁积是胆汁郁积病况的两种类型。肝内胆汁郁积(发生在肝内)最常见于原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、脓毒症(全身性感染)、急性酒精性肝炎、药物毒性、胃肠道外全面营养(静脉内提供营养)、恶性肿瘤、囊性纤维化和妊娠。肝外胆汁郁积(发生在肝外)可由胆管肿瘤、狭窄、囊肿、憩室、胆总管中结石形成、胰腺炎、胰腺肿瘤或假囊肿和由附近器官的肿块或肿瘤所致压迫引起。

[0448] 胆汁郁积病况的临床症状和病征包括:瘙痒(瘙痒症)、疲劳、黄疸性皮肤或眼、无法消化某些食物、恶心、呕吐、灰白色大便、赤尿和右上象限腹痛。在临床上可根据一套标准临床实验室试验诊断和跟踪患有胆汁郁积病况的患者,包括测量患者血清中的碱性磷酸酶、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶(GGT)、5'核苷酸酶、胆红素、胆汁酸和胆固醇水平。总的来说,如果诊断标志物碱性磷酸酶、GGT和5'核苷酸酶所有3种的血清水平被视为异常升高,则患者被诊断为患有胆汁郁积病况。这些标志物的正常血清水平可从实验室到实验室和从方法到方法改变至某种程度,这取决于试验方案。因此,医生可根据具体实验室和试验方法,确定什么是各种标志物异常升高的血液水平。例如,患有胆汁郁积病况的患者血液中一般有大于约125IU/L碱性磷酸酶、大于约65IU/L GGT和大于约17NIL 5'核苷酸酶。由于血清标志物水平的变化性,除至少一种上述症状(例如瘙痒(瘙痒症))以外,可根据这3种标志物的水平异常来诊断胆汁郁积病况。

[0449] 术语“器官”是指由细胞和组织组成并在生物体中进行某些特定功能的分化结构(如在心脏、肺、肾、肝等中)。该术语还包括执行功能或在活动中协调合作的身体部件(例如构成视器的眼和相关结构)。术语“器官”还包括可能发育成为完整结构的分化细胞和组织的任何部分结构(例如肝叶或肝瓣)。

[0450] 本文引用的所有公开文本和专利文件通过引用结合到本文中,就像所述公开文本或文件具体而单独指明通过引用结合到本文中一样。公开文本和专利文件的引用无意承认任一个是有关的现有技术,也不构成对所述文件的内容或日期的任何承认。虽然现已通过书面描述对本发明进行了描述,但本领域技术人员应认识到,本发明可在各种实施方案中予以实践,上面的描述和下面的实施例用于说明目的而非对随附权利要求书进行限制。

[0451] 在本说明书中,单数形式还包括复数,除非文中另有明确说明。除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的含义。在有冲突的情况下,以本说明书为准。

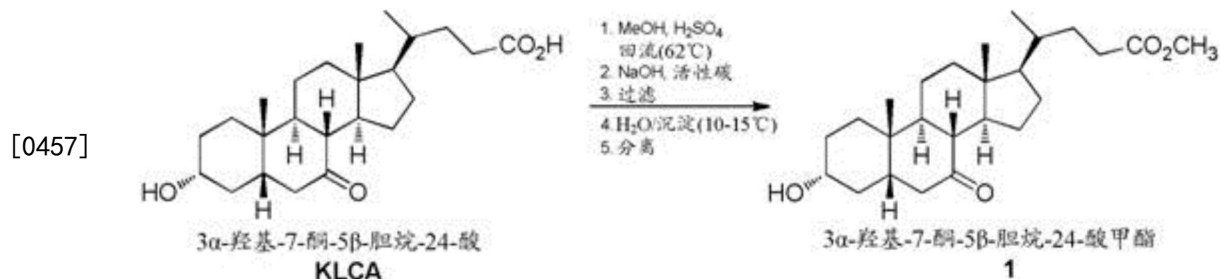
[0452] 除非另有说明,否则本文所用的所有百分比和比率以重量计。

[0453] 实施例

[0454] 实施例1:奥贝胆酸的合成

[0455] 本合成程序中所提及的化合物编号是指流程1中和对应于各步骤的反应中的化合物编号。

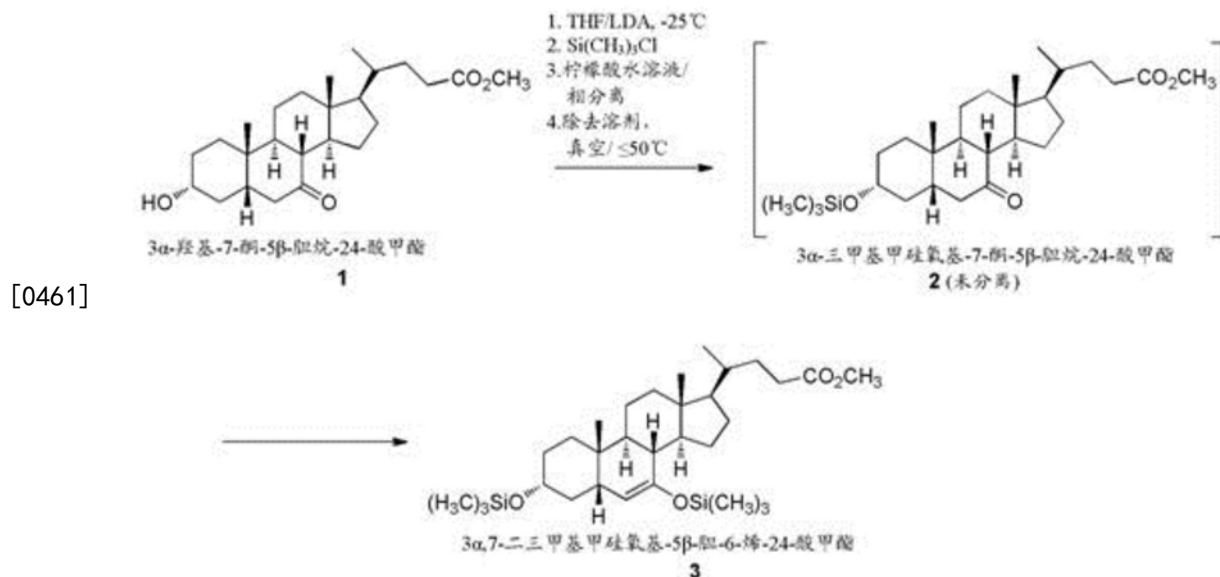
[0456] 步骤1-3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (1) 的制备:



[0458] 反应1: 7-酮石胆酸 (KLCA) 的C-24羧酸的酯化

[0459] 在酸性催化剂(硫酸, 1.0mL)存在下, 使用甲醇(2500mL)使3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (KLCA; 500.0g, 1.28mol) 酯化, 并加热直到62°C-64°C约3小时, 得到3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (1)。在该反应中, 甲醇起甲基化试剂以及反应溶剂的作用。对于后处理, 用氢氧化钠溶液 (2N) 调节pH值至pH7.0-7.5。溶液用活性碳 (25g) 处理约30分钟, 过滤除去碳固体物。或者, 溶液不用活性碳处理。为了沉淀产物, 在15分钟内加入10°C-15°C的水 (625mL), 并加入晶种材料。在10°C-15°C下搅拌反应混合物1小时。在约20-25分钟内加入另一部分水 (1875mL)。在10°C-15°C下搅拌产物悬浮液30分钟。产物用离心机分离, 用甲醇和水的混合物 (1:1, 350mL) 洗涤。通过Karl Fischer (KF) 定量测定湿料的含水量。将材料在转筒式干燥机中在NMT 70°C下真空干燥。材料也可用于下一步骤而无需干燥。收率 (以干燥产物计算) 为501.4g (1.24mol, 96.8%)。

[0460] 步骤2-3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -二三甲基甲硅氧基-5 $\beta$ -胆-6-烯-24-酸甲酯 (3) 的制备:

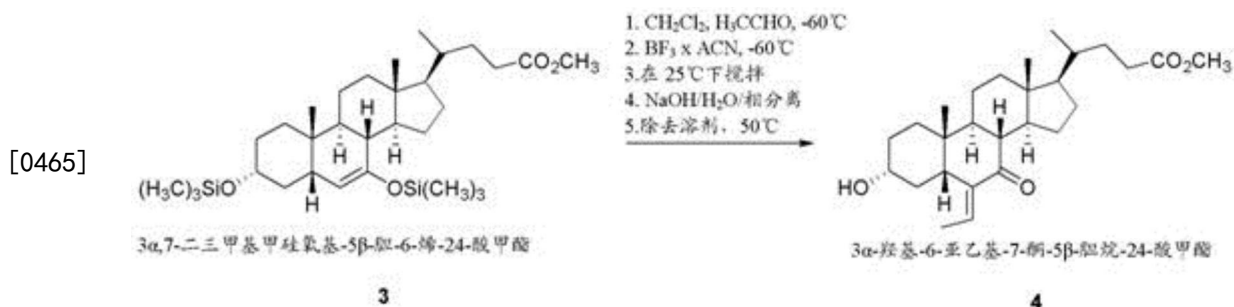


[0462] 反应2: 从7-酮石胆酸甲酯形成硅烯醇醚

[0463] 将含有残余的水和甲醇的化合物1 (60.69g, 150mmol, 以干物质计算) 装入惰性条件下的反应器中, 并溶于四氢呋喃 (THF, 363mL) 中。通过在约65°C和常压下重复共沸蒸馏除去水和甲醇。需要时将THF加入残余物中, 重复蒸馏约4次。剩余的溶液必须具有≤0.05%的最终含水量 (Karl Fischer滴定)。将该溶液预冷至-20°C至-25°C, 然后在约30-45分钟中加

入三甲基氯硅烷 (73.33g, 675mmol, 4.5当量)。在氮气氛下, 将二异丙基氨基锂 (28% LDA 溶液, 900mmol) 和 THF (504mL) 装入单独的惰性反应器中, 并冷却至  $-20^{\circ}\text{C}$  至  $-25^{\circ}\text{C}$ 。将化合物1的无水冷却溶液、THF (84mL) 和三甲基氯硅烷装入  $-20^{\circ}\text{C}$  至  $-25^{\circ}\text{C}$  下的 LDA 溶液中。然后, 搅拌反应混合物约2小时。对于后处理, 将反应混合物加入  $2^{\circ}\text{C}$ – $8^{\circ}\text{C}$  的预冷的柠檬酸水溶液 (34.6g, 在300mL中) 中。在加入后, 分离水相并弃去。在最大  $50^{\circ}\text{C}$  下通过真空蒸馏从有机相中除去液体。分离的残余物含有化合物3和一些残余溶剂, 并“照原样”用于下一步骤。

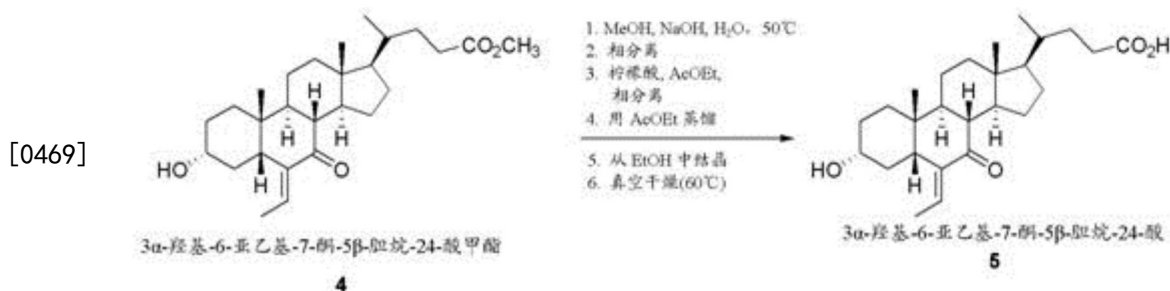
[0464] 步骤3-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸甲酯 (4) 的制备:



[0466] 反应3: 硅烯醇醚和乙醛的羟醛缩合

[0467] 将THF中的化合物3 (164.68g, 300mmol, 以干燥物质计算) 溶液装入惰性反应器中。在  $50^{\circ}\text{C}$  的最大温度下, 真空馏出残余量的THF。将残余物的含水量限于  $\leq 0.5\%$  (Karl Fischer 滴定) 以继续进行。然后将残余物溶于二氯甲烷 (200mL), 并预冷至  $-60^{\circ}\text{C}$  至  $-65^{\circ}\text{C}$ 。然后加入乙醛 (33.8mL, 600mmol)。在氮气氛下, 将二氯甲烷 (700mL) 和三氟化硼 (乙腈中的 16wt% 溶液, 318g, 750mmol) 乙腈络合物装入单独的反应器中, 然后冷却至  $-60^{\circ}\text{C}$  至  $-65^{\circ}\text{C}$ 。在  $-60^{\circ}\text{C}$  至  $-65^{\circ}\text{C}$  下, 加入无水化合物3溶液。在  $-60^{\circ}\text{C}$  至  $-65^{\circ}\text{C}$  下搅拌反应混合物约2小时, 加热至  $23^{\circ}\text{C}$ – $28^{\circ}\text{C}$ , 再搅拌约3小时, 并冷却至约  $2^{\circ}\text{C}$ – $10^{\circ}\text{C}$  用于水解/后处理。对于后处理, 将反应器中的冷却溶液加入 50%wt 苛性钠 (40mL) 和 660mL 的水的预冷水性溶液中。在充分搅拌约10分钟后, 分离各相, 将 (下层) 有机层转移到单独的反应器中。在 NMT  $50^{\circ}\text{C}$  下通过蒸馏尽可能地除去溶剂。将由化合物4和一些剩余的乙腈和二氯甲烷组成的残余物装入滚筒中。化合物4A (E/Z-异构体的混合物) 也可通过上述用于步骤3的方法制备。

[0468] 步骤4-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸 (5) 的制备:



[0470] 反应4:C-24酯的皂化

[0471] 将化合物4 (258.37g, 600mmol, 以干燥物质计算) 装入惰性反应器中。在 NMT  $50^{\circ}\text{C}$  的温度下, 真空馏出残余量的溶剂。将残余物溶于甲醇 (360mL) 和水 (54mL) 中, 加入苛性钠 50%wt (54mL)。将反应混合物加热至  $49^{\circ}\text{C}$ – $53^{\circ}\text{C}$ , 在该温度下搅拌至少2小时。检查反应混合物的pH以证实pH为  $>12$ 。如果  $\text{pH} < 12$ , 则再加入NaOH, 重复2小时反应时间。溶液用水 (1000mL) 稀释, 并调节温度至  $25^{\circ}\text{C}$ – $35^{\circ}\text{C}$ 。对于后处理, 使反应混合物静置至少30分钟。分离各相, 将

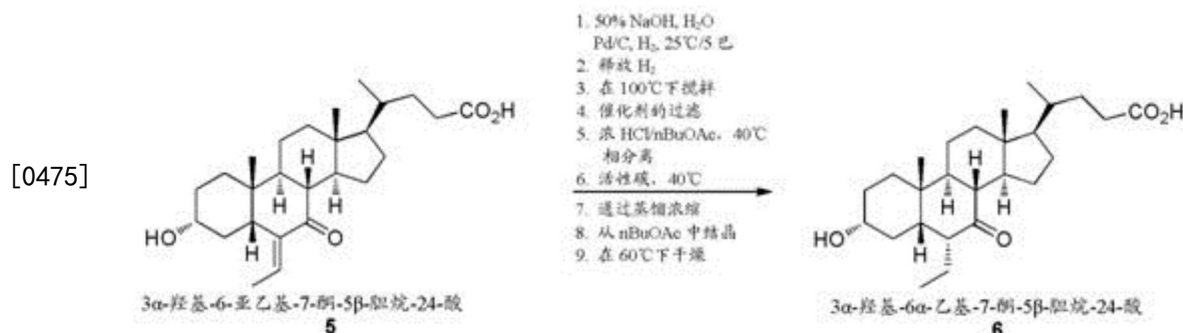


下层的水层转移到单独的反应器,弃去有机层。加入乙酸乙酯(1400mL)和柠檬酸水溶液(244g,在480mL中)以充分搅拌进入水层中。在25℃-35℃下搅拌反应混合物10分钟。分离各相,弃去下层的水层。从有机层中馏出乙酸乙酯,并再加入乙酸乙酯(800mL)。重复该操作直到馏出液的含水量为NMT1%或直到达到恒定沸点。使悬浮液冷却至20℃-25℃,搅拌30分钟,然后分离产物,用乙酸乙酯(100mL,3-4次)洗涤。在转筒式干燥机中在约60℃下进行真空干燥。产量为118.71g(47.5%,来自KLCA)的粗制化合物5。化合物4A(E/Z异构体的混合物)也可用作产生化合物5A(E/Z异构体的混合物)的起始原料。

[0472] 然后使用乙醇使粗制化合物5结晶。用于结晶的粗制化合物也可作为E/Z异构体的混合物化合物5A。将乙醇(390-520mL)和粗制化合物5(130g)装入惰性反应器中。为了溶解粗制化合物5,将反应混合物加热至回流。然后,在3-5小时内以受控制的冷却变速按线性分布使反应混合物冷却至15℃-20℃。结晶化合物5A用离心机分离,然后用乙酸乙酯(50-100mL,2次)洗涤。干燥在转筒式干燥机中在真空和约60℃下进行。这产生85.8g(66%)产量。取样品以测量纯化的化合物5的含量测定、纯度和水分含量。纯化的化合物5是3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸的E异构体。有关纯化的化合物5的鉴定和表征的全部详情参见实施例2。纯化的化合物5(E异构体)的分离可为任选的。E异构体和Z异构体具有不同的溶解度。E异构体不太溶解和结晶,使得Z异构体可被洗掉。

[0473] 制备化合物5的备选方法如下。将化合物4(111.96g)装入惰性反应器中。在最大50℃下,真空馏出残余量的溶剂(例如乙腈、二氯甲烷)。将残余物溶于甲醇(156mL)中,冷却至约10℃。加入自来水(23.4mL)和苛性钠50%(23.4mL)。在约20℃-约25℃下搅拌反应混合物约4小时。溶液用自来水(433mL)稀释,加入甲苯(144mL)。在搅拌后,分离各相,将下层水层转移到惰性反应器中。弃去有机层。在充分搅拌到水层的同时,加入乙酸乙酯(607mL)和柠檬酸溶液(105.7g,在208mL的水中)。分离各相,弃去下层水层。将有机层转移到惰性反应器中。从有机层馏出乙酸乙酯,并再加入乙酸乙酯(347mL)。在一个实施方案中,用乙酸乙酯(173mL)重复该操作直到馏出液的含水量不超过约1%或直到达到恒定沸点。使该悬浮液冷却至20℃-25℃。用惰性离心机将化合物5分离,并用乙酸乙酯(3-4次各43mL)洗涤。干燥在转筒式干燥机中在真空和约60℃下进行(64.8%收率,基于化合物1)。化合物4A(E/Z异构体的混合物)也可用作步骤4的起始原料以产生化合物5A(E/Z异构体的混合物)。

[0474] 步骤5-3 $\alpha$ -羟基-6 $\alpha$ -乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(6)的制备:

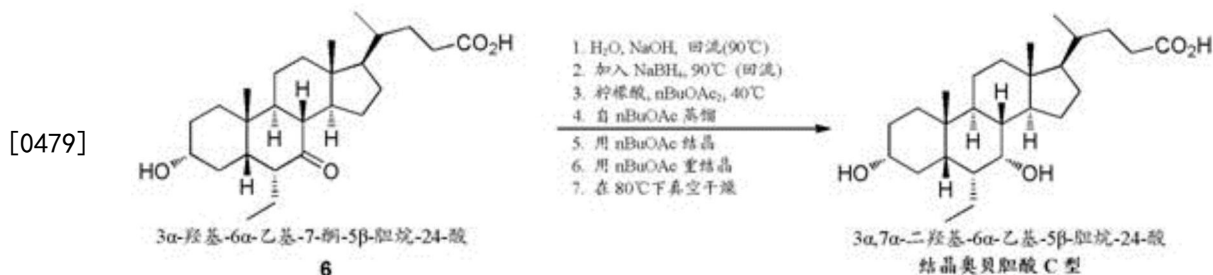


[0476] 反应5:6-亚乙基部分的氢化

[0477] 将纯化的化合物5(110g,264mmol)、水(1100mL)、50%的苛性钠溶液(35.8mL,682mmol)和钯催化剂(Pd/C,11g)的混合物装入氢化反应器中。调节温度至25℃-35℃,反应器用氮气(2巴)吹扫3次,用氢气(1巴)吹扫3次。这些压力值相对于环境压力(=0巴)给出。

施加5巴的氢压,并在1.5小时的时间内将反应混合物加热至100℃(用于 $\alpha$ 位的异构化),然后在保持4.5-5巴氢压的同时搅拌3小时。然后使反应混合物冷却至40℃-50℃。对于后处理,滤出Pd/C。向滤液中加入乙酸正丁酯(1320mL)和盐酸(67.8mL,815mmol,37%)。分离水相并弃去。有机相在40-50℃下用活性碳(5.5g)处理约10分钟。滤出活性碳,滤液通过蒸馏浓缩,在2-3小时内使所得悬浮液冷却至15℃-20℃。沉淀的化合物6经分离,并用乙酸正丁酯(160mL)洗涤。产物使用压力过滤器过滤。干燥在压力过滤器中在约60℃下真空进行。这产生89.8g(81.2%)的化合物6。化合物5A(E/Z异构体的混合物)可用于步骤5以制备化合物6。

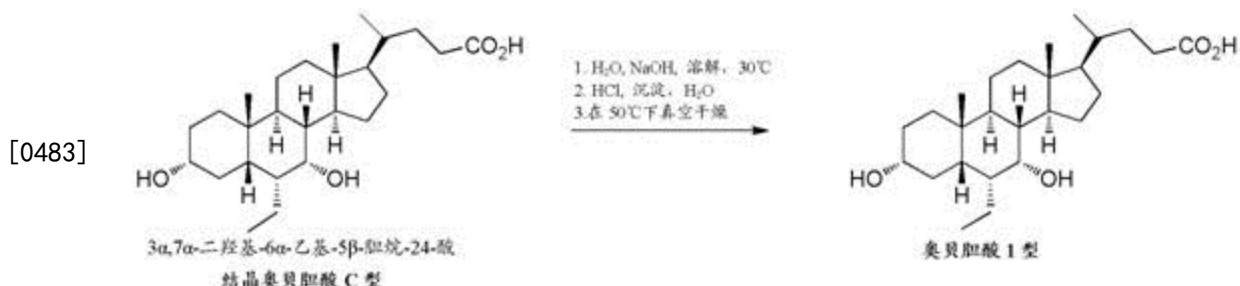
[0478] 步骤6-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(奥贝胆酸)的制备:



[0480] 反应6:7-酮至7 $\alpha$ -羟基的选择性还原

[0481] 在50%wt氢氧化钠溶液(1.5mL)和水(20mL)的混合物中,在90℃-105℃下使化合物6(86g,205.4mmol)、水(688mL)和50%氢氧化钠溶液(56.4mL)的混合物与硼氢化钠(7.77g,205.4mmol)反应。将反应混合物加热至回流,并搅拌至少3小时。对于后处理,在反应完成后,使反应混合物冷却至约80℃,并转移到冷却的反应器中。在30℃-50℃下,加入水(491mL)中的乙酸正丁酯(860mL)和柠檬酸(320.2g,无水)。在检查pH值以确保是酸性后,分离水相并弃去。有机相经转移并蒸馏。残余物用乙酸正丁酯稀释,并慢慢冷却至15℃-20℃,粗制奥贝胆酸使用离心机过滤。湿产物从乙酸正丁酯中结晶出来。产物奥贝胆酸经分离,并在惰性压力过滤器中用乙酸正丁酯(43mL,4次)洗涤。干燥在压力过滤器中在约80℃下真空进行。这产生67.34g(77.9%)的结晶奥贝胆酸。有关结晶奥贝胆酸的鉴定和表征的全部详情参见实施例3。

[0482] 步骤7-奥贝胆酸1型的制备:



[0484] 反应7:自结晶奥贝胆酸C型制备奥贝胆酸1型

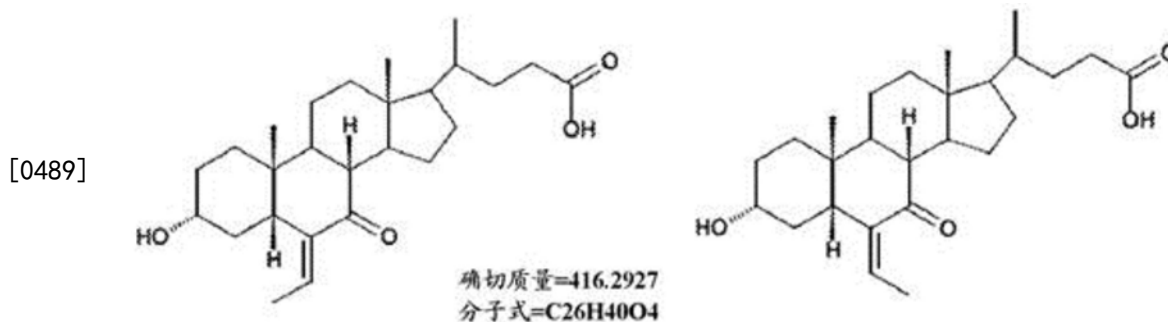
[0485] 将结晶奥贝胆酸C型(58g)溶于30℃-40℃的水(870mL)和苛性钠溶液(50%,8.7mL,166mmol)中。搅拌混合物直到全部固体溶解。产物使用下列后处理沉淀。通过过滤器将奥贝胆酸溶液慢慢加入30℃-40℃的含稀盐酸(37%,16.05mL,193mmol)的水(870mL)中。在下30℃-40℃搅拌悬浮液约30分钟,然后冷却至不超过(NMT)20℃。产物经分离,在惰性压

力过滤器中用水(465mL,6次)洗涤。干燥在真空压力过滤器中在NMT 50℃的温度下进行。这产生53.2g (91.7%)的奥贝胆酸1型。

[0486] 实施例2:E-3 $\alpha$ -羟基-6-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸(5)的表征

[0487] 化合物5是本申请方法的关键中间体。化合物自乙酸乙酯分离,然后用乙醇结晶出来。高纯度化合物5可供化合物6及随后结晶奥贝胆酸C型和奥贝胆酸1型(包括基本上纯的奥贝胆酸)的有效而高产量的生产。

[0488] 使用<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR和质谱法证实了来自实施例1步骤4的化合物5的结构。在通过LC/MS联用经质量控制方法1产生的UV色谱图中,来自步骤4的粗产物产生保留时间(RT)为27.457分钟的主产物和RT为28.078分钟的副产物。两种产物为化合物5的E/Z异构体:



[0490] 这两种异构体在MS/MS谱中显示相同的精确质量和相同断片。通过质谱数据无法区分它们。

[0491] 采用半制备方法分离E/Z异构体峰,采用两阶段法证实E/Z异构体的结构。HPLC质量控制方法1使用不挥发的磷酸缓冲液,因此,使用不挥发的缓冲液的直接LC/MS联用是不可能的。用于调整该方法的初步试验显示,对于E/Z异构体的充分分离,仅UPLC方法允许非常高的板数(plate number)。两阶段方法如下:步骤A是用新开发的UPLC/MS方法鉴定两个样品中的E/Z异构体,步骤B是用HPLC方法2分离E/Z异构体峰的级分,并随后用UPLC/MS方法1鉴定。该方法的实验详情如下:

[0492] 表C

[0493]

1. MS 相容性 UPLC 方法(方法 1)	
仪器:	Accela UPLC与LTQ FTSpectrometer联用(ThermoScientific)
柱:	200 x 2mm Hypersil Gold 1.9 $\mu$ m
洗脱液:	A: 水+ 10 mM Ammoniumformiat + 0.1%甲酸 B: 乙腈
梯度:	45% B在20分钟内至60% B (10分钟等度梯度)
流速:	0.4 ml/分钟, 40℃柱温
检测:	MS: ESI 阳离子和阴离子; UV: PDA 200.600 nm
质量分辨	R=100000 ICR
样品:	1 mg/ml在水/乙腈(1:1)中, 3 $\mu$ l/20 $\mu$ l注入
2. HPLC (方法2)	
仪器:	Agilent1100 HPLC (Agilent Technologies)
柱:	125 x 4mm Purospher STAR C18 5 Lm
洗脱液:	A: 含磷酸的水pH 2.6 B: 乙腈
梯度:	30% B在10分钟内至35% B在30分钟内至60% B 在1分钟内至90% B (9分钟等度梯度)
流速:	1 ml/分钟, 35℃柱温
检测:	UV: DAD 200 – 400 nm (UVA 200 nm)
样品:	10 mg/ml在水/乙腈(9:1)中, 25 $\mu$ l注入

[0494] 结果见图1和2。图1和2是“粗制化合物5”(图1)和高效UPLC柱上获得的化合物5“纯化参比”(图2)的UPLC UV/MS色谱图。对于图1,将样品以1mg/mL溶于ACN/H<sub>2</sub>O 1:1;200x2mm Hypersil GOLD R122;LMA:H<sub>2</sub>O+10mM AF+0.1%HFo;LMB:ACN;45%-20-60%(10);0.4mL/分钟;40℃;UVA=200nm;3 $\mu$ L注射体积。对于图2,将样品以1mg/ml溶于ACN/H<sub>2</sub>O;200x2mm Hypersil GOLD R122;A:10mM AF+0.1%HFo;B:ACN;45%-20-60%B(10);0.4mL/分钟;20 $\mu$ L注射体积。在2个样品中,主要组分(RT 9.92分钟)和次要组分(RT 10.77分钟)的分子量与预期相同,如下所示阳离子和阴离子测量数据的表D和E所示,两种化合物的精确质量与所提供的结构一致:

[0495] 表D:阳离子测量的数据

[0496]

RT (分钟)	离子 m/z	分子式	结构建议
9.98	417.30008	C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> O <sub>4</sub> $\Delta$ M 0.35 ppm	M+H E 异构体
	833.59381	C <sub>52</sub> H <sub>81</sub> O <sub>8</sub> $\Delta$ M 1.45 ppm	2M+H E 异构体
	850.61938	C <sub>52</sub> H <sub>84</sub> O <sub>8</sub> N $\Delta$ M 0.28 ppm	2M+NH <sub>4</sub> E 异构体
10.77	417.30023	C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> O <sub>4</sub>	M+H Z 异构体
	833.59409	C <sub>52</sub> H <sub>81</sub> O <sub>8</sub>	2M+H Z 异构体
	850.61984	C <sub>52</sub> H <sub>84</sub> O <sub>8</sub> N	2M+NH <sub>4</sub> Z 异构体

[0497] 表E:阴离子测量的数据

[0498]

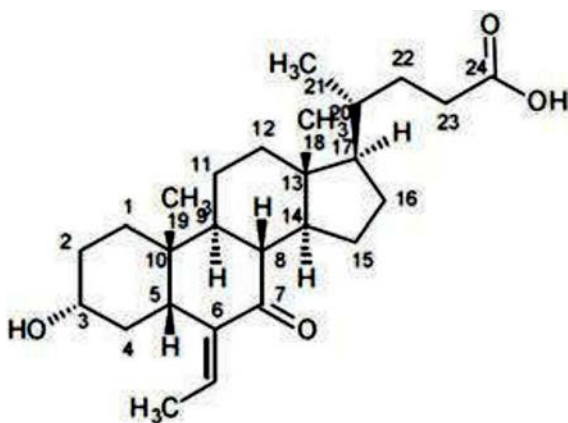
RT (分钟)	离子 m/z	分子式	结构建议
9.98	415.28520	$C_{26}H_{36}O_4$ $\Delta M -0.44$ ppm	M-H Z 异构体
	461.29051	$C_{27}H_{41}O_5$ $\Delta M -0.76$ ppm	M+Formiat Z 异构体
	831.57683	$C_{52}H_{76}O_8$ $\Delta M -1.46$ ppm	2M-H Z 异构体
10.77	415.28545	$C_{26}H_{36}O_4$	M-H E 异构体
	461.29069	$C_{27}H_{41}O_5$	M+Formiat E 异构体
	831.57739	$C_{52}H_{76}O_8$	2M-H E 异构体

[0499] 为了确保质量控制HPLC方法2的可移植性(portability),在所述条件下确切地重复原始分离。按半制备法分离主峰和次峰。具有捕获级分的明显位置的所得UV色谱图见图3。图3是使用HPLC方法2的粗制化合物5的UV色谱图;125x4mm Purospher STAR C18 5 $\mu$ m AG;LMA:H<sub>2</sub>O pH 2.6mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>;LMB:ACN;30%B-10-35%-30-60%-1-90%(9);1mL/分钟;35℃;UVA=200nm;ohne MS;25mL。随后,用新开发的UPLC/MS方法分别分析分离级分。为了评价,使用850.61914 $\pm$ 3ppm的准分子离子[2M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>的精确离子迹线。所得的主峰级分、次峰级分和两个样品的色谱图见图4A-4D。MS研究表明,通过质量控制方法2产生的在RT 27.457分钟和RT 28.078分钟处的2个峰是分子式C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>的2个异构体。该分子式与针对E/Z异构体提出的结构一致。因此,UPLC-MS方法的开发表明,3 $\alpha$ -羟基-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆-24酸的E/Z异构体是以高分辨率在色谱法中可分离的。得自FR-ICR质谱仪的精确MS数据与针对E/Z异构体提出的结构一致。对于2个异构体,得到相同的分子式C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>。

[0500] 由于用HPLC方法2的E/Z异构体峰的半制备分离和用UPLC-MS方法的后续鉴定,我们可证实通过质量控制方法2产生的2个峰(RT 27.457分钟和RT 28.078分钟,参见图1)是具有分子式C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>的2个异构体。该分子式与提议的E/Z-异构体的结构一致。结合下述NMR结果,得到下列分配:RT 27.457分钟属于E-异构体,RT 28.078分钟属于Z-异构体。

[0501] 3 $\alpha$ -羟基-亚乙基-7-酮-5 $\beta$ -胆-24酸的E异构体的<sup>1</sup>H和<sup>13</sup>C位移的分配如下。位移按照以下文献估算:“L.Bettarello等,II Farmaco 55 (2000),51-55 (物质3 $\alpha$ -羟基-7-酮-5 $\beta$ -胆烷-24-酸)。

[0502]



[0503] 表F: <sup>1</sup>H位移分配 (<sup>1</sup>H-NMR, 500MHz, 303K, CD<sub>3</sub>OD)

[0504]

化学位移 [ppm]	强度 [H]	峰裂数分配
6.10	1	Q25
3.61	1	M3

2.69	1	DD5
2.28	2	DT23
1.72	3	D26
1.05	3	S19
0.99	3	D21
0.70	3	S18

[0505] 表G:  $^{13}\text{C}$ 位移分配 ( $^{13}\text{C}$ -NMR, 125MHz, 303K,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

[0506]

化学位移 [ppm]	峰裂数	分配
207.5	S	7
178.1	S	24
145.3	S	6
130,4	D	25
71.0	D	3
56.0	S	17
52.0和50.1	D各个	8和14
46.9	D	5
44.7	S	13
40.7	D	9
40.3	T	12*
38.3	T	4*
36.5	D	20
35.8	S	10
35.4	T	1
32.3和32.0	T各个	22和23
30.5	T	2*
29.4	T	16*
27.0	T	15*
23.2	Q	19
22.4	T	11
18.9	Q	21
12.7	Q	26
12.5	Q	18

[0507] S=单峰

[0508] D=双峰

[0509] T=三重峰

[0510] Q=四重峰

[0511] M=多重峰

[0512] DD=双双重峰

[0513] DT=双三重峰

[0514] 实施例3:结晶奥贝胆酸C型的表征

[0515] 来自流程1步骤6和实施例1的产物的全固态表征显示奥贝胆酸是晶体。该晶体形式被标记为C型。下面是概述结晶奥贝胆酸C型的表征的表格:

[0516] 表G:结晶奥贝胆酸C型特征概述

	技术	结晶奥贝胆酸 C 型
	外观	白色粉末
	NMR	与大约 3.5% w/w 己烷的提供结构一致
	XRPD	结晶
	TGA	在室温 -85 °C (0.4%) 和 85-115 °C (4.1%)之间重量减轻
[0518]	DSC	97.9°C 开始吸热
	GVS	略微吸湿的, 在 90% RH 下 1.2%水吸收
	Karl Fisher 水测定	1.5% w/w
	在 40°C/75% RH 下的稳定性	型或结晶性无改变

[0519] 热分析

[0520] 在配备34位自动进样器的Mettler DSC 823e中收集DSC (示差扫描量热法) 数据。使用检定的钢针对能量和温度校准仪器。通常将针孔铝锅中的各样品0.5-1mg以10°C • 分钟<sup>-1</sup>从25°C加热至350°C。在样品上方以50ml • 分钟<sup>-1</sup>保持氮气吹扫。仪器控制和数据分析软件是STARe v 9.20。

[0521] 在配备34位自动进样器的Mettler TGA/SDTA 851e上收集TGA (热解重量分析) 数据。使用检定的钢对仪器进行温度校正。通常将5-10mg的各个样品加载到预先称重的铝坩埚中,以10°C • 分钟<sup>-1</sup>从环境温度加热至300°C。在样品上方以50ml • 分钟<sup>-1</sup>保持氮气吹扫。仪器控制和数据分析软件是STARe v9.20。

[0522] 通过结晶奥贝胆酸C型的TGA观察到2个重量减轻步骤。第一个发生在室温 (室温) 和85°C之间 (0.41%), 第二个发生在85°C-115°C之间 (4.10%)。第一重量减轻步骤可归因于水分丢失,而第二步骤归因于剩余水分丢失 (水负责约1.2%重量减轻) 和结合的庚烷丢失 (约3.4%重量减轻)。结晶奥贝胆酸C型含有0.15和0.2摩尔间的溶剂 (庚烷) 和约1.5%w/w (0.3摩尔)。结晶奥贝胆酸C型的DSC温谱图含有一个吸热峰。这是相当陡峭的,从约98°C开始。参见图6。不同的溶剂会具有不同的沸点,因此在DSC和TGA实验中在不同温度下会蒸发。

[0523] X射线粉末衍射 (XRPD) 分析

[0524] Bruker AXS C2 GADDS

[0525] 使用Cu K $\alpha$ 辐射 (40kV, 40mA)、自动化XYZ阶段、用于自动样品定位的激光视频显微镜和HiStar二维平面检测器,在Bruker AXS C2 GADDS衍射计上收集X射线粉末衍射图。X射线光学系统由与0.3mm针孔准直仪联用的单一Göbel多层镜 (single Göbel multilayer mirror) 组成。采用经检定的标准NIST 1976 Corundum (平板) 进行每周性能检查。

[0526] 射束发散性,即X射线束在样品上的有效尺寸为约4mm。采用样品—检测器距离为20cm的 $\theta$ - $\theta$ 连续扫描模式,这提供 $3.2^{\circ}$ - $29.7^{\circ}$ 的有效 $2\theta$ 范围。通常将样品暴露于X射线束120秒钟。用于数据收集的软件为用于WNT 4.1.16的GADDS,并应用Diffraction Plus EVA v 9.0.0.2或v 13.0.0.2分析并呈现数据。

[0527] 环境条件:原样使用未研磨的粉末,制备在环境条件下运行的样品作为平板样本。将约1-2mg的样品在玻璃载玻片上轻轻压平得到平直表面。

[0528] 非环境条件:将在非环境条件下运行的样品铺在含热传导化合物的硅片上。然后将样品以约 $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}^{-1}$ 加热至合适的温度,随后保持恒温约1分钟后,开始数据收集。

[0529] Bruker AXS/Siemens D5000

[0530] 使用Cu K $\alpha$ 辐射(40kV,40mA)、 $\theta$ - $\theta$ 测角仪、V20的发散性和接收缝隙、石墨二级单色器和闪烁计数器,在Siemens D5000衍射计上收集X射线粉末衍射图。采用检定的金刚砂(Corundum)标准(NIST 1976)对仪器进行性能检查。用于数据收集的软件为Diffraction Plus XRD Commander v2.3.1,并应用Diffraction Plus EVA v 11,0.0.2或v 13.0.0.2分析并呈现数据。

[0531] 原样使用粉末,将样品在环境条件下运行作为平板样本。将约20mg样品轻轻塞进切成磨光的零背景(510)硅片的空腔中。在分析期间使样品在自己平面上旋转。数据收集的详情为:

[0532] • 角范围: $2-42^{\circ}2\theta$

[0533] • 步长: $0.05^{\circ}2\theta$

[0534] • 收集时间:4s • 步骤 $^{-1}$

[0535] Bruker AXS D8 Advance

[0536] 使用Cu K $\alpha$ 辐射(40kV,40mA)、 $\theta$ - $2\theta$ 测角仪、V4的分散性和接收缝隙、Ge单色器和Lynxeye检测器,在Bruker D8衍射计上收集X射线粉末衍射图。采用检定的金刚砂标准(NIST 1976)对仪器进行性能检查。用于数据收集的软件为Diffraction Plus XRD Commander v 2.5.0,并应用Diffraction Plus EVA v 11.0.0.2或v 13.0.0.2分析并呈现数据。

[0537] 原样使用粉末,将样品在环境条件下运行作为平板样本。将约5mg样品轻轻塞进切成磨光的零背景(510)硅片的空腔中。在分析期间使样品在自己平面上旋转。数据收集的详情为:

[0538] • 角范围: $2-42^{\circ}2\theta$

[0539] • 步长: $0.05^{\circ}2\theta$

[0540] • 收集时间:0.5s • 步骤 $^{-1}$

[0541] XRPD显示在Bruker AXS D8 Advance收集从本发明方法步骤6分离的粉末。参见图5。下表中提供X射线衍射图的相应数据。用于数据收集的软件为Diffraction Plus XRD Commander v2.6.1,应用Diffraction Plus EVA v13.0.0.2或v15.0.0.0分析并呈现数据。原样使用粉末,将样品在环境条件下运行作为平板样本。将样品轻轻塞进切成磨光的零背景(510)硅片的空腔中。在分析期间使样品在自己平面上旋转。数据收集的详情为:

[0542] • 角范围: $2-42^{\circ}2\theta$

[0543] • 步长: $0.05^{\circ}2\theta$

[0544] • 收集时间:0.5s • 步骤 $^{-1}$



[0545] 表H:结晶奥贝胆酸C型的X射线衍射图数据

峰	角2- $\theta$ (°)	d值 (埃)
1	4.2	21.0203
2	6.35	13.90839
3	8.298	10.64718
4	9.5	9.30229
5	11.05	8.00042
6	12.246	7.22192
7	12.498	7.07692
8	12.647	6.99367
9	15.497	5.71337
10	15.843	5.5895
11	15.998	5.53561
12	16.346	5.41836
13	16.695	5.30601
14	16.996	5.21251
15	17.849	4.96547
16	18.593	4.76844
17	18.798	4.71689
18	19.047	4.65579
19	20.493	4.33041
20	20.894	4.24808

[0547] VT-XRPD (可变温度-X射线衍射) 显示DSC温谱图所见吸热相当于样品的去溶剂化, 因为在加热时未观察到形态变化。在DSC和VT-XRPD数据之间存在温度差异, 因为VT-XRPD实验在样品所暴露的大空间中进行, 而DSC实验在有限的封闭空间中进行。这种差异为约20 °C, 并解释了为什么在DSC实验中样品在低得多的温度下融化, 而在VT-XRPD实验中样品在110 °C下仍呈现晶体。VT-XRPD显示材料中溶剂的干燥导致结晶性丧失, 这与材料呈溶剂化形式一致。参见图7。

[0548] 重量法蒸汽吸附 (GVS)

[0549] 使用由DVS内部控制软件v 1.0.0.30控制的SMS DVS内部水分含量吸附分析仪, 获得吸着等温线。通过仪器控制将样品温度保持在25 °C下。以200ml • 分钟<sup>-1</sup>的总流速, 通过将干氮和湿氮气流混合, 来控制湿度。通过位于样品附近的经校正的Rotronic探头 (1.0-100 %RH的动态范围), 测定相对湿度。通过微量天平 (精确度 $\pm 0.005$ mg) 不断监测随 %RH (相对湿度) 变化的样品的重量变化 (质量弛豫 (mass relaxation))。

[0550] 在环境条件下将5-20mg样品置于去皮的网孔不锈钢篮中。在40 %RH和25 °C (典型的室内条件) 下加载和卸载样品。如下概述进行吸湿等温线 (2次扫描得到1个完整循环)。标准等温线在25 °C下在0.5-90 %RH范围内以10 %RH间隔进行。应用DVS分析套件v6.0.0.7, 在Microsoft Excel中进行数据分析。SMS DVS内部实验的方法参数如下:

[0551]	参数	值
--------	----	---

吸附—扫描1	40-90%
解吸/吸附—扫描2	90-0, 0-40%
间隔(%RH)	10
扫描次数	2
流速(ml·分钟 <sup>-1</sup> )	200
温度(°C)	25
稳定性(°C·分钟 <sup>-1</sup> )	0.2
吸附时间(小时)	6小时终止

[0552] 样品在完成等温线后回收,并通过XRPD再次分析。

[0553] 结晶奥贝胆酸C型的分析显示,样品是略微吸湿的,因为在0-90%RH间观察到1.18%的质量增加。这种水的吸收在整个分析中是稳定的,并且对于所有步骤都达到平衡。曲线的滞后少,表明了样品容易丢失已吸附的水。在GVS分析后的XRPD分析表明,样品无改变。参见图8A、8B和8C。

[0554] 通过Karl Fischer滴定(KF)的水测定

[0555] 使用Hydranal Coulomat AG试剂和氩气吹扫,用Mettler Toledo DL39库伦计测量了各样品的含水量。将称重的固体样品引入与subaseal连接以避免进水的铂TGA盘的管中。每次滴定使用约10mg样品,并且进行一式两份测定。

[0556] Karl Fischer分析表明结晶奥贝胆酸C型含有1.5%水,相当于约0.3摩尔水。

[0557] 在40°C和75%RH下的一周稳定性

[0558] 如下测定40°C和75%RH(相对湿度)下奥贝胆酸的稳定性。将奥贝胆酸样品在潮湿箱中在40°C/75%RH下保存1周。通过XRPD再次分析样品,发现无变化。

[0559] 固态研究表明,需要存在相对大量的有机溶剂以使奥贝胆酸C型结晶。奥贝胆酸1型样品将自发结晶形成贮存中的结晶奥贝胆酸C型是极不可能的。

[0560] 实施例4:奥贝胆酸片剂

[0561] 下表显示奥贝胆酸片剂的定量组成。5mg、10mg和25mg制剂被用作3期临床试验材料。

[0562] 表I:薄膜衣片剂

[0563]

薄膜衣片剂			
组分	每片的量	功能	参考标准
<b>1 mg 片剂</b>			
奥贝胆酸	1.0 mg*	API	HSE
微晶纤维素	185.0 mg*	填充剂/粘合剂	USP-NF/EP/JP
羟基乙酸淀粉钠	12.0 mg	崩解剂	USP-NF/EP/JP
硬脂酸镁	2.0 mg	润滑剂	USP-NF/EP/JP
Opadry® II 绿色或白色	8.0 mg	包衣材料	HSE
总重	208.0 mg		
<b>5 mg 片剂</b>			
奥贝胆酸	5.0 mg*	API	HSE
微晶纤维素	181.0 mg*	填充剂/粘合剂	USP-NF/EP/JP
羟基乙酸淀粉钠	12.0 mg	崩解剂	USP-NF/EP/JP
硬脂酸镁	2.0 mg	润滑剂	USP-NF/EP/JP
Opadry® II 绿色或白色	8.0 mg	包衣材料	HSE
总重	208.0 mg		
<b>10 mg 片剂</b>			
奥贝胆酸	10.0 mg*	API	HSE
微晶纤维素	176.0 mg*	填充剂/粘合剂	USP-NF/EP/JP
羟基乙酸淀粉钠	12.0 mg	崩解剂	USP-NF/EP/JP
硬脂酸镁	2.0 mg	润滑剂	USP-NF/EP/JP
Opadry® II 绿色或白色	8.0 mg	包衣材料	HSE
总重	208.0 mg		
<b>25 mg 片剂</b>			
奥贝胆酸	25.0 mg*	API	HSE
微晶纤维素	157.0 mg*	填充剂/粘合剂	USP-NF/EP/JP
羟基乙酸淀粉钠	12.0 mg	崩解剂	USP-NF/EP/JP
硬脂酸镁	2.0 mg	润滑剂	USP-NF/EP/JP
胶态二氧化硅	4.0 mg	助流剂	USP-NF/EP/JP
Opadry® II 绿色或白色	8.0 mg	包衣材料	HSE
总重	208.0 mg		

[0564] API: 活性药物成分

[0565] HSE= 内部规格

[0566] USP-NF 美国药典国家处方集

[0567] Ph Eur=欧洲药典

[0568] JP=日本药典

[0569] \*所提供的奥贝胆酸量假设API是无水和100%纯的;实际量根据所用的药物批次的效能调节,并相应减少微晶纤维素的量。

[0570] 实施例5:奥贝胆酸1型的表征

[0571] 奥贝胆酸1型是指奥贝胆酸的非晶形式。奥贝胆酸的这种形式可通过结晶奥贝胆酸作为合成中间体产生。奥贝胆酸1型可用作药理学活性成分。如下表征和分析奥贝胆酸1型。

[0572] 第1批奥贝胆酸1型采用下列技术表征:通过X射线粉末衍射(XRPD)对结晶性的评价,<sup>1</sup>H和<sup>13</sup>C核磁共振(NMR)、傅里叶变换红外光谱法(FT-IR)、光学评价(例如粒子形态/粒径)、热性质(例如示差扫描量热法(DSC)和热解重量分析(TGA))、通过Karl Fischer(KF)的水测定、在40℃和75%RH下贮存和2周后通过XRPD再次分析、通过电势测定方法的pKa、通过电势测定法的Log P/D(辛醇/水)和采用重量法蒸汽吸附(GVS;例如用通过XRPD收集的固体分析的完全吸附-解吸循环)的水分含量的稳定性。还采用下列技术表征并比较了奥贝胆酸1型的其它5个批次(例如第2、3、4、5和6批):通过XRPD评价并与主要的第1批图形的比较、<sup>1</sup>H和<sup>13</sup>C NMR、FT-IR、光学评价(例如粒子形态/粒径)、热性质(例如DSC、TGA和高温载台显微术)和通过KF的水测定。

[0573] X射线粉末衍射(XRPD)分析

[0574] 使用Cu K $\alpha$ 辐射(40kV,40mA)、自动化XYZ阶段、用于自动样品定位的激光视频显微镜和HiStar二维平面检测器,在Bruker AXS C2 GADDS衍射计中收集X射线粉末衍射图。X射线光学系统由与0.3mm针孔准直仪联用的单一Göbel多层镜组成。射束发散性,即X射线束在样品上的有效尺寸为约4mm。采用样品一检测器距离为20cm的 $\theta$ - $\theta$ 连续扫描模式,这得到3.2°-29.7°的有效2 $\theta$ 范围。通常将样品暴露于X射线束120秒钟。用于数据收集的软件为用于WNT 4.1.16的GADDS,并应用Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2或v 13.0.0.2分析并呈现数据。

[0575] 原样使用未研磨的粉末,制备在环境条件下运行的样品作为平板样本。将约1-2mg样品在硅片上轻轻压平得到平直表面。衍射图显示奥贝胆酸1型是非晶体的(参见图10和图11)。

[0576] NMR表征

[0577] 在配备自动进样器和由DRX400控制台控制的Bruker 400MHz仪器中收集NMR波谱。采用标准Bruker加载实验,应用带有Topspin v 1.3(patch level 8)运行的ICONNMR v4.0.4(build 1),实现自动化实验。对于非常规光谱法,通过仅使用Topspin获得数据。在d6-DMSO中制备样品,除非另有说明。离线分析采用ACD SpecManager v 9.09(build 7703)的进行。

[0578] 图12显示第1批的<sup>1</sup>H NMR波谱。还记录了第2-6批的<sup>1</sup>H NMR波谱,并与第1批的波谱进行了比较。参见图13。波谱全都类似,但是含不同量的水。在0.75ppm和2ppm之间的一大群质子的积分中注意到一些差异,其中峰重叠,无法分别积分。表J显示在第1-6批的波谱中积分的质子总数,考虑了0.75-2ppm区域的变化。

[0579] 表J

[0580]

批号	通过积分的H的数目(不包括COOH)
----	--------------------

1	43
2	42
3	40
4	41
5	42
6	41-42

[0581] 不包括羧酸质子,使得质子数应为43,但实际上它在6个波谱间从40到43之间变化。然而,其中来自(0.75-2ppm)范围的变化的面积是相当宽的,并且是因基线质量所致,不能依靠该积分。

[0582] 因为波谱不能完全指定,并且积分改变,因此记录了第2批的 $^{13}\text{C}$  NMR波谱。图14显示DEPTQ波谱,其中 $\text{CH}_2$ 和季碳峰指向上,而 $\text{CH}_3$ 和 $\text{CH}$ 基团指向下。有13个峰指向下,其对应于9个 $\text{CH}$ 和4个 $\text{CH}_3$ 基团。这与结构一致。在175ppm处观察到羧酸碳的峰。为了目标区域清楚起见,将其从该展开图中排除。然而,仅有11个峰指向上,但是应有12个,因为分子中有10个 $\text{CH}_2$ 基团和2个季碳(不包括羰基)。一个碳显得与另一个信号重叠。因此,收集DEPT135波谱,抑制季碳信号,其可显示重叠信号是否是四重的。参见图15。DEPT135波谱与DEPTQ波谱的比较显示1个峰(在42.5ppm处)消失。在分子中有2个季碳,其应相当于2个峰消失。因此重叠碳信号是四重的。

[0583] 另外,进行了测定碳的弛豫时间的实验以测定其中丢失的季碳信号与另一个碳信号重叠。参见图16。该 $^{13}\text{C}$ 波谱含有被积分的峰。这表明在32.3ppm处的峰说明2个碳。有关在32.3ppm处的峰的展开图的参见图17。因此,目前通过积分说明了26个碳(包括羧酸),这与结构一致。

#### [0584] 通过ATR的FT-IR

[0585] 在配备Universal ATR采样配件的Perkin-Elmer Spectrum One中收集数据。应用波谱v5.0.1软件,收集并分析数据。参见图18。

#### [0586] 通过示差扫描量热法(DSC)和热解重量分析(TGA)的热分析

[0587] 在配备50位自动进样器的TA Instruments Q2000中收集DSC数据。使用检定的钢,针对能量和温度校准校正仪器。通常将针孔铝锅中的0.5-3mg各样品以 $10^\circ\text{C} \cdot \text{分钟}^{-1}$ 从 $25^\circ\text{C}$ 加热至 $300^\circ\text{C}$ 。在样品上方以 $50\text{ml} \cdot \text{分钟}^{-1}$ 保持氮气吹扫。仪器控制软件是Advantage for Q Series v2.8.0.392和Thermal Advantage v4.8.3,应用Universal Analysis v4.3A分析数据。对调制DSC,样品如前制备,将锅以 $2^\circ\text{C} \cdot \text{分钟}^{-1}$ 从 $25^\circ\text{C}$ 加热至 $200^\circ\text{C}$ 。调制器条件为 $0.20^\circ\text{C}$ 的幅度和40s的周频。采样间隔为1sec/pt。

[0588] 在配备16位自动进样器的TA Instruments Q500 TGA中收集TGA数据。使用检定的Alumel对仪器进行温度校准。通常将5-10mg各样品加载到预去皮的铂坩埚和铝DSC锅中,以 $10^\circ\text{C} \cdot \text{分钟}^{-1}$ 从环境温度加热至 $350^\circ\text{C}$ 。在样品上方以 $60\text{ml} \cdot \text{分钟}^{-1}$ 保持氮气吹扫。仪器控制软件是Advantage for Q Series v2.8.0.392和Thermal Advantage v4.8.3。

[0589] 通过DSC和TGA进行第1批的热分析。TGA迹线(参见图19)显示在环境温度和 $121^\circ\text{C}$ 之间重量减轻1.7%,这可能是水的丢失。DSC迹线(参见图19)显示宽泛的低温吸热(可能相当于水丢失),接着在 $94^\circ\text{C}$ 下开始小的吸热。

[0590] 该第二个吸热可能表明玻璃转化,通过调制DSC作进一步研究(参见图20)。该技术

使得能够将可逆转事件(例如玻璃转化)与不可逆转事件(例如溶剂丢失或晶体形式融溶)分开来。调制DSC中的可逆热流迹线显示玻璃转化为拐点(T<sub>g</sub>)位于95℃的步骤。这对于玻璃转化是高的,且表明1型是稳定的。在不可逆热流迹线中在89℃处开始的小的吸热相当于在玻璃转化温度下疏松材料的分子弛豫。

[0591] DSC迹线(参见图19)显示分解在220℃附近开始,这还相当于TGA迹线弯曲向下。

[0592] 第1、2、3、4、5和6批的TGA迹线具有类似形状(图21)。在环境和120℃间测量的重量减轻见表K。它们与通过NMR观察到的不同量的水一致。进一步通过Karl Fischer (KF) 水滴定量测定这些量。参见通过FK的水测定。

[0593] 表K:接受样品的TGA重量减轻概要

批号	通过TGA的重量减轻
1	1.7%
2	0.6%
3	1.2%
4	0.9%
5	1.5%
6	1.6%

[0595] 图22显示用于比较的6个批次的DSC迹线。迹线相似,具有不同大小的宽的低温吸热,与不同量的水一致,接着在玻璃转化温度附近的小的吸热,如DSC和TGA节所见。结果概括于表L。

[0596] 表L:接受样品的DSC结果概要

批号	第1吸热, 宽	第2吸热, 小	开始分解
1	28.3J/g, T <sub>max</sub> = 64℃	1.2J/g, T <sub>onset</sub> = 94℃	220℃
2	7.4J/g, T <sub>max</sub> = 48℃	1.4J/g, T <sub>onset</sub> = 94℃	220℃
3	无	2.0J/g, T <sub>onset</sub> = 89℃	175℃
4	14.5J/g, T <sub>max</sub> = 58℃	1.3J/g, T <sub>onset</sub> = 94℃	200℃
5	12.2J/g, T <sub>max</sub> = 59℃	1.2J/g, T <sub>onset</sub> = 94℃	175℃
6	28.7J/g, T <sub>max</sub> = 59℃	1.5J/g, T <sub>onset</sub> = 94℃	200℃

[0598] 偏振光显微术 (PLM)

[0599] 样品用带有用于图像捕捉的数字视频摄录机的Leica LM/DM偏振光显微镜进行研究。将少量的各样品置于玻璃载玻片上,在硅油中固定,盖上盖玻片,尽可能地使各个颗粒分开。样品用适当的放大倍数和与λ假色滤镜联用的部分偏振光观察。

[0600] 图23A-23F显示第1、2、3、4、5和6批是由小的不规则颗粒形成的大的硬聚结物构成

的材料。第1、2、3、4、5和6批看起来全都类似。在平面偏振光下未观察到双折射,这与该材料是非晶体的一致。粒径的范围为小于 $1\mu\text{m}$ – $3\mu\text{m}$ 。这些小的颗粒尺寸表明它们极快地析出。

[0601] 重量法蒸汽吸附 (GVS)

[0602] 使用由SMS分析套件软件控制的SMS DVS内在水分含量吸附分析仪,获得吸着等温线。通过仪器控制将样品温度保持在 $25^{\circ}\text{C}$ 下。以 $200\text{ml} \cdot \text{分钟}^{-1}$ 的总流速,通过将干氮和湿氮气流混合来控制湿度。通过位于样品附近的经校正的Rotronic探头( $1.0$ – $100\%$  RH的动态范围),测定相对湿度。通过微量天平(精确度 $\pm 0.005\text{mg}$ )不断监测随 $\%$  RH变化的样品的重量变化(质量弛豫)。

[0603] 通常在环境条件下,将 $5$ – $20\text{mg}$ 样品置于去皮的网孔不锈钢篮中。在 $40\%$  RH和 $25^{\circ}\text{C}$ (典型的室内条件)下加载和卸载样品。如下概述进行吸湿等温线(2次扫描得到1个完整循环)。标准等温线在 $25^{\circ}\text{C}$ 下在 $0.5$ – $90\%$  RH范围内以 $10\%$  RH间隔进行。

[0604] 表M

[0605]	参数	值
	吸附—扫描1	40–90
	解吸/吸附—扫描2	85–无水,无水–40
	间隔( $\%$ RH)	10
	扫描次数	2
	流速( $\text{ml} \cdot \text{分钟}^{-1}$ )	200
	温度( $^{\circ}\text{C}$ )	25
	稳定性( $^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}^{-1}$ )	0.2
	吸附时间(小时)	6小时终止

[0606] 在 $25^{\circ}\text{C}$ 下获得第1批的重量法蒸汽吸附(GVS)等温线,见图24。样品显得是适度吸湿的,从 $0$ 到 $90\%$ 相对湿度(RH)的总重量变化为 $3.8\%$ 。滞后(吸附和解吸曲线间的面积)小,表明了固体相当容易释放吸附的水。未观察水合物的形成。在整个实验后没有可观的重量变化( $0.3\%$ )。

[0607] GVS的动态图(图25)显示水的吸附大多发生在非常高的湿度下,解吸发生在非常低的湿度下。在吸附阶段,样品相当快地达到平衡直到 $80\%$  RH,并花较长时间在 $90\%$  RH下平衡。解吸时,质量在所有步骤中稳定。

[0608] 在完成GVS后,回收样品,通过XRPD再次分析,分析表明该材料仍是非晶体的(图26)。

[0609] 通过Karl Fischer (KF)的水测定

[0610] 使用Hydranal Coulomat AG试剂和氩气吹扫,用Mettler Toledo DL39库伦计测量了各样品的含水量。将称重的固体样品引入与subaseal连接以避免进水的铂TGA盘上的管中。每次滴定使用约 $10\text{mg}$ 样品,并且进行一式两份测定。

[0611] 通过库仑分析的Karl Fischer的水滴定得到 $2.4\text{wt}\%$ 水的结果。这略微高于通过TGA观察到重量减轻。它可能意味着一些水不是在加热时从材料中释放,而是可能因为这两种技术的不同实验程序所致。

[0612] 通过库仑分析的Karl Fischer测定各批次的含水量。表N显示这些结果,并且将其与较早获得的Karl Fischer结果和通过TGA观察到的重量减轻进行比较。数据是一致的,因

为在所有3项分析中趋势是相同的。较早获得的Karl Fischer数据显示比在此获得的结果低的含水量。这与材料是吸湿的一致,虽然一些样品比其它样品吸收更多的水。TGA重量减轻一贯比通过Karl Fischer滴定获得的结果低,这可能意味着一些水被截留在材料中,在加热时不释放,但是也可能是由实验程序所致。

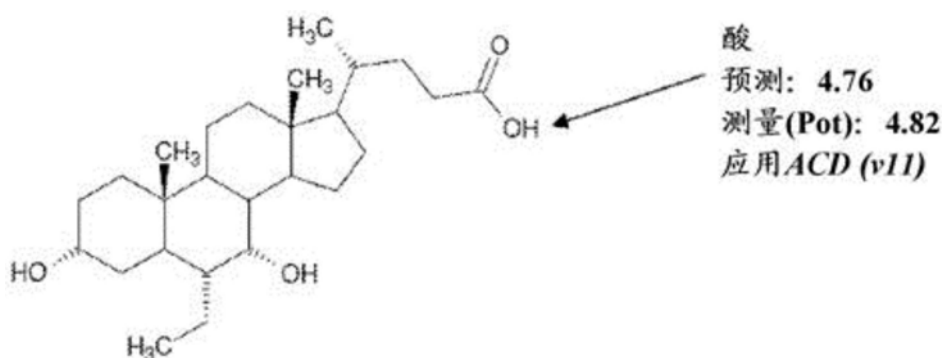
[0613] 表N:Karl Fischer (KF) 结果和含水量数据概要

批号	KF 含水量	较早的 KF 结果	TGA 重量减轻
1	2.4%	2.1%	1.7%
2	1.9%	0.4%	0.6%
3	2.5%	1.4%	1.2%
4	2.2%	0.92%	0.9%
5	2.3%	0.53%	1.5%
6	2.8%	2.1%	1.6%

[0615] pKa测定和预测

[0616] 在带有D-PAS附件的Sirius GIpKa仪器中收集pKa测定数据。在25℃下在水性溶液中通过UV和在甲醇水混合物中通过电势测定法进行测量。用0.15M KCl (aq) 对滴定介质进行离子强度调节 (ISA)。通过Yasuda-Shedlovsky外推,将甲醇水混合物中的实测值校正至0%共溶剂。应用Refinement Pro软件v1.0对数据进行精修。pKa值的预测应用ACD pKa预测软件v9进行。

[0617]



[0618] 奥贝胆酸的pKa使用甲醇作为共溶剂通过电势测定法测量(图27)并应用Yasuda-Shedlovsky外推外推至0%共溶剂(图28)。pKa使得能够测定指定pH下化合物的中性和电离形式的比例。图29显示取决于pH的种类的分布。

[0619] Log P测定

[0620] 使用3种比率的辛醇:离子强度调节 (ISA) 的水,在Sirius GIpKa仪器通过电势测定滴定法收集数据,以得到Log P、Log P<sub>离子</sub>和Log D值。应用Refinement Pro软件v1.0对数据进行精修。Log P值的预测应用ACD v9和Syracuse KOWWIN v1.67软件进行。

[0621] 表O:预测和实测的LogP

ACD (V9) 预测的LogP	5.81
实测的LogP	5.54
实测的LogP <sub>离子</sub>	1.58
实测的LogD7.4	2.98



[0623] 应用ACD软件预测LogP,然后通过电势测定法测量。在3种不同的辛醇/ISA水比率下进行3个滴定,得到图30中绘制的不同曲线。黑色曲线是纯的水溶液pKa滴定,3个有色曲线对应于3种辛醇/ISA水比率。pKa中的位移使得能够测定LogP。

[0624] 亲油性曲线(logD随pH而变化)见图31。Log D是分配系数,代表在特定pH下存在的所有物类的综合亲油性。LogP是化合物常数,其相当于纯的中性物类的分配系数,而LogP<sub>离子</sub>是纯的电离物类的分配系数。LogP和LogP<sub>离子</sub>可自亲油性曲线测定为Y轴分别与pH标度开始时的正切(当分子完全是中性形式时)和pH标度结束时的正切(当分子完全完全电离时)的交叉点。

[0625] 在40℃和75%RH及25℃和97%RH下的2周稳定性

[0626] 在固体形式的加速稳定性试验中,将第1批样品贮存在40℃和75%相对湿度(RH)下。将另一个样品贮存在25℃和97%相对湿度下以检查极高湿度的作用。在5天后和在2周后通过XRPD再次分析两个样品。2个样品在2个贮存条件下保持非晶体持续高达2周,表明1型在这些条件下是稳定的。参见图32和图33。

[0627] 所分析的6个批次全是非晶体的。用调制DSC实验在95℃下测量玻璃转化温度。对于采用的所有分析技术,6个批次显得非常相似,其间的唯一差异是其含水量,通过Karl Fischer滴定从1.9%到2.8%变化。热分析显示不同量的水,并表明分解在175-220℃附近开始。实测pKa为4.82,LogP为5.54。显微评价显示极小的不规则颗粒形成大的硬聚结物。

[0628] 稳定性试验表明,在加速条件(40℃/75%RH)下或是在高湿度(25℃/97%RH)下2周后,该材料仍是非晶体的。重量法蒸汽吸附(GVS)分析表明该材料仅是适度吸湿的,从0至90%相对湿度(RH)总重量增加3.8%。在GVS下未观察到水合物形成。在GVS后通过XRPD再次分析的样品依旧是非晶体的。高玻璃转化温度和稳定性试验结果表明该非晶体形式是稳定的。

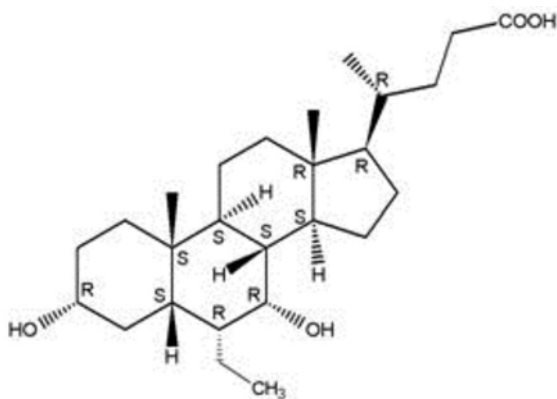
[0629] 实施例6:单晶X射线结构和绝对立体化学

[0630] 在以0.1℃/分钟冷却至5℃接着在室温/50℃8小时周期成熟1周后,由奥贝胆酸从乙腈溶液中重结晶获得的晶体,测定奥贝胆酸的单晶X射线结构(参见图34)。结构与G型一致,产生模拟的XRPD图作为该材料的参比图。可通过使在例如乙腈中的奥贝胆酸溶液冷却来制备G型。

[0631] 结构是正交晶系的,空间群P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>,在不对称单元中含有1分子的奥贝胆酸。最终R1[I>2σ(I)]=3.22%。晶体显示概略尺寸为0.4x 0.4x 0.3mm的棱晶形态。确定分子的绝对立体化学在手性中心C5、C9、C10和C14上为S,在手性中心C3、C6、C7、C8、C13、C17和C22上为R,Flack参数=-0.01(13)。对于在R构型中具有手性中心C5、C9、C10和C14,在S构型中具有手性中心C3、C6、C7、C8、C13、C17和C22的倒置结构,Flack参数=1.01(13),证实了上述指派。

[0632] 总之,该结构具有强数据集且有序。

[0633]



[0634] 用于指派立体化学的软件 (PLATON) 确定手性中心 (C8) 为R立体中心, 而ACD软件 (以及Cahn-Ingold-Prelog) 对 (C8) 的指派为S。然而, 对于B/C环系反式环连接点的指派从晶体结构来看是绝对确定的。

[0635] 对Bijvoet差异使用Bayesian统计测定的绝对结构 (Hoofst等, J. Appl. Cryst., (2008), 41, 96-103) 显示, 所提供的是正确的绝对结构的概率为1.000, 而绝对结构是外消旋晶或非真的概率分别为0.000和0.000。通过该程序计算Flack等同物及其不确定度为-0.019 (17)。

[0636] 奥贝胆酸的结构含有稠合在一起的1个5元环和3个6元环。对5元环 (C13、C14、C15、C16和C17) 的构象分析显示对于这个环最密折起的描述符 (closest puckering descriptor) 是半椅式。对3个6元环 (C1、C2、C3、C4、C5和C10); (C5、C6、C7、C8、C9和C10) 和 (C8、C9、C11、C12、C13和C14) 的构象分析显示对于这些环最密折起的描述符是椅式。

[0637] 在晶体结构中观察到2个独特的分子间氢键。每分子的奥贝胆酸与分别具有氧O1和O4 (用作氧的供体)、O3和O1 (用作接纳体) 的奥贝胆酸的2个不同的对称相关分子形成氢键,  $O1-H1C \cdots O3$  [ $D \cdots A = 2.7419(12) \text{ \AA}$ ] 和  $O4-H4C \cdots O1$  [ $D \cdots A = 2.6053(13) \text{ \AA}$ ] (参见图35)。这些相互作用产生复杂的三维氢键网。最终傅立叶差异图显示最大和最小电子强度分别为0.402和-0.176  $e \text{ \AA}^{-3}$ 。

[0638] 该结构的计算的XRPD图与实验批次的重叠表明, 晶体与大部分一致, 且是奥贝胆酸G型 (参见图36)。

[0639] 表1. 奥贝胆酸G型的晶体数据

[0640]	结晶溶剂	乙腈
	结晶方法	在RT/50℃下成熟
	经验式	$C_{26}H_{44}O_4$
	式量	420.63
	温度	100(2) K
	波长	1.54178 Å
	结晶粒度	0.40 x 0.40 x 0.30 mm
	晶癖	无色棱晶
	晶系	斜方晶
	空间群	$P2_12_12_1$
	晶胞大小	$a = 8.72510(10) \text{ Å}$ $\alpha = 90^\circ$ $b = 12.69860(10) \text{ Å}$ $\beta = 90^\circ$ $c = 22.5408(2) \text{ Å}$ $\gamma = 90^\circ$
	体积	2497.44(4) Å <sup>3</sup>
	Z	4
	密度(计算值)	1.119 Mg/m <sup>3</sup>
	吸收系数	0.574 mm <sup>-1</sup>
	F(000)	928
[0641]	表2. 奥贝胆酸G型的数据收集和结构精修	
	衍射计	SuperNova, Dual, 在零下的Cu, Atlas
	辐射源	SuperNova (Cu) X射线源, CuK $\alpha$
	数据收集方法	$\omega$ 扫描
	用于数据收集的 $\theta$ 范围	9.15-74.49°
	下标范围	$-10 \leq h \leq 10$ , $-15 \leq k \leq 15$ , $-28 \leq l \leq 26$
	收集的反射	50001
[0642]	独立反射	5073 [R(int) = 0.0220]
	独立反射的覆盖度	99.4%
	检查反射的变化	N/A
	吸收校正	来自等同物的半经验
	最大和最小传输	1.00000和0.78605
	结构解析技术	直接
	结构解析程序	SHELXTL (Sheldrick, 2001)

精修技术	对 $F^2$ 的全矩阵最小二乘
精修程序	SHELXTL (Sheldrick, 2001)
函数最小化	$\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2$
数据/约束/参数	5073/0/286
对 $F^2$ 的拟合优度	1.060
$\Delta/\sigma_{\max}$	0.001
最终R指数	
5039数据; $I > 2\sigma(I)$	$R1 = 0.0320, wR2 = 0.0859$
全部数据	$R1 = 0.0322, wR2 = 0.0861$
加权方式	计算 $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0503P)^2 + 0.5520P]$ 其中 $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
[0643] 绝对结构参数	-0.01(13)
最大差异峰和空穴	0.402和-0.176 eÅ <sup>-3</sup>
结构的精修概要如下:	
有序的非H原子, XYZ	随意精修
有序的非H原子, U	各向异性
H原子(在碳上), XYZ	连接原子上的理想化位置
H原子(在碳上), U	结合原子的U(eq)的适当倍数
H原子(在杂原子上), XYZ	随意精修
H原子(在杂原子上), U	各向同性
无序原子, OCC	非无序
无序原子, XYZ	非无序
无序原子, U	非无序

[0644] 实施例7: 奥贝胆酸1型(非晶体)和晶体(F型)形式之间的生物利用度差异固体奥贝胆酸的物理状态在口服给予受试者(例如大鼠)时可在分子的生物利用度中起作用。进行了下述研究以评价在单次口服给药后的血清动力学和肠吸收的效率和奥贝胆酸的固体非晶体和晶体形式的药代动力学。对在给予奥贝胆酸1型(非晶体)或F型后的奥贝胆酸血浆浓度与时间的分布、 $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 和AUC进行了比较(参见图37-38)。

[0645] 将奥贝胆酸1型(非晶体)和F型给予大鼠,在不同的时间收集各动物血液持续至少3小时。针对奥贝胆酸的各个形式对6只动物进行了研究。

[0646] 实验方案:

[0647] 所用的试验物质是奥贝胆酸1型(非晶体)和晶体F型。可通过从乙腈或硝基甲烷中成熟来制备F型。把制剂制备成pH 4的水中的混悬剂。研究模型是约225-约250g的成年雄性Sprague Dawley大鼠(Harlan Laboratories)。各剂量途径使用6只动物。剂量为P0 20mg/kg/5mL。在用奥贝胆酸制剂治疗前,使动物禁食过夜。口服给药通过胃管饲进行。

[0648] 在第一天,给动物装上植入左颈静脉的导管(SOP VIVO/SAF6),通过异氟烷达到麻醉。在手术恢复一天后开始实验。通过在肝素化注射器(Na Heparin)中的导管采集约500 $\mu$ L血液(250 $\mu$ L血浆),并立即收集在冰/水浴中的微管中。在1小时内,使样品在4 $^{\circ}$ C下以10000xg离心5分钟。将血清立即转移到微管中,并在-20 $^{\circ}$ C下贮存。给药后30分钟、1小时、1.3小时、2小时和3小时收集血样。采用HPLC-ES/MS/MS定量方法分析血清样品。采用非区室方法进行药代动力学研究。

[0649] 结果:

[0650] 图37中报告了在2种固体形式的20mg/Kg b.w口服单剂给药后奥贝胆酸的平均血浆浓度。值是各制剂6套实验的均值。图中报告了标准差。

[0651] 在给予晶体形式后,1.5小时后达到C<sub>max</sub>,血浆奥贝胆酸浓度遵循具有一个最大值的正常动力学,3小时后剂量是C<sub>max</sub>的几乎一半。

[0652] 在给予奥贝胆酸1型(非晶体)1型后的动力学概况不同于晶体F型的动力学概况。30分钟后获得早期血浆浓度峰,2小时后获得第二个峰。6只大鼠中数据的变化性非常低,这一行为在统计学上不同于所述晶体形式的特点。对于所述晶体形式,所研究的3小时的AUC较高。动力学表明,3小时后奥贝胆酸仍存在于血浆中。之前已证实,奥贝胆酸通过肝的途径产生肝代谢物牛磺胆酸,它分泌进入胆汁,并在肠肝循环中蓄积。因此,牛磺胆酸的测量可用来确定通过肝的途径的奥贝胆酸的量。图38中报告了牛磺胆酸形成的速率,其显示牛磺胆酸形成较快,并且在给予所述晶体形式后达到较高的浓度。

[0653] 熔点和玻璃转化

[0654] 奥贝胆酸1型(非晶体)1型和晶体F型的熔点使用常规方法测量。测量作为参比化合物的鹅脱氧胆酸和乌索脱氧胆酸的熔点。一式三份进行测量。对于晶体形式,从固态到液态的转变定义为熔解温度(T<sub>m</sub>),而对于非晶体形式定义为玻璃化温度转变(T<sub>g</sub>)。表中报告了测量值,以摄氏 $^{\circ}$ C和开尔文 $^{\circ}$ K两者表示。

[0655] 表3:奥贝胆酸(1型和F型)和CDCA和UDCA的熔点

[0656]

化合物	实验数据		文献数据	
	T <sub>m</sub> ( $^{\circ}$ C)	T <sub>g</sub> ( $^{\circ}$ C)	T <sub>m</sub> ( $^{\circ}$ C)	T <sub>g</sub> ( $^{\circ}$ C)
CDCA	136-140	-	119 143 163	98
UDCA	203-207	-	203	105
奥贝胆酸	120-124 235-237	108-112	-	-

化合物	实验数据			文献数据		
	T <sub>m</sub> (°K)	T <sub>g</sub> (°K)	T <sub>g</sub> /T <sub>m</sub> (°K)	T <sub>m</sub> (°K)	T <sub>g</sub> (°K)	T <sub>g</sub> /T <sub>m</sub> (°K)
[0657] CDCA	409-413	-	-	392	371	0,85
				416		
				436		
UDCA	476-480	-	-	477	378	0,79
奥贝胆酸	393-397	381-385	0,75	-	-	0,75
	508-510					

[0658] 结果:

[0659] 针对CDCA和UDCA得到的值与之前报告的值一致,其中UDCA的熔点高于CDCA的熔点。1型的转变玻璃化温度T<sub>g</sub> (102-112°C) 低于F型的熔点温度T<sub>m</sub> (120-124°C)。当比较2种固态形式时,此观察模式与之前报告的数据一致。F型在较高温度 (235-237°C) 下具有额外转变。

[0660] 以开尔文度表示的最高熔点温度和玻璃转化温度间的比率与其它药物和其它胆汁酸十分类似 (J.Kerc等Thermochim.Acta,1995 (248) 81-95)。

[0661] 示差扫描量热法分析

[0662] 进行了示差扫描量热法 (DSC) 分析以更好地界定奥贝胆酸晶体和非晶体形式的熔点和物理状态。所用仪器为Mettler Toledo DSC 821e型。对1型和F型各约4-5mg进行了分析。以10°C/分钟加热速率将化合物暴露于30-300°C的温度范围内。

[0663] 图39显示针对奥贝胆酸晶体F型获得的DSC曲线。检测到相当于化合物熔点的120.04°C处的一个吸热转变。该结果还得到热台显微术 (HSM) 的证实;在30°C-240°C的范围内,所观察到的固体-液体转变在122-124°C下。在DSC迹线中,针对F型获得的峰形和强度与晶体形式所显示的典型表现一致。然而,峰宽相当宽;这可能是由于不均匀的晶体所致。热解重量分析 (TGA) 在30-300°C温度范围内不显示任何重量减轻。

[0664] 图40显示针对奥贝胆酸非晶体1型获得的DSC曲线。观察到在79.95°C处的一个吸热转变。峰形和强度与非晶化合物所预期的表现一致。对于这些物质,固体-液体转变 (玻璃转化) 所需能量小于结晶化合物。温谱图在30-300°C温度范围内不显示任何重量减轻。

[0665] 水溶性

[0666] 奥贝胆酸1型 (非晶体) 和晶体F型的水溶性按照本领域已知方法测量。简单地说,将固体悬浮于低pH (HCl 0.1mol/L) 的水中,并在稍稍混合下置于25°C下一周以使之平衡。将饱和溶液过滤,通过HPLC-ES-MS/MS测量溶液中化合物的浓度。

[0667] 结果:

	水溶性 (μmol/L)
1型	17.9
F型	9.1

[0669] 相对于F型的9.1μmol/L,1型呈现较高的溶解度17.9μmol/L。

[0670] 按照奥贝胆酸的生物利用度数据,晶体F型高于奥贝胆酸1型 (非晶体)。尽管给予1型后血浆浓度峰较早,但是血浆概况显示F型更有效地吸收 (较高的AUC),甚至动力学更有

规律,反映了药物在肠内容物中的最佳分布。1型显示这个早期峰,之后第二个峰,其C<sub>max</sub>低于F型的C<sub>max</sub>。

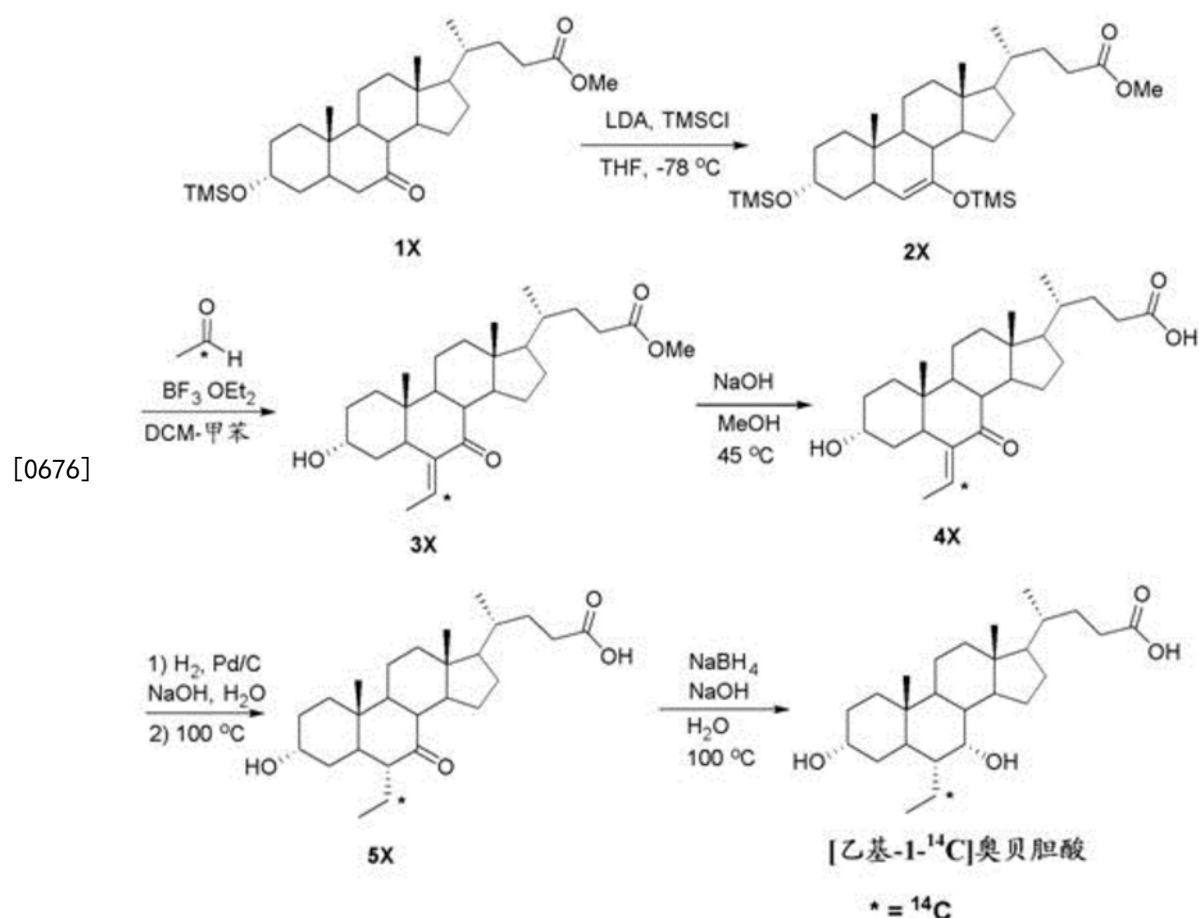
[0671] 1型的水溶性高于F型的水溶性。F型显得是稳定的,因为热解重量分析(TGA)在所研究的温度范围内未显示任何重量减轻。

[0672] 按照这些结果,F型当口服给予时显得更有效地被肠吸收,并被肝吸收。F型的主要肝代谢物牛磺结合物的形成速率几乎是与1型相比的两倍,表明了更有效的转运和在肠肝循环中蓄积和3小时后的血清浓度。

[0673] 实施例8:放射性标记的奥贝胆酸的制备

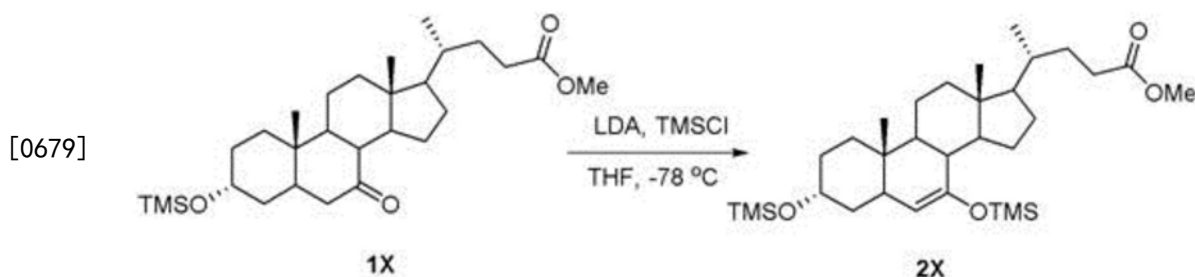
[0674] 放射性标记的奥贝胆酸按照以下流程制备。

[0675] 流程5



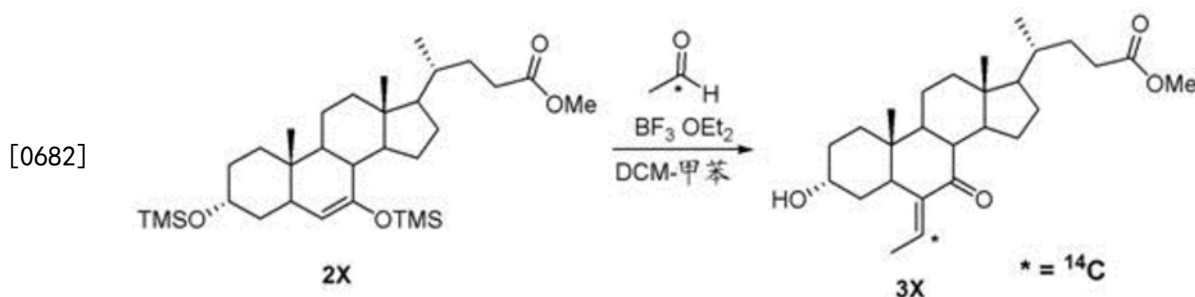
[0677] 在30℃下在5-mm外径管(Norell, Inc. 507-HP)中记录CDCl<sub>3</sub>和MeOD-d<sub>4</sub>溶液中的NMR波谱,并在Varian VNMRs-400中以<sup>1</sup>H的400MHz收集。化学位移(δ)以四甲基硅烷(TMS = 0.00ppm)为基准,并用ppm表示。LC-MS/MS以Accela-Thermo Finnigan LCQ Fleet操作EST(-)电离模式在离子阱质谱仪中取得。HPLC在Agilent 1200系列(柱:Xterra MS C8, 250x 4.6mm, 5μm, 40℃)连线β-Ram中取得。比活在LSA(Liquid Scintillation Analyzer, Perkin Elmer, Tri-Carb 2900TR)中取得。

[0678] 化合物2X的制备



[0680] 在-20℃下,向二异丙胺(1.59g,15.8mmol)的无水THF(6.0mL)溶液中加入n-BuLi(6.30mL,2.5M,15.8mmol)。在-20℃下搅拌反应混合物1小时后,冷却至-78℃,加入TMSCl(1.72g,15.8mmol),接着加入含化合物1X(3.00g,6.29mmol)的无水THF(6.0mL)。在-78℃下搅拌反应混合物1小时,通过加入NaHCO<sub>3</sub>猝灭,并在室温下搅拌30分钟。有机层经分离,并真空浓缩,得到化合物2X(3.29g,95%),无需进一步纯化用于下一步骤。

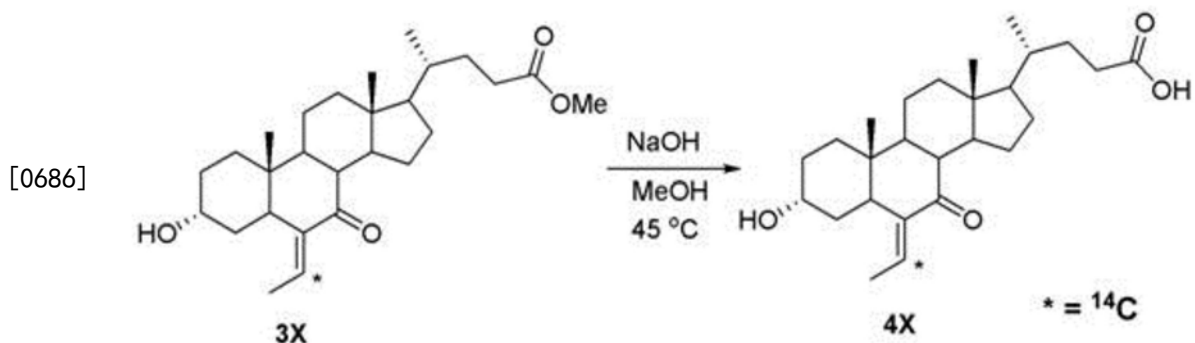
[0681] 化合物3X的制备



[0683] 将含[1-<sup>14</sup>C]乙醛(330mCi,5.63mmol)(由[<sup>14</sup>C]BaCO<sub>3</sub>制备,SA=58.6mCi/mmol)的甲苯(1.0mL)和含乙醛(130mg,2.95mmol)的DCM(2.0mL)在-78℃下混合,然后在-78℃下转移到化合物2X(3.29g,6.00mmol)的DCM(13.0mL)溶液中,接着加入BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>(1.05g,7.40mmol)。在-78℃下搅拌1小时后,使反应混合物升温直到35℃,并在上述温度下搅拌1小时。通过加入水(10mL)猝灭反应,水层用DCM萃取,合并的有机层经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤后,真空浓缩。残余物用SiO<sub>2</sub>柱色谱法(己烷:EtOAc=5:1-3:1)纯化,得到化合物3X(102mCi,31%,SAW 37.0mCi/mmol),为白色固体。

[0684] <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>,Varian,400MHz):δ 0.65(3H,s);0.93(3H,d,J=6.0Hz),1.01(3H,s),1.06-1.49(12H,m),1.62-2.04(7H,m),1.69(3H,d,J=6.8Hz),2.18-2.28(2H,m),2.32-2.43(2H,m),2.58(1H,dd,J=12.8,4.0Hz),3.62-3.70(1H,m),3.67(3H,s),6.18(1H,q,J=6.8Hz)。

[0685] 化合物4X的制备



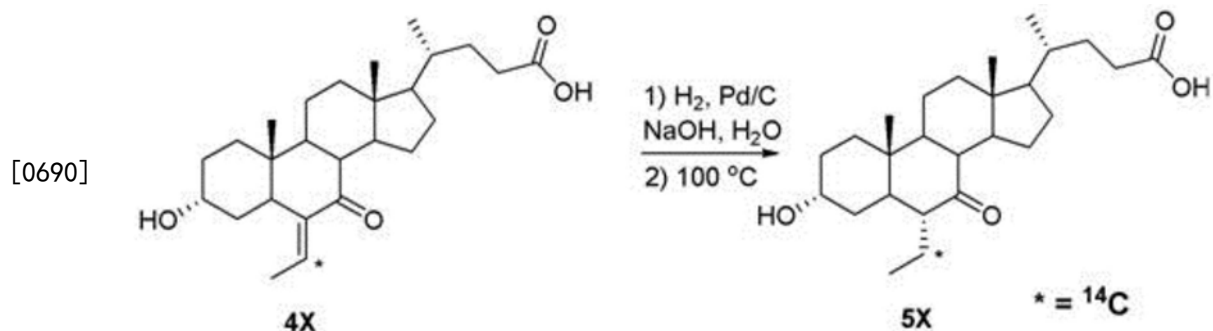
[0687] 在室温下,向化合物3X(102mCi,2.75mmol)的MeOH(6.0mL)溶液中加入含NaOH



(220mg, 5.50mmol) 的  $\text{H}_2\text{O}$  (3.0mL)。在  $45^\circ\text{C}$  下搅拌反应混合物1小时后,冷却至室温,减压除去  $\text{MeOH}$ ,用  $\text{H}_2\text{O}$  (12mL) 稀释。水层用  $\text{H}_3\text{PO}_4$  酸化,用  $\text{DCM}$  萃取,并将有机层真空浓缩。将残余物悬浮于  $\text{Et}_2\text{O}$  中,经过滤收集沉淀,得到化合物4X (86.3mCi, 85%), 为白色固体。

[0688]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , Varian, 400MHz):  $\delta$  0.63 (3H, s), 0.92 (3H, d,  $J=6.0\text{Hz}$ ), 0.99 (3H, s), 1.04–1.50 (13H, m), 1.61–2.01 (7H, m), 1.67 (3H, d,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 2.21–2.28 (2H, m), 2.35–2.41 (2H, m), 2.56 (1H, dd,  $J=12.8, 4.0\text{Hz}$ ), 3.58–3.69 (1H, m), 6.16 (1H, q,  $J=7.2\text{Hz}$ )。

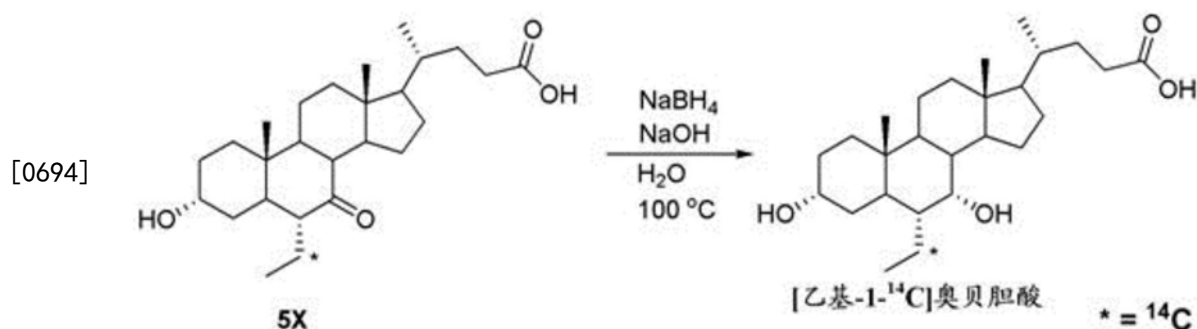
[0689] 化合物5X的制备



[0691] 将化合物4X (86.3mCi, 2.35mmol) 和5%–Pd/C (100mg) 在aq. 0.5M  $\text{NaOH}$  (10mL, 5.0mmol) 中的混合物在室温、 $\text{H}_2$ 气氛(气囊)下搅拌10小时,然后在  $100^\circ\text{C}$  下搅拌14小时。催化剂经过滤除去,用水洗涤,滤液用  $\text{H}_3\text{PO}_4$  酸化。经过滤收集沉淀物,将固体溶于  $\text{EtOAc}$  中,用盐水洗涤,通过  $\text{SiO}_2$  短垫过滤,并真空浓缩。残余固体用  $\text{EtOAc}$  重结晶,得到化合物5X (67.7mCi, 78%), 为白色固体。

[0692]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOD-d}_4$ , Varian, 400MHz):  $\delta$  0.71 (3H, s), 0.75–0.84 (1H, m), 0.81 (3H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 0.92–1.01 (1H, m), 0.96 (3H, d,  $J=6.4\text{Hz}$ ), 1.06–1.38 (7H, m), 1.25 (3H, s), 1.41–1.96 (12H, m), 2.01–2.05 (1H, m), 2.11–2.24 (2H, m), 2.30–2.37 (1H, m), 2.50 (1H, t,  $J=11.4\text{Hz}$ ), 2.80–2.85 (1H, m), 3.42–3.49 (1H, m)。

[0693] [乙基- $1-^{14}\text{C}$ ]奥贝胆酸的制备



[0695] 在  $80^\circ\text{C}$  下向化合物5X (67.7mCi, 1.83mmol) 的aq. 2M  $\text{NaOH}$  (4.50mL, 9.00mmol) 的溶液中加入  $\text{NaBH}_4$  (416mg, 11.0mmol) 的  $\text{H}_2\text{O}$  (2.0mL) 溶液。在  $100^\circ\text{C}$  下搅拌反应混合物2小时后,在室温下加入水 (6.0mL),并用  $\text{H}_3\text{PO}_4$  酸化。水层用  $\text{DCM}$  萃取,经无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥,通过  $\text{SiO}_2$  短垫过滤,并真空浓缩,残余物用  $\text{SiO}_2$  柱色谱法(己烷: $\text{EtOAc}=1:1-1:3$ ) 纯化,得到产物 (44.0mCi, 65%), 为白色固体。将产物 (44.0mCi, 1.19mmol) 和奥贝胆酸 (120mg, 0.285mmol) 溶于  $\text{EtOAc}$  (4mL) 中,将溶液在  $50^\circ\text{C}$  下搅拌2小时,然后真空浓缩。将残余的油状物悬浮于  $\text{Et}_2\text{O}$  中,经过滤收集沉淀物,得到[乙基- $1-^{14}\text{C}$ ]奥贝胆酸 (560mg, 38.5mCi, SA=29mCi/

mmol), 为白色固体。

[0696]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , Varian, 400MHz):  $\delta$  0.66 (3H, s), 0.88 (3H, s), 0.93 (3H, t,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 0.93 (3H, d,  $I=6.4\text{Hz}$ ), 0.96-1.04 (1H, m), 1.08-1.52 (14H, m), 1.51-1.60 (10H, m), 2.22-2.30 (1H, m), 2.36-2.44 (1H, m), 3.38-3.45 (1H, m), 3.71 (1H, s)。

[0697] LC-MS/MS (MS: LCQ Fleet): MS 计算值: 421.56; MS 实测值: 421.07  $[\text{M-H}]^-$ 。

[0698] Radio TLC: 二氧化硅 60F<sub>254</sub> 的 TLC 板, 流动相为 EtOAc。放射化学纯度为 98.90%,  $R_f=0.675$ 。

[0699] HPLC (Agilent 1200 系列): 流动相: 乙腈: 5mM 磷酸盐缓冲液 ( $\text{pH}=3$ ): MeOH=450: 450: 100。放射化学纯度为 98.19% ( $\beta$ -ram),  $R_t=20.00$  分钟。

[0700] [乙基-1- $^{14}\text{C}$ ] 奥贝胆酸的分子式为  $^{14}\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4$ , 在通过 LSC 的 29mCi/mmol 比活下的分子量为 421.46。

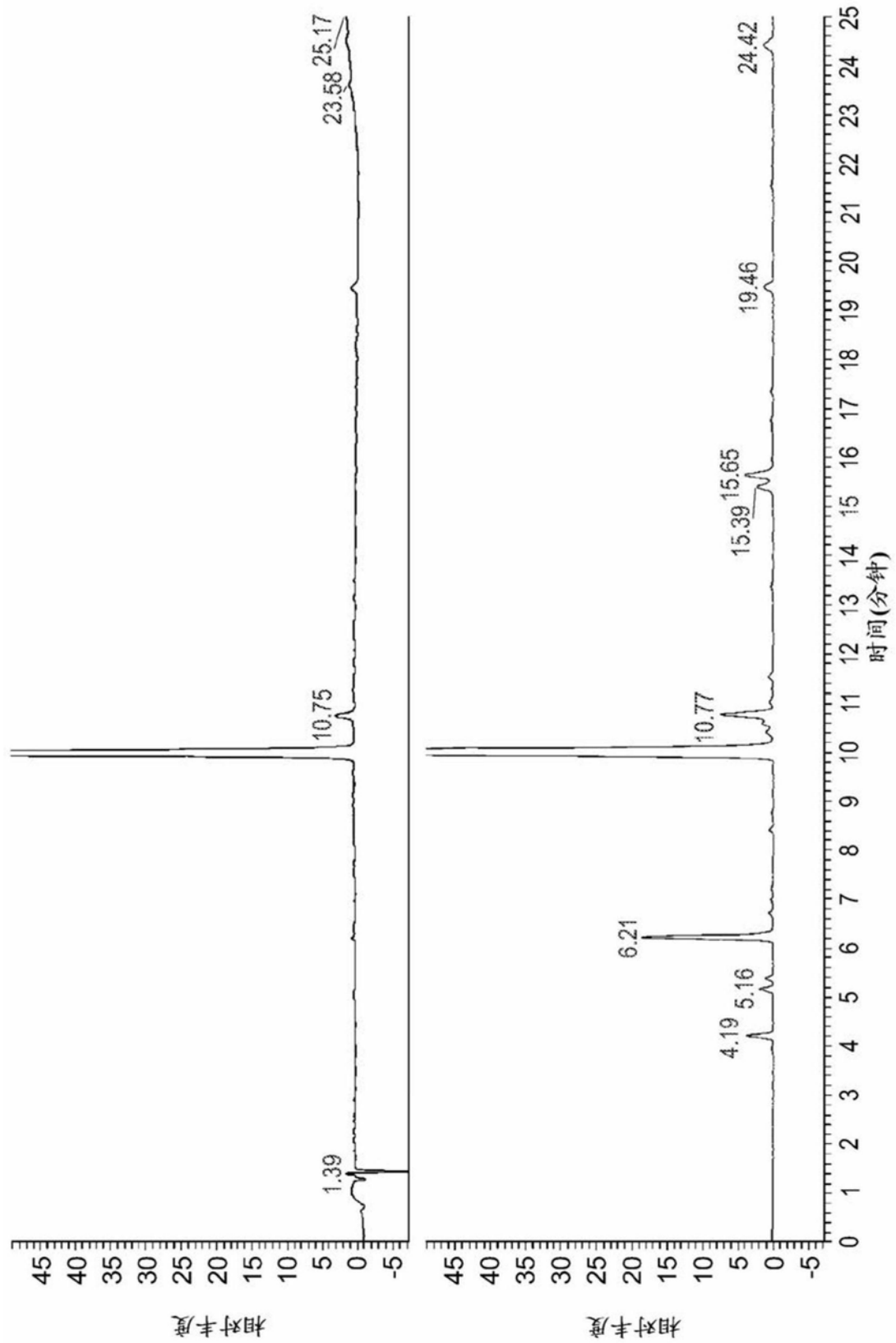


图1

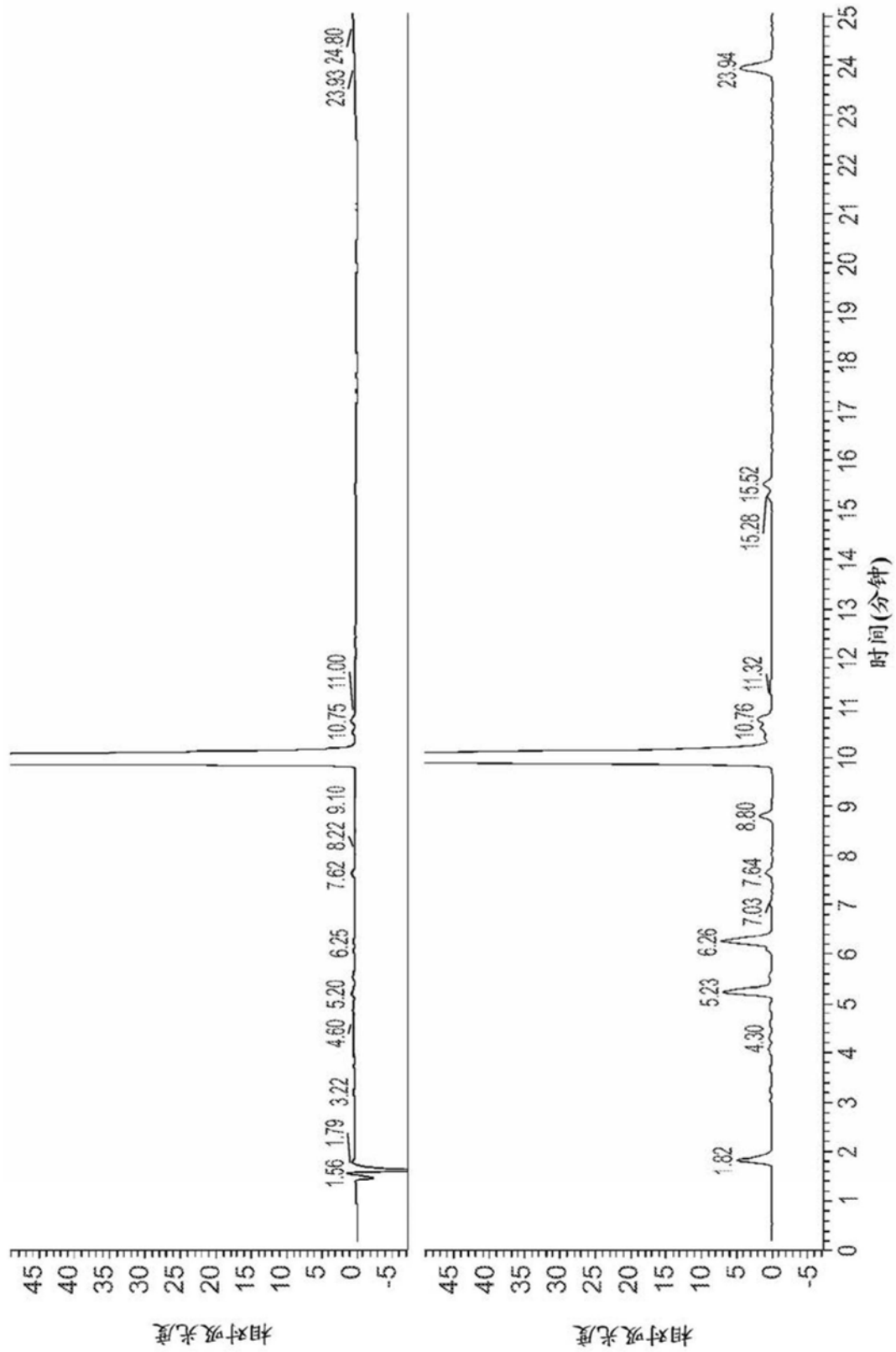


图2

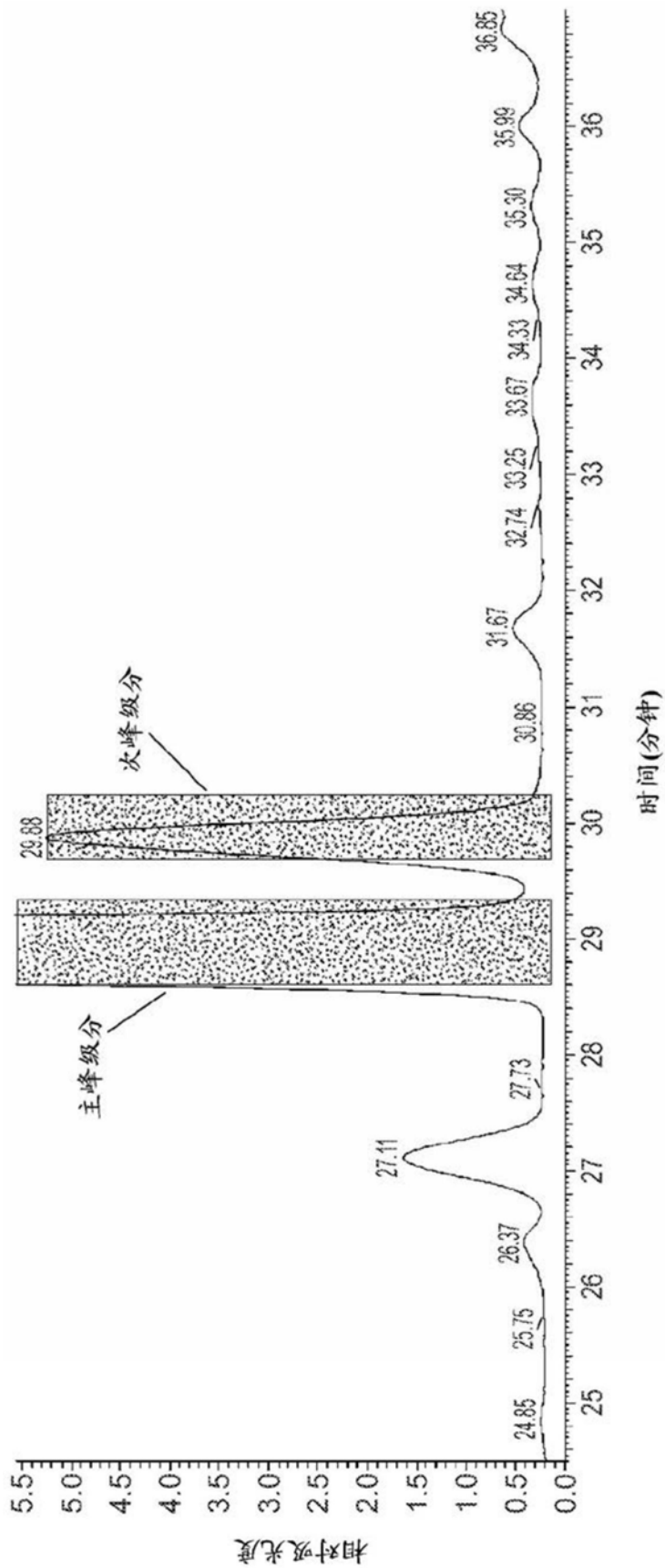


图3

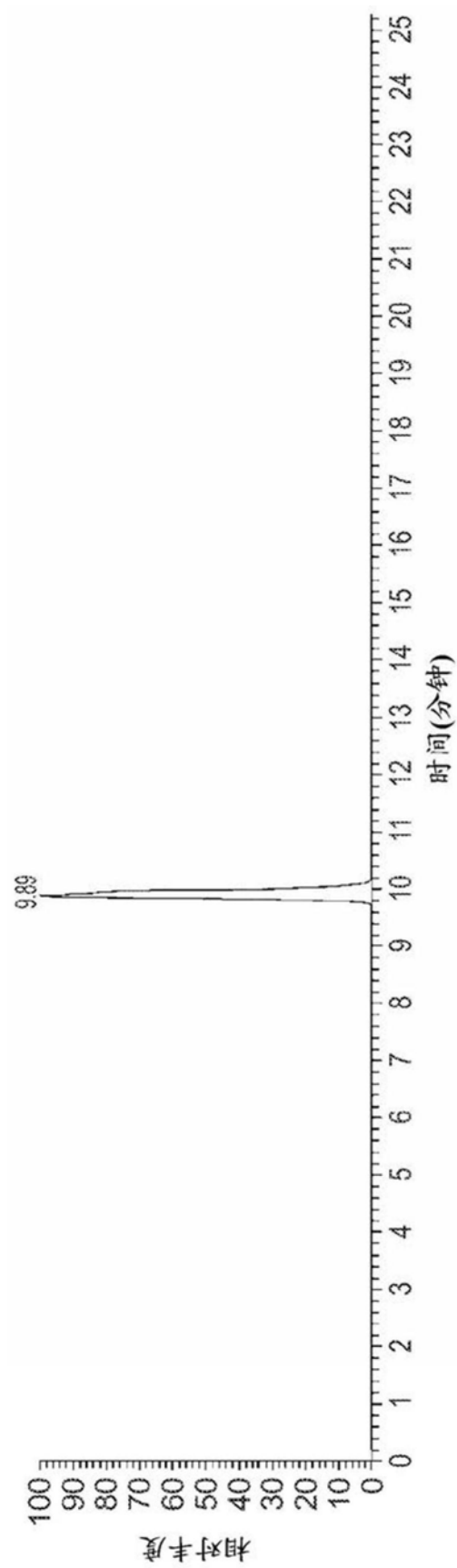


图4A

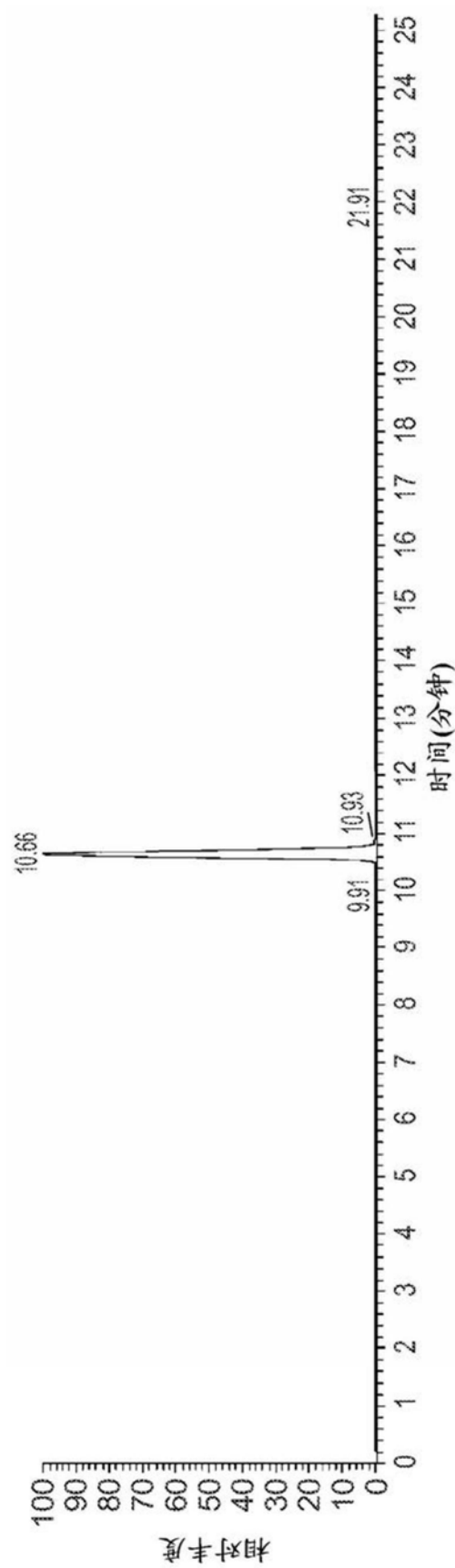


图4B

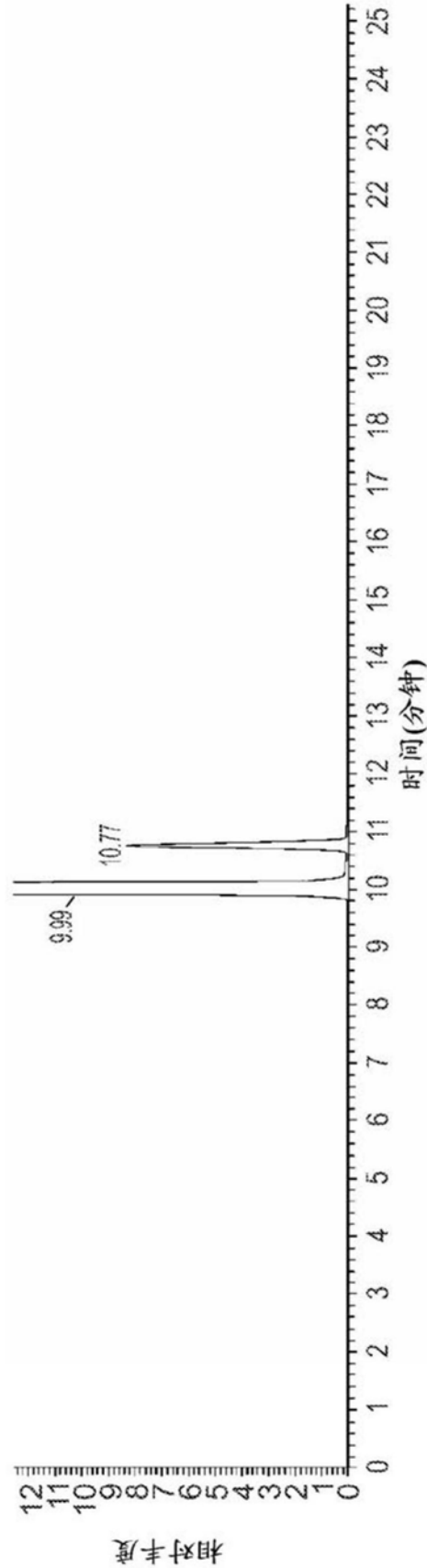


图4C



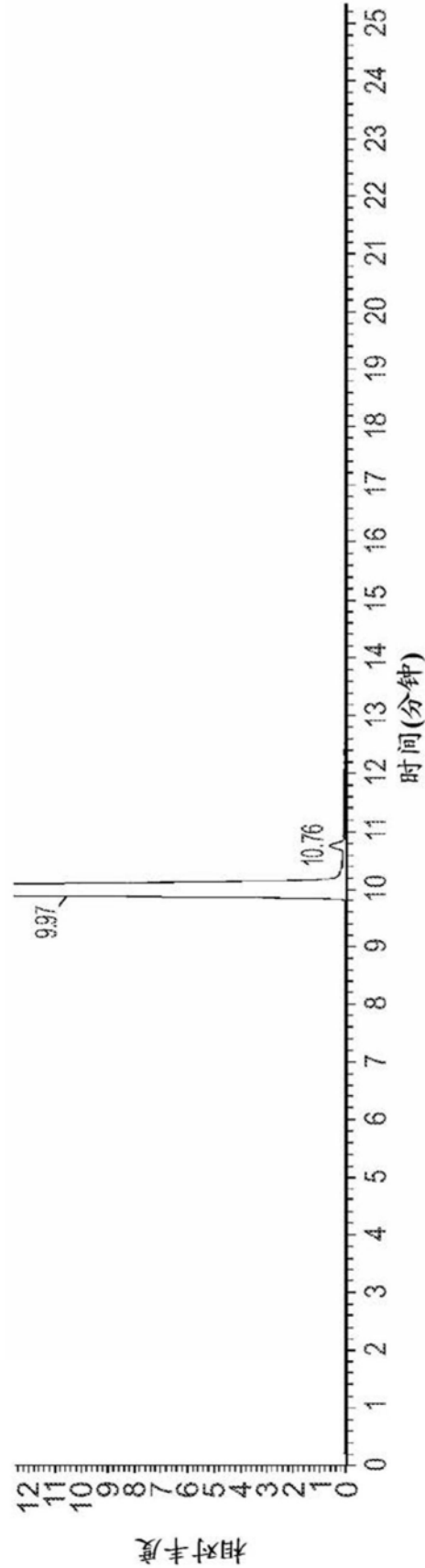


图4D

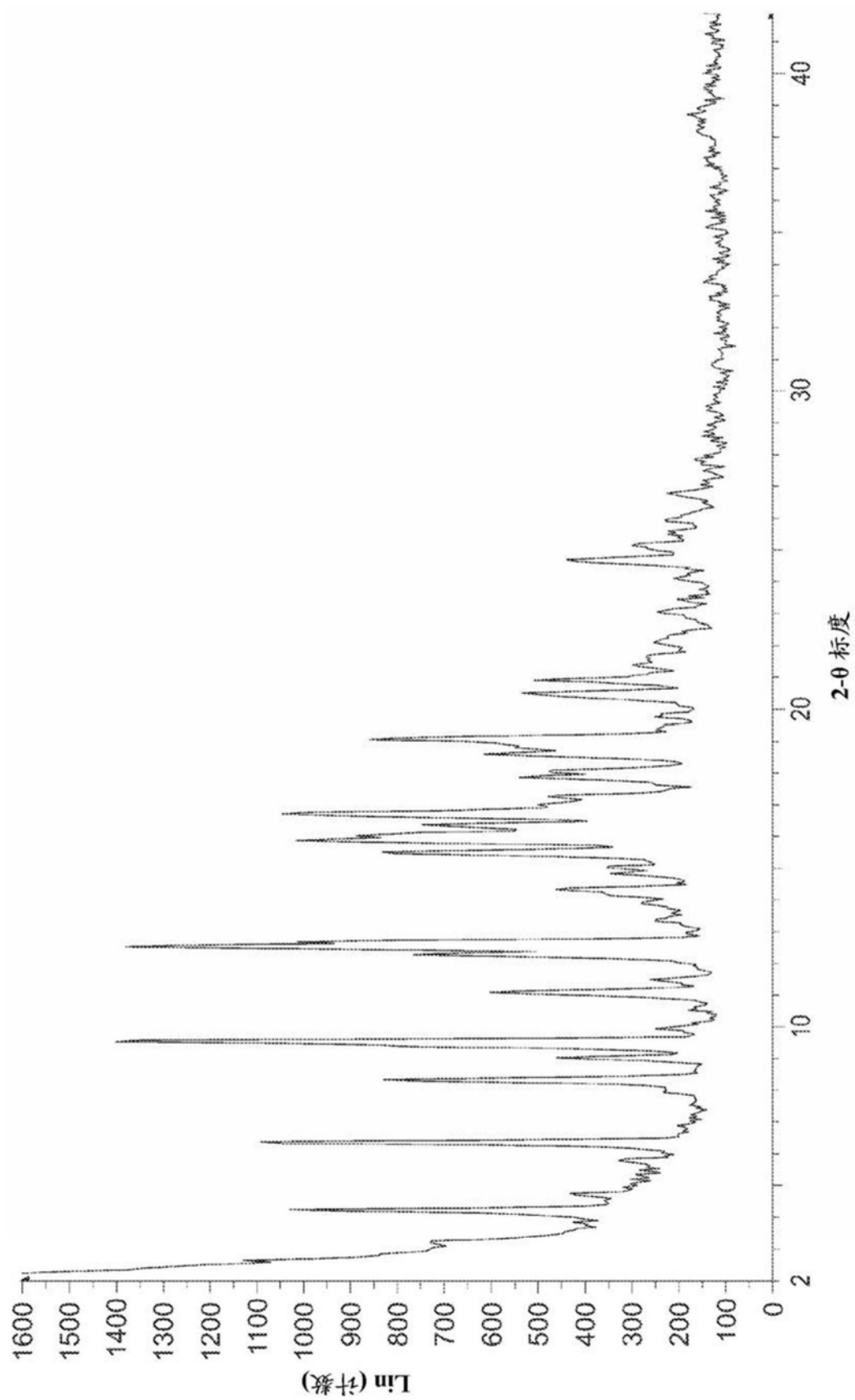


图5

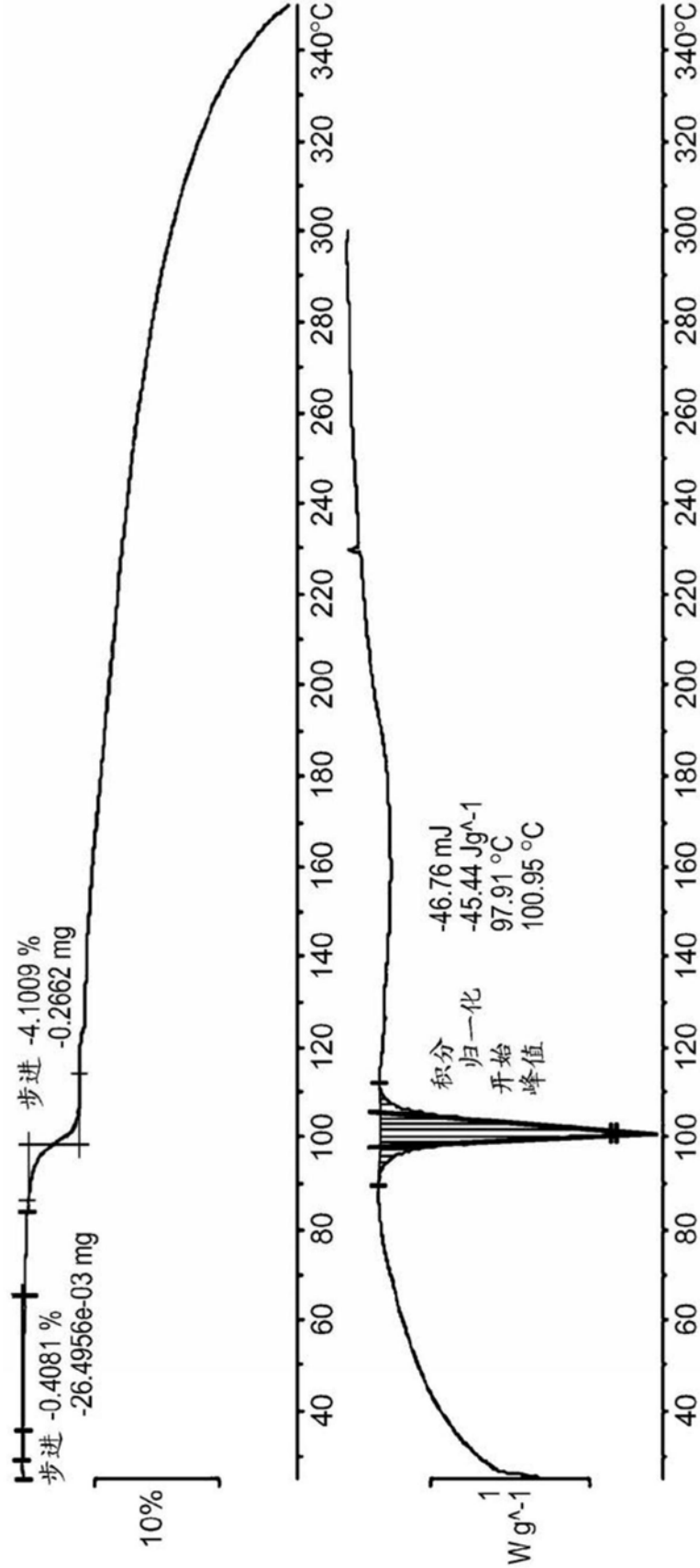


图6

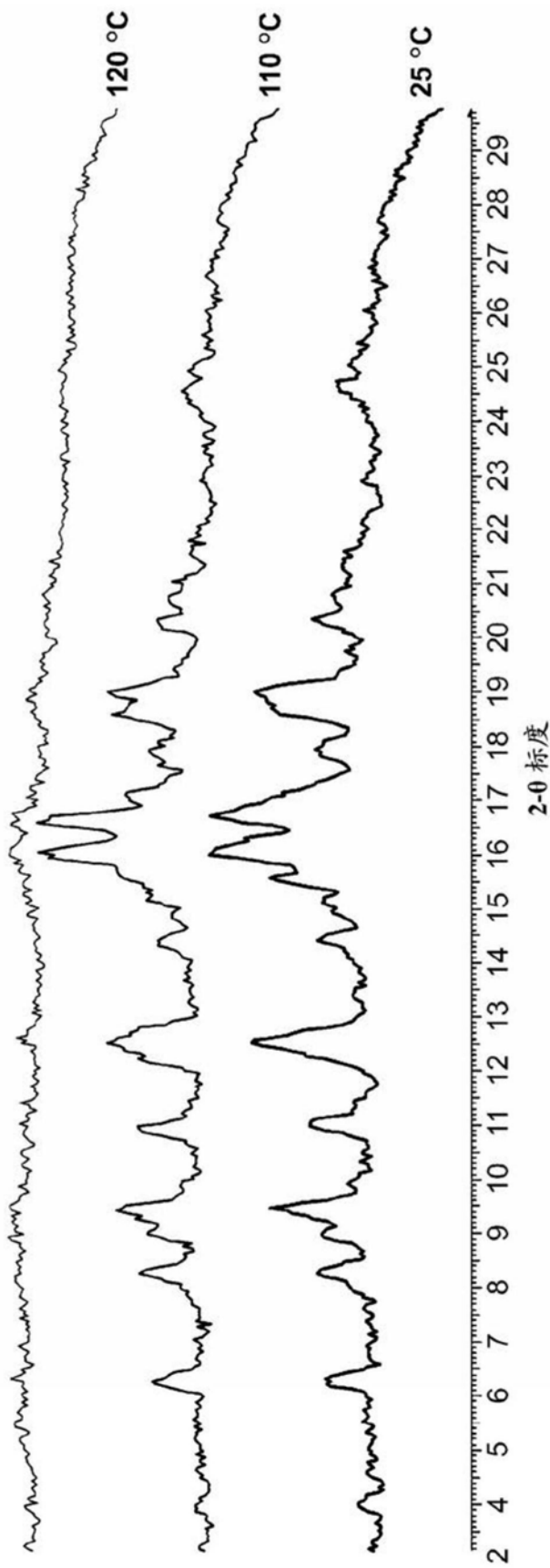


图7

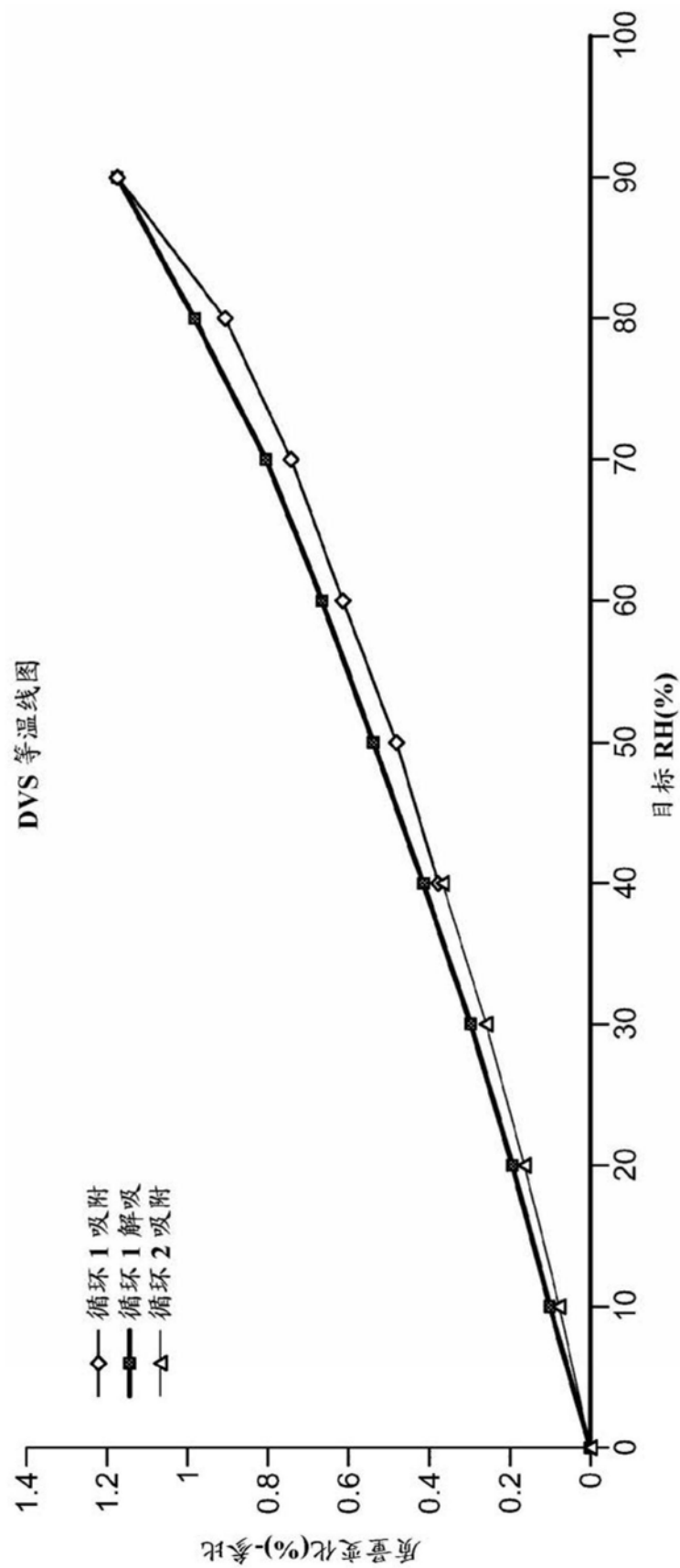


图8A

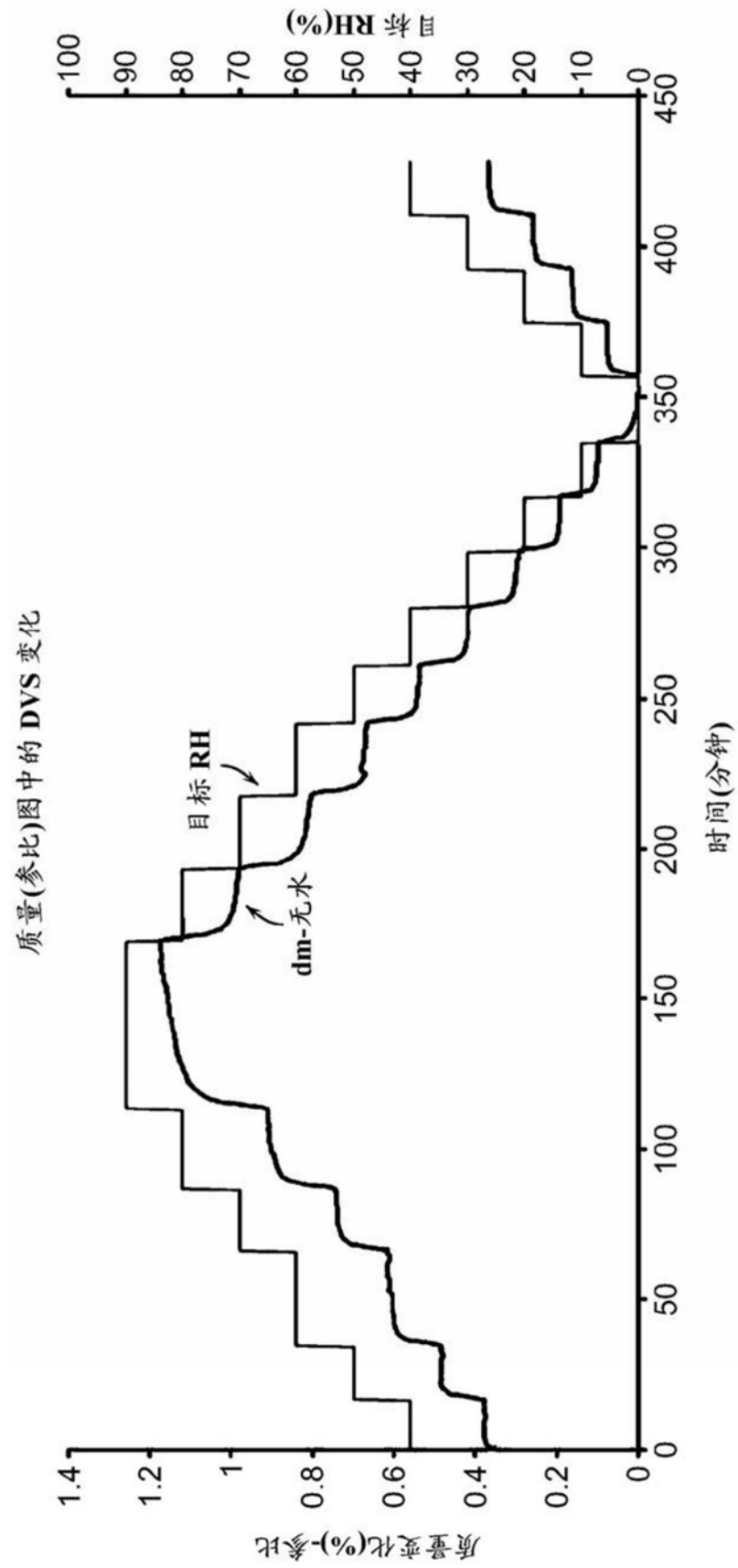


图8B

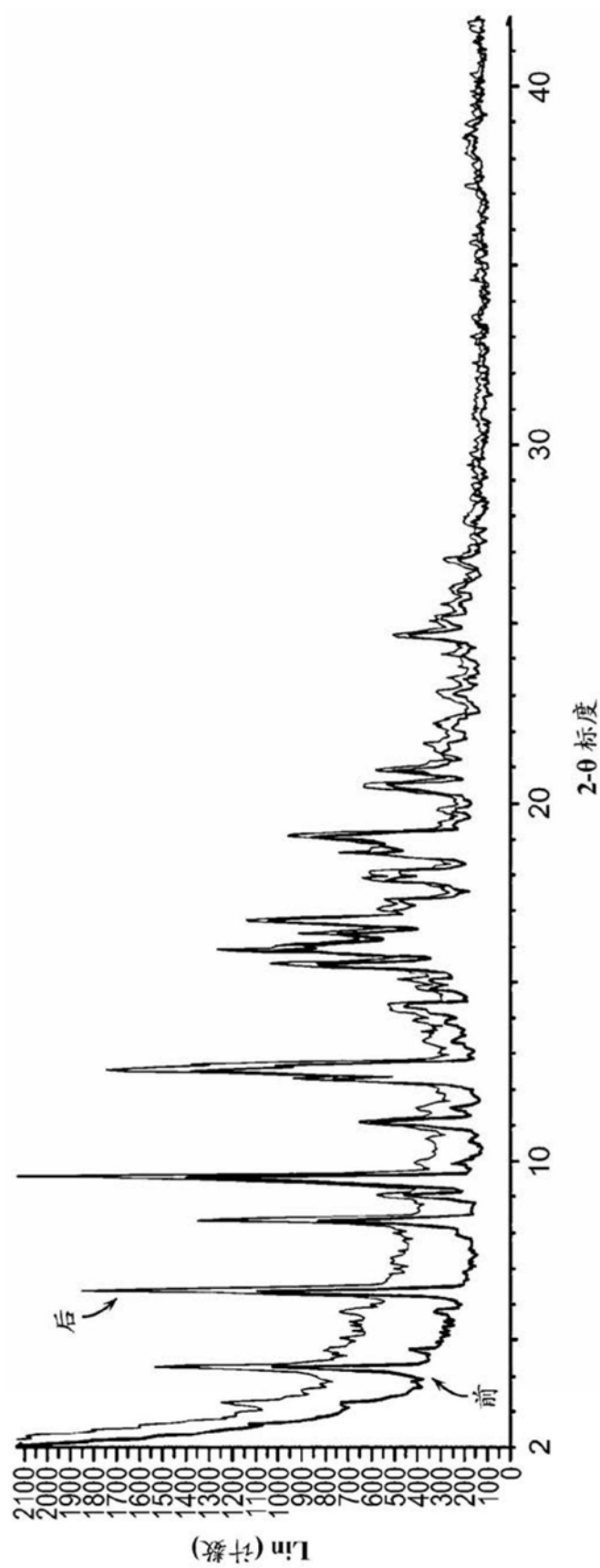


图8C

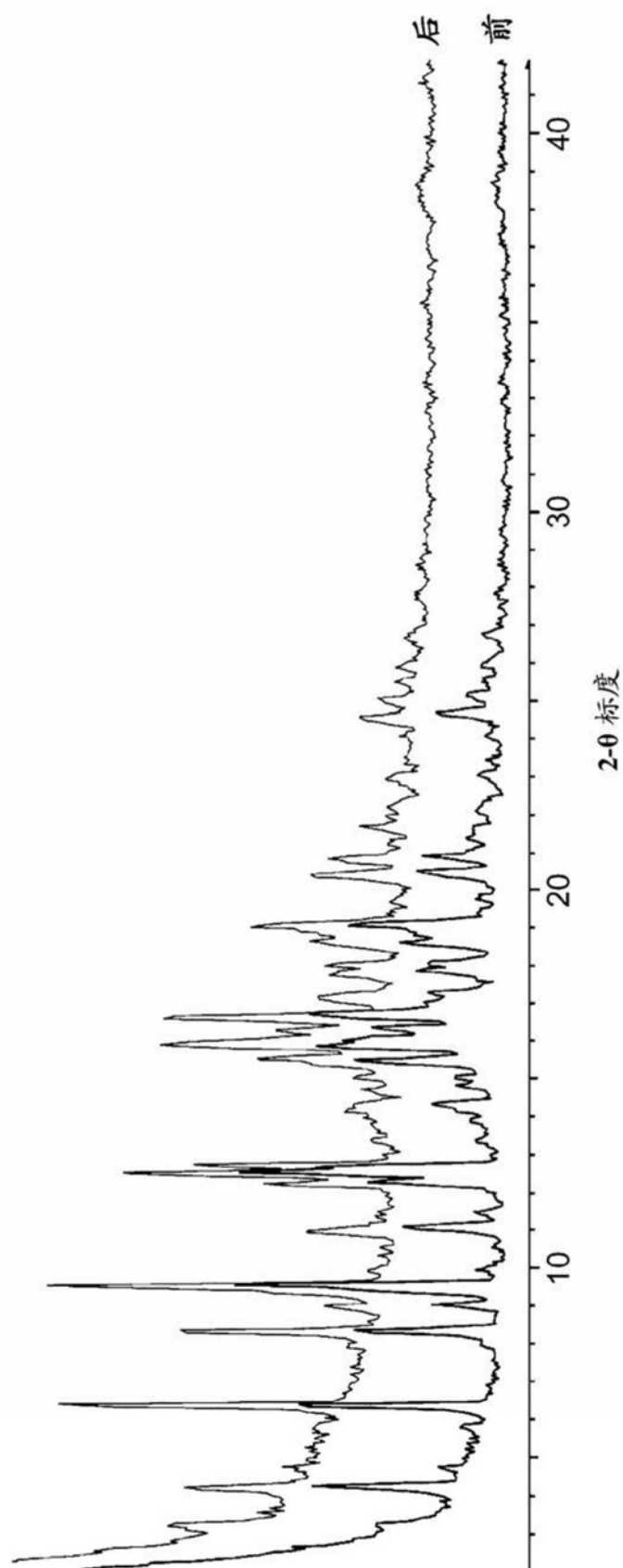


图9



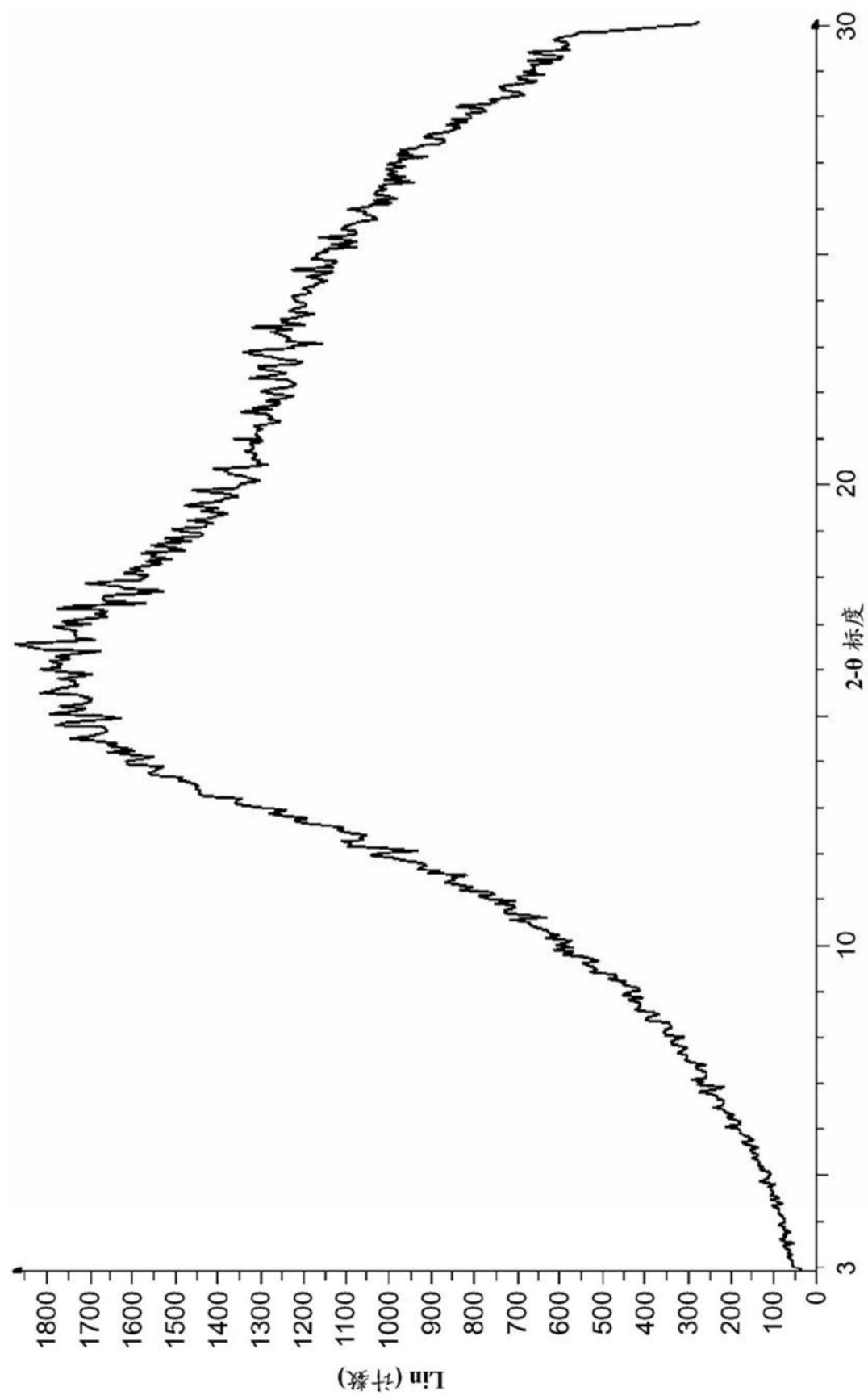


图10

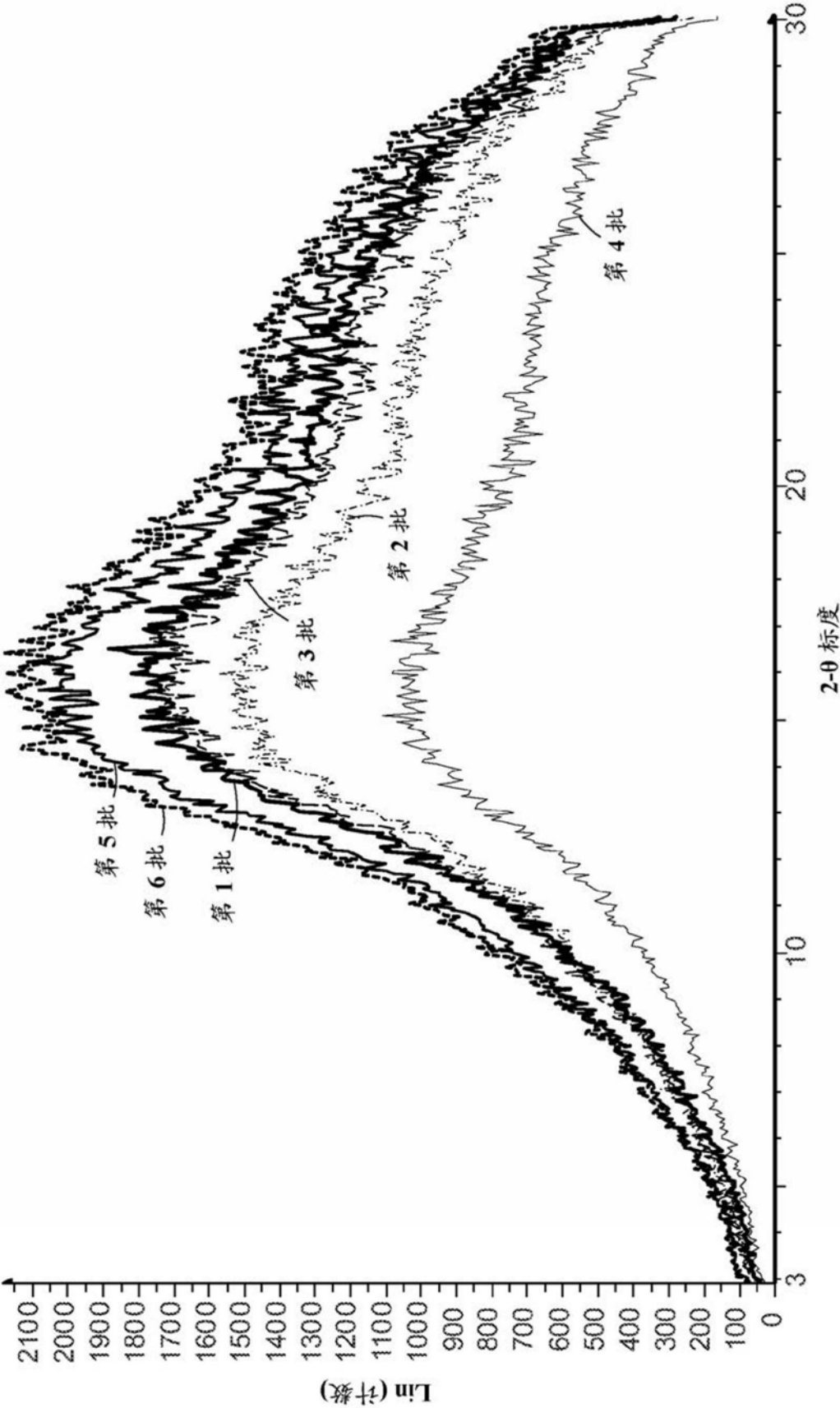
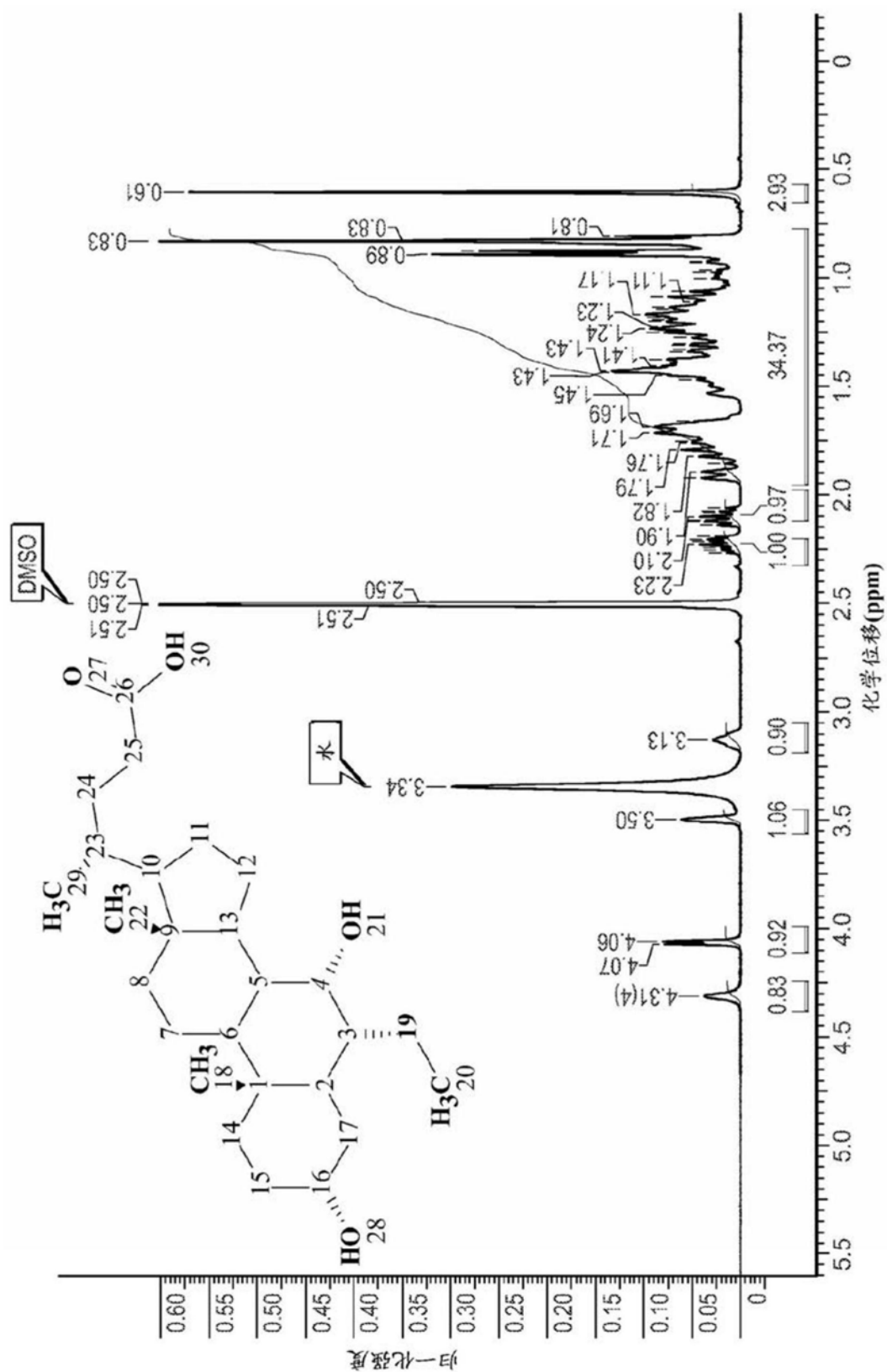


图11



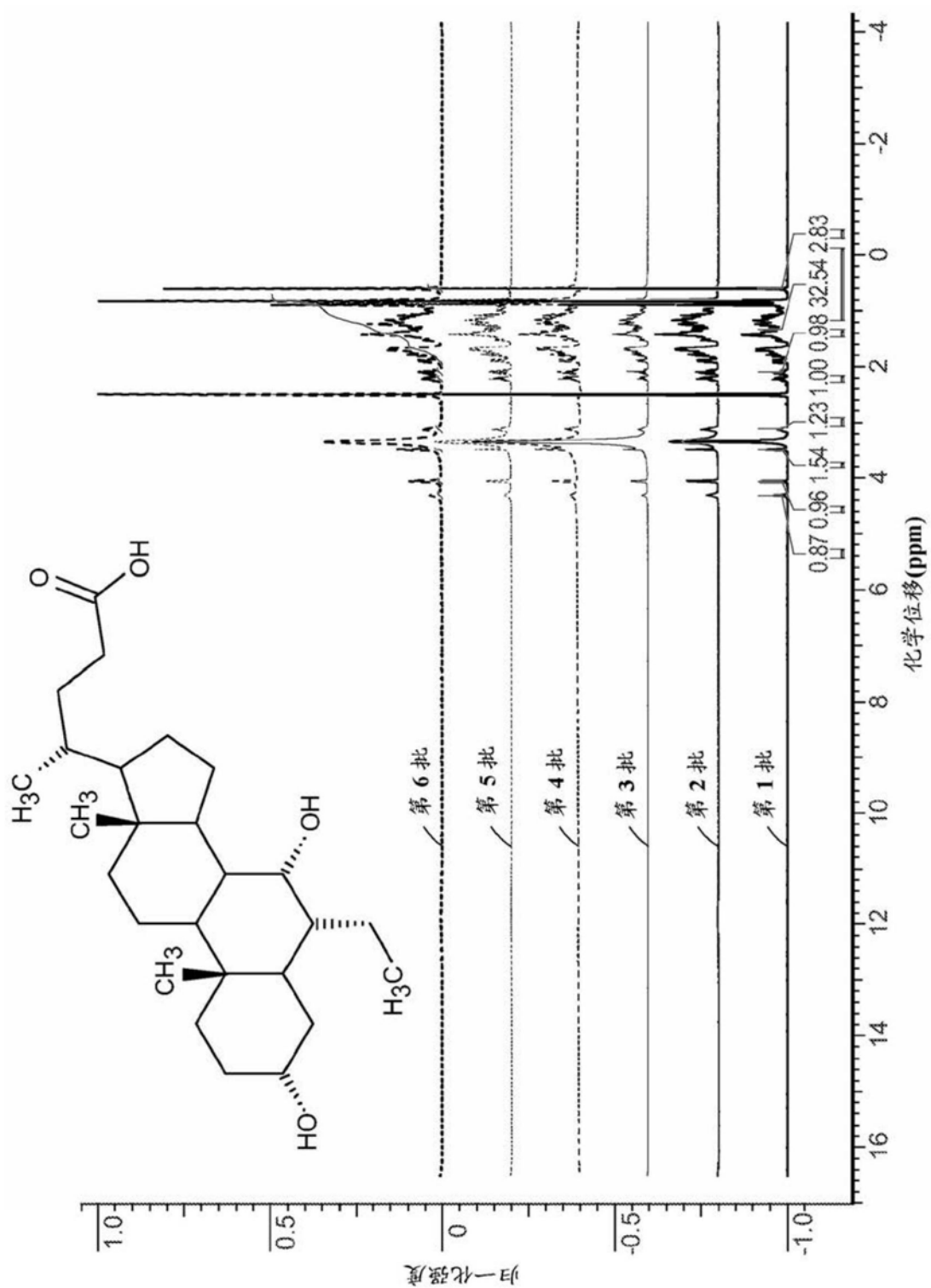


图13

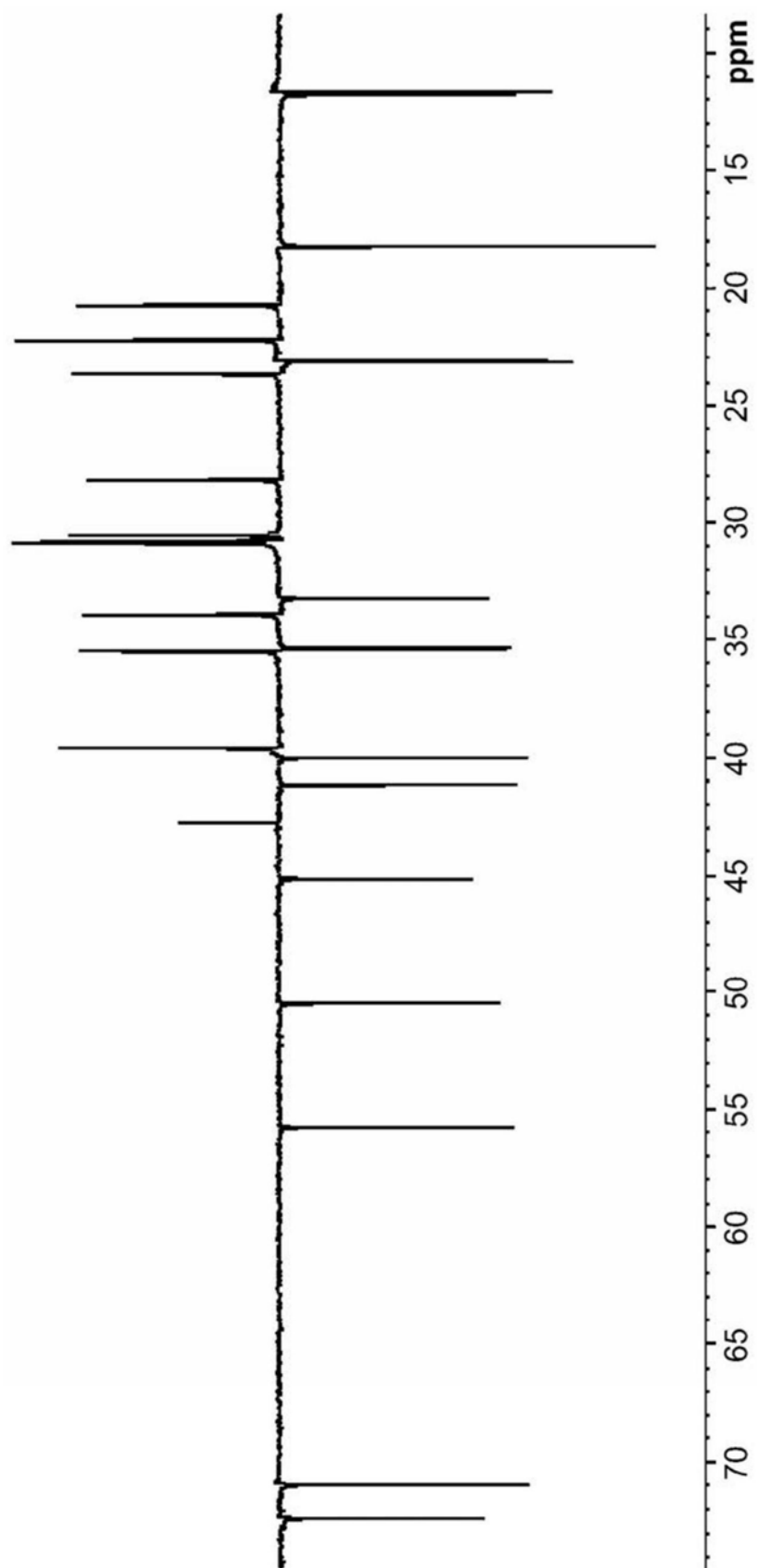


图14

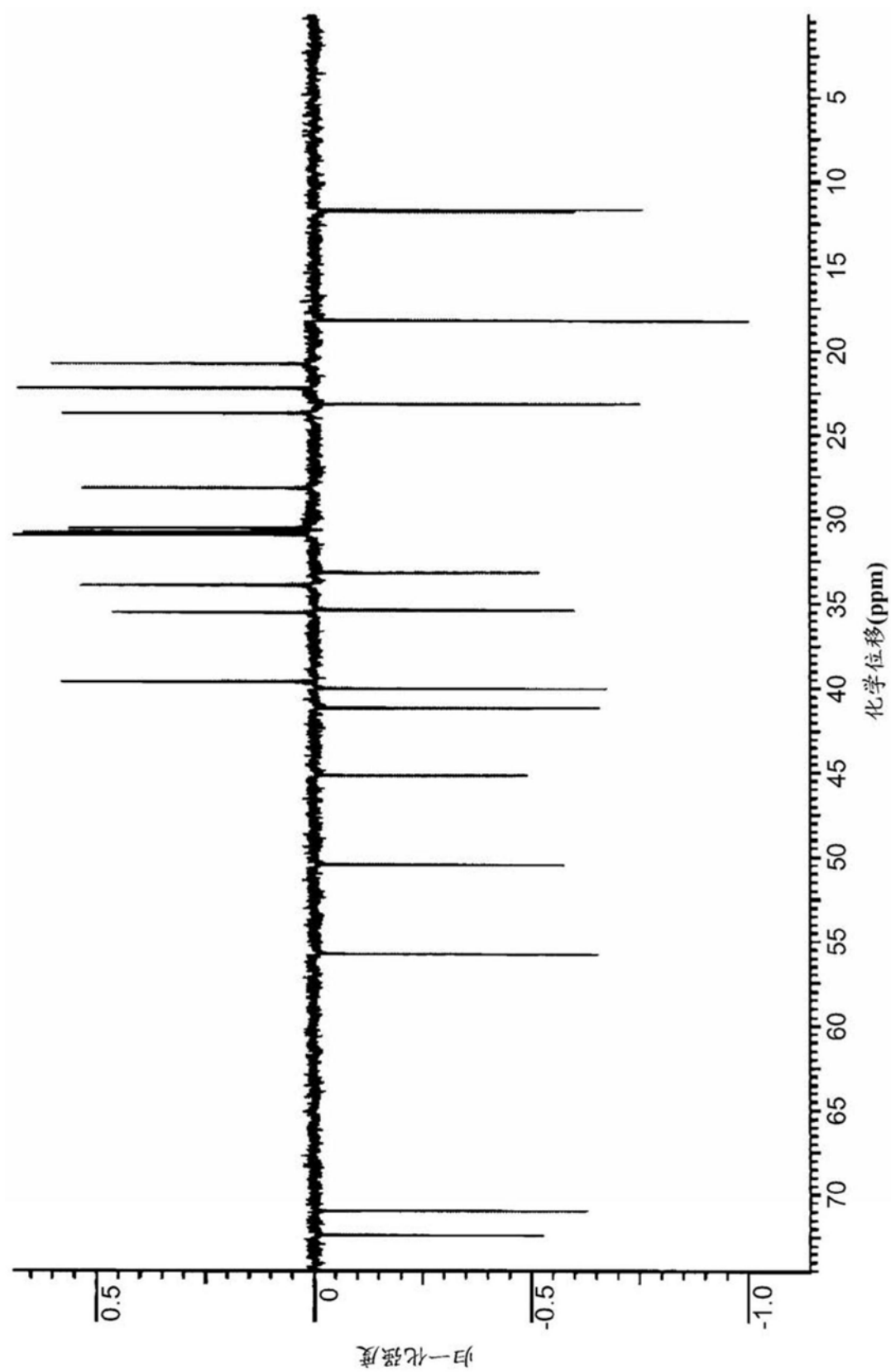


图15

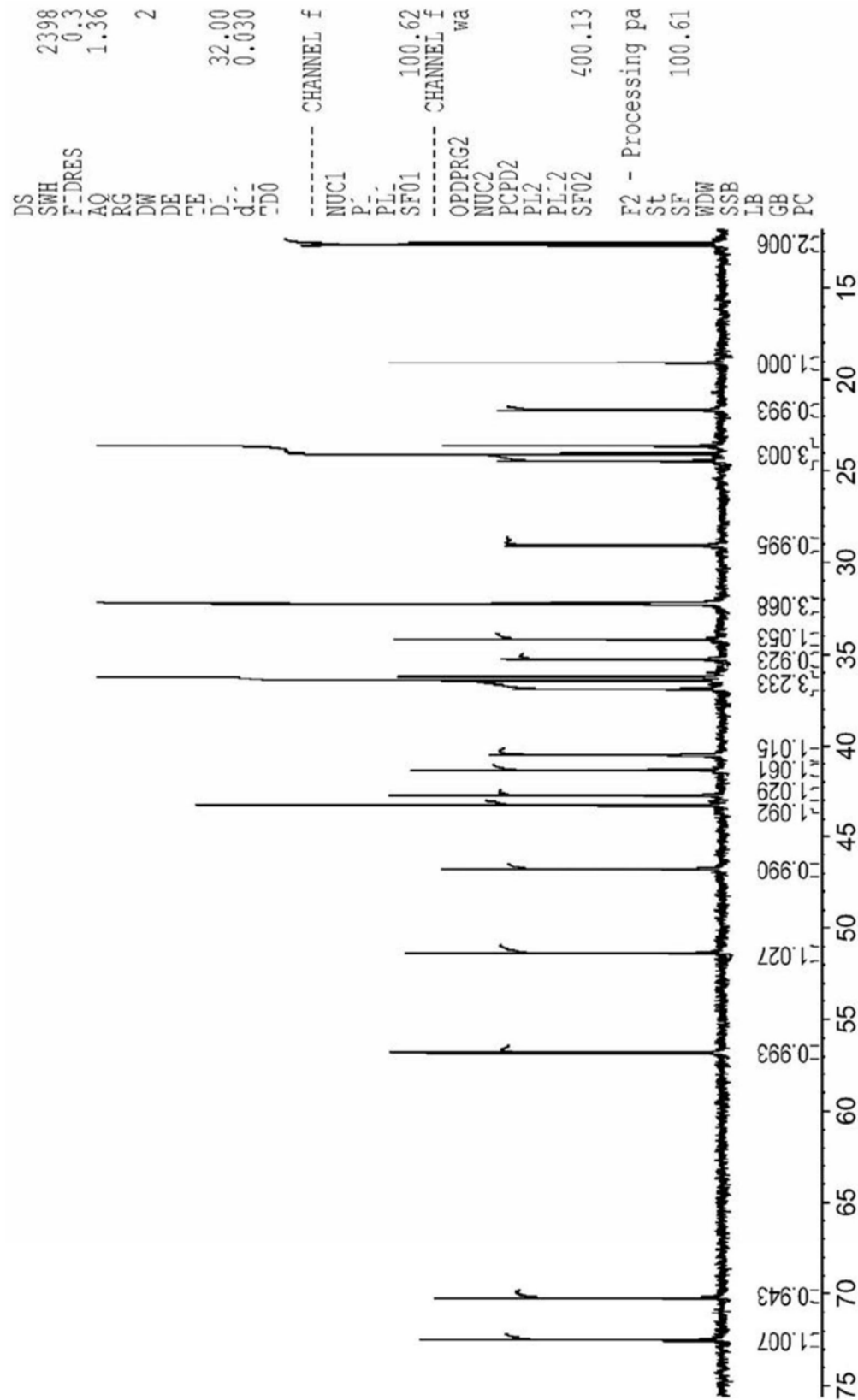


图16

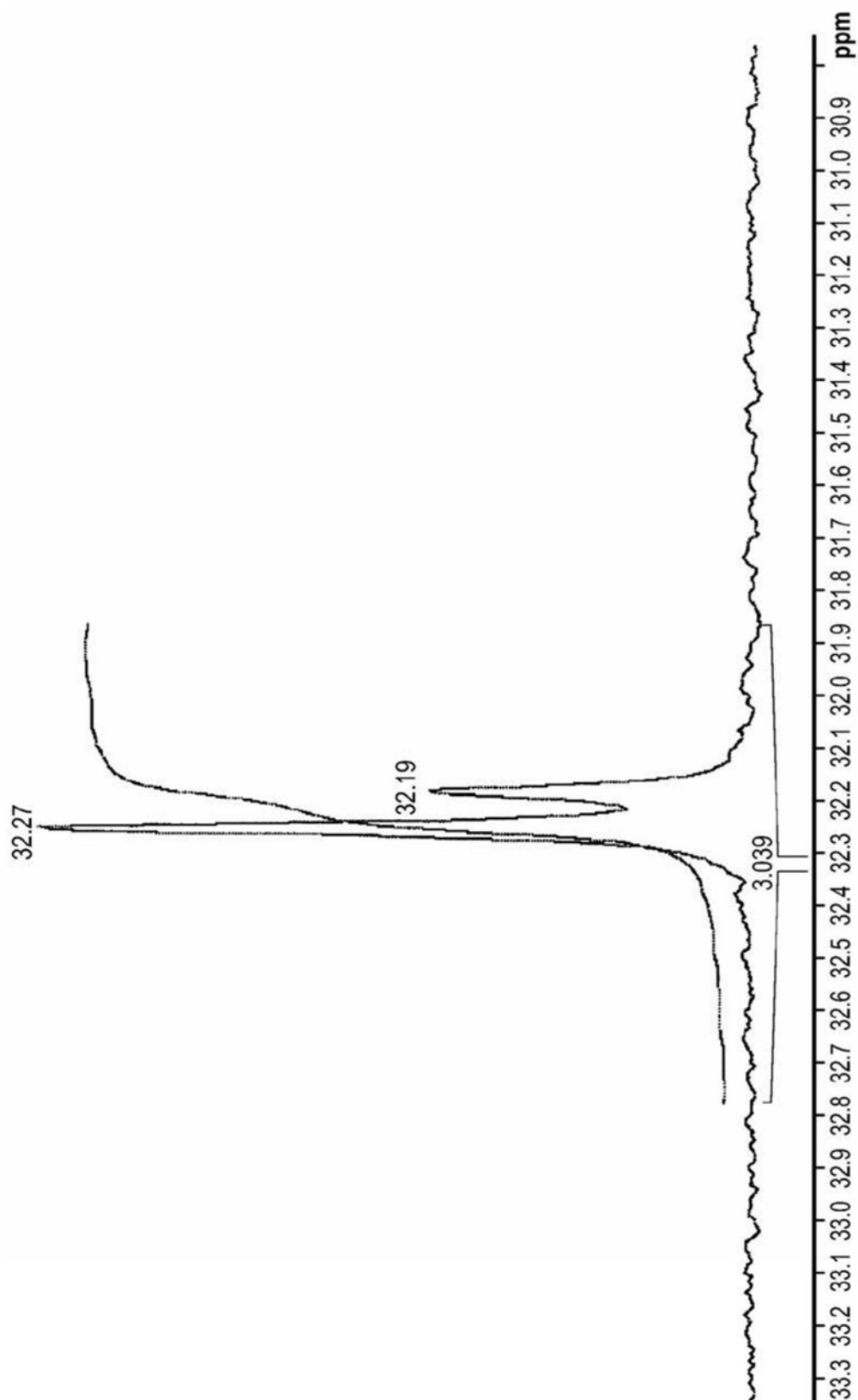


图17



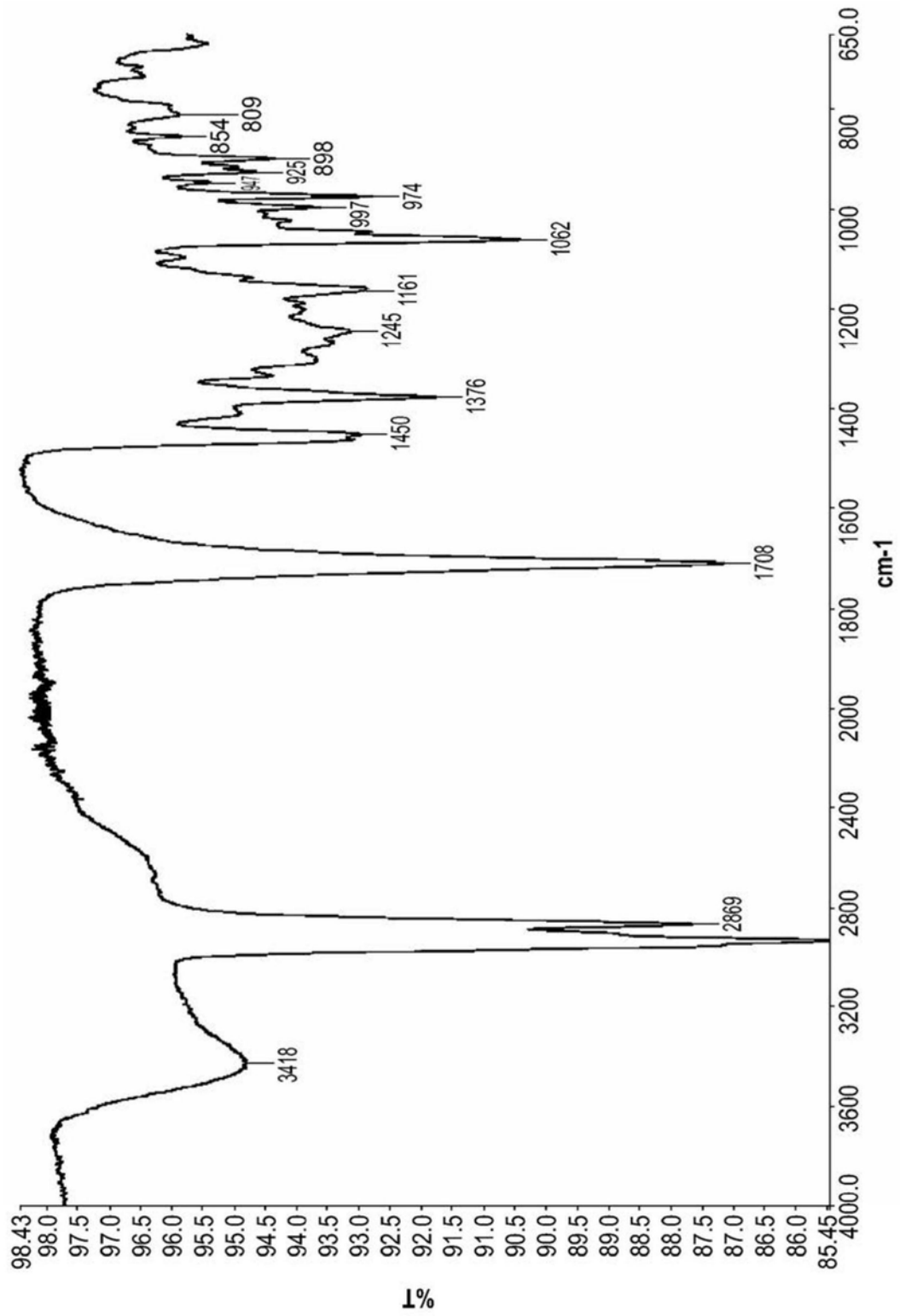


图18

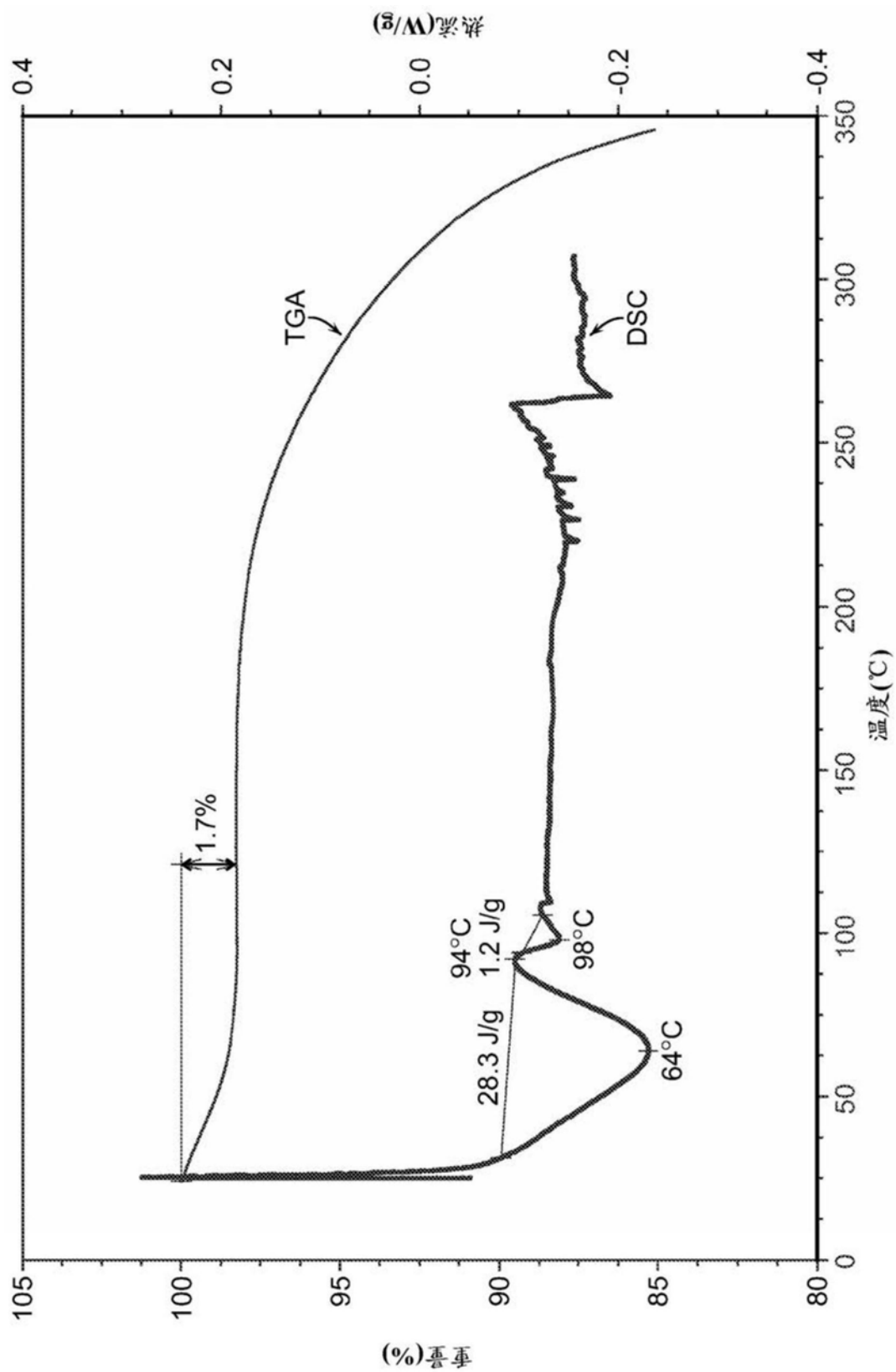


图19

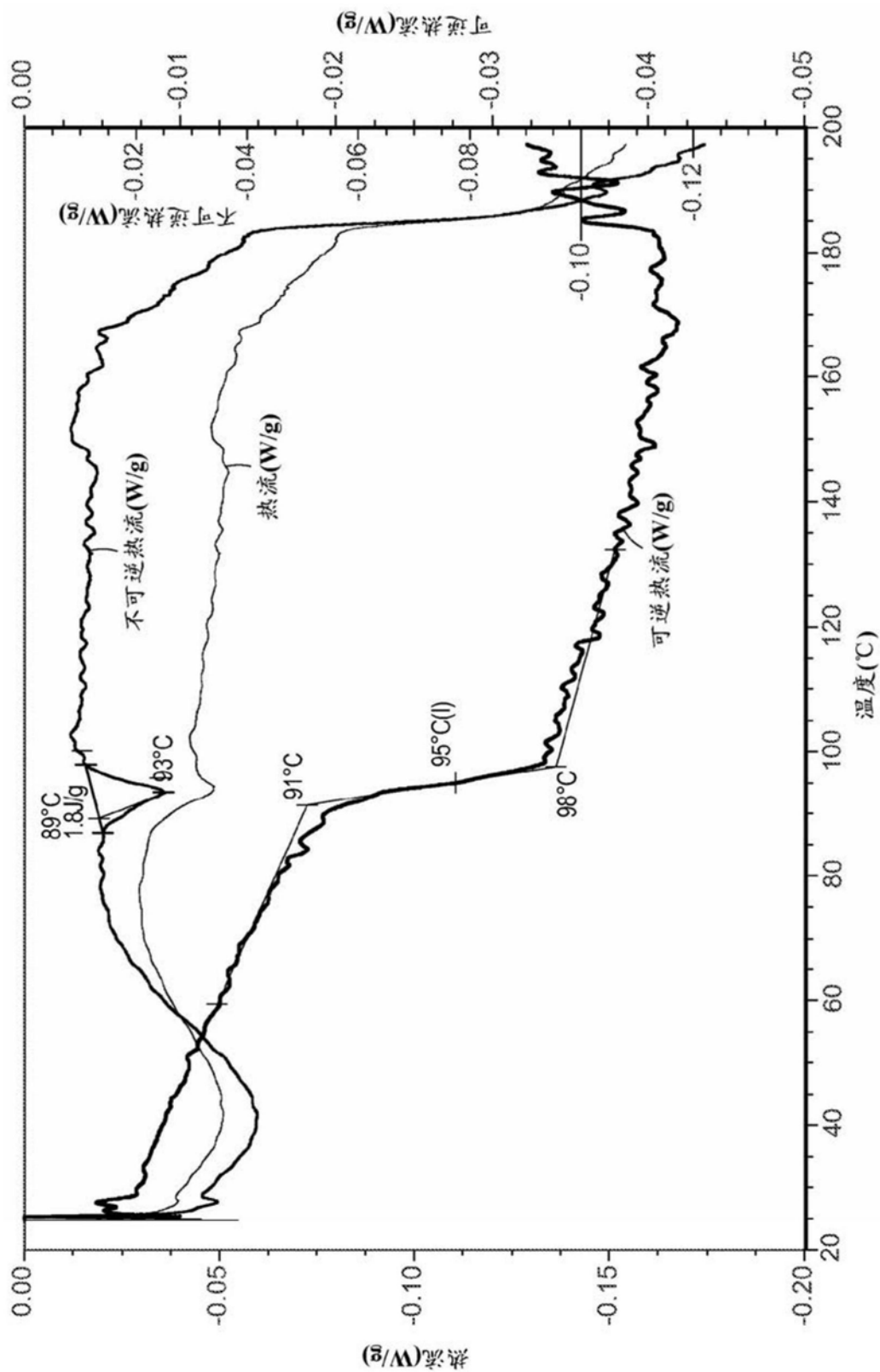


图20

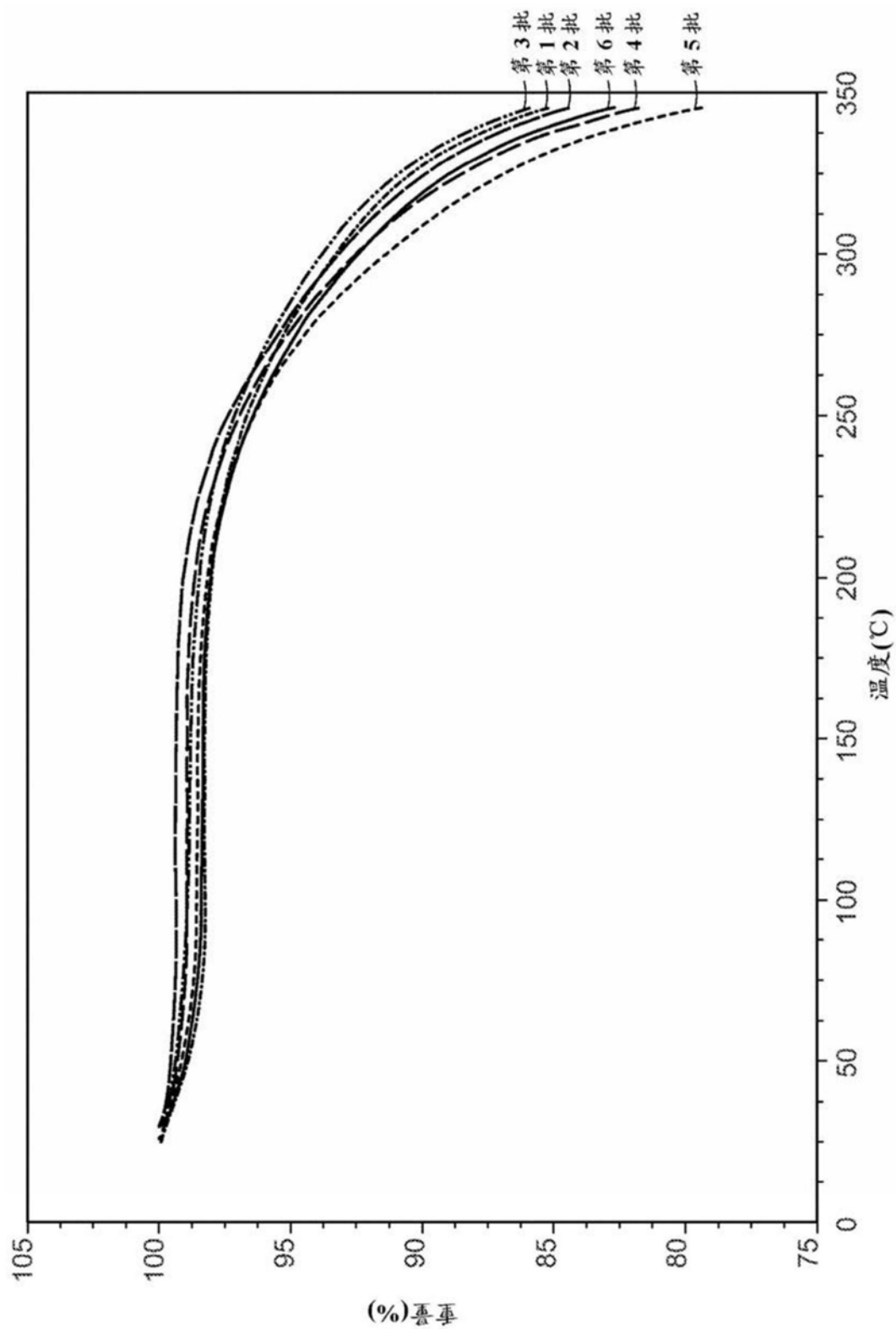


图21

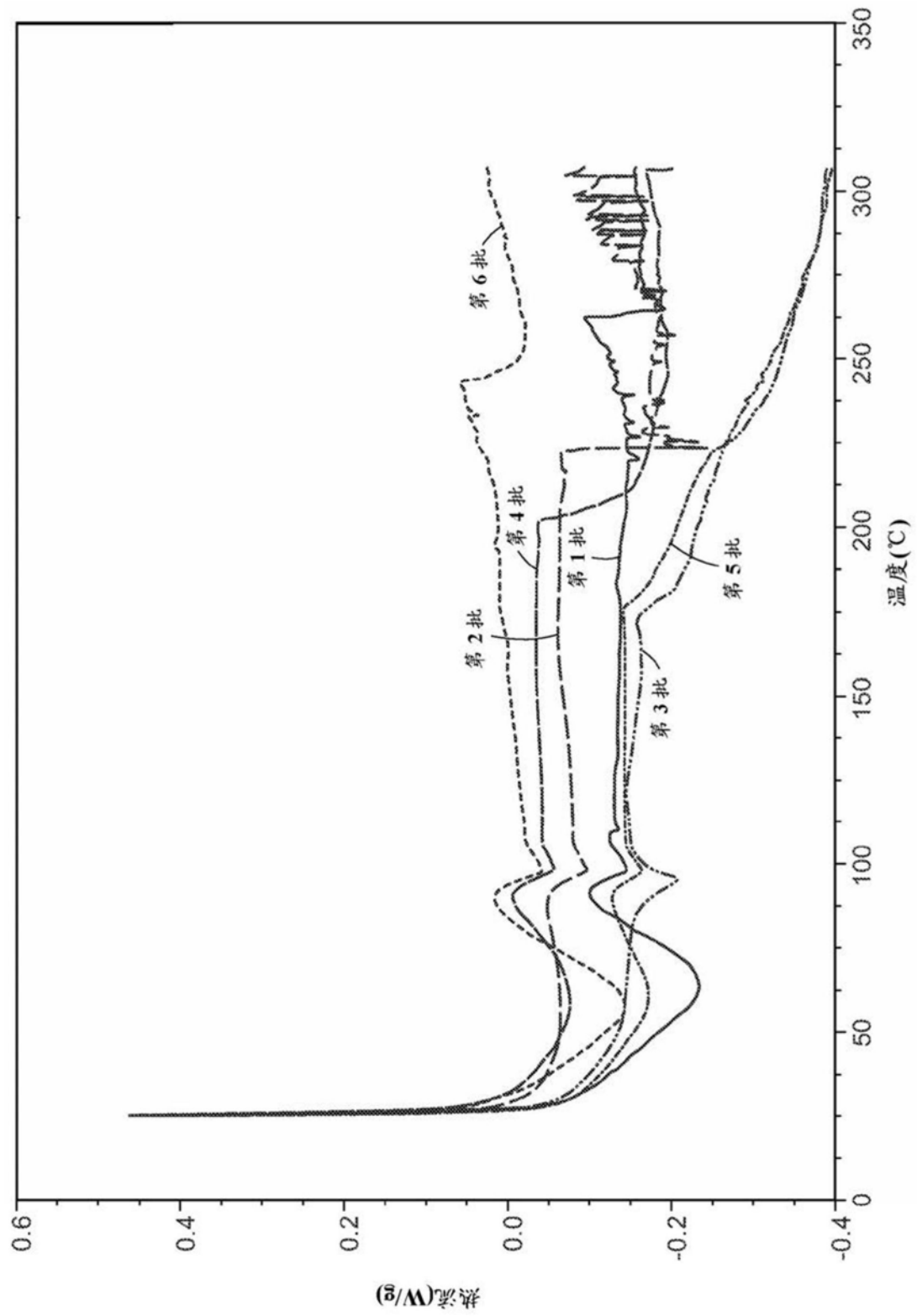


图22

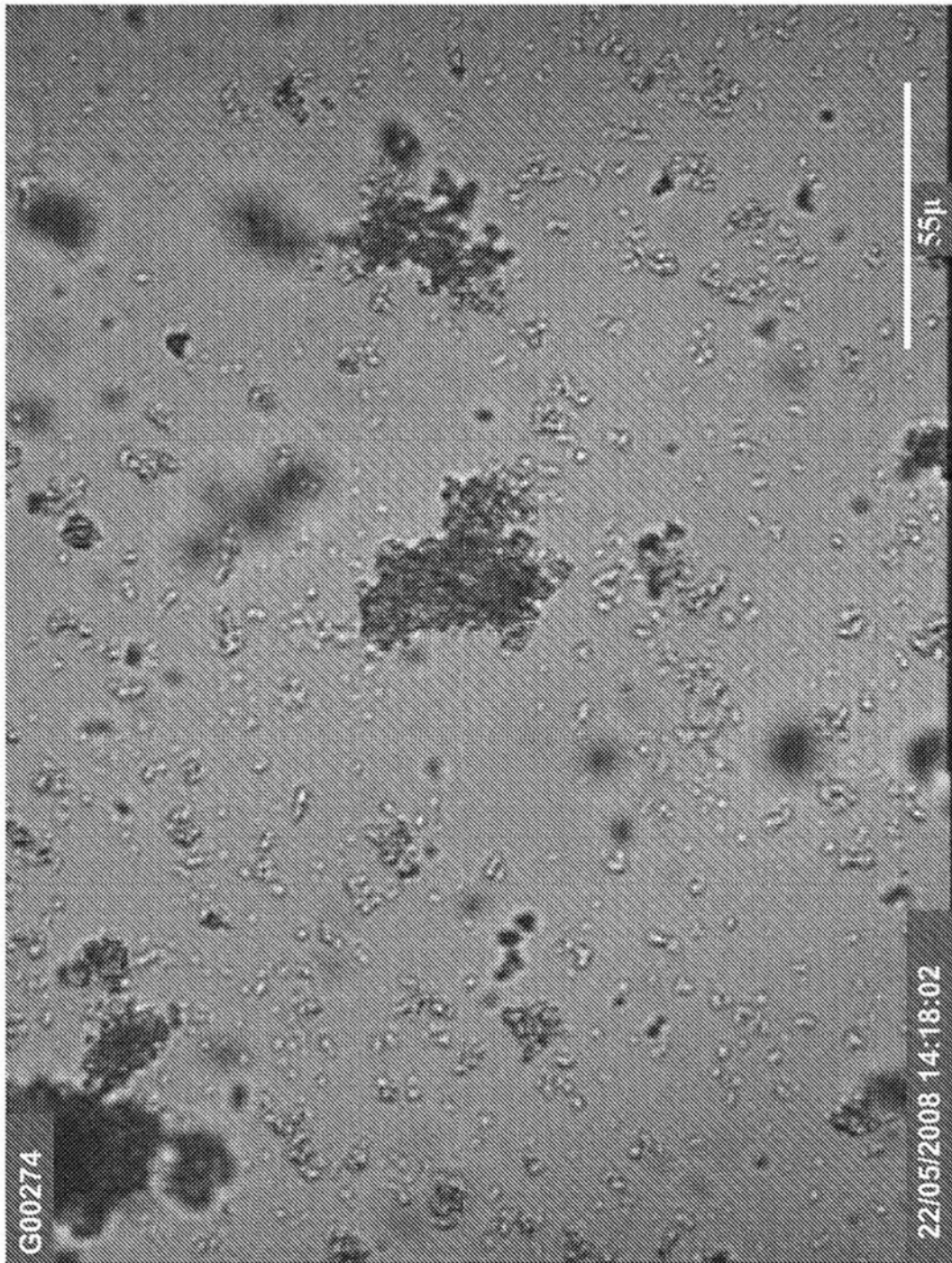


图23A

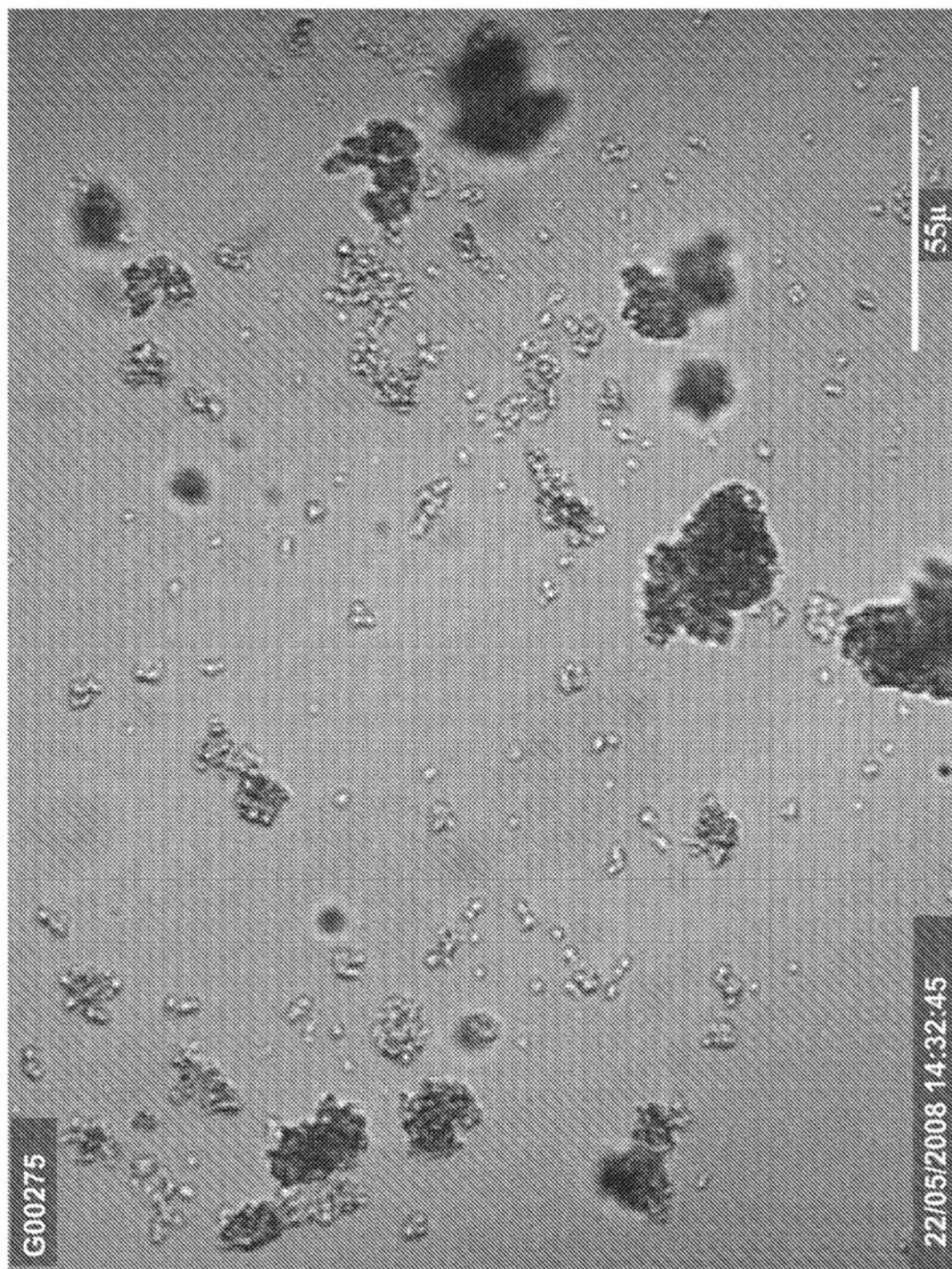


图23B



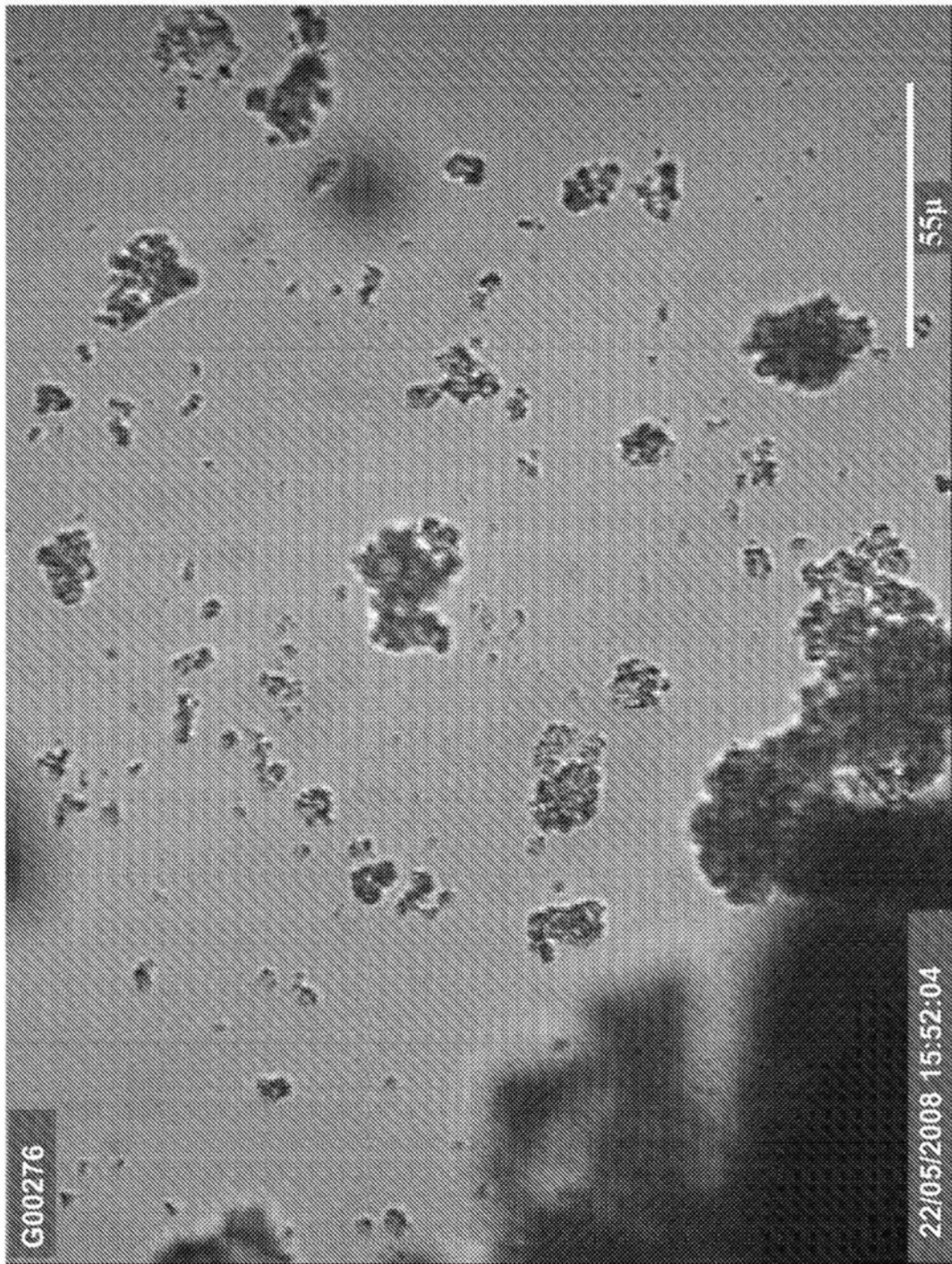


图23C



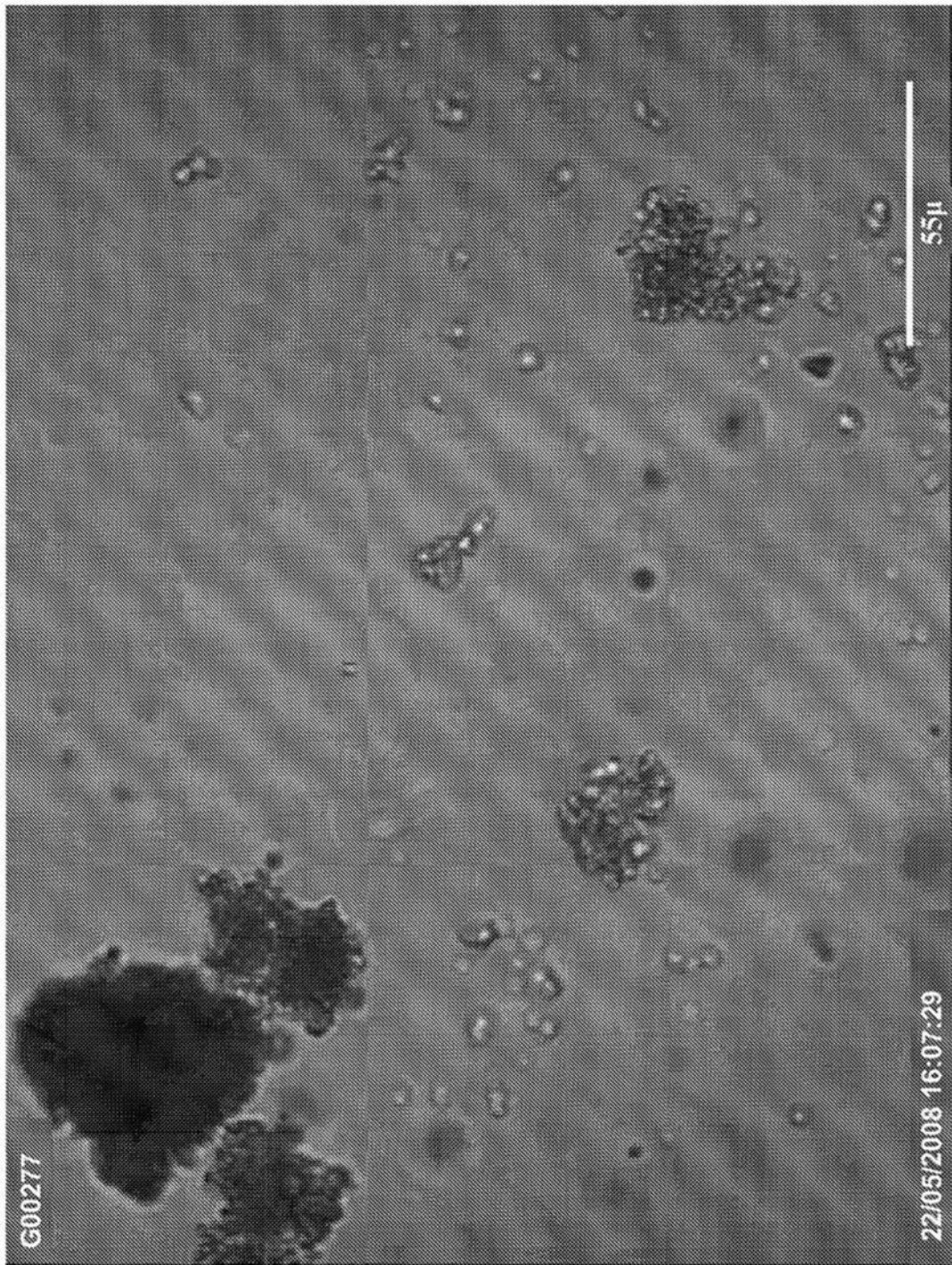


图23D

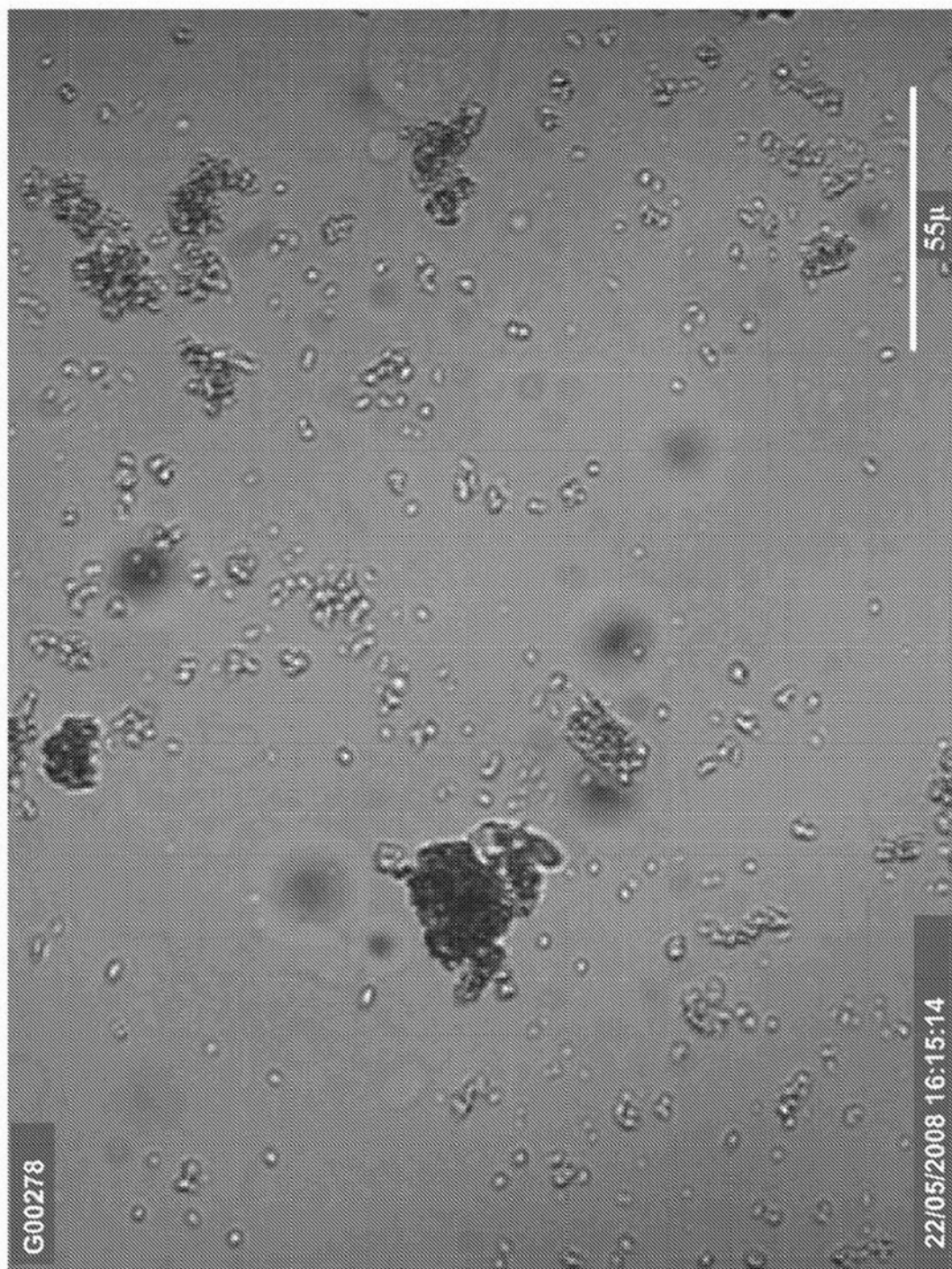


图23E

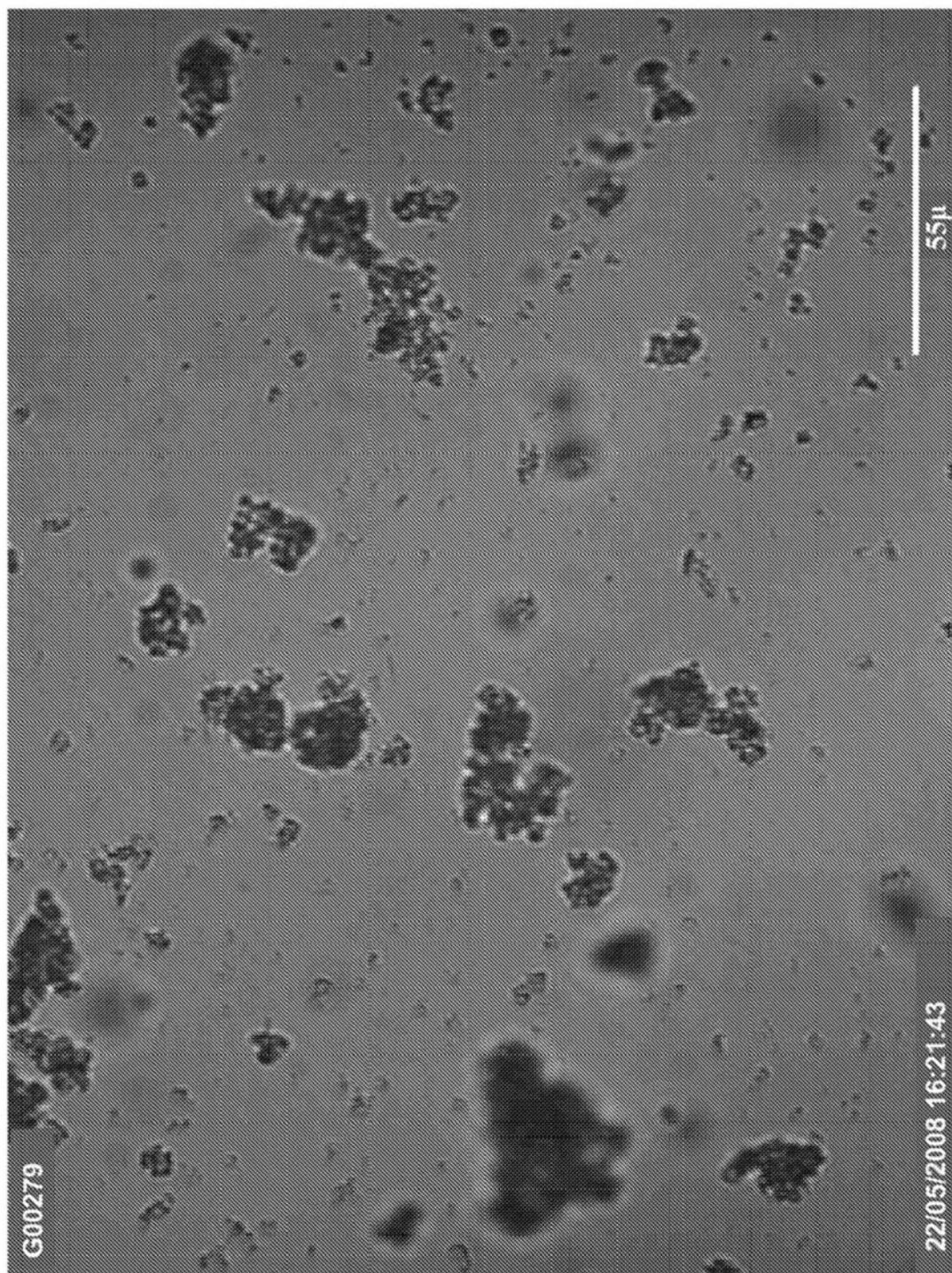


图23F

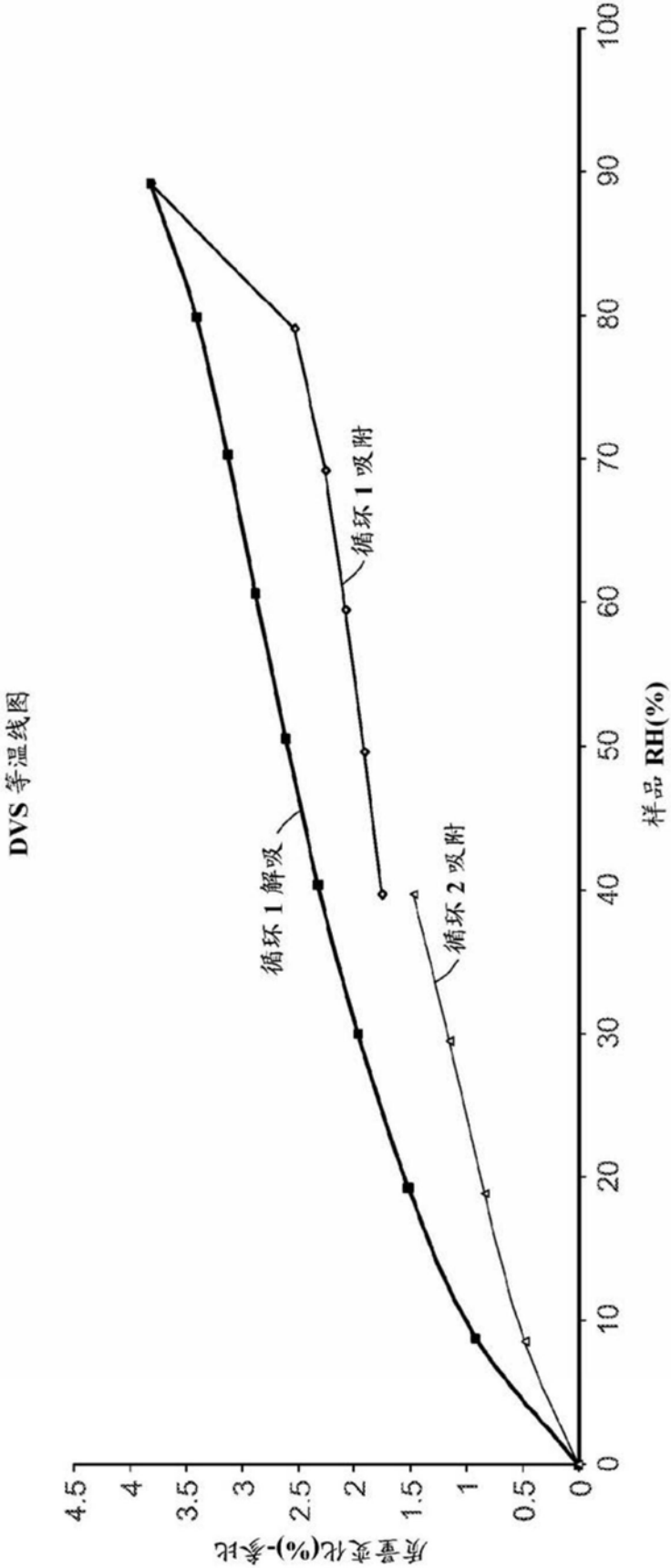


图24



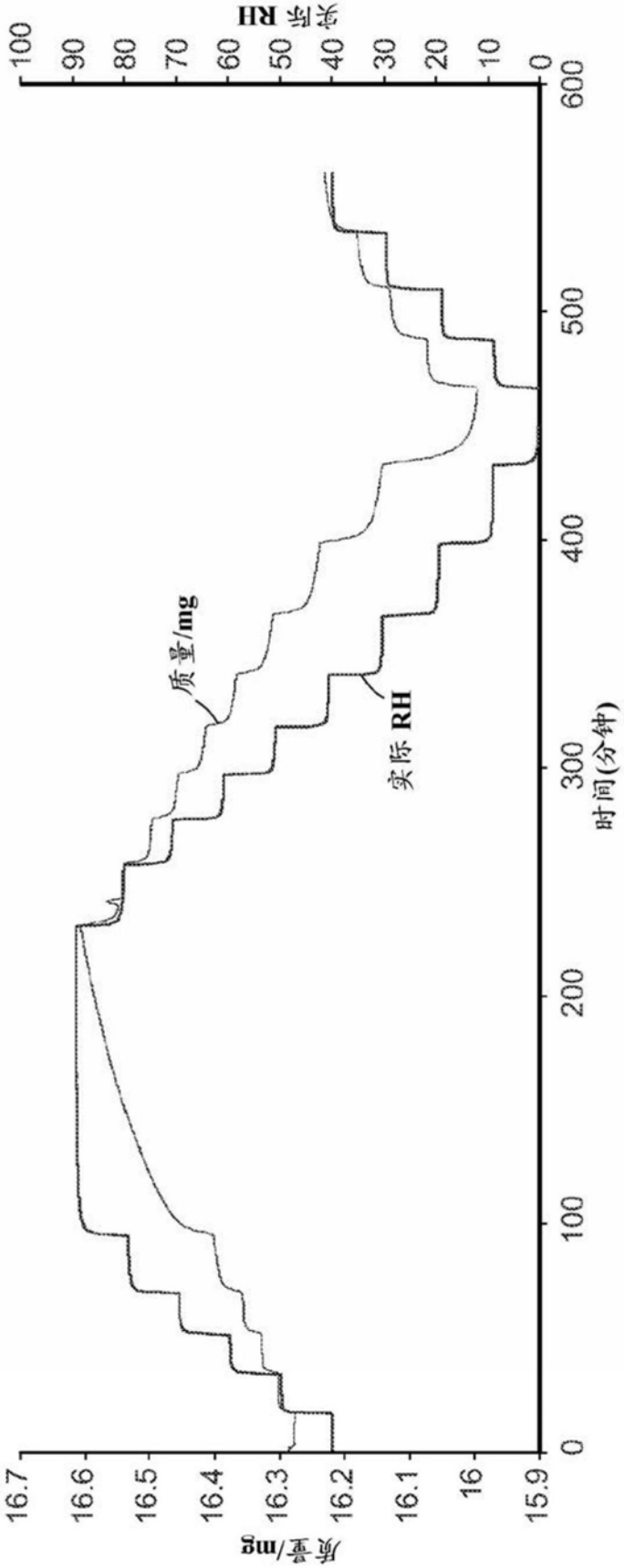


图25

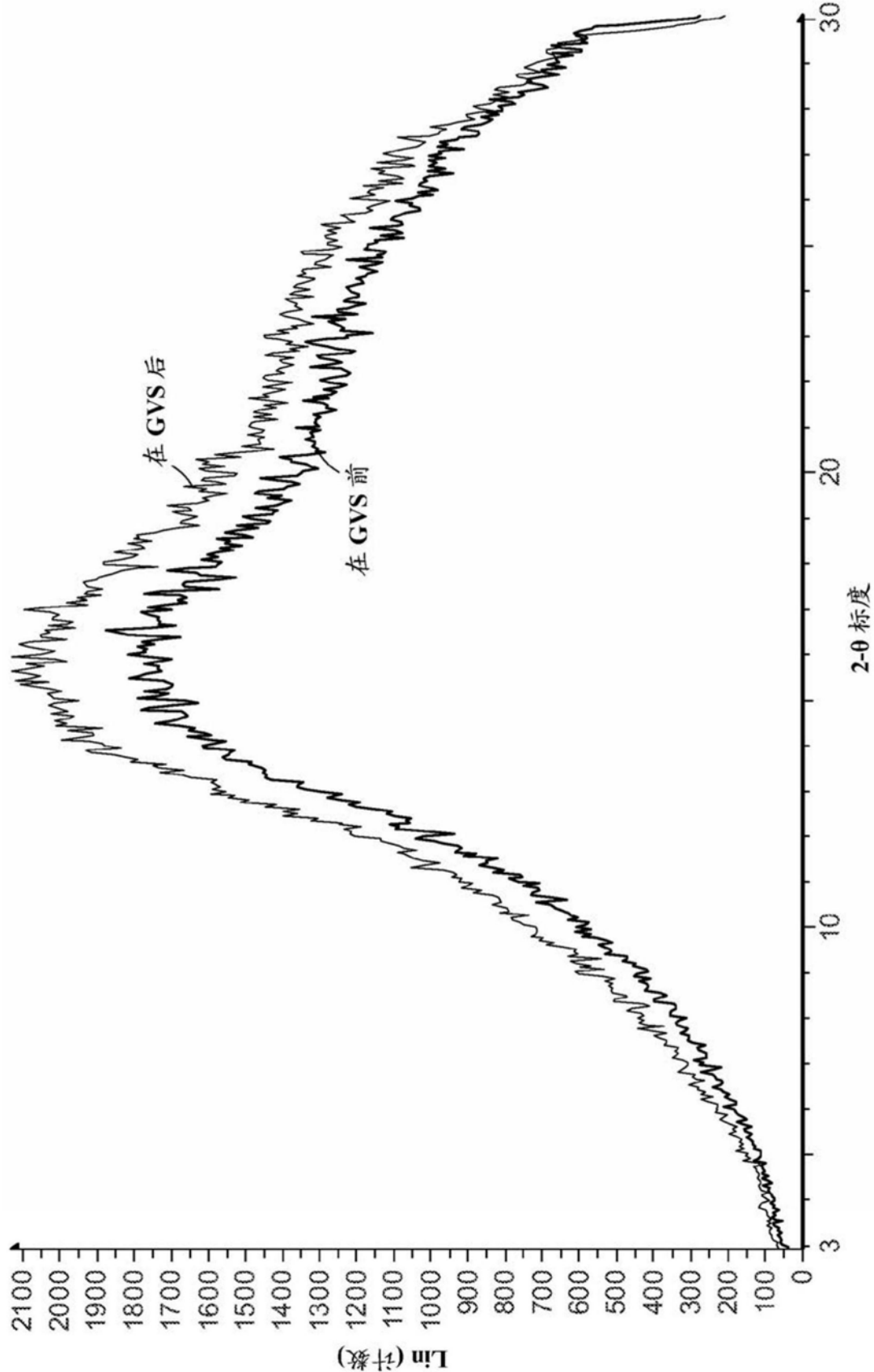


图26

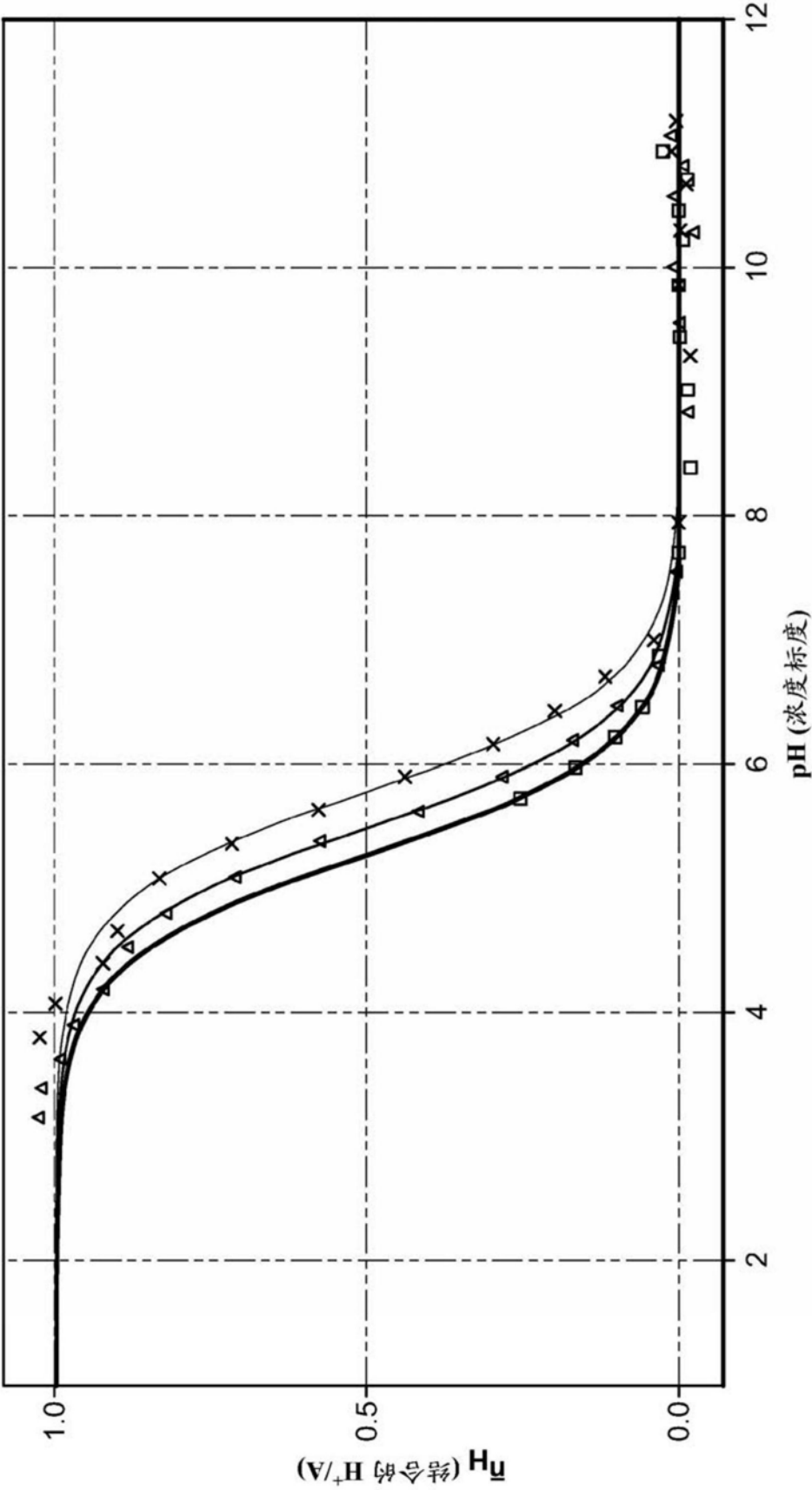


图27

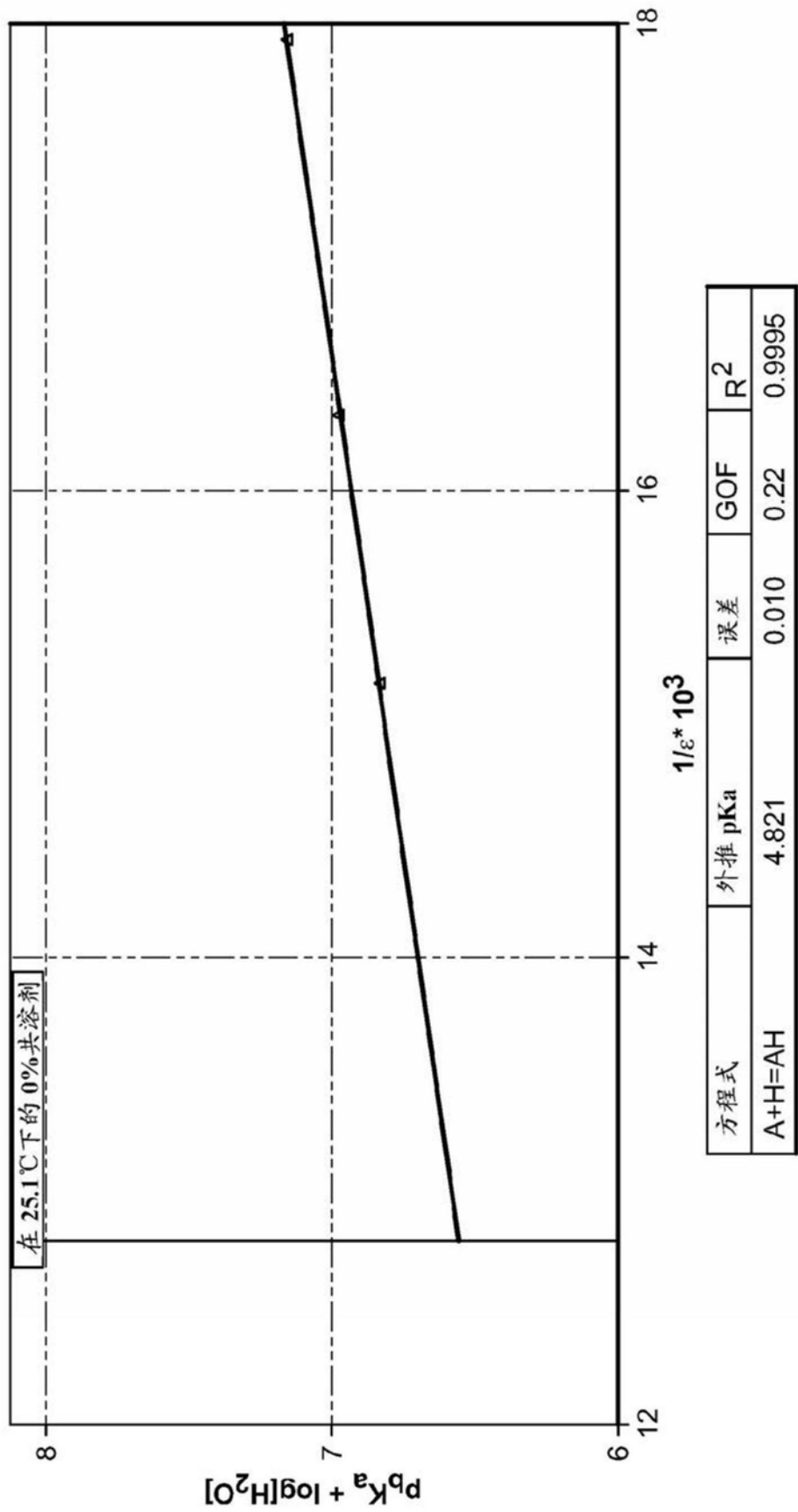


图28



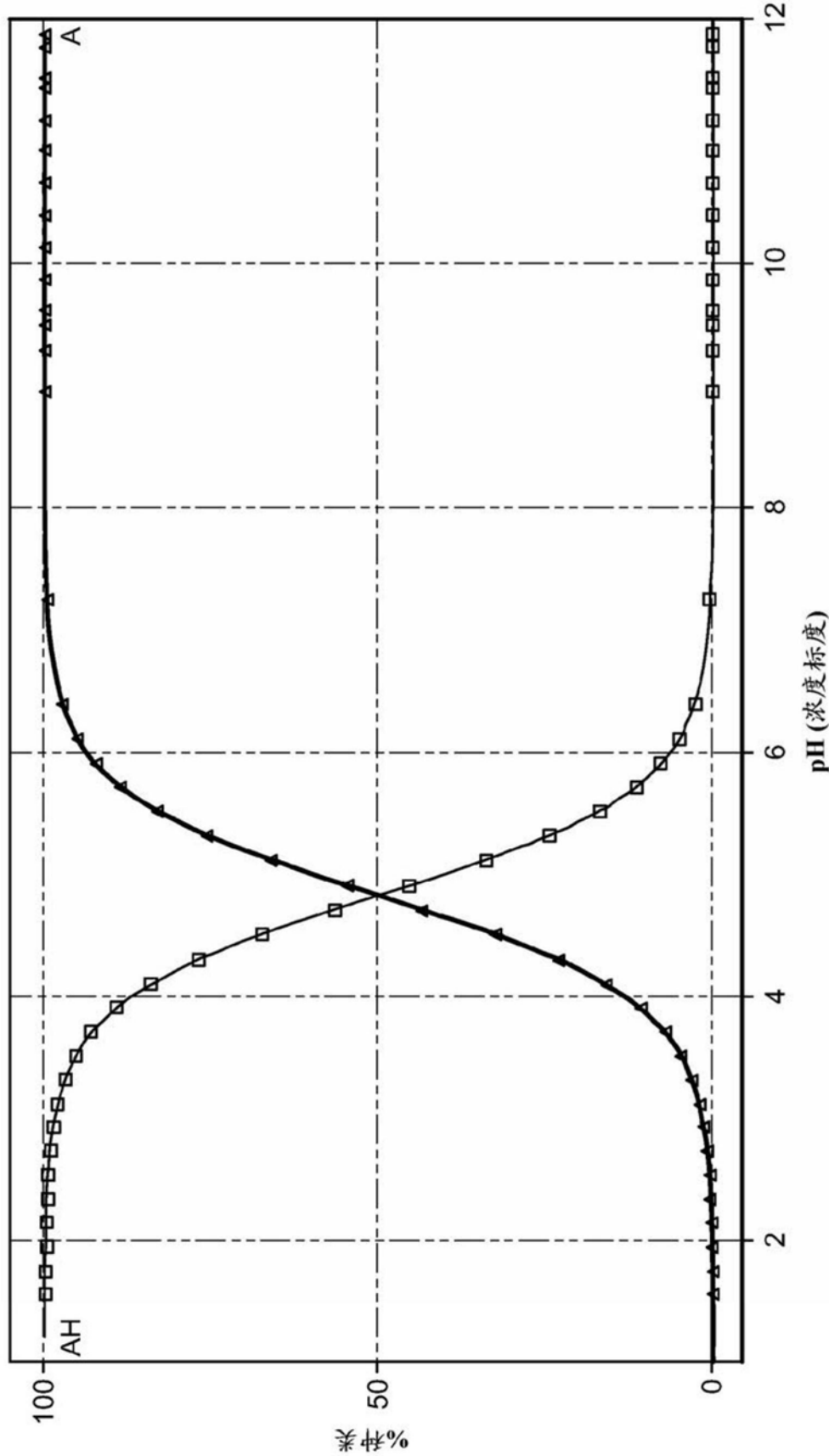


图29

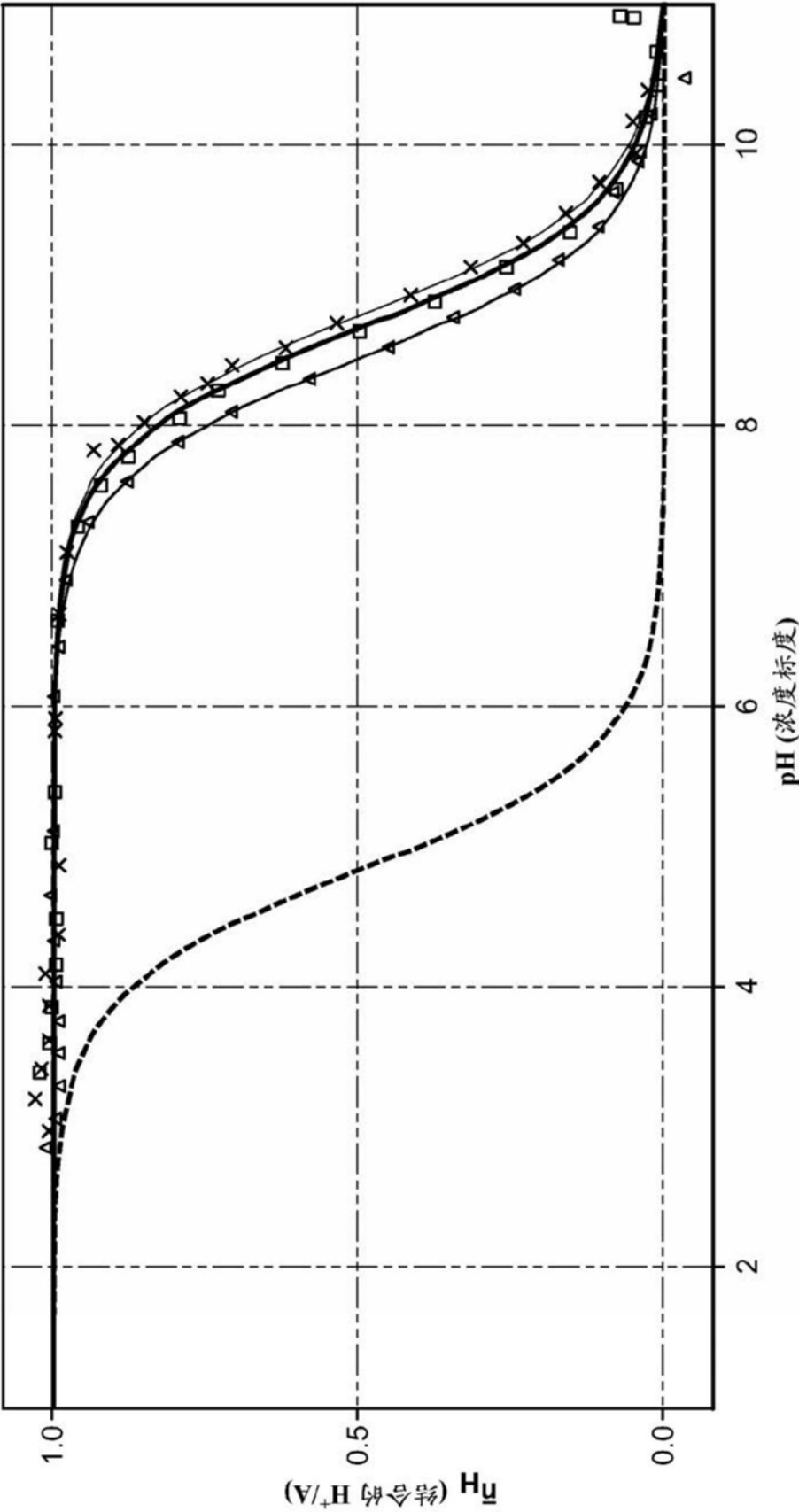


图30

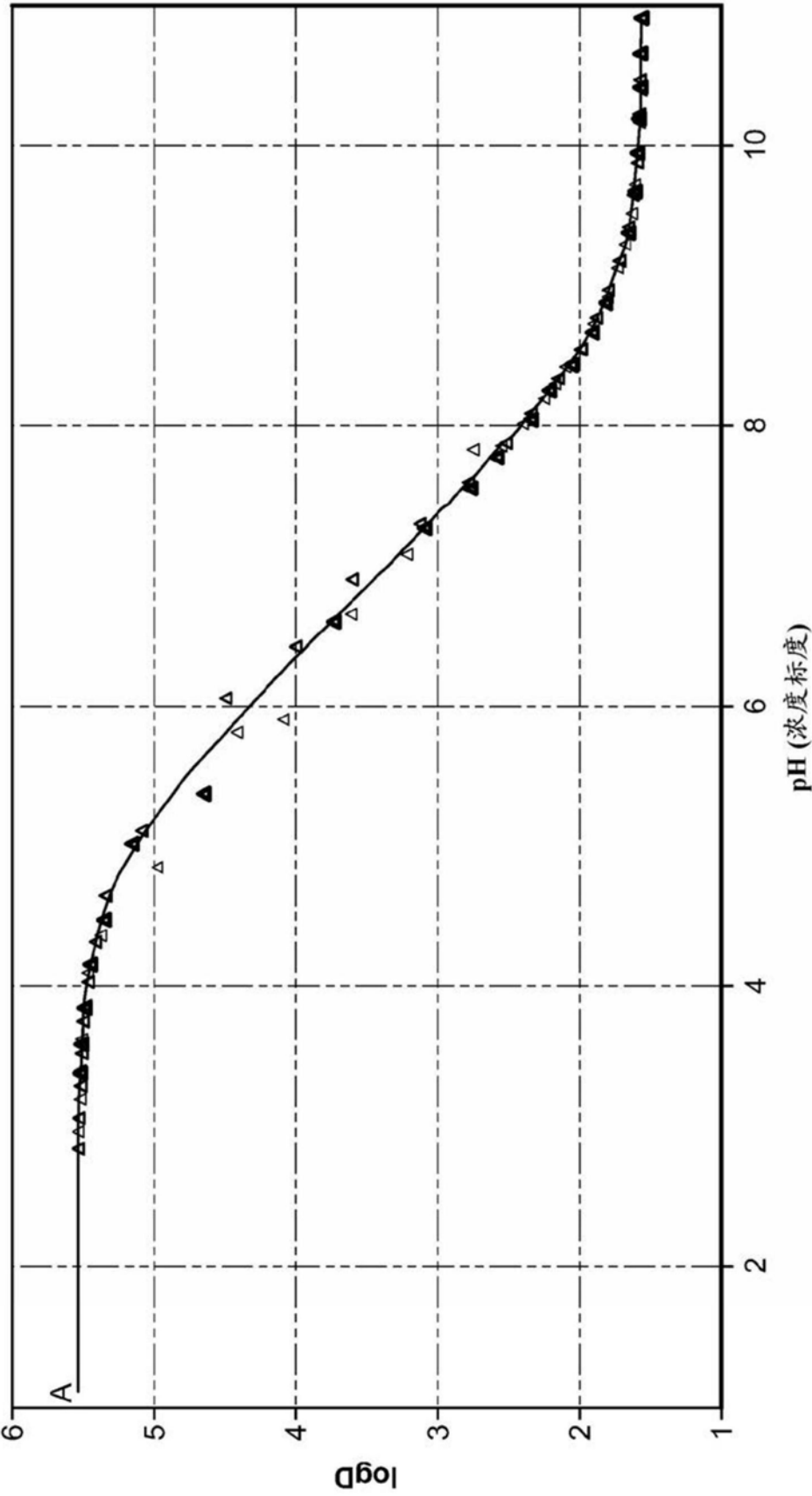


图31

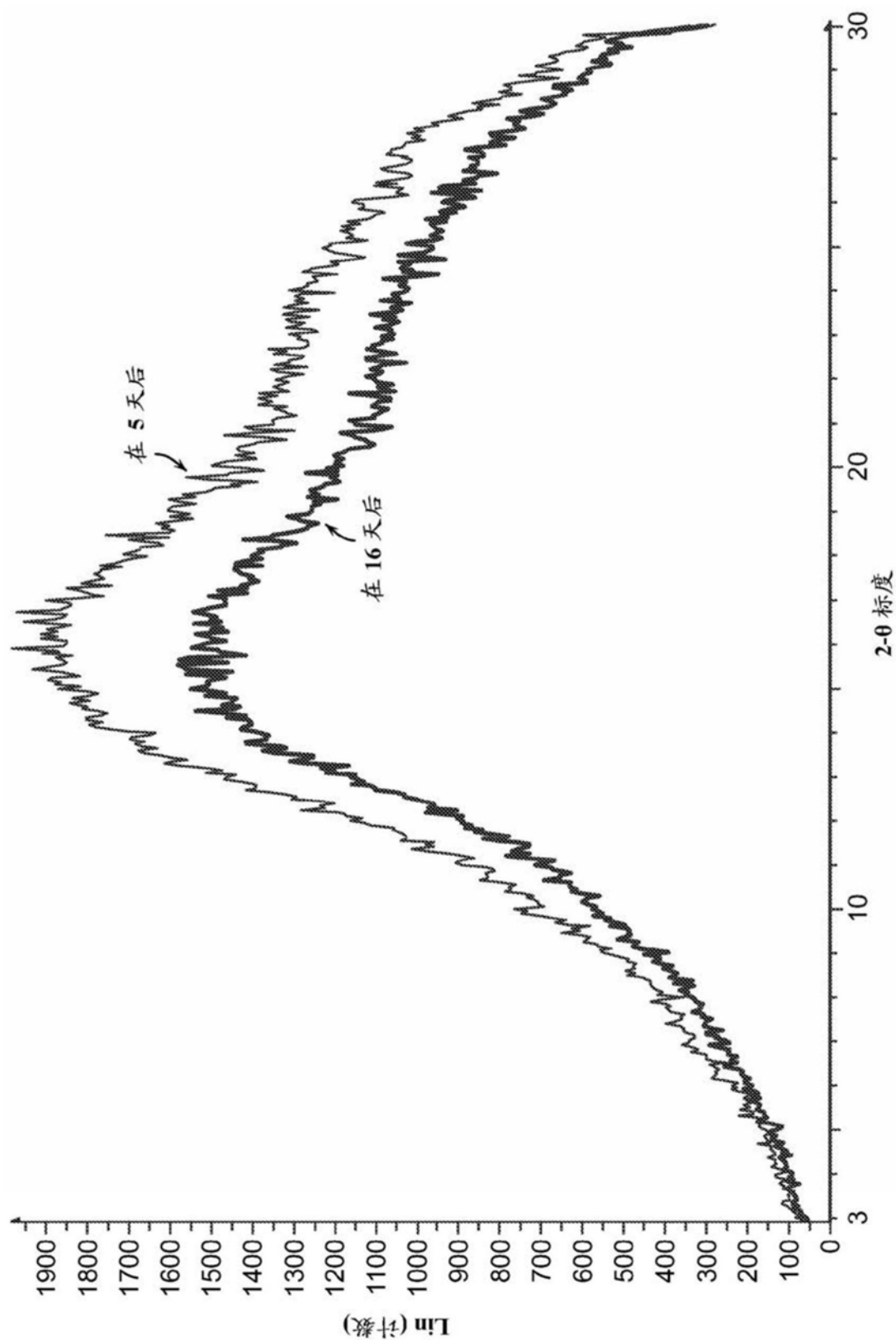


图32

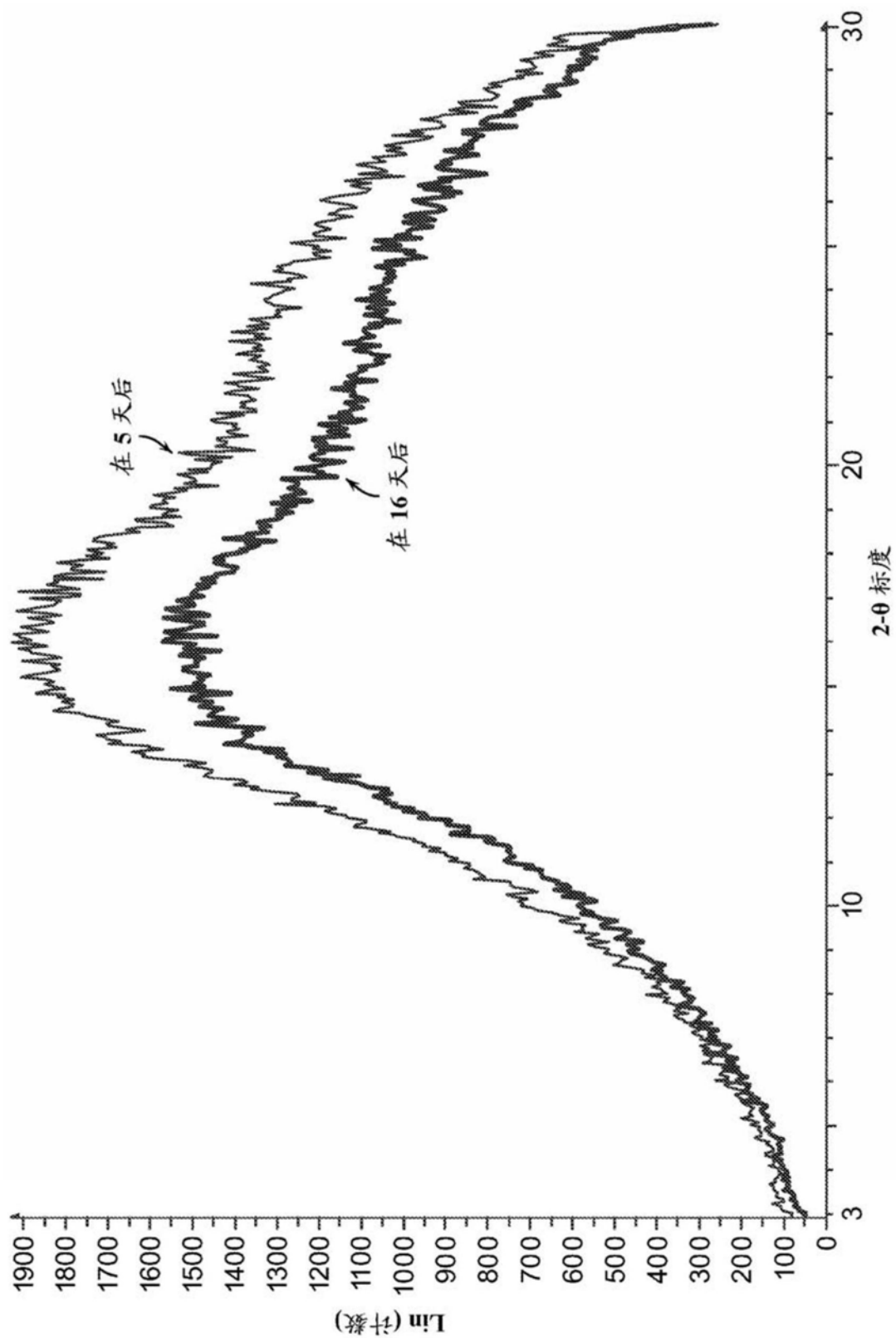


图33

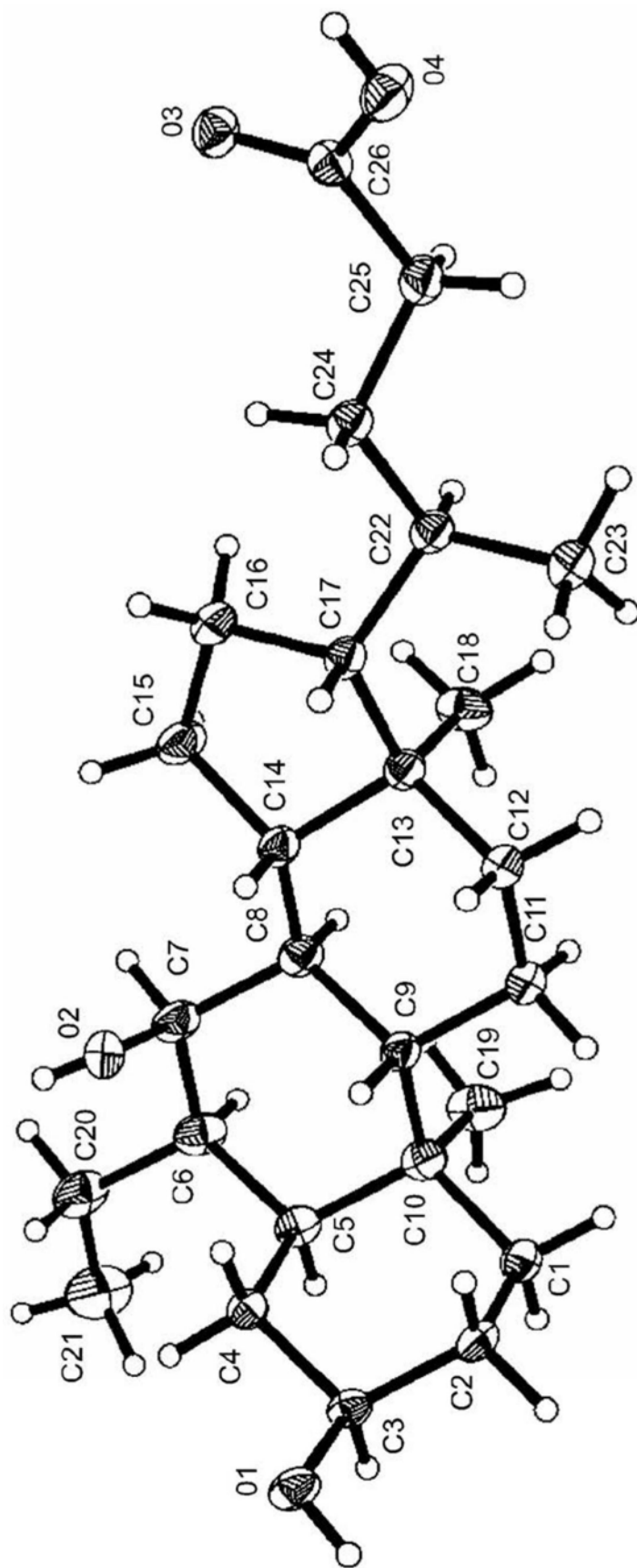


图34

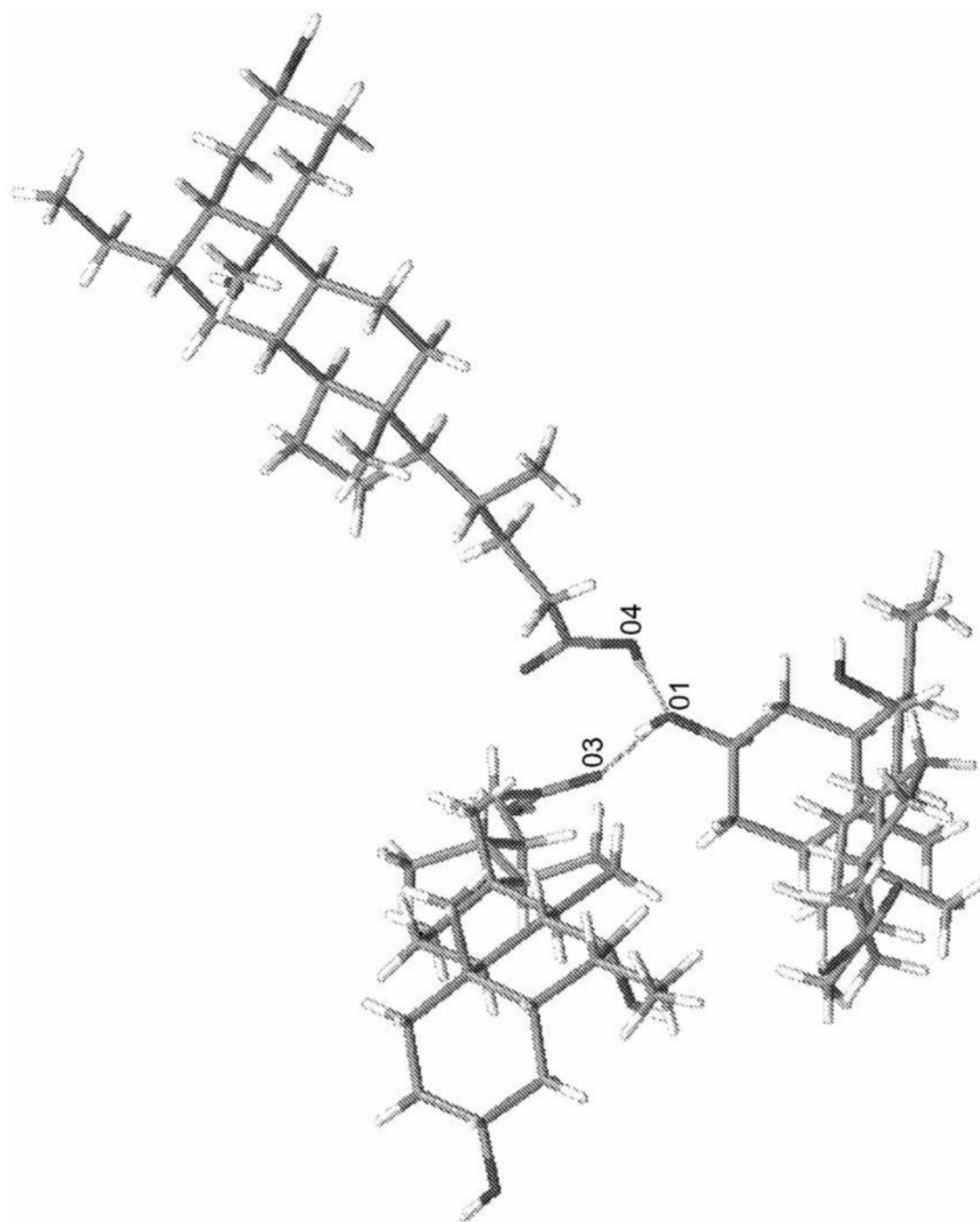


图35

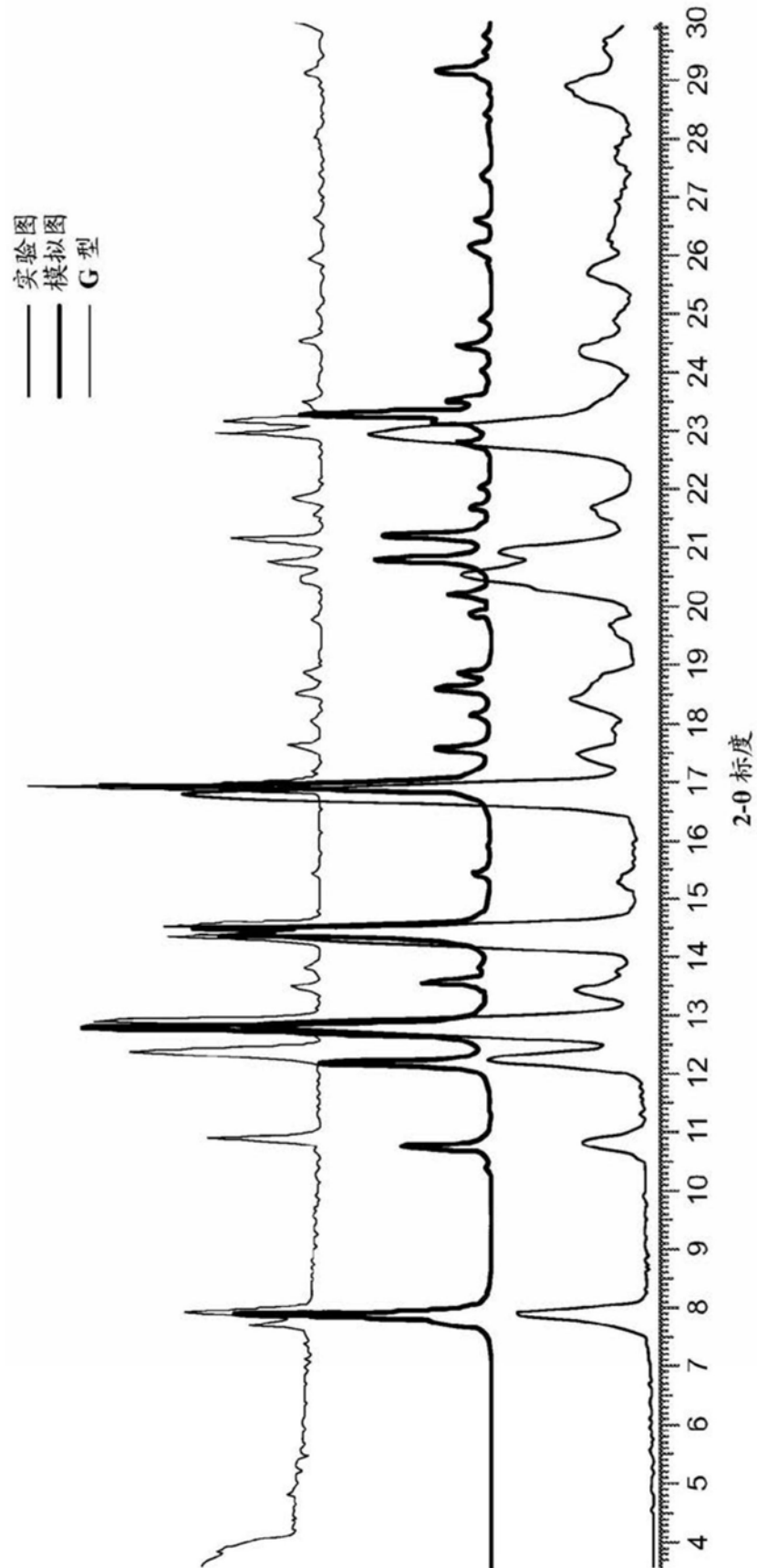


图36



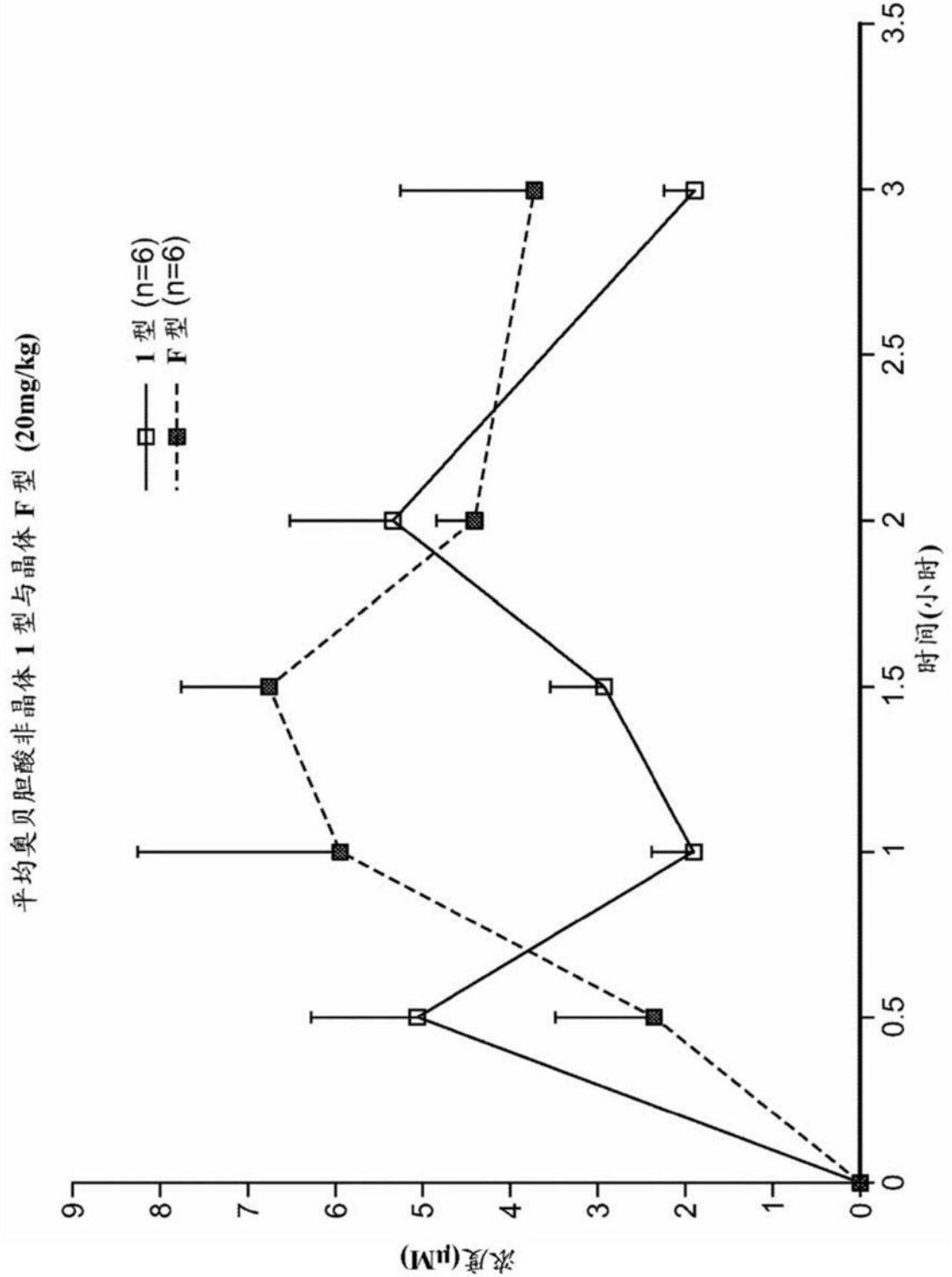


图37

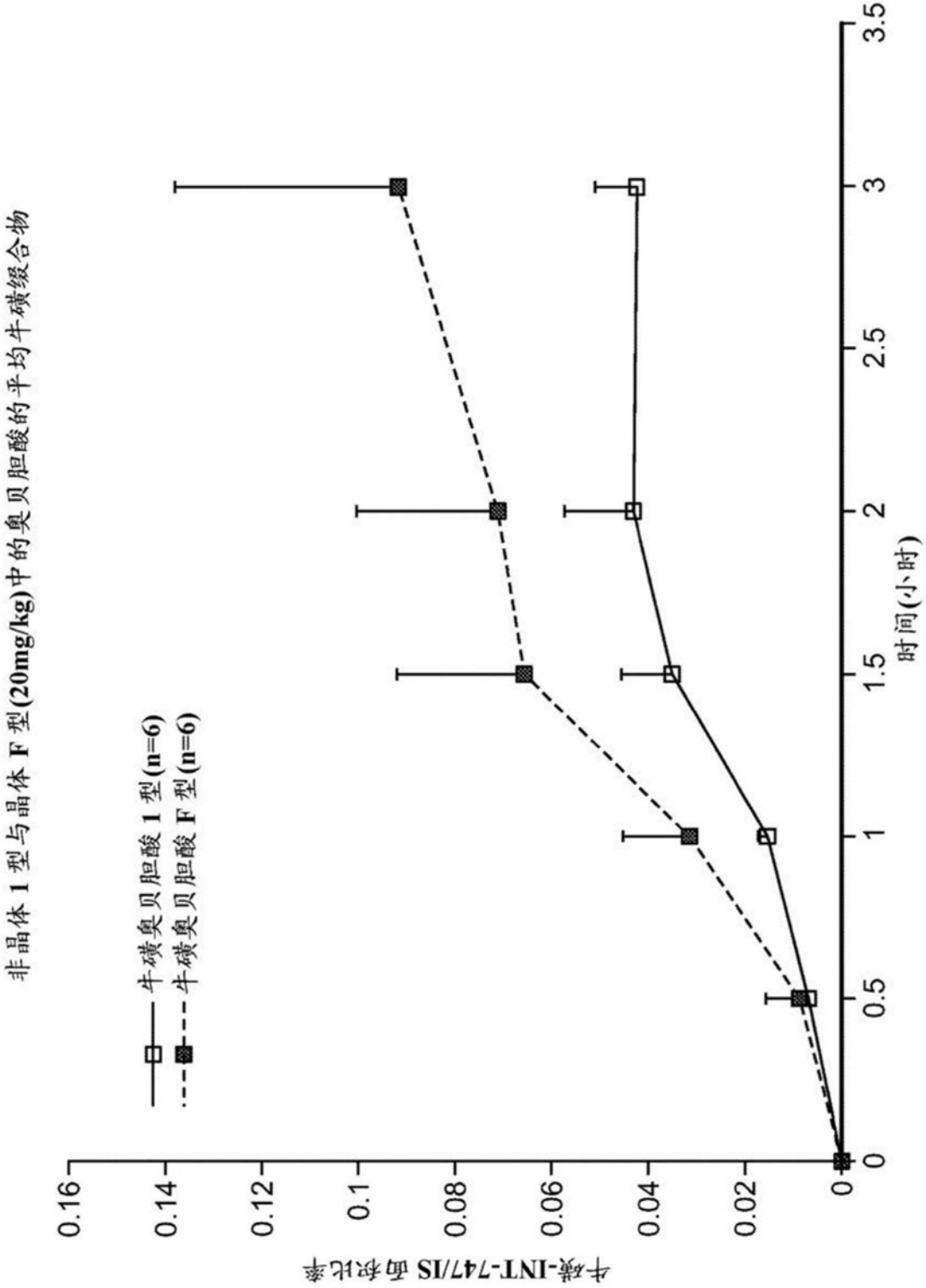


图38

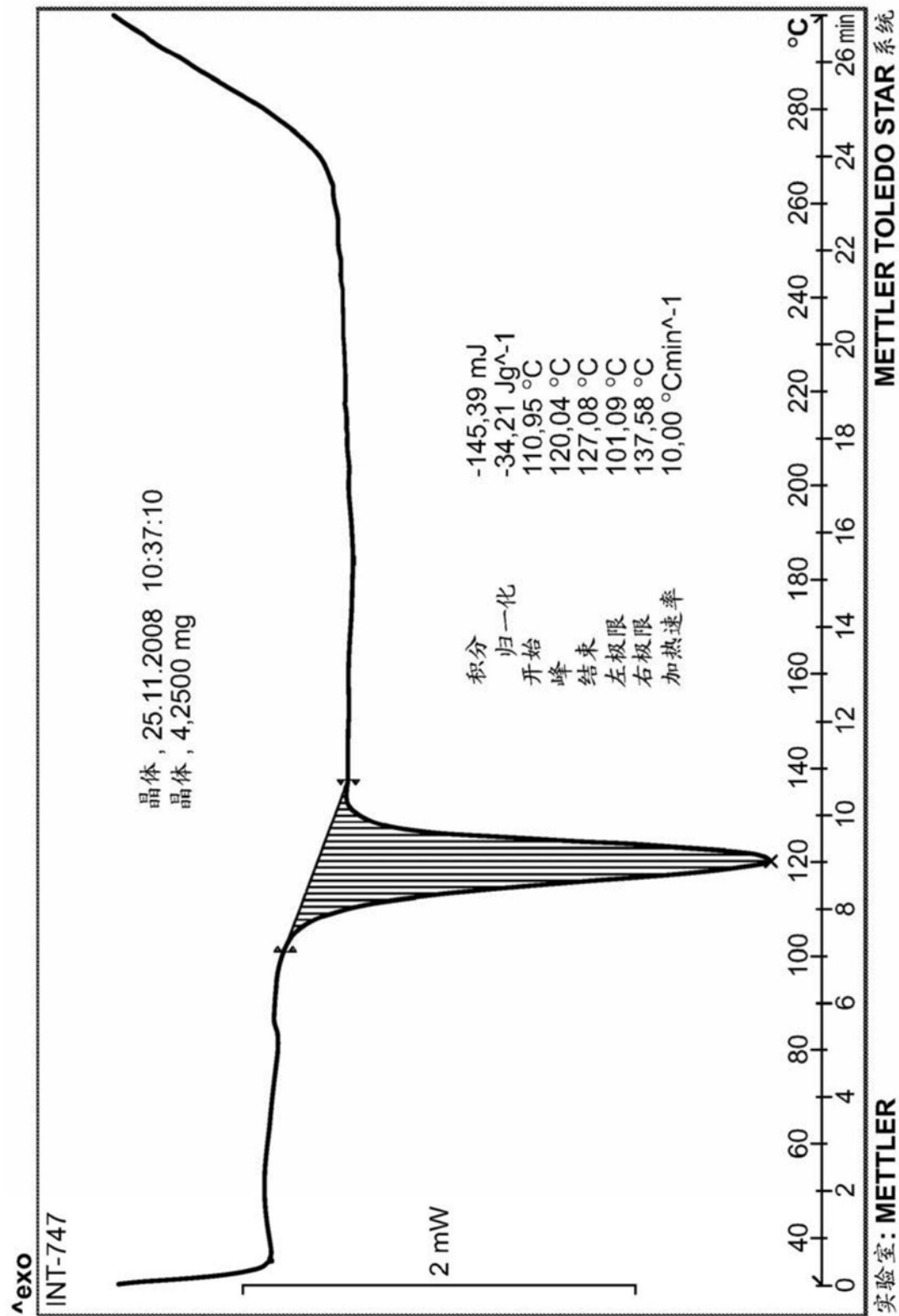


图39

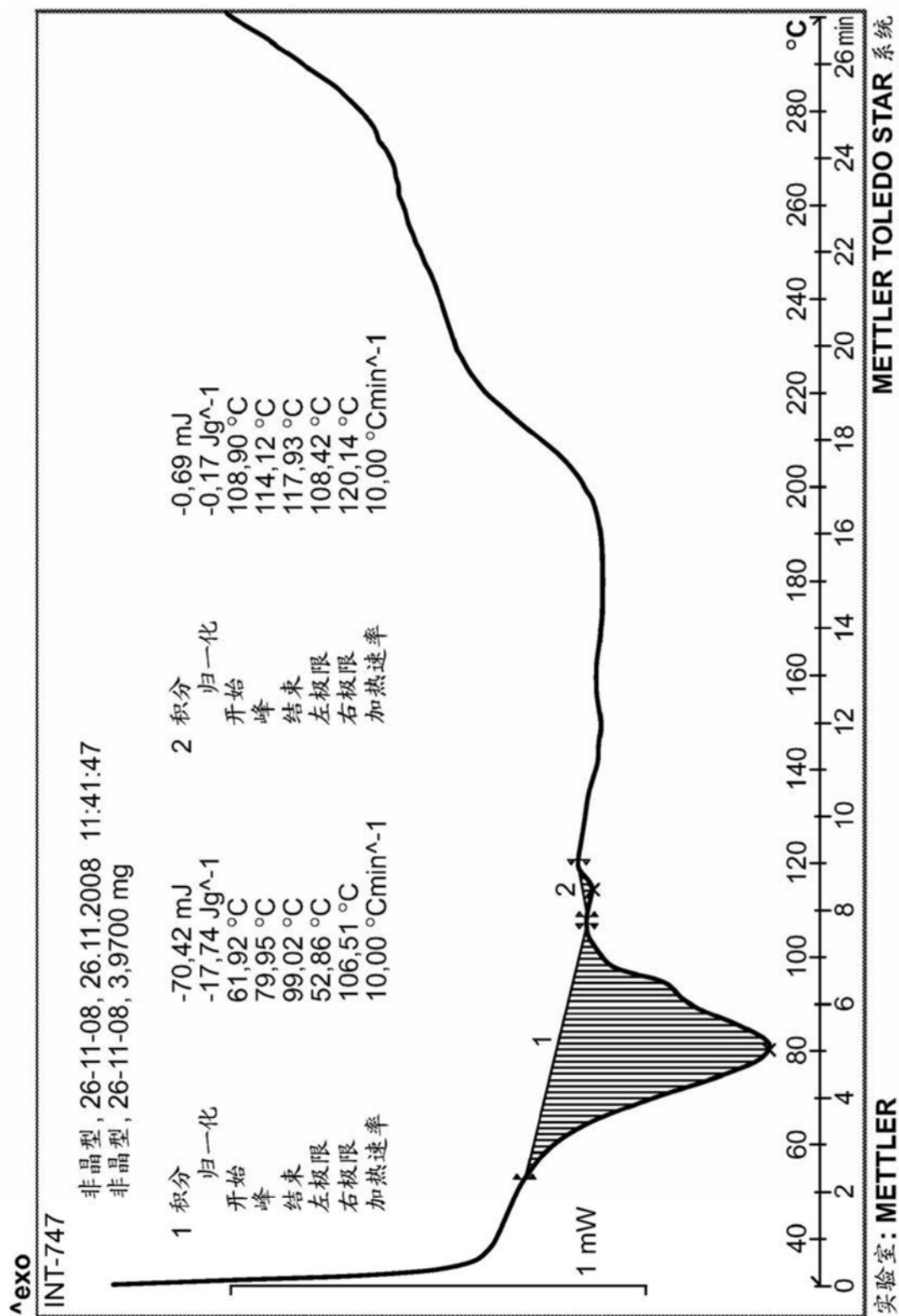


图40