

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11)

032347

(13)

B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: **2019.05.31**

(21) Номер заявки: **201590040**

(22) Дата подачи: **2013.06.17**

(51) Int. Cl. **C07J 9/00** (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
C07J 51/00 (2006.01)

(54) ПОЛУЧЕНИЕ, ПРИМЕНЕНИЕ И ТВЕРДЫЕ ФОРМЫ ОБЕТИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

(31) **61/661,531**

(32) **2012.06.19**

(33) **US**

(43) **2015.05.29**

(86) **PCT/US2013/046150**

(87) **WO 2013/192097 2013.12.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНТЕРСЕНТ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Штайнер Андре (DE), Венерлунд Поульсен
Хейди (DK), Жолибуа Эмили (GB),
Револински Мелисса (US), Гросс Ральф
(DE), Шарп Эмма, Дубас-Фишер Фиона,
Иберлин Алекс (GB)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56)

WO-A2-2006122977

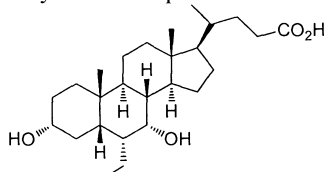
SEPE VALENTINA ET AL.: "Conicasterol E, a small heterodimer partner sparing farnesoid X receptor modulator endowed with a pregnane X receptor agonistic activity, from the marine sponge Theonella swinhoei.", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY 12 JAN 2012, vol. 55, no. 1, 12 January 2012 (2012-01-12), pages 84-93, XP002711362, ISSN: 1520-4804, page 87, scheme 1, page 91, column 2, paragraph 1, abstract

EP-A1-1568706

GIOIELLO ANTIMO ET AL.: "Extending SAR of bile acids as FXR ligands: discovery of 23-N-(carbocinnamyloxy)-3[alpha],7[alpha] dihydroxy-6[alpha]ethyl-24-nor-5[beta]cholan-23-amine.", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY 15 APR 2011, vol. 19, no. 8, 15 April 2011 (2011-04-15), pages 2650-2658, XP002711363, ISSN: 1464-3391, page 2652, scheme 1, page 2656, column 1, paragraph 4.1.4

YU DONNA ET AL.: "An improved synthesis of 6[alpha]ethylchenodeoxycholic acid (6ECDCA), a potent and selective agonist for the Farnesoid X Receptor (FXR).", STEROIDS NOV 2012, vol. 77, no. 13, November 2012 (2012-11), pages 1335-1338, XP002711364, ISSN: 1878-5867, page 1338, column 1, paragraph 2.4

(57) Изобретение относится к способу получения некристаллической обетихолево́й кислоты



или ее фармацевтически приемлемой соли, сольвату или аминокислотному конъюгату. Обетихоле́вая кислота полезна для лечения или предотвращения опосредованного FXR заболевания или состояния, сердечно-сосудистого заболевания или холестатического заболевания печени, а также для снижения уровней холестерина ЛПВП, для снижения уровней триглицеридов у млекопитающего или для подавления фиброза.

032347

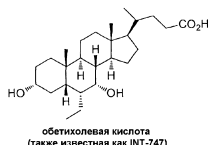
B1

B1

032347

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к обетихоловой кислоте, агонисту FXR, способам получения обетихоловой кислоты, фармацевтическим композициям, содержащим обетихоловую кислоту, и их терапевтическому применению.



Настоящее изобретение относится к способу получения некристаллической обетихоловой кислоты, включающему стадии

очистки промежуточного соединения E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты кристаллизацией;

гидрогенизации очищенной E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с получением 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты;

восстановления 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с образованием сырой обетихоловой кислоты;

получения кристаллической обетихоловой кислоты путем кристаллизации сырой обетихоловой кислоты, используя для этого н-бутилацетат и

превращения кристаллической обетихоловой кислоты в некристаллическую обетихоловую кислоту путем растворения кристаллической обетихоловой кислоты в водном растворе NaOH, с гашением соляной кислотой.

В предпочтительном варианте восстановление 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты включает взаимодействие 3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaBH₄, с образованием сырой обетихоловой кислоты.

В более предпочтительном варианте гидрогенизация очищенной E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты включает взаимодействие E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с Pd/C и газообразным водородом в щелочном растворе с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты.

В более предпочтительном варианте E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овую кислоту получают взаимодействием метилового эфира 3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaOH.

В еще более предпочтительном варианте способ дополнительно включает стадию взаимодействия метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты с CH₃CHO, с образованием метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты.

В еще более предпочтительном варианте способ дополнительно включает стадию взаимодействия метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с Li[N(CH(CH₃)₂)₂] и Si(CH₃)₃Cl, с образованием метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты.

В еще более предпочтительном варианте способ дополнительно включает стадию взаимодействия 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с CH₃OH и H₂SO₄, с образованием метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты.

В наиболее предпочтительном варианте взаимодействие 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaBH₄, с образованием сырой обетихоловой кислоты, проводят при температуре от примерно 85 до примерно 110°C в щелочном водном растворе.

В еще более предпочтительном варианте взаимодействие E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с Pd/C и газообразным водородом в щелочном растворе, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, проводят при температуре от примерно 90 до примерно 110°C.

В еще более предпочтительном варианте взаимодействие метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaOH, с образованием E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, проводят при температуре от примерно 20 до примерно 60°C.

В наиболее предпочтительном варианте взаимодействие метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты с CH₃CHO с образованием метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты проводят в полярном апротонном растворителе при температуре от примерно -50 до примерно -70°C в присутствии сольватированного комплекса трифторида бора (BF₃).

В предпочтительном варианте взаимодействие метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с Li[N(CH(CH₃)₂)₂] и Si(CH₃)₃Cl, с образованием метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты, проводят в полярном апротонном растворителе при температуре от примерно -10 до примерно -30°C.

В более предпочтительном варианте взаимодействие 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с CH₃OH и H₂SO₄ с образованием метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, проводят при нагреве в течение примерно 3 ч и где pH реакционной смеси доводят водным щелочным раствором до величины pH от 6,5 до 8,0.

Настоящее изобретение также относится к способу получения кристаллической обетихоловой кислоты, включающему стадии

очистки промежуточного соединения, E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, кристаллизацией;

гидрогенизации очищенной E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с получением 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты;

восстановления 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с образованием сырой обетихоловой кислоты;

получения кристаллической обетихоловой кислоты путем кристаллизации сырой обетихоловой кислоты, используя для этого н-бутилацетат.

Настоящее изобретение также относится к способу получения кристаллической обетихоловой кислоты, включающему стадии

взаимодействия 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с CH₃OH и H₂SO₄ с образованием метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, при нагреве в течение примерно 3 ч и где pH реакционной смеси доводят водным щелочным раствором до величины pH от 6,5 до 8,0;

взаимодействия метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с Li[N(CH(CH₃)₂)₂] и Si(CH₃)₃Cl, с образованием метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты, в полярном апротонном растворителе при температуре от примерно -10 до примерно -30°C;

взаимодействия метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты с CH₃CHO, с образованием метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, в полярном апротонном растворителе при температуре от примерно -50 до примерно -70°C в присутствии сольватированного комплекса трифторида бора (BF₃);

взаимодействия метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaOH, с образованием E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, при температуре от примерно 20 до примерно 60°C;

очистки E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты кристаллизацией;

взаимодействия очищенной E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с Pd/C и газообразным водородом в щелочном растворе, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, при температуре от примерно 90 до примерно 110°C;

взаимодействия 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaBH₄, с образованием сырой обетихоловой кислоты, при температуре от примерно 85 до примерно 110°C в щелочном водном растворе;

получения кристаллической обетихоловой кислоты путем кристаллизации сырой обетихоловой кислоты, используя для этого н-бутилацетат, и

превращения кристаллической обетихоловой кислоты в некристаллическую обетихоловую кислоту в водном растворе NaOH, с гашением его соляной кислотой.

В предпочтительном варианте некристаллическая обетихоловая кислота содержит менее 1% хенодезоксихоловой кислоты.

В более предпочтительном варианте некристаллическая обетихоловая кислота характеризуется термограммой дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) с эндотермическим пиком при температуре примерно от 89 до 94°C.

В еще более предпочтительном варианте, где некристаллическая обетихоловая кислота содержит менее 1% хенодезоксихоловой кислоты.

В наиболее предпочтительном варианте некристаллическая обетихоловая кислота содержит от 0,01 до менее чем 1 мас.% хенодезоксихоловой кислоты (CDCA).

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой хроматограмму ВЭЖХ-УФ/МС сырого соединения 5 стадии 4 примера 1, введенного в концентрации 1 мг/мл, вводимый объем 3 мкл. Хроматограмму получали в соответствии с методикой, описанной в примере 2.

Фиг. 2 представляет собой хроматограмму ВЭЖХ-УФ/МС соединения 5 стадии 4 примера 1, очищенное эталонное соединение вводили в концентрации 1 мг/мл, вводимый объем 20 мкл. Хроматограмму получали в соответствии с методикой, описанной в примере 2.

Фиг. 3 представляет собой УФ-хроматограмму сырого соединения 5 стадии 4 примера 1, полученного методом ВЭЖХ. Хроматограмму получали в соответствии с методикой, описанной в примере 2.

Фиг. 4А представляет собой точную регистрацию ионов m/z 850,61914 \pm 3 ч/млн фракции основно-

го пика (RT 29,0 мин) соединения 5 стадии 4 примера 1, выделенного в чистом виде методом ВЭЖХ (см. пример 2).

Фиг. 4В представляет собой точную регистрацию ионов m/z 850,61914 \pm 3 ч/млн фракции побочного пика (RT 29,9 мин) соединения 5 стадии 4 примера 1, выделенного в чистом виде методом ВЭЖХ (см. пример 2).

Фиг. 4С представляет собой точную регистрацию ионов m/z 850,61914 \pm 3 ч/млн сырого соединения 5 стадии 4 примера 1 (см. пример 2).

Фиг. 4D представляет собой точную регистрацию ионов m/z 850,61914 \pm 3 ч/млн соединения 5 стадии 4 примера 1, очищенного эталонного соединения (см. пример 2).

Фиг. 5 представляет собой дифрактограмму ПРД формы С кристаллической обетихолево́й кислоты (см. пример 3).

Фиг. 6 изображает термограммы ТГА и ДСК формы С кристаллической обетихолево́й кислоты (см. пример 3).

Фиг. 7 изображает дифрактограммы ПТ-ПРД кристаллической обетихолево́й кислоты при 25, 110 и 120°C (см. пример 3).

Фиг. 8А представляет собой график изотермы ГСП формы С кристаллической обетихолево́й кислоты (см. пример 3).

Фиг. 8В представляет собой график кинетики ГСП формы С кристаллической обетихолево́й кислоты (см. пример 3).

Фиг. 8С изображает дифрактограммы ПРД формы С кристаллической обетихолево́й кислоты до и после анализа ГСП (см. пример 3).

Фиг. 9 изображает дифрактограммы ПРД формы С кристаллической обетихолево́й кислоты до и после хранения при 40°C/75% RH (см. пример 3).

Фиг. 10 представляет собой дифрактограмму ПРД партии 1 формы 1 обетихолево́й кислоты (смотри пример 5).

Фиг. 11 изображает дифрактограммы ПРД для партий 1, 2, 3, 4, 5 и 6 формы 1 обетихолево́й кислоты (см. пример 5).

Фиг. 12 представляет собой спектр ЯМР партии 1 формы 1 обетихолево́й кислоты в d_6 -ДМСО (см. пример 5).

Фиг. 13 изображает спектры ^1H ЯМР для партий 1, 2, 3, 4, 5 и 6 формы 1 обетихолево́й кислоты (см. пример 5).

Фиг. 14 представляет собой расширение спектра ^{13}C DEPTQ ЯМР формы 1 обетихолево́й кислоты из области 10-75 ч/млн (см. пример 5).

Фиг. 15 представляет собой расширение спектра ^{13}C DEPT135 ЯМР формы 1 обетихолево́й кислоты с подавлением четвертичных атомов углерода из области 0-75 ч/млн (см. пример 5).

Фиг. 16 представляет собой количественный ^{13}C ЯМР формы 1 обетихолево́й кислоты (см. пример 5).

Фиг. 17 представляет собой развернутый вид пиков при 32,3 ч/млн фиг. 16 (см. пример 5).

Фиг. 18 представляет собой спектр ПФ-ИКС партии 1 формы 1 обетихолево́й кислоты (см. пример 5).

Фиг. 19 изображает термограммы ТГА и ДСК партии 1 формы 1 обетихолево́й кислоты (см. пример 5).

Фиг. 20 изображает термограммы модулированной ДСК партии 1 формы 1 обетихолево́й кислоты (см. пример 5).

Фиг. 21 изображает записи прибора ТГА для партий 1, 2, 3, 4, 5, и 6 формы 1 обетихолево́й кислоты (см. пример 5).

Фиг. 22 изображает записи прибора ДСК для партий 1, 2, 3, 4, 5, и 6 формы 1 обетихолево́й кислоты (см. пример 5).

Фиг. 23А представляет собой изображение партии 1 формы 1 обетихолево́й кислоты под поляризационным световым микроскопом.

Фиг. 23В представляет собой изображение партии 2 формы 1 обетихолево́й кислоты под поляризационным световым микроскопом.

Фиг. 23С представляет собой изображение партии 3 формы 1 обетихолево́й кислоты под поляризационным световым микроскопом.

Фиг. 23D представляет собой изображение партии 4 формы 1 обетихолево́й кислоты под поляризационным световым микроскопом.

Фиг. 23Е представляет собой изображение партии 5 формы 1 обетихолево́й кислоты под поляризационным световым микроскопом.

Фиг. 23F представляет собой изображение партии 6 формы 1 обетихолево́й кислоты под поляризационным световым микроскопом.

Фиг. 24 изображает график изотермы ГСП партии 1 формы 1 обетихолево́й кислоты (см. пример 5).

Фиг. 25 изображает график кинетики ГСП партии 1 формы 1 обетихолево́й кислоты (см. пример 5).

Фиг. 26 изображает дифрактограммы ПРД партии 1 формы 1 обетихолево́й кислоты до и после ГСП

(см. пример 5).

Фиг. 27 представляет собой график измерений рКа при трех различных отношениях метанол/вода для формы 1 обетихолевого кислоты (см. пример 5).

Фиг. 28 представляет собой график Ясуда-Шедловски для формы 1 обетихолевого кислоты (см. пример 5).

Фиг. 29 представляет собой график, демонстрирующий распределение форм в зависимости от pH для формы 1 обетихолевого кислоты (см. пример 5).

Фиг. 30 представляет собой график, демонстрирующий разностную кривую, полученную методом потенциометрии для формы 1 обетихолевого кислоты (см. пример 5).

Фиг. 31 изображает профиль липофильности формы 1 обетихолевого кислоты (см. пример 5).

Фиг. 32 изображает дифрактограммы ПРД партии 1 формы 1 обетихолевого кислоты после хранения при 40°C/75% RH (см. пример 5).

Фиг. 33 изображает дифрактограммы ПРД партии 1 формы 1 обетихолевого кислоты после хранения при 25°C/97% RH (см. пример 5).

Фиг. 34 показывает изображение молекулы формы G обетихолевого кислоты из кристаллической структуры, демонстрируя анизотропные эллипсоиды атомных смещений для неводородных атомов при 50% уровне вероятности (см. пример 6).

Фиг. 35 показывает изображение межмолекулярных водородных связей кристаллической структуры формы G обетихолевого кислоты, где водородные связи показаны пунктирными линиями (см. пример 6).

Фиг. 36 изображает совмещение смоделированной ПРД картины, экспериментальных картин собранного кристалла и формы G обетихолевого кислоты (см. пример 6).

Фиг. 37 изображает график зависимости профиля обетихолевого кислоты в плазме от времени после перорального введения в дозе 20 мг/кг формы 1 и кристаллической формы F обетихолевого кислоты (см. пример 7).

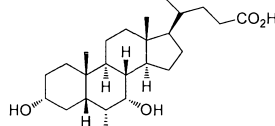
Фиг. 38 изображает график концентрации в плазме тауро-конъюгата формы 1 и кристаллической формы F обетихолевого кислоты через различные временные интервалы после введения (см. пример 7).

Фиг. 39 изображает кривую ДСК для формы 1 (см. пример 7).

Фиг. 40 изображает кривую ДСК для формы F (см. пример 7).

Подробное описание изобретения

Настоящая заявка относится к обетихолевого кислоте, фармацевтически активному ингредиенту (также известной как INT-747), имеющей химическую структуру



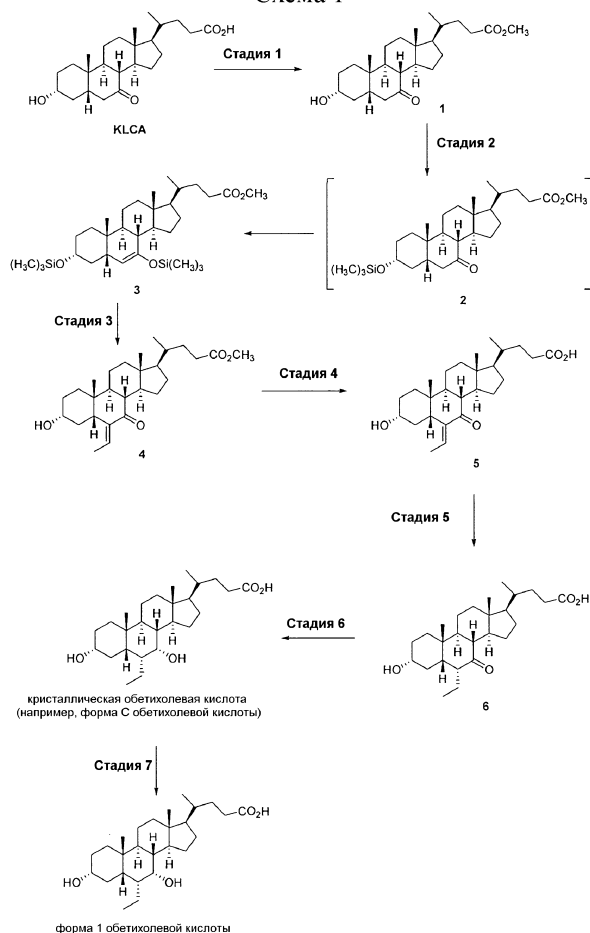
обетихолевого кислота
(также известная как INT-747)

включая практически чистую обетихолевого кислоту, способу получения обетихолевого кислоты, включающему использование кристаллической обетихолевого кислоты в качестве синтетического промежуточного соединения, и аналитическим методам для подтверждения присутствия и чистоты обетихолевого кислоты и синтетических промежуточных соединений в процессе получения обетихолевого кислоты. В настоящей заявке также описаны фармацевтические композиции и препараты обетихолевого кислоты и варианты применения таких композиций.

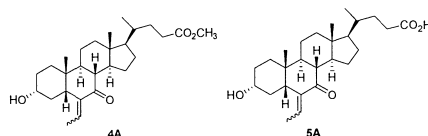
Способ получения обетихолевого кислоты

Настоящая заявка относится к способу получения обетихолевого кислоты высокой чистоты. Способ по настоящей заявке изображен на схеме 1. Способ представляет собой 6-стадийный синтез и последующую одну стадию очистки, с получением обетихолевого кислоты высокой чистоты.

Схема 1



Способ по настоящему изобретению также включает способ в соответствии со схемой 1, где каждое из соединений 4 и 5 состоит из смеси Е и Z изомеров, что проиллюстрировано ниже структурами соединений 4А и 5А:



В одном варианте осуществления отношение Е/З изомеров метилового эфира Е/З-3α-гидрокси-6-этилиден-7-кето-5β-холан-24-овой кислоты (4А) составляет примерно 50%, более чем примерно 60%, более чем примерно 70%, более чем примерно 80%, более чем примерно 83%, более чем примерно 85%, более чем примерно 90%, более чем примерно 93%, более чем примерно 95% или более чем примерно 99%. В одном варианте осуществления отношение Е/З определяют методом ВЭЖХ. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 80%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 83%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 85%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 90%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 93%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 95%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 99%.

В одном варианте осуществления отношение Е/З изомеров Е/З-3α-гидрокси-6-этилиден-7-кето-5β-холан-24-овой кислоты (5А) составляет примерно 50%, более чем примерно 60%, более чем примерно 70%, более чем примерно 80%, более чем примерно 83%, более чем примерно 85%, более чем примерно 90%, более чем примерно 93%, более чем примерно 95% или более чем примерно 99%. В одном варианте осуществления отношение Е/З определяют методом ВЭЖХ. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 80%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 83%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 85%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 90%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 93%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 95%. В одном варианте осуществления данное отношение составляет более чем примерно 99%.

Способ по настоящей заявке ранее не был известен в данной области. Способ представляет собой 6-стадийный синтез с последующей одной стадией очистки. Стадия 1 представляет собой этерификацию C-24 карбоновой кислоты 7-кетолитохолевой кислоты (KLCA) с использованием метанола в присутствии кислотного катализатора при нагревании, с получением метилового эфира соединения 1. Стадия 2 представляет собой образование силиленолового эфира соединения 1 при помощи сильного основания с последующей обработкой хлорсиланом, с получением соединения 3. Стадия 3 представляет собой реакцию альдольной конденсации соединения 3 силиленолового эфира и ацетальдегида, с получением соединения 4 (или соединения 4A). Стадия 4 представляет собой гидролиз сложноэфирных связей, то есть, сапонификацию C-24 метилового эфира соединения 4 (или соединения 4A), с получением карбоновокислотного соединения 5 (или соединения 5A). Стадия 5 представляет собой гидрогенизацию 6-этилиденового фрагмента соединения 5 (или соединения 5A) с последующей изомеризацией, с получением соединения 6. Стадия 6 представляет собой избирательное восстановление 7-кетогруппы соединения 6 до 7 α -гидроксигруппы, с получением кристаллической обетихолевой кислоты. Стадия 7 представляет собой превращение кристаллической обетихолевой кислоты в форму 1 обетихолевой кислоты.

Способ по настоящему изобретению относится к получению формы 1 обетихолевой кислоты, где используют кристаллическую форму обетихолевой кислоты в качестве синтетического промежуточного соединения.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения формы 1 обетихолевой кислоты, включающему стадию превращения кристаллической обетихолевой кислоты в форму 1 обетихолевой кислоты.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения формы 1 обетихолевой кислоты, включающему стадии

взаимодействия 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6) с NaBH₄, с образованием кристаллической обетихолевой кислоты и

превращения кристаллической обетихолевой кислоты в форму 1 обетихолевой кислоты.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения формы 1 обетихолевой кислоты, включающему стадии

взаимодействия E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5A) с Pd/C и газообразным водородом, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6),

взаимодействия 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6) с NaBH₄, с образованием кристаллической обетихолевой кислоты и

превращения кристаллической обетихолевой кислоты в форму 1 обетихолевой кислоты.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу получения формы 1 обетихолевой кислоты, включающему стадии

взаимодействия E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5) с Pd/C и газообразным водородом, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6),

взаимодействия 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6) с NaBH₄, с образованием кристаллической обетихолевой кислоты и

превращения кристаллической обетихолевой кислоты в форму 1 обетихолевой кислоты.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения формы 1 обетихолевой кислоты, включающему стадии

взаимодействия метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4A) с NaOH, с образованием E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5A),

взаимодействия E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5A) с Pd/C и газообразным водородом, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6),

взаимодействия 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6) с NaBH₄, с образованием кристаллической обетихолевой кислоты и

превращения кристаллической обетихолевой кислоты в форму 1 обетихолевой кислоты.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения формы 1 обетихолевой кислоты, включающему стадии

взаимодействия метилового эфира E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4) с NaOH, с образованием E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5),

взаимодействия E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5) с Pd/C и газообразным водородом, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6),

взаимодействия 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6) с NaBH₄, с образованием кристаллической обетихолевой кислоты, и

превращения кристаллической обетихолевой кислоты в форму 1 обетихолевой кислоты.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения формы 1 обетихолевой кислоты, включающему стадии

взаимодействия метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты (3) с

CH_3CHO , с образованием метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4A),

взаимодействия метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4A) с NaOH, с образованием E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5A),

взаимодействия E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5A) с Pd/C и газообразным водородом, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6),

взаимодействия 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6) с NaBH_4 , с образованием кристаллической обетихоловой кислоты и

превращения кристаллической обетихоловой кислоты в форму I обетихоловой кислоты.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения формы I обетихоловой кислоты, включающему стадии

взаимодействия 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (KLCA) с CH_3OH и H_2SO_4 , с образованием метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (1),

взаимодействия метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (1) с $\text{Li}[\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2]$ и $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$, с образованием метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты (3),

взаимодействия метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты (3) с CH_3CHO , с образованием метилового эфира E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4),

взаимодействия метилового эфира E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4) с NaOH, с образованием E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5),

взаимодействия E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5) с Pd/C и газообразным водородом, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6),

взаимодействия 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6) с NaBH_4 , с образованием кристаллической обетихоловой кислоты и

превращения кристаллической обетихоловой кислоты в форму I обетихоловой кислоты.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения формы I обетихоловой кислоты с использованием кристаллической обетихоловой кислоты. В другом варианте осуществления кристаллическая обетихоловая кислота представляет собой форму C. В одном варианте осуществления форма C кристаллической обетихоловой кислоты характеризуется рентгеновской дифракционной картиной, аналогичной картине, приведенной на фиг. 5. В одном варианте осуществления форму C кристаллической обетихоловой кислоты кристаллизуют и перекристаллизовывают из н-бутилацетата.

Стадия 1.

Стадия 1 представляет собой реакцию 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (KLCA) с CH_3OH и H_2SO_4 , с образованием метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (1). В одном варианте осуществления стадии 1 реакционную смесь нагревают в течение примерно 3 часов и pH реакционной смеси доводят водным щелочным раствором до значения pH примерно 6,5-8,0. В одном варианте осуществления выделение метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (1) включает дополнительную обработку активированным углем. В одном варианте осуществления выделение метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (1) не включает дополнительную обработку активированным углем. В одном варианте осуществления выделение метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (1) без обработки активированным углем позволяет получать более высокий выход. В одном варианте осуществления реакцию 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (1) с CH_3OH и H_2SO_4 проводят в метаноле. В одном варианте осуществления щелочной раствор представляет собой водный раствор NaOH. В одном варианте осуществления значение pH составляет примерно 7,0-7,5.

В одном варианте осуществления метиловый спирт действует как метилирующий реагент, а также как растворитель реакционной смеси. В одном варианте осуществления раствор, содержащий продукт, обрабатывают активированным углем в течение примерно 30 мин и фильтруют, чтобы удалить твердые частицы угля. В одном варианте осуществления раствор, содержащий продукт, не обрабатывают активированным углем. Для осаждения продукта добавляют воду при температуре примерно 5 -20°C и затравочный материал. В другом варианте осуществления температура воды составляет примерно 10-15°C. В одном варианте осуществления продукт выделяют центрифугированием и промывают смесью метанола и воды. В одном варианте осуществления содержание воды во влажном материале количественно определяют по методу Карла Фишера (КФ). В одном варианте осуществления материал сушат в сушильном барабане перед тем, как использовать в следующей стадии. В одном варианте осуществления материал не сушат перед тем, как использовать в следующей стадии.

Стадия 2.

Стадия 2 представляет собой реакцию метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой ки-

слоты (1) с $\text{Li}[\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2]$ и $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$, с образованием метилового эфира $3\alpha,7$ -дитриметилсилилокси- 5β -хол-6-ен-24-овой кислоты (3). В одном варианте осуществления стадию 2 проводят в полярном апротонном растворителе при температуре от примерно -10 до примерно -30°C . В одном варианте осуществления полярный апротонный растворитель представляет собой тетрагидрофуран. В одном варианте осуществления температура составляет от примерно -20 до примерно -25°C . В одном варианте осуществления реакцию смесь метилового эфира 3α -гидрокси-7-кето- 5β -холан-24-овой кислоты (1) с $\text{Li}[\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2]$ и $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$ перемешивают в течение примерно 2 ч.

В одном варианте осуществления соединение 1 загружают в реактор в инертных условиях. В другом варианте осуществления остаточную воду и метанол удаляют повторной азеотропной перегонкой при примерно 65°C и нормальном давлении. В другом варианте осуществления ТГФ добавляют к остатку по мере необходимости и перегонку повторяют примерно 4 раза. В другом варианте осуществления перегонку повторяют примерно 3 раза, примерно 2 раза или примерно 1 раз. В одном варианте осуществления остаточный раствор, содержащий продукт, имеет конечное содержание воды $\leq 0,05\%$ (титрование методом Карла Фишера). Вода может гидролизовать хлортриметилсилан, который добавляют позже в этой стадии. В одном варианте осуществления раствор продукта предварительно охлаждают до температуры от примерно -10 до примерно -30°C и затем добавляют хлортриметилсилан. В другом варианте осуществления раствор предварительно охлаждают до температуры от примерно -20 до примерно -25°C . В одном варианте осуществления сильное основание и ТГФ загружают в отдельный реактор и охлаждают до температуры от примерно -10 до примерно -30°C . В одном варианте осуществления сильное основание представляет собой литий диизопропиламид. В другом варианте осуществления атмосфера реактора является инертной, например атмосфера азота или аргона. В другом варианте осуществления раствор основания и ТГФ охлаждают до температуры от примерно -20 до примерно -25°C . В одном варианте осуществления сухой охлажденный раствор метилового эфира 3α -гидрокси-7-кето- 5β -холан-24-овой кислоты, ТГФ и хлортриметилсилан загружают в основной раствор при температуре от примерно -10 до примерно -30°C . В другом варианте осуществления температура составляет от примерно -20 до примерно -25°C . В одном варианте осуществления реакцию смесь перемешивают в течение примерно 2 ч. В одном варианте осуществления для выделения продукта реакции реакцию смесь добавляют в предварительно охлажденный кислый раствор. В другом варианте осуществления кислый раствор представляет собой водный раствор лимонной кислоты. В одном варианте осуществления после добавления водную фазу отделяют и отбрасывают. В одном варианте осуществления растворитель удаляют из органической фазы вакуумной перегонкой при температуре примерно 50°C . В одном варианте осуществления выделенный остаток, являющийся метиловым эфиром $3\alpha,7\alpha$ -дитриметилсилилокси- 5β -хол-6-ен-24-овой кислоты (3), используют "как есть" в следующей стадии. Альтернативно, соединение 3 может быть очищено перед стадией 3.

Стадия 3.

Стадия 3 представляет собой реакцию метилового эфира $3\alpha,7$ -дитриметилсилилокси- 5β -хол-6-ен-24-овой кислоты (3) с CH_3CHO , с образованием метилового эфира 3α -гидрокси-6-этилиден-7-кето- 5β -холан-24-овой кислоты (4). В одном варианте осуществления стадию 3 проводят в полярном апротонном растворителе при температуре от примерно -50 до примерно -70°C в присутствии BF_3 . В одном варианте осуществления полярный апротонный растворитель представляет собой дихлорметан. В одном варианте осуществления BF_3 представляет собой 16 мас.% раствор в ацетонитриле. В одном варианте осуществления температура составляет от примерно -60 до примерно -65°C .

В одном варианте осуществления соединение 3 в полярном апротонном растворителе загружают в реактор с инертной атмосферой. В другом варианте осуществления полярный апротонный растворитель представляет собой остаточный растворитель из предыдущей стадии (например, ТГФ). В одном варианте осуществления ТГФ добавляют для облегчения отгонки остаточной воды и диизопропиламина. При максимальной температуре примерно 50°C остаточные количества полярного апротонного растворителя отгоняют в вакууме. Содержание воды в остатке, содержащем соединение 3, ограничено количеством $\leq 0,5\%$ (титрование методом Карла Фишера). Остаток, содержащий соединение 3, затем растворяют в полярном апротонном растворителе и предварительно охлаждают до температуры от примерно -50 до примерно -70°C . Полярный апротонный растворитель представляет собой дихлорметан. В другом варианте осуществления остаток, содержащий соединение 3 в полярном апротонном растворителе, предварительно охлаждают до температуры от примерно -60 до примерно -65°C . Добавляют ацетальдегид (CH_3CHO). Полярный апротонный растворитель и сольватированный комплекс трифторида бора (BF_3) загружают в отдельный реактор и затем охлаждают до температуры от примерно -50 до примерно -70°C . В другом варианте осуществления полярный апротонный растворитель представляет собой дихлорметан. В другом варианте осуществления сольватированный комплекс трифторида бора представляет собой ацетонитрильный комплекс трифторида бора. Температура раствора BF_3 составляет от примерно -60 до примерно -65°C . Раствор, содержащий соединение 3 и ацетальдегид, добавляют к раствору BF_3 при температуре от примерно -60 до примерно -65°C . В другом варианте осуществления раствор, содержащий соединение 3 и ацетальдегид, является сухим. В одном варианте осуществления реакцию смесь пе-

ремешивают в течение примерно двух часов при температуре от примерно -60 до примерно -65°C, нагревают до температуры примерно 23-28°C, перемешивают в течение еще примерно 2 ч и охлаждают до температуры примерно 2-10°C для гидролиза/выделения продукта реакции. В одном варианте осуществления общее время для добавления и перемешивания составляет примерно 4 ч. В одном варианте осуществления для выделения продукта реакции охлажденный раствор из реактора добавляют к предварительно охлажденному водному щелочному раствору. В другом варианте осуществления водный щелочной раствор представляет собой примерно 50 мас.% раствор гидроксида натрия (NaOH; каустическая сода). В одном варианте осуществления фазы разделяют и (нижний) органический слой переносят в отдельный реактор. В одном варианте осуществления из органического слоя растворитель отгоняют при температуре не более чем (НБЧ) 50°C, насколько возможно. В одном варианте осуществления остаток содержит метиловый эфир 3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4) и некоторое остаточное количество ацетонитрила и дихлорметана. Понятно, что в стадии 4 может образовываться метиловый эфир E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4A). Продукт стадии 3 переносят непосредственно в стадию 4.

Стадия 4.

Стадия 4 представляет собой реакцию метилового эфира 3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4) с NaOH, с образованием E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5). В одном варианте осуществления перед стадией 4 остаток из стадии 3 нагревают до температуры примерно 45-60°C для удаления остаточных количеств растворителя. В одном варианте осуществления температура составляет примерно 49-55°C. В одном варианте осуществления реакцию гидролиза сложноэфирных связей метилового эфира 3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4) с NaOH проводят при температуре примерно 20-25°C в метаноле, воде и растворе NaOH. В одном варианте осуществления реагирующий метиловый эфир 3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4) загружают в реактор. В другом варианте осуществления атмосфера реактора является инертной, например, атмосфера азота или аргона. При температуре НБЧ 50°C остаточные количества растворителя отгоняют в вакууме. В одном варианте осуществления остаток нагревают до температуры примерно 45-60°C. В другом варианте осуществления остаток нагревают до температуры примерно 49-55°C. В другом варианте осуществления остаток из стадии 3 (соединение 4) растворяют в метаноле и воде и водном щелочном растворе. В другом варианте осуществления водный щелочной раствор представляет собой примерно 50 мас.% раствор гидроксида натрия (NaOH; каустическая сода). Реакцию гидролиза сложноэфирных связей стадии 4 проводят при температуре примерно 20-60°C и перемешивают до завершения реакции гидролиза. В одном варианте осуществления гидролиз сложноэфирных связей проводят при температуре примерно 20-25°C. Значение pH реакционной смеси проверяют, чтобы убедиться, что оно >12. Если pH <12, дополнительно добавляют NaOH. Реакционную смесь разбавляют водой и температуру доводят до примерно 20-35°C. В другом аспекте реакционную смесь разбавляют водой и температуру доводят до примерно 25-35°C. В одном варианте осуществления для выделения продукта реакции фазы разделяют, нижний водный слой переносят в отдельный реактор и органический слой отбрасывают. Соединение 5 находится в водной фазе. В одном варианте осуществления этилацетат и кислоту добавляют в водную фазу, содержащую соединение 5, с интенсивным перемешиванием водного слоя. В другом варианте осуществления кислота представляет собой водный раствор лимонной кислоты. В одном варианте осуществления фазы разделяют и нижний водный слой отбрасывают. Соединение 5 находится в органическом слое. В одном варианте осуществления этилацетат отгоняют из органического слоя и заменяют свежим этилацетатом. В одном варианте осуществления отгонку повторяют до тех пор, пока содержание воды дистиллята не будет НБЧ 1% или до достижения постоянной температуры кипения. В одном варианте осуществления суспензию охлаждают до температуры примерно 10-30°C, выделяют и промывают этилацетатом. В другом варианте осуществления полученную суспензию, содержащую соединение 5, охлаждают до температуры примерно 20-25°C. В одном варианте осуществления сушку полученного продукта осуществляют в вакууме (например, сушильном барабане) при температуре примерно 60°C.

В одном варианте осуществления сырую E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овую кислоту (5) кристаллизуют с использованием этанола. В одном варианте осуществления этанол и сырое соединение 5 загружают в реактор. В другом варианте осуществления атмосфера реактора является инертной. В одном варианте осуществления для растворения сырого соединения 5 смесь нагревают при кипячении с обратным холодильником. В одном варианте осуществления смесь охлаждают в контролируемом диапазоне температур охлаждения до температуры примерно 15-20°C. В одном варианте осуществления кристаллическое соединение 5 выделяют центрифугированием и затем промывают этилацетатом. В одном варианте осуществления сушку кристаллического соединения 5 осуществляют в вакууме (например, сушильном барабане) при температуре примерно 60°C. Можно отбирать образец для количественного анализа, определения чистоты и влажности очищенного соединения 5. В одном варианте осуществления очищенное соединение 5 содержит как E, так и Z изомеры 3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты. В одном варианте осуществления отношение E к Z составляет примерно 99:1,

примерно 98:2, примерно 95:5, примерно 90:10, примерно 85:15, примерно 80:20, примерно 75:25, примерно 70:30, примерно 65:35, примерно 60:40, примерно 55:45 или примерно 50:50. Смотри пример 2 для получения подробной информации относительно идентификации и характеристики очищенного соединения 5.

Стадию 4 также можно проводить, начиная с соединения, которое представляет собой смесь E/Z изомеров. Например, стадия 4 представляет собой реакцию метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4A) с NaOH, с образованием E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5A). В одном варианте осуществления перед стадией 4 остаток из стадии 3 нагревают до температуры примерно 45-60°C для удаления остаточных количеств растворителя. В одном варианте осуществления температура составляет примерно 49-55°C. В одном варианте осуществления реакцию гидролиза сложноэфирных связей с участием метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4A), реагирующего с NaOH, проводят при температуре примерно 20-25°C в метаноле, воде и растворе NaOH. В одном варианте осуществления раствор NaOH представляет собой 50 мас.% водный раствор.

В одном варианте осуществления реагирующий метиловый эфир E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (4A) загружают в реактор. В другом варианте осуществления атмосфера реактора является инертной, например атмосфера азота или аргона. При температуре НБЧ 50°C остаточные количества растворителя отгоняют в вакууме. В одном варианте осуществления остаток нагревают до температуры примерно 45-60°C. В одном варианте осуществления температура составляет примерно 49-55°C. В одном варианте осуществления остаток из стадии 3 (соединение 4A) растворяют в метаноле и воде и водном щелочном растворе. В другом варианте осуществления водный щелочной раствор представляет собой примерно 50 мас.% раствор гидроксида натрия (NaOH; каустическая сода). Реакцию гидролиза сложноэфирных связей стадии 4 проводят при температуре примерно 20-60°C и перемешивают до завершения реакции гидролиза. В одном варианте осуществления гидролиз сложноэфирных связей проводят при температуре примерно 20-25°C. Значение pH реакционной смеси проверяют, чтобы убедиться, что оно >12. Если pH <12, дополнительно добавляют NaOH. Реакционную смесь разбавляют водой и температуру доводят до примерно 25-35°C. В одном варианте осуществления для выделения продукта реакции фазы разделяют, нижний водный слой переносят в отдельный реактор и органический слой отбрасывают. Соединение 5A находится в водной фазе. В одном варианте осуществления этилацетат и кислоту добавляют в водную фазу, содержащую соединение 5A, с интенсивным перемешиванием водного слоя. В другом варианте осуществления кислота представляет собой водный раствор лимонной кислоты. В одном варианте осуществления фазы разделяют и нижний водный слой отбрасывают. Соединение 5A находится в органическом слое. В одном варианте осуществления этилацетат отгоняют из органического слоя и заменяют свежим этилацетатом. В одном варианте осуществления отгонку повторяют до тех пор, пока содержание воды дистиллята не будет НБЧ 1% или до достижения постоянной температуры кипения. В одном варианте осуществления суспензию охлаждают до температуры примерно 10-30°C, выделяют и промывают этилацетатом. В другом варианте осуществления полученную суспензию, содержащую соединение 5A, охлаждают до температуры примерно 20-25°C. В одном варианте осуществления сушку полученного продукта осуществляют в вакууме (например, сушильном барабане) при температуре примерно 60°C. Соединение 5A можно переносить без очистки в стадию 5.

В одном варианте осуществления сырую E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овую кислоту (5A) кристаллизуют с использованием этанола. В одном варианте осуществления этанол и сырое соединение 5A загружают в реактор. В другом варианте осуществления атмосфера реактора является инертной. В одном варианте осуществления для растворения сырого соединения 5A смесь нагревают при кипячении с обратным холодильником. В одном варианте осуществления смесь охлаждают в контролируемом диапазоне температур охлаждения до температуры примерно 15-20°C. В одном варианте осуществления кристаллическое соединение 5A выделяют центрифугированием и затем промывают этилацетатом. В одном варианте осуществления сушку кристаллического соединения 5A осуществляют в вакууме (например, сушильном барабане) при температуре примерно 60°C. В одном варианте осуществления выделенный кристаллический продукт стадии 4 представляет собой соединение 5.

Альтернативная стадия 4.

Соединение 5 можно получать альтернативным методом. В одном варианте осуществления соединение 4 загружают в реактор с инертной атмосферой. При температуре примерно 50°C (максимум) остаточные количества растворителя (например, ацетонитрила, дихлорметана) можно отгонять в вакууме. Остаток растворяют в метаноле и охлаждают. Добавляют водопроводную воду и каустическую соду (50 мас.% раствор NaOH). В одном варианте осуществления реакционную смесь перемешивают в течение примерно 4 ч при температуре примерно 20-25°C. Раствор разбавляют водопроводной водой и добавляют толуол. После перемешивания фазы разделяют и нижний водный слой переносят в реактор с инертной атмосферой. Органический слой отбрасывают. Этиловый эфир уксусной кислоты и раствор лимонной кислоты добавляют при интенсивном перемешивании в водный слой. Фазы разделяют и нижний водный слой отбрасывают. Органический слой переносят в реактор с инертной атмосферой. Из органи-

ческого слоя этиловый эфир уксусной кислоты отгоняют и заменяют свежим этиловым эфиром уксусной кислоты. В одном варианте осуществления эту операцию повторяют до тех пор, пока содержание воды в дистилляте станет не более чем 1% или до достижения постоянной температуры кипения. Настоящую суспензию охлаждают до температуры примерно 20-25°C, соединение 5 выделяют и промывают этиловым эфиром уксусной кислоты центрифугированием в инертной атмосфере. Сушку осуществляют в сушильном барабане в вакууме при температуре примерно 60°C.

Альтернативную стадию 4 также можно проводить, начиная с соединения, которое представляет собой смесь E/Z изомеров. В одном варианте осуществления соединение 4A загружают в реактор с инертной атмосферой. При температуре примерно 50°C (максимум) остаточные количества растворителя (например, ацетонитрила, дихлорметана) можно отгонять в вакууме. Остаток растворяют в метаноле и охлаждают. Добавляют водопроводную воду и каустическую соду (50 мас.% раствор NaOH). В одном варианте осуществления реакцию смесь перемешивают в течение примерно 4 ч при температуре примерно 20-25°C. Раствор разбавляют водопроводной водой и добавляют толуол. После перемешивания фазы разделяют и нижний водный слой переносят в реактор с инертной атмосферой. Органический слой отбрасывают. Этиловый эфир уксусной кислоты и раствор лимонной кислоты добавляют при интенсивном перемешивании в водный слой. Фазы разделяют и нижний водный слой отбрасывают. Органический слой переносят в реактор с инертной атмосферой. Из органического слоя этиловый эфир уксусной кислоты отгоняют и заменяют свежим этиловым эфиром уксусной кислоты. В одном варианте осуществления эту операцию повторяют до тех пор, пока содержание воды в дистилляте станет не более чем 1% или до достижения постоянной температуры кипения. Настоящую суспензию охлаждают до температуры примерно 20-25°C, соединение 5A выделяют и промывают этиловым эфиром уксусной кислоты центрифугированием в инертной атмосфере. Сушку осуществляют в сушильном барабане в вакууме при температуре примерно 60°C.

Стадия 5.

Стадия 5 представляет собой реакцию E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5) с Pd/C и газообразным водородом, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6). Стадию 5 можно осуществлять в один этап (совместно гидрогенизация и изомеризация) или в два этапа (гидрогенизация с последующей изомеризацией). В одном варианте осуществления стадию 5 проводят при температуре примерно 90-110°C и давлении примерно 4-5 бар. В одном варианте осуществления при выделении продукта реакции органическую фазу реакционной смеси обрабатывают активированным углем. В одном варианте осуществления давление составляет примерно 4,5-5,5 бар. В другом варианте осуществления давление составляет примерно 5 бар. В одном варианте осуществления реакцию смесь гидрогенизации оставляют перемешиваться в течение примерно 1 ч. В одном варианте осуществления реакцию смесь E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5) с Pd/C и газообразным водородом нагревают до температуры примерно 100°C и перемешивают в течение примерно 2-5 ч. В одном варианте осуществления реакцию смесь E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5) с Pd/C и газообразным водородом нагревают до температуры примерно 100°C и перемешивают в течение примерно 3 ч.

В одном варианте осуществления реакцию E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5) с Pd/C и газообразным водородом проводят в присутствии щелочного раствора. В одном варианте осуществления щелочной раствор представляет собой 50 мас.% раствор гидроксида натрия (NaOH; каустическая сода). После реакции гидрогенизации реакцию смесь нагревают до температуры примерно 100°C (для осуществления изомеризации положения C-6 из бета-конфигурации в альфа-конфигурацию) и затем охлаждают до температуры примерно 40-50°C. Для выделения продукта реакции Pd/C отфильтровывают. В одном варианте осуществления к фильтрату добавляют н-бутилацетат и кислоту. В другом варианте осуществления кислота представляет собой соляную кислоту (HCl). Водную фазу отделяют и отбрасывают после проверки величины pH, чтобы убедиться, что она находится в кислотном диапазоне. Органическую фазу, содержащую продукт, обрабатывают активированным углем. В одном варианте осуществления активированный уголь отфильтровывают, полученный фильтрат, содержащий продукт, конденсируют путем перегонки и полученную суспензию охлаждают до температуры примерно 10-30°C. В другом варианте осуществления суспензию охлаждают до температуры примерно 15-20°C. Суспензию, содержащую соединение 6, выделяют и промывают н-бутилацетатом. Соединение 6 фильтруют с использованием нагнетательного фильтра. В одном варианте осуществления сушку производят на нагнетательном фильтре в вакууме при температуре примерно 80°C. В одном варианте осуществления в стадии 5 E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овую кислоту (5), воду, раствор NaOH (например, 50 мас.%) и Pd/C смешивают при давлении примерно 5 бар газообразного H₂ и при температуре примерно 100°C-105°C до прекращения поглощения H₂. Реакционную смесь охлаждают до температуры примерно 40-50°C и Pd/C отфильтровывают. Затем н-бутилацетат и HCl добавляют к раствору, содержащему соединение 6. В одном варианте осуществления водную фазу отделяют и отбрасывают. Органическую фазу, содержащую соединение 6, обрабатывают активированным углем. Уголь отфильтровывают и фильтрат переносят в другой реактор, где его объем уменьшается в результате пере-

гонки, а затем суспензию охлаждают до температуры примерно 5-20°C. В одном варианте осуществления соединение 6 выделяют фильтрованием и фильтрат сушат на нагнетательном фильтре в вакууме при температуре примерно 80°C.

Стадию 5 также можно проводить, начиная с соединения, которое представляет собой смесь E/Z изомеров. Например, стадия 5 представляет собой реакцию E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5A) с Pd/C и газообразным водородом и смесь нагревают, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6). Стадию 5 можно осуществлять в один этап (совместно гидрогенизация и изомеризация) или в два этапа (гидрогенизация с последующей изомеризацией). В одном аспекте стадию 5 проводят при температуре примерно 90-110°C и давлении примерно 4-5 бар. В одном варианте осуществления при выделении продукта реакции органическую фазу реакционной смеси обрабатывают активированным углем. В одном варианте осуществления давление составляет примерно 4,5-5,5 бар. В другом варианте осуществления давление составляет примерно 5 бар. В одном варианте осуществления реакционную смесь гидрогенизации оставляют перемешиваться в течение примерно 1 ч. В одном варианте осуществления реакционную смесь E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5A) с Pd/C и газообразным водородом нагревают до температуры примерно 100°C и перемешивают в течение примерно 2-5 ч. В одном варианте осуществления реакционную смесь E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5A) с Pd/C и газообразным водородом нагревают до температуры примерно 100°C и перемешивают в течение примерно 3 ч.

В одном варианте осуществления реакцию E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5A) с Pd/C и газообразным водородом проводят в присутствии щелочного раствора. В одном варианте осуществления щелочной раствор представляет собой 50 мас.% раствор гидроксида натрия (NaOH; каустическая сода). После реакции гидрогенизации реакционную смесь нагревают до температуры примерно 100°C (для осуществления изомеризации положения C-6 из бета-конфигурации в альфа-конфигурацию) и затем охлаждают до температуры примерно 40-50°C. Для выделения продукта реакции Pd/C отфильтровывают. В одном варианте осуществления к фильтрату добавляют н-бутилацетат и кислоту. В другом варианте осуществления кислота представляет собой соляную кислоту (HCl). Водную фазу отделяют и отбрасывают после проверки величины pH, чтобы убедиться, что она находится в кислотном диапазоне. Органическую фазу, содержащую продукт, обрабатывают активированным углем. В одном варианте осуществления активированный уголь отфильтровывают, полученный фильтрат, содержащий продукт, конденсируют путем перегонки и полученную суспензию охлаждают до температуры примерно 10-30°C. В другом варианте осуществления суспензию охлаждают до температуры примерно 15-20°C. Суспензию, содержащую соединение 6, выделяют и промывают н-бутилацетатом.

Соединение 6 фильтруют с использованием нагнетательного фильтра. В одном варианте осуществления сушку производят на нагнетательном фильтре в вакууме при температуре примерно 80°C. В одном варианте осуществления в стадии 5 E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овую кислоту (5A), воду, раствор NaOH (например, 50 мас.%) и Pd/C смешивают при давлении примерно 5 бар газообразного H₂ и при температуре примерно 100-105°C до прекращения поглощения H₂. Реакционную смесь охлаждают до температуры примерно 40-50°C и Pd/C отфильтровывают. Затем н-бутилацетат и HCl добавляют к раствору, содержащему соединение 6. В одном варианте осуществления водную фазу отделяют и отбрасывают. Органическую фазу, содержащую соединение 6, обрабатывают активированным углем. Уголь отфильтровывают и фильтрат переносят в другой реактор, где его объем уменьшается в результате перегонки, а затем суспензию охлаждают до температуры примерно 5-20°C. В одном варианте осуществления соединение 6 выделяют фильтрованием и фильтрат сушат на нагнетательном фильтре в вакууме при температуре примерно 80°C.

В другом варианте осуществления реакции гидрогенизации/изомеризации, описанные выше, для получения соединения 6 проводят в два этапа (начиная с соединения 5 или соединения 5A). Во-первых, проводят гидрогенизацию при давлении примерно 4-5 бар и затем, во-вторых, реакционную смесь нагревают до температуры примерно 20-40°C. Нагревание реакционной смеси приводит к изомеризации этиловой группы в положение 6 в желаемую альфа-конфигурацию. Реакционную смесь нагревают до завершения изомеризации.

Стадия 6.

Стадия 6 представляет собой реакцию 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (6) с NaBH₄, с образованием кристаллической обетихолево́й кислоты. В одном варианте осуществления стадию 6 проводят при температуре примерно 85-110°C в щелочном водном растворе. В одном варианте осуществления температура составляет примерно 90-95°C. В одном варианте осуществления щелочной водный раствор представляет собой водный раствор NaOH. В одном варианте осуществления щелочной водный раствор представляет собой смесь 50 мас.% раствора NaOH и воды. В одном варианте осуществления реакционную смесь соединения 6 и NaBH₄ перемешивали в течение примерно 3-5 ч. В другом варианте осуществления реакционную смесь перемешивали в течение примерно 4 ч.

Для выделения продукта реакции после завершения реакции смесь охлаждают до температуры примерно 80°C и переносят в охлажденный реактор. В одном варианте осуществления добавляют н-

бутилацетат и кислоту при температуре примерно 20-60°C. В одном варианте осуществления температура составляет примерно 40-45°C. В другом варианте осуществления кислота представляет собой лимонную кислоту. Водную фазу отделяют и отбрасывают после проверки величины pH, чтобы убедиться, что она находится в кислотном диапазоне. Органическую фазу, содержащую продукт, концентрируют перегонкой. В одном варианте осуществления н-бутилацетат добавляют к остатку и вновь отгоняют. В одном варианте осуществления н-бутилацетат вновь добавляют к остатку и затем медленно охлаждают. В другом варианте осуществления затравочный материал добавляют к остатку при температуре примерно 50°C. В другом варианте осуществления после завершения кристаллизации смесь нагревают до 52°C и затем медленно охлаждают до температуры примерно 15-20°C. В другом варианте осуществления остаток охлаждают до температуры примерно 15-20°C. В одном варианте осуществления полученную обетихоловую кислоту промывают н-бутилацетатом. В одном варианте осуществления обетихоловую кислоту выделяют и промывают н-бутилацетатом (например, на нагнетательном фильтре). В другом варианте осуществления нагнетательный фильтр является инертным. Кристаллический продукт сушат в вакууме при температуре примерно 60°C. В одном варианте осуществления полученную кристаллическую обетихоловую кислоту выделяют из органического растворителя (например, гептана). См. пример 3 для получения подробной информации относительно идентификации и характеристики формы С кристаллической обетихоловой кислоты.

Стадия 7.

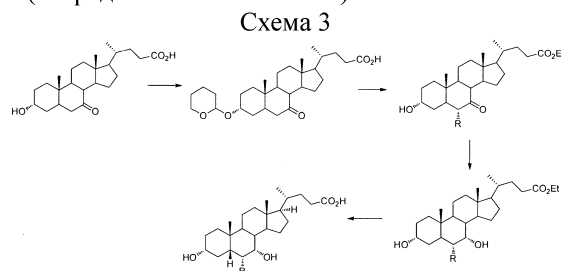
Стадия 7 представляет собой превращение формы С кристаллической обетихоловой кислоты в форму 1 обетихоловой кислоты. В одном варианте осуществления стадия 7 включает стадию растворения формы С кристаллической обетихоловой кислоты в водном растворе NaOH и добавления HCl.

В одном варианте осуществления кристаллическую обетихоловую кислоту растворяют в воде и растворе каустической соды (50 мас.%) при температуре примерно 20-50°C. В одном варианте осуществления температура составляет примерно 30-40°C. В одном варианте осуществления кристаллическая обетихоловая кислота представляет собой форму С. В одном варианте осуществления полученный раствор формы С кристаллической обетихоловой кислоты добавляют к разбавленной кислоте при температуре примерно 20-50°C. В другом варианте осуществления температура составляет примерно 30-40°C. В другом варианте осуществления кислота представляет собой соляную кислоту (например, 37%). В одном варианте осуществления 37% раствор соляной кислоты разбавляют водой до менее чем примерно 1% по объему. В одном варианте осуществления 37% раствор соляной кислоты разбавляют водой до менее чем примерно 0,7% по объему. В одном варианте осуществления суспензию продукта в разбавленной кислоте перемешивают в течение примерно 30 мин при температуре примерно 20-50°C. В другом варианте осуществления температура составляет примерно 30-40°C. В одном варианте осуществления форму 1 обетихоловой кислоты выделяют и промывают водой (например, на нагнетательном фильтре) при температуре НБЧ примерно 20°C. В одном варианте осуществления форму 1 обетихоловой кислоты выделяют и промывают водой (например, на нагнетательном фильтре) при температуре НБЧ примерно 20°C. В другом варианте осуществления нагнетательный фильтр является инертным. Продукт сушат на нагнетательном фильтре в вакууме при температуре НБЧ примерно 50°C.

В способе по настоящей заявке используют кристаллическое промежуточное соединение для получения формы 1 обетихоловой кислоты, что неожиданно приводит к значительному улучшению препарата в целом и чистоты конечного продукта. В частности, в стадии 6 синтеза получают новую кристаллическую форму обетихоловой кислоты. Получение этой кристаллической формы приводит к получению практически чистой формы 1 обетихоловой кислоты.

Способ по настоящей заявке является усовершенствованным по сравнению со способами предшествующего уровня техники. Получение обетихоловой кислоты описано в патентной публикации США № 2009/0062526 A1 (называемой в настоящем документе "публикация 526"), патенте США № 7138390 (называемом в настоящем документе "патент 390") и WO 2006/122977 (называемой в настоящем документе "заявка 977").

Способ получения обетихоловой кислоты в патенте 390 (называемый в настоящем документе способ "390") изображен на схеме 3 (R представляет собой этил):

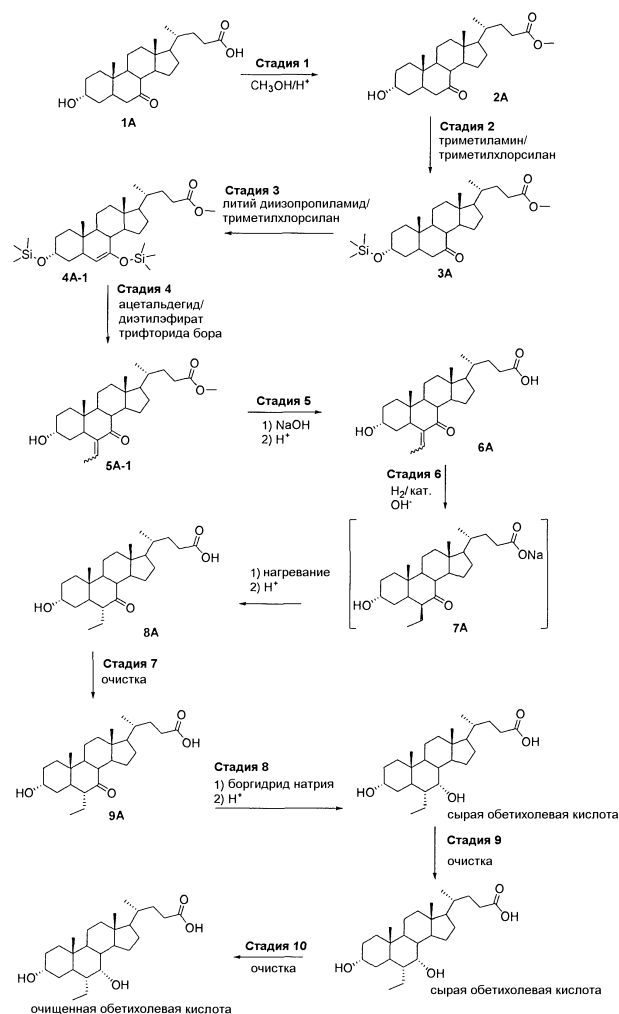


При том, что данный способ включает несколько стадий, он имеет ряд недостатков. Во всех стадиях продукты реакции очищают на хроматографической колонке, то есть, очень дорогим методом разделения, который не может быть использован в промышленных масштабах. Кроме того, выход реакции на

стадии 2 является крайне низким (12-13%), при этом сильно снижается общий выход, который составляет менее 3,5%. В данном способе также используют гексаметиленфосфоами́д в качестве реагента, который известен как канцероген.

Способ получения обетихоловой кислоты в заявке 977 изображен на схеме 4.

Схема 4



Способ "977" получения обетихоловой кислоты является 8-стадийным процессом синтеза, который включает одну стадию очистки (стадия 7), с последующими 2 дополнительными стадиями очистки. Есть значительное количество различий между способом "977" и способом по настоящей заявке. В табл. А ниже приведены по меньшей мере некоторые из различий между двумя способами.

Таблица А. Различия между способом "977" и способом по настоящей заявке

Стадия синтеза	Изменения		Преимущества изменения
	Способ « 977»	Способ по заявке	
Стадия 1	Метансульфоновая кислота	Серная кислота	Масштаб и безопасность (мезилат)
	30% раствор аммиака (водный)	NaOH (водный)	Увеличение масштаба
	Без очистки/обработки	Использование обработки активированным углем	Улучшение чистоты/цвета
Стадия 2 (способа по заявке сочетает стадии 2 и 3 способа «977»)	Триэтиламин	Литий диизопропиламид (ЛДА)	ЛДА является подходящим альтернативным реагентом для этой стадии
	Толуол	Тетрагидрофуран (ТГФ)	ТГФ является подходящим альтернативным реагентом для этой стадии
	Нет гашения кислотой	Гашение в раствор лимонной кислоты	Увеличение масштаба
Стадия 3 способа по	Диэтилэфират трифторида бора	Ацетонитрильный комплекс	Проблемы безопасности

заявке такая же, как стадия 4 способа «977»		трифторида бора	при обращении с эфиром (опасность взрыва эфира)
Стадия 4 (способа по заявке такая же, как стадия 5 способа «977»)	Толуол	Метанол	Безопасность (толуол) ; шкала
	Гашение фосфорной кислотой (водной)	Гашение лимонной кислотой (водной)	Увеличение масштаба
	Без очистки/обработки	Стадия кристаллизации является частью выделения продукта реакции	Улучшение чистоты
Стадия 5 (способа по заявке сочетает стадии 6 и 7 способа «977»)	Гашение фосфорной кислотой (водной)	Гашение соляной кислотой (водной)	Увеличение масштаба
	Без очистки/обработки	Использование обработкой активированным углем	Улучшение чистоты/цвета
	Очистку осуществляют как стадию 7	Стадия кристаллизации является частью выделения продукта реакции	Увеличение масштаба
Стадия 6 (способа по заявке сочетает стадии 8 и 9 способа «977»)	Дихлорметан	н-бутилацетат	Безопасность (дихлорметан)
	Гашение фосфорной кислотой (водной)	Гашение лимонной кислотой (водной)	Увеличение масштаба
	Очистку осуществляют как стадию 9 -	Стадия кристаллизации является частью	Масштаб и безопасность (дихлорметан)
	используя дихлорметан/этилацетат	выделения продукта реакции - с использованием н-бутилацетата	
Стадия 7 (способа по заявке такая же, как стадия 10 способа «977»)	Раствор аммиака	Раствор NaOH	Увеличение масштаба
	Гашение фосфорной кислотой (водной)	Гашение соляной кислотой (водной)	Увеличение масштаба

Отличия способа по настоящей заявке от способа "977" заключаются в значительном усовершенствовании способа, включая усовершенствования, относящиеся к оптимизации масштабирования, безопасности, а также чистоте и процессу в целом. Обетихоловая кислота, полученная способом по настоящей заявке, является практически чистой. В частности, обетихоловая кислота, полученная способом по настоящей заявке, является в значительной степени более чистой, чем обетихоловая кислота, полученная способами предшествующего уровня техники, включая способ "390" и способ "977". Например, сравнение результатов, представленных в сертификате анализа обетихоловой кислоты, полученной способом по настоящей заявке, и обетихоловой кислоты, полученной способом "977", приведено в табл. В ниже. Процентную долю примесей определяли методом ВЭЖХ.

Таблица В. Сравнение примесей в обетихоловой кислоте, полученной способом по заявке и способом "977"

Параметр	Предел спецификации	Способ по заявке	Способ «977»
Вода (КФ)	НВЧ 4,5%	1,0%	2,1%
Примесь 1 и Примесь 4	НВЧ 0,15%	<0,05%	<0,05%
Примесь 2	НВЧ 0,15%	<0,05%	<0,1%
Примесь 3	НВЧ 0,15%	<0,05%	<0,1%
Примесь 5	НВЧ 3,0%	0,2%	1,0%
Примесь 6	НВЧ 0,15%	<0,05%	<0,05%

Примесь 1 представляет собой 6-этилурсодезоксихоловую кислоту.

Примесь 2 представляет собой 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овую кислоту.

Примесь 3 представляет собой 6 β -этилхенодезоксихоловую кислоту.

Примесь 4 представляет собой 3 α ,7 α -дигидрокси-6-этилиден-5 β -холан-24-овую кислоту.

Примесь 5 представляет собой хенодезоксихоловую кислоту.

Примесь 6 представляет собой 3 α (3 α ,7 α -дигидрокси-6 α -этил-5 β -холан-24-оилокси)-7 α -гидрокси-6 α -этил-5 β -холан-24-овую кислоту (димер 6ECDCA). НВЧ означает "не более чем".

В спецификации грамматическая форма единственного числа также включает множественное число, если из контекста явно не следует иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится данное изобретение. В случае конфликта настоящая спецификация будет иметь преимущественную силу.

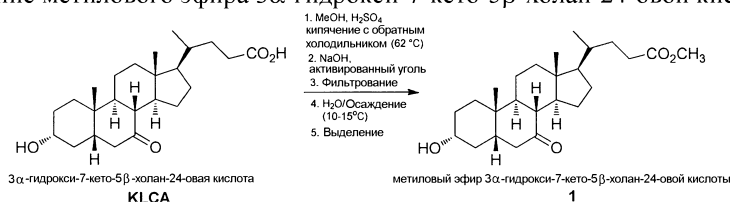
Если не указано иное, все процентные доли и соотношения, используемые в настоящем документе, приведены по массе.

Примеры

Пример 1. Синтез обетихоловой кислоты

Номера соединений, на которые даются ссылки в методике синтеза, соответствуют номерам на схеме 1 и в реакции, соответствующей каждой из стадий.

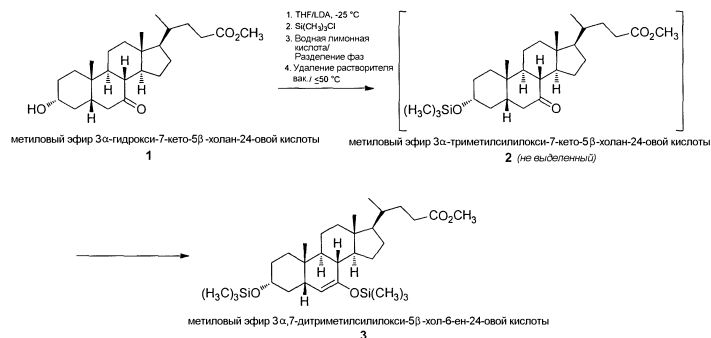
Стадия 1: Получение метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (1)



Реакция 1: Этерификация C-24 карбоновой кислоты 7-кетолитохолевой кислоты (KLCA)

3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овую кислоту (KLCA; 500,0 г, 1,28 моль) этерифицировали с использованием метилового спирта (2500 мл) в присутствии кислотного катализатора (серная кислота, 1,0 мл) и нагревали до температуры 62-64°C в течение примерно 3 ч, получая метилловый эфир 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (1). В этой реакции метилловый спирт действует как метилирующий реагент, а также как растворитель реакционной смеси. Для выделения продукта реакции значение pH доводили раствором гидроксида натрия (2Н) до pH 7,0-7,5. Раствор обрабатывали активированным углем (25 г) в течение примерно 30 мин и фильтровали для удаления твердых частиц угля. Альтернативно, раствор не обрабатывали активированным углем. Для осаждения продукта добавляли воду (625 мл) при температуре 10-15°C в течение 15 мин и добавляли затравочный материал. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при температуре 10-15°C. Другую порцию воды (1875 мл) добавляли в течение примерно 20-25 мин. Суспензию продукта перемешивали в течение 30 мин при температуре 10-15°C. Продукт выделяли центрифугированием и промывали смесью метанола и воды (1:1, 350 мл). Содержание воды во влажном материале количественно определяли по методу Карла Фишера (КФ). Материал сушили в сушильном барабане в вакууме при температуре НВЧ 70°C. Материал также можно использовать в следующей стадии без высушивания. Выход (в расчете на сухой продукт) составлял 501,4 г (1,24 моль, 96,8%).

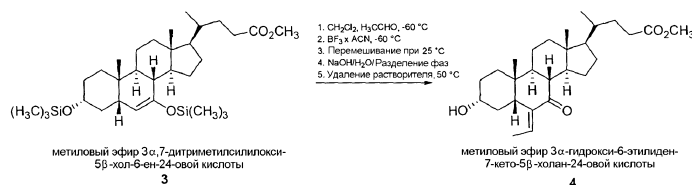
Стадия 2: Получение метилового эфира 3 α ,7 α -дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты (3)



Реакция 2: Образование силиленольного эфира из метилового эфира 7-кетолитохолевой кислоты

Соединение 1 (60,69 г, 150 ммоль в расчете на сухое вещество), содержащее остаточные количества воды и метанола, загружали в реактор в инертных условиях и растворяли в тетрагидрофуране (ТГФ, 363 мл). Воду и метанол удаляли повторной азеотропной перегонкой при температуре примерно 65°C и нормальном давлении. ТГФ добавляли к осадку по мере необходимости и перегонку повторяли примерно 4 раза. Остаточный раствор должен иметь конечное содержание воды ≤0,05% (титрование методом Карла Фишера). Этот раствор предварительно охлаждали до температуры от -20 до -25°C и затем добавляли хлортриметилсилан (73,33 г, 675 ммоль, 4,5 экв.) через примерно 30-45 мин. В атмосфере азота литий диизопропиламид (28% раствор ЛДА, 900 ммоль) и ТГФ (504 мл) загружали в отдельный реактор в инертных условиях и охлаждали до температуры от -20 до -25°C. Сухой охлажденный раствор соединения 1, ТГФ (84 мл) и хлортриметилсилан загружали в раствор ЛДА при температуре от -20 до -25°C. Затем реакционную смесь перемешивали в течение примерно 2 ч. Для выделения продукта реакции реакционную смесь добавляли к предварительно охлажденному водному раствору лимонной кислоты (34,6 г в 300 мл) при температуре 2-8°C. После добавления водную фазу отделяли и отбрасывали. Из органической фазы жидкость удаляли вакуумной перегонкой при максимальной температуре 50°C. Выделенный остаток содержал соединение 3 и некоторое остаточное количество растворителей и был использован "как есть" в следующей стадии.

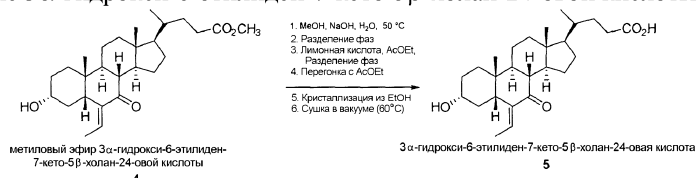
Стадия 3: Получение метилового эфира 3α-гидрокси-6-этилиден-7-кето-5β-холан-24-овой кислоты (4)



Реакция 3: Альдольная конденсация силиленольного эфира и ацетальдегида

Раствор соединения 3 (164,68 г, 300 ммоль в расчете на сухое вещество) в ТГФ загружали в реактор в инертных условиях. При максимальной температуре 50°C остаточные количества ТГФ отгоняли в вакууме. Для продолжения, содержание воды в остатке было ограничено до ≤0,5% (титрование методом Карла Фишера). Затем остаток растворяли в дихлорметане (200 мл) и предварительно охлаждали до температуры от -60 до -65°C. Затем добавляли ацетальдегид (33,8 мл, 600 ммоль). В атмосфере азота дихлорметан (700 мл) и ацетонитрильный комплекс трифторида бора (16 мас.% раствор в ацетонитриле, 318 г, 750 ммоль) загружали в отдельный реактор и затем охлаждали до температуры от -60 до -65°C. При температуре от -60 до -65°C добавляли сухой раствор соединения 3. Реакционную смесь перемешивали в течение примерно 2 ч при температуре от -60 до -65°C, нагревали до температуры 23-28°C, перемешивали еще в течение примерно 3 ч и охлаждали до температуры примерно 2-10°C для гидролиза/выделения продукта реакции. Для выделения продукта реакции охлажденный раствор из реактора добавляли к предварительно охлажденному 50 мас.% водному раствору каустической соды (40 мл) и 660 мл воды. После примерно 10 мин интенсивного перемешивания проводили разделение фаз и (нижний) органический слой переносили в отдельный реактор. Из органического слоя растворитель отгоняли при температуре НБЧ 50°C насколько возможно. Остаток, состоящий из соединения 4 и некоторого остаточного количества ацетонитрила и дихлорметана, переносили в барабаны. Соединение 4А, смесь из E/Z-изомеров, также можно получать способом, описанным выше для стадии 3.

Стадия 4: Получение 3α-гидрокси-6-этилиден-7-кето-5β-холан-24-овой кислоты (5)



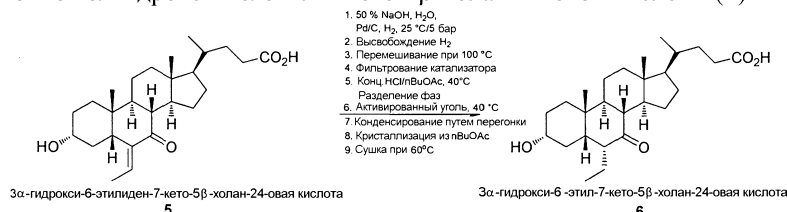
Реакция 4: Сапонификация С-24 эфира

Соединение 4 (258,37 г, 600 ммоль в расчете на сухое вещество) загружали в реактор в инертных условиях. При температуре НБЧ 50°C остаточные количества растворителя отгоняли в вакууме. Остаток растворяли в метаноле (360 мл) и добавляли воду (54 мл) и 50 мас.% раствор каустической соды (54 мл). Реакционную смесь нагревали до температуры 49-53°C и перемешивали при этой температуре в течение по меньшей мере 2 ч. Значение pH реакционной смеси проверяли, чтобы убедиться, что оно >12. Если pH <12, дополнительно добавляли NaOH и повторяли реакцию в течение еще 2 ч. Раствор разбавляли водой (1000 мл) и температуру доводили до 25-35°C. Для выделения продукта реакции реакционной смеси давали отстояться в течение по меньшей мере 30 мин. Проводили разделение фаз, нижний водный слой переносили в отдельный реактор и органический слой отбрасывали. Этилацетат (1400 мл) и водный раствор лимонной кислоты (244 г в 480 мл) добавляли при интенсивном перемешивании к водному слою. Реакционную смесь перемешивали при температуре 25-35°C в течение 10 мин. Проводили разделение фаз и нижний водный слой отбрасывали. Этилацетат отгоняли из органического слоя и заменяли свежим этилацетатом (800 мл). Эту операцию повторяли до тех пор, пока содержание воды дистиллята не составляло НБЧ 1% или до достижения постоянной температуры кипения. Суспензию охлаждали до температуры 20-25°C, перемешивали в течение 30 мин и затем продукт выделяли и промывали этилацетатом (100 мл, 3-4 раза). Сушку осуществляли в сушильном барабане в вакууме при температуре примерно 60°C. Выход составлял 118,71 г (47,5% от KLCA) сырого соединения 5. Соединение 4А, смесь E/Z изомеров, также можно использовать в качестве исходного материала для получения соединения 5А, смеси E/Z изомеров.

Сырое соединение 5 затем кристаллизовали с использованием этанола. Сырое соединение для кристаллизации может быть также смесью E/Z изомеров, соединением 5А. Этанол (390-520 мл) и сырое соединение 5 (130 г) загружали в реактор в инертных условиях. Для растворения сырого соединения 5 реакционную смесь нагревали при кипячении с обратным холодильником. Затем реакционную смесь охлаждали в контролируемом диапазоне температур охлаждения до 15-20°C в течение 3-5 ч с линейным профилем. Кристаллическое соединение 5А выделяли центрифугированием и затем промывали этилацетатом (50-100 мл, 2 раза). Сушку осуществляли в сушильном барабане в вакууме при температуре примерно 60°C. Полученный выход составлял 85,8 г (66%). Отбирали образец для проведения анализа, измерения чистоты и содержания влаги в очищенном соединении 5. Очищенное соединение 5 представляло собой E изомер 3α-гидрокси-6-этилиден-7-кето-5β-холан-24-овой кислоты. См. пример 2 для получения подробной информации относительно идентификации и характеристики очищенного соединения 5. Выделение очищенного соединения 5, E изомера, может быть необязательным. E и Z изомеры имеют разную растворимость. E изомер менее растворим и кристаллизуется, так что Z изомер может быть удален промыванием.

Альтернативная методика получения соединения 5 заключается в следующем. Соединение 4 (111,96 г) загружали в реактор в инертных условиях. При максимальной температуре 50°C остаточные количества растворителя (например, ацетонитрила, дихлорметана) отгоняли в вакууме. Осадок растворяли в метаноле (156 мл) и охлаждали до температуры примерно 10°C. Добавляли водопроводную воду (23,4 мл) и каустическую соду (23,4 мл) в концентрации 50%. Реакционную смесь перемешивали в течение примерно 4 ч при температуре примерно 20-25°C. Раствор разбавляли водопроводной водой (433 мл) и добавляли толуол (144 мл). После перемешивания проводили разделение фаз и нижний водный слой переносили в реактор в инертных условиях. Органический слой отбрасывали. Этиловый эфир уксусной кислоты (607 мл) и раствор лимонной кислоты (105,7 г в 208 мл воды) добавляли при интенсивном перемешивании к водному слою. Проводили разделение фаз и нижний водный слой отбрасывали. Органический слой переносили в реактор в инертных условиях. Из органического слоя этиловый эфир уксусной кислоты отгоняли и заменяли свежим этиловым эфиром уксусной кислоты (347 мл). В одном варианте осуществления эту процедуру повторяли с этиловым эфиром уксусной кислоты (173 мл), пока содержание воды в дистилляте становилось не более чем 1% или до достижения постоянной температуры кипения. Настоящую суспензию охлаждали до температуры 20-25°C. Соединение 5 выделяли и промывали этиловым эфиром уксусной кислоты (3-4 раза по 43 мл) путем центрифугирования в инертных условиях. Сушку осуществляли в сушильном барабане в вакууме при температуре примерно 60°C (выход 64,8% в расчете на соединение 1). Соединение 4А (смесь E/Z изомеров) также можно использовать в качестве исходного материала в стадии 4 для получения соединения 5А (смесь E/Z изомеров).

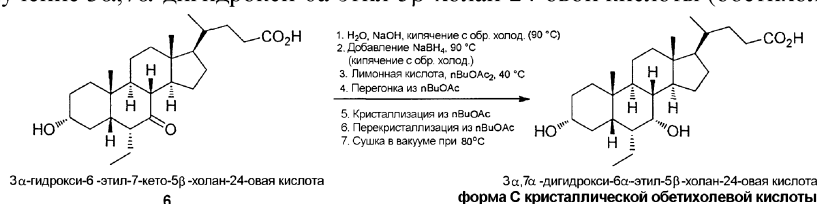
Стадия 5: Получение 3α-гидрокси-6α-этил-7-кето-5β-холан-24-овой кислоты (6)



Реакция 5: Гидрогенизация 6-этилиденового фрагмента

Смесь очищенного соединения 5 (110 г, 264 ммоль), воды (1100 мл), 50% раствора каустической соды (35,8 мл, 682 ммоль) и палладиевого катализатора (Pd/C, 11 г) загружали в реактор для гидрогенизации. Температуру доводили до 25-35°C и реактор продували три раза азотом (2 бар) и три раза водородом (1 бар). Эти значения давления приведены относительно давления окружающей среды (=0 бар). Попадали водород под давлением 5 бар и реакционную смесь нагревали до 100°C (для изомеризации в альфа-положение) в течение 1,5 ч и затем перемешивали в течение 3 ч, поддерживая давление водорода на уровне 4,5-5 бар. Затем реакционную смесь охлаждали до температуры 40-50°C. Для выделения продукта реакции Pd/C отфильтровывали. К фильтрату добавляли н-бутилацетат (1320 мл) и соляную кислоту (67,8 мл, 815 ммоль, 37%). Водную фазу отделяли и отбрасывали. Органическую фазу обрабатывали активированным углем (5,5 г) в течение примерно 10 мин при температуре 40-50°C. Активированный уголь отфильтровывали, фильтрат конденсировали путем перегонки и полученную суспензию охлаждали до температуры 15°C-20°C в течение 2-3 ч. Осажденное соединение 6 выделяли и промывали н-бутилацетатом (160 мл). Продукт фильтровали с использованием нагнетательного фильтра. Сушку производили на нагнетательном фильтре в вакууме при температуре примерно 60°C. В результате получали 89,8 г (81,2%) соединения 6. Соединение 5A, смесь E/Z изомеров, можно использовать в стадии 5 для получения соединения 6.

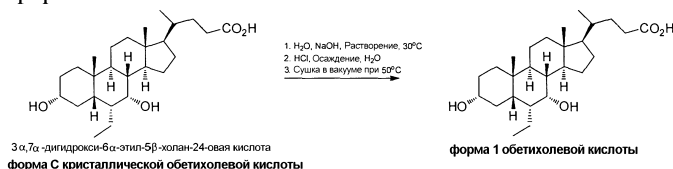
Стадия 6: Получение 3 α ,7 α -дигидрокси-6 α -этил-5 β -холан-24-овой кислоты (обетихоловой кислоты)



Реакция 6: Избирательное восстановление 7-кетогруппы в 7 α -гидроксильную группу

Проводили реакцию смеси соединения 6 (86 г, 205,4 ммоль), воды (688 мл) и 50% раствора гидроксида натрия (56,4 мл) с борогидридом натрия (7,77 г, 205,4 ммоль) в смеси из 50 мас. % раствора гидроксида натрия (1,5 мл) и воды (20 мл) при температуре 90-105°C. Реакционную смесь нагревали при кипячении с обратным холодильником и перемешивали в течение по меньшей мере 3 ч. Для выделения продукта реакции после завершения реакции реакционную смесь охлаждали до температуры примерно 80°C и переносили в охлажденный реактор. При температуре 30-50°C добавляли н-бутилацетат (860 мл) и лимонную кислоту (320,2 г, безводную) в воде (491 мл). Водную фазу отделяли и отбрасывали после проверки величины pH, чтобы убедиться, что она находится в кислотном диапазоне. Органическую фазу переносили и перегоняли. Остаток разбавляли н-бутилацетатом, медленно охлаждали до температуры 15-20°C и сырую обетихоловую кислоту фильтровали путем центрифугирования. Влажный продукт кристаллизовали из н-бутилацетата. Продукт обетихоловую кислоту выделяли и промывали н-бутилацетатом (43 мл, 4 раза) на нагнетательном фильтре в инертных условиях. Сушку производили на нагнетательном фильтре в вакууме при температуре примерно 80°C. В результате получали 67,34 г (77,9%) кристаллической обетихоловой кислоты. См. пример 3 для получения подробной информации относительно идентификации и характеристики кристаллической обетихоловой кислоты.

Стадия 7: Получение формы 1 обетихоловой кислоты



Реакция 7: Получение формы 1 обетихоловой кислоты из формы С кристаллической обетихоловой кислоты

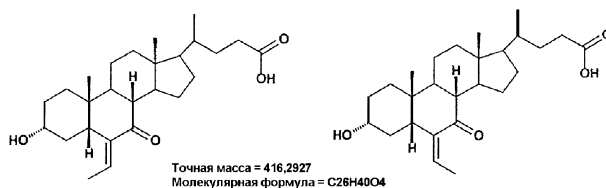
Форму С кристаллической обетихоловой кислоты (58 г) растворяли в воде (870 мл) и растворе каустической соды (50%, 8,7 мл, 166 ммоль) при температуре 30-40°C. Смесь перемешивали до полного растворения твердого вещества. Продукт осаждали с использованием следующих процедур. Раствор обетихоловой кислоты медленно добавляли через фильтр в разбавленную соляную кислоту (37%, 16,05 мл, 193 ммоль) в воде (870 мл) при температуре 30-40°C. Суспензию перемешивали в течение примерно 30 мин при температуре 30-40°C и затем охлаждали до температуры не более чем (НБЧ) 20°C. Продукт выделяли и промывали водой (465 мл, 6 раз) на нагнетательном фильтре в инертных условиях. Сушку производили на нагнетательном фильтре в вакууме при температуре НБЧ 50°C. В результате получали 53,2 г (91,7%) формы 1 обетихоловой кислоты.

Пример 2. Характеризация Е-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты (5)

Соединение 5 является ключевым промежуточным соединением для способа по данной заявке. Соединение выделяли из этилацетата и затем кристаллизовали из этанола. Соединение 5 высокой чистоты

позволяет эффективно и с высоким выходом получать соединение 6 и затем форму С кристаллической обетихоловой кислоты и форму 1 обетихоловой кислоты, включая практически чистую обетихоловую кислоту.

Структуру соединения 5 из стадии 4 примера 1 подтверждали методами ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР и масс-спектрометрии. При анализе сырого продукта из стадии 4 получали основной продукт со временем удержания (RT) 27,457 мин и побочный продукт с RT 28,078 мин на УФ-хроматограмме, полученной методом 1 контроля качества с использованием сочетания ЖХ/МС. Два продукта являлись E/Z изомерами соединения 5



Эти два изомера демонстрировали одинаковую точную массу и одинаковую фрагментацию на МС/МС-спектре. Их невозможно различать на основании данных масс-спектрометрии.

С помощью полупрепаративного метода выделения пиков изомеров E/Z подтверждали структуры E/Z изомеров, используя двухэтапный подход. В методе 1 контроля качества с помощью ВЭЖХ был использован нелетучий фосфорно-кислотный буфер и, таким образом, прямое сочетание ЖХ/МС с нелетучим буфером было невозможно. Предварительные тесты для корректировки метода показали, что только метод СЭЖХ (UPLC) позволял получать очень высокое число тарелок для адекватного разделения E/Z изомеров. Двухэтапный подход заключался в следующем: этап А представлял собой идентификацию E/Z изомеров в двух образцах новым разработанным методом СЭЖХ/МС и этап В представлял собой выделение фракции пиков E/Z изомеров методом 2 ВЭЖХ и последующую идентификацию методом 1 СЭЖХ/МС. Технические детали методов были следующими:

Таблица С

1. Совместимый с МС метод СЭЖХ (метод 1)	
Прибор:	Accela UPL совмещенный с LTQ FTSpectrometer (ThermoScientific)
Колонка:	200×2 мм Hypersil Gold 1,9 мкм
Элюент:	А: вода + 10 мМ формиат аммония + 0,1% муравьиная кислота В: ацетонитрил
Градиент:	45% В за 20 минут до 60% В (10 мин изократический)
Поток:	0,4 мл/мин, температура колонки 40°C
Детекция:	МС: положительные и отрицательные ионы при ИЭР (ESI); УФ: ФДМ (PDA) 200,600 нм
Разрешение по массе:	R=100000 ИЦР (ICR)
Образец:	1 мг/мл в смеси вода/ацетонитрил (1:1), 3 мкл/20 мкл введенного объема
2. ВЭЖХ (метод 2)	
Прибор:	Agilent1100 HPLC (Agilent Technologies)
Колонка:	125×4 мм Purospher STAR C18 5 Lm
Элюент:	А: вода pH 2,6 с фосфорной кислотой В: ацетонитрил
Градиент:	30 % В за 10 минут до 35% В за 30 минут до 60% В за 1 минуту до 90% В (9 мин изократический)
Поток:	1 мл/мин, температура колонки 35°C
Детекция:	УФ: ДМД (DAD) 200-400 нм (УФА 200 нм)
Образец:	10 мг/мл в смеси вода/ацетонитрил (9:1), 25 мкл введенный объем

Результаты приведены на фиг. 1 и 2. Фиг. 1 и 2 представляют собой хроматограммы СЭЖХ УФ/МС для "сырого соединения 5" (фиг. 1) и соединения 5 "очищенного эталона" (фиг. 2), полученные на высокоэффективной колонке для СЭЖХ. В случае фиг. 1 образец растворяли в концентрации 1 мг/мл в ACN/H₂O 1:1; 200×2 мм Hypersil GOLD R122; LMA:H₂O + 10 мМ AF + 0,1% HFO; LMB:ACN; 45%-20-60%(10); 0,4 мл/мин; 40°C; УФА=200 нм; объем впрыска 3 мкл. В случае фиг. 2 образец растворяли в концентрации 1 мг/мл в ACN/H₂O; 200×2 мм Hypersil GOLD R122; А: 10 мМ AF + 0,1% HFO; В:ACN;

45%-20-60%B(10); 0,4 мл/мин; объем впрыска 20 мкл. В обоих образцах молекулярная масса основного компонента (RT 9,92 мин) и побочного компонента (RT 10,77 мин) была такой же, как и ожидалось, и точные массы двух соединений согласовались со структурами, предложенными в приведенных ниже таблицах D и E данных измерений положительных и отрицательных ионов:

Таблица D. Данные измерений положительных ионов

RT (мин)	Ион	Формула	Предположительная структура
9,98	417,30008	$C_{26}H_{11}O_4$	M+H E Изомер
		$\Delta M \ 0,35 \text{ ч/млн}$	
	833,59381	$C_{52}H_{81}O_8$	2M+H E Изомер
		$\Delta M \ 1,45 \text{ ч/млн}$	
	850,61938	$C_{52}H_{84}O_8N$	2M + NH ₄ E Изомер
		$\Delta M \ 0,28 \text{ ч/млн}$	
10,77	417,30023	$C_{26}H_{11}O_4$	M+H Z Изомер
	833,59409	$C_{52}H_{81}O_8$	2M +H Z Изомер
	850,61984	$C_{52}H_{84}O_8N$	2M + NH ₄ Z Изомер

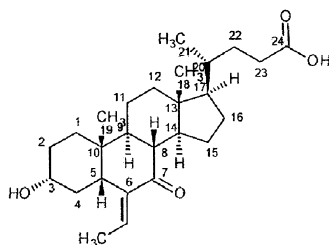
Таблица E. Данные измерений отрицательных ионов

RT (мин)	Ион	Формула	Предположительная структура
9,98	415,28520	$C_{26}H_{39}O_4$	M-H Z Изомер
		$\Delta M \ -0,44 \text{ ч/млн}$	
	461,29051	$C_{27}H_{41}O_6$	M + Формиат Z Изомер
		$\Delta M \ -0,76 \text{ ч/млн}$	
	831,57683	$C_{52}H_{79}O_8$	2M - H Z Изомер
		$\Delta M \ -1,46 \text{ ч/млн}$	
10,77	415,28545	$C_{26}H_{39}O_4$	M-H E Изомер
	461,29069	$C_{27}H_{41}O_6$	M + Формиат E Изомер
	831,57739	$C_{52}H_{79}O_8$	2M - H E Изомер

Для обеспечения преимущества метода 2 контроля качества с помощью ВЭЖХ, первоначальное разделение повторяли точно в соответствии с установленными условиями. Основной пик и побочный пик выделяли в полупрепаративных количествах. Полученная УФ-хроматограмма с отмеченными позициями уловленных фракций приведена на фиг. 3. Фиг. 3 представляет собой УФ-хроматограмму сырого соединения 5 при использовании метода 2 ВЭЖХ; 125×4 мм Purospher STAR C18 5 мкм AG; LMA:H₂O pH 2,6 с H₃PO₄; LMB:ACN; 30%B-10-35%-30-60%-1-90%(9); 1 мл/мин; 35°C; УФА = 200 нм; без MC; 25 мл. В дальнейшем выделенные фракции отдельно анализировали новым разработанным методом СЭЖХ/МС. Для оценки использовали точную регистрацию ионов квазимолекулярного иона [2M+NH₄] при 850,6191 ± 3 ч/млн. Полученные хроматограммы фракции основного пика, фракции побочного пика и двух образцов приведены на фиг. 4 (A-D). Изучение МС показало, что два пика, полученные методом 2 контроля качества при RT 27,457 мин и при RT 28,078 мин, соответствуют двум изомерам с формулой C₂₆H₄₀O₄. Эта формула соответствует структуре, предложенной для E/Z изомеров. Таким образом, разработка метода СЭЖХ-МС показала, что E/Z изомеры 3α-гидроксиэтилиден-7-кето-5β-холевой-24 кислоты можно разделять хроматографически с высоким разрешением. Точные МС данные, полученные на масс-спектрометре ПФ-ИЦР (FR-ICR), согласуются со структурой, предложенной для E/Z изомеров. Для обоих изомеров была выведена одна и та же формула C₂₆H₄₀O₄.

В результате полупрепаративного выделения пиков E/Z изомеров методом 2 ВЭЖХ и последующей идентификации методом СЭЖХ-МС авторы изобретения смогли показать, что два пика, полученные методом 2 контроля качества (RT 27,457 минут и RT 28,078 мин, см. фиг. 1), соответствуют двум изомерам с формулой C₂₆H₄₀O₄. Эта формула согласуется со структурой, предложенной для E/Z изомеров. В сочетании с результатами ЯМР, приведенными ниже, это привело к следующим выводам: пик с RT 27,457 минут соответствует E-изомеру и пик с RT 28,078 мин соответствует Z-изомеру.

Отнесение ¹H и ¹³C сдвигов для E изомера 3α-гидрокси-этилиден-7-кето-5β-холевой-24 кислоты приведены ниже. Сдвиги были оценены в соответствии с "L. Bettarello et al., II Farmaco 55 (2000), 51-55 (вещество 3α-гидрокси-7-кето-5β-холан-24-овая кислота)".

Таблица F. Отнесение ^1H сдвига (^1H ЯМР, 500 МГц, 303К, CD_3OD)

Химический сдвиг [ч/млн]	Интенсивность [H]	Множественность	Отнесение
6,10	1	Q	25
3,61	1	M	3
2,69	1	DD	5
2,28	2	DT	23
1,72	3	D	26
1,05	3	S	19
0,99	3	D	21
0,70	3	S	18

Таблица G. Отнесение ^{13}C сдвига (^{13}C ЯМР, 125 МГц, 303К, CD_3OD)

Химический сдвиг [ч/млн]	Множественность	Отнесение
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 и 50,1	D каждый	8 и 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 и 32,0	T каждый	22 и 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

S = синглет

D = дублет

T = триплет

Q = квартет

M = мультиплет

DD = дублет дублетов

DT = дублет триплетов

Пример 3. Характеризация формы С кристаллической обетихолевой кислоты

Полная характеристика твердотельного продукта из стадии 6 схемы 1 и примера 1 показала, что обетихолева кислота является кристаллической. Эта кристаллическая форма была названа формой С. Ниже приведена таблица сводных характеристик формы С кристаллической обетихолевой кислоты.

Таблица G. Сводные характеристики формы С кристаллической обетихолевой кислоты

Метод	Форма С кристаллической обетихолевой кислоты
Внешний вид	Белый порошок
ЯМР	Соответствует прилагаемой структуре примерно 3,5% по массе гептана
ПРД	Кристаллическая
ТГА	Уменьшение массы от RT до 85°C (0,4%) и 85-115°C (4,1%)
ДСК	Эндотерма с началом при 97,9°C
ГСП	Слегка гигроскопичная, 1,2% поглощение воды при 90% RH
Определение содержания воды методом Карла Фишера	1,5% по массе
Стабильность при 40°C/75% RH	Никаких изменений формы или кристалличности

Термоанализ

Данные ДСК (дифференциальной сканирующей калориметрии) получали на приборе Mettler DSC 823e, оснащённом 34-позиционным автодозатором. Прибор был откалиброван по энергии и температуре с использованием сертифицированного индия. Как правило, 0,5-1 мг каждого образца в алюминиевой кювете с точечными отверстиями нагревали со скоростью 10°C·мин⁻¹ от 25 до 350°C. Образец постоянно продували азотом со скоростью 50 мл·мин⁻¹. Программу STARe v 9.20 использовали для управления прибором и анализа данных.

Данные ТГА (термогравиметрического анализа) получали на приборе Mettler TGA/SDTA 851e, оснащённом 34-позиционным автодозатором. Прибор был откалиброван по температуре с использованием сертифицированного индия. Как правило, 5-10 мг

каждого образца помещали в предварительно взвешенный алюминиевый тигель и нагревали со скоростью 10°C·мин⁻¹ от температуры окружающей среды до 300°C. Образец постоянно продували азотом со скоростью 50 мл·мин⁻¹. Программу STARe v 9.20 использовали для управления прибором и анализа данных.

При использовании метода ТГА для формы С кристаллической обетихолевой кислоты наблюдали два этапа уменьшения массы. Первый имел место в промежутке между комнатной температурой (RT) и 85°C (0,41%) и второй происходил при 85-115°C (4,10%). Первый этап уменьшения массы можно отнести к потере воды, при этом второй этап связан с потерей остаточной воды (на воду приходится примерно 1,2% уменьшения массы) и потерей связанного гептана (примерно 3,4% уменьшения массы). Форма С кристаллической обетихолевой кислоты содержала от 0,15 до 0,2 моль растворителя (гептана) и примерно 1,5 мас.% (0,3 моль). Термограмма ДСК формы С кристаллической обетихолевой кислоты содержала одну эндотерму. Она была довольно острой и начиналась примерно при 98°C. См. фиг. 6. Различные растворители будут иметь разные температуры кипения и, таким образом, будут испаряться при различных температурах при проведении ДСК и ТГА экспериментов.

Анализ методом порошковой рентгеновской дифракции (ПРД) Bruker AXS C2 GADDS

Дифракционные картины порошковой рентгеновской дифракции получали на дифрактометре Bruker AXS C2 GADDS с использованием Cu K α излучения (40 кВ, 40 мА), автоматической XYZ платформы, лазерного видеомикроскопа для автопозиционирования образца и 2-мерного детектора HiStar. Рентгеновская оптика состояла из одного многослойного зеркала Göbel в сочетании с коллиматором с точечной апертурой 0,3 мм. Ежедневную проверку технических характеристик проводили с использованием сертифицированного стандарта корунда NIST 1976 (плоская пластина).

Расходимость пучка, то есть эффективный размер рентгеновского пучка на образце, составляла примерно 4 мм. Непрерывный режим сканирования θ - θ использовали с расстоянием образец - детектор,

равным 20 см, что давало эффективный 2θ диапазон 3,2-29,7°. Как правило, образец экспонировали рентгеновским лучом в течение 120 с. Для сбора данных использовали программу GADDS для WNT 4.1.16 и данные анализировали и представляли с использованием Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2 или v 13.0.0.2.

Условия окружающей среды:

Для анализа образцов в условиях окружающей среды готовили плоские пластины образцов с использованием порошка непосредственно после выращивания без измельчения. Примерно 1-2 мг образца слегка придавливали на предметном стекле, чтобы получить плоскую поверхность.

Условия, не соответствующие условиям окружающей среды:

Образцы, анализируемые в условиях, не соответствующих условиям окружающей среды, помещали на кремниевую пластину с теплопроводным соединением. Затем образец нагревали до соответствующей температуры со скоростью примерно $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ и затем поддерживали изотермически в течение примерно 1 мин до начала сбора данных.

Bruker AXS/Siemens D5000

Дифракционные картины порошковой рентгеновской дифракции получали на дифрактометре Siemens D5000 с использованием $\text{Cu K}\alpha$ излучения (40 кВ, 40 мА), θ - θ гониометра, расхождения V20 и приемных щелей, графитового вторичного монохроматора и сцинтилляционного счетчика. Технические характеристики прибора проверяли с использованием сертифицированного стандарта корунда (NIST 1976). Для сбора данных использовали программу Diffrac Plus XRD Commander v2.3.1 и данные анализировали и представляли с использованием Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2 или v 13.0.0.2.

Образцы анализировали в условиях окружающей среды в виде плоских пластин образцов, используя порошок непосредственно после выращивания. Примерно 20 мг образца осторожно помещали в полость, вырезанную в полированной, с нулевым фоном (510), кремниевой пластине. При анализе образец вращали в собственной плоскости.

Подробности сбора данных:

угловой диапазон: от 2 до $42^{\circ}2\theta$

размер шага: $0,05^{\circ}2\theta$

время сбора: $4\text{с}\cdot\text{шаг}^{-1}$ Bruker AXS D8 Advance

Дифракционные картины порошковой рентгеновской дифракции получали на дифрактометре Bruker D8 с использованием $\text{Cu K}\alpha$ излучения (40 кВ, 40 мА), θ - 2θ гониометра, расхождения V4 и приемных щелей, Ge монохроматора и детектора Lynxeye. Технические характеристики прибора проверяли с использованием сертифицированного стандарта корунда (NIST 1976). Для сбора данных использовали программу Diffrac Plus XRD Commander v 2.5.0 и данные анализировали и представляли с использованием Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2 или v 13.0.0.2.

Образцы анализировали в условиях окружающей среды в виде плоских пластин образцов, используя порошок непосредственно после выращивания. Примерно 5 мг образца осторожно помещали в полость, вырезанную в полированной, с нулевым фоном (510), кремниевой пластине. При анализе образец вращали в собственной плоскости.

Подробности сбора данных:

угловой диапазон: от 2 до $42^{\circ}2\theta$

размер шага: $0,05^{\circ}2\theta$

время сбора: $0,5\text{с}\cdot\text{шаг}^{-1}$

Дифрактограмма ПРД порошка, выделенного в стадии 6 способа по изобретению, была получена на приборе Bruker AXS D8 Advance. См. фиг. 5. Соответствующие данные для рентгеновской дифрактограммы приведены в таблице ниже. Для сбора данных использовали программу Diffrac Plus XRD Commander v2.6.1 и данные анализировали и представляли с использованием Diffrac Plus EVA v13.0.0.2 или v15.0.0.0. Образцы анализировали в условиях окружающей среды в виде плоских пластин образцов, используя порошок непосредственно после выращивания. Образец осторожно помещали в полость, вырезанную в полированной, с нулевым фоном (510), кремниевой пластине. При анализе образец вращали в собственной плоскости. Подробности сбора данных:

угловой диапазон: от 2 до $42^{\circ}2\theta$

размер шага: $0,05^{\circ}2\theta$

время сбора: $0,5\text{с}\cdot\text{шаг}^{-1}$

Таблица Н. Данные рентгеновской дифрактограммы формы С кристаллической обетихолевой кислоты

Пик	Угол 2-тета (град)	d-значение (ангстрем)
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

ПТ-ПРД (рентгеновская дифракция с переменной температурой) выявила, что эндотерма, наблюдаемая на термограмме ДСК, соответствовала десольватации образца, поскольку никаких изменений формы не наблюдалось при нагревании. Между данными ДСК и ПТ-ПРД существуют температурные различия, поскольку эксперимент ПТ-ПРД проводили в большом пространстве с экспонированным образцом, тогда как эксперимент ДСК проводили в закрытом, замкнутом пространстве. Эта разница составляет примерно 20°C и объясняет, почему образец плавился при значительно более низкой температуре в экспериментах ДСК и образец все еще выглядел кристаллическим при температуре 110°C в эксперименте ПТ-ПРД. Анализ ПТ-ПРД показал, что удаление высушиванием растворителя из материала приводит к потере кристалличности, что согласуется с тем, что материал находится в сольватированной форме. См. фиг. 7.

Гравиметрическая сорбция пара (ГСП)

Изотермы сорбции получали с использованием анализатора сорбции внутренней влаги SMS DVS Intrinsic moisture sorption analyzer, управляемого с помощью программы DVS Intrinsic Control software v 1.0.0.30. Температуру образца поддерживали на уровне 25°C с помощью элементов управления прибора. Влажность контролировали путем смешивания потоков сухого и влажного азота, с общей скоростью потока 200 мл·мин⁻¹. Относительную влажность измеряли с помощью калиброванного датчика Rotronic (динамический диапазон 1,0-100% RH), расположенного вблизи образца. Изменение массы (релаксацию массы) образца в зависимости от % RH (относительной влажности) постоянно контролировали с помощью микровесов (точность ±0,005 мг).

5-20 мг образца помещали в тарированный сетчатый контейнер из нержавеющей стали в условиях окружающей среды. Образец загружали и выгружали при 40% RH и температуре 25°C (типичные комнатные условия). Изотерму сорбции влаги получали, как описано ниже (2 сканирования составляли 1 полный цикл). Стандартную изотерму получали при температуре 25°C с интервалами 10% RH в диапазоне 0,5-90% RH. Анализ данных проводили в Microsoft Excel с использованием программы DVS Analysis Suite V6.0.0.7. Параметры метода в экспериментах SMS DVS Intrinsic были следующими:

Параметры	Значения
Адсорбция - Сканирование 1	40-90%
Десорбция/Адсорбция - Сканирование 2	90-0, 0-40%

Интервалы (% RH)	10
Число сканирований	2
Скорость потока (мл·мин ⁻¹)	200
Температура (°C)	25
Стабильность (°C·мин ⁻¹)	0,2
Время сорбции (часы)	время простоя 6 часов

Образец извлекали после завершения получения изотермы и повторно анализировали методом ПРД.

Анализ формы С кристаллической обетихоловой кислоты показал, что образец был слегка гигроскопичным, поскольку было отмечено увеличение массы на 1,18% в диапазоне 0-90% RH. Это поглощение воды было стабильным в течение всего анализа и равновесие было достигнуто на всех этапах. Гистерезис кривой был небольшим, свидетельствуя о том, что образец легко теряет воду, которую он поглотил. Анализ ПРД после анализа ГСП продемонстрировал, что образец не изменился. См. фиг. 8А, 8В и 8С.

Определение воды титрованием по методу Карла Фишера (КФ)

Содержание воды в каждом образце измеряли на кулонометре Mettler Toledo DL39 с использованием реагента Hydranal Coulomat AG и продувки аргоном. Взвешенные твердые образцы помещали в сосуд на платиновом контейнере для ТГА, снабженный пробкой Suba-Seal®, чтобы избежать попадания воды. Примерно 10 мг образца использовали на каждое титрование и определения были продублированы.

Анализ методом Карла Фишера показал, что форма С кристаллической обетихоловой кислоты содержала 1,5% воды, что соответствует примерно 0,3 моль воды.

Стабильность в течение одной недели при 40°C и 75% RH

Стабильность обетихоловой кислоты при 40°C и 75% RH (относительная влажность) определяли следующим образом. Образец обетихоловой кислоты хранили во влажной камере в течение одной недели при 40°C/75% RH. Образец повторно проанализировали методом ПРД и установили, что он не изменился.

Изучение твердотельного материала показало, что присутствие относительно большого количества органического растворителя необходимо для кристаллизации формы С обетихоловой кислоты. Маловероятно, что образец формы 1 обетихоловой кислоты будет спонтанно кристаллизироваться в форму С кристаллической обетихоловой кислоты при хранении.

Пример 5. Характеризация формы 1 обетихоловой кислоты

Форма 1 обетихоловой кислоты является некристаллической формой обетихоловой кислоты. Эту форму обетихоловой кислоты можно получать с использованием кристаллической обетихоловой кислоты в качестве синтетического промежуточного соединения. Форму 1 обетихоловой кислоты можно использовать в качестве фармацевтически активного ингредиента. Форму 1 обетихоловой кислоты характеризовали и анализировали следующим образом.

Партию 1 формы 1 обетихоловой кислоты характеризовали, используя следующие методики: оценку с помощью порошковой рентгеновской дифракции (ПРД) на кристалличность, ¹H и ¹³C ядерный магнитный резонанс (ЯМР), инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье (ПФ-ИКС), оптическую оценку (например, форма/размер частиц), оценку термических свойств (например, методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и термогравиметрического анализа (ТГА)), определение содержания воды методом Карла Фишера (КФ), хранение при 40°C и 75% RH и повторный анализ через 2 недели методом ПРД, определение рКа потенциометрическим методом, определение Log P/D (октанол/вода) потенциометрически, а также определение устойчивости к влаге с использованием гравиметрической сорбции пара (ГСП; например, полный цикл сорбции-десорбции с анализом твердого вещества методом ПРД). Пять других партий (например, партии 2, 3, 4, 5 и 6) формы 1 обетихоловой кислоты также характеризовали и сравнивали, используя следующие методики: оценку методом ПРД и сравнение с картиной основной партии 1, ¹H и ¹³C ЯМР, ПФ-ИКС, оптическую оценку (например, форма/размер частиц), оценку термических свойств (например, анализами ДСК, ТГА и высокотемпературной микроскопией), а также определение содержания воды методом КФ.

Анализ методом порошковой рентгеновской дифракции (ПРД)

Дифракционные картины порошковой рентгеновской дифракции получали на дифрактометре Bruker AXS C2 GADDS с использованием Cu Kα излучения (40 кВ, 40 мА), автоматической XYZ платформы, лазерного видеомикроскопа для автопозиционирования образца и 2-мерного детектора HiStar. Рентгеновская оптика состояла из одного многослойного зеркала Göbel в сочетании с коллиматором с точечной апертурой 0,3 мм. Расходимость пучка, то есть эффективный размер рентгеновского пучка на образце, составляла примерно 4 мм. Непрерывный режим сканирования θ-θ использовали с расстоянием образец - детектор, равным 20 см, что давало эффективный 2θ диапазон 3,2-29,7°. Как правило, образец экспонировали рентгеновским лучом в течение 120 с. Для сбора данных использовали программу

GADDS для WNT 4.1.16 и данные анализировали и представляли с использованием Diffraс Plus EVA v 9.0.0.2 или v 13.0.0.2.

Для анализа образцов в условиях окружающей среды готовили плоские пластины образцов с использованием порошка непосредственно после выращивания без измельчения. Примерно 1-2 мг образца слегка придавливали на силиконовом предметном стекле, чтобы получить плоскую поверхность. Дифрактограммы показали, что форма 1 обетихолево́й кислоты является некристаллической (смотри фиг. 10 и фиг. 11).

Характеризация методом ЯМР

Спектры ЯМР получали на приборе Bruker 400 МГц, оснащенном автодозатором и управляемом с помощью консоли DRX400. Автоматизированные эксперименты проводили с использованием ICONNMR v4.0.4 (полная сборка 1) с Topspin v 1.3 (уровень установки патча 8), используя стандартные загруженные эксперименты Bruker. В случае нестандартной спектроскопии данные получали, используя только Topspin. Образцы готовили в d6-ДМСО, если не указано иное. Оффлайн анализ проводили с использованием ACD SpecManager v 9.09 (полная сборка 7703).

На фиг. 12 приведен спектр ^1H ЯМР для партии 1. Спектры

^1H ЯМР партий 2-6 также записывали и сравнивали со спектром партии 1. См. фиг. 13. Все спектры были схожими, но с различными количествами воды. Некоторые различия были отмечены в интеграции большой группы протонов от 0,75 до 2 ч/млн, где пики перекрываются и не могут быть интегрированы отдельно. В табл. J показано общее количество интегрированных протонов в спектрах партий 1-6, принимая во внимание различия в области 0,75-2 ч/млн.

Таблица J

Номер партии	Количество H по интеграции (исключая COOH)
1	43
2	42
3	40
4	41
5	42
6	41-42

Протон карбоновой кислоты был исключен, таким образом, количество протонов должно быть 43, но фактически оно варьировало от 40 до 43 среди 6 спектров. Однако площадь, где происходят вариации (0,75-2 ч/млн) достаточно широка, и из-за качества исходных данных эту интеграцию нельзя брать за основу.

Поскольку спектр невозможно было полностью соотнести и интеграция варьировала, записывали спектр ^{13}C ЯМР партии 2. На фиг. 14 приведен DEPTQ спектр, на котором пики CH_2 и четвертичных атомов углерода направлены вверх, в то время как пики CH_3 и CH групп направлены вниз. Вниз направлены тринадцать пиков, которые соответствуют девяти группам CH и четырем группам CH_3 . Эти результаты согласуются со структурой. Пик углерода карбоновой кислоты был обнаружен на 175 ч/млн. Он был исключен из этой развернутой картины для чистоты интересующей области. Однако есть только одиннадцать пиков, направленных вверх, при том, что их должно быть двенадцать, поскольку присутствуют десять CH_2 групп и два четвертичных атома углерода в молекуле (за исключением карбонила). Судя по всему, сигнал одного атома углерода перекрывается с другим сигналом. Вследствие этого, был получен DEPT135 спектр с подавлением сигналов четвертичных атомов углерода, который мог бы показать, соответствует ли перекрывающийся сигнал четвертичному атому. См. фиг. 15. Сравнение DEPT135 спектра с DEPTQ спектром показало, что один пик (при 42,5 ч/млн) исчезает. В молекуле присутствуют два четвертичных атома углерода, которые должны соответствовать двум исчезающим пикам. Таким образом, перекрывающийся сигнал атома углерода соответствует четвертичному атому.

Кроме того, проводили эксперимент для определения времени релаксации атомов углерода, чтобы определить, где пропавший сигнал четвертичного атома углерода перекрывается с другим сигналом углерода. См. фиг. 16. Этот ^{13}C спектр содержит пики, которые были интегрированы. Это показало, что пик при 32,3 ч/млн соответствует двум атомам углерода. См. фиг. 17 для развернутого изображения пика при 32,3 ч/млн. Таким образом, теперь двадцать шесть атомов углерода были учтены по интеграции (включая карбоновую кислоту), что согласуется со структурой.

ПФ-ИКС методом НПВО (ATR)

Данные получали на приборе Perkin-Elmer Spectrum One, оснащенном универсальным комплектом вспомогательных принадлежностей для НПВО. Данные собирали и анализировали с использованием программы Spectrum v5.0.1. См. фиг. 18.

Термический анализ методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и термогравиметрического анализа (ТГА)

Данные ДСК получали на приборе TA Instruments Q2000, оснащенный 50-позиционным автодозатором. Прибор был откалиброван по энергии и температуре с использованием сертифицированного индия. Как правило, 0,5-3 мг каждого образца в алюминиевой кювете с точечными отверстиями нагревали со скоростью $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ от 25 до 300°C . Образец постоянно продували азотом со скоростью $50\text{мл}\cdot\text{мин}^{-1}$. Для управления прибором использовали программу Advantage for Q Series v2.8.0.392 и Thermal Advantage v4.8.3 и данные анализировали с использованием Universal Analysis v4.3A. В случае модулированной ДСК образец готовили, как описано ранее, и кювету нагревали со скоростью $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ от 25 до 200°C . Условия модулятора были: амплитуда $0,20^{\circ}\text{C}$ и периодичность 40 с. Интервал выборки составлял 1 с/pt.

Данные ТГА получали на приборе TA Instruments Q500 TGA, оснащенный 16-позиционным автодозатором. Прибор был откалиброван по температуре с использованием сертифицированного алюминия. Как правило, 5-10 мг каждого образца помещали в предварительно тарированный платиновый тигель и алюминиевую кювету для ДСК и нагревали со скоростью $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ от температуры окружающей среды до 350°C . Образец постоянно продували азотом со скоростью $60\text{мл}\cdot\text{мин}^{-1}$. Для управления прибором использовали программы Advantage for Q Series v2.8.0.392 и Thermal Advantage v4.8.3.

Термический анализ партии 1 проводили методом ДСК и ТГА. Запись прибора ТГА (см фиг. 19) показала уменьшение массы на 1,7% в промежутке между температурой окружающей среды и 121°C , что, вероятно, соответствовало потере воды. Запись прибора ДСК (смотри фиг. 19) демонстрировала широкую низкотемпературную эндотерму, возможно, соответствующую потере воды, за которой следовала малая эндотерма с началом при 94°C .

Эта вторая эндотерма может указывать на стеклование и ее дополнительно изучали методом модулированной ДСК (смотри фиг. 20). Этот метод позволяет отделять обратимые события, такие как стеклование, от необратимых событий, таких как потеря растворителя или плавление кристаллической формы. Запись обратимого теплового потока в модулированной ДСК показывала стеклование как шаг с точкой перегиба (T_g) при 95°C . Она является высокой для стеклования и свидетельствует о том, что форма 1 является стабильной. Малая эндотерма с началом при 89°C на записи необратимого теплового потока соответствует молекулярной релаксации сыпучего материала при температуре стеклования.

Запись прибора ДСК (см фиг. 19) демонстрирует деструкцию, начиная примерно с температуры 220°C , что также соответствует изгибу вниз на записи ТГА.

Записи прибора ТГА для партий 1, 2, 3, 4, 5 и 6 имели аналогичную форму (фиг. 21). Уменьшение массы, измеренное в промежуток между температурой окружающей среды и 120°C , приведено в табл. К. Эти данные согласуются с наличием различных количеств воды, наблюдаемых при ЯМР-анализе. Эти количества далее были определены путем титрования воды методом Карла Фишера (КФ). См. определение воды методом КФ.

Таблица К. Сводная таблица уменьшения массы образцов непосредственно после выращивания при определении методом ТГА

Номер партии	Уменьшение массы при измерении методом ТГА
1	1,7%
2	0,6%
3	1,2%
4	0,9%
5	1,5%
6	1,6%

На фиг. 22 приведены записи прибора ДСК шести партий для сравнения. Записи схожи, с широкой низкотемпературной эндотермой различного размера, что согласуется с различными количествами воды, за которой следует малая эндотерма примерно при температуре стеклования, как видно в разделе ДСК и ТГА. Совокупные результаты приведены в табл. L.

Таблица L. Сводные результаты образцов непосредственно после выращивания при измерении методом ДСК

Номер партии	1 ^{ая} эндотерма, широкая	2 ^{ая} эндотерма, малая	Начало деструкции
1	28,3 J/g, $T_{\text{max}} =$	1,2 J/g, $T_{\text{onset}} = 94^{\circ}\text{C}$	220°C

	64°C		
2	7,4 J/g, T _{max} = 48°C	1,4 J/g, T _{onset} = 94°C	220°C
3	нет	2,0 J/g, T _{onset} = 89°C	175°C
4	14,5 J/g, T _{max} = 58°C	1,3 J/g, T _{onset} = 94°C	200°C
5	12,2 J/g, T _{max} = 59°C	1,2 J/g, T _{onset} = 94°C	175°C
6	28,7 J/g, T _{max} = 59°C	1,5 J/g, T _{onset} = 94°C	200°C

Поляризационная микроскопия (ПМ) (PLM)

Образцы изучали с помощью поляризационного микроскопа Leica LM/DM с цифровой видеокамерой для получения изображения. Небольшое количество каждого образца помещали на предметное стекло с нанесенным силиконовым маслом и накрывали покровным стеклом, отдельные частицы разделяли, насколько это возможно. Образец рассматривали при соответствующем увеличении и частично поляризованном свете, в сочетании с λ фильтром искусственной расцветки.

На фиг. 23А-23F видно, что партии 1, 2, 3, 4, 5 и 6 представляют собой материал, состоящий из крупных жестких агломератов мелких частиц неправильной формы. Все партии 1, 2, 3, 4, 5 и 6 выглядели одинаково. В плоскополяризованном свете не наблюдали двойное лучепреломление, что согласуется с тем, что материал является некристаллическим. Диапазон размеров частиц составлял от менее чем 1 мкм до 3 мкм. Небольшой размер этих частиц предполагает, что они были осаждены очень быстро.

Гравиметрическая сорбция пара (ГСП)

Изотермы сорбции получали с использованием анализатора сорбции внутренней влаги SMS DVS Intrinsic moisture sorption analyzer, управляемого с помощью программы SMS Analysis Suite software. Температуру образца поддерживали на уровне 25°C с помощью элементов управления прибора. Влажность контролировали путем смешивания потоков сухого и влажного азота, с общей скоростью потока 200 мл·мин⁻¹. Относительную влажность измеряли с помощью калиброванного датчика Rotronic (динамический диапазон 1,0-100% RH), расположенного вблизи образца. Изменение массы (релаксацию массы) образца в зависимости от % RH (относительной влажности) постоянно контролировали с помощью микровесов (точность $\pm 0,005$ мг).

Как правило, 5-20 мг образца помещали в тарированный сетчатый контейнер из нержавеющей стали в условиях окружающей среды. Образец загружали и выгружали при 40% RH и температуре 25°C (типичные комнатные условия). Изотерму сорбции влаги получали, как описано ниже (2 сканирования составляли 1 полный цикл). Стандартную изотерму получали при температуре 25°C с интервалами 10% RH в диапазоне 0,5-90% RH.

Таблица М

Параметры	Значения
Адсорбция - Сканирование 1	40-90
Десорбция/Адсорбция - Сканирование 2	85-сухость, сухость-40
Интервалы (% RH)	10
Число сканирований	2
Скорость потока (мл·мин ⁻¹)	200
Температура (°C)	25
Стабильность (°C·мин ⁻¹)	0,2
Время сорбции (часы)	время простоя 6 часов

Изотерма гравиметрической сорбции пара (ГСП) была получена для партии 1 при 25°C и приведена на фиг. 24. Образец, по-видимому, являлся умеренно гигроскопичным, с общим изменением массы на 3,8% при относительной влажности (RH) от 0 до 90%. Гистерезис (площадь между кривыми адсорбции и десорбции) был небольшим, свидетельствуя о том, что образец легко теряет воду, которую он адсорбировал. Образование гидратов не наблюдали. Не было никаких существенных изменений массы после всего эксперимента (0,3%).

График кинетики ГСП (фиг. 25) показывает, что адсорбция воды происходит главным образом при очень высокой влажности и десорбция - при очень низкой влажности. В фазе адсорбции образец достигал равновесия достаточно быстро до 80% RH, и больше времени требовалось для установления равновесия при 90% RH. При десорбции масса стабилизировалась на всех этапах.

После завершения анализа ГСП образец извлекали и повторно анализировали методом ПРД, ре-

зультаты показали, что материал по-прежнему был некристаллическим (фиг. 26).

Определение содержания воды методом Карла Фишера (КФ)

Содержание воды в каждом образце измеряли на кулонометре Mettler Toledo DL39 с использованием реагента Hydranal Coulomat AG и продувки аргоном. Взвешенные твердые образцы помещали в сосуд на платиновом контейнере для ТГА, снабженный пробкой Suba-Seal®, чтобы избежать попадания воды. Примерно 10 мг образца использовали на каждое титрование и определения были продублированы.

Титрование воды кулонометрическим методом Карла Фишера дало результат 2,4 мас.% воды. Это было немного выше, чем уменьшение массы, наблюдаемое при анализе ТГА. Это может означать, что часть воды не высвобождается из материала при нагревании, однако, вероятно, это происходит из-за различных экспериментальных процедур для этих двух методов.

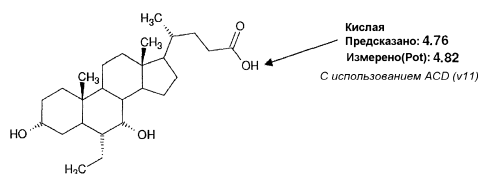
Содержание воды в каждой партии определяли кулонометрическим методом Карла Фишера. В табл. N приведены эти результаты и сравнение их с более ранними результатами, полученными методом Карла Фишера, а также с результатами уменьшения массы, полученными при анализе ТГА. Данные свидетельствуют в пользу того, что в случае всех трех анализов наблюдается одна и та же тенденция. Данные, полученные ранее методом Карла Фишера, показывают меньшее количество воды, чем результаты, полученные в настоящем анализе. Это согласуется с тем, что материал является гигроскопичным, хотя некоторые образцы поглощали больше воды, чем другие. Уменьшение массы, определяемое в анализе ТГА, неизменно является более низким, чем результаты, полученные титрованием по методу Карла Фишера, что может означать, что некоторое количество воды остается захваченным в материале и не высвобождается при нагревании, но может также являться следствием экспериментальных процедур.

Таблица N. Результаты, полученные методом Карла Фишера (КФ) и сводные данные по содержанию воды

Номер партии	Содержание воды методом КФ	Предыдущие результаты методом КФ	Уменьшение массы, определенное методом ТГА
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%

Определение и предсказание pKa

Определение pKa проводили на приборе Sirius GIpKa, оснащенном D-PAS. Измерения проводили при температуре 25°C в водном растворе с использованием УФ и в смесях метанола и воды с использованием потенциометрии. Среда титрования была скорректирована по ионной силе (ISA) с помощью 0,15 М раствора KCl (водного). Значения, полученные для смесей метанола и воды, были скорректированы на 0% соразтворителя путем экстраполяции Ясуда-Шедловски. Данные уточняли, используя программу Refinement Pro software v1.0. Предсказание значений pKa выполняли с использованием программы ACD pKa prediction software v9.



pKa обетихолеовой кислоты измеряли потенциометрически с использованием метанола в качестве соразтворителя (фиг. 27) и экстраполировали на 0% соразтворителя методом экстраполяции Ясуда-Шедловски (фиг. 28). Значение pKa позволяет определять долю нейтральной и ионизированной формы соединения при заданном значении pH. На фиг. 29 показано распределение форм в зависимости от pH.

Определение Log P

Данные получали потенциометрическим титрованием на приборе Sirius GIpKa, используя три соотношения октанол:скорректированная по ионной силе (ISA) вода, для получения значений Log P, Log P_{ion} и Log D. Данные уточняли, используя программное обеспечение Refinement Pro software v1.0. Предсказание значений Log P проводили с использованием программы ACD v9 и программы Syracuse KOWWIN v1.67.

Таблица О. Предсказанные и измеренные значения LogP

ACD (V9) Предсказанное LogP	5,81
Измеренное LogP	5,54
Измеренное LogP _{ion}	1,58
Измеренное LogD7.4	2,98

Значение LogP предсказывали с использованием программы ACD, затем измеряли потенциометрически. Проводили три титрования при трех различных соотношениях октанол/ISA вода, получая различные кривые, приведенные на фиг. 30. Черная кривая соответствует чисто водному титрованию pKa и 3 цветных кривых соответствуют титрованию при трех соотношениях октанол/ISA вода. Сдвиги pKa позволяют определять LogP.

Кривая липофильности (logD в зависимости от pH) приведена на фиг. 31. Log D является коэффициентом распределения, представляя комбинированную липофильность всех форм, присутствующих при определенном pH. LogP представляет собой константу соединения, что соответствует коэффициенту распределения чистых нейтральных форм, в то время как LogP_{ion} соответствует таковому для чистых ионизированных форм. LogP и LogP_{ion} можно определять из кривой липофильности как пересечение оси Y, соответственно, с касательной в начале шкалы pH (когда молекула находится чисто в своей нейтральной форме) и с касательной в конце шкалы pH (когда молекула является полностью ионизированной).

Двухнедельная стабильность при 40°C и 75% RH и при 25°C и 97% RH

Образец партии 1 хранили при 40°C и 75% относительной влажности (RH) для ускоренного испытания стабильности твердой формы. Другой образец хранили при 25°C и 97% относительной влажности, чтобы проверить эффект очень высокой влажности. Оба образца были повторно проанализированы методом ПРД через пять дней и через две недели. Оба образца оставались некристаллическими при двух вариантах условий хранения вплоть до двух недель, что свидетельствовало о том, что форма I стабильна в данных условиях. См. фиг. 32 и 33.

Все шесть проанализированных партий были некристаллическими. Температура стеклования была измерена при 95°C методом модулированной ДСК. Шесть партий оказались очень похожи при анализе всеми используемыми методами, единственным различием между ними было содержание в них воды, которое варьировало от 1,9 до 2,8% при определении титрованием по методу Карла Фишера. Термический анализ показал различное количество воды и свидетельствовал о деструкции, начинающейся при температуре примерно 175-220°C. Измеренное значение pKa составляло 4,82 и значение LogP составляло 5,54. Микроскопическое исследование продемонстрировало крупные жесткие агломераты из очень маленьких частиц неправильной формы.

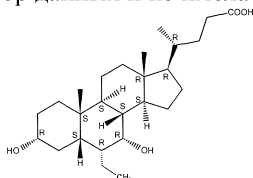
Тестирование стабильности показало, что материал по-прежнему оставался некристаллическим через две недели в условиях ускоренного испытания стабильности (40°C/75% RH) или в условиях высокой влажности (25°C/97% RH). Анализ методом гравиметрической сорбции пара (ГСП) показал, что материал является лишь умеренно гигроскопичным с общим увеличением массы на 3,8% в условиях 0-90% относительной влажности (RH). Образование гидратов не наблюдали при анализе методом ГСП. Образец, повторно проанализированный методом ПРД после анализа ГСП, по-прежнему оставался некристаллическим. Высокая температура стеклования и результаты тестирования стабильности свидетельствовали о том, что некристаллическая форма является стабильной.

Пример 6. Рентгеноструктурный анализ монокристаллов и абсолютная стереохимия

Рентгеноструктурный анализ монокристаллов обетихоловой кислоты проводили на кристалле, полученном при перекристаллизации обетихоловой кислоты из раствора ацетонитрила после охлаждения до 5°C со скоростью 0,1°C/мин с последующим созреванием в процессе 8-часовых циклов RT/50°C в течение 1 недели (см. фиг. 34). Структура соответствовала форме G, и была создана смоделированная ПРД картина в качестве эталонной картины для этого материала. Форму G можно получать охлаждением раствора обетихоловой кислоты, например, в ацетонитриле.

Структура является орторомбической, пространственная группа P2₁2₁2₁, и содержит одну молекулу обетихоловой кислоты в асимметричной единице. Конечное значение R1 [I > 2σ(I)] = 3,22%. Кристалл демонстрировал морфологию призмы с примерными размерами 0,4×0,4×0,3 мм. Абсолютную стереохимию молекулы определяли как S в хиральных центрах C5, C9, C10 и C14 и R в хиральных центрах C3, C6, C7, C8, C13, C17 и C22 с параметром Флэка = -0,01 (13). Для инвертированной структуры с хиральными центрами C5, C9, C10 и C14 в R конфигурации и хиральными центрами C3, C6, C7, C8, C13, C17 и C22 в S конфигурации параметр Флэка = 1,01(13), что подтверждало отнесение, указанное выше.

В целом, структура имела сильный набор данных и не имела разупорядочения.



Программа, используемая для определения стереохимии (PLATON), определила хиральный центр (C8) как R стереоцентр, в то время как согласно программе ACD (и правилам Кана-Ингольда-Прелога) (C8) определен как S. Однако отнесение транскольцевого соединения для системы колец В/С абсолютно определяется из кристаллической структуры.

Определение абсолютной структуры с использованием байесовской статистики на различиях Vijvoet (Hoofst et al., J. Appl. Cryst., (2008), 41, 96-103) показало, что вероятность того, что представленная абсолютная структура является правильной, составляет 1,000, в то время, как вероятности того, что абсолютная структура представляет собой рацемические двойники или является неправильной, составляют 0,000 и 0,000, соответственно. Эквивалент Флэка и его неопределенность, рассчитанные с помощью данной программы, составляют -0,019(17).

Структура обетихоловой кислоты содержит одно 5-членное кольцо и 3-шестичленных кольца, которые соединены вместе. Конформационный анализ 5-членного кольца (C13, C14, C15, C16 и C17) выявил, что наиболее близким описанием сморщивания для данного кольца является конформация "полукресла".

Конформационный анализ трех 6-членных колец (C1, C2, C3, C4, C5 и C10); (C5, C6, C7, C8, C9 и C10) и (C8, C9, C11, C12, C13 и C14) выявил, что наиболее близким описанием сморщивания для данных колец является конформация "кресла".

В кристаллической структуре обнаружены две уникальные межмолекулярные водородные связи. Каждая молекула обетихоловой кислоты образует водородную связь с двумя разными симметрично связанными молекулами обетихоловой кислоты, при этом атомы кислорода, O1 и O4, действуют как доноры для атомов кислорода, O3 и O1, соответственно, действующих как рецепторы, O1- H1C---O3 [D...A = 2,7419(12)Å] и O4-H4C-----O1 [D ...A = 2,6053(13)Å (см. фиг. 35). Эти взаимодействия приводят к образованию сложной 3-мерной сети, связанной водородными связями. Конечная разностная карта Фурье показывает максимальную и минимальную плотности электронов 0,402 и -0,176 еА⁻³ соответственно.

Совмещение рассчитанной ПРД картины для структуры с результатами для экспериментальных партий показывает, что кристалл соответствует сыпучему материалу и представляет собой форму G обетихоловой кислоты (смотри фиг. 36).

Таблица 1. Кристаллографические данные для формы G обетихоловой кислоты

Растворители кристаллизации	Ацетонитрил	
Способ кристаллизации	Созревание при RT/50°C	
Эмпирическая формула	C ₂₆ H ₄₄ O ₄	
Молекулярная масса по формуле	420,63	
Температура	100(2) K	
Длина волны	1,54178 Å	
Размер кристалла	0,40×0,40×0,30 мм	
Габитус кристалла	Бесцветная призма	
Кристаллографическая система	Ромбическая	
Пространственная группа	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Размеры элементарной ячейки	a = 8,72510(10) Å	α = 90°
	b = 12,69860(10) Å	β = 90°
	c = 22,5408(2) Å	γ = 90°
Объем	2497,44(4) Å ³	
Z	4	
Плотность (рассчитанная)	1,119 Мг/м ³	
Коэффициент поглощения	0,574 мм ⁻¹	
F(000)	928	

Таблица 2. Сбор данных и уточнение структуры для формы G обетихолево́й кислоты

Дифрактометр	SuperNova, Dual, Cu at zero, Atlas
Источник излучения	SuperNova (Cu) X-ray Source, CuK α
Метод сбора данных	омега сканирование
Тета диапазон для сбора данных	от 9,15 до 74,49°
Диапазоны индекса	$-10 \leq h \leq 10$, $-15 \leq k \leq 15$, $-28 \leq l \leq 26$
Полученные отражения	50001
Независимые отражения	5073 [R(int) = 0,0220]
Покрытие независимых отражений	99,4%
Вариация контрольных отражений	н/п
Коррекция поглощения	Полуэмпирическая из эквивалентов
Макс. и мин. пропускание	1,00000 и 0,78605
Метод решения структуры	прямой
Программа решения структуры	SHELXTL (Sheldrick, 2001)
Методика уточнения	Методика наименьших квадратов в полноматричном приближении по F^2
Программа уточнения	SHELXTL (Sheldrick, 2001)
Минимизированная функция	$\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2$
Данные/ограничения/параметры	5073/0/286
Критерий адекватности по F^2	1,060
Δ/σ_{\max}	0,001
Окончательные показатели R	
5039 данных; $I > 2\sigma(I)$	R1 = 0,0320, wR2 = 0,0859
все данные	R1 = 0,0322, wR2 = 0,0861
Схема взвешивания	Расч. $w = 1 / [\sigma^2(F_o^2) + (0,0503P)^2 + 0,5520P]$ где $P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$
Параметр абсолютной структуры	-0,01 (13)
Наибольшая разн. пик и впадина	0,402 и -0,176 $e\text{\AA}^{-3}$

Сводные результаты уточнения структуры являются следующими:

Упорядоченные атомы, отличные от H, XYZ	Свободно оптимизируемые
Упорядоченные атомы, отличные от H, U	Анизотропные
Атомы H (на углероде), XYZ	Идеализированные положения, зависимые от присоединенных атомов
Атомы H (на углероде), U	Соответствующие кратные U(экв) для связанного атома
Атомы H (на гетероатомах), XYZ	Свободно оптимизируемые
Атомы H (на гетероатомах), U	Изотропные
Разупорядоченные атомы, OCC	Разупорядочение отсутствует
Разупорядоченные атомы, XYZ	Разупорядочение отсутствует
Разупорядоченные атомы, U	Разупорядочение отсутствует

Пример 7. Разница в биодоступности между формой 1 обетихоловой кислоты (некристаллической) и кристаллической формой (формой F).

Физическое состояние твердой обетихоловой кислоты может влиять на биодоступность молекулы при пероральном введении субъекту (например, крысам). Описанное ниже исследование проводили для оценки кинетики в плазме после однократного перорального введения, а также эффективности кишечной абсорбции и фармакокинетики твердой некристаллической и кристаллической форм обетихоловой кислоты. Проводили сравнение профилей концентрации в плазме обетихоловой кислоты в зависимости от времени, t_{\max} , C_{\max} и AUC после введения формы 1 обетихоловой кислоты (некристаллической) или формы F (см. фиг. 37-38).

Форму 1 обетихоловой кислоты (некристаллическую) и форму F вводили крысам и от каждого животного кровь собирали через различные периоды времени в течение по меньшей мере 3 ч. Для каждой формы обетихоловой кислоты изучали по шесть животных.

Протокол эксперимента

Используемым тестируемым веществом была форма 1 обетихоловой кислоты (некристаллическая) и кристаллическая форма F. Форму F можно получать путем созревания кристаллов из ацетонитрила или нитрометана. Препарат готовили в виде суспензии в воде при pH 4. Экспериментальной моделью служили взрослые самцы крыс Sprague Dawley весом примерно 225-250 г (Harlan Laboratories). Для каждого варианта дозирования использовали по шесть животных. Дозировка составляла по 20 мг/кг/5 мл. Животные голодали в течение ночи перед получением препарата обетихоловой кислоты. Пероральное введение проводили через желудочный зонд.

В первый день животным имплантировали канюли в левую яремную вену (SOP VIVO/SAF6), анестезию проводили изофлураном. Эксперимент начинали через один день после операции. Примерно 500 мкл крови (250 мкл плазмы) отбирали через канюлю в гепаринизированный шприц (Na-гепарин) и немедленно переносили в микропробирки в ледяной бане. В пределах 1 ч образцы центрифугировали при $10000 \times g$ в течение 5 мин при 4°C. Плазму немедленно переносили в микропробирки и хранили при -20°C. Образцы крови собирали через 30 мин, 1, 1,3, 2 и 3 ч после введения дозы. Образцы плазмы анализировали количественным методом ВЭЖХ-ЭР/МС/МС.

Исследование фармакокинетики проводили с использованием некомпартментальных методов.

Результаты:

Средние значения концентраций в плазме после перорального введения однократных доз 20 мг/кг массы тела двух твердых форм обетихоловой кислоты приведены на фиг. 37. Значения являются средними величинами из шести серий экспериментов для каждого препарата. Значения стандартных отклонений приведены на графике.

После введения кристаллической формы величина C_{\max} была достигнута через 1,5 ч и концентрация в плазме обетихоловой кислоты демонстрировала обычную кинетику с одним максимальным значением, и через 3 ч концентрация составляла примерно половину C_{\max} .

Профиль кинетики после введения формы 1 обетихоловой кислоты (некристаллической) отличался от профиля кристаллической формы F. Ранний пик концентрации в плазме появлялся через 30 мин и второй пик появлялся через 2 ч. Вариабельность данных от 6 крыс была очень низкой и такие результаты статистически отличались от результатов, полученных для кристаллической формы. AUC для изучаемых трех часов была выше в случае кристаллической формы. Кинетика свидетельствовала о том, что обетихоловая кислота все еще присутствует в плазме через 3 ч. Ранее было показано, что при прохождении обетихоловой кислоты через печень образуется печеночный метаболит тауро-конъюгат, который секретируется в желчь и скапливается в системе кишечно-печеночной циркуляции. Таким образом, измерение количества тауро-конъюгата можно использовать для определения количества проходящей через печень обетихоловой кислоты. Данные по скорости образования тауро-конъюгата приведены на фиг. 38, на которой видно, что образование тауро-конъюгата происходит быстрее и более высокая концентрация достигается после введения кристаллической формы.

Температура плавления и стеклование

Температуру плавления формы 1 обетихоловой кислоты (некристаллической) и кристаллической формы F измеряли общепринятым методом. Измеряли температуру плавления хенодезоксихоловой кислоты и урсодезоксихоловой кислоты в качестве эталонных соединений. Измерения проводили в трех повторях. В случае кристаллической формы переход из твердого состояния в жидкое определяли как температуру плавления (T_m), тогда как в случае некристаллической формы определяли как температуру стеклования (T_g). В таблице приведены измеренные значения, выраженные как в градусах Цельсия (°C), так и в градусах Кельвина (°K).

Таблица 3. Температуры плавления обетихолевой кислоты (формы I и формы F), CDCA и UDCA

Соединение	Экспериментальные данные		Литературные данные	
	T_m (°C)	T_g (°C)	T_m (°C)	T_g (°C)
CDCA	136-140	-	119	98
			143	
			163	
UDCA	203-207	-	203	105
Обетихолева кислота	120-124	108-112	-	-
	235-237			

Соединение	Экспериментальные данные			Литературные данные		
	T_m (°K)	T_g (°K)	T_g/T_m (°K)	T_m (°K)	T_g (°K)	T_g/T_m (°K)
CDCA	409-413	-	-	392	371	0,85
				416		
				436		
UDCA	476-480	-	-	477	378	0,79
Обетихолева кислота	393-397	381-385	0,75	-	-	0,75
	508-510					

Результаты:

Значения, полученные для CDCA и UDCA, согласуются с теми, которые сообщались ранее, при этом температура плавления UDCA выше, чем температура плавления CDCA. Температура стеклования T_g формы I (102-112°C) ниже, чем температура плавления T_m формы F (120-124°C). Это наблюдаемая картина согласуется с предыдущими литературными данными, полученными при сравнении двух твердых форм. Форма F демонстрировала дополнительный переход при более высокой температуре (235-237°C).

Соотношение между самой высокой температурой плавления и температурой стеклования, выраженных в градусах Кельвина, очень схоже с таковым для других лекарственных средств и других желчных кислот. (J. Kerc et al. Thermochim. Acta, 1995 (248) 81-95).

Анализ методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Анализ методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проводили для более точного определения температуры плавления и физического состояния кристаллической и некристаллической форм обетихолевой кислоты. Для анализа использовали прибор Mettler Toledo ДСК model 821e. Анализ проводили, используя примерно 4-5 мг каждой из форм I и формы F. Соединения подвергали воздействию температур в диапазоне 30-300°C при скорости нагрева 10°C/мин.

На фиг. 39 приведена кривая ДСК, полученная для кристаллической формы F обетихолевой кислоты. Был обнаружен один эндотермический переход при 120,04°C, соответствующий температуре плавления соединения. Этот результат был также подтвержден методом высокотемпературной микроскопии (ВТМ) (HSM); в диапазоне 30-240°C наблюдаемый переход из твердого в жидкое состояние происходил при 122-124°C. На записи прибора ДСК форма и интенсивность пика, полученные для формы F, согласуются с типичной картиной, наблюдаемой в случае кристаллических форм. Однако ширина пика была достаточно большой; причиной этого могли быть неоднородные кристаллы. Термогравиметрический анализ (ТГА) не показал никакого уменьшения массы в диапазоне температур 30-300°C.

На фиг. 40 приведена кривая ДСК, полученная для некристаллической формы I обетихолевой кислоты. Наблюдали один эндотермический переход при 79,95°C. Форма и интенсивность пика соответствовали картине, ожидаемой для некристаллических соединений. Для этих веществ энергия, необходимая для перехода из твердого состояния в жидкое (стеклование), меньше, чем для кристаллических соединений. Термограмма не показала никакого уменьшения массы в диапазоне температур 30-300°C.

Растворимость в воде

Растворимость в воде формы I обетихолевой кислоты (некристаллической) и кристаллической формы F измеряли методами, известными в данной области. Вкратце, твердое вещество суспендировали в воде при низком значении pH (HCl 0,1 моль/л) и оставляли для уравнивания при температуре 25°C на одну неделю при легком перемешивании. Насыщенный раствор фильтровали и концентрацию соединения в растворе измеряли методом ВЭЖХ-ЭР/МС/МС.

Результаты:

	Растворимость в воде (мкмоль/л)
Форма I	17,9
Форма F	9,1

Форма I демонстрировала более высокую растворимость 17,9 мкмоль/л против 9,1 мкмоль/л у формы F.

Согласно данным биодоступность кристаллической формы F обетихолевой кислоты выше, чем у

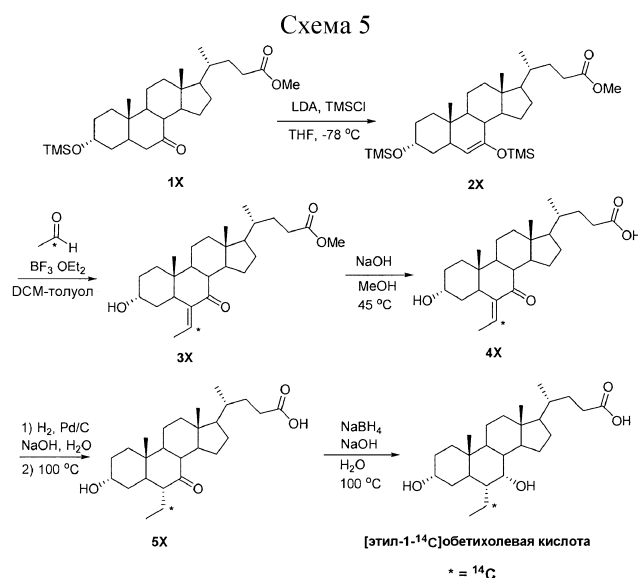
формы 1 обетихоловой кислоты (некристаллической). Несмотря на более ранний пик концентрации в плазме после введения формы 1, профили концентрации в плазме демонстрируют, что форма F абсорбируется более эффективно (более высокая AUC) и даже кинетика является более обычной, что отражает оптимальное распределение лекарственного средства в содержимом кишечника. У формы 1 наблюдается этот ранний пик, затем более поздний второй пик с C_{\max} ниже, чем у формы F.

Растворимость в воде формы 1 выше, чем растворимость формы F. Форма F, по-видимому, является стабильной, поскольку термогравиметрический анализ (ТГА) не показал никакого уменьшения массы в изучаемом диапазоне температур.

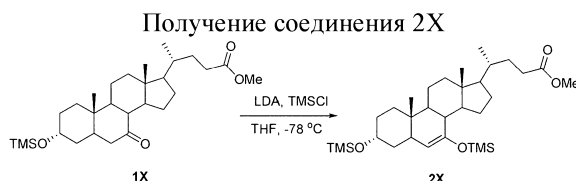
В соответствии с этими результатами форма F при пероральном введении, по-видимому, абсорбируется более эффективно в кишечнике и поглощается печенью. Скорость образования основного печеночного метаболита тауро-конъюгата почти в два раза выше в случае формы F, по сравнению с формой 1, что предполагает более эффективный транспорт и накопление в системе кишечного-печеночной циркуляции и концентрацию в плазме через 3 ч.

Пример 8. Получение радиоактивно меченой обетихоловой кислоты

Радиоактивно меченую обетихоловую кислоту получали в соответствии с приведенной ниже схемой.

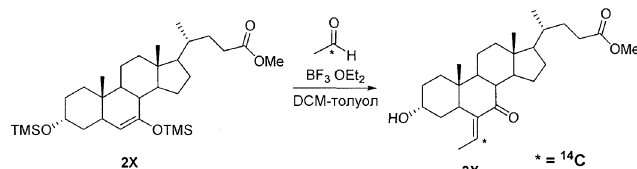


Спектры ЯМР записывали в растворе CDCl_3 и MeOD-d_4 в пробирках с 5-мм внешним диаметром (Norell, Inc. 507-NP) при температуре 30°C и получали на приборе Varian VNMR-400 при 400 МГц для ^1H . Химические сдвиги (δ) получали относительно тетраметилсилана ($\text{TMS} = 0,00$ ч./млн) и выражали в ч./млн. ЖХ-МС/МС анализ проводили на масс-спектрометре с ионной ловушкой в режиме ионизации Accela-Thermo Finnigan LCQ Fleet operating EST(-). ВЭЖХ проводили на приборе серии Agilent 1200 (коллонка: Xterra MS C8, $250 \times 4,6$ мм, 5 мкм, 40°C) с подключенным к системе детектором β -Ram. Удельную активность измеряли на ЖСА (жидкостной сцинтилляционный анализатор, Perkin Elmer, Tri-Carb 2900TR).



К раствору диизопропиламина (1,59 г, 15,8 ммоль) в сухом ТГФ (6,0 мл) добавляли H-BuLi (6,30 мл, 2,5 М, 15,8 ммоль) при температуре -20°C . После перемешивания реакционной смеси в течение 1 ч при -20°C ее охлаждали до -78°C и добавляли TMSCl (1,72 г, 15,8 ммоль), затем соединение 1X (3,00 г, 6,29 ммоль) в сухом ТГФ (6,0 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при температуре -78°C , гасили добавлением NaHCO_3 и перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Органический слой отделяли и концентрировали в вакууме, получая соединение 2X (3,29 г, 95%), которое использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

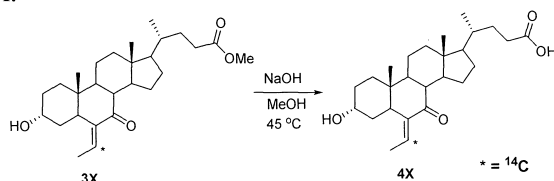
Получение соединения 3X.



[1-¹⁴C]ацетальдегид (330 мКи, 5,63 ммоль) (полученный из [¹⁴C]BaCO₃, УА = 58,6 мКи/ммоль) в толуоле (1,0 мл) и ацетальдегид (130 мг, 2,95 ммоль) в ДХМ (2,0 мл) смешивали при температуре -78°C и затем переносили в раствор соединения 2X (3,29 г, 6,00 ммоль) в ДХМ (13,0 мл), с последующим добавлением BF₃·OEt₂ (1,05 г, 7,40 ммоль) при температуре -78°C. После перемешивания в течение 1 ч при температуре -78°C реакционную смесь оставляли нагреваться до 35°C и перемешивали в течение 1 ч при вышеуказанной температуре. Реакцию гасили добавлением воды (10 мл), водный слой экстрагировали ДХМ, объединенный органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Осадок очищали колоночной хроматографией на SiO₂ (гексан:EtOAc=5:1-3:1), получая соединение 3X (102 мКи, 31%, УА 37,0 мКи/ммоль) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (CDCl₃, Varian, 400 МГц): δ 0,65 (3H, с); 0,93 (3H, д, J=6,0 Гц), 1,01 (3H, с), 1,06-1,49 (12H, м), 1,62-2,04 (7H, м), 1,69 (3H, д, J=6,8 Гц), 2,18-2,28 (2H, м), 2,32-2,43 (2H, м), 2,58 (1H, дд, J=12,8, 4,0 Гц), 3,62-3,70 (1H, м), 3,67 (3H, с), 6, 18 (1H, к, J=6,8 Гц).

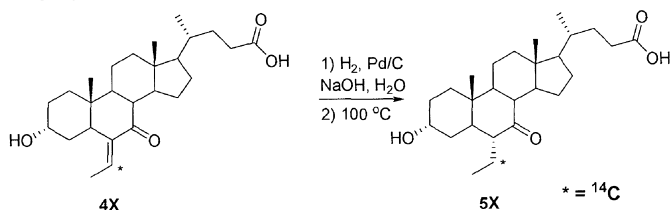
Получение соединения 4X.



К раствору соединения 3X (102 мКи, 2,75 ммоль) в MeOH (6,0 мл) добавляли NaOH (220 мг, 5,50 ммоль) в H₂O (3,0 мл) при комнатной температуре. После перемешивания реакционной смеси в течение 1 ч при 45°C ее охлаждали до комнатной температуры, MeOH удаляли при пониженном давлении и добавляли H₂O (12 мл). Водный слой подкисляли H₃PO₄, экстрагировали ДХМ и органический слой концентрировали в вакууме. Осадок суспендировали в Et₂O и преципитат собирали фильтрованием, получая соединение 4X (86,3 мКи, 85%) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (CDCl₃, Varian, 400 МГц): δ 0,63 (3H, с), 0,92 (3H, д, J=6,0 Гц), 0,99 (3H, с), 1,04-1,50 (13H, м), 1,61-2,01 (7H, м), 1,67 (3H, д, J=7,2 Гц), 2,21-2,28 (2H, м), 2,35-2,41 (2H, м), 2,56 (1H, дд, J=12,8, 4,0 Гц), 3,58-3,69 (1H, м), 6,16 (1H, к, J=7,2 Гц).

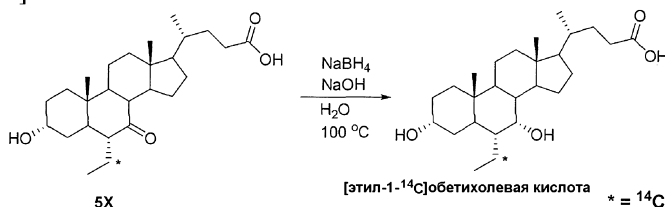
Получение соединения 5X.



Смесь соединения 4X (86,3 мКи, 2,35 ммоль) и 5% - Pd/C (100 мг) в водном 0,5 М растворе NaOH (10 мл, 5,0 ммоль) перемешивали в течение 10 ч при комнатной температуре в атмосфере H₂ (баллон) и затем перемешивали в течение 14 ч при температуре 100°C. Катализатор удаляли фильтрованием, промывали водой и фильтрат подкисляли H₃PO₄. Преципитаты собирали фильтрованием, твердое вещество растворяли в EtOAc, промывали насыщенным раствором соли, фильтровали через короткий слой SiO₂ и концентрировали в вакууме. Остаточное твердое вещество перекристаллизовывали с EtOAc, получая соединение 5X (67,7 мКи, 78%) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (MeOD-d₄, Varian, 400 МГц): δ 0,71 (3H, с), 0,75-0,84 (1H, м), 0,81 (3H, т, J=7,4 Гц), 0,92-1,01 (1H, м), 0,96 (3H, д, J=6,4 Гц), 1,06-1,38 (7H, м), 1,25 (3H, с), 1,41-1,96 (12H, м), 2,01-2,05 (1H, м), 2,11-2,24 (2H, м), 2,30-2,37 (1H, м), 2,50 (1H, т, J=11,4 Гц), 2,80-2,85 (1H, м), 3,42-3,49 (1H, м).

Получение [этил-1-¹⁴C]обетихолеовой кислоты



К раствору соединения 5X (67,7 мКи, 1,83 ммоль) в водном 2 М растворе NaOH (4,50 мл, 9,00

ммоль) добавляли раствор NaBH_4 (416 мг, 11,0 ммоль) в H_2O (2,0 мл) при температуре 80°C . После перемешивания реакционной смеси в течение 2 ч при 100°C добавляли воду (6,0 мл) при комнатной температуре и подкисляли H_3PO_4 . Водный слой экстрагировали ДХМ, высушивали над безводным Na_2SO_4 , фильтровали через короткий слой SiO_2 и концентрировали в вакууме. Осадок очищали колоночной хроматографией на SiO_2 (гексан:EtOAc=1:1-1:3), получая продукт (44,0 мКи, 65%) в виде белого твердого вещества. Продукт (44,0 мКи, 1,19 ммоль) и обетихоловую кислоту (120 мг, 0,285 ммоль) растворяли в EtOAc (4 мл), раствор перемешивали в течение 2 ч при температуре 50°C и затем концентрировали в вакууме. Остаточное масло суспендировали в Et_2O , преципитат собирали фильтрованием, получая [этил-1- ^{14}C]обетихоловую кислоту (560 мг, 38,5 мКи, УА = 29 мКи/ммоль) в виде белого твердого вещества.

^1H -ЯМР (CDCl_3 , Varian, 400 МГц): δ 0,66 (3H, с), 0,88 (311, с), 0,93 (3H, т, J=7,2 Гц), 0,93 (3H, д, J=6,4 Гц), 0,96-1,04 (1H, м), 1,08-1,52 (14H, м), 1,51-1,60 (1011, м), 2,22-2,30 (111, м), 2,36-2,44 (1H, м), 3,38-3,45 (111, м), 3,71 (1H, с).

ЖХ-МС/МС (MS: LCQ Fleet): МС рассчит.: 421,56; МС опред.: 421,07 [М-Н] $^+$.

Радиоизотопная ТСХ: ТСХ пластина из диоксида кремния 60 F $_{254}$, и подвижная фаза EtOAc. Радиохимическая чистота 98,90%, Rf = 0,675

ВЭЖХ (серия Agilent 1200): подвижная фаза; ацетонитрил: 5 mM фосфатный буфер (pH=3):MeOH = 450:450:100. Радиохимическая чистота 98,19% (β -гам), Rt = 20,00 мин.

[Этил-1- ^{14}C]обетихоловая кислота имеет молекулярную формулу $^{14}\text{C}_1\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{O}_4$ и молекулярную массу 421,46 с удельной активностью 29 мКи/ммоль при измерении на ЖСА.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения некристаллической обетихоловой кислоты, включающий стадии очистки промежуточного соединения E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты кристаллизацией; гидрогенизации очищенной E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с получением 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты; восстановления 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с образованием сырой обетихоловой кислоты; получения кристаллической обетихоловой кислоты путем кристаллизации сырой обетихоловой кислоты, используя для этого н-бутилацетат; и превращения кристаллической обетихоловой кислоты в некристаллическую обетихоловую кислоту путем растворения кристаллической обетихоловой кислоты в водном растворе NaOH, с гашением соляной кислотой.
2. Способ по п.1, в котором восстановление 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты включает взаимодействие 3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaBH_4 , с образованием сырой обетихоловой кислоты.
3. Способ по п.1, в котором гидрогенизация очищенной E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты включает взаимодействие E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с Pd/C и газообразным водородом в щелочном растворе с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты.
4. Способ по п.1, в котором E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овая кислота получена взаимодействием метилового эфира 3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaOH.
5. Способ по п.4, дополнительно включающий стадию взаимодействия метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты с CH_3CHO , с образованием метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты.
6. Способ по п.5, дополнительно включающий стадию взаимодействия метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с $\text{Li}[\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2]$ и $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$, с образованием метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты.
7. Способ по п.6, дополнительно включающий стадию взаимодействия 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с CH_3OH и H_2SO_4 , с образованием метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты.
8. Способ по п.2, где взаимодействие 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaBH_4 , с образованием сырой обетихоловой кислоты, проводят при температуре от примерно 85 до примерно 110°C в щелочном водном растворе.
9. Способ по п.3, где взаимодействие E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с Pd/C и газообразным водородом в щелочном растворе, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, проводят при температуре от примерно 90 до примерно 110°C .
10. Способ по п.4, где взаимодействие метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaOH, с образованием E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой

кислоты, проводят при температуре от примерно 20 до примерно 60°C.

11. Способ по п.5, где взаимодействие метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты с CH_3CHO , с образованием метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, проводят в полярном апротонном растворителе при температуре от примерно -50 до примерно -70°C в присутствии сольватированного комплекса трифторида бора (BF_3).

12. Способ по п.6, где взаимодействие метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с $\text{Li}[\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2]$ и $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$, с образованием метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты, проводят в полярном апротонном растворителе при температуре от примерно -10 до примерно -30°C.

13. Способ по п.7, где взаимодействие 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с CH_3OH и H_2SO_4 , с образованием метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, проводят при нагреве в течение примерно 3 ч и где pH реакционной смеси доводят водным щелочным раствором до величины pH от 6,5 до 8,0.

14. Способ получения кристаллической обетихолевой кислоты, включающий стадии очистки промежуточного соединения, E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, кристаллизацией;

гидрогенизации очищенной E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с получением 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты;

восстановления 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с образованием сырой обетихолевой кислоты;

получения кристаллической обетихолевой кислоты путем кристаллизации сырой обетихолевой кислоты, используя для этого н-бутилацетат.

15. Способ получения некристаллической обетихолевой кислоты, включающий стадии

взаимодействия 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с CH_3OH и H_2SO_4 , с образованием метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, при нагреве в течение примерно 3 ч и где pH реакционной смеси доводят водным щелочным раствором до величины pH от 6,5 до 8,0;

взаимодействия метилового эфира 3 α -гидрокси-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с $\text{Li}[\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2]$ и $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$, с образованием метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты, в полярном апротонном растворителе при температуре от примерно -10 до примерно -30°C;

взаимодействия метилового эфира 3 α ,7-дитриметилсилилокси-5 β -хол-6-ен-24-овой кислоты с CH_3CHO , с образованием метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, в полярном апротонном растворителе при температуре от примерно -50 до примерно -70°C в присутствии сольватированного комплекса трифторида бора (BF_3);

взаимодействия метилового эфира E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaOH , с образованием E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, при температуре от примерно 20 до примерно 60°C;

очистки E/Z-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты кристаллизацией;

взаимодействия очищенной E-3 α -гидрокси-6-этилиден-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с Pd/C и газообразным водородом в щелочном растворе, с образованием 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты, при температуре от примерно 90 до примерно 110°C;

взаимодействия 3 α -гидрокси-6 α -этил-7-кето-5 β -холан-24-овой кислоты с NaBH_4 , с образованием сырой обетихолевой кислоты, при температуре от примерно 85 до примерно 110°C в щелочном водном растворе;

получения кристаллической обетихолевой кислоты путем кристаллизации сырой обетихолевой кислоты, используя для этого н-бутилацетат, и

превращения кристаллической обетихолевой кислоты в некристаллическую обетихолевою кислоту в водном растворе NaOH , с гашением его соляной кислотой.

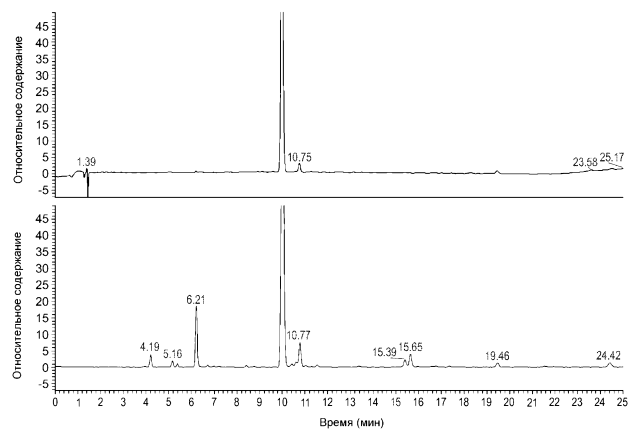
16. Способ по п.1, где некристаллическая обетихолева кислота содержит менее 1% хенодезоксикислоты.

17. Способ по п.1, где некристаллическая обетихолева кислота характеризуется термограммой дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) с эндотермическим пиком при температуре примерно от 89 до 94°C.

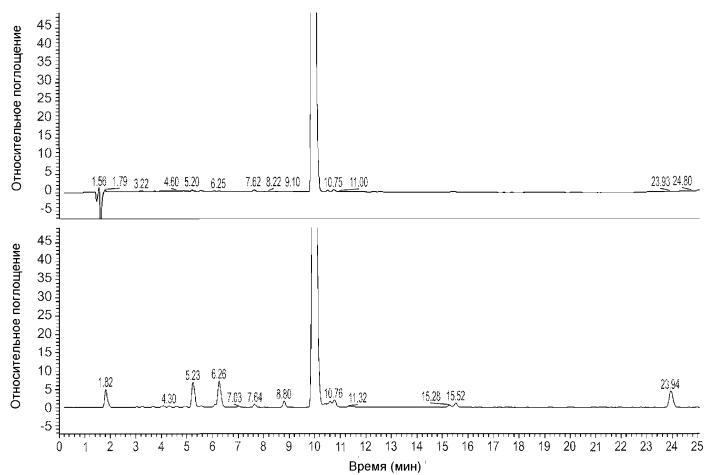
18. Способ по п.15, где некристаллическая обетихолева кислота содержит менее 1% хенодезоксикислоты.

19. Способ по п.1, где некристаллическая обетихолева кислота содержит от 0,01 до менее чем 1 мас.% хенодезоксикислоты (CDCA).

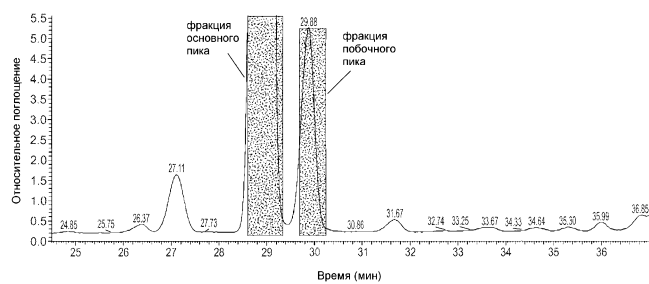
032347



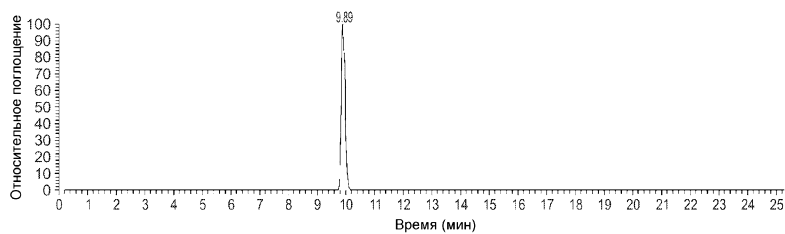
Фиг. 1



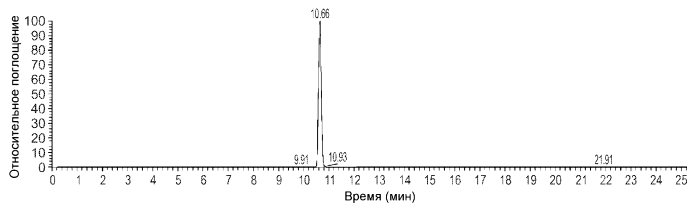
Фиг. 2



Фиг. 3

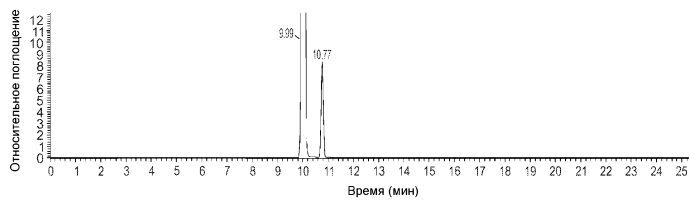


Фиг. 4А

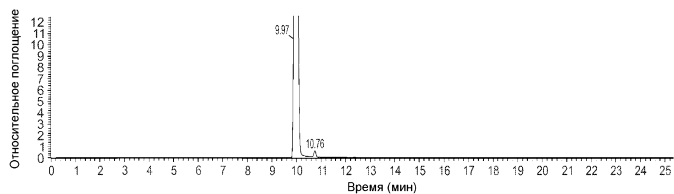


Фиг. 4В

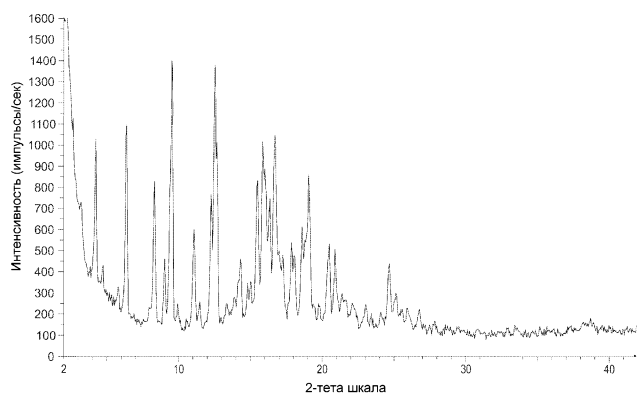
032347



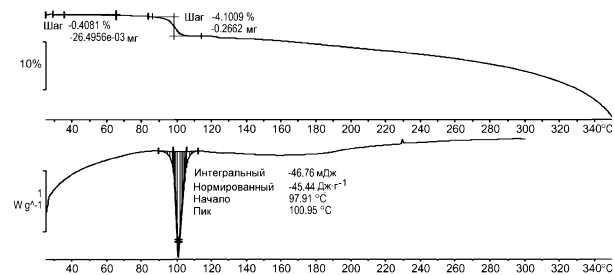
Фиг. 4С



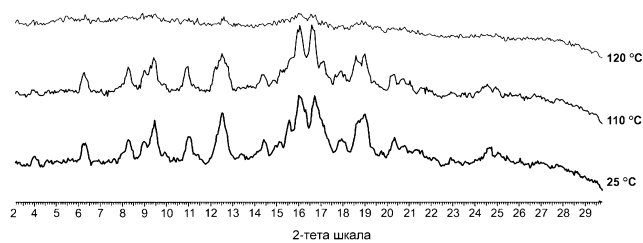
Фиг. 4D



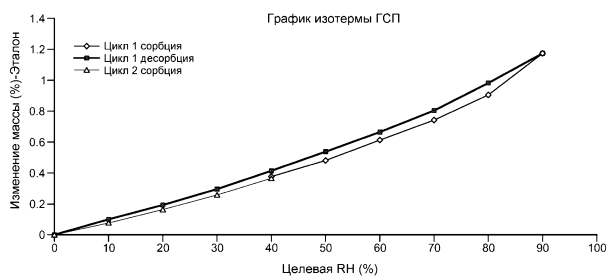
Фиг. 5



Фиг. 6

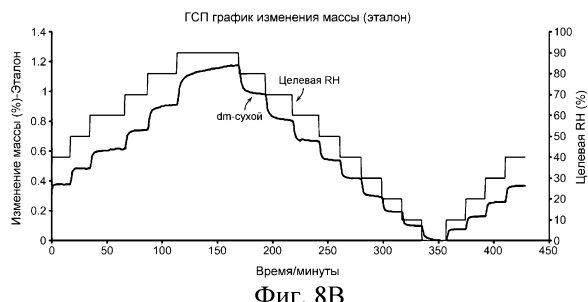


Фиг. 7

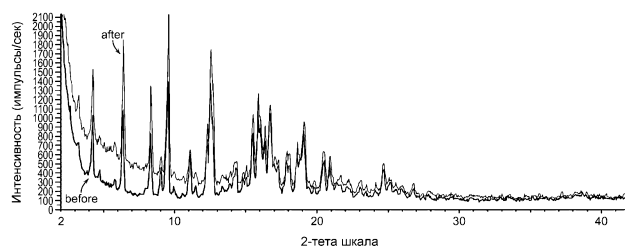


Фиг. 8A

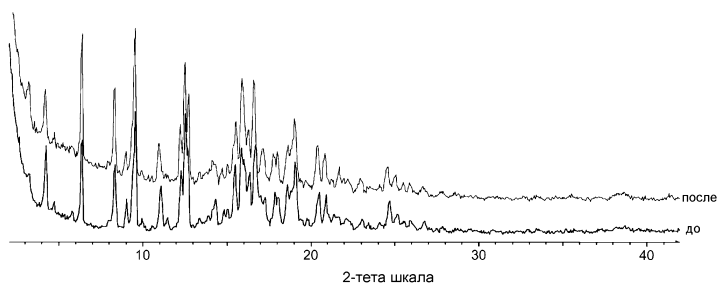
032347



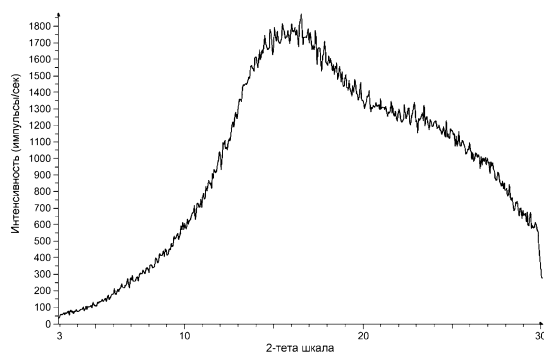
Фиг. 8В



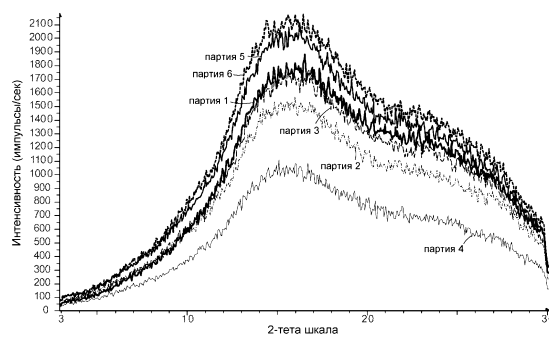
Фиг. 8С



Фиг. 9

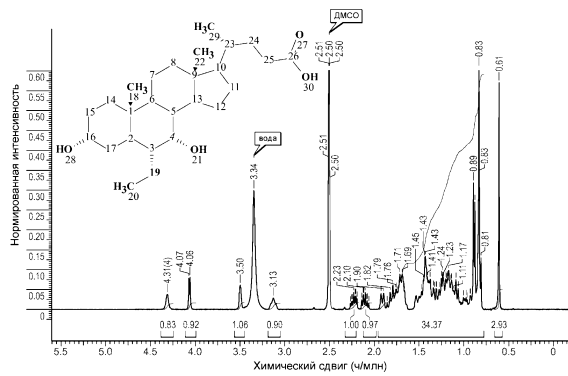


Фиг. 10

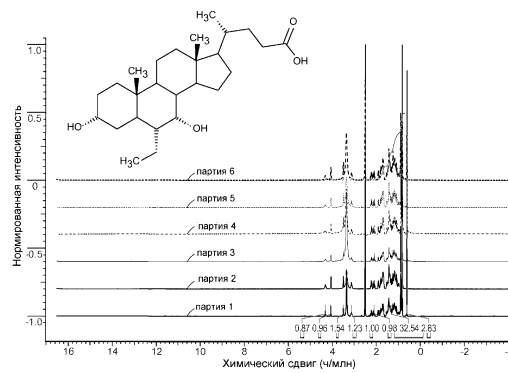


Фиг. 11

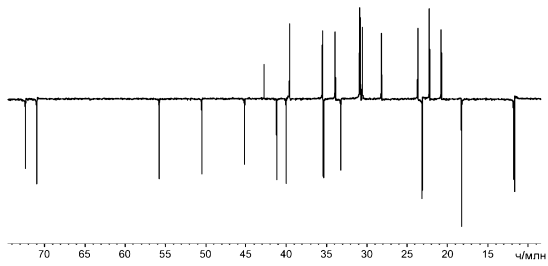
032347



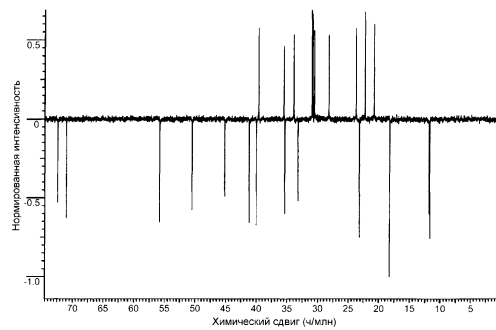
Фиг. 12



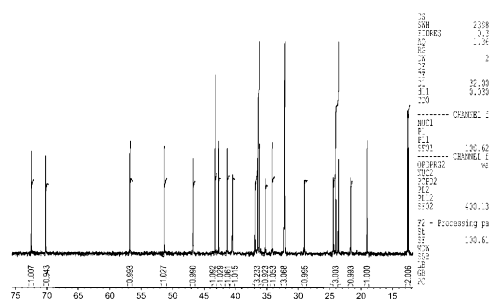
ФИГ. 13



Фиг. 14

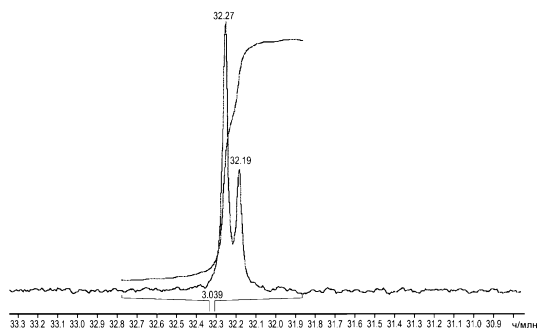


ФИГ. 15

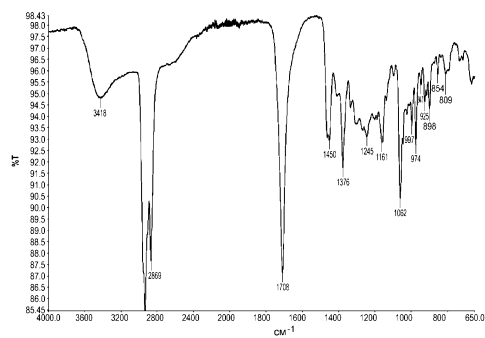


Фиг. 16

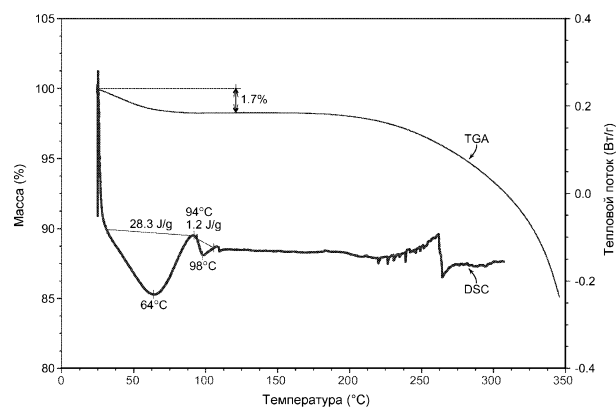
032347



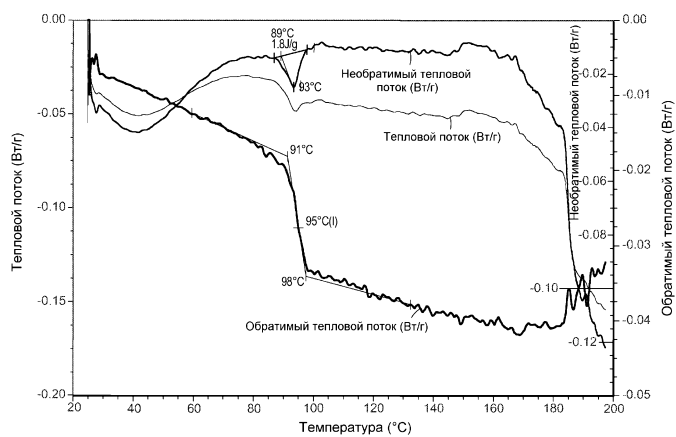
Фиг. 17



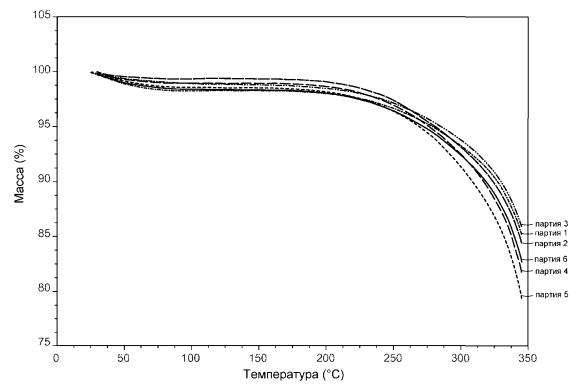
Фиг. 18



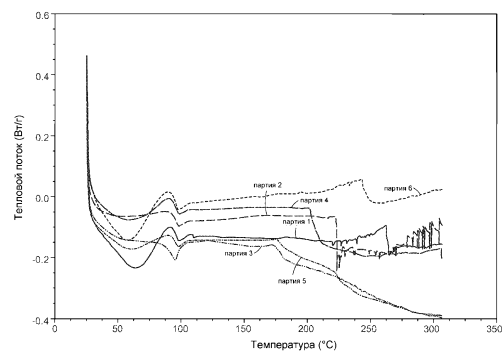
Фиг. 19



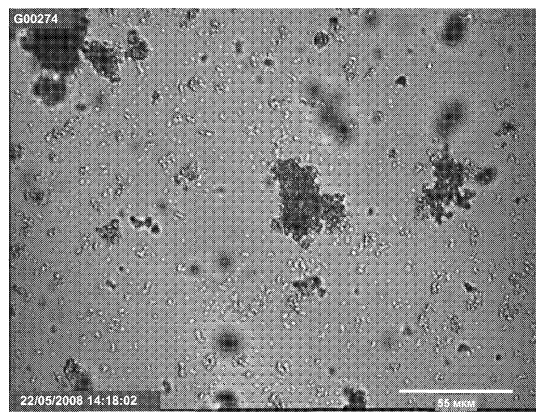
Фиг. 20



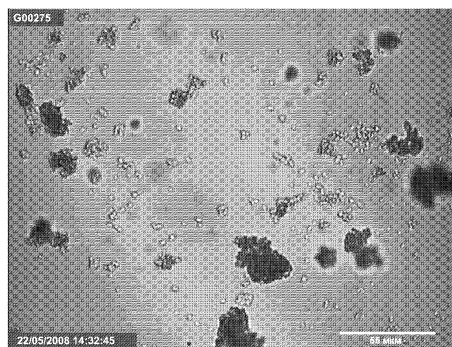
Фиг. 21



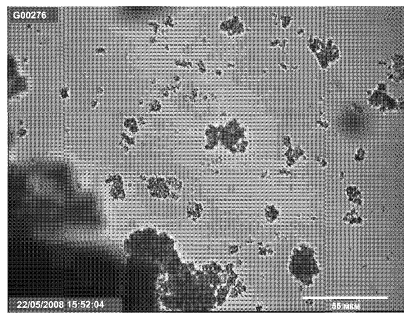
Фиг. 22



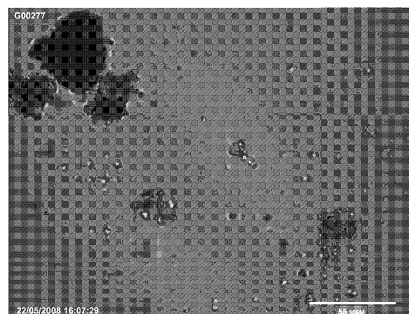
Фиг. 23А



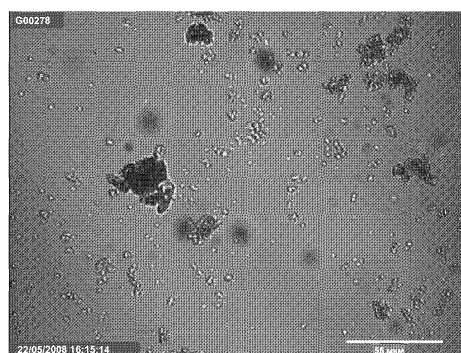
Фиг. 23В



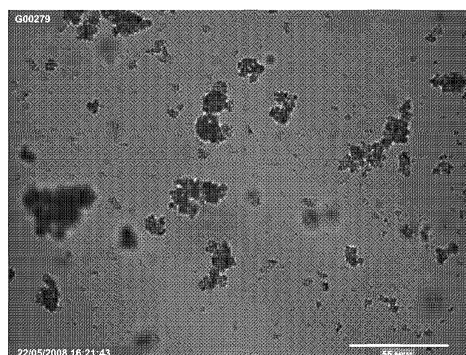
Фиг. 23С



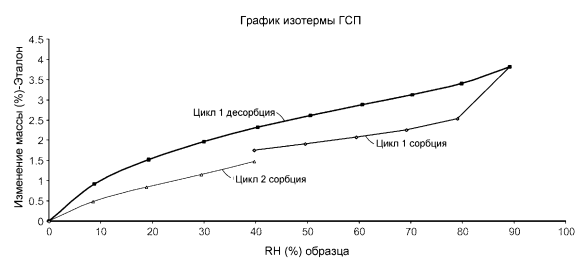
Фиг. 23D



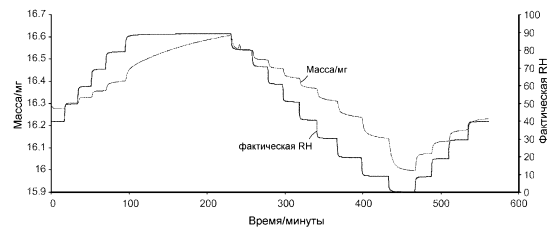
Фиг. 23Е



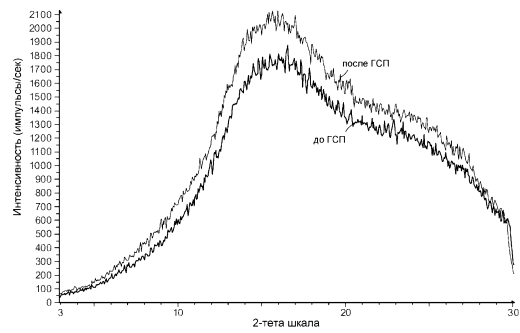
Фиг. 23F



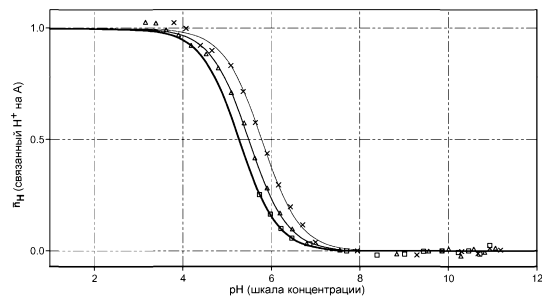
Фиг. 24



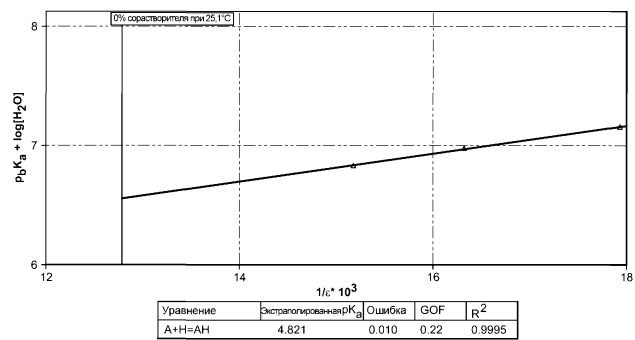
Фиг. 25



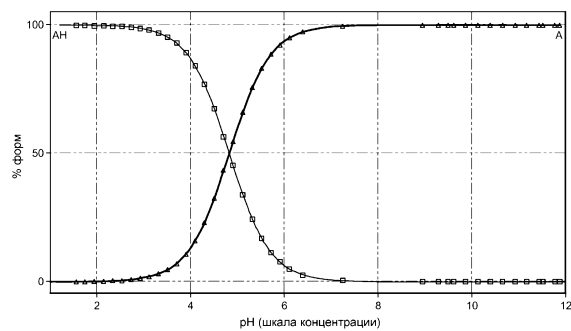
Фиг. 26



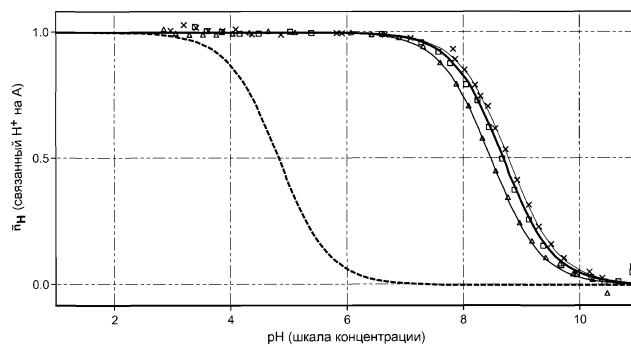
Фиг. 27



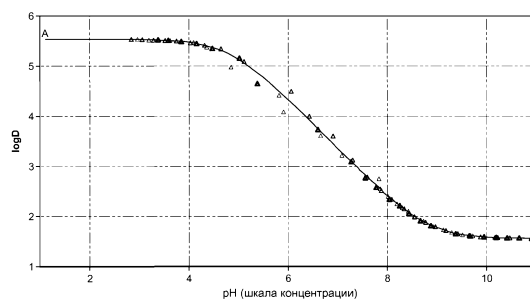
Фиг. 28



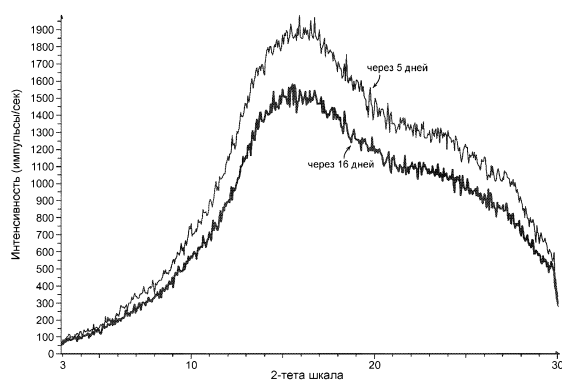
Фиг. 29



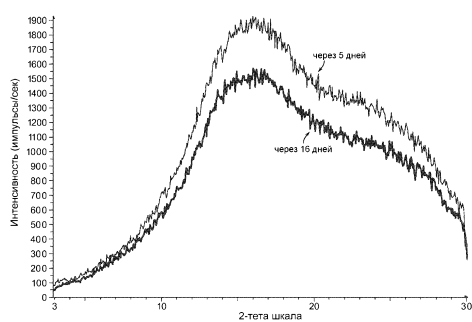
Фиг. 30



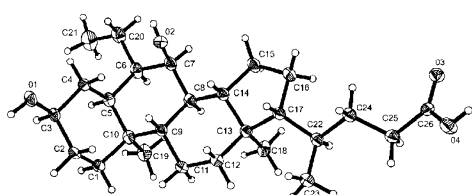
Фиг. 31



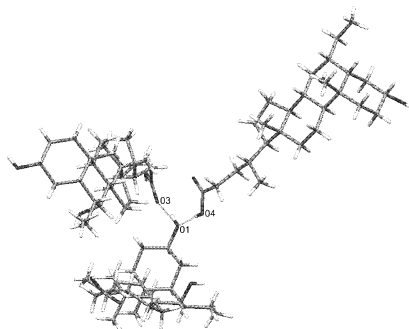
Фиг. 32



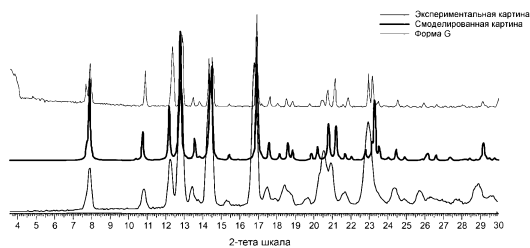
Фиг. 33



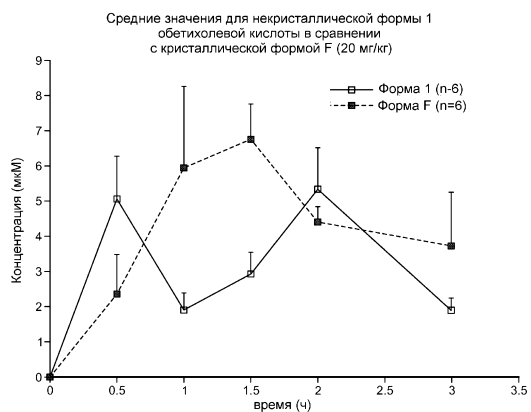
Фиг. 34



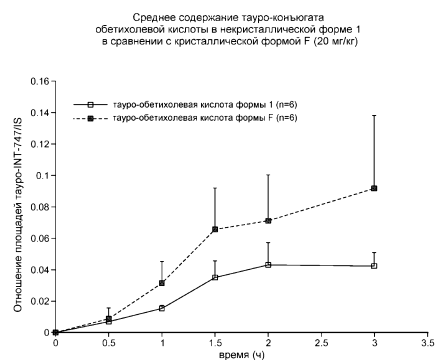
Фиг. 35



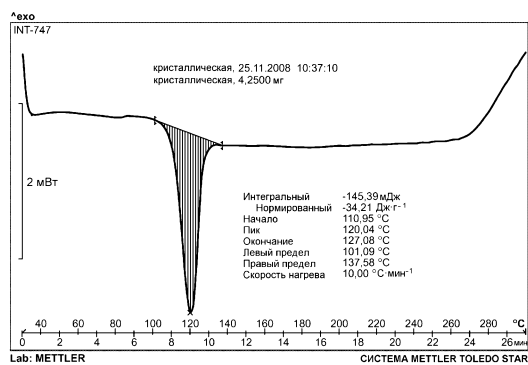
Фиг. 36



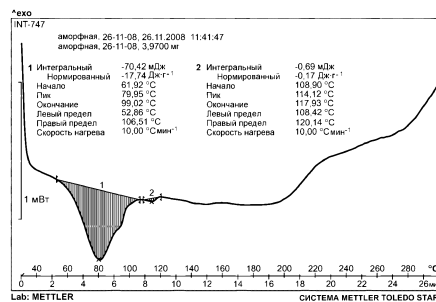
Фиг. 37



Фиг. 38



Фиг. 39



Фиг. 40

