



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0083966
(43) 공개일자 2018년07월23일

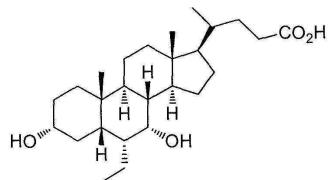
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07J 9/00 (2006.01) *A61K 31/56* (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01) *A61K 9/20* (2006.01)
C07J 51/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07J 9/005 (2013.01)
A61K 31/56 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7020294(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년06월17일
심사청구일자 2018년07월16일
- (62) 원출원 특허 10-2016-7034255
원출원일자(국제) 2013년06월17일
심사청구일자 2016년12월07일
- (85) 번역문제출일자 2018년07월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/046150
- (87) 국제공개번호 WO 2013/192097
국제공개일자 2013년12월27일
- (30) 우선권주장
61/661,531 2012년06월19일 미국(US)

전체 청구항 수 : 총 12 항

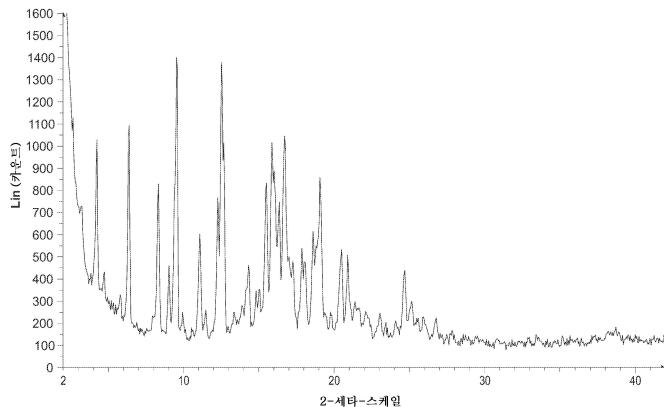
(54) 발명의 명칭 오베티콜산의 제조법, 용도 및 고체 형태

(57) 요 약

본 발명은 하기 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체에 관한 것이다. 오베티콜산은 FXR 매개 질환 또는 상태, 심혈관 질환 또는 담즙정체성 간 질환을 치료 또는 예방하는데, 및 HDL 콜레스테롤을 감소시키는데, 포유동물에서 트리글리세리드를 강하시키는데, 또는 섬유증을 억제하는데 유용하다. 본 발명은 또한 오베티콜산의 합성 방법에 관한 것이다.



대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 31/575 (2013.01)

A61K 9/2054 (2013.01)

C07J 51/00 (2013.01)

(72) 발명자

줄리보아, 에밀리

영국 씨비4 0더블류이 캠브리지 밀톤 로드 캠브리지 사이언스 파크 250 파모픽스 리미티드

레올린스키, 펠리사

미국 92122 캘리포니아주 샌 디에이고 수트 960 라줄라 빌리지 드라이브 4350

그로쓰, 랄프

독일 83064 라우블링 로센하이머 스트라쎄 43 파르마첼 게엠베하

샤프, 엠마

영국 씨비4 0더블류이 캠브리지 밀톤 로드 캠브리지 사이언스 파크 250 파모픽스 리미티드

두바스-피셔, 피오나

영국 씨비4 0더블류이 캠브리지 밀톤 로드 캠브리지 사이언스 파크 250 파모픽스 리미티드

에벌린, 알렉스

영국 씨비4 0더블류이 캠브리지 밀톤 로드 캠브리지 사이언스 파크 250 파모픽스 리미티드

명세서

청구범위

청구항 1

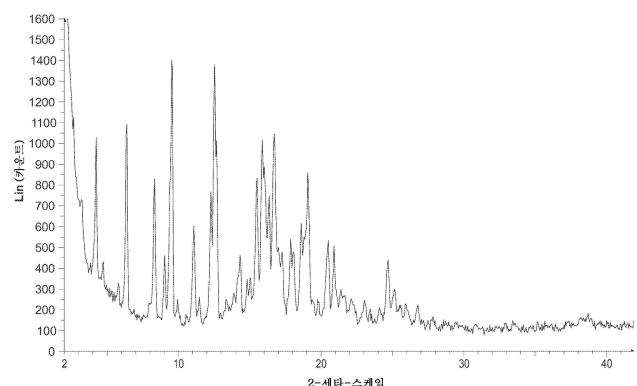
4.2, 6.4, 9.5, 12.5, 및 16.7도 2-세타에서의 피크를 포함하는 X선 분말 회절 패턴을 특징으로 하는, 오베티콜산의 결정질 형태.

청구항 2

제1항에 있어서, 4.2, 6.4, 9.5, 12.5, 15.5, 16.7, 및 19.0도 2-세타에서의 피크를 포함하는 X선 분말 회절 패턴을 특징으로 하는 결정질 형태.

청구항 3

특징적인 피크가 제1항의 피크의 ± 0.2 도 2-세타 내에 있는 것인, 하기 도면 기재의 X선 분말 회절 패턴을 특징으로 하는, 오베티콜산의 결정질 형태.



청구항 4

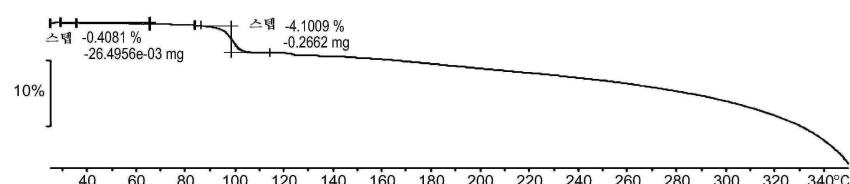
제3항에 있어서, X선 분말 회절 패턴이 Cu K α 방사선을 사용하는 회절계 상에 수집된 것인 결정질 형태.

청구항 5

제1항에 있어서, 98 \pm 2°C에서 흡열 피크를 갖는 시차 주사 열량측정 온도기록도를 특징으로 하는 결정질 형태.

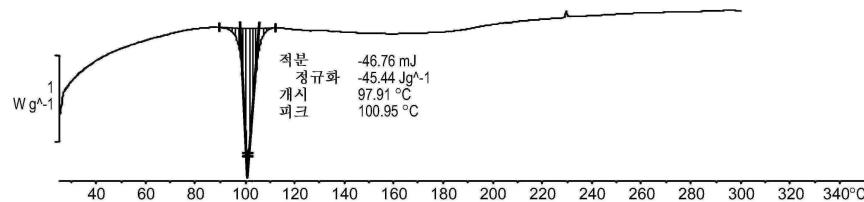
청구항 6

제1항에 있어서, 하기 도면 기재의 시차 주사 열량측정 온도기록도 패턴을 특징으로 하는 결정질 형태.



청구항 7

제1항에 있어서, 하기 도면 기재의 열 중량 분석 온도기록도 패턴을 특징으로 하는 결정질 형태.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 96% 초과의 순도를 갖는 결정질 형태.

청구항 9

제8항에 있어서, 98% 초과의 순도를 갖는 결정질 형태.

청구항 10

제1항에 있어서,

6-에틸우르소테옥시콜산,

3α -히드록시- 6α -에틸-7-케토- 5β -콜란-24-오산,

6β -에틸케노데옥시콜산,

3α , 7α -디히드록시-6-에틸리텐- 5β -콜란-24-오산,

케노데옥시콜산, 및

3α (3α , 7α -디히드록시- 6α -에틸- 5β -콜란-24-오일옥시)- 7α -히드록시- 6α -에틸- 5β -콜란-24-오산

으로부터 선택되는 1종 이상의 불순물을 총 4% 미만으로 갖는 결정질 형태.

청구항 11

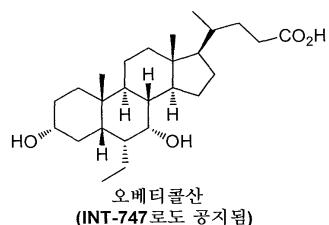
제10항에 있어서, 불순물의 총 백분율이 3.8% 미만인 결정질 형태.

청구항 12

제11항에 있어서, 불순물의 총 백분율이 3.6% 미만인 결정질 형태.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 FXR에 대한 효능제인 오베티콜산, 오베티콜산의 제조 방법, 오베티콜산을 포함하는 제약 제제 및 그의 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

발명의 내용

[0003]

본 발명은 약 4.2, 6.4, 9.5, 12.5 및 16.7도 2-세타에서 특징적인 피크를 포함하는 X선 회절 패턴을 특징으로 하는 결정질 오베티콜산 형태 C에 관한 것이다. 결정질 오베티콜산 형태 C는 도 5에 제시된 것과 실질적으로 유사한 X선 회절 패턴을 특징으로 하며, 약 $98\pm 2^\circ\text{C}$ 에서 흡열 값을 갖는 시차 주사 열량측정 (DSC) 온도기록도를 추가로 특징으로 한다.

[0004]

본 발명은 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0005]

본 발명은 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 NaBH_4 와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계 및 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0006]

본 발명은 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 형성하는 단계; 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 NaBH_4 와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계; 및 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0007]

본 발명은 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 NaOH 와 반응시켜 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 형성하는 단계; E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 형성하는 단계; 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 NaBH_4 와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0008]

본 발명은 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르를 CH_3CHO 와 반응시켜 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 형성하는 단계; E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 NaOH 와 반응시켜 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 형성하는 단계; E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 NaBH_4 와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0009]

본 발명은 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 $\text{Li}[\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2]$ 및 $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$ 과 반응시켜 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르를 형성하는 단계; 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르를 CH_3CHO 와 반응시켜 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 NaOH 와 반응시켜 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 형성하는 단계; E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 NaBH_4 와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0010]

본 발명은 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 CH_3OH 및 H_2SO_4 와 반응시켜 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 형성하는 단계; 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 $\text{Li}[\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2]$ 및 $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$ 과 반응시켜 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르를 형성하는 단계; 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르를 CH_3CHO 와 반응시켜 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 형성하는 단계; E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 NaOH 와 반응시켜 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 형성하는 단계; E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 형성하는 단계; 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 NaBH_4 와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0011] 본 발명은 결정질 오베티콜산 형태 C를 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계가 결정질 오베티콜산 형태 C를 수성 NaOH 용액 중에 용해시키고 HCl을 첨가하는 단계를 포함하는 것인, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명은 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계를 염기성 수용액 중에서 약 85°C 내지 약 110°C의 온도에서 수행하는 것인, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0013] 본 발명은 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 형성하는 단계를 약 100°C 내지 약 105°C의 온도 및 약 4 내지 약 5 bar의 압력에서 수행하는 것인, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0014] 본 발명은 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 NaOH와 반응시켜 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 형성하는 단계를 약 20°C 내지 약 60°C의 온도에서 수행하는 것인, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0015] 본 발명은 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르를 CH₃CHO와 반응시켜 E- 또는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 형성하는 단계를 극성 비양자성 용매 중에서 약 -50°C 내지 약 -70°C의 온도에서 BF₃의 존재 하에 수행하는 것인, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0016] 본 발명은 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 Li[N(CH₃)₂]₂ 및 Si(CH₃)₃Cl과 반응시켜 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르를 형성하는 단계를 극성 비양자성 용매 중에서 약 -10°C 내지 약 -30°C의 온도에서 수행하는 것인, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0017] 본 발명은 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 CH₃OH 및 H₂SO₄와 반응시켜 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르를 형성하는 단계를 약 3시간 동안 가열하며, 반응 혼합물의 pH를 수성 염기성 용액에 의해 약 6.5 내지 약 8.0의 pH-값으로 조정하는 것인, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0018] 본 발명은 약 98% 초과, 약 98.5% 초과, 약 99.0% 초과, 또는 약 99.5% 초과의 효력을 갖는 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체에 관한 것이다. 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 생성된 오베티콜산 형태 1 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명은 유효량의 오베티콜산 형태 1을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 FXR 매개 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 질환 또는 상태는 담도 폐쇄증, 담즙정체성 간 질환, 만성 간 질환, 비알콜성 지방간염 (NASH), C형 간염 감염, 알콜성 간 질환, 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 진행성 섬유증으로 인한 간 손상, 간 섬유증, 및 아테롬성동맥경화증, 동맥경화증, 고콜레스테롤혈증 및 고지혈증을 비롯한 심혈관 질환으로부터 선택된다. 본 발명은 유효량의 오베티콜산 형태 1을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 트리글리세리드를 강하시키는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 1 mg/mL, 주입 부피 3 μ L로 주입된 실시예 1의 단계 4의 조 화합물 5의 HPLC-UV/MS 크로마토그램이다. 크로마토그램은 실시예 2에 기재된 방법에 따라 수득된다.

도 2는 1 mg/mL, 주입 부피 20 μ L로 주입된 정제된 참조물질인 실시예 1의 단계 4의 화합물 5의 HPLC-UV/MS 크로마토그램이다. 크로마토그램은 실시예 2에 기재된 방법에 따라 수득된다.

도 3은 HPLC 방법을 사용한 실시예 1의 단계 4의 조 화합물 5의 UV 크로마토그램이다. 크로마토그램은 실시예 2에 기재된 방법에 따라 수득된다.

도 4a는 HPLC 방법에 의해 순수하게 단리된 실시예 1의 단계 4의 화합물 5의 주요 피크 분획 (RT 29.0 min)으로부터의 m/z 850.61914 ± 3ppm의 정확한 이온 트레이스이다 (실시예 2 참조).

도 4b는 HPLC 방법에 의해 순수하게 단리된 실시예 1의 단계 4의 화합물 5의 부차적 피크 분획 (RT 29.9 min)으로부터의 m/z 850.61914 ± 3ppm의 정확한 이온 트레이스이다 (실시예 2 참조).

도 4c는 실시예 1의 단계 4의 조 화합물 5로부터의 m/z 850.61914 ± 3ppm의 정확한 이온 트레이스이다 (실시예 2 참조).

도 4d는 정제된 참조물질인 실시예 1의 단계 4의 화합물 5로부터의 m/z 850.61914 ± 3ppm의 정확한 이온 트레이스이다 (실시예 2 참조).

도 5는 결정질 오베티콜산 형태 C의 XRPD 회절도이다 (실시예 3 참조).

도 6은 결정질 오베티콜산 형태 C의 TGA 및 DSC 온도기록도를 나타낸다 (실시예 3 참조).

도 7은 25°C, 110°C 및 120°C에서의 결정질 오베티콜산의 VT-XRPD 회절도를 나타낸다 (실시예 3 참조).

도 8a는 결정질 오베티콜산 형태 C의 GVS 등온 플롯이다 (실시예 3 참조).

도 8b는 결정질 오베티콜산 형태 C의 GVS 동역학 플롯이다 (실시예 3 참조).

도 8c는 GVS 분석 이전 및 이후의 결정질 오베티콜산 형태 C의 XRPD 회절도를 나타낸다 (실시예 3 참조).

도 9는 40°C/75% RH에서의 저장 이전 및 이후의 결정질 오베티콜산 형태 C의 XRPD 회절도를 나타낸다 (실시예 3 참조).

도 10은 오베티콜산 형태 1의 배치 1의 XRPD 회절도이다 (실시예 5 참조).

도 11은 오베티콜산 형태 1의 배치 1, 2, 3, 4, 5 및 6에 대한 XRPD 회절도를 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 12는 d₆-DMSO 중의 오베티콜산 형태 1의 배치 1의 NMR 스펙트럼이다 (실시예 5 참조).

도 13은 오베티콜산 형태 1의 배치 1, 2, 3, 4, 5 및 6에 대한 ¹H NMR 스펙트럼을 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 14는 영역 10–75 ppm으로부터의 오베티콜산 형태 1의 ¹³C DEPTQ NMR 스펙트럼의 확대도이다 (실시예 5 참조).

도 15는 영역 0–75 ppm으로부터의 4급 탄소를 숨기는 오베티콜산 형태 1의 ¹³C DEPT135 NMR 스펙트럼의 확대도이다 (실시예 5 참조).

도 16은 오베티콜산 형태 1의 정량적 ¹³C NMR이다 (실시예 5 참조).

도 17은 도 16의 32.3 ppm 피크의 확대도이다 (실시예 5 참조).

도 18은 오베티콜산 형태 1의 배치 1의 FT-IR 스펙트럼이다 (실시예 5 참조).

도 19는 오베티콜산 형태 1의 배치 1의 TGA 및 DSC 온도기록도를 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 20은 오베티콜산 형태 1의 배치 1의 조정된 DSC 온도기록도를 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 21은 오베티콜산 형태 1의 배치 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 TGA 트레이스를 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 22는 오베티콜산 형태 1의 배치 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 DSC 트레이스를 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 23a는 편광 현미경검사 하의 오베티콜산 형태 1의 배치 1의 사진이다. 도 23b는 편광 현미경검사 하의 오베티콜산 형태 1의 배치 2의 사진이다. 도 23c는 편광 현미경검사 하의 오베티콜산 형태 1의 배치 3의 사진이다.

도 23d는 편광 현미경검사 하의 오베티콜산 형태 1의 배치 4의 사진이다. 도 23e는 편광 현미경검사 하의 오베티콜산 형태 1의 배치 5의 사진이다. 도 23f는 편광 현미경검사 하의 오베티콜산 형태 1의 배치 6의 사진이다.

도 24는 오베티콜산 형태 1의 배치 1의 GVS 등온 플롯을 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 25는 오베티콜산 형태 1의 배치 1의 GVS 동역학 플롯을 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 26은 GVS 이전 및 이후의 오베티콜산 형태 1의 배치 1의 XRPD 회절도를 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 27은 오베티콜산 형태 1에 대한 3종의 상이한 메탄올/물 비에서의 pKa의 측정값 그래프이다 (실시예 5 참조).

조).

도 28은 오베티콜산 형태 1에 대한 야스다-쉐드로브스키(Yasuda-Shedlovsky) 플롯이다 (실시예 5 참조).

도 29는 오베티콜산 형태 1에 대한 pH에 의존한 종의 분포를 나타낸 그래프이다 (실시예 5 참조).

도 30은 오베티콜산 형태 1에 대한 전위차측정법에 의해 수득된 차이 곡선을 나타낸 그래프이다 (실시예 5 참조).

도 31은 오베티콜산 형태 1의 친지성 프로파일을 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 32는 40°C/75% RH에서의 저장 이후의 오베티콜산 형태 1의 배치 1의 XRPD 회절도를 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 33은 25°C/97% RH에서의 저장 이후의 오베티콜산 형태 1의 배치 1의 XRPD 회절도를 나타낸다 (실시예 5 참조).

도 34는 비-수소 원자에 대해 50% 확률 수준에서 이방성 원자 변위 타원체를 나타내는 결정 구조로부터의 오베티콜산 형태 G의 분자의 도면을 나타낸다 (실시예 6 참조).

도 35는 오베티콜산 형태 G의 결정 구조의 분자간 수소 결합의 도면을 나타내며, 여기서 수소 결합은 파선으로 제시된다 (실시예 6 참조).

도 36은 모의 분말 패턴, 수집된 결정 및 오베티콜산 형태 G의 실험상 패턴의 XRPD 오버레이를 나타낸다 (실시예 6 참조).

도 37은 오베티콜산 형태 1 및 결정질 형태 F의 20 mg/kg 경구 투여 이후의 혈장 오베티콜산 프로파일 vs. 시간의 그래프를 나타낸다 (실시예 7 참조).

도 38은 투여 이후의 상이한 시간 간격에서 오베티콜산 형태 1 및 결정질 형태 F의 타우로 접합체의 혈장 농도의 그래프를 나타낸다 (실시예 7 참조).

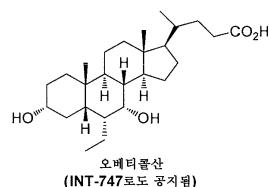
도 39는 형태 1의 DSC 곡선을 나타낸다 (실시예 7 참조).

도 40은 형태 F의 DSC 곡선을 나타낸다 (실시예 7 참조).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

본원은 실질적으로 순수한 오베티콜산을 포함하는, 하기 화학 구조를 갖는 제약 활성 성분인 오베티콜산 (또한 INT-747로도 공지됨):



[0022]

합성 중간체로서 결정질 오베티콜산을 포함하는, 오베티콜산의 제조 방법, 및 오베티콜산을 제조하는 방법에서 오베티콜산 및 합성 중간체의 존재 및 순도를 확인하기 위한 분석 방법에 관한 것이다. 본원은 또한 오베티콜산의 제약 조성물 및 제제, 및 이러한 조성물에 대한 용도를 기재한다.

[0024]

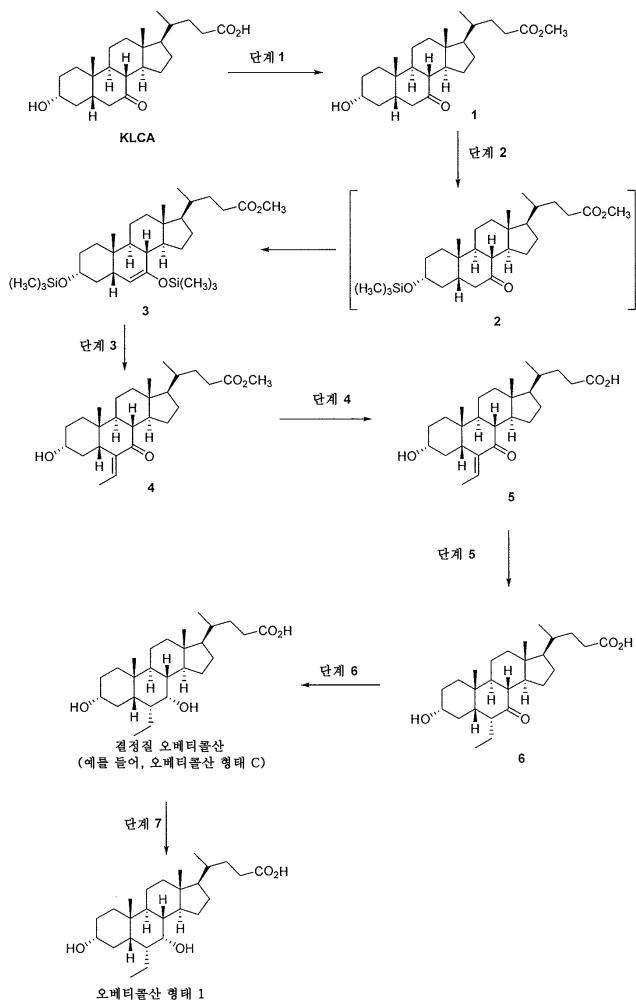
오베티콜산을 제조하는 방법

[0025]

본원은 고도로 순수한 오베티콜산을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 출원 방법은 반응식 1에 제시된다. 방법은 6-단계 합성이며, 고도로 순수한 오베티콜산을 생성하기 위한 1회의 정제 단계가 이어진다.

[0026]

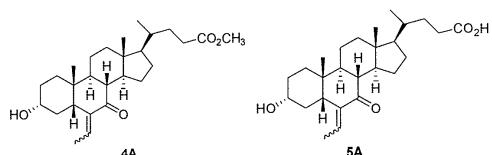
<반응식 1>



[0027]

[0028]

본 발명의 방법은 또한 반응식 1에 따른 방법을 포함하며, 여기서 화합물 4 및 5는 각각 하기 화합물 4A 및 5A의 구조에 의해 예시되는 바와 같은 E 및 Z 이성질체의 혼합물로 구성된다:



[0029]

[0030]

한 실시양태에서, E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4A)의 E/Z 이성질체 비는 약 50%, 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 83% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 93% 초과, 약 95% 초과, 또는 약 99% 초과이다. 한 실시양태에서, E/Z 비는 HPLC에 의해 결정된다. 한 실시양태에서, 비는 약 80% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 83% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 85% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 90% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 93% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 95% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 99% 초과이다.

[0031]

한 실시양태에서, E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)의 E/Z 이성질체 비는 약 50%, 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 83% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 93% 초과, 약 95% 초과, 또는 약 99% 초과이다. 한 실시양태에서, E/Z 비는 HPLC에 의해 결정된다. 한 실시양태에서, 비는 약 80% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 83% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 85% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 90% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 93% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 95% 초과이다. 한 실시양태에서, 비는 약 99% 초과이다.

- [0032] 본 출원 방법은 당업계에 전혀 보고된 적이 없다. 방법은 6-단계 합성이며, 1회의 정제 단계가 이어진다. 단계 1은 산성 촉매작용 및 열의 존재 하에 메탄올을 사용하여 7-케토 리토콜산 (KLCA)의 C-24 카르복실산을 에스테르화하여 메틸 에스테르 화합물 1을 생성한다. 단계 2는 강염기를 사용하여 화합물 1로부터 실릴엔올 에테르를 형성한 다음, 클로로실란으로 처리하여 화합물 3을 생성한다. 단계 3은 실릴엔올 에테르 화합물 3 및 아세트알데히드의 알돌 축합 반응으로 화합물 4 (또는 화합물 4A)를 생성한다. 단계 4는 에스테르 가수분해, 즉 화합물 4 (또는 화합물 4A)의 C-24 메틸 에스테르의 비누화로 카르복실산 화합물 5 (또는 화합물 5A)를 생성한다. 단계 5는 화합물 5 (또는 화합물 5A)의 6-에틸리덴 모이어티의 수소화에 이어 이성질체화하여 화합물 6을 생성한다. 단계 6은 화합물 6의 7-케토 기의 α -히드록시 기로의 선택적 환원으로 결정질 오베틱콜산을 생성한다. 단계 7은 결정질 오베틱콜산의 오베틱콜산 형태 1로의 전환이다.
- [0033] 본 발명의 방법은 합성 중간체로서 오베틱콜산의 결정질 형태를 사용하는, 오베틱콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0034] 한 실시양태에서, 본 발명은 결정질 오베틱콜산을 오베틱콜산 형태 1로 전환시키는 단계를 포함하는, 오베틱콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0035] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0036] 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베틱콜산을 형성하는 단계, 및
- [0037] 결정질 오베틱콜산을 오베틱콜산 형태 1로 전환시키는 단계
- [0038] 를 포함하는, 오베틱콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0039] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0040] E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성하는 단계,
- [0041] 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베틱콜산을 형성하는 단계, 및
- [0042] 결정질 오베틱콜산을 오베틱콜산 형태 1로 전환시키는 단계
- [0043] 를 포함하는, 오베틱콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0044] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0045] E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성하는 단계,
- [0046] 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베틱콜산을 형성하는 단계, 및
- [0047] 결정질 오베틱콜산을 오베틱콜산 형태 1로 전환시키는 단계
- [0048] 를 포함하는, 오베틱콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0049] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0050] E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4A)를 NaOH와 반응시켜 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 형성하는 단계,
- [0051] E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성하는 단계,
- [0052] 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베틱콜산을 형성하는 단계, 및
- [0053] 결정질 오베틱콜산을 오베틱콜산 형태 1로 전환시키는 단계

- [0054] 를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0055] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0056] E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4)를 NaOH와 반응시켜 E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 형성하는 단계,
- [0057] E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성하는 단계,
- [0058] 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및
- [0059] 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계
- [0060] 를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0061] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0062] 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)를 CH₃CHO와 반응시켜 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4A)를 형성하는 단계,
- [0063] E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4A)를 NaOH와 반응시켜 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 형성하는 단계,
- [0064] E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성하는 단계,
- [0065] 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및
- [0066] 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0067] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0068] 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)를 CH₃CHO와 반응시켜 E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4)를 형성하는 단계,
- [0069] E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4)를 NaOH와 반응시켜 E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 형성하는 단계,
- [0070] E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성하는 단계,
- [0071] 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및
- [0072] 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계
- [0073] 를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0074] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0075] 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)를 Li[N(CH₃)₂)₂] 및 Si(CH₃)₃Cl과 반응시켜 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)를 형성하는 단계,
- [0076] 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)를 CH₃CHO와 반응시켜 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4A)를 형성하는 단계,
- [0077] E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4A)를 NaOH와 반응시켜 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 형성하는 단계,

- [0078] E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성하는 단계,
- [0079] 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및
- [0080] 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계
- [0081] 를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0082] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0083] 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)를 Li[N(CH₃)₂)₂] 및 Si(CH₃)₃Cl과 반응시켜 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)를 형성하는 단계,
- [0084] 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)를 CH₃CHO와 반응시켜 E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4)를 형성하는 단계,
- [0085] E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4)를 NaOH와 반응시켜 E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 형성하는 단계,
- [0086] E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성하는 단계,
- [0087] 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및
- [0088] 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계
- [0089] 를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0090] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0091] 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (KLCA)을 CH₃OH 및 H₂SO₄와 반응시켜 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)를 형성하는 단계,
- [0092] 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)를 Li[N(CH₃)₂)₂] 및 Si(CH₃)₃Cl과 반응시켜 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)를 형성하는 단계,
- [0093] 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)를 CH₃CHO와 반응시켜 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4A)를 형성하는 단계,
- [0094] E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4A)를 NaOH와 반응시켜 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 형성하는 단계,
- [0095] E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성하는 단계,
- [0096] 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및
- [0097] 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계
- [0098] 를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0099] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0100] 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (KLCA)을 CH₃OH 및 H₂SO₄와 반응시켜 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)를 형성하는 단계,
- [0101] 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)를 Li[N(CH₃)₂)₂] 및 Si(CH₃)₃Cl과 반응시켜 3 α ,7-

디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)를 형성하는 단계,

[0102] 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)를 CH₃CHO와 반응시켜 E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4)를 형성하는 단계,

[0103] E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4)를 NaOH와 반응시켜 E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 형성하는 단계,

[0104] E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시켜 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성하는 단계,

[0105] 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 NaBH₄와 반응시켜 결정질 오베티콜산을 형성하는 단계, 및

[0106] 결정질 오베티콜산을 오베티콜산 형태 1로 전환시키는 단계

[0107] 를 포함하는, 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0108] 한 실시양태에서, 본 발명은 결정질 오베티콜산을 사용하여 오베티콜산 형태 1을 제조하는 방법에 관한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 결정질 오베티콜산은 형태 C이다. 한 실시양태에서, 결정질 오베티콜산 형태 C는 도 5에 제시된 것과 유사한 X선 회절 패턴을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 결정질 오베티콜산 형태 C는 결정화되며, n-부틸 아세테이트로부터 재결정화된다.

[0109] 단계 1

[0110] 단계 1은 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (KLCA)과 CH₃OH 및 H₂SO₄의 반응으로 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)를 형성한다. 단계 1의 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 약 3시간 동안 가열되며, 반응 혼합물의 pH는 수성 염기성 용액에 의해 약 6.5 내지 약 8.0의 pH-값으로 조정된다. 한 실시양태에서, 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)의 단리는 활성탄에 의한 처리를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)의 단리는 활성탄에 의한 처리를 추가로 포함하지 않는다. 한 실시양태에서, 활성탄에 의한 처리의 부재 하의 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)의 단리는 높은 수율을 제공한다. 한 실시양태에서, 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (1)을 CH₃OH 및 H₂SO₄와 반응시키는 것은 메탄올 중에서 수행된다. 한 실시양태에서, 염기성 용액은 수성 NaOH 용액이다. 한 실시양태에서, pH-값은 약 7.0 내지 약 7.5이다.

[0111] 한 실시양태에서, 메틸 알콜은 메틸화 시약으로서 뿐만 아니라 반응 용매로서 작용한다. 한 실시양태에서, 생성물을 함유하는 용액은 활성탄으로 약 30분 동안 처리되고, 여과되어 탄소 고체가 제거된다. 한 실시양태에서, 생성물을 함유하는 용액은 활성탄으로 처리되지 않는다. 생성물을 침전시키기 위해, 약 5°C 내지 약 20°C의 물 및 시딩 물질이 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 물은 약 10°C 내지 약 15°C이다. 한 실시양태에서, 생성물은 원심분리에 의해 단리되고, 메탄올 및 물의 혼합물에 의해 세척된다. 한 실시양태에서, 습윤 물질의 수분 함량은 칼 피셔 (KF: Karl Fischer)에 의해 정량화된다. 한 실시양태에서, 물질은 후속 단계에서의 사용 이전에 텁블 건조기에서 건조된다. 한 실시양태에서, 물질은 후속 단계에서의 사용 이전에 건조되지 않는다.

[0112] 단계 2

[0113] 단계 2는 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)와 Li[N(CH₃)₂]₂ 및 Si(CH₃)₃Cl의 반응으로 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)를 형성한다. 한 실시양태에서, 단계 2는 극성 비양자성 용매 중에서 약 -10°C 내지 약 -30°C의 온도에서 수행된다. 한 실시양태에서, 극성 비양자성 용매는 테트라히드로푸란이다. 한 실시양태에서, 온도는 약 -20°C 내지 약 -25°C이다. 한 실시양태에서, 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)를 Li[N(CH₃)₂]₂ 및 Si(CH₃)₃Cl과 반응시키는 것은 약 2시간 동안 교반된다.

[0114] 한 실시양태에서, 화합물 1은 불활성 조건 하에서 반응기에 충전된다. 또 다른 실시양태에서, 약 65°C 및 정상 압력에서의 반복된 공비 증류에 의해 잔류 물 및 메탄올이 제거된다. 또 다른 실시양태에서, 필요에 따라 THF가 잔류물에 첨가되고, 증류가 약 4회 반복된다. 또 다른 실시양태에서, 증류는 약 3회, 약 2회 또는 약 1회 반복된다. 한 실시양태에서, 생성물을 함유하는 나머지 용액은 ≤ 0.05%의 최종 수분 함량을 갖는다 (칼 피셔

적정). 물은 클로로트리메틸실란을 가수분해할 수 있으며, 이는 이 단계의 후반에 첨가된다. 한 실시양태에서, 생성물의 용액은 약 -10°C 내지 약 -30°C로 사전에 냉각된 다음 클로로트리메틸실란이 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 용액은 약 -20°C 내지 약 -25°C로 사전에 냉각된다. 한 실시양태에서, 강염기 및 THF는 별개의 반응기에 충전되며, 약 -10°C 내지 약 -30°C로 냉각된다. 한 실시양태에서, 강염기는 리튬 디이소프로필아미드이다. 또 다른 실시양태에서, 반응기는 불활성, 예를 들어 질소 또는 아르곤 분위기 하이다. 또 다른 실시양태에서, 염기 및 THF 용액은 약 -20°C 내지 약 -25°C로 냉각된다. 한 실시양태에서, 건조 냉각된 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르, THF 및 클로로트리메틸실란 용액은 약 -10°C 내지 약 -30°C에서 염기성 용액에 충전된다. 또 다른 실시양태에서, 온도는 약 -20°C 내지 약 -25°C이다. 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 약 2시간 동안 교반된다. 한 실시양태에서, 후처리를 위해, 반응 혼합물은 사전에 냉각된 산성 용액에 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 산성 용액은 수성 시트르산 용액이다. 한 실시양태에서, 첨가 후에, 수성 상이 분리되고 벼려진다. 한 실시양태에서, 용액은 약 50°C에서의 진공 증류에 의해 유기 상으로부터 제거된다. 한 실시양태에서, 단리된 잔류물은 3 α ,7 α -디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르(3)이며, 이는 '그대로' 후속 단계에서 사용된다. 대안적으로, 화합물 3은 단계 3 이전에 정제될 수 있다.

[0115]

단계 3

[0116]

단계 3은 3 α ,7-디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르(3)와 CH₃CHO의 반응으로 3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르(4)를 형성한다. 한 실시양태에서, 단계 3은 약 -50°C 내지 약 -70°C의 온도에서 BF₃의 존재 하에 극성 비양자성 용매 중에서 수행된다. 한 실시양태에서, 극성 비양자성 용매는 디클로로메탄이다. 한 실시양태에서, BF₃은 아세토니트릴 중의 16 중량% 용액이다. 한 실시양태에서, 온도는 약 -60°C 내지 약 -65°C이다.

[0117]

한 실시양태에서, 극성 비양자성 용매 중의 화합물 3이 불활성 반응기에 충전된다. 또 다른 실시양태에서, 극성 비양자성 용매는 이전 단계로부터의 잔류 용매(예를 들어, THF)이다. 한 실시양태에서, THF는 잔류 물 및 디이소프로필아민의 증류를 용이하게 하기 위해 첨가된다. 약 50°C의 최대 온도에서, 극성 비양자성 용매의 잔류 양은 진공 하에 증류된다. 화합물 3을 함유하는 잔류물 내의 수분 함량은 ≤ 0.5%로 제한된다(칼 피셔 적정). 화합물 3을 함유하는 잔류물은 이어서 극성 비양자성 용매 중에 용해되고, 약 -50°C 내지 약 -70°C로 사전에 냉각된다. 극성 비양자성 용매는 디클로로메탄이다. 또 다른 실시양태에서, 극성 비양자성 용매 중의 화합물 3의 함유하는 잔류물은 약 -60°C 내지 약 -65°C로 사전에 냉각된다. 아세트알데히드(CH₃CHO)가 첨가된다. 극성 비양자성 용매 및 삼플루오린화붕소(BF₃) 용매화 복합체가 별개의 반응기에 충전되고, 이어서 약 -50°C 내지 약 -70°C로 냉각된다. 또 다른 실시양태에서, 극성 비양자성 용매는 디클로로메탄이다. 또 다른 실시양태에서, 삼플루오린화붕소 용매화 복합체는 삼플루오린화붕소 아세토니트릴 복합체이다. BF₃ 용액의 온도는 약 -60°C 내지 약 -65°C이다. 화합물 3 및 아세트알데히드를 함유하는 용액은 약 -60°C 내지 약 -65°C에서 BF₃ 용액에 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 화합물 3 및 아세트알데히드를 함유하는 용액은 건성이다. 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 약 2시간 동안 약 -60°C 내지 약 -65°C에서 교반되고, 약 23°C 내지 약 28°C로 가열되고, 또 다른 약 2시간 동안 교반되고, 가수분해/후처리를 위해 약 2°C 내지 약 10°C로 냉각된다. 한 실시양태에서, 첨가 및 교반을 위한 총 시간은 약 4시간이다. 한 실시양태에서, 후처리를 위해, 반응기로부터 냉각된 용액이 사전에 냉각된 수성 염기성 용액에 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 수성 염기성 용액은 약 50 중량% 수산화나트륨(NaOH; 가성 소다)이다. 한 실시양태에서, 상이 분리되고, (하부) 유기 상은 별개의 반응 기로 옮겨진다. 한 실시양태에서, 유기 층으로부터 용매는 가능한 한 최대(NMT) 50°C의 온도에서 증류에 의해 제거된다. 한 실시양태에서, 잔류물은 3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르(4) 및 일부 나머지 아세토니트릴 및 디클로로메탄을 포함한다. 단계 4는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르(4A)를 형성할 수 있는 것으로 이해된다. 단계 3의 생성물은 단계 4에서 바로 사용된다.

[0118]

단계 4

[0119]

단계 4는 3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르(4)와 NaOH의 반응으로 E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산(5)을 형성한다. 한 실시양태에서, 단계 4 이전에, 단계 3으로부터의 잔류물은 약 45°C 내지 약 60°C로 가열되어 용매의 잔류 양이 제거된다. 한 실시양태에서, 온도는 약 49°C 내지 약 55°C이다. 한 실시양태에서, 3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르(4)를 NaOH와 반응시키는 에스테르 가수분해 반응은 메탄올, 물 및 NaOH 용액 중에서 약 20°C 내지 약 25°C에서 수행

된다.

[0120]

한 실시양태에서, 3α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4)를 반응시키는 것은 반응기에 충전된다. 또 다른 실시양태에서, 반응기는 불활성, 예를 들어 질소 또는 아르곤 분위기 하이다. NMT 50°C의 온도에서, 용매의 잔류 양은 진공 하에 증류된다. 한 실시양태에서, 잔류물은 약 45°C 내지 약 60°C로 가열된다. 또 다른 실시양태에서, 잔류물은 약 49°C 내지 약 55°C로 가열된다. 또 다른 실시양태에서, 단계 3으로부터의 잔류물 (화합물 4)은 메탄올 및 물 및 수성 염기성 용액 중에 용해된다. 또 다른 실시양태에서, 수성 염기성 용액은 약 50 중량% 수산화나트륨 (NaOH; 가성 소다)이다. 단계 4의 에스테르 가수분해 반응은 약 20°C 내지 약 60°C에서 수행되며, 가수분해 반응이 완료될 때까지 교반된다. 한 실시양태에서, 에스테르 가수분해는 약 20°C 내지 약 25°C에서 수행된다. 반응 혼합물의 pH는 그것이 > 12인지 확인하기 위해 체크된다. pH가 < 12인 경우에, 추가의 NaOH가 첨가된다. 반응 혼합물은 물로 희석되고, 온도는 약 20°C 내지 약 35°C로 조정된다. 또 다른 측면에서, 반응 혼합물은 물로 희석되고, 온도는 약 25°C 내지 약 35°C로 조정된다. 한 실시양태에서, 후처리를 위해, 상이 분리되고, 하부 수성 층은 별개의 반응기로 옮겨지고, 유기 층은 버려진다. 화합물 5는 수성 상 내에 존재한다. 한 실시양태에서, 수성 층에 대한 집중 교반 하에, 화합물 5를 함유하는 수성 상에 에틸 아세테이트 및 산이 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 산은 수성 시트르산 용액이다. 한 실시양태에서, 상은 분리되고, 하부 수성 층은 버려진다. 화합물 5는 유기 층 내에 존재한다. 한 실시양태에서, 에틸 아세테이트는 유기 층으로부터 증류되고, 에틸 아세테이트로 대체된다. 한 실시양태에서, 증류는 증류물의 수분 함량이 NMT 1%일 때까지 또는 일정한 비점에 도달할 때까지 반복된다. 한 실시양태에서, 혼탁액은 약 10°C 내지 약 30°C로 냉각되고, 단리되고, 에틸 아세테이트로 세척된다. 또 다른 실시양태에서, 화합물 5를 함유하는 생성된 혼탁액은 약 20°C 내지 약 25°C로 냉각된다. 한 실시양태에서, 생성된 생성물을 건조시키는 것은 약 60°C에서 진공 (예를 들어 텀블 건조기) 하에 이루어진다.

[0121]

한 실시양태에서, 조 $E-3\alpha$ -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)은 에탄올을 사용하여 결정화된다. 한 실시양태에서, 에탄올 및 조 화합물 5는 반응기에 충전된다. 또 다른 실시양태에서, 반응기는 불활성이다. 한 실시양태에서, 조 화합물 5를 용해시키기 위해, 혼합물은 환류 하에 가열된다. 한 실시양태에서, 혼합물은 약 15°C에서 약 20°C로의 제어된 냉각 경사로 냉각된다. 한 실시양태에서, 결정질 화합물 5는 원심분리를 사용하여 단리된 다음, 에틸 아세테이트로 세척된다. 한 실시양태에서, 결정질 화합물 5를 건조시키는 것은 진공 (예를 들어 텀블 건조기) 하에 약 60°C에서 이루어진다. 정제된 화합물 5의 검정, 순도 및 수분을 측정하기 위해 샘플이 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 정제된 화합물 5는 3α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산의 E 및 Z 이성질체를 둘 다 함유한다. 한 실시양태에서, E 대 Z 비는 약 99:1, 약 98:2, 약 95:5, 약 90:10, 약 85:15, 약 80:20, 약 75:25, 약 70:30, 약 65:35, 약 60:40, 약 55:45 또는 약 50:50이다. 정제된 화합물 5의 확인 및 특성화와 관련한 모든 세부사항에 대해서는 실시예 2를 참조한다.

[0122]

단계 4는 또한 E/Z 이성질체의 혼합물인 화합물로 출발하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 단계 4는 E/Z- 3α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4A)와 NaOH의 반응으로 E/Z- 3α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 형성한다. 한 실시양태에서, 단계 4 이전에, 단계 3으로부터의 잔류물은 약 45°C 내지 약 60°C에서 가열되어 용매의 잔류 양이 제거된다. 한 실시양태에서, 온도는 약 49°C 내지 약 55°C이다. 한 실시양태에서, E/Z- 3α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4A)를 NaOH 와 반응시키는 것을 수반하는 에스테르 가수분해 반응은 메탄올, 물 및 NaOH 용액 중에서 약 20°C 내지 약 25°C에서 수행된다. 한 실시양태에서, NaOH 용액은 50 중량% 수용액이다.

[0123]

한 실시양태에서, E/Z- 3α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4A)를 반응시키는 것은 반응기에 충전된다. 또 다른 실시양태에서, 반응기는 불활성, 예를 들어 질소 또는 아르곤 분위기 하이다. NMT 50°C의 온도에서, 용매의 잔류 양은 진공 하에 증류된다. 한 실시양태에서, 잔류물은 약 45°C 내지 약 60°C로 가열된다. 한 실시양태에서, 온도는 약 49°C 내지 약 55°C이다. 한 실시양태에서, 단계 3으로부터의 잔류물 (화합물 4A)은 메탄올 및 물 및 수성 염기성 용액 중에 용해된다. 또 다른 실시양태에서, 수성 염기성 용액은 약 50 중량% 수산화나트륨 (NaOH; 가성 소다)이다. 단계 4의 에스테르 가수분해 반응은 약 20°C 내지 약 60°C에서 수행되며, 가수분해 반응이 완료될 때까지 교반된다. 한 실시양태에서, 에스테르 가수분해는 약 20°C 내지 약 25°C에서 수행된다. 반응 혼합물의 pH는 그것이 > 12인지 확인하기 위해 체크된다. pH가 < 12인 경우에, 추가의 NaOH가 첨가된다. 반응 혼합물은 물로 희석되고, 온도는 약 25°C 내지 약 35°C로 조정된다. 한 실시양태에서, 후처리를 위해, 상이 분리되고, 하부 수성 층은 별개의 반응기로 옮겨지고, 유기 층은 버려진다. 화합물 5A는 수성 상 내에 존재한다. 한 실시양태에서, 수성 층에 대한 집중 교반 하에, 화합물 5A를 함유하는 수성 상에 에틸 아세테이트 및 산이 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 산은 수성 시트르산 용액이다. 한 실시

양태에서, 상은 분리되고, 하부 수성 층은 버려진다. 화합물 5A는 유기층 내에 존재한다. 한 실시양태에서, 에틸 아세테이트는 유기 층으로부터 중류되고, 에틸 아세테이트로 대체된다. 한 실시양태에서, 중류는 중류물의 수분 함량이 NMT 1%일 때까지 또는 일정한 비점에 도달할 때까지 반복된다. 한 실시양태에서, 혼탁액은 약 10°C 내지 약 30°C로 냉각되고, 단리되고, 에틸 아세테이트로 세척된다. 또 다른 실시양태에서, 화합물 5A를 함유하는 생성된 혼탁액은 약 20°C 내지 약 25°C로 냉각된다. 한 실시양태에서, 생성된 생성물을 건조시키는 것은 약 60°C에서 진공 (예를 들어 텀블 건조기) 하에 이루어진다. 화합물 5A는 정제 없이 단계 5로 이어질 수 있다.

[0124] 한 실시양태에서, 조 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)은 에탄올을 사용하여 결정화 된다. 한 실시양태에서, 에탄올 및 조 화합물 5A는 반응기에 충전된다. 또 다른 실시양태에서, 반응기는 불활성이다. 한 실시양태에서, 조 화합물 5A를 용해시키기 위해, 혼합물은 환류 하에 가열된다. 한 실시양태에서, 혼합물은 약 15°C에서 약 20°C로의 제어된 냉각 경사로 냉각된다. 한 실시양태에서, 결정질 화합물 5A는 원심분리를 사용하여 단리된 다음, 에틸 아세테이트로 세척된다. 한 실시양태에서, 결정질 화합물 5A를 건조시키는 것은 진공 (예를 들어 텀블 건조기) 하에 약 60°C에서 이루어진다. 한 실시양태에서, 단계 4의 단리된 결정질 생성물을 화합물 5이다.

대안적 단계 4

[0125] 화합물 5는 대안적 방법에 따라 제조될 수 있다. 한 실시양태에서, 화합물 4는 불활성 반응기에 충전된다. 약 50°C (최대)에서, 용매 (예를 들어, 아세토니트릴, 디클로로메탄)의 잔류 양은 진공 하에 중류될 수 있다. 잔류물은 메탄올 중에 용해되고 냉각된다. 수돗물 및 가성 소다 (50 중량% NaOH)가 첨가된다. 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 약 20°C 내지 약 25°C에서 약 4시간 동안 교반된다. 용액은 수돗물로 희석되고, 톨루엔이 첨가된다. 교반 후에, 상이 분리되고, 하부 수성 층이 불활성 반응기로 옮겨진다. 유기 층은 버려진다. 아세트산 에틸에스테르 및 시트르산 용액이 집중 교반 동안 수성 층에 첨가된다. 상은 분리되고, 하부 수성 층은 버려진다. 유기 층은 불활성 반응기로 옮겨진다. 유기 층으로부터, 아세트산 에틸에스테르가 중류되며, 아세트산 에틸 에스테르로 대체된다. 한 실시양태에서, 이러한 작업은 중류물의 수분 함량이 최대 약 1%일 때까지 또는 일정한 비점에 도달할 때까지 반복된다. 본 혼탁액은 약 20°C 내지 약 25°C로 냉각되고, 화합물 5는 단리되고, 불활성 원심분리 하에 아세트산 에틸에스테르로 세척된다. 건조는 텀블 건조기에서 진공 및 대략 60°C 하에 이루어진다.

[0126] 이러한 대안적 단계 4는 또한 E/Z 이성질체의 혼합물인 화합물로 출발하여 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 화합물 4A는 불활성 반응기에 충전된다. 약 50°C (최대)에서, 용매 (예를 들어, 아세토니트릴, 디클로로메탄)의 잔류 양은 진공 하에 중류될 수 있다. 잔류물은 메탄올 중에 용해되고 냉각된다. 수돗물 및 가성 소다 (50 중량% NaOH)가 첨가된다. 한 실시양태에서, 반응 혼합물은 약 20°C 내지 약 25°C에서 대략 4시간 동안 교반된다. 용액은 수돗물로 희석되고, 톨루엔이 첨가된다. 교반 후에, 상이 분리되고, 하부 수성 층이 불활성 반응기로 옮겨진다. 유기 층은 버려진다. 아세트산 에틸에스테르 및 시트르산 용액이 집중 교반 동안 수성 층에 첨가된다. 상은 분리되고, 하부 수성 층은 버려진다. 유기 층은 불활성 반응기로 옮겨진다. 유기 층으로부터, 아세트산 에틸에스테르는 중류되고, 아세트산 에틸에스테르로 대체된다. 한 실시양태에서, 이러한 작업은 중류물의 수분 함량이 최대 약 1%일 때까지 또는 일정한 비점에 도달할 때까지 반복된다. 본 혼탁액은 20°C 내지 25°C로 냉각되고, 화합물 5A는 단리되고, 불활성 원심분리 하에 아세트산 에틸에스테르로 세척된다. 건조는 텀블 건조기에서 진공 및 대략 60°C 하에 이루어진다.

단계 5

[0127] 단계 5는 E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)과 Pd/C 및 수소 기체의 반응으로 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성한다. 단계 5는 1 상으로 (수소화 및 이성질체화가 함께) 또는 2 상으로 (수소화에 이어 이성질체화) 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 단계 5는 약 90°C 내지 약 110°C의 온도 및 약 4 내지 약 5 bar의 압력에서 수행된다. 한 실시양태에서, 후처리 동안, 반응 혼합물의 유기 상은 활성탄으로 처리된다. 한 실시양태에서, 압력은 약 4.5 내지 약 5.5 bar이다. 또 다른 실시양태에서, 압력은 약 5 bar이다. 한 실시양태에서, 수소화 반응 혼합물은 약 1시간 동안 교반되도록 한다. 한 실시양태에서, E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시키는 것은 약 100°C로 가열되고, 약 2시간 내지 약 5시간 동안 교반된다. 한 실시양태에서, E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시키는 것은 약 100°C로 가열되고 약 3시간 동안 교반된다.

[0128] 한 실시양태에서, E-3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시키는

것은 염기성 용액의 존재 하에 수행된다. 한 실시양태에서, 염기성 용액은 50 중량% 수산화나트륨 (NaOH; 가성 소다) 용액이다. 수소화 반응 이후에, 반응 혼합물은 약 100°C로 가열된 다음 (C-6 위치의 베타 배위로부터 알파 배위로의 이성질체화를 수행하기 위함) 약 40°C 내지 약 50°C로 냉각된다. 후처리를 위해, Pd/C가 여과된다. 한 실시양태에서, 여과물에 n-부틸 아세테이트 및 산이 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 산은 염산 (HCl)이다. pH-값을 체크하여 수성 상이 산성인 것을 확인한 후에 이를 분리하고 버린다. 생성물을 함유하는 유기 상은 활성탄으로 처리된다. 한 실시양태에서, 활성탄은 여과되고, 생성물을 함유하는 생성된 여과물은 중류에 의해 응축되고, 생성된 혼탁액은 약 10°C 내지 약 30°C로 냉각된다. 또 다른 실시양태에서, 혼탁액은 약 15°C 내지 약 20°C로 냉각된다. 화합물 6을 함유하는 혼탁액은 단리되고, n-부틸 아세테이트로 세척된다. 화합물 6은 압력 필터를 사용하여 여과된다. 한 실시양태에서, 건조는 약 80°C에서 진공 하에 압력 필터에서 이루어진다.

[0131]

단계 5의 한 실시양태에서, E-3 α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5), 물, NaOH 용액 (예를 들어 50 중량%) 및 Pd/C는 H₂ 기체 약 5 bar 및 약 100°C 내지 약 105°C의 온도에서 H₂ 흡수가 중단될 때까지 혼합된다. 반응 혼합물은 약 40°C 내지 약 50°C로 냉각되고, Pd/C는 여과된다. 이어서 n-부틸 아세테이트 및 HCl이 화합물 6을 함유하는 용액에 첨가된다. 한 실시양태에서, 수성 상은 분리되고 버려진다. 화합물 6을 함유하는 유기 상은 활성탄으로 처리된다. 탄소는 여과되고, 여과물은 또 다른 반응기로 옮겨져서, 중류에 의해 감량된 다음, 혼탁액은 약 5°C 내지 약 20°C로 냉각된다. 한 실시양태에서, 화합물 6은 여과를 통해 단리되고, 여과물은 약 80°C에서 진공 하에 압력 필터 상에서 건조된다.

[0132]

단계 5는 또한 E/Z 이성질체의 혼합물인 화합물로 출발하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 단계 5는 E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)과 Pd/C 및 수소 기체 및 열의 반응으로 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)을 형성한다. 단계 5는 1 상으로 (수소화 및 이성질체화가 함께) 또는 2 상으로 (수소화에 이어 이성질체화) 수행될 수 있다. 한 측면에서, 단계 5는 약 90°C 내지 약 110°C의 온도 및 약 4 내지 약 5 bar의 압력에서 수행된다. 한 실시양태에서, 후처리 동안, 반응 혼합물의 유기 상은 활성탄으로 처리된다. 한 실시양태에서, 압력은 약 4.5 내지 약 5.5 bar이다. 또 다른 실시양태에서, 압력은 약 5 bar이다. 한 실시양태에서, 수소화 반응 혼합물은 약 1시간 동안 교반되도록 한다. 한 실시양태에서, E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시키는 것은 약 100°C로 가열되고, 약 2시간 내지 약 5시간 동안 교반된다. 한 실시양태에서, E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시키는 것은 약 100°C로 가열되고 약 3시간 동안 교반된다.

[0133]

한 실시양태에서, E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A)을 Pd/C 및 수소 기체와 반응시키는 것은 염기성 용액의 존재 하에 수행된다. 한 실시양태에서, 염기성 용액은 50 중량% 수산화나트륨 (NaOH; 가성 소다) 용액이다. 수소화 반응 이후에, 반응 혼합물은 약 100°C로 가열된 다음 (C-6 위치의 베타 배위로부터 알파 배위로의 이성질체화를 수행하기 위함) 약 40°C 내지 약 50°C로 냉각된다. 후처리를 위해, Pd/C가 여과된다. 한 실시양태에서, 여과물에 n-부틸 아세테이트 및 산이 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 산은 염산 (HCl)이다. pH-값을 체크하여 수성 상이 산성인 것을 확인한 후에 이를 분리하고 버린다. 생성물을 함유하는 유기 상은 활성탄으로 처리된다. 한 실시양태에서, 활성탄은 여과되고, 생성물을 함유하는 생성된 여과물은 중류에 의해 응축되고, 생성된 혼탁액은 약 10°C 내지 약 30°C로 냉각된다. 또 다른 실시양태에서, 혼탁액은 약 15°C 내지 약 20°C로 냉각된다. 화합물 6을 함유하는 혼탁액은 단리되고, n-부틸 아세테이트로 세척된다. 화합물 6은 압력 필터를 사용하여 여과된다. 한 실시양태에서, 건조는 약 80°C에서 진공 하에 압력 필터에서 이루어진다.

[0134]

단계 5의 한 실시양태에서, E/Z-3 α -히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5A), 물, NaOH 용액 (예를 들어 50 중량%) 및 Pd/C는 H₂ 기체 약 5 bar 및 약 100°C 내지 약 105°C의 온도에서 H₂ 흡수가 중단될 때까지 혼합된다. 반응 혼합물은 약 40°C 내지 약 50°C로 냉각되고, Pd/C는 여과된다. 이어서 n-부틸 아세테이트 및 HCl이 화합물 6을 함유하는 용액에 첨가된다. 한 실시양태에서, 수성 상은 분리되고 버려진다. 화합물 6을 함유하는 유기 상은 활성탄으로 처리된다. 탄소는 여과되고, 여과물은 또 다른 반응기로 옮겨져서, 중류에 의해 감량된 다음, 혼탁액은 약 5°C 내지 약 20°C로 냉각된다. 한 실시양태에서, 화합물 6은 여과를 통해 단리되고, 여과물은 약 80°C에서 진공 하에 압력 필터 상에서 건조된다.

[0135]

또 다른 실시양태에서, 화합물 6을 제조하기 위한 상기 기재된 수소화/이성질체화 반응은 2 상으로 수행된다 (화합물 5 또는 화합물 5A로부터 출발함). 먼저 수소화가 약 4 내지 5 bar에서 수행된 다음, 두번째로 반응 혼합물이 약 20°C 내지 약 40°C로 가열된다. 반응 혼합물을 가열하는 것은 6-위치의 에틸 기를 목적하는 알파 배

위로 이성질체화한다. 반응 혼합물은 이성질체화가 완료될 때까지 가열된다.

[0136] 단계 6

[0137] 단계 6은 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)과 NaBH₄의 반응으로 결정질 오베티콜산을 형성한다. 한 실시양태에서, 단계 6은 염기성 수용액 중에서 약 85°C 내지 약 110°C의 온도에서 수행된다. 한 실시양태에서, 온도는 약 90°C 내지 약 95°C이다. 한 실시양태에서, 염기성 수용액은 수성 NaOH 용액이다. 한 실시양태에서, 염기성 수용액은 50 중량% NaOH 용액 및 물의 혼합물이다. 한 실시양태에서, 화합물 6 및 NaBH₄의 반응 혼합물은 약 3시간 내지 약 5시간 동안 교반된다. 또 다른 실시양태에서, 반응 혼합물은 약 4시간 동안 교반된다.

[0138] 후처리를 위해, 반응이 완료된 후에, 혼합물은 약 80°C로 냉각되고, 냉각 반응기로 옮겨진다. 한 실시양태에서, 약 20°C 내지 약 60°C에서, n-부틸 아세테이트 및 산이 첨가된다. 한 실시양태에서, 온도는 약 40°C 내지 약 45°C이다. 또 다른 실시양태에서, 산은 시트르산이다. pH-값을 체크하여 수성 상이 산성인 것을 확인한 후에 이를 분리하고 버린다. 생성물을 함유하는 유기 상은 증류에 의해 농축된다. 한 실시양태에서, n-부틸 아세테이트가 잔류물에 첨가되고, 다시 증류된다. 한 실시양태에서, n-부틸 아세테이트가 다시 잔류물에 첨가된 다음, 천천히 냉각된다. 또 다른 실시양태에서, 잔류물은 약 50°C에서 시정된다. 또 다른 실시양태에서, 결정화가 일어난 이후에, 혼합물은 52°C로 가열된 다음, 약 15°C 내지 약 20°C로 천천히 냉각된다. 또 다른 실시양태에서, 잔류물은 약 15°C 내지 약 20°C로 냉각된다. 한 실시양태에서, 생성된 오베티콜산은 n-부틸 아세테이트로 세척된다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 단리되고, n-부틸 아세테이트로 세척된다 (예를 들어 압력 필터에서). 또 다른 실시양태에서, 압력 필터는 불활성이다. 결정질 생성물은 진공 하에 약 60°C에서 건조된다. 한 실시양태에서, 생성된 결정질 오베티콜산은 유기 용매 (예를 들어, 헵탄)로부터 단리된다. 결정질 오베티콜산 형태 C의 확인 및 특성화에 관한 보다 상세한 사항은 실시예 3을 참조한다.

[0139] 단계 7

[0140] 단계 7은 결정질 오베티콜산 형태 C의 오베티콜산 형태 1로의 전환이다. 한 실시양태에서, 단계 7은 결정질 오베티콜산 형태 C를 수성 NaOH 용액에 용해시키고 HCl을 첨가하는 단계를 포함한다.

[0141] 한 실시양태에서, 결정질 오베티콜산은 약 20°C 내지 약 50°C에서 물 및 가성 소다 용액 (50 중량%) 중에 용해된다. 한 실시양태에서, 온도는 약 30°C 내지 약 40°C이다. 한 실시양태에서, 결정질 오베티콜산은 형태 C이다. 한 실시양태에서, 결정질 오베티콜산 형태 C의 생성된 용액은 약 20°C 내지 약 50°C에서 묽은 산에 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 온도는 약 30°C 내지 약 40°C이다. 또 다른 실시양태에서, 산은 염산이다 (예를 들어, 37%). 한 실시양태에서, 37% 염산 용액은 약 1 부피% 미만으로 물로 희석된다. 한 실시양태에서, 37% 염산 용액은 약 0.7 부피%로 물로 희석된다. 한 실시양태에서, 묽은 산 중의 생성물의 혼탁액은 약 20°C 내지 약 50°C에서 약 30분 동안 교반된다. 또 다른 실시양태에서, 온도는 약 30°C 내지 약 40°C이다. 한 실시양태에서, 오베티콜산 형태 1은 단리되고, NMT 약 20°C에서 물로 (예를 들어, 압력 필터에서) 세척된다. 한 실시양태에서, 오베티콜산 형태 1은 단리되고, NMT 약 20°C에서 물로 (예를 들어, 압력 필터에서) 세척된다. 또 다른 실시양태에서, 압력 필터는 불활성이다. 생성물은 NMT 약 50°C의 온도에서 진공 하에 압력 필터 상에서 건조된다.

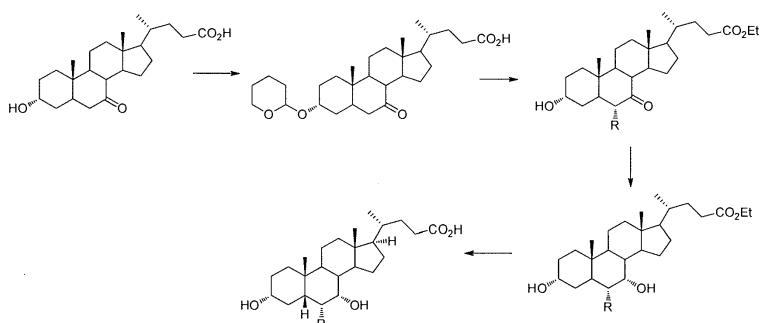
[0142] 본 출원 방법은 오베티콜산 형태 1의 제조 시에 결정질 중간체를 사용하며, 이는 예상외로, 최종 생성물의 전반적인 제조 및 순도를 유의하게 개선시킨다. 구체적으로, 합성 단계 6은 오베티콜산의 신규 결정질 형태를 생성한다. 이러한 결정질 형태의 생성은 실질적으로 순수한 오베티콜산 형태 1로 이어진다.

[0143] 본 출원 방법은 선행 기술에 개시된 방법보다 개선된 것이다. 오베티콜산의 제조는 미국 공보 번호 2009/0062526 A1 (본원에서 "'526 공보"로 지칭됨), 미국 특허 번호 7,138,390 (본원에서 "'390 특허"로 지칭됨) 및 WO 2006/122977 (본원에서 "'977 출원"으로 지칭됨)에 개시되어 있다.

[0144] '390 특허에서의 오베티콜산을 제조하는 방법 (본원에서 "'390 방법"으로 지칭됨)은 반응식 3에 도시된다 (R은 에틸임):

[0145]

<반응식 3>



[0146]

[0147]

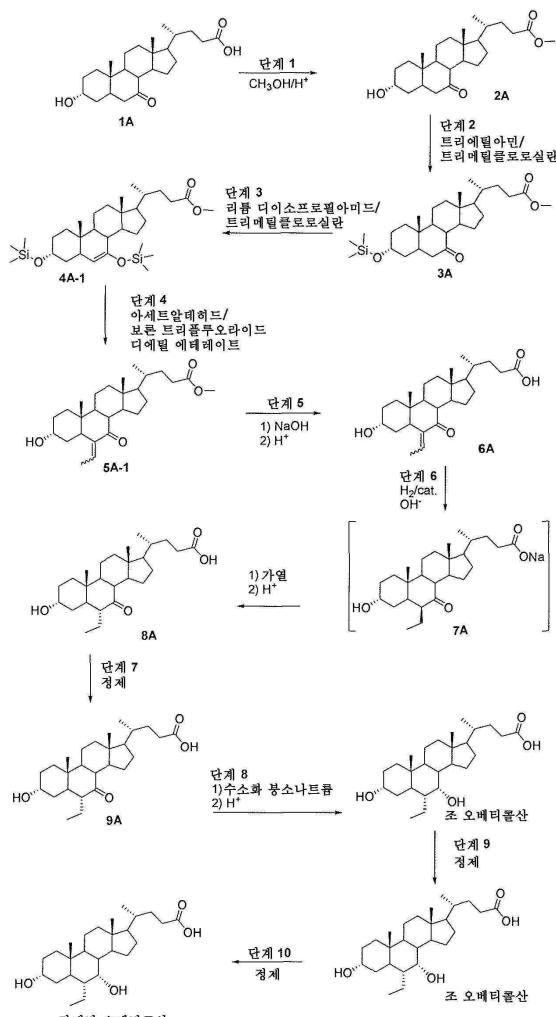
이러한 방법은 몇 개의 단계를 포함하지만, 이는 일련의 결점을 나타낸다. 모든 단계에서, 반응 생성물은 크로마토그래피 칼럼, 즉 산업상 규모로는 사용될 수 없는 매우 값비싼 분리 방법으로 정제된다. 또한, 단계 2에서의 반응 수율은 극히 낮으며 (12-13%) 총 수율이 상당히 감소되어 3.5%보다 낮다. 이러한 방법은 또한 반응물로서 발암원으로 공지되어 있는 핵사메틸렌포스폰아미드를 사용한다.

[0148]

'977 출원의 오베틱콜산을 제조하는 방법은 반응식 4에 도시된다.

[0149]

<반응식 4>



[0150]

오베틱콜산을 제조하는 '977 방법은 8-단계 합성 방법이며, 1회의 정제 단계 (단계 7)에 이어 2회의 추가의 정제 단계를 포함한다. '977 방법과 본 출원 방법 사이에는 유의한 수의 차이점이 존재한다. 하기 표 A는 2가지 방법 사이의 차이점을 적어도 일부 기재한다:

[0152]

<표 A> '977 방법과 본 출원 방법 사이의 차이점

합성 단계	변화		변화의 이점
	'977 방법	본 출원 방법	
단계 1	메탄솔忿산	황산	규모 및 안전성 (메틸레이트)
	30% 암모니아 (수성)	NaOH (수성)	규모 확대
	정제/처리 없음	활성탄 처리의 사용	순도/색상 개선
단계 2 (본 출원 방법 단계 2는 '977 방법 단계 2 및 3을 조합함)	트리에틸아민	리튬 디이소프로필아미드 (LDA)	LDA는 이 단계에 대해 적합한 대안적 시약임
	톨루엔	테트라하드로포판 (THF)	THF는 이 단계에 대해 적합한 대안적 시약임
	산성 켄칭 없음	시트르산 용액 내로의 켄칭	규모 확대
단계 3 (본 출원 방법 단계 3은 '977 단계 4와 동일함)	보론 트리플루오라이드 디에틸 에테레이트	보론 트리플루오라이드 아세토니트릴 착물	에테레이트 취급 관련 안전성 (에테르로 인한 폭발 위험)
단계 4 (본 출원 방법 단계 4는 '977 단계 5와 동일함)	톨루엔	메탄올	안전성 (톨루엔); 규모
	인산 (수성) 켄칭	시트르산 (수성) 켄칭	규모 확대
	정제/처리 없음	결정화 단계는 후처리의 일부임	순도 개선
단계 5 (본 출원 방법 단계 5는 '977 방법 단계 6 및 7을 조합함)	인산 (수성) 켄칭	염산 (수성) 켄칭	규모 확대
	정제/처리 없음	활성탄 처리의 사용	순도/색상 개선
	정제는 단계 7로서 수행함	결정화 단계는 후처리의 일부임	규모 확대
단계 6 (본 출원 방법 단계 6은 '977 방법 단계 8 및 9를 조합함)	디클로로메탄	n-부틸아세테이트	안전성 (디클로로메탄)
	인산 (수성) 켄칭	시트르산 (수성) 켄칭	규모 확대
	정제는 단계 9로서 수행함 - 디클로로메탄 /에틸 아세테이트를 사용함	결정화 단계는 후처리의 일부임 - n- 부틸아세테이트를 사용함	규모 및 안전성 (디클로로메탄)
단계 7 (본 출원 방법 단계 7은 '977 단계 10과 동일함)	암모니아 용액	NaOH 용액	규모 확대
	인산 (수성) 켄칭	염산 (수성) 켄칭	규모 확대

[0153]

'977 방법과 비교하여 본 출원 방법의 차이점은 규모 확대 최적화, 안전성, 뿐만 아니라 순도와 관련된 개선 및 전반적인 방법에서의 개선을 비롯하여, 방법을 유의하게 개선시킨다. 본 출원 방법에 의해 생성된 오베티콜산의 순도는 실질적으로 순수하다. 구체적으로, 본 출원 방법에 의해 생성된 오베티콜산은 '390 방법 및 '977 방법을 포함하여 선행 기술의 방법에 의해 생성된 오베티콜산보다 더 실질적으로 순수하다. 예를 들어, 본 출원 방법에 의해 생성된 오베티콜산 및 '977 방법에 의해 생성된 오베티콜산의 분석 증명서에 제공된 결과의 비교가 하기 표 B에 제시된다. 불순물의 백분율은 HPLC 방법을 사용하여 결정되었다.

[0155]

<표 B> 본 출원 방법 및 '977 방법으로부터 생성된 오베티콜산의 불순물의 비교

파라미터	규격 한계	본 출원 방법	'977 방법
물 (KF)	NMT 4.5%	1.0%	2.1%
불순물 1 및 불순물 4	NMT 0.15%	<0.05%	<0.05%
불순물 2	NMT 0.15%	<0.05%	<0.1%
불순물 3	NMT 0.15%	<0.05%	<0.1%
불순물 5	NMT 3.0%	0.2%	1.0%
불순물 6	NMT 0.15%	<0.05%	<0.05%

[0156]

불순물 1은 6-에틸우르소데옥시콜산이다.

[0157]

불순물 2는 3 α -하드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산이다.불순물 3은 3 α -하드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산이다.

- [0159] 불순물 3은 6β -에틸케노데옥시콜산이다.
- [0160] 불순물 4는 $3\alpha, 7\alpha$ -디히드록시-6-에틸리덴- 5β -콜란-24-오산이다.
- [0161] 불순물 5는 케노데옥시콜산이다.
- [0162] 불순물 6은 $3\alpha(3\alpha, 7\alpha$ -디히드록시- 6α -에틸- 5β -콜란-24-오일옥시)- 7α -히드록시- 6α -에틸- 5β -콜란-24-오산(6ECDCA 이량체)이다.
- [0163] NMT는 "최대"를 지칭한다.
- [0164] 합성 중간체로서 결정질 오베티콜산
- [0165] 오베티콜산은 비-결정질 고체로서 현재 활성 제약 성분으로 개발되고 있다. 오베티콜산의 개발을 가능하게 하기 위해, 결정질 형태가 이용가능한지, 만약 그렇다면 그것이 개발에 적합한지를 결정하기 위한 초기 결정화 및 다형성 연구가 수행되었다. 다양한 용매 중에서의 물질의 거동에 대한 보다 나은 이해를 제공하도록 설계된 예비 용해도 스크린 이후에, 물질은 젤을 형성하는 경향이 있으며, 결정화될 수 있는 것으로 나타났다. 이어서, 가능한 한 많은 관련 다형체를 확인하고 특성화하기 위해, 넓은 범위의 용매 및 결정화 조건에 물질을 노출시키는 광범위한 다형체 스크린이 수행되었다. 이러한 스크린 동안 5종의 상이한 고체 형태가 발견되었다.
- [0166] 3종의 형태 (A, C 및 D)의 오베티콜산은 0.25 mol eq의 물 및 가변 양의 다양한 범위의 유기 용매를 함유하는 혼합된 수화물/용매화물이었다. 가열 시에, 이들 고체는 결정화도 및 용매를 동시에 잃었고, 불행하게도 이들 용매화 형태는 저융점 온도 및 높은 용매 함량으로 인해 제약 성분으로서 추가로 개발하기에 적합하지 않았다. 또한, 이러한 유형의 유사한 "부적합" 형태가 존재함을 주목한다. 예를 들어, 실험 후반에 저융점 용매화 형태, 뿐만 아니라 또 다른 형태의 단결정이 발견되었고, 이는 SCXRD (단결정 X선 회절)에 의해 1수화물/아니솔 용매화물인 것으로 밝혀졌다.
- [0167] 2종의 나머지 형태는 융점이 보다 높고, 잠재적으로 보다 가능성이 높은 것이지만, 이들 중 하나 (형태 G)는 확대된 규모로 재생될 수 없고, 또한 많은 시도에도 불구하고 반복될 수 없다. 이러한 형태를 단독으로 생성하는 것이 곤란하다는 점은, 그의 개발을 부적합하게 만든다. 나머지 비-용매화 형태 F는 재생가능하게 제조되지만, 이는 광범위한 재결정화 절차, 및 아민, 알칼리, 강산 또는 고온 또는 단열 압축에 의해 민감해질 경우에 폭발될 수 있는 독성 용매인 니트로메탄의 사용을 필요로 한다. 니트로메탄의 잔류 수준에 대한 우려는 형태 F를 또한 개발에 부적합한 것으로 간주되게 한다.
- [0168] 초기 결정화 및 다형체 연구의 전반적인 결과는 물질이 다양한 형태의 결정질 물질을 형성할 수 있지만, 결정질 물질 또는 형태 중 어느 것도 개발에 적합한 것으로 간주되지 않는 것으로 밝혀졌다.
- [0169] 많은 시간이 지나지 않아서, 본 출원 방법의 뒤에서 두번째 단계에서 중간체로서 결정질 오베티콜산을 생성하는 것의 중요성이 밝혀졌다. 결정질 오베티콜산은 본 출원 방법을 사용하여 대규모로 용이하게 단리될 수 있다. 이러한 결정질 오베티콜산은 초기 결정화 및 다형체 연구로부터 형태 C와 일치하는 것으로 결정되었다. 본 출원 방법의 단계 7에서 합성 중간체로서 생성되는 결정질 오베티콜산의 형성, 단리의 용이성 및 고도의 순수성은 실질적으로 순수한 오베티콜산의 제조에 실제로 중요하다.
- [0170] 한 실시양태에서, 본 발명은 약 4.2, 6.4, 9.5, 12.5 및 16.7도 2-세타에서 특징적인 피크를 포함하는 X선 회절 패턴을 특징으로 하는 결정질 오베티콜산 형태 C에 관한 것이다. 한 실시양태에서, X선 회절 패턴은 약 4.2, 6.4, 9.5, 12.5, 12.6, 15.5, 15.8, 16.0, 16.7 및 19.0도 2-세타에서 특징적인 피크를 포함한다. 한 실시양태에서, X선 회절 패턴은 약 4.2, 6.4, 8.3, 9.5, 11.1, 12.2, 12.5, 12.6, 15.5, 15.8, 16.0, 16.3, 16.7, 18.6 및 19.0도 2-세타에서 특징적인 피크를 포함한다. 한 실시양태에서, X선 회절 패턴은 약 4.2, 6.4, 8.3, 9.5, 11.1, 12.2, 12.5, 12.6, 15.5, 15.8, 16.0, 16.3, 16.7, 17.0, 17.8, 18.6, 18.8, 19.0, 20.5 및 20.9도 2-세타에서 특징적인 피크를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 도 5에 제시된 것과 실질적으로 유사한 X선 회절 패턴을 특징으로 하는 결정질 오베티콜산 형태 C에 관한 것이다. 한 실시양태에서, X선 회절 패턴은 Cu K α 방사선 (40 kV, 40 mA)을 사용하는 회절계 상에 수집된다. 한 실시양태에서, X선 회절 패턴은 약 12.0 내지 약 12.8 및 약 15.4 내지 약 21.0에서 특징적인 피크를 포함한다.
- [0171] 한 실시양태에서, 본 발명은 메틀러(Mettler) DSC 823e 기기에 의한 측정 시에 약 98±2°C에서 흡열 값을 갖는 시차 주사 열량측정 (DSC) 온도기록도를 특징으로 하는 결정질 오베티콜산 형태 C에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 시차 주사 열량측정 (DSC) 온도기록도는 메틀러 DSC 823e 기기에 의한 측정 시에 약 98±2°C에서 흡열 값

을 갖는다.

[0172] 한 실시양태에서, 본 발명은 결정질 오베티콜산이 형태 C이고, 약 90% 초과의 순도를 갖는 결정질 오베티콜산에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 상기 결정질 오베티콜산 형태 C의 순도는 HPLC에 의해 결정된다. 한 실시양태에서, 본 발명은 결정질 오베티콜산 형태 C 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 용매화물은 수화물이다. 한 실시양태에서, 순도는 약 92% 초과이다. 한 실시양태에서, 순도는 약 94% 초과이다. 한 실시양태에서, 순도는 약 96% 초과이다. 한 실시양태에서, 순도는 약 98% 초과이다. 한 실시양태에서, 순도는 약 99% 초과이다.

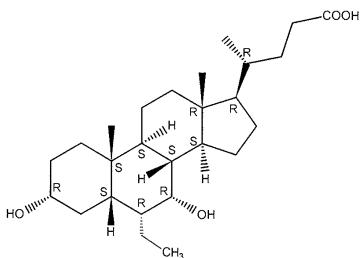
[0173] 한 실시양태에서, 본 발명은 결정질 오베티콜산이 형태 C이고, 약 90% 초과의 효력을 갖는 결정질 오베티콜산에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 상기 결정질 오베티콜산 형태 C의 순도는 HPLC 및/또는 다른 당업계 공지의 분석 절차에 의해 결정된다. 한 실시양태에서, 본 발명은 결정질 오베티콜산 형태 C 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 용매화물은 수화물이다. 한 실시양태에서, 효력은 약 92% 초과이다. 한 실시양태에서, 효력은 약 94% 초과이다. 한 실시양태에서, 효력은 약 96% 초과이다. 한 실시양태에서, 효력은 약 98% 초과이다. 한 실시양태에서, 효력은 약 99% 초과이다.

[0174] 한 실시양태에서, 본 발명은 6-에틸우르소데옥시콜산, 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산, 6 β -에틸케노데옥시콜산, 3 α ,7 α -디히드록시-6-에틸리тен-5 β -콜란-24-오산, 케노데옥시콜산 및 3 α (3 α ,7 α -디히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오일옥시)-7 α -히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오산으로부터 선택되는 1종 이상의 불순물을 총 약 4% 미만으로 함유하는 결정질 오베티콜산 형태 C에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 총 불순물은 약 3.8% 미만이다. 한 실시양태에서, 총 불순물은 약 3.6% 미만이다.

[0175] 본원의 실시예 3은 오베티콜산의 이러한 신규 결정질 형태의 모든 특성을 제공한다.

[0176] 오베티콜산의 단결정 X선 구조가 수득되고, 절대 입체화학이 할당되었다. 예를 들어, 결정질 오베티콜산 형태 G의 단결정 X선 구조는 0.1°C/min으로 5°C로의 냉각에 이어 1주 동안의 RT/50°C 8h 사이클에서의 성숙 이후에 아세토니트릴 용액으로부터의 오베티콜산의 재결정화로부터 수득된 결정으로부터 결정된다.

[0177] 구조는 사방정계, 공간군 P2₁2₁2₁이며, 비대칭 단위 내에 오베티콜산의 1개 분자를 함유한다. 최종 R1 [I>2σ(I)] = 3.22%. 분자의 절대 입체화학은 플랙(Flack) 파라미터 = -0.01 (13)로 하기 제시된 바와 같이 결정된다. 구조는 어떤 무질서도 갖지 않았다.



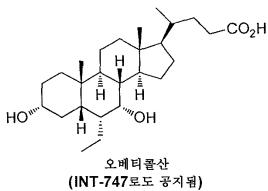
[0178]

[0179] 오베티콜산 형태 1(비-결정질) vs. 결정질 오베티콜산 형태 F의 생체이용률을 연구가 수행되었다(실시예 7). 연구의 결과는 고체 오베티콜산의 물리적 상태가 대상체에게 경구로 투여된 경우에 분자의 생체이용률에 소정의 역할을 할 수 있는 것으로 나타났다. 고체 오베티콜산 형태 1(비-결정질) 및 결정질 형태 F의 경구 투여 후의 혈장 동역학 및 장 흡수 효율 및 약동학이 당업계에 공지된 방법에 따라 평가되었다. 본 발명의 실시예 8은 오베티콜산 형태 1 또는 형태 F의 투여 이후의 오베티콜산 혈장 농도 프로파일 vs 시간, t_{max}, C_{max} 및 AUC를 보여준다(도 37-38 참조). 결정질 형태 F는 오베티콜산 형태 1(비-결정질)보다 높은 생체이용률을 갖는다. 혈장 프로파일은 형태 F가 보다 효율적으로 흡수되며(보다 높은 AUC), 동역학도 또한 보다 규칙적인 것으로 나타났고, 이는 장 용량에서 약물의 최적의 분포를 반영한다.

[0180] 오베티콜산 형태 1(비-결정질)의 수용해도는 형태 F의 그것보다 약간 더 높다. 열 중량 분석(TGA)은 연구된 온도 범위에서 어떤 중량 손실도 나타내지 않았기 때문에, 형태 F는 안정한 것으로 보인다.

[0181] 실질적으로 순수한 오베티콜산

[0182] 본원은 실질적으로 순수한 오베티콜산 및 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체를 제공한다.



[0183]

[0184] 제약 활성 성분 오베티콜산의 다른 명칭은 INT-747, 3 α ,7 α -디히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오산, 6 α -에틸-케노데옥시콜산, 6-에틸-CDCA, 6ECDC 및 콜란-24-오산, 6-에틸-3,7-디히드록시-(3 α ,5 β ,6 α ,7 α)-이다.

[0185]

본원은 오베티콜산 형태 1을 포함하는 조성을, 및 안전하고 대규모로 오베티콜산을 생성하는 고도로 순수한 오베티콜산 형태 1의 합성 방법을 제공한다. 한 측면에서, 오베티콜산 형태 1은 상업적 규모 방법으로 생성된다. 용어 "상업적 규모 방법"은 적어도 약 100 그램의 단일 배치로 수행되는 방법을 지칭한다. 한 측면에서, 본 출원 방법은 높은 수율 (>80%)로, 한정된 불순물을 갖는 오베티콜산 형태 1을 생성한다.

[0186]

본원에 사용된 용어 "순도"는 HPLC에 기초한 오베티콜산의 양을 지칭한다. 순도는 화합물의 "유기" 순도를 기초로 한다. 순도는 물, 용매, 금속, 무기 염 등의 임의의 양의 측정값은 포함하지 않는다. 한 측면에서, 오베티콜산의 순도는 피크하 면적을 비교하는 것에 의해 참조 표준물의 순도와 비교된다. 또 다른 측면에서, 순도에 대해 공지된 표준물은 오베티콜산 참조 표준물이다. 한 측면에서, 오베티콜산은 약 96% 초과의 순도를 갖는다. 한 측면에서, 오베티콜산은 약 98% 초과의 순도를 갖는다. 예를 들어, 오베티콜산 형태 1의 순도는 96.0%, 96.1%, 96.2%, 96.3%, 96.4%, 96.5%, 96.6%, 96.7%, 96.8%, 96.9%, 97.0%, 97.1%, 97.2%, 97.3%, 97.4%, 97.5%, 97.6%, 97.7%, 97.8%, 97.9%, 98.0%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99.0%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9%이다. 예를 들어, 오베티콜산 형태 1의 순도는 98.0%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99.0%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9%이다. 예를 들어, 오베티콜산의 순도는 98.0%, 98.5%, 99.0%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9%이다. 예를 들어, 오베티콜산의 순도는 98.5%, 99.0% 또는 99.5%이다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 오베티콜산 형태 1이다.

[0187]

한 실시양태에서, 본 발명은 약 98% 초과의 순도를 갖는 오베티콜산에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 순도는 HPLC에 의해 결정된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 순도는 약 98.5% 초과이다. 한 실시양태에서, 순도는 약 99.0% 초과이다. 한 실시양태에서, 순도는 약 99.5% 초과이다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 오베티콜산 형태 1이다.

[0188]

본원에 사용된 용어 "효력"은 공지된 표준물의 양에 기초한 오베티콜산의 양의 측정값이다 (예를 들어, 허용 기준 약 95% 내지 약 102%). 효력은 물, 용매, 유기 및 무기 불순물을 비롯한 모든 가능한 불순물을 고려한다. 한 측면에서, 공지된 표준물은 오베티콜산이다. 한 측면에서, 오베티콜산은 약 96% 초과의 효력을 갖는다. 한 측면에서, 오베티콜산은 약 98% 초과의 효력을 갖는다. 한 측면에서, 공지된 표준물은 오베티콜산이다. 또 다른 측면에서, 효력은 100% 마이너스 물, 황산화 회분, 잔류 용매 및 다른 불순물 내용물, 예컨대 6-에틸우르소데옥시콜산, 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산, 6 β -에틸케노데옥시콜산, 3 α ,7 α -디히드록시-6-에틸리덴-5 β -콜란-24-오산, 케노데옥시콜산 및 3 α (3 α ,7 α -디히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오일옥시)-7 α -히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오산의 양이다. 또 다른 실시양태에서, 효력은 물, 용매, 금속, 무기 염 및 다른 무기 또는 유기 불순물로 인한 불순물을 고려한다. 예를 들어, 오베티콜산 형태 1의 효력은 96.0%, 96.1%, 96.2%, 96.3%, 96.4%, 96.5%, 96.6%, 96.7%, 96.8%, 96.9%, 97.0%, 97.1%, 97.2%, 97.3%, 97.4%, 97.5%, 97.6%, 97.7%, 97.8%, 97.9%, 98.0%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99.0%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9%이다. 한 측면에서, 오베티콜산 형태 1의 효력은 98.0%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99.0%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9%이다. 예를 들어, 오베티콜산의 효력은 98.0%, 98.5%, 99.0%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9%이다. 예를 들어, 오베티콜산의 효력은 98.5%, 99.0% 또는 99.5%이다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 오베티콜산 형태 1이다.

[0189]

한 실시양태에서, 본 발명은 6-에틸우르소데옥시콜산, 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산, 6 β -에틸케노데옥시콜산, 3 α ,7 α -디히드록시-6-에틸리덴-5 β -콜란-24-오산, 케노데옥시콜산 및 3 α (3 α ,7 α -디히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오일옥시)-7 α -히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오산으로부터 선택되는 1종 이상의 불

순물을 총 약 2% 미만으로 함유하는 오베티콜산에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 총 불순물은 약 1.5% 미만이다. 한 실시양태에서, 총 불순물은 약 1.4% 미만이다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 오베티콜산 형태 1이다.

[0190] 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 10% 미만의 물, 약 9% 미만의 물, 8% 미만의 물, 7% 미만의 물, 6% 미만의 물, 5% 미만의 물, 4% 미만의 물, 3% 미만의 물, 2% 미만의 물 또는 1% 미만의 물을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 1.2% 미만의 물을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 1.0% 미만의 물을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 오베티콜산 형태 1이다.

[0191] 또 다른 실시양태에서, 오베티콜산은 최대 (NMT) 0.15%의 6-에틸우르소데옥시콜산 및 3 α ,7 α -디히드록시-6-에틸리덴-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 오베티콜산은 총 약 0.07% 미만의 6-에틸우르소데옥시콜산 및 3 α ,7 α -디히드록시-6-에틸리덴-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 총 약 0.06% 미만의 6-에틸우르소데옥시콜산 및 3 α ,7 α -디히드록시-6-에틸리덴-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 총 약 0.05% 미만의 6-에틸우르소데옥시콜산 및 3 α ,7 α -디히드록시-6-에틸리덴-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 오베티콜산 형태 1이다.

[0192] 한 실시양태에서, 오베티콜산은 최대 (NMT) 0.15%의 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.07% 미만의 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.06% 미만의 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.05% 미만의 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 오베티콜산 형태 1이다.

[0193] 한 실시양태에서, 오베티콜산은 최대 (NMT) 0.15%의 6 β -에틸케노데옥시콜산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.07% 미만의 6 β -에틸케노데옥시콜산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.06% 미만의 6 β -에틸케노데옥시콜산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.05% 미만의 6 β -에틸케노데옥시콜산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 오베티콜산 형태 1이다.

[0194] 한 실시양태에서, 오베티콜산은 최대 (NMT) 3%의 케노데옥시콜산 (CDCA)을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 1% 미만의 CDCA를 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.5% 미만의 CDCA를 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.3% 미만의 CDCA를 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.2% 미만의 CDCA를 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 오베티콜산 형태 1이다.

[0195] 한 실시양태에서, 오베티콜산은 최대 (NMT) 4%의 CDCA 및 6-에틸우르소데옥시콜산을 함유한다.

[0196] 한 실시양태에서, 오베티콜산은 최대 (NMT) 1.5%의 3 α (3 α ,7 α -디히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오일옥시)-7 α -히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 1% 미만의 3 α (3 α ,7 α -디히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오일옥시)-7 α -히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.07% 미만의 3 α (3 α ,7 α -디히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오일옥시)-7 α -히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.06% 미만의 3 α (3 α ,7 α -디히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오일옥시)-7 α -히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 약 0.05% 미만의 3 α (3 α ,7 α -디히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오일옥시)-7 α -히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오산을 함유한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 오베티콜산 형태 1이다.

경구 제제 및 투여

[0198] 오베티콜산은 경구 투여용이다. 한 실시양태에서, 제제는 FXR 매개 질환 및 상태의 예방 및 치료를 위한 경구 투여용이다. 한 실시양태에서, 제제는 오베티콜산 형태 1을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 실질적으로 순수한 오베티콜산을 포함한다.

[0199] 경구 투여에 적합한 제제는 이산 단위, 예컨대 각각 예정량의 오베티콜산을 함유하는 정제, 캡슐, 카쉐 (약물을 제공하기 위해 약사에 의해 사용되는 웨이퍼 캡슐), 로젠지로서; 분말 또는 과립으로서; 수성 또는 비-수성 액체 중의 용액 또는 혼탁액으로서; 또는 수중유 또는 유중수 에멀젼으로서 제공될 수 있다.

[0200] 본 발명의 제제는 임의의 적합한 방법에 의해, 전형적으로 오베티콜산을 액체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 다와 요구되는 비율로 균일하고 친밀하게 혼합한 다음, 필요한 경우에 생성된 혼합물을 목적하는 형상으로 성형하는 것에 의해 제조될 수 있다.

[0201] 예를 들어, 정제는 오베티콜산의 분말 또는 과립 및 1종 이상의 임의적인 성분, 예컨대 결합제, 윤활제, 불활성

희석제 또는 계면 활성 분산제를 포함하는 친밀한 혼합물을 압축하거나, 또는 분말화된 활성 성분 및 불활성 액체 희석제의 친밀한 혼합물을 몰딩하는 것에 의해 제조될 수 있다.

[0202] 예를 들어, 1종 이상의 정제는 대상체의 체중, 예를 들어 인간 약 30 kg 내지 약 70 kg에 기초하여 표적 용량 수준에 달하도록 투여될 수 있다.

[0203] 한 실시양태에서, 대상체는 소아이고, 제제는 담도 폐쇄증을 치료하기 위해 사용된다. "간외 담관감소증" 및 "진행성 폐쇄성 담관병증"으로도 공지되어 있는 담도 폐쇄증은 간의 선천성 또는 후천성 질환이며, 이식된 간 동종이식편의 만성 거부의 주요 형태 중 하나이다. 선천성 형태에서, 간과 소장 사이의 총담관이 차단되거나 부채한다. 후천성 유형은 대부분 자가면역 질환 상태에서 종종 발생하고, 이식된 간 동종이식편의 만성 거부의 주요 형태 중 하나이다.

[0204] 담도 폐쇄증을 갖는 유아 및 소아는 진행성 담즙정체를 통상적인 모든 부수적 특징: 황달, 소양증, 성장 지연을 동반한 흡수장애, 지방-가용성 비타민 결핍, 고지혈증 및 최종적으로 문맥 고혈압을 동반한 간경변증과 함께 갖는다. 인식되지 않은 경우에, 상태는 간부전으로 이어지지만-간이 여전히 빌리루빈을 접합시킬 수 있고, 접합된 빌리루빈이 혈액-뇌 장벽을 가로지를 수 없기 때문에 핵황달로 이어지지는 않는다. 상태의 원인은 공지되어 있지 않다. 오직 유효한 치료는 특정 수술, 예컨대 카사이 절차, 또는 간 이식이다.

[0205] 한 실시양태에서, 인간 소아는 카사이 절차를 받은 적이 있으며, 여기서 카사이 절차는 소아가 출생 시 담관 없이 또는 그것이 완전히 차단된 상태로 태어난 경우에 기능적 담관을 효과적으로 제공한다.

[0206] 상기 구체적으로 언급된 성분에 더하여, 본 발명의 경구 제제는 관심 제제의 유형을 고려하여 제약 업계의 당업자에게 공지된 기타 작용제를 포함할 수 있다. 적합한 경구 제제는 향미제를 포함할 수 있다.

[0207] 한 실시양태에서, 본 발명은 오베티콜산이 본 발명의 방법에 의해 생성된 것 (오베티콜산 형태 1)인 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체의 제약 제제에 관한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 경구로 투여된다.

[0208] 한 실시양태에서, 제제는 정제 형태로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 오베티콜산, 및 미세결정질 셀룰로스, 소듐 전분 글리콜레이트, 스테아르산마그네슘, 코팅 물질 또는 콜로이드성 이산화규소로부터 선택되는 1종 이상의 성분을 포함한다. 한 실시양태에서, 코팅 물질은 오파드라이(Opadry)® 코팅 물질이다.

[0209] 또 다른 실시양태에서, 제제는 정제당 약 0.1 mg 내지 약 1500 mg의 오베티콜산을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 100 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 50 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 30 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 4 mg 내지 약 26 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 5 mg 내지 약 25 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 2 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1.2 mg 내지 약 1.8 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1.3 mg 내지 약 1.7 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1.5 mg을 포함한다.

[0210] 한 실시양태에서, 제제는 정제당 약 1 mg 내지 약 25 mg의 오베티콜산을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1 mg의 오베티콜산, 약 180 내지 약 190 mg의 미세결정질 셀룰로스, 약 10 내지 약 15 mg의 소듐 전분 글리콜레이트, 약 1 내지 약 3 mg의 스테아르산마그네슘, 및 약 5 mg 내지 약 10 mg의 코팅 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, 코팅 물질은 오파드라이® 코팅 물질이다.

[0211] 한 실시양태에서, 제제는 정제당 약 1 mg 내지 약 25 mg의 오베티콜산을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1 mg의 오베티콜산, 약 185.0 mg의 미세결정질 셀룰로스, 약 12.0 mg의 소듐 전분 글리콜레이트, 약 2.0 mg의 스테아르산마그네슘, 및 약 8.0 mg의 코팅 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, 코팅 물질은 오파드라이® 코팅 물질이다.

[0212] 한 실시양태에서, 제제는 정제당 약 1 mg 내지 약 25 mg의 오베티콜산을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 5 mg의 오베티콜산, 약 175 내지 약 190 mg의 미세결정질 셀룰로스, 약 10 내지 약 15 mg의 소듐 전분 글리콜레이트, 약 1 내지 약 3 mg의 스테아르산마그네슘, 및 약 5 mg 내지 약 10 mg의 코팅 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, 코팅 물질은 오파드라이® 코팅 물질이다.

[0213] 한 실시양태에서, 제제는 정제당 약 1 mg 내지 약 25 mg의 오베티콜산을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 5 mg의 오베티콜산, 약 181.0 mg의 미세결정질 셀룰로스, 약 12.0 mg의 소듐 전분 글리콜레이트, 약 2.0 mg의 스테아르산마그네슘, 및 약 8.0 mg의 코팅 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, 코팅 물질은 오파드라이® 코팅 물질이다.

코팅 물질이다.

- [0214] 한 실시양태에서, 제제는 정제당 약 1 mg 내지 약 25 mg의 오베티콜산을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 10 mg의 오베티콜산, 약 170 mg 내지 약 180 mg의 미세결정질 셀룰로스, 약 10 mg 내지 약 15 mg의 소듐 전분 글리콜레이트, 약 1 mg 내지 약 3 mg의 스테아르산마그네슘, 및 약 5 mg 내지 약 10 mg의 코팅 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, 코팅 물질은 오파드라이® 코팅 물질이다.
- [0215] 한 실시양태에서, 제제는 정제당 약 1 mg 내지 약 25 mg의 오베티콜산을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 10 mg의 오베티콜산, 약 176.0 mg의 미세결정질 셀룰로스, 약 12.0 mg의 소듐 전분 글리콜레이트, 약 2.0 mg의 스테아르산마그네슘, 및 약 8.0 mg의 코팅 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, 코팅 물질은 오파드라이® 코팅 물질이다.
- [0216] 한 실시양태에서, 제제는 정제당 약 1 mg 내지 약 25 mg의 오베티콜산을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 25 mg의 오베티콜산, 약 150 mg 내지 약 160 mg의 미세결정질 셀룰로스, 약 10 mg 내지 약 15 mg의 소듐 전분 글리콜레이트, 약 1 mg 내지 약 3 mg의 스테아르산마그네슘, 약 5 mg 내지 약 10 mg의 코팅 물질, 및 약 1 mg 내지 약 10 mg의 콜로이드성 이산화규소를 포함한다. 한 실시양태에서, 코팅 물질은 오파드라이® 코팅 물질이다.
- [0217] 한 실시양태에서, 제제는 정제당 약 1 mg 내지 약 25 mg의 오베티콜산을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 25 mg의 오베티콜산, 약 157.0 mg의 미세결정질 셀룰로스, 약 12.0 mg의 소듐 전분 글리콜레이트, 약 2.0 mg의 스테아르산마그네슘, 약 8.0 mg의 코팅 물질, 및 약 4.0 mg의 콜로이드성 이산화규소를 포함한다. 한 실시양태에서, 코팅 물질은 오파드라이® 코팅 물질이다.
- [0218] 본원에 사용된 모든 백분율 및 비는, 달리 나타내지 않는 한, 중량 기준이다. 퍼센트 이랑체 불순물은 전형적으로 분석용 HPLC에 의해 정량화된 바와 같은, 면적 퍼센트 기준이다.
- [0219] 명세서 전반에 걸쳐, 조성물이 특정한 성분을 갖거나, 포함하거나 또는 구성된 것으로 기재되어 있는 경우에, 조성물은 또한 언급된 성분으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 언급된 성분으로 이루어진 것으로 고려된다. 유사하게, 방법 또는 공정이 특정한 공정 단계를 갖거나, 포함하거나 또는 구성된 것으로 기재되어 있는 경우에, 공정은 또한 언급된 공정 단계로 본질적으로 이루어지거나, 또는 언급된 공정 단계로 이루어진다. 또한, 단계들의 순서나 특정 작업을 수행하기 위한 순서는 본 발명이 작동하도록 유지되는 한 중요하지는 않은 것으로 이해하여야 한다. 또한, 2 이상의 단계 또는 작업을 동시에 수행할 수 있다.

[0220]

정제의 제제

필름 코팅된 정제			
성분	정제당 양	기능	표준물에 대한 참조
1 mg 정제			
오베틱산	1.0 mg*	API	HSE
미세결정질 셀룰로스	185.0 mg*	충전제/결합제	USP-NF/EP/JP
소듐 전분 글리콜레이트	12.0 mg	붕해제	USP-NF/EP/JP
스테아르산마그네슘	2.0 mg	윤활제	USP-NF/EP/JP
오파드라이® II 그린, 화이트 또는 엘로우	8.0 mg	코팅 물질	HSE
총 중량	208.0 mg		
5 mg 정제			
오베틱산	5.0 mg*	API	HSE
미세결정질 셀룰로스	181.0 mg*	충전제/결합제	USP-NF/EP/JP
소듐 전분 글리콜레이트	12.0 mg	붕해제	USP-NF/EP/JP
스테아르산마그네슘	2.0 mg	윤활제	USP-NF/EP/JP
오파드라이® II 그린, 화이트 또는 엘로우	8.0 mg	코팅 물질	HSE
총 중량	208.0 mg		
10 mg 정제			
오베틱산	10.0 mg*	API	HSE
미세결정질 셀룰로스	176.0 mg*	충전제/결합제	USP-NF/EP/JP
소듐 전분 글리콜레이트	12.0 mg	붕해제	USP-NF/EP/JP
스테아르산마그네슘	2.0 mg	윤활제	USP-NF/EP/JP
오파드라이® II 그린, 화이트 또는 엘로우	8.0 mg	코팅 물질	HSE
총 중량	208.0 mg		
25 mg 정제			
오베틱산	25.0 mg*	API	HSE
미세결정질 셀룰로스	157.0 mg*	충전제/결합제	USP-NF/EP/JP
소듐 전분 글리콜레이트	12.0 mg	붕해제	USP-NF/EP/JP
스테아르산마그네슘	2.0 mg	윤활제	USP-NF/EP/JP
콜로이드성 이산화규소	4.0 mg	활택제	USP-NF/EP/JP
오파드라이® II 그린, 화이트 또는 엘로우	8.0 mg	코팅 물질	HSE
총 중량	208.0 mg		

[0221]

[0222] API: 활성 제약 성분

[0223] HSE = 사내 규격

[0224] USP-NF = 미국 약전 국립 처방집

[0225] Ph Eur = 유럽 약전

[0226] JP = 일본 약전

[0227] * 제공된 오베틱산 양은 API가 무수이며 100% 순수한 것으로 가정함; 실제 양은 사용된 약물 물질 로트의 효력을 기초로 조정되며, 미세결정질 셀룰로스의 양은 상응하게 감소됨.

[0228]

한 실시양태에서, 정제는 엘로우 오파드라이®를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 정제는 화이트 오파드라이®를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 정제는 그린 오파드라이®를 포함한다.

[0229]

제약 조성물

[0230] 실질적으로 순수한 형태의 오베틱산인 오베틱산 형태 1 및 오베틱산의 결정질 형태를 비롯한 오베틱산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체는 다양한 의약 목적상 유용하다. 오베틱산은 FXR 매개 질환 및 상태의 예방 또는 치료 방법에 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 질환 또는 상태는 담도 폐쇄증, 담즙정체성 간 질환, 만성 간 질환, 비알콜성 지방간염 (NASH), C형 간염 감염, 알콜성 간 질환, 원발성 담즙성 간경변증 (PBC), 진행성 섬유증으로 인한 간 손상, 간 섬유증, 및 아테롬성동맥경화증, 동맥경화증, 고콜레스테롤혈증 및 고지혈증을 비롯한 심혈관 질환으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 오베틱산 형태 1은

트리글리세리드를 강하시키는 방법에 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 결정질 오베티콜산은 트리글리세리드를 강하시키는 방법에 사용될 수 있다. 오베티콜산 형태 1 또는 결정질 오베티콜산은 HDL을 증가시킬 수 있다. 오베티콜산 형태 1 또는 결정질 오베티콜산의 다른 효과는 알칼리성 포스파타제 (ALP), 빌리루빈, ALT, AST 및 GGT를 강하시키는 것을 포함한다.

[0231] 한 실시양태에서, 본 발명은 오베티콜산이 본 발명의 방법에 의해 생성된 것, 예를 들어 오베티콜산 형태 1인, 오베티콜산 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 실질적으로 순수한 오베티콜산 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 결정질 오베티콜산 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 결정질 오베티콜산은 형태 C이다.

[0232] 한 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 생성된 오베티콜산 형태 1 또는 그의 제약 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 FXR 매개 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 생성된 실질적으로 순수한 오베티콜산 또는 그의 제약 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 FXR 매개 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 결정질 오베티콜산 또는 그의 제약 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 FXR 매개 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 결정질 오베티콜산은 형태 C이다. 한 실시양태에서, 결정질 오베티콜산은 형태 A이다. 한 실시양태에서, 결정질 오베티콜산은 형태 C이다. 한 실시양태에서, 결정질 오베티콜산은 형태 D이다. 한 실시양태에서, 결정질 오베티콜산은 형태 F이다. 한 실시양태에서, 결정질 오베티콜산은 형태 G이다.

[0233] 또 다른 실시양태에서, 질환 또는 상태는 심혈관 질환 또는 담즙정체성 간 질환이며, 트리글리세리드를 강하시킬 필요가 있는 것이다. 또 다른 실시양태에서, 심혈관 질환은 아테롬성동맥경화증 또는 고콜레스테롤혈증이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다. 또 다른 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0234] 또 다른 실시양태에서, 화합물 또는 제약 조성물은 경구, 비경구 또는 국소로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 화합물 또는 제약 조성물은 경구로 투여된다.

[0235] 한 실시양태에서, 본 발명은 담즙정체 상태를 앓고 있는 대상체에게 본 발명의 방법에 의해 생성된 오베티콜산 또는 그의 제약 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 섬유증을 억제하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 담즙정체 상태를 앓고 있지 않는 대상체에게 본 발명의 방법에 의해 생성된 오베티콜산 또는 그의 제약 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 섬유증을 억제하는 방법에 관한 것이다. 실시양태에서, 억제할 섬유증은 FXR이 발현되는 기관에서 발생한다.

[0236] 한 실시양태에서, 담즙정체 상태는 비정상적으로 상승된 알칼리성 포스파타제, 7-글루타밀 트랜스펩티다제 (GGT) 및 5' 뉴클레오티다제의 혈청 수준을 갖는 것으로 정의된다. 또 다른 실시양태에서, 담즙정체 상태는 적어도 하나의 임상적 증상을 나타내는 것으로 추가로 정의된다. 또 다른 실시양태에서, 증상은 가려움증 (소양증)이다. 또 다른 실시양태에서, 섬유증은 간 섬유증, 신섬유증 및 장 섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 담즙정체 상태는 원발성 담즙성 간경변증, 원발성 경화성 담관염, 약물-유발 담즙정체, 유전성 담즙정체 및 임신 중 간내 담즙정체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 원발성 간암 및 담도암, 전이성 암, 패혈증, 만성 총 비경구 영양, 낭성 섬유증 및 육아종성 간 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 또는 상태와 연관된 담즙정체 상태를 앓고 있지 않는 것이다.

[0237] 또 다른 실시양태에서, 대상체는 B형 간염; C형 간염; 기생충성 간 질환; 이식후 박테리아, 바이러스 및 진균 감염; 알콜성 간 질환 (ALD); 비-알콜성 지방간 질환 (NAFLD); 비-알콜성 지방간염 (NASH); 메토트렉세이트, 이소니아지드, 옥시페ニ스타틴, 메틸도파, 클로르프로마진, 톨부타미드 또는 아미오다론에 의해 유발된 간 질환; 자가면역 간염; 사르코이드증; 월슨병; 혈색소증; 고서병; 유형 III, IV, VI, IX 및 X 글리코겐 축적 질환; α₁-항트립신 결핍; 젤베거 증후군; 티로신혈증; 프룩토스혈증; 갈락토스혈증; 베드-카이아리 증후군, 정맥폐쇄 질환 또는 문맥 혈전증과 연관된 혈관 이상; 및 선천성 간 섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환과 연관된 간 섬유증을 갖는다.

[0238] 또 다른 실시양태에서, 대상체는 크론병, 궤양성 결장염, 방사선조사후 결장염 및 현미경적 결장염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환과 연관된 장 섬유증을 갖는다.

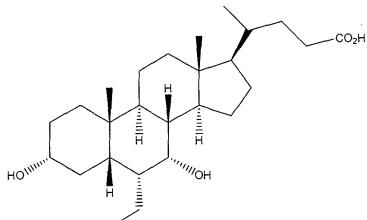
[0239] 또 다른 실시양태에서, 대상체는 당뇨병성 신병증, 고혈압성 신경화증, 만성 사구체신염, 만성 이식

사구체병증, 만성 간질성 신염 및 다낭성 신장 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환과 연관된 신섬유증을 갖는다.

[0240] 정의

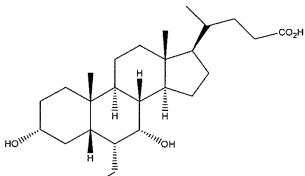
편의상, 본 명세서, 실시예 및 첨부된 특허청구범위에서 사용된 특정 용어가 하기에 집합된다.

[0242] 본원에 사용된 용어 "오베티콜산" 또는 "OCA"는 하기 화학 구조를 갖는 화합물을 지칭한다:



[0243] 오베티콜산에 대한 다른 화학 명칭은 $3\alpha,7\alpha$ -디히드록시- 6α -에틸- 5β -콜란-24-오산, 6α -에틸-케노데옥시콜산, 6-에틸-CDCA, 6ECDCA, 콜란-24-오산, 6-에틸-3,7-디히드록시-, ($3\alpha,5\beta,6\alpha,7\alpha$ - 및 INT-747을 포함한다. 오베티콜산에 대한 CAS 등록 번호는 459789-99-2이다. 이 용어는 모든 형태의 오베티콜산, 예를 들어 비-결정질, 결정질 및 실질적으로 순수한 오베티콜산을 지칭한다.

[0244] 본원에 사용된 용어 "결정질 오베티콜산"은 하기 화학 구조를 갖는 화합물의 임의의 결정질 형태를 지칭한다:



[0245] 결정질 오베티콜산은 화합물이 3차원 공간으로 특정한 결정 충전 배열로 결정화되거나, 또는 화합물이 외부 표면 평면을 갖는 화합물인 것을 의미한다. 오베티콜산 (또는 그의 제약상 허용되는 염, 아미노산 접합체, 용매화물)의 결정질 형태는 모두 동일한 오베티콜산의 원소 조성을 갖는 상이한 결정 충전 배열로 결정화될 수 있다. 상이한 결정 형태는 통상적으로 상이한 X선 회절 패턴, 적외선 스펙트럼, 용점, 밀도 경도, 결정 형상, 광학 및 전기 특성, 안정성 및 용해도를 갖는다. 재결정화 용매, 결정화 속도, 저장 온도 및 기타 인자는 1종의 결정 형태를 우세하게 발생시킬 수 있다. 오베티콜산 결정은 상이한 조건, 예를 들어 상이한 용매, 온도 등 하에서 결정화에 의해 제조될 수 있다.

[0246] 본원에 사용된 용어 "결정질 오베티콜산 형태 C"는 도 5에 제시된 것과 실질적으로 유사한 X선 회절 패턴을 갖는 결정질 형태, 예를 들어 실시예 3에서 특성화된 바와 같은 결정질 형태의 오베티콜산을 지칭한다.

[0247] 본원에 사용된 용어 "실질적으로 순수한 오베티콜산"은 약 95% 초과의 효력을 갖는 오베티콜산을 지칭한다. 오베티콜산의 효력은, 예를 들어 오베티콜산 샘플 내의 물, 용매 및 다른 유기 및 무기 불순물을 비롯한 불순물을 고려한다. 또 다른 실시양태에서, 효력에 대한 공지된 표준물은 100% 오베티콜산이고, 효력은 공지된 표준물 100%에서 용매, 물 및 다른 유기 및 무기 불순물과 같은 불순물의 백분율을 차감하여 결정된다. 한 측면에서, 무기 불순물은, 예를 들어 무기 염 및 황산화 회분을 포함한다. 한 측면에서, 유기 불순물은 6-에틸우르소데옥시콜산, 3α -히드록시- 6α -에틸-7-케토- 5β -콜란-24-오산, 6β -에틸케노데옥시콜산, $3\alpha,7\alpha$ -디히드록시- 6α -에틸리덴- 5β -콜란-24-오산, 케노데옥시콜산 및 3α ($3\alpha,7\alpha$ -디히드록시- 6α -에틸- 5β -콜란-24-오일옥시)- 7α -히드록시- 6α -에틸- 5β -콜란-24-오산을 포함한다. 불순물의 양은 당업계에 공지된 절차, 예를 들어 HPLC, NMR, 또는 미국 약전 또는 유럽 약전으로부터의 방법, 또는 이를 방법 중 2종 이상의 조합에 의해 결정될 수 있다.

[0248] 본원에 사용된 용어 "순도"는, 예를 들어 HPLC로부터 수득된 화합물의 화학적 분석을 지칭한다. 한 실시양태에서, 화합물의 순도는 참조 표준물, 예를 들어 오베티콜산의 순도와, 비교를 위한 그들 각각의 피크하 면적을 통해 비교된다. 한 실시양태에서, 순도는 샘플 내 유기 불순물을 고려한다.

[0249] 본원에 사용된 용어 "반응 혼합물"은 함께 조합된 1종 이상의 물질의 혼합물을 지칭한다. 한 실시양태에서, 물질을 혼합 또는 조합하는 것은 본래 물질 중 1종 이상에 화학적 변환 또는 변화를 발생시킨다.

[0250] 본원에 사용된 용어 "오베티콜산 형태 1"은 비-결정질 오베티콜산을 지칭한다. 한 실시양태에서, 이러한 형태의 오베티콜산은 합성 중간체로서 결정질 오베티콜산을 통해 생성된다. 예를 들어, 이러한 형태의 오베티콜산은 본 출원 방법에 의해 합성 중간체로서 결정질 오베티콜산 형태 C를 통해 생성된다. 한 실시양태에서, 오베티콜산 형태 1은 비-결정질 오베티콜산을 지칭한다.

티콜산 형태 1은 제약 활성 성분으로서 사용되는 형태이다. 보다 상세한 사항은 실시예 5를 참조한다.

[0251] "치료하는"은 상태, 질환, 장애 등을 개선시키는, 예를 들어 완화, 감소, 조절 또는 제거하는 임의의 효과를 포함한다. 질환 상태를 "치료하는" 또는 질환 상태의 "치료"는 질환 상태를 억제하는 것, 즉 질환 상태 또는 그의 임상적 증상의 발생을 저지하는 것; 또는 질환 상태를 경감시키는 것, 즉 질환 상태 또는 그의 임상적 증상의 일시적이거나 영구적인 퇴화를 발생시키는 것을 포함한다.

[0252] 질환 상태를 "예방하는"은 질환 상태에 노출되거나 질환 상태에 이를 경향이 있을 수 있지만, 아직 질환 상태를 겪지 않았거나 질환 상태의 증상을 나타내지 않는 대상체에서 질환 상태의 임상적 증상이 발생하지 않도록 하는 것을 포함한다.

[0253] "질환 상태"는 임의의 질환, 장애, 상태, 증상 또는 적응증을 의미한다.

[0254] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 적절한 용량 투여 시에 급성 또는 만성 치료 효과를 생성하는 오베티콜산 (예를 들어, FXR-활성화 리간드)의 양을 지칭한다. 효과는 증상, 신호 및 질환/상태의 기저 병리상태 (예를 들어, 간, 신장 또는 장의 섬유증) 및 관련 합병증의 임의의 검출가능한 정도로의 예방, 조정, 억제 또는 역전을 포함한다.

[0255] "치료 유효량"은 질환을 치료하기 위해 포유동물에게 투여한 경우에, 질환에 대해 이러한 치료 효과를 내는데 충분한 오베티콜산의 양을 의미한다. "치료 유효량"은 오베티콜산, 질환 및 그의 증증도 및 치료할 포유동물의 연령, 체중 등에 의존하여 달라질 것이다.

[0256] 치료 유효량의 오베티콜산은 인간 또는 동물에게 투여하기 위해 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화될 수 있다. 따라서, 오베티콜산 또는 그의 제제는 유효량의 화합물을 제공하기 위해, 예를 들어 경구, 비경구 또는 국소 경로를 통해 투여될 수 있다. 대안적 실시양태에서, 본 발명에 따라 제조된 오베티콜산은 의료 장치, 예를 들어 스텐트를 코팅하거나 함침시키는데 사용될 수 있다.

[0257] 본원에 사용된 "약리학적 효과"는 요법의 의도된 목적을 달성한 대상체에서 생성되는 효과를 포괄한다. 한 실시양태에서, 약리학적 효과는 치료되는 대상체의 원발성 적응증이 예방, 완화 또는 감소된 것을 의미한다. 예를 들어, 약리학적 효과는 치료된 대상체에서 원발성 적응증의 예방, 완화 또는 감소를 유발하는 것일 것이다. 또 다른 실시양태에서, 약리학적 효과는 치료되는 대상체의 원발성 적응증의 장애 또는 증상이 예방, 완화 또는 감소된 것을 의미한다. 예를 들어, 약리학적 효과는 치료된 대상체에서 원발성 적응증의 예방 또는 감소를 유발하는 것일 것이다.

[0258] 본 발명은 또한 1개 이상의 원자가 자연에서 가장 흔히 발견되는 원자 질량 또는 질량수와 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자로 대체된 사실을 제외하고, 본 발명의 화학식 및 하기에 언급된 것과 동일한 동위원소-표지된 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체를 내포한다. 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 플루오린의 동위원소, 예컨대 ^3H , ^{11}C , ^{14}C 및 ^{18}F 를 포함한다.

[0259] 상기 언급된 동위원소 및/또는 다른 원자의 다른 동위원소를 함유하는 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체는 본 발명의 범위 내에 존재한다. 동위원소-표지된 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체, 예를 들어 방사성 동위원소, 예컨대 ^3H , ^{14}C 가 혼입된 것은 약물 및/또는 기질 조직 분포 검정에 유용하다. 삼중수소, 즉 ^3H 및 탄소-14, 즉 ^{14}C 동위원소는 제조의 용이성 및 검출감도에 있어서 특히 바람직하다. 또한, 보다 무거운 동위원소, 예컨대 중수소, 즉 ^2H 에 의한 치환은 보다 큰 대사 안정성으로 인한 특정의 치료 이점, 예를 들어 증가된 생체내 반감기 또는 감소된 투여량 요구를 제공할 수 있으며, 따라서 동위원소 표지된 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체가 본 발명의 반응식 및/또는 실시예에 개시된 절차를 수행하는 것에 의해, 비-동위원소 표지된 시약을 용이하게 이용가능한 동위원소 표지된 시약으로 치환하는 것에 의해 일반적으로 제조될 수 있는 일부 상황에서 바람직할 수 있다. 한 실시양태에서, 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체는 동위원소 표지되지 않는다. 한 실시양태에서, 중수소화 오베티콜산은 생분석 검정에 유용하다. 또 다른 실시양태에서, 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체는 방사성표지된다.

[0260] "기하 이성질체"는 그의 존재가 이중 결합에 대해 장애 회전되는 부분입체이성질체를 의미한다. 이러한 배위는

그의 명칭 내의 접두어 시스 및 트랜스, 또는 Z 및 E에 의해 구별되며, 이는 칸-인골드-프렐로그(Cahn-Ingold-Prelog) 법칙에 따라 기가 문자 내 이중 결합의 같은 쪽 또는 반대 쪽에 있는지를 나타낸다.

[0261] "용매화물"은 용매를 화학량론적 또는 비화학량론적 양으로 함유하는 용매 첨가 형태를 의미한다. 오베티콜산은 결정질 고체 상태에 고정 몰비의 용매 분자를 포획하여 용매화물을 형성하는 경향을 가질 수 있다. 용매가 물인 경우에 형성된 용매화물은 수화물이며, 용매가 알콜인 경우에 형성된 용매화물은 알콜레이트이다. 수화물은 1개 이상의 물 분자를, 물을 그의 문자 상태 H₂O로서 보유하는 물질 중 하나와 조합하는 것에 의해 형성되며, 이러한 조합은 1종 이상의 수화물을 형성할 수 있다. 추가로, 본 발명의 화합물, 예를 들어 화합물의 염은 수화 또는 비수화 (무수) 형태로, 또는 다른 용매 문자와의 용매화물로서 존재할 수 있다. 수화물의 비제한적 예는 1수화물, 2수화물 등을 포함한다. 용매화물의 비제한적 예는 에탄올 용매화물, 아세톤 용매화물 등을 포함한다.

[0262] "호변이성질체"는 그 구조가 원자의 배열 면에서 현저하게 상이하지만, 용이하고 신속한 평형으로 존재하는 화합물을 지칭한다. 오베티콜산은 상이한 호변이성질체로 도시될 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, 본 발명의 오베티콜산 및 합성 중간체가 호변이성질체 형태를 갖는 경우에, 모든 호변이성질체 형태가 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 의도되며, 오베티콜산의 명칭은 어떤 호변이성질체 형태도 제외하는 것이 아님을 이해하여야 한다. 본 발명의 오베티콜산 및 합성 중간체는 케토-엔올을 비롯한 여러 호변이성질체 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 케토-엔올 호변이성질체에서, 전자 및 수소 원자의 동시 이동이 일어난다. 호변이성질체는 용액 중에서 호변이성질체 세트의 혼합물로서 존재한다. 고체 형태에서는, 통상적으로 1종의 호변이성질체가 우세하다. 1종의 호변이성질체가 기재될 수 있다 하더라도, 본 발명은 본 화합물의 모든 호변이성질체를 포함한다.

[0263] 따라서, 달리 나타내지 않는 한, 비대칭 탄소 원자로부터 비롯된 이성질체 (예를 들어, 모든 거울상이성질체 및 부분입체이성질체)가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 이해하여야 한다. 이러한 이성질체는 고전적 분리 기술에 의해, 그리고 입체화학적 제어 합성에 의해 실질적으로 순수한 형태로 수득될 수 있다. 또한, 본 출원에서 논의된 구조 및 다른 화합물 및 모이어티도 또한 그의 모든 호변이성질체를 포함한다. 알켄은 적절한 경우에 E- 또는 Z-기하구조를 포함할 수 있다. 오베티콜산 및 합성 중간체는 입체이성질체 형태로 존재할 수 있으며, 따라서 개별 입체이성질체로서 또는 혼합물로서 생성될 수 있다.

[0264] "제약 조성물"은 대상체에게 투여하기에 적합한 형태로 오베티콜산을 함유하는 제제이다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 벌크 또는 단위 투여 형태이다. 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 유익할 수 있다. 본원에 사용된 투여 단위 형태는 치료할 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리적 이산 단위를 지칭하고; 각 단위는 요구되는 제약 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 제공하도록 계산된 예정량의 활성 시약을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 규격은 활성 시약의 특유한 특징 및 달성하고자 하는 특정한 치료 효과, 및 개체의 치료를 위한 이러한 활성 시약의 배합에 있어서 당업계에 내재된 제한사항에 의해 영향을 받고, 이들에 직접적으로 의존한다.

[0265] 단위 투여 형태는, 예를 들어 캡슐, IV 백, 정제, 에어로졸 흡입기 상의 단일 펌프, 또는 바이알을 비롯한 다양한 형태 중 임의의 것이다. 조성물의 단위 용량 내의 오베티콜산 (예를 들어 오베티콜산 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물 또는 아미노산 접합체의 제제)의 양은 유효량이며, 수반되는 특정한 치료에 따라 달라진다. 당업자는 환자의 연령 및 상태에 의존하여 때때로 투여량에 통상적인 변화를 줄 필요가 있음을 인식할 것이다. 투여량은 또한 투여 경로에 의존할 것이다. 경구, 폐, 직장, 비경구, 경피, 피하, 정맥내, 근육내, 복강내, 흡입, 협측, 설하, 흉강내, 척수강내, 비강내 등을 비롯한, 다양한 경로가 고려된다. 본 발명의 화합물의 국소 또는 경피 투여를 위한 투여 형태는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 한 실시양태에서, 오베티콜산은 무균 조건 하에, 제약상 허용되는 담체, 및 필요한 임의의 보존제, 완충제 또는 추진제와 함께 혼합된다.

[0266] 용어 "플래쉬 용량"은 투여 형태를 신속하게 분산시키는 오베티콜산 제제를 지칭한다.

[0267] 용어 "즉시 방출"은 비교적 단시간, 일반적으로 약 60분 이하의 시간 내에 투여 형태로부터의 오베티콜산의 방출로 정의된다. 용어 "변형 방출"은 지연 방출, 연장 방출 및 펄스 방출을 포함하는 것으로 정의된다. 용어 "펄스 방출"은 투여 형태로부터의 일련의 약물 방출로 정의된다. 용어 "지속 방출" 또는 "연장 방출"은 투여 형태로부터의 장기간에 걸친 연속적인 오베티콜산의 방출로 정의된다.

[0268] "대상체"는 포유동물, 예를 들어 인간, 반려 동물 (예를 들어, 개, 고양이, 새 등), 가축 (예를 들어, 소, 양,

돼지, 말, 닭 등) 및 실험 동물 (예를 들어, 래트, 마우스, 기니 피그, 새 등)을 포함한다. 한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 한 실시양태에서, 대상체는 인간 소아 (예를 들어, 약 30 kg 내지 약 70 kg)이다. 한 실시양태에서, 인간 소아는 카사이 절차를 받은 적이 있으며, 여기서 카사이 절차는 소아가 출생 시 담관 없이 또는 그것이 완전히 차단된 상태로 태어난 경우에 기능적 담관을 효과적으로 제공한다.

[0269] 본원에 사용된 어구 "제약상 허용되는"은 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적합하고, 합리적인 이익/위험비에 부합하는 화합물, 물질, 조성물, 담체, 및/또는 투여 형태를 지칭한다.

[0270] "제약상 허용되는 부형제"는 일반적으로 안전하고 비-독성이고 생물학적으로나 달리 바람직하지 않은 것이 아닌, 제약 조성물을 제조하는데 유용한 부형제를 의미하며, 수의학적 용도 뿐만 아니라 인간 제약 용도에서도 허용되는 부형제를 포함한다. 본 명세서 및 특허청구범위에서 사용된 "제약상 허용되는 부형제"는 1종 및 1종 초과의 이러한 부형제를 둘 다 포함한다.

[0271] 임의의 제제없이 오베티콜산을 직접적으로 투여하는 것이 가능하지만, 오베티콜산은 통상적으로 제약상 허용되는 부형제 및 오베티콜산을 포함하는 제약 제제의 형태로 투여된다. 이를 제제는 경구, 협측, 직장, 비강내, 경피, 피하, 정맥내, 근육내 및 비강내를 비롯한 다양한 경로에 의해 투여될 수 있다. 오베티콜산의 경구 제제는 본원에서 표제 "경구 제제 및 투여"의 섹션 하에 추가로 기재된다.

[0272] 한 실시양태에서, 오베티콜산은 경피로 투여될 수 있다. 경피로 투여하기 위해, 경피 전달 장치 ("패치")가 필요하다. 이러한 경피 전달 패치는 본 발명의 화합물을 제어된 양으로 연속 또는 불연속 주입을 제공하는데 사용될 수 있다. 제약 작용제의 전달을 위한 경피 패치의 구성 및 사용은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,023,252를 참조한다. 이러한 패치는 연속형, 펄스형으로 구성될 수 있거나, 또는 제약 작용제의 요구되는 전달에 따라 구성될 수 있다.

[0273] 본 발명의 한 실시양태에서, 협측 및/또는 설하 또는 비강 투여에 적합화된 제제 내에 상기 기재된 바와 같은 오베티콜산을 적어도 포함하는 제약 제제가 제공된다. 이러한 실시양태는 위 시스템에 의하고/거나 간을 통하여 일차 통과 대사와 같은 위 합병증을 회피하는 방식으로의 오베티콜산의 투여를 제공한다. 이러한 투여 경로는 또한 흡착 시간을 감소시켜 보다 신속한 치료 이익을 개시시킬 수 있다. 본 발명의 화합물은 설하/협측 제제를 가능하게 하는 특히 바람직한 용해도 프로파일을 제공할 수 있다. 이러한 제제는 전형적으로, 제제가 표면적과 접촉하는 상대적으로 짧은 기간 동안 설하/협측 점막의 제한된 표면적에 충분한 양의 활성 성분을 전달하여 활성 성분이 흡착되도록 하기 위해 상대적으로 높은 농도의 활성 성분을 필요로 한다. 따라서, 높은 용해도와 조합된, 매우 높은 활성의 오베티콜산이 그것을 설하/협측 제제에 적합하게 한다.

[0274] 오베티콜산은 바람직하게는 단위 투여 형태로 제제화되며, 각각의 투여량은 약 0.1 mg 내지 약 1500 mg을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 100 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 50 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 30 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 4 mg 내지 약 26 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 5 mg 내지 약 25 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 2 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1.2 mg 내지 약 1.8 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1.3 mg 내지 약 1.7 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1.5 mg을 포함한다. 용어 "단위 투여 형태"는 인간 대상체 및 다른 포유동물을 위한 단위 투여로서 적합한 물리적 이산 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 목적하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 예정량의 활성 물질을 상기 기재된 바와 같은 적합한 제약 부형제와 함께 함유한다.

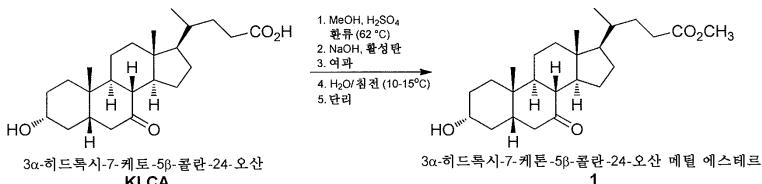
[0275] 오베티콜산은 일반적으로 넓은 투여량 범위에서 효과적이다. 예를 들어, 1일 투여량은 통상적으로 약 0.0001 내지 약 30 mg/kg 체중의 범위 이내이다. 성인 인간의 치료에 있어서, 단일 또는 분할된 용량으로의 약 0.1 내지 약 15 mg/kg/일의 범위가 특히 바람직하다. 실시양태에서, 제제는 약 0.1 mg 내지 약 1500 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 100 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 50 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 30 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 4 mg 내지 약 26 mg을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 5 mg 내지 약 25 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1 mg 내지 약 2 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1.2 mg 내지 약 1.8 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1.3 mg 내지 약 1.7 mg을 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 1.5 mg을 포함한다. 그러나, 실제로 투여되는 오베티콜산의 양은 치료할 상태, 선택된 투여 경로, 투여되는 오베티콜산의 형태, 개별 환자의 연령, 체중 및 반응, 및 환자의 증상의 중증도를 비롯한 관련 상황을 고려하여 의사에 의해 결정될 것임을 이해할 것이며, 따라서 상기 투여량 범위는 어떤 방식으로든 본 발명

의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 일부 경우에 상기 범위의 하한 미만의 투여량 수준이 보다 적절 할 수 있고, 다른 경우에 훨씬 더 큰 용량이 어떠한 해로운 부작용도 유발하지 않으면서 사용될 수 있으며, 단 이러한 큰 용량은 우선 하루에 걸친 투여를 위해 여러 작은 용량으로 분할될 것을 단서로 한다.

- [0276] "본 발명의 방법"은 본원에 기재된 바와 같은 오베티콜산을 제조하는 방법을 지칭하며, 여기서 방법은 결정질 오베티콜산을 포함한다.
- [0277] "섬유증"은 조직 또는 기관 내에서의 과도한 섬유 결합 조직, 예를 들어 반흔 조직의 발생을 수반하는 상태를 지칭한다. 이러한 반흔 조직의 생성은 질환, 외상, 화학적 독성 등으로 인한 기관의 감염, 염증 또는 손상에 반응하여 발생할 수 있다. 섬유증은 간, 신장, 장, 폐, 심장 등을 비롯한 다양한 상이한 조직 및 기관에서 발생할 수 있다.
- [0278] 본원에 사용된 용어 "억제하는" 또는 "억제"는 질환 또는 상태의 발생 또는 진행에 대한 임의의 검출가능한 긍정적 영향을 지칭한다. 이러한 긍정적 영향은 질환 또는 상태의 적어도 하나의 증상 또는 신호의 개시의 지연 또는 방지, 증상(들) 또는 신호(들)의 완화 또는 역전, 및 증상(들) 또는 신호(들)의 추가의 악화의 늦춤 또는 방지를 포함할 수 있다.
- [0279] 본원에 사용된 "담즙정체 상태"는 간으로부터의 담즙 배출이 손상되거나 차단된 임의의 질환 또는 상태를 지칭하며, 이는 간 또는 담관에서 발생할 수 있다. 간내 담즙정체 및 간외 담즙정체는 2가지 유형의 담즙정체 상태이다. 간내 담즙정체 (간 내부에서 발생함)는 원발성 담즙성 간경변증, 원발성 경화성 담관염, 패혈증 (전신 감염), 급성 알콜성 간염, 약물 독성, 총 비경구 영양 (정맥내로 공급되는 것), 악성종양, 낭성 섬유증 및 임신에서 가장 흔히 관찰된다. 간외 담즙정체 (간 외부에서 발생함)는 담관 종양, 협착, 낭, 계실, 총담관 내 결석 형성, 췌장염, 췌장 종양 또는 가성낭 및 주위 기관 내 종괴 또는 종양으로 인한 압축에 의해 유발될 수 있다.
- [0280] 담즙정체 상태의 임상적 증상 및 신호는 가려움증 (소양증), 피로, 황달에 걸린 피부 또는 눈, 특정 식품의 소화 불능, 오심, 구토, 옅은색의 대변, 암뇨 및 우측 상복부 통증을 포함한다. 담즙정체 상태의 환자는 환자의 혈액 혈청 내 알칼리성 포스파타제, γ-글루타밀 트랜스펩티다제 (GGT), 5' 뉴클레오티다제, 빌리루빈, 담즙산 및 콜레스테롤 수준의 측정을 포함하는 일련의 표준 임상 실험실 시험에 기초하여 진단 및 임상 추적될 수 있다. 일반적으로, 환자는 모든 3종의 진단 마커 알칼리성 포스파타제, GGT 및 5' 뉴클레오티다제의 혈청 수준이 비정상적으로 상승된 것으로 간주되는 경우에, 담즙정체 상태를 갖는 것으로 진단된다. 이들 마커의 정상 혈청 수준은 시험 프로토콜에 의존하여, 실험실마다 그리고 절차마다 어느 정도 다를 수 있다. 따라서, 의사는 특정한 실험실 및 시험 절차에 기초하여 각각의 마커에 대해 어떤 것이 비정상적으로 상승된 혈액 수준인지를 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 담즙정체 상태를 앓고 있는 환자는 일반적으로 혈액 중 약 125 IU/L 초과의 알칼리성 포스파타제, 약 65 IU/L 초과의 GGT 및 약 17 NIL 초과의 5' 뉴클레오티다제를 갖는다. 혈청 마커의 수준에서의 가변성으로 인해, 담즙정체 상태는 상기 언급한 증상 중 적어도 하나, 예전대 가려움증 (소양증)에 더하여 이들 3종의 마커의 비정상적인 수준을 기준으로 진단될 수 있다.
- [0281] 용어 "기관"은 세포 및 조직으로 이루어지고 유기체 내에서 일부 특정 기능을 수행하는 (심장, 폐, 신장, 간 등과 같이) 분화된 구조를 지칭한다. 이러한 용어는 또한, 기능을 수행하거나 또는 행위에 협조하는 신체 부분 (예를 들어, 눈 및 시각 기관을 구성하는 관련 조직)을 포함한다. 용어 "기관"은 잠재적으로 완전한 구조로 발생할 수 있는 분화된 세포 및 조직의 임의의 부분 구조 (예를 들어, 간의 엽 또는 절편)를 추가로 포함한다.
- [0282] 본원에 언급된 모든 간행물 및 특히 문헌은, 이러한 간행물 또는 문헌이 각각 구체적이고 개별적으로 표시되어 본원에 참조로 포함되는 것과 같이, 본원에 참조로 포함된다. 간행물 및 특히 문헌의 언급은 임의의 것을 관련 선행 기술로 허용하고자 하는 것이 아니며, 그의 내용 또는 시기에 대해서 어떠한 것도 허용하지 않는다. 본 발명은 여기서 서면 명세로서 기재되어 있으며, 당업자는 본 발명이 다양한 실시양태로 실시될 수 있고 상기 설명 및 하기 실시예가 예시의 목적이며 하기 특허청구범위를 제한하지 않는다는 것을 인식할 것이다.
- [0283] 명세서에서, 문맥상 달리 분명하게 나타내지 않는 한 단수형은 또한 복수형을 포함한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 전문 과학 용어는 본 발명이 속한 업계의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 상충의 경우에, 본 명세서가 제어할 것이다.
- [0284] 본원에 사용된 모든 백분율 및 비는, 달리 나타내지 않는 한, 중량 기준이다.
- [0285] 실시예
- [0286] 실시예 1: 오베티콜산의 합성

[0287] 이 합성 절차에 지칭된 화합물 번호는 반응식 1 및 각각의 단계에 상응하는 반응에 나타낸 것들을 지칭한다.

[0288] 단계 1 - 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)의 제조:



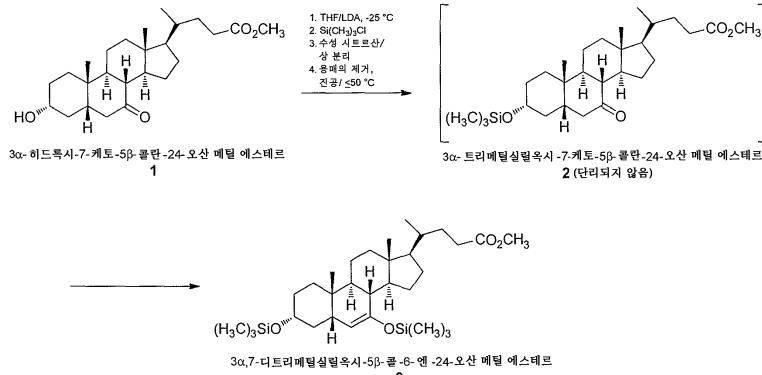
[0289]

[0290] 반응 1: 7-케토 리토콜산 (KLCA)의 C-24 카르복실산의 에스테르화

[0291] 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (KLCA; 500.0 g, 1.28 mol)을 산성 촉매작용 (황산, 1.0 mL)의 존재 하에 메틸 알콜 (2500 mL)을 사용하여 에스테르화시키고 대략 3시간 동안 62°C 내지 64°C로 가열하여 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (1)를 수득하였다. 이 반응에서, 메틸 알콜은 메틸화 시약 뿐만 아니라 반응 용매로서 작용한다. 후처리를 위해, pH-값을 수산화나트륨 용액 (2N)을 사용하여 pH 7.0 내지 7.5로 조정하였다. 용액을 활성탄 (25 g)으로 대략 30분 동안 처리하고, 여과하여 탄소 고체를 제거하였다. 대안적으로, 용액을 활성탄으로 처리하지 않았다. 생성물을 침전시키기 위해, 10°C 내지 15°C에서 물 (625 mL)을 15분에 걸쳐 첨가하고, 시딩 물질을 첨가하였다. 반응 혼합물을 10°C 내지 15°C에서 1시간 동안 교반하였다. 물 (1875 mL)의 추가 분량을 약 20 내지 25분에 걸쳐 첨가하였다. 생성물 혼탁액을 10°C 내지 15°C에서 30분 동안 교반하였다. 생성물을 원심분리로 단리시키고, 메탄올 및 물의 혼합물 (1:1, 350 mL)로 세척하였다. 습윤 물질의 수분 함량을 칼 피셔 (KF)에 의해 정량화하였다. 물질을 텁블 건조기에서 진공 하에 NMT 70°C에서 건조시켰다. 물질은 건조시키지 않고 후속 단계에 사용할 수도 있다. 수율 (건조된 생성물에 대해 계산됨)은 501.4 g (1.24 mol, 96.8%)이었다.

[0292]

단계 2 - 3 α , 7 α -디트리메틸실릴옥시-5 β -콜-6-엔-24-오산 메틸 에스테르 (3)의 제조:



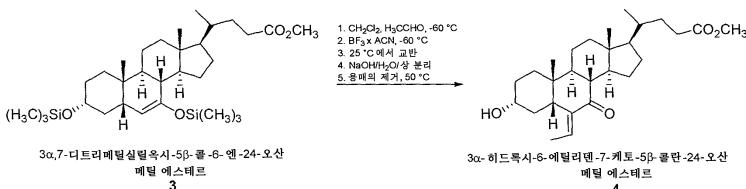
[0293]

[0294] 반응 2: 7-케토 리토콜산 메틸 에스테르로부터의 실릴엔올 에테르 형성

[0295]

잔류 물 및 메탄올을 함유하는 화합물 1 (60.69 g, 150 mmol, 건조 물질로서 계산됨)을 불활성 조건 하에 반응기에 충전하고, 테트라하يد로푸란 (THF, 363 mL) 중에 용해시켰다. 물 및 메탄올을 반복된 공비 증류에 의해 대략 65°C 및 정상 압력에서 제거하였다. THF를 필요에 따라 잔류물에 첨가하고, 증류를 대략 4회 반복하였다. 나머지 용액은 ≤ 0.05%의 최종 수분 함량 (칼 피셔 적정)을 가져야만 한다. 이 용액을 -20°C 내지 -25°C로 사전에 냉각시킨 다음, 클로로트리메틸실란 (73.33 g, 675 mmol, 4.5 당량)을 약 30 내지 45분 내에 첨가하였다. 질소 분위기 하에, 리튬 디이소프로필 아미드 (28% LDA 용액, 900 mmol) 및 THF (504 mL)를 별개의 불활성 반응기에 충전하고, -20°C 내지 -25°C로 냉각시켰다. 화합물 1의 건조, 냉각된 용액, THF (84 mL) 및 클로로트리메틸실란을 LDA 용액에 -20°C 내지 -25°C에서 충전하였다. 이어서, 반응 혼합물을 대략 2시간 동안 교반하였다. 후처리를 위해, 반응 혼합물을 2°C 내지 8°C에서 시트르산의 사전에 냉각된 수용액 (300 mL 중 34.6 g)에 첨가하였다. 첨가한 후, 수성 상을 분리하고 버렸다. 유기 상으로부터, 액체를 진공 증류에 의해 최대 50°C에서 제거하였다. 단리된 잔류물은 화합물 3 및 일부 잔류 용매를 함유하였고 후속 단계에 '그대로' 사용하였다.

[0296]

단계 3 - 3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 메틸 에스테르 (4)의 제조:

[0297]

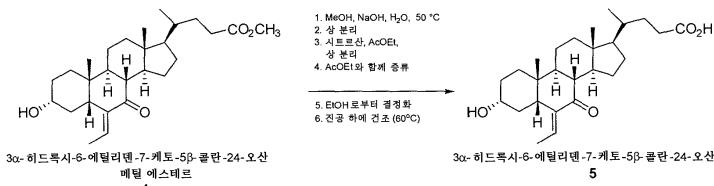
[0298]

반응 3: 실릴엔올 에테르 및 아세트알데히드의 알돌 축합

[0299]

THF 중 화합물 3 (164.68 g, 300 mmol, 건조 물질로서 계산됨) 용액을 불활성 반응기에 충전하였다. 50°C의 최대 온도에서, 잔류 양의 THF를 진공 하에 증류시켰다. 진행하기 위해 잔류물 중 수분 함량을 ≤ 0.5% (칼 피서 적정)로 제한하였다. 이어서, 잔류물을 디클로로메탄 (200 mL) 중에 용해시키고, -60°C 내지 -65°C로 사전에 냉각시켰다. 이어서, 아세트알데히드 (33.8 mL, 600 mmol)를 첨가하였다. 질소 분위기 하에, 디클로로메탄 (700 mL) 및 삼플루오르화붕소 (아세토니트릴 중 16 중량% 용액, 318 g, 750 mmol) 아세토니트릴 착물을 별개의 반응기에 충전한 다음, -60°C 내지 -65°C로 냉각시켰다. -60°C 내지 -65°C에서, 건조 화합물 3 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 대략 2시간 동안 -60°C 내지 -65°C에서 교반하고, 23°C 내지 28°C로 가열하고, 추가로 대략 3시간 동안 교반하고, 가수분해/후처리를 위해 대략 2°C 내지 10°C로 냉각시켰다. 후처리를 위해, 반응기로부터의 냉각된 용액을 50 중량% 가성 소다 (40 mL) 및 물 660 mL의 사전에 냉각된 수용액에 첨가하였다. 약 10분 동안 집중 교반한 후, 상을 분리하고, (하부) 유기 층을 별개의 반응기로 옮겼다. 유기 층으로부터, 용매를 NMT 50°C에서 증류에 의해 가능한 한 제거하였다. 화합물 4 및 일부 나머지 아세토니트릴 및 디클로로메탄으로 이루어진 잔류물을 드럼으로 배출하였다. 화합물 4A, E/Z-이성질체의 혼합물은 또한 단계 3에 대해 상기 기재된 절차에 의해 제조될 수 있다.

[0300]

단계 4 - 3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (5)의 제조:

[0301]

[0302]

반응 4: C-24 에스테르의 비누화

[0303]

화합물 4 (258.37 g, 600 mmol, 건조 물질로서 계산됨)를 불활성 반응기에 충전하였다. NMT 50°C의 온도에서, 잔류 양의 용매를 진공 하에 증류시켰다. 잔류물을 메탄올 (360 mL) 및 물 (54 mL) 중에 용해시키고, 가성 소다 50 중량% (54 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 49°C 내지 53°C로 가열하고, 이 온도에서 적어도 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 pH를 체크하고, > 12인 것으로 확인하였다. pH가 < 12인 경우에, 추가의 NaOH를 첨가하고, 2시간 반응 시간을 반복하였다. 용액을 물 (1000 mL)로 희석하고, 온도를 25°C 내지 35°C로 조정하였다. 후처리를 위해, 반응 혼합물을 적어도 30분 동안 정착되도록 하였다. 상을 분리하고, 하부 수성 층을 별개의 반응기로 옮기고, 유기 층을 버렸다. 에틸 아세테이트 (1400 mL) 및 수성 시트르산 (480 mL 중 244 g)을 집중 교반 하에 수성 층에 첨가하였다. 반응 혼합물을 25°C 내지 35°C에서 10분 동안 교반하였다. 상을 분리하고, 하부 수성 층을 버렸다. 에틸 아세테이트를 유기 층으로부터 증류하고, 에틸 아세테이트 (800 mL)로 대체하였다. 이 작업을 증류물의 수분 함량이 NMT 1%일 때까지 또는 일정한 비점에 도달할 때까지 반복하였다. 혼탁액을 20°C 내지 25°C로 냉각시키고, 30분 동안 교반한 다음, 생성물을 단리시키고, 에틸 아세테이트 (100 mL, 3 내지 4회)로 세척하였다. 건조를 텁블 건조기에서 진공 하에 대략 60°C에서 수행하였다. 수율은 조 화합물 5 118.71 g (KLCA로부터 47.5%)이었다. 화합물 4A, E/Z 이성질체의 혼합물을 또한 출발 물질로서 사용하여 화합물 5A, E/Z 이성질체의 혼합물을 생성할 수 있다.

[0304]

이어서, 조 화합물 5를 에탄올을 사용하여 결정화하였다. 결정화를 위한 조 화합물은 또한 E/Z 이성질체의 혼합물, 화합물 5A일 수 있다. 에탄올 (390 내지 520 mL) 및 조 화합물 5 (130 g)를 불활성 반응기에 충전하였다. 조 화합물 5를 용해시키기 위해, 반응 혼합물을 환류 하에 가열하였다. 이어서, 반응 혼합물을 15°C에서 20°C로의 제어된 냉각 경사로 3 내지 5시간 이내에 선형 프로파일에 의해 냉각시켰다. 결정질 화합물

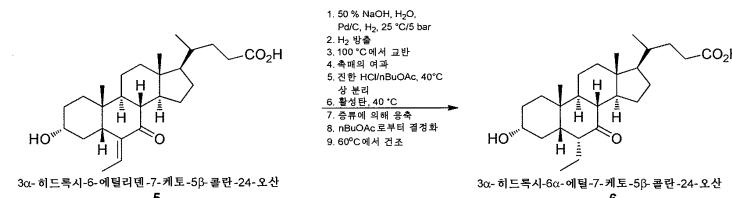
5A를 원심분리를 사용하여 단리시킨 다음, 에틸 아세테이트 (50-100 mL, 2회)로 세척하였다. 건조를 텁블 건조기에서 진공 하에 대략 60°C에서 수행하였다. 이는 85.8 g (66%) 수율을 생성하였다. 정제된 화합물 5의 검정, 순도 및 수분을 측정하기 위해 샘플을 취하였다. 정제된 화합물 5는 3 α -히드록시-6-에틸리덴-7-케토-5 β -콜란-24-오산의 E 이성질체이다. 정제된 화합물 5의 확인 및 특성화와 관련한 모든 세부사항에 대해서는 실시예 2를 참조한다. 정제된 화합물 5, E 이성질체의 단리는 임의적일 수 있다. E 이성질체 및 Z 이성질체는 상이한 용해도를 갖는다. Z 이성질체를 세척해 버릴 수 있도록 E 이성질체는 보다 덜 가용성이고 결정화한다.

[0305]

화합물 5를 제조하기 위한 대안적 방법은 하기와 같다. 화합물 4 (111.96 g)를 불활성 반응기에 충전하였다. 최대 50°C에서 잔류 양의 용매 (예를 들어, 아세토니트릴, 디클로로메탄)를 진공 하에 증류시켰다. 잔류물을 메탄올 (156 mL) 중에 용해시키고, 약 10°C로 냉각시켰다. 수돗물 (23.4 mL) 및 가성 소다 50% (23.4 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 약 20°C 내지 약 25°C에서 약 4시간 동안 교반하였다. 용액을 수돗물 (433 mL)로 회석하고, 톨루엔 (144 mL)을 첨가하였다. 교반한 후, 상을 분리하고, 하부, 수성 층을 불활성 반응기로 옮겼다. 유기 층을 버렸다. 아세트산 에틸에스테르 (607 mL) 및 시트르산 (물 208 mL 중 105.7 g)의 용액을 집중 교반 동안 수성 층에 첨가하였다. 상을 분리하고, 하부, 수성 층을 버렸다. 유기 층을 불활성 반응기로 옮겼다. 유기 층으로부터 아세트산 에틸에스테르를 증류시키고, 아세트산 에틸에스테르 (347 mL)로 대체하였다. 한 실시양태에서, 이 작업을 증류물의 수분 함량이 최대 약 1%일 때까지 또는 일정한 비점에 도달할 때까지 아세트산 에틸에스테르 (173 mL)를 사용하여 반복하였다. 해당 혼탁액을 20°C 내지 25°C로 냉각시켰다. 화합물 5를 단리시키고, 불활성 원심분리 하에 아세트산 에틸에스테르 (3 내지 4회 각각 43 mL)로 세척하였다. 건조를 텁블 건조기에서 진공 하에 및 대략 60°C에서 수행하였다 (화합물 1을 기초로 하여 64.8% 수율). 화합물 4A (E/Z 이성질체의 혼합물)를 또한 단계 4에 대한 출발 물질로서 사용하여 화합물 5A (E/Z 이성질체의 혼합물)를 생성할 수 있다.

[0306]

단계 5 - 3 α -히드록시-6 α -에틸-7-케토-5 β -콜란-24-오산 (6)의 제조:



[0307]

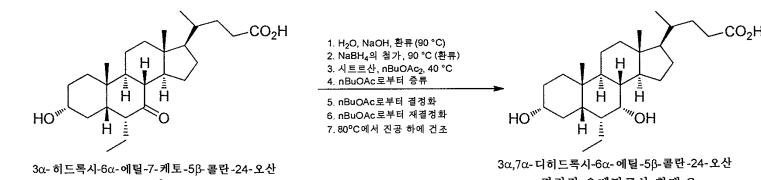
반응 5: 6-에틸리덴 모이어티의 수소화

[0309]

정제된 화합물 5 (110 g, 264 mmol), 물 (1100 mL), 50%의 가성 소다 용액 (35.8 mL, 682 mmol) 및 팔라듐 촉매 (Pd/C, 11 g)의 혼합물을 수소화 반응기에 충전하였다. 온도를 25°C 내지 35°C로 조정하고, 반응기를 질소 (2 bar)로 3회 및 수소 (1 bar)로 3회 풀러싱하였다. 이들 압력 값을 주위 압력 (= 0 bar)에 대비하여 제공하였다. 5 bar의 수소압을 적용시키고, 반응 혼합물을 (알파 위치로의 이성질체화를 위해) 100°C로 1.5시간의 기간에 걸쳐 가열한 다음, 수소압을 4.5 내지 5 bar로 유지하면서 3시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 40°C 내지 50°C로 냉각시켰다. 후처리를 위해, Pd/C를 여과하였다. 여과물에, n-부틸 아세테이트 (1320 mL) 및 염산 (67.8 mL, 815 mmol, 37%)을 첨가하였다. 수성 상을 분리하고 버렸다. 유기 상을 활성탄 (5.5 g)으로 약 10분 동안 40 내지 50°C에서 처리하였다. 활성탄을 여과하고, 여과물을 증류에 의해 응축시키고, 생성된 혼탁액을 15°C 내지 20°C로 2 내지 3시간 이내에 냉각시켰다. 침전된 화합물 6을 단리시키고, n-부틸 아세테이트 (160 mL)로 세척하였다. 생성물을 압력 필터를 사용하여 여과하였다. 건조를 압력 필터에서 진공 하에 대략 60°C에서 수행하였다. 이는 화합물 6 89.8 g (81.2%)을 생성하였다. 화합물 5A, E/Z 이성질체를 단계 5에서 사용하여 화합물 6을 제조할 수 있다.

[0310]

단계 6 - 3 α , 7 α -디히드록시-6 α -에틸-5 β -콜란-24-오산 (오베티콜산)의 제조:



[0311]

[0312]

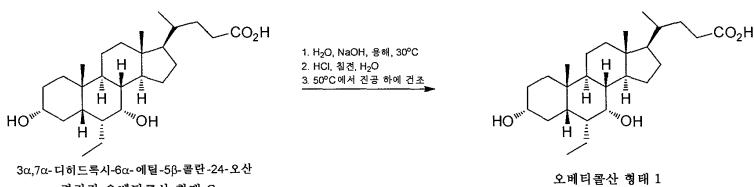
반응 6: 7-케토 기의 7a-히드록시 기로의 선택적 환원

[0313]

화합물 6 (86 g, 205.4 mmol), 물 (688 mL) 및 50% 수산화나트륨 용액 (56.4 mL)의 혼합물을 90°C 내지 105°C에서 50 중량% 수산화나트륨 용액 (1.5 mL) 및 물 (20 mL)의 혼합물 중 수소화붕소나트륨 (7.77 g, 205.4 mmol)과 반응시켰다. 반응 혼합물을 환류 하에 가열하고, 적어도 3시간 동안 교반하였다. 후처리를 위해, 반응을 완료한 후, 반응 혼합물을 대략 80°C로 냉각시키고, 냉각된 반응기로 옮겼다. 30°C 내지 50°C에서, 물 (491 mL) 중 n-부틸 아세테이트 (860 mL) 및 시트르산 (320.2 g, 무수)을 첨가하였다. pH-값을 체크하여 수성상이 산성인 것을 확인한 후에 이를 분리하고 버렸다. 유기 상을 옮기고 중류시켰다. 잔류물을 n-부틸 아세테이트로 희석하고, 15°C 내지 20°C로 천천히 냉각시키고, 조 오베티콜산을 원심분리를 사용하여 여과하였다. 습윤 생성물을 n-부틸 아세테이트로부터 결정화하였다. 생성물 오베티콜산을 단리시키고, 불활성 압력 필터에서 n-부틸 아세테이트 (43 mL, 4회)로 세척하였다. 건조를 압력 필터에서 진공 하에 대략 80°C에서 수행하였다. 이는 결정질 오베티콜산 67.34 g (77.9%)을 생성하였다. 결정질 오베티콜산의 확인 및 특성화와 관련한 모든 세부사항에 대해서는 실시예 3을 참조한다.

[0314]

단계 7 - 오베티콜산 형태 1의 제조:



[0315]

반응 7: 결정질 오베티콜산 형태 C로부터의 오베티콜산 형태 1의 제조

[0316]

결정질 오베티콜산 형태 C (58 g)를 30°C 내지 40°C에서 물 (870 mL) 및 가성 소다 용액 (50%, 8.7 mL, 166 mmol) 중에 용해시켰다. 혼합물을 모든 고체가 용해될 때까지 교반하였다. 생성물을 하기 후처리를 사용하여 침전시켰다. 오베티콜산 용액을 필터를 통해 물 (870 mL) 중 묽은 염산 (37%, 16.05 mL, 193 mmol)에 30°C 내지 40°C에서 천천히 첨가하였다. 혼탁액을 30°C 내지 40°C에서 대략 30분 동안 교반한 다음, 최대 (NMT) 20°C로 냉각시켰다. 생성물을 단리시키고, 불활성 압력 필터에서 물 (465 mL, 6회)로 세척하였다. 건조를 압력 필터에서 진공 하에 NMT 50°C의 온도에서 수행하였다. 이는 오베티콜산 형태 1 53.2 g (91.7%)을 생성하였다.

[0317]

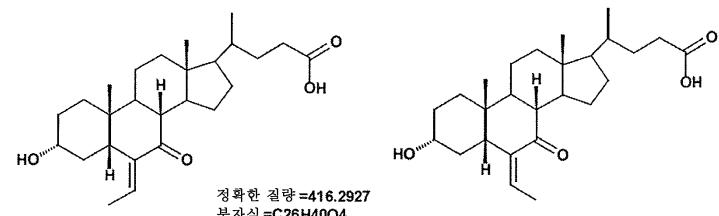
실시예 2: E-3 α-히드록시-6-에틸리텐-7-케토-5β-콜란-24-오산 (5)의 특성화

[0318]

화합물 5는 본 출원 방법에서의 핵심 중간체이다. 화합물을 에틸 아세테이트로부터 단리한 다음 에탄올로부터 결정화하였다. 고도로 순수한 화합물 5는 화합물 6 및 후속적으로, 실질적으로 순수한 오베티콜산을 비롯한 결정질 오베티콜산 형태 C 및 오베티콜산 형태 1의 효율적이고 높은 수율의 생성을 가능하게 한다.

[0319]

실시예 1의 단계 4로부터의 화합물 5의 구조는 ^1H NMR, ^{13}C NMR 및 질량 분광측정법을 사용하여 확인하였다. 단계 4로부터의 조 생성물은 LC/MS-결합에 의한 품질 관리 방법 1에 의해 생성된 UV 크로마토그램 상 체류 시간 (RT) 27.457 min에서 주요 생성물 및 RT 28.078 min에서 부차적 생성물을 생성하였다. 2종의 생성물은 화합물 5의 E/Z 이성질체이다.



[0320]

이들 2종의 이성질체는 MS/MS 스펙트럼에서 동일한 정확한 질량 및 동일한 단편화를 나타낸다. 이들은 질량 분광측정 데이터에 의해 구분할 수 없다.

[0321]

E/Z 이성질체 피크를 단리하기 위한 반-정제용 방법을 사용하여, 2 단계 접근법에 의해 E/Z 이성질체의 구조를 확인하였다. HPLC 품질 관리 방법 1은 비-휘발성 인산 완충제를 사용하며, 따라서 비-휘발성 완충제와 LC/MS의 직접적인 결합은 불가능하였다. 방법을 조정하기 위한 예비 시험은 UPLC 방법만이 E/Z 이성질체의 적절한 분리

를 위한 매우 높은 플레이트 수를 참고하는 것으로 나타났다. 2 단계 접근법은 하기와 같다: 단계 A는 새롭게 개발된 UPLC/MS 방법으로 2개의 샘플 내의 E/Z 이성질체를 확인하는 것이고, 단계 B는 HPLC 방법 2에 의한 E/Z 이성질체 피크의 분획의 단리에 이어 UPLC/MS 방법 1에 의해 후속적으로 확인하는 것이다. 방법의 실험 세부사항은 하기와 같다.

[0324]

<표 C>

1. MS 호환성 UPLC 방법 (방법 1)	
기기:	LTQ FT분광계와 결합된 액설라 UPLC (씨모사이언티픽)
칼럼:	200 x 2mm 하이퍼실 골드 1.9 μm
용리액:	A: 물 + 10 mM 포름산암모늄 + 0.1% 포름산 B: 아세토니트릴
구배:	45% B (20분 내) → 60% B (10분 등용매)
유량:	0.4 ml/min, 40 °C 칼럼 온도
검출:	MS: ESI 양이온 및 음이온; UV: PDA 200.600 nm
질량 해상도:	R=100000 ICR
샘플:	1 mg / ml (물/아세토니트릴 (1:1), 3μl/20μl (주입))
2. HPLC (방법 2)	
기기:	애질런트 1100 HPLC (애질런트 테크놀로지스)
칼럼:	125 x 4mm 퓨로스퍼 스탠 C18 5 Lm
용리액:	A: 물 pH 2.6 + 인산 B: 아세토니트릴
구배:	30 % B (10분 내) → 35% B (30분 내) → 60% B (1분 내) → 90% B (9분 등용매)
유량:	1 mL/min, 35 °C 칼럼 온도
검출:	UV: DAD 200 - 400 nm (UVA 200 nm)
샘플:	10 mg / ml (물/아세토니트릴 (9:1), 25μl (주입))

[0325]

결과를 도 1 및 2에 제시한다. 도 1 및 2는 고성능 UPLC 칼럼으로 수득한 "조 화합물 5" (도 1) 및 "정제된 참조물"인 화합물 5 (도 2)에 대한 UPLC UV/MS 크로마토그램이다. 도 1의 경우에, 샘플을 ACN/H₂O 1:1 중에 1 mg/mL로 용해시켰고; 200x2mm 하이퍼실 골드(Hypersil GOLD) R122; LMA:H20+10mM AF + 0.1%HFO; LMB:ACN; 45%-20-60%(10); 0.4mL/min; 40°C; UVA=200nm; 3 μL 주입 부피였다. 도 2의 경우에, 샘플을 ACN/H₂O 중에 1 mg/ml로 용해시켰고; 200x2mm 하이퍼실 골드 R122; A: 10mM AF + 0.1%HFO; B:ACN; 45%-20-60% B(10); 0.4mL/min; 20 μL 주입 부피였다. 샘플 둘 다에서, 주요 성분 (RT 9.92 min) 및 부차적 성분 (RT 10.77 min)의 분자량은 예상한 것과 동일하였고, 2종의 화합물의 정확한 질량은 하기 제시된 양이온 및 음이온 측정 데이터에 대해 표 D 및 E에 제시된 바와 같이 제공된 구조와 일치하였다.

[0327]

<표 D> 양이온 측정 데이터

RT(min)	이온 m/z	식	구조 제안
9.98	417.30008	C ₂₆ H ₄₁ O ₄ ΔM 0.35 ppm	M+H E 이성질체
	833.59381	C ₅₂ H ₈₁ O ₆ ΔM 1.45 ppm	2M +H E 이성질체
	850.61938	C ₅₂ H ₈₄ O ₆ N ΔM 0.28 ppm	2M + NH4 E 이성질체
10.77	417.30023	C ₂₆ H ₄₁ O ₄	M+H Z 이성질체
	833.59409	C ₅₂ H ₈₁ O ₆	2M +H Z 이성질체
	850.61984	C ₅₂ H ₈₄ O ₆ N	2M + NH4 Z 이성질체

[0328]

<표 E> 음이온 측정 데이터

RT(min)	이온 m/z	식	구조 제안
9.98	415.28520	C ₂₆ H ₃₉ O ₄ ΔM -0.44 ppm	M-H Z 이성질체
	461.29051	C ₂₇ H ₄₁ O ₆ ΔM -0.76 ppm	M + Formiat Z 이성질체
	831.57683	C ₅₂ H ₇₉ O ₈ ΔM -1.46 ppm	2M - H Z 이성질체
10.77	415.28545	C ₂₆ H ₃₉ O ₄	M-H E 이성질체
	461.29069	C ₂₇ H ₄₁ O ₆	M + Formiat E 이성질체
	831.57739	C ₅₂ H ₇₉ O ₈	2M - H E 이성질체

[0330]

[0331]

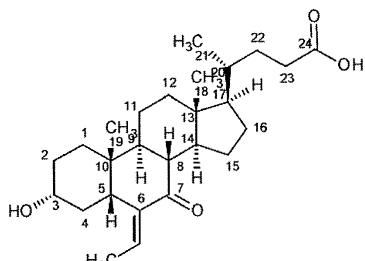
품질 관리 HPLC 방법 2의 간편함을 확실하게 하기 위해, 정확하게 상기 기재된 조건 하에서 본래의 분리를 반복하였다. 주요 피크 및 부차적 피크가 반정제용으로서 단리되었다. 포획된 분획의 위치가 표시된 생성된 UV 크로마토그램을 도 3에 제시한다. 도 3은 HPLC 방법 2; 125x4mm 퓨로스퍼 스타(Purospher STAR) C18 5 μm AG; LMA:H₂O pH 2.6 mit H₃PO₄; LMB:ACN; 30%B-10-35%-30-60%-1-90%(9); 1 mL/min; 35°C; UVA=200nm; ohne MS; 25 mL를 사용한 조 화합물 5의 UV 크로마토그램이다. 후속적으로, 단리된 분획을 새롭게 개발된 UPLC/MS 방법에 의해 개별적으로 분석하였다. 준분자 이온의 정확한 이온 트레이스의 평가를 위해, 850.61914±3ppm의 [2M+NH₄]를 사용하였다. 주요 피크 분획, 부차적 피크 분획 및 2개의 샘플의 생성된 크로마토그램을 도 4 (a-d)에 제시한다. MS 연구는 품질 관리 방법 2에 의해 RT 27.457 min 및 RT 28.078 min에서 생성된 2개의 피크가 화학식 C₂₆H₄₀O₄를 갖는 2종의 이성질체인 것으로 보여주었다. 이러한 화학식은 E/Z 이성질체에 대해 제안된 구조와 일치한다. 따라서, UPLC-MS 방법의 개발은 3 α -히드록시-에틸리텐-7-케토-5 β -콜-24 산의 E/Z 이성질체가 높은 해상도로 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있음을 보여준다. FR-ICR 질량 분광계로부터의 정확한 MS 데이터는 E/Z 이성질체에 대해 제안된 구조와 일치한다. 둘 다의 이성질체에 대해, 동일한 화학식 C₂₆H₄₀O₄가 유도되었다.

[0332]

HPLC 방법 2에 의한 E/Z-이성질체 피크의 반-정제용 단리에 이어, UPLC-MS 방법에 의한 후속적인 확인으로 인해, 본 발명자들은 품질 관리 방법 2에 의해 생성된 2개의 피크 (RT 27.457분 및 RT 28.078분, 도 1 참조)가 화학식 C₂₆H₄₀O₄를 갖는 2종의 이성질체임을 보여줄 수 있다. 이러한 화학식은 E/Z-이성질체의 구조 제안사항과 일치한다. 하기 기재된 NMR 결과와 함께, 하기와 같은 할당이 수득되었다: RT 27.457분은 E-이성질체에 속하고, RT 28.078분은 Z-이성질체에 속함.

[0333]

3 α -히드록시-에틸리텐-7-케토-5 β -콜-24 산의 E 이성질체에 대한 ¹H 및 ¹³C 이동의 할당을 하기에 제시한다. 이동은 "L. Bettarello et al., II Farmaco 55 (2000), 51-55 (물질 3 α -히드록시-7-케토-5 β -콜란-24-오산)"에 따라 예측하였다.



[0334]

<표 F> ¹H 이동 할당 (¹H-NMR, 500 MHz, 303K, CD₃OD)

화학적 이동 [ppm]	강도 [H]	다중도	할당
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

[0336]

[0337] <표 G> ^{13}C 이동 할당 ($^{13}\text{C-NMR}$, 125 MHz, 303K, CD_3OD)

화학적 이동 [ppm]	다중도	할당
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 및 50.1	D 각각	8 및 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 및 32.0	T 각각	22 및 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

[0338]

[0339] S = 단일선

[0340] D = 이중선

[0341] T = 삼중선

[0342] Q = 사중선

[0343] M = 다중선

[0344] DD = 이중선의 이중선

[0345] DT = 삼중선의 이중선

[0346] 실시예 3: 결정질 오베티콜산 형태 C의 특성화

[0347] 반응식 1 및 실시예 1의 단계 6으로부터의 생성물의 모든 고체-상태 특성화는 오베티콜산이 결정질인 것으로 보여주었다. 이러한 결정질 형태는 표지된 형태 C이다. 이하는 결정질 오베티콜산 형태 C의 특성화를 요약한 표이다:

[0348] <표 G> 결정질 오베티콜산 형태 C 특성의 요약

기술	결정질 오베티콜산 형태 C
외관	백색 분말
NMR	광급된 구조 약 3.5% w/w 헵坦과 일치
XRPD	결정질
TGA	중량 손실: 실온과 85 °C 사이 (0.4%) 및 85-115 °C (4.1%)
DSC	97.9 °C의 개시로 흡열
GVS	약간 흡습성, 90% RH에서 1.2 % 수분 흡수
칼 피서 수분 결정	1.5 % w/w
40 °C/75% RH에서의 안정성	형태 또는 결정화도의 변화 없음

[0349]

[0350] 열 분석

[0351] 34 위치 자동-샘플러가 구비된 메틀러 DSC 823e 상에서 DSC (시차 주사 열량측정) 데이터를 수집하였다. 기기는 공인된 인듐을 사용하여 에너지 및 온도에 대해 조정되었다. 핀-홀이 생성된 알루미늄 웨이퍼 내의 전형적으로 0.5-1 mg의 각각의 샘플을 $10\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 25°C에서 350°C로 가열하였다. 샘플에 대해 질소 퍼지를 $50\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 유지하였다. 기기 제어 및 데이터 분석 소프트웨어는 STARe v 9.20였다.

- [0352] 34 위치 자동-샘플러가 구비된 메틀러 TGA/SDTA 851e 상에서 TGA (열-중량 분석) 데이터를 수집하였다. 기기는 공인된 인듐을 사용하여 온도 조정되었다. 전형적으로 5-10 mg의 각각의 샘플을 사전-칭량된 알루미늄 도가니에 넣고, $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 주위 온도에서 300°C로 가열하였다. 샘플에 대해 질소 퍼지를 50 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 유지하였다. 기기 제어 및 데이터 분석 소프트웨어는 STARe v 9.20였다.
- [0353] 결정질 오베티콜산 형태 C의 TGA에 의해 2회의 중량 손실 단계가 관찰되었다. 첫번째는 실온 (r.t.)과 85°C 사이에서 발생하였고 (0.41%), 두번째는 85°C-115°C 사이에서 발생하였다 (4.10%). 첫번째 중량 손실 단계는 물 손실로 인한 것일 수 있고, 두번째 단계는 나머지 물 (약 1.2% 중량 손실의 원인이 되는 물)의 손실 및 결합된 헵탄의 손실 (약 3.4% 중량 손실)로 인한 것이다. 결정질 오베티콜산 형태 C는 0.15 내지 0.2몰 용매 (헵탄) 및 약 1.5% w/w (0.3몰)를 함유하였다. 결정질 오베티콜산 형태 C의 DSC 온도기록도는 1회의 흡열을 함유하였다. 이는 상당히 뾰족하며, 약 98°C의 개시를 가졌다. 도 6을 참조한다. 상이한 용매는 상이한 비점을 가질 것이므로, DSC 및 TGA 실험에서 상이한 온도에서 증발할 것이다.
- [0354] X선 분말 회절 (XRPD) 분석
- [0355] 브루커(Bruker) AXS C2 GADDS
- [0356] Cu K α 방사선 (40 kV, 40 mA), 자동화 XYZ 스테이지, 자동 샘플 위치조정을 위한 레이저 비디오 현미경 및 하이스타(HiStar) 2-차원 영역 검출기를 사용하는 브루커 AXS C2 GADDS 회절계 상에서 X선 분말 회절 패턴을 수집하였다. X선 광학은 0.3 mm의 핀홀 시준기와 연결된 단일 괴벨(Goebel) 다층 거울로 이루어졌다. 공인된 표준 NIST 1976 강옥 (평평한 플레이트)을 사용하여 매주 성능 검사를 수행하였다.
- [0357] 범 발산, 즉 샘플에 대한 X선 범의 유효 크기는 대략 4 mm였다. $3.2^{\circ} - 29.7^{\circ}$ 의 유효 2θ 범위를 제공하는 20 cm의 샘플 - 검출기 거리와 함께 $\theta-\theta$ 연속 스캔 모드를 사용하였다. 전형적으로 샘플을 X선 범에 120초 동안 노출시켰다. 데이터 수집에 사용된 소프트웨어는 WNT 4.1.16용 GADDS였고, 데이터는 디프락(Diffrac) 플러스 EVA v 9.0.0.2 또는 v 13.0.0.2를 사용하여 분석 및 제시되었다.
- [0358] 주위 조건: 주위 조건 하에 구동되는 샘플은 분말을 분쇄 없이 입수한 대로 사용하여 평평한 플레이트 시편으로 제조하였다. 대략 1-2 mg의 샘플을 유리 슬라이드 상에서 살짝 가압하여 평평한 표면을 수득하였다.
- [0359] 비-주위 조건: 비-주위 조건 하에 구동되는 샘플은 열-전도성 화합물을 갖는 실리콘 웨이퍼 상에 놓았다. 이어서, 샘플을 약 $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 적절한 온도로 가열하고, 후속적으로 약 1분 동안 등온으로 유지한 후에, 데이터 수집을 개시하였다.
- [0360] 브루커 AXS/지멘스(Siemens) D5000
- [0361] Cu K α 방사선 (40 kV, 40 mA), $\Theta-\Theta$ 고니오미터, V20의 발산 및 수광 슬릿, 흑연 2차 단색기 및 섬광 계수기 를 사용하는 지멘스 D5000 회절계 상에서 X선 분말 회절 패턴을 수집하였다. 공인된 강옥 표준물 (NIST 1976) 을 사용하여 기기를 성능 검사하였다. 데이터 수집에 사용된 소프트웨어는 디프락 플러스 XRD 커맨더 v2.3.1이었고, 데이터는 디프락 플러스 EVA v 11.0.0.2 또는 v 13.0.0.2를 사용하여 분석 및 제시되었다.
- [0362] 샘플을 입수한 그대로의 분말을 사용하여 평평한 플레이트 시편으로서 주위 조건 하에 구동하였다. 연마된, 제로-배경 (510) 실리콘 웨이퍼 내의 절단된 공간 내로 대략 20 mg의 샘플을 조심스럽게 채워넣었다. 샘플을 분석 동안 그 자체의 평면에서 회전시켰다. 데이터 수집에 대한 세부사항은 하기와 같다:
- [0363] • 각도 범위: 2 내지 $42^{\circ} 2\theta$
 - [0364] • 스텝 크기: $0.05^{\circ} 2\theta$
 - [0365] • 수집 시간: $4 \text{ s} \cdot \text{스텝}^{-1}$
- [0366] 브루커 AXS D8 어드밴스(Advance)
- [0367] Cu K α 방사선 (40 kV, 40 mA), $\Theta-2\theta$ 고니오미터, V4의 발산 및 수광 슬릿, Ge 단색기 및 링스아이(Lynxeye) 검출기를 사용하는 브루커 D8 회절계 상에서 X선 분말 회절 패턴을 수집하였다. 공인된 강옥 표준물 (NIST 1976)을 사용하여 기기를 성능 검사하였다. 데이터 수집에 사용된 소프트웨어는 디프락 플러스 XRD 커맨더 v 2.5.0이었고, 데이터는 디프락 플러스 EVA v 11.0.0.2 또는 v 13.0.0.2를 사용하여 분석 및 제시되었다.

[0368] 샘플을 입수한 그대로의 분말을 사용하여 평평한 플레이트 시편으로서 주위 조건 하에 구동하였다. 연마된, 제로-배경 (510) 실리콘 웨이퍼 내의 절단된 공간 내로 대략 5 mg의 샘플을 조심스럽게 채워넣었다. 샘플을 분석 동안 그 자체의 평면에서 회전시켰다. 데이터 수집에 대한 세부사항은 하기와 같다:

[0369] * 각도 범위: 2 내지 42° 2Θ

[0370] * 스텝 크기: 0.05° 2Θ

[0371] * 수집 시간: $0.5 \text{ s} \cdot \text{스텝}^{-1}$

[0372] XRPD는 본 발명 방법의 단계 6으로부터 단리된 분말이 브루커 AXS D8 어드밴스 상에 수집되었음을 보여주었다. 도 5를 참조한다. X선 회절도에 상응하는 데이터를 하기 표에 제시한다. 데이터 수집에 사용된 소프트웨어는 디프락 플러스 XRD 커맨더 v2.6.1이었고, 데이터는 디프락 플러스 EVA v13.0.0.2 또는 v15.0.0.0을 사용하여 분석 및 제시되었다. 샘플을 입수한 그대로의 분말을 사용하여 평평한 플레이트 시편으로서 주위 조건 하에 구동하였다. 연마된, 제로-배경 (510) 실리콘 웨이퍼 내의 절단된 공간 내로 샘플을 조심스럽게 채워넣었다. 샘플을 분석 동안 그 자체의 평면에서 회전시켰다. 데이터 수집에 대한 세부사항은 하기와 같다:

[0373] * 각도 범위: 2 내지 42° 2Θ

[0374] * 스텝 크기: 0.05° 2Θ

[0375] * 수집 시간: $0.5 \text{ s} \cdot \text{스텝}^{-1}$

[0376] <표 H> 결정질 오베티콜산 형태 C의 X선 회절도 데이터

피크	각 2-세타 (도)	d 값 (옹스트롬)
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

[0377]

[0378] VT-XRPD (가변 온도-X선 회절)는, 어떤 변화도 일어나지 않았기 때문에, 샘플의 탈용매화에 상응하는 DSC 온도 기록도에서 관찰된 흡열이 가열 시에 관찰된 것임을 보여주었다. VT-XRPD 실험이 샘플이 노출되는 넓은 공간에서 수행된 반면에 DSC 실험은 한정된, 닫힌 공간에서 수행되었기 때문에, DSC와 VT-XRPD 데이터 사이에는 온도 차이가 존재한다. 이러한 차이는 대략 20°C 이며, 이것은 DSC 실험에서 샘플이 왜 활чин 낮은 온도에서 용융되었으며 VT-XRPD 실험에서 샘플이 왜 110°C 에서 여전히 결정질을 나타내는지를 설명한다. VT-XRPD는 물질로부터 용매의 진조가 결정화도의 손실을 야기하며, 이는 물질이 용매화 형태로 존재한다는 것과 일치함을 보여준다. 도 7을 참조한다.

[0379] 중량 증기 흡착 (GVS)

[0380] DVS 인트린식(DVS Intrinsic) 제어 소프트웨어 v 1.0.0.30에 의해 제어되는 SMS DVS 인트린식 수분 흡착 분석 기기를 사용하여 흡착 등온선을 수득하였다. 샘플 온도를 기기 제어에 의해 25°C 로 유지하였다. $200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 의 총 유량으로 진조 및 습윤 질소의 스트림을 혼합하는 것에 의해 습도를 제어하였다. 상대 습도는 샘플 가까이에 위치시킨 조정된 로트로닉(Rotronic) 프로브 (동적 범위 1.0-100% RH)에 의해 측정하였다. %RH (상대 습

도)의 함수로서의 샘플의 중량 변화, (질량 완화)를 미량천칭 (정확도 ±0.005 mg)에 의해 일정하게 모니터링하였다.

- [0381] 5 내지 20 mg의 샘플을 주위 조건 하에 계량된 메쉬 스테인레스 스틸 바스켓에 놓았다. 샘플을 40% RH 및 25 °C (전형적인 실내 조건)에서 넣고 꺼내었다. 수분 흡착 등온선은 하기 요약된 바와 같이 수행되었다 (1개의 완전 주기를 제공하는 2개의 스캔). 표준물 등온선은 25°C에서 0.5-90% RH 범위에 걸쳐 10% RH 간격으로 수행되었다. 데이터 분석은 DVS 애널리시스 스위트(DVS Analysis Suite) v6.0.0.7을 사용하여 마이크로소프트 엑셀 (Microsoft Excel)에서 수행하였다. SMS DVS 인트린식 실험을 위한 방법 파라미터는 하기와 같다:

파라미터	값
흡착 - 스캔 1	40 - 90 %
탈착 / 흡착 - 스캔 2	90 - 0, 0 - 40 %
간격 (% RH)	10
스캔의 수	2
유량 (ml·min ⁻¹)	200
온도 (°C)	25
안정성 (°C·min ⁻¹)	0.2
흡착 시간 (시간)	6시간 타임 아웃

[0382]

등온선의 완성 후에 샘플을 회수하여 XRPD로 재-분석하였다.

- [0384] 결정질 오베티콜산 형태 C의 분석은 0-90% RH 사이에서 1.18%의 질량 증가가 감지되므로 샘플이 약간 흡습성인 것으로 나타났다. 이러한 물의 흡수는 분석 내내 지속되었고, 모든 단계 동안 평형에 도달하였다. 곡선의 히스테리시스는 작았고, 이는 샘플이 흡수한 물을 쉽게 잃는다는 것을 나타낸다. GVS 분석 이후의 XRPD 분석은 샘플이 변화되지 않았음을 나타내었다. 도 8a, 8b 및 8c를 참조한다.

[0385]

칼 피셔 적정 (KF)에 의한 수분 결정

- [0386] 히드라날 코울로마트 아게(Hydralanal Coulomat AG) 시약 및 아르곤 퍼지를 사용하는 메틀러 톨레도(Mettler Toledo) DL39 전량계에서 각각의 샘플의 수분 함량을 측정하였다. 청량된 고체 샘플을 물의 유입을 막기 위한 수바실에 연결된 백금 TGA 팬 위의 용기에 도입하였다. 적정당 대략 10 mg의 샘플을 사용하고, 중복 측정을 수행하였다.

[0387]

칼 피셔 분석은 결정질 오베티콜산 형태 C가 약 0.3몰의 물에 상응하는 1.5% 물을 함유하는 것으로 나타내었다.

[0388]

40°C 및 75% RH에서의 1주 안정성

[0389]

40°C 및 75% RH (상대 습도)에서의 오베티콜산의 안정성을 하기와 같이 결정하였다. 오베티콜산의 샘플을 습도 챔버 내에서 1주 동안 40°C/75% RH에서 저장하였다. 샘플의 XRPD에 의해 재-분석하였고, 변화되지 않았음을 확인하였다.

[0390]

고체 상태 연구는 상대적으로 많은 양의 유기 용매의 존재가 오베티콜산 형태 C를 결정화하는데 필요한 것으로 나타났다. 오베티콜산 형태 1의 샘플이 저장 시에 자연적으로 결정화되어 결정질 오베티콜산 형태 C를 형성할 가능성은 아주 낮다.

[0391]

실시예 4: 오베티콜산 정제 제제

[0392]

하기 정제는 오베티콜산 정제의 정량적 조성을 나타낸다. 5 mg, 10 mg 및 25 mg 제제는 3상 임상 시험 물질로서 사용되었다.

[0393]

<표 I> 필름 코팅된 정제

필름 코팅된 정제			
성분	정제당 양	기능	표준물에 대한 참조
1 mg 정제			
오베티콜산	1.0 mg*	API	HSE
미세결정질 셀룰로스	185.0 mg*	충전제/결합제	USP-NF/EP/JP
소듐 전분 글리콜레이트	12.0 mg	붕해제	USP-NF/EP/JP
스테아르산마그네슘	2.0 mg	윤활제	USP-NF/EP/JP
오파드라이® II 그린 또는 화이트	8.0 mg	코팅 물질	HSE
총 중량	208.0 mg		
5 mg 정제			
오베티콜산	5.0 mg*	API	HSE
미세결정질 셀룰로스	181.0 mg*	충전제/결합제	USP-NF/EP/JP
소듐 전분 글리콜레이트	12.0 mg	붕해제	USP-NF/EP/JP
스테아르산마그네슘	2.0 mg	윤활제	USP-NF/EP/JP
오파드라이® II 그린 또는 화이트	8.0 mg	코팅 물질	HSE
총 중량	208.0 mg		
10 mg 정제			
오베티콜산	10.0 mg*	API	HSE
미세결정질 셀룰로스	176.0 mg*	충전제/결합제	USP-NF/EP/JP
소듐 전분 글리콜레이트	12.0 mg	붕해제	USP-NF/EP/JP
스테아르산마그네슘	2.0 mg	윤활제	USP-NF/EP/JP
오파드라이® II 그린 또는 화이트	8.0 mg	코팅 물질	HSE
총 중량	208.0 mg		
25 mg 정제			
오베티콜산	25.0 mg*	API	HSE
미세결정질 셀룰로스	157.0 mg*	충전제/결합제	USP-NF/EP/JP
소듐 전분 글리콜레이트	12.0 mg	붕해제	USP-NF/EP/JP
스테아르산마그네슘	2.0 mg	윤활제	USP-NF/EP/JP
콜로이드성 이산화규소	4.0 mg	월백제	USP-NF/EP/JP
오파드라이® II 그린 또는 화이트	8.0 mg	코팅 물질	HSE
총 중량	208.0 mg		

[0394]

[0395] API: 활성 제약 성분

[0396] HSE = 사내 규격

[0397] USP-NF = 미국 약전 국립 처방집

[0398] Ph Eur = 유럽 약전

[0399] JP = 일본 약전

[0400] * 제공된 오베티콜산 양은 API가 무수이며 100% 순수한 것으로 가정함; 실제 양은 사용된 약물 물질 로트의 효력을 기초로 조정되며, 미세결정질 셀룰로스의 양은 상응하게 감소됨.

[0401]

실시예 5: 오베티콜산 형태 1의 특성화

[0402] 오베티콜산 형태 1은 오베티콜산의 비-결정질 형태를 지칭한다. 이러한 형태의 오베티콜산은 합성 중간체로서 결정질 오베티콜산을 통해 생성될 수 있다. 오베티콜산 형태 1은 제약 활성 성분으로서 사용될 수 있다. 오베티콜산 형태 1은 하기와 같이 특성화 및 분석될 수 있다.

[0403]

오베티콜산 형태 1의 배치 1은 하기 기술을 사용하여 특성화하였다: 결정화도에 대해 X선 분말 회절 (XPRD)에 의한 평가, ¹H 및 ¹³C 핵 자기 공명 (NMR), 푸리에 변환 적외선 분광분석법 (FT-IR), 광학적 평가 (예를 들어, 입자 형상/크기), 열적 특성 (예를 들어, 시차 주사 열량측정 (DSC) 및 열 중량 분석 (TGA)), 칼 피셔 (KF)에 의한 수분 결정, 40°C 및 75%RH에서의 저장 및 XRPD에 의한 2주 후 재분석, 전위차 방법에 의한 pKa, 전위차측 정법에 의한 Log P/D (옥탄올/물), 및 중량 증가 흡착 (GVS; 예를 들어, XRPD에 의해 수집된 고체의 분석과 함께 완전한 흡착-탈착 주기)을 사용한 수분에 대한 안정성. 오베티콜산 형태 1의 5개의 다른 배치 (예를 들어, 배치 2, 3, 4, 5 및 6)를 또한 하기 기술을 사용하여 특성화하고 비교하였다: XRPD에 의한 평가 및 주요 배치 1

패턴과의 비교, ^1H 및 ^{13}C NMR, FT-IR, 광학적 평가 (예를 들어, 입자 형상/크기), 열적 특성 (예를 들어, DSC, TGA 및 고온-단계 현미경검사), 및 KF에 의한 수분 결정.

[0404] X선 분말 회절 (XRPD) 분석

Cu K α 방사선 (40 kV, 40 mA), 자동화 XYZ 스테이지, 자동 샘플 위치조정을 위한 레이저 비디오 현미경 및 하이스타 2-차원 영역 검출기를 사용하는 브루커 AXS C2 GADDS 회절계 상에서 X선 분말 회절 패턴을 수집하였다. X선 광학은 0.3 mm의 펀홀 시준기와 연결된 단일 괴벨 다층 거울로 이루어졌다. 범 발산, 즉 샘플에 대한 X선 빔의 유효 크기는 대략 4 mm였다. 3.2° - 29.7° 의 유효 2θ 범위를 제공하는 20 cm의 샘플 - 검출기 거리와 함께 $\Theta-\Theta$ 연속 스캔 모드를 사용하였다. 전형적으로 샘플을 X선 빔에 120초 동안 노출시켰다. 데이터 수집에 사용된 소프트웨어는 WNT 4.1.16용 GADDS였고, 데이터는 디프락 플러스 EVA v 9.0.0.2 또는 v 13.0.0.2를 사용하여 분석 및 제시되었다.

[0406] 주위 조건 하에 구동되는 샘플은 분말을 분쇄 없이 입수한 대로의 분말을 사용하여 평평한 플레이트 시편으로 제조하였다. 대략 1-2 mg의 샘플을 실리콘 웨이퍼 상에서 살짝 가압하여 평평한 표면을 수득하였다. 회절도는 오베티콜산 형태 1이 비-결정질인 것으로 나타내었다 (도 10 및 도 11 참조).

[0407] NMR 특성화

자동-샘플러가 구비되고 DRX400 콘솔에 의해 제어되는 브루커 400 MHz 기기 상에서 NMR 스펙트럼을 수집하였다. 표준 브루커 로딩 실험을 사용하여 톱스핀(Topspin) v 1.3 (패치 수준 8)에 의해 구동되는 ICONNMR v4.0.4 (빌드 1)를 사용하여 자동화된 실험을 획득하였다. 비-통상적인 분광분석법을 위해, 톱스핀 만을 사용하여 데이터를 획득하였다. 달리 언급되지 않는 한, 샘플을 d6-DMSO 중에서 제조하였다. 오프-라인 분석은 ACD 스펙메니저(ACD SpecManager) v 9.09 (빌드 7703)를 사용하여 수행하였다.

[0409] 도 12는 배치 1에 대한 ^1H NMR 스펙트럼을 보여준다. 배치 2-6의 ^1H NMR 스펙트럼을 또한 기록하고, 배치 1의 스펙트럼과 비교하였다. 도 13을 참조한다. 스펙트럼은 모두 유사하였지만, 가변 양의 물을 가졌다. 0.75 ppm과 2 ppm 사이의 큰 그룹의 양성자 적분에서 몇몇 차이가 주목되며, 여기서 피크는 중첩되어 개별적으로 적분될 수 없었다. 표 J는 0.75 - 2 ppm 영역 내에서의 변동을 고려한, 배치 1-6의 스펙트럼에서 적분된 양성자의 총 수를 나타낸다.

[0410] <표 J>

배치 번호	적분에 의한 H의 수 (COOH 배제)
1	43
2	42
3	40
4	41
5	42
6	41-42

[0411]

[0412] 카르복실산 양성자가 배제되어 양성자의 수는 43이어야 하지만, 실제로는 6개의 스펙트럼 사이에서 40 내지 43으로 달랐다. 그러나, 변동이 생긴 영역 (0.75-2 ppm)이 상당히 넓고, 기준선의 품질로 인해 이러한 적분은 신뢰할 수 없다.

[0413] 스펙트럼이 완전히 할당될 수 없고 적분이 다르기 때문에, 배치 2의 ^{13}C NMR 스펙트럼을 기록하였다. 도 14는 DEPTQ 스펙트럼을 나타내며, 여기서 CH_2 및 4급 탄소 피크는 상부를 향하는 반면에, CH_3 및 CH기는 하부를 향한다. 하부를 향하는 13개의 피크가 존재하며, 이는 9개의 CH 및 4개의 CH_3 기에 상응한다. 이는 구조식과 일치 한다. 카르복실산의 탄소의 피크는 175 ppm에서 관찰되었다. 이는 관심 영역의 명확화를 위한 본 확대도에서 배제되었다. 그러나, 문자 내에 (카르보닐을 배제하고) 10개의 CH_2 기 및 2개의 4급 탄소가 존재하기 때문에 12개가 존재하여야 함에도, 상부를 향하는 피크는 단지 11개만이 존재하였다. 1개의 탄소는 또 다른 신호와 중첩된 것으로 보인다. 따라서, 4급 탄소 신호를 숨기는 DEPT135 스펙트럼을 수집하였고, 이는 중첩된 신호가 4급인지 여부를 보여줄 수 있었다. 도 15를 참조한다. DEPTQ 스펙트럼과 DEPT135 스펙트럼의 비교는 1개의 피크가 (42.5 ppm에서) 사라졌음을 보여준다. 문자 내에는 2개의 4급 탄소가 존재하며, 이는 사라진 2개의 피크에 상응할 것이다. 따라서, 중첩된 탄소 신호는 4급 탄소 신호이다.

[0414] 또한, 없어진 4급 탄소 신호가 또 다른 탄소 신호와 중첩되는지 여부를 결정하기 위해, 탄소의 이완 시간을 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 도 16을 참조한다. 이러한 ^{13}C 스펙트럼은 적분된 피크를 함유한다. 이는 32.3 ppm에서의 피크가 2개의 탄소를 설명함을 보여주었다. 32.3 ppm에서의 피크의 확대도인 도 17을 참조한다. 따라서, 적분에 의해 (카르복실산 포함) 이제 26개의 탄소가 설명되며, 이는 구조식과 일치한다.

[0415] ATR에 의한 FT-IR

[0416] 유니버설(Universal) ATR 샘플링 부속에 의해 적합화된 퍼킨-엘머(Perkin-Elmer) 스펙트럼 원 상에서 데이터를 수집하였다. 스펙트럼 v5.0.1 소프트웨어를 사용하여 데이터를 수집 및 분석하였다. 도 18을 참조한다.

[0417] 시차 주사 열량측정 (DSC) 및 열 중량 분석 (TGA)에 의한 열 분석

[0418] 50 위치 자동샘플러가 구비된 TA 기기 Q2000 상에서 DSC 데이터를 수집하였다. 기기는 공인된 인듭을 사용하여 에너지 및 온도에 대해 조정되었다. 핀-홀이 생성된 알루미늄 팬 내의 전형적으로 0.5-3 mg의 각각의 샘플을 $10\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 25°C에서 300°C로 가열하였다. 샘플에 대해 질소 퍼지를 50 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 유지하였다. 기기 제어 소프트웨어는 Q 시리즈용 어드밴티지(Advantage) v2.8.0.392 및 씨말 어드밴티지(Thermal Advantage) v4.8.3이었고, 유니버설 애널리시스 v4.3A를 사용하여 데이터를 분석하였다. 변조된 DSC를 위해, 샘플을 상기와 같이 제조하고, 팬을 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 25°C에서 200°C로 가열하였다. 변조기 조건은 진폭 0.20°C 및 주기 40 s였다. 샘플링 간격은 1 sec/pt였다.

[0419] 16 위치 자동샘플러가 구비된 TA 기기 Q500 TGA 상에서 TGA 데이터를 수집하였다. 기기는 공인된 알루멜을 사용하여 온도 조정되었다. 전형적으로 5-10 mg의 각각의 샘플을 사전-칭량된 백금 도가니 및 알루미늄 DSC 팬에 넣고, $10\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 주위 온도에서 350°C로 가열하였다. 샘플에 대해 질소 퍼지를 60 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 유지하였다. 기기 제어 소프트웨어는 Q 시리즈용 어드밴티지 v2.8.0.392 및 씨말 어드밴티지 v4.8.3이었다.

[0420] 배치 1의 열 분석은 DSC 및 TGA에 의해 수행하였다. TGA 트레이스 (도 19 참조)는 주위 온도와 121°C 사이에서 1.7%의 중량 손실을 나타내었고, 이는 물의 손실일 수 있다. DSC 트레이스 (도 19 참조)는, 아마도 물의 손실에 상응하는, 넓은 저온 흡열에 이어 94°C에서 개시되는 작은 흡열을 나타낸다.

[0421] 이러한 두번째 흡열은 유리 전이를 나타낼 수 있으며, 변조된 DSC에 의해 추가로 조사되었다 (도 20 참조). 이러한 기술은 비가역적 사건, 예컨대 용매의 손실 또는 결정질 형태의 용융으로부터 가역적 사건, 예컨대 유리 전이를 분리가능하게 한다. 변조된 DSC에서의 가역적 열 유량 트레이스는 95°C에서 변곡점 (Tg)을 갖는 단계로서 유리 전이를 나타낸다. 이는 유리 전이의 경우에 높으며, 형태 1이 안정함을 시사한다. 비-가역적 열 유량 트레이스에서 89°C에서 개시되는 작은 흡열은 유리 전이 온도에서 벌크 물질의 분자 이완에 상응한다.

[0422] DSC 트레이스 (도 19 참조)는 분해가 대략 220°C에서 시작됨을 보여주며, 이는 또한 하향 만곡되는 TGA 트레이스와 상응한다.

[0423] 배치 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 TGA 트레이스는 유사한 형상이다 (도 21). 주위와 120°C 사이에서 측정된 중량 손실을 표 K에 제시한다. 이는 NMR에 의해 관찰된 가변 양의 물과 일치한다. 이를 양을 칼 피셔 (KF) 수분 적정에 의해 추가로 정량화하였다. KF에 의한 수분 결정을 참조한다.

[0424] <표 K> 입수된 샘플의 TGA 중량 손실의 요약

배치 번호	TGA에 의한 중량 손실
1	1.7%
2	0.6%
3	1.2%
4	0.9%
5	1.5%
6	1.6%

[0425]

[0426] 도 22는 비교를 위한 6개의 배치의 DSC 트레이스를 보여준다. 트레이스는 섹션 DSC 및 TGA에서 관찰된 바와 같은 가변 양의 물과 일치하는 가변 크기의 넓은 저온 흡열에 이어 대략 유리 전이 온도에서 작은 흡열을 갖는 것으로 유사하다. 결과를 표 L에 요약한다.

[0427] <표 L> 입수된 샘플의 DSC 결과의 요약

배치 번호	제1 흡열, 넓음	제2 흡열, 작음	분해 시작
1	28.3J/g, T _{최대} = 64°C	1.2J/g, T _{개시} = 94°C	220°C
2	7.4J/g, T _{최대} = 48°C	1.4J/g, T _{개시} = 94°C	220°C
3	없음	2.0J/g, T _{개시} = 89°C	175°C
4	14.5J/g, T _{최대} = 58°C	1.3J/g, T _{개시} = 94°C	200°C
5	12.2J/g, T _{최대} = 59°C	1.2J/g, T _{개시} = 94°C	175°C
6	28.7J/g, T _{최대} = 59°C	1.5J/g, T _{개시} = 94°C	200°C

[0428]

[0429] 편광 현미경검사 (PLM)

[0430] 영상 캡처를 위한 디지털 비디오 카메라를 갖춘 라이카(Leica) LM/DM 편광 현미경 상에서 샘플을 연구하였다. 소량의 각각의 샘플을 유리 슬라이드 상에 놓고, 실리콘 오일을 떨어뜨리고, 유리 슬립을 덮어, 개개의 입자를 가능한 한 잘 분리되게 하였다. 샘플을 적절한 배율 및 λ 위색 필터와 결합된 부분 편광으로 관측하였다.

[0431] 도 23a-23f는 배치 1, 2, 3, 4, 5 및 6이 작은 불규칙적인 입자의 큰 단단한 응집으로 구성된 물질임을 보여준다. 배치 1, 2, 3, 4, 5 및 6은 모두 유사하게 보인다. 평면 편광 하에서 어떤 복굴절도 관찰되지 않았고, 이는 물질이 비-결정질이라는 것과 일치한다. 입자 크기 범위는 1 μm 미만에서 3 μm에 이르렀다. 작은 크기의 이들 입자는 이들이 매우 신속하게 침전됨을 시사한다.

[0432] 중량 증기 흡착 (GVS)

[0433] SMS 애널리시스 스위트 소프트웨어에 의해 제어되는 SMS DVS 인트린식 수분 흡착 분석기를 사용하여 흡착 등온선을 수득하였다. 샘플 온도를 기기 제어에 의해 25°C로 유지하였다. 200 ml · min⁻¹의 총 유량으로 건조 및 습윤 질소의 스트림을 혼합하는 것에 의해 습도를 제어하였다. 상대 습도는 샘플 가까이에 위치시킨 조정된 로트로닉 프로브 (동적 범위 1.0-100% RH)에 의해 측정하였다. %RH의 함수로서의 샘플의 중량 변화, (질량 완화)를 미량천칭 (정확도 ± 0.005 mg)에 의해 일정하게 모니터링하였다.

[0434] 전형적으로 5-20 mg의 샘플을 주위 조건 하에 계량된 메쉬 스테인레스 스틸 바스켓에 놓았다. 샘플을 40% RH 및 25°C (전형적인 실내 조건)에서 넣고 꺼내었다. 수분 흡착 등온선은 하기 요약된 바와 같이 수행되었다 (1 개의 완전 주기를 제공하는 2개의 스캔). 표준물 등온선은 25°C에서 0.5-90%RH 범위에 걸쳐 10% RH 간격으로 수행되었다.

[0435] <표 M>

파라미터	값
흡착 - 스캔 1	40 - 90
탈착 / 흡착 - 스캔 2	85 - Dry. Dry - 40
간격 (%RH)	10
스캔의 수	2
유량 (ml·min ⁻¹)	200
온도 (°C)	25
안정성 (°C·min ⁻¹)	0.2
흡착 시간 (시간)	6시간 타임 아웃

[0436]

[0437] 25°C에서 배치 1에 대한 중량 증기 흡착 (GVS) 등온선을 수득하였고, 도 24에 제시한다. 샘플은 0 내지 90% 상대 습도 (RH)에서 3.8%의 총 중량 변화를 갖는, 중등도로 흡습성인 것으로 보인다. 히스테리시스 (흡착 및 탈착 곡선 사이의 영역)은 작으며, 이는 고체가 흡착된 물을 매우 쉽게 방출함을 나타낸다. 어떤 수화물의 형성도 관찰되지 않았다. 전체 실험 후에 어떤 유의한 중량 변화도 없었다 (0.3%).

[0438] GVS의 동역학적 플롯 (도 25)은 물의 흡착이 대부분 매우 높은 습도에서 발생하며, 탈착은 매우 낮은 습도에서 발생함을 보여준다. 흡착 상에서, 샘플은 80% RH까지 매우 신속하게 평형에 도달하였고, 90% RH에서 평형화되는데 더 오래 걸렸다. 탈착 시에, 질량은 모든 단계에서 안정화되었다.

[0439] GVS의 완료 이후에, 샘플을 회수하여 XRPD에 의해 재분석하였고, 이는 물질이 여전히 비-결정질임을 나타내었다 (도 26).

[0440] 칼 피셔 (KF)에 의한 수분 결정

[0441] 히드라닐 코울로마트 아게 시약 및 아르곤 퍼지를 사용하는 메틀러 틀레도 DL39 전량계에서 각각의 샘플의 수분

함량을 측정하였다. 칭량된 고체 샘플을 물의 유입을 막기 위한 수바실에 연결된 백금 TGA 팬 위의 용기에 도입하였다. 적정당 대략 10 mg의 샘플을 사용하고, 중복 측정을 수행하였다.

[0442] 전량 칼 피셔에 의한 수분 측정은 2.4 중량% 물의 결과를 제공하였다. 이것은 TGA에 의해 관찰된 중량 손실보다 약간 더 높다. 이는 물의 일부가 가열 시에 물질로부터 방출되지 않았음을 의미할 수 있지만, 이를 2종의 기술에 대한 상이한 실험 절차로 인한 것일 수 있다.

[0443] 전량 칼 피셔에 의해 각각의 배치의 수분 함량을 결정하였다. 표 N은 이들 결과를 보여주고, 조기에 수득된 칼 피셔 결과 및 TGA에 의해 관찰된 중량 손실과 비교한다. 데이터는 모든 3종의 분석에서 경향이 동일하다는 것과 일치한다. 조기에 수득된 칼 피셔 데이터는 여기서 수득된 결과보다 낮은 물의 양을 나타낸다. 이는 일부 샘플이 다른 것보다 물을 더 많이 흡수할 지라도, 물질이 흡습성이라는 것과 일치한다. TGA 중량 손실은 칼 피셔 측정에 의해 수득된 결과보다 일관되게 낮으며, 이는 일부 물이 물질 내에 갇힌 채 머무르며, 가열 시에 방출되지 않음을 의미할 수 있지만, 또한 실험 절차로 인한 것일 수 있다.

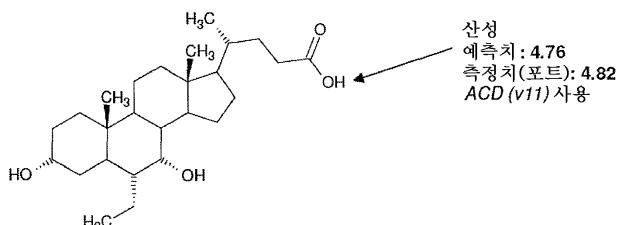
[0444] <표 N> 칼 피셔 (KF) 결과 및 수분 함량 데이터의 요약

배치 번호	KF 수분 함량	조기 KF 결과	TGA 중량 손실
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%

[0445]

[0446] pKa 결정 및 예측

[0447] pKa 결정 데이터는 D-PAS가 부착된 시리우스(Sirius) GlpKa 기기 상에서 수집하였다. 측정은 25°C에서 수용액 중에서 UV에 의해, 그리고 메탄올 물 혼합물 중에서 전위차측정법에 의해 수행하였다. 적정 배지는 0.15 M KCl (aq)에 의해 이온-강도 조정되었다 (ISA). 메탄올 물 혼합물에서 관찰된 값을 야스다-쉐드로브스키 외삽을 통해 0% 공-용매로 보정하였다. 데이터는 리파인먼트 프로(Refinement Pro) 소프트웨어 v1.0을 사용하여 정밀화하였다. pKa 값의 예측은 ACD pKa 예측 소프트웨어 v9를 사용하여 수행하였다.



[0448]

[0449] 오베티콜산의 pKa는 공용매로서 메탄올을 사용한 전위차측정법에 의해 측정되었고 (도 27), 야스다-쉐드로브스키 외삽을 통해 0% 공-용매로 외삽되었다 (도 28). pKa는 주어진 pH에서 화합물의 중성 및 이온화된 형태의 비율의 결정을 가능하게 하였다. 도 29는 pH에 의존한 종의 분포를 보여준다.

[0450] Log P 결정

[0451] 데이터를 3종의 육탄을:이온-강도 조정된 (ISA) 물 비를 사용하여 시리우스 GlpKa 기기 상에서의 전위차 적정에 의해 수집하여 Log P, Log Pi온 및 Log D 값을 생성하였다. 데이터는 리파인먼트 프로 소프트웨어 v1.0을 사용하여 정밀화하였다. Log P 값의 예측은 ACD v9 및 시라쿠스 코우윈(Syracuse KOWWIN) v1.67 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0452] <표 0> 예측 및 측정된 LogP

ACD (V9) 예측된 LogP	5.81
측정된 LogP	5.54
측정된 LogP이온	1.58
측정된 LogD7.4	2.98

[0453]

LogP는 ACD 소프트웨어를 사용하여 예측한 다음 전위차측정법에 의해 측정하였다. 3종의 상이한 옥탄올/ISA 물비에서 3회의 적정을 수행하였고, 도 30에 플로팅된 상이한 곡선이 제공되었다. 흑색 곡선은 순수한 수성 pKa 적정이며, 3개의 유색 곡선은 3종의 옥탄올/ISA 물비에 상응한다. pKa에서의 이동은 LogP의 결정을 가능하게 한다.

[0455] 친지성 곡선 (pH의 함수로서 logD)이 도 31에 제시된다. Log D는 특정 pH에 존재하는 모든 종의 조합된 친지성을 나타내는 분포 계수이다. LogP는 순수한 중성 종의 분배 계수에 상응하는 화합물 상수이며, LogP이온은 순수한 이온화된 종의 그것이다. LogP 및 LogP이온은 친지성 곡선으로부터 각각 pH 스케일의 시작에서의 탄젠트 (분자가 그의 중성 형태로 순수하게 존재하는 경우) 및 pH 스케일의 끝에서의 탄젠트 (분자가 완전히 이온화된 경우)에 의한 Y 축의 교차로서 결정될 수 있다.

[0456] 40°C & 75% RH 및 25°C & 97% RH에서의 2주 안정성

[0457] 고체 형태의 가속된 안정성 시험에서 배치 1의 샘플을 40°C 및 75% 상대 습도 (RH)에서 저장하였다. 또 다른 샘플은 25°C 및 97% 상대 습도에서 저장하여 매우 높은 습도의 영향을 체크하였다. 샘플을 둘 다 5일 후 및 2주 후에 XRPD에 의해 재-분석하였다. 샘플은 둘 다 최대 2주 동안 2가지의 저장 조건 하에 비-결정질을 유지하였고, 이는 형태 1이 이들 조건에서 안정함을 나타낸다. 도 32 및 도 33을 참조한다.

[0458] 분석된 6개의 배치는 모두 비-결정질이었다. 변조된 DSC 실험으로 95°C에서 유리 전이 온도를 측정하였다. 6개의 배치는 사용된 모든 분석 기술에 의하면 매우 유사한 것으로 보였고, 이들 사이의 유일한 차이점은 칼 피셔 적정에 의했을 때 1.9%에서 2.8%로 달라지는 수분 함량이었다. 열 분석은 가변 양의 물을 보여주었고, 대략 175-220°C에서 분해가 시작됨을 나타내었다. 측정된 pKa는 4.82였고, LogP는 5.54이다. 현미경 평가는 매우 작은 불규칙적인 입자의 큰 단단한 응집을 보여주었다.

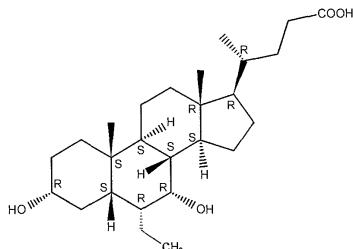
[0459] 안정성 시험은 가속 조건 (40°C / 75% RH) 하에서 또는 높은 습도 (25°C / 97% RH) 하에서 2주 후에도 물질이 여전히 비-결정질임을 보여주었다. 중량 증기 흡착 (GVS) 분석은 물질이 0 내지 90% 상대 습도 (RH)에서 3.8%의 총 중량 증가를 갖는, 오직 중등도로 흡습성임을 보여주었다. GVS 하에서 어떤 수화물의 형성도 관찰되지 않았다. GVS 후에 XRPD에 의해 샘플을 재-분석하였고, 샘플은 여전히 비-결정질이었다. 높은 유리 전이 온도 및 안정성 시험 결과는 비-결정질 형태가 안정함을 시사한다.

[0460] 실시예 6: 단결정 X선 구조 및 절대 입체화학

[0461] 0.1°C/min으로 5°C로의 냉각에 이어 1주 동안의 RT/50°C 8 h 사이클에서의 성숙 이후에 아세토니트릴 용액으로부터의 오베티콜산의 재결정화로부터 수득된 결정으로부터 오베티콜산의 단결정 X선 구조를 결정하였다 (도 34 참조). 구조는 형태 G와 일치하였고, 이 물질에 대한 참조 패턴으로서 모의 XRPD 패턴을 생성하였다. 예를 들어, 아세토니트릴 중의 오베티콜산 용액을 냉각시키는 것에 의해 형태 G를 제조할 수 있다.

[0462] 구조는 사방정계, 공간군 P2₁2₁2₁이며, 비대칭 단위 내에 오베티콜산의 1개 분자를 함유한다. 최종 R1 [I>2σ (I)] = 3.22%. 결정은 대략 0.4 x 0.4 x 0.3mm 치수의 각기둥 형태를 나타내었다. 분자의 절대 입체화학은 플랙 파라미터 = -0.01 (13)에 의해 키랄 중심 C5, C9, C10 및 C14에서는 S로 및 키랄 중심 C3, C6, C7, C8, C13, C17 및 C22에서는 R로 결정되었다. R 배위에서 키랄 중심 C5, C9, C10 및 C14 및 S 배위에서 키랄 중심 C3, C6, C7, C8, C13, C17 및 C22를 갖는 역 구조의 경우에, 플랙 파라미터 = 1.01(13)으로, 상기 언급된 할당을 확인시켜주었다.

[0463] 전반적으로, 구조는 강력한 데이터 세트를 가지며, 어떤 무질서도 갖지 않았다.



[0464]

[0465] 입체화학을 할당하는데 사용된 소프트웨어 (플라톤(PLATON))는 키랄 중심 (C8)을 R 입체중심으로 결정한 반면에, ACD 소프트웨어 (및 칸-인골드-프렐로그)는 (C8)에 대해 S로 할당하였다. 그러나, B/C 고리계에 대한 트랜스 고리 접점의 할당은 절대적으로 결정 구조로부터 규정된다.

[0466]

베이부트(Bijvoet) 차이점에 대한 베이지안(Bayesian) 통계를 사용한 절대 구조의 결정은, (Hooft et al., J. Appl. Cryst., (2008), 41, 96-103), 절대 구조가 정확한 것으로 제공될 확률이 1.000이며, 절대 구조가 라세미 쌍이거나 거짓일 확률은 각각 0.000 및 0.000인 것으로 나타났다. 플랙 등가 및 그의 불확실성은 이 프로그램을 통해 -0.019(17)인 것으로 계산되었다.

[0467]

오베티콜산의 구조는 함께 융합된 1개의 5원 고리 및 3개의 6원 고리를 함유한다. 5원 고리 (C13, C14, C15, C16 및 C17)에 대한 입체형태 분석은 이 고리에 대해 가장 가까운 퍼커링 서술어가 반-의자임을 보여준다. 3개의 6원 고리 (C1, C2, C3, C4, C5 및 C10); (C5, C6, C7, C8, C9 및 C10) 및 (C8, C9, C11, C12, C13 및 C14)에 대한 입체형태 분석은 이들 고리에 대한 가장 가까운 퍼커링 서술어가 의자임을 보여준다.

[0468]

결정 구조에서는 2개의 독특한 문자간 수소 결합이 관찰된다. 각각의 오베티콜산 분자는 수용자로서 작용하는 산소 03 및 01에 대해 산소 01 및 04가 각각 공여자로서 작용하여 01-H1C---03 [D···A = 2.7419(12) Å] 및 04-H4C---01 [D···A = 2.6053(13) Å]의 오베티콜산의 2개의 상이한 대칭 관련 문자로의 수소 결합을 형성한다 (도 35 참조). 이러한 상호작용은 복합적인 3차원 수소 결합 네트워크를 야기한다. 최종적인 푸리에 차이 지도는 각각 0.402 및 -0.176 eÅ⁻³의 최대 및 최소 전자 밀도를 보여준다.

[0469]

실험 배치에 의한 구조에 대해 계산된 XRPD 패턴의 오버레이는 결정이 벌크와 일치하며, 오베티콜산 형태 G임을 보여주었다 (도 36 참조).

[0470]

<표 1> 오베티콜산 형태 G에 대한 결정 데이터

[0471]

결정화 용매 아세토니트릴

[0472]

결정화 방법 RT/50°C에서의 성숙

[0473]

실험식 C₂₆ H₄₄ O₄

[0474]

화학식량 420.63

[0475]

온도 100(2) K

[0476]

파장 1.54178 Å

[0477]

결정 크기 0.40 x 0.40 x 0.30 mm

[0478]

결정 습성 무색 각기둥

[0479]

결정계 사방정계

[0480]

공간군 P2₁2₁2₁

[0481]

단위 셀 치수

[0482]

a = 8.72510(10) Å α = 90°

[0483]

b = 12.69860(10) Å β = 90°

[0484]	$c = 22.5408(2) \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$
[0485]	부피	$2497.44(4) \text{ \AA}^3$
[0486]	Z	4
[0487]	밀도 (계산치)	1.119 Mg/m^3
[0488]	흡수 계수	0.574 mm^{-1}
[0489]	F(000)	928
[0490]	<표 2> 오베티콜산 형태 G에 대한 데이터 수집 및 구조 정밀화	
[0491]	회절계	슈퍼노바(SuperNova), 듀얼(Dual), Cu (0에서), 아틀라스(Atlas)
[0492]	방사선원	슈퍼노바 (Cu) X선 공급원, CuK α
[0493]	데이터 수집 방법	오메가 스캔
[0494]	데이터 수집을 위한 세타 범위	$9.15 \text{ 내지 } 74.49^\circ$
[0495]	지수 범위	$-10 \leq h \leq 10, -15 \leq k \leq 15, -28 \leq l \leq 26$
[0496]	수집된 반사	50001
[0497]	독립적 반사	5073 [R(int) = 0.0220]
[0498]	독립적 반사의 포함범위	99.4%
[0499]	체크 반사에서의 변동	N/A
[0500]	흡수 보정	등가물로부터 반-실험적
[0501]	최대 및 최소 전송	1.00000 및 0.78605
[0502]	구조 용액 기술	직접적
[0503]	구조 용액 프로그램	SHELXTL (Sheldrick, 2001)
[0504]	정밀화 기술	F^2 에 대한 전-행렬 최소-자승법
[0505]	정밀화 프로그램	SHELXTL (Sheldrick, 2001)
[0506]	최소화 함수	$\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2$
[0507]	데이터 / 억제 / 파라미터	5073 / 0 / 286
[0508]	F^2 에 대한 적합도	1.060
[0509]	Δ / σ_{\max}	0.001
[0510]	최종 R 지수	
[0511]	5039 데이터; $I > 2\sigma(I)$	$R_1 = 0.0320, wR_2 = 0.0859$
[0512]	모든 데이터	$R_1 = 0.0322, wR_2 = 0.0861$
[0513]	가중치 계산법	calc w=1 / $[\sigma^2(F_o^2) + (0.0503P)^2 + 0.5520P]$
[0514]		여기서 $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
[0515]	절대 구조 파라미터	-0.01(13)

- [0516] 가장 큰 상이한 피크 및 홀 0.402 및 -0.176 eÅ^{-3}
- [0517] 구조의 정밀화 요약은 하기와 같다:
- [0518] 질서있는 비-H 원자, XYZ 자유롭게 정밀화
- [0519] 질서있는 비-H 원자, U 이방성
- [0520] H 원자 (탄소 상), XYZ 부착된 원자 상에 얹혀있는 이상적인 위치
- [0521] H 원자 (탄소 상), U 결합된 원자에 대한 적절한 U(eq) 배수
- [0522] H 원자 (헤테로원자 상), XYZ 자유롭게 정밀화
- [0523] H 원자 (헤테로원자 상), U 등방성
- [0524] 무질서한 원자, OCC 무질서 없음
- [0525] 무질서한 원자, XYZ 무질서 없음
- [0526] 무질서한 원자, U 무질서 없음
- [0527] 실시예 7: 오베티콜산 형태 1 (비-결정질)과 결정질 (형태 F) 형태 사이의 생체이용률 차이
- [0528] 고체 오베티콜산의 물리적 상태는 대상체 (예를 들어 래트)에 경구로 투여된 경우에 분자의 생체이용률에 소정의 역할을 할 수 있다. 하기에 기재된 연구는 고체 비-결정질 및 결정질 형태의 오베티콜산의 단일 경구 투여 이후의 혈장 동역학 및 장 흡수의 효율 및 약동학을 평가하기 위해 수행되었다. 오베티콜산 형태 1 (비-결정질) 또는 형태 F의 투여 이후의 오베티콜산 혈장 농도 프로파일 vs 시간, t_{\max} , C_{\max} 및 AUC를 비교하였다 (도 37-38 참조).
- [0529] 오베티콜산 형태 1 (비-결정질) 및 형태 F를 래트에게 투여하고, 각각의 동물에서 적어도 3시간 동안 상이한 시간 간격으로 혈액을 수집하였다. 각각의 형태의 오베티콜산에 대해 6마리의 동물을 연구하였다.
- [0530] 실험 프로토콜:
- [0531] 사용된 시험 물질은 오베티콜산 형태 1 (비-결정질) 및 결정질 형태 F였다. 형태 F는 아세토니트릴 또는 니트로메탄으로부터의 성숙에 의해 제조할 수 있다. 제제를 물 중 혼탁액으로서 pH 4에서 제조하였다. 연구 모델은 약 225 내지 약 250 g의 성인 수컷 스프라그 돌리 래트이다 (하틀란 래보러토리즈(Harlan Laboratories)). 투여 경로당 6마리의 동물을 사용하였다. 투여량은 PO 20 mg/kg/5 mL였다. 오베티콜산 제제에 의한 치료 이전에 동물을 밤새 금식시켰다. 위관 영양에 의해 경구 투여를 수행하였다.
- [0532] 제1일에, 캐뉼러를 좌측 경정맥에 이식하여 동물을 피팅시키고 (SOP VIVO/SAF6), 이소플루란에 의해 마취하였다. 수술에서 회복되고 1일 후에 실험을 시작하였다. 캐뉼러를 통해 약 500 μL 의 혈액 (250 μL 의 혈장)을 혜파린첨가된 시린지 (Na 혜파린)로 취하고, 즉시 빙수조 내의 마이크로튜브에 수집하였다. 1시간 내에, 샘플을 10000xg에서 5분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 혈장을 즉시 마이크로튜브로 옮기고, -20°C에서 저장하였다. 혈액 샘플을 투여-후 30분, 1시간, 1.3시간, 2시간 및 3시간째에 수집하였다. HPLC-ES/MS/MS 정량적 방법을 사용하여 혈장 샘플을 분석하였다. 비-구획화 방법을 사용하여 약동학 연구를 수행하였다.
- [0533] 결과:
- [0534] 2종의 고체 형태의 20 mg/Kg b.w 경구 단일 용량 투여 이후의 오베티콜산의 평균 혈장 농도를 도 37에 보고한다. 값은 각각의 제제에 대한 6 세트의 실험의 평균이다. 표준 편차를 그래프로 보고한다.
- [0535] 결정질 형태의 투여 후, 1.5시간 후에 C_{\max} 가 달성되었고, 혈장 오베티콜산 농도는 1개의 최대 값을 갖는 정규 동역학을 따르며, 3시간 이후에 용량은 C_{\max} 의 거의 절반이었다.
- [0536] 오베티콜산 형태 1 (비-결정질) 형태 1의 투여 이후의 동역학 프로파일은 결정질 형태 F의 그것과 상이하였다. 초기 혈장 농도 피크는 30분 후에 수득되었고, 두번째 것은 2시간 후에 수득되었다. 6마리의 래트에서 데이터의 가변성은 매우 낮았고, 이러한 거동은 결정질 형태의 그것과 통계적으로 상이하였다. 연구된 3시간 동안의 AUC는 결정질 형태의 경우에 더 높았다. 동역학은 오베티콜산이 3시간 후에도 혈장 중에서 여전히 존재함을 시사한다. 오베티콜산이 간을 통해 통과되면 간 대사물인 타우로 접합체가 생산되며, 이는 담즙으로 분비되고, 장간 순환에 축적된다는 것이 종전에 입증된 바 있다. 따라서, 타우로 접합체의 측정은 간을 통해 통과한 오베티콜산 형태 1 (비-결정질) 형태 1의 투여 이후의 동역학 프로파일은 결정질 형태 F의 그것과 상이하였다.

티콜산의 양을 결정하는데 사용될 수 있다. 타우로 접합체 형성의 속도를 도 38에 보고하며, 이는 결정질 형태의 투여 이후에 타우로 접합체의 형성이 더 빠르고, 높은 농도가 달성됨을 보여준다.

[0537] 용점 및 유리 전이

[0538] 통상의 방법을 사용하여 오베티콜산 형태 1 (비-결정질) 형태 1 및 결정질 형태 F의 용점을 측정하였다. 참조화합물로서 케노데옥시콜산 및 우르소데옥시콜산의 용점을 측정하였다. 측정은 3중으로 수행하였다. 결정질 형태의 경우에 고체에서 액체 상태로의 전이는 용융 온도 (T_m)로 규정하고, 비-결정질 형태의 경우에는 유리 전이 온도 (T_g)로 규정하였다. 표에는 측정된 값을 섭씨 °C 및 켈빈 °K 둘 다로 표현하여 보고하였다.

[0539] <표 3> 오베티콜산 (형태 1 및 형태 F) 및 CDCA 및 UDCA의 용점

화합물	실험 데이터		문헌 데이터	
	T_m (°C)	T_g (°C)	T_m (°C)	T_g (°C)
CDCA	136-140	-	119 143 163	98
UDCA	203-207	-	203	105
오베티콜산	120-124 235-237	108-112	-	-

화합물	실험 데이터			문헌 데이터		
	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	-	-	392 416 436	371	0.85
UDCA	476-480	-	-	477	378	0.79
오베티콜산	393-397 508-510	381-385	0.75	-	-	0.75

[0540]

[0541] 결과:

[0542] UDCA의 용점은 CDCA의 그것보다 높았고, CDCA 및 UDCA에 대해 수득된 값은 종전에 보고된 것과 일치하였다. 형태 1의 유리 전이 온도 T_g (102-112°C)는 형태 F의 용점 온도 T_m (120-124°C)보다 낮았다. 이러한 관찰된 패턴은 2종의 고체 상태 형태를 비교한 경우에 종전에 보고된 데이터와 일치하였다. 형태 F는 보다 높은 온도 (235-237°C)에서 추가의 전이를 갖는다.

[0543] 켈빈 온도로 표현된 가장 높은 용점 온도 및 유리 전이 온도 사이의 비는 다른 약물 및 다른 담즙산과 매우 유사하였다. (J. Kerc et al. *Thermochim. Acta*, 1995 (248) 81-95).

[0544] 시차 주사 열량측정 분석

[0545] 오베티콜산 결정질 및 비-결정질 형태의 용점 및 물리적 상태를 추가로 규정하기 위해 시차 주사 열량측정 (DSC) 분석을 수행하였다. 사용된 기기는 메탈러 틀레도 DSC 모델 821e였다. 대략 4-5 mg의 각각의 형태 1 및 형태 F를 분석에 사용하였다. 화합물을 10°C/min의 가열 속도로 30-300°C의 온도 범위에 노출시켰다.

[0546] 도 39는 오베티콜산 결정질 형태 F에 대해 수득된 DSC 곡선을 나타낸다. 120.04°C에서 1개의 흡열 전이가 화합물의 용점에 상응하게 검출되었다. 이러한 결과는 또한 고온 단계 현미경검사 (HSM)에 의해 30° -240°C 범위에서 확인되었고; 고체-액체 전이가 122-124°C에서 관찰되었다. DSC 트레이스에서, 형태 F에 대해 수득된 피크 형상 및 강도는 결정질 형태에 의해 보여지는 전형적인 거동과 일치하였다. 그러나, 피크 폭은 오히려 넓었고; 이는 균질한 결정이 아니기 때문일 수 있다. 열 중량 분석 (TGA)은 30-300°C 온도 범위에서 어떤 중량 손실도 나타내지 않았다.

[0547] 도 40은 오베티콜산 비-결정질 형태 1에 대해 수득된 DSC 곡선을 나타낸다. 79.95°C에서 1개의 흡열 전이가 관찰되었다. 피크 형상 및 강도는 비-결정질 화합물에 대해 예상되는 거동과 일치하였다. 이들 물질의 경우에,

고체-액체 전이 (유리 전이)를 위해 요구되는 에너지는 결정질 화합물의 경우보다 낮았다. 온도기록도는 30-300°C 온도 범위에서 어떤 중량 손실도 나타내지 않았다.

[0548] 수용해도

[0549] 당업계에 공지된 하기 절차에 따라 오베티콜산 형태 1 (비-결정질) 형태 1 및 결정질 형태 F의 수용해도를 측정하였다. 간략하게, 고체를 물 중에 낮은 pH (HCl 0.1 mol/L)에서 혼탁시키고, 약한 혼합 하에 1주 동안 25°C에서 평형이 되도록 정치시켰다. 포화 용액을 여과하고, 용액 중의 화합물의 농도를 HPLC-ES-MS/MS에 의해 측정하였다.

[0550] 결과:

	수용해도 ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
형태 1	17.9
형태 F	9.1

[0551]

[0552] 형태 1은 $17.9 \mu\text{mol}/\text{L}$ vs. 형태 F의 경우에 $9.1 \mu\text{mol}/\text{L}$ 로 더 높은 용해도를 나타내었다. 오베티콜산의 생체 이용률 데이터에 따르면, 결정질 형태 F는 오베티콜산 형태 1 (비-결정질)보다 더 높았다. 형태 1의 투여 이후의 초기 혈장 농도 피크에 불구하고, 혈장 프로파일은 형태 F가 보다 효율적으로 흡수되며 (보다 높은 AUC), 동 역학도 또한 보다 정규적인 것으로 나타났고, 이는 장 용량에서 약물의 최적의 분포를 반영한다. 형태 1은 이러한 초기 피크에 이어 형태 F의 그것보다 낮은 C_{\max} 를 갖는 나중의 두번째 피크를 나타내었다.

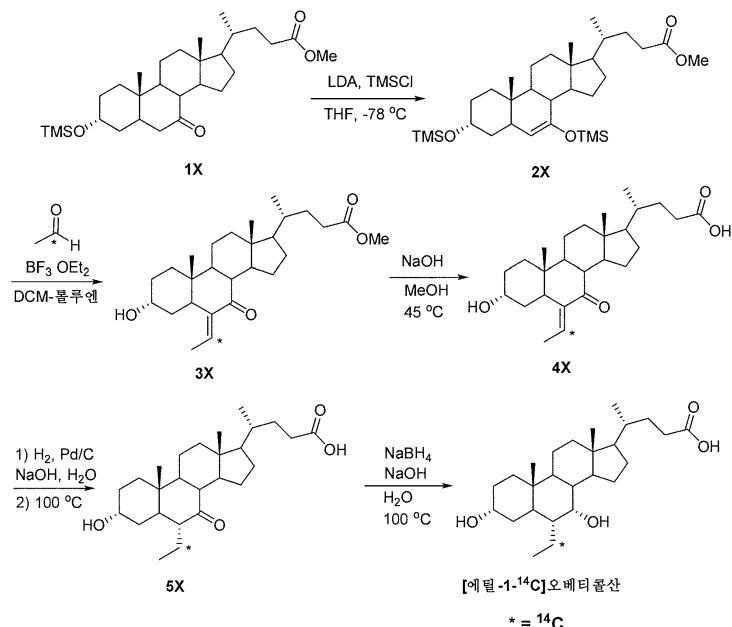
[0553] 형태 1의 수용해도는 형태 F의 그것보다 높았다. 열 중량 분석 (TGA)이 연구된 온도 범위에서 어떤 중량 손실도 나타내지 않았기 때문에 형태 F는 안정한 것으로 보인다.

[0554] 이를 결과에 따르면, 경구로 투여된 경우에 형태 F는 장에 의해 보다 효율적으로 흡수되고 간에 의해 받아들여지는 것으로 보인다. 주요 간 대사를 타우로 접합체의 형성 속도는 형태 1과 비교하여 형태 F의 경우에 거의 2 배였고, 이는 3시간 후에서의 보다 효율적인 전송 및 장간 순환 및 혈장 농도에서의 축적을 시사한다.

[0555] 실시예 8: 방사성표지된 오베티콜산의 제조

[0556] 방사성표지된 오베티콜산을 하기 반응식에 따라 제조하였다.

[0557] <반응식 5>



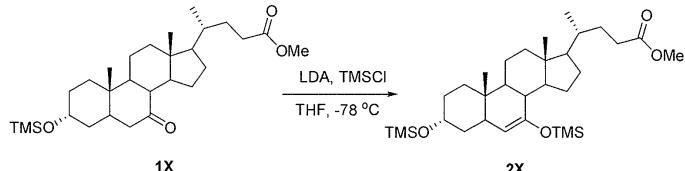
[0558]

[0559] 30°C에서 5-mm o.d. 튜브 (노렐, 인크.(Norell, Inc.) 507-HP) 내의 CDCl_3 및 MeOD-d_4 용액 중에서 NMR 스펙트럼을 기록하고, 배리안 VNMRS-400 상에서 400 MHz에서 ^1H 에 대해 수집하였다. 화학적 이동 (δ)은 테트라메틸실란 (TMS = 0.00 ppm)에 상대적인 것으로, ppm으로 표현하였다. LC-MS/MS는 이온-포획 질량 분광계 상에서

EST (-) 이온화 모드로 작동하는 악셀라-써모 피니간(Accela-Thermo Finnigan) LCQ 플럿 상에서 수득하였다. HPLC는 애질런트 1200 시리즈 (칼럼: 엑스테라(Xterra) MS C8, 250 x 4.6 mm, 5 μm , 40°C) 상에서 라인 β -ram에서 수득하였다. 비활성은 LSA (액체 섬광 분석기, 퍼킨 엘머(Perkin Elmer), 트리-카르브 2900TR) 상에서 수득하였다.

[0560]

화합물 2X의 제조



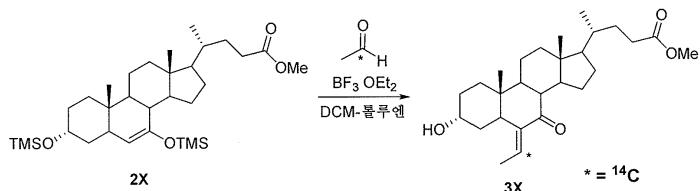
[0561]

[0562]

건조 THF (6.0 mL) 중 디이소프로필아민 (1.59 g, 15.8 mmol)의 용액에 -20°C에서 n-BuLi (6.30 mL, 2.5 M, 15.8 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 -20°C에서 1시간 동안 교반한 후, -78°C로 냉각시키고, TMSCl (1.72 g, 15.8 mmol)을 첨가하고, 이어서 건조 THF (6.0 mL) 중 화합물 1X (3.00 g, 6.29 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 -78°C에서 1시간 동안 교반하고, NaHCO₃을 첨가하여 켄칭하고, 실온에서 30분 동안 교반하였다. 유기 층을 분리하고, 진공 하에 농축시켜 화합물 2X (3.29 g, 95%)를 수득하고, 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

[0563]

화합물 3X의 제조



[0564]

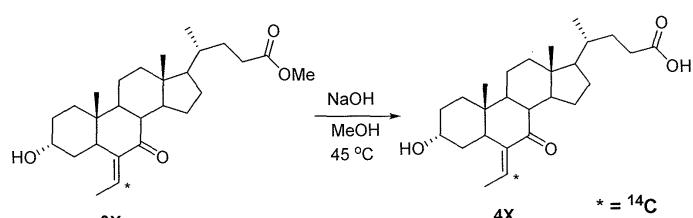
[0565]

톨루엔 (1.0 mL) 중 [¹⁴C]아세트알데히드 (330 mCi, 5.63 minol) ([¹⁴C]BaCO₃, SA = 58.6 mCi/mmol로부터 제조됨) 및 DCM (2.0 mL) 중 아세트알데히드 (130 mg, 2.95 mmol)를 -78°C에서 혼합한 다음, DCM (13.0 mL) 중 화합물 2X (3.29 g, 6.00 mmol)의 용액에 옮긴 다음, BF₃ · OEt₂ (1.05 g, 7.40 mmol)를 -78°C에서 첨가하였다. -78°C에서 1시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 35°C로 가온되도록 하고, 상기 온도에서 1시간 동안 교반하였다. 반응물을 물 (10 mL)의 첨가에 의해 켄칭하고, 수성 층을 DCM으로 추출하고, 합한 유기 층을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 SiO₂ 상에서 칼럼 크로마토그래피 (헥산: EtOAc = 5:1에서 3:1까지)에 의해 정제하여 화합물 3X (102 mCi, 31%, SAW 37.0 mCi/mmol)를 백색 고체로서 수득하였다.

¹H-NMR (CDCl₃, 배리안, 400 MHz): δ 0.65 (3H, s); 0.93 (3H, d, J= 6.0 Hz), 1.01 (3H, s), 1.06-1.49 (12H, m), 1.62-2.04 (7H, m), 1.69 (3H, d, J= 6.8 Hz), 2.18-2.28 (2H, m), 2.32-2.43 (2H, m), 2.58 (1H, dd, J= 12.8, 4.0 Hz), 3.62-3.70 (1H, m), 3.67 (3H, s), 6.18 (1H, q, J= 6.8 Hz).

[0566]

화합물 4X의 제조



[0568]

[0569]

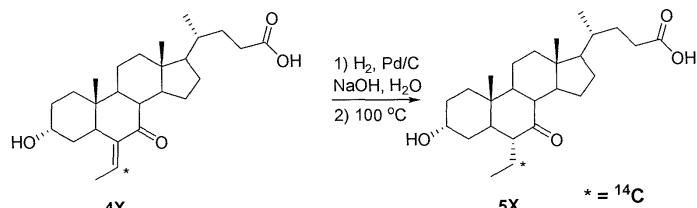
MeOH (6.0 mL) 중 화합물 3X (102 mCi, 2.75 mmol)의 용액에 실온에서 H₂O (3.0 mL) 중 NaOH (220 mg, 5.50 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 45°C에서 1시간 동안 교반한 후, 실온으로 냉각시키고, MeOH를 감압 하에

제거하고, H_2O (12 mL)로 희석하였다. 수성 층을 H_3PO_4 로 산성화시키고, DCM으로 추출하고, 유기 층을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 Et_2O 중에 혼탁시키고, 침전물을 여과에 의해 수집하여 화합물 4X (86.3 mCi, 85%)를 백색 고체로서 수득하였다.

1H -NMR ($CDCl_3$, 배리안, 400 MHz): δ 0.63 (3H, s), 0.92 (3H, d, $J = 6.0$ Hz), 0.99 (3H, s), 1.04-1.50 (13H, m), 1.61-2.01 (7H, m), 1.67 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 2.21-2.28 (2H, m), 2.35-2.41 (2H, m), 2.56 (1H, dd, $J = 12.8, 4.0$ Hz), 3.58-3.69 (1H, m), 6.16 (1H, q, $J = 7.2$ Hz).

[0570]

화합물 5X의 제조

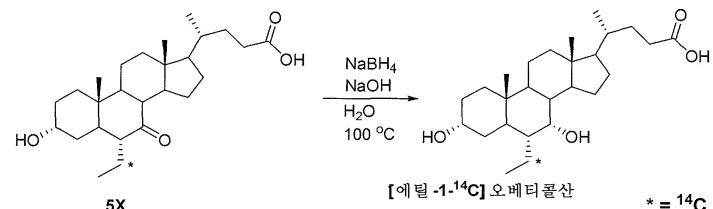


[0572]

수성 0.5 M NaOH (10 mL, 5.0 mmol) 중 화합물 4X (86.3 mCi, 2.35 mmol) 및 5% - Pd/C (100 mg)의 혼합물을 H_2 분위기 (풍선) 하에 실온에서 10시간 동안 교반한 다음, 14시간 동안 100°C에서 교반하였다. 촉매를 여과에 의해 제거하고, 물로 세척하고, 여과물을 H_3PO_4 로 산성화시켰다. 침전물을 여과에 의해 수집하고, 고체를 $EtOAc$ 중에 용해시키고, 염수로 세척하고, SiO_2 의 짧은 패드를 통해 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류 고체를 $EtOAc$ 로 재결정화하여 화합물 5X (67.7 mCi, 78%)를 백색 고체로서 수득하였다.

1H -NMR ($MeOD-d_4$, 배리안, 400 MHz): δ 0.71 (3H, s), 0.75-0.84 (1H, m), 0.81 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 0.92 (1H, m), 0.96 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.06-1.38 (7H, m), 1.25 (3H, s), 1.41-1.96 (12H, m), 2.01-2.05 (1H, m), 2.11-2.24 (2H, m), 2.30-2.37 (1H, m), 2.50 (1H, t, $J = 11.4$ Hz), 2.80-2.85 (1H, m), 3.42-3.49 (1H, m).

[0574]

[에틸-1- ^{14}C]오베티콜산의 제조

[0576]

수성 2 M NaOH (4.50 mL, 9.00 mmol) 중 화합물 5X (67.7 mCi, 1.83 mmol)의 용액에 80°C에서 1120 (2.0 mL) 중 $NaBH_4$ (416 mg, 11.0 mmol)의 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 100°C에서 2시간 동안 교반한 후, 물 (6.0 mL)을 실온에서 첨가하고, H_3PO_4 로 산성화시켰다. 수성 층을 DCM으로 추출하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, SiO_2 의 짧은 패드를 통해 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 SiO_2 상에서 칼럼 크로마토그래피 (헥산:EtOAc = 1:1에서 1:3까지)에 의해 정제하여 생성물 (44.0 mCi, 65%)을 백색 고체로서 수득하였다. 생성물 (44.0 mCi, 1.19 mmol) 및 오베티콜산 (120 mg, 0.285 mmol)을 $EtOAc$ (4 mL) 중에 용해시키고, 용액을 50°C에서 2시간 동안 교반한 다음, 진공 하에 농축시켰다. 잔류 오일을 Et_2O 중에 혼탁시키고, 침전물을 여과에 의해 수집하여 [에틸-1- ^{14}C]오베티콜산 (560 mg, 38.5 mCi, SA = 29 mCi/mmol)을 백색 고체로서 수득하였다.

1H -NMR ($CDCl_3$, 배리안, 400 MHz): δ 0.66 (3H, s), 0.88 (3H, s), 0.93 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 0.93 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.96-1.04 (1H, m), 1.08-1.52 (14H, m), 1.51-1.60 (10H, m), 2.22-2.30 (11H, m), 2.36-2.44 (1H, m), 3.38-3.45 (11H, m), 3.71 (1H, s).

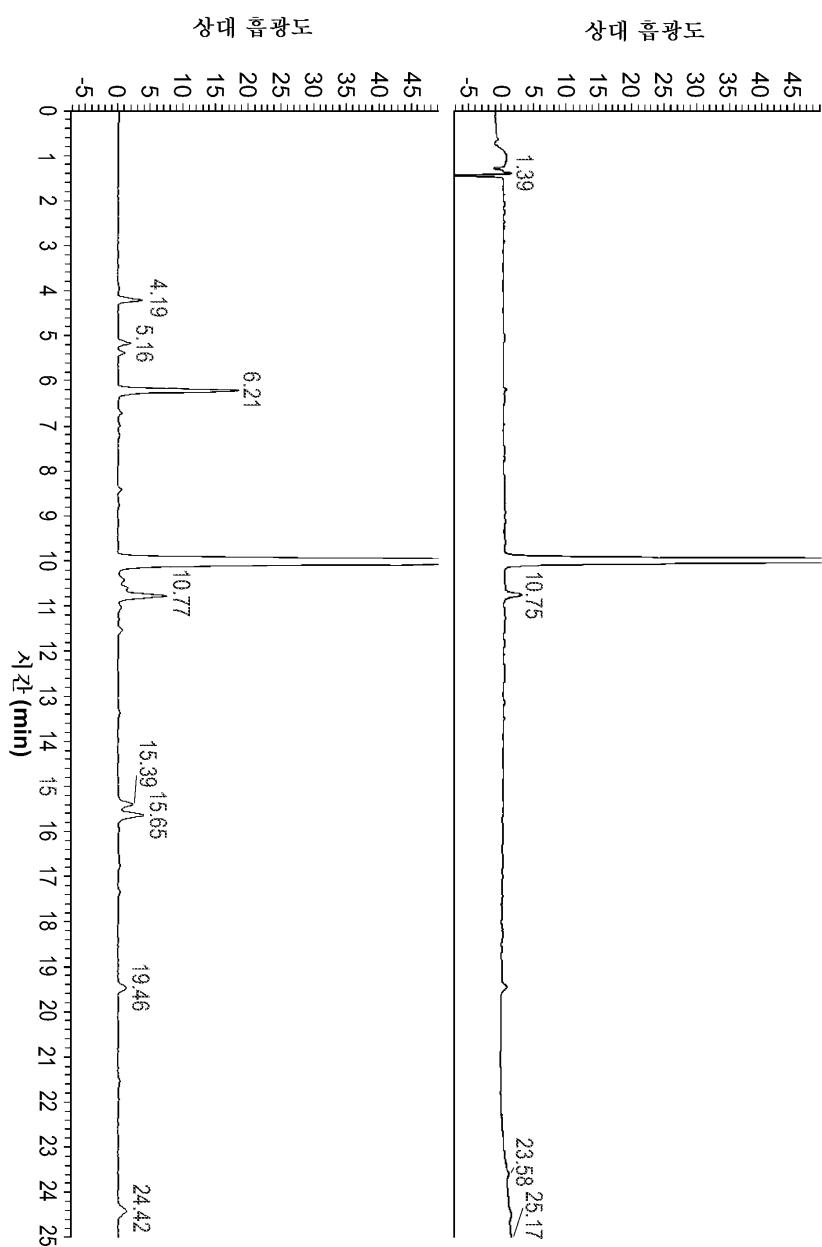
LC-MS/MS (MS: LCQ 프로트): MS 계산치: 421.56; MS 실측치 : 421.07 [$M-H^-$].

[0578]

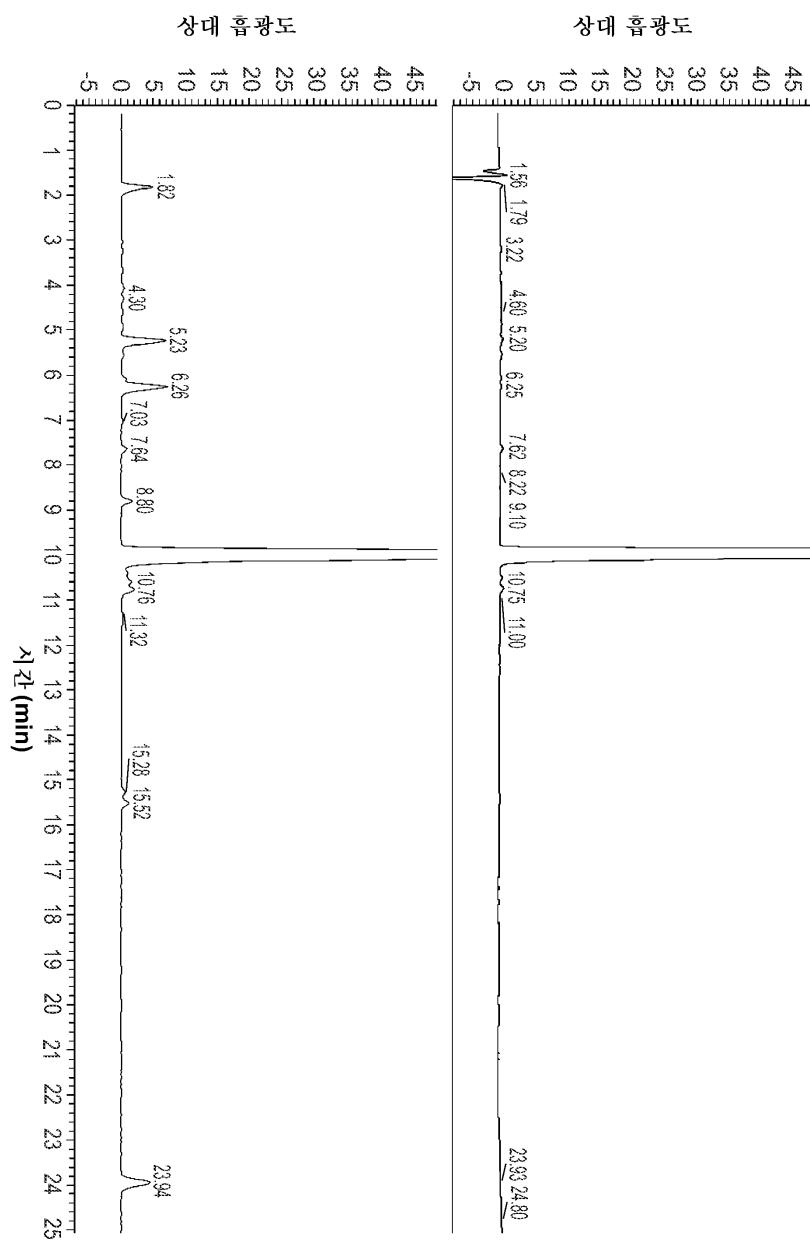
- [0579] 방사성 TLC: 실리카 60 F₂₅₄의 TLC 플레이트, 및 이동상은 EtOAc임. 방사화학적 순도는 98.90%임, R_f = 0.675
- [0580] HPLC (애질런트 1200 시리즈): 이동상; 아세토니트릴: 5 mM 인산염 완충액 (pH = 3):MeOH = 450:450:100. 방사화학적 순도는 98.19% (β -ram)임, R_t = 20.00분.
- [0581] [에틸-1-¹⁴C]오베티콜산은 LSC에 의해 29 mCi/mmol의 빈활성에서 ¹⁴C₁C₂₅H₄₄O₄의 분자식 및 421.46의 분자량을 갖는다.

도면

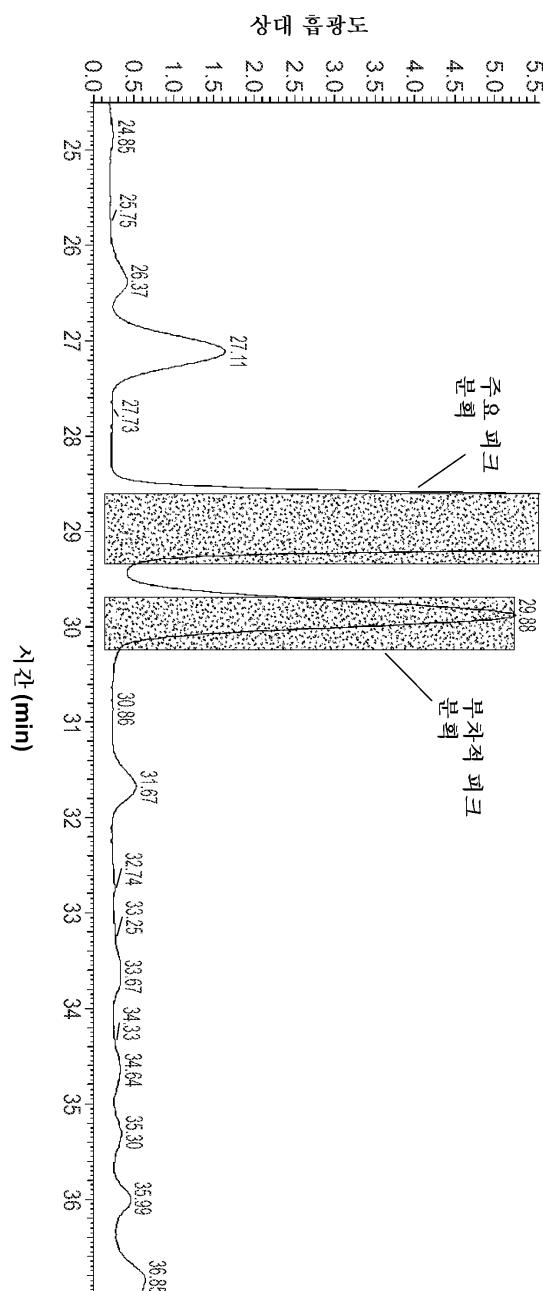
도면1



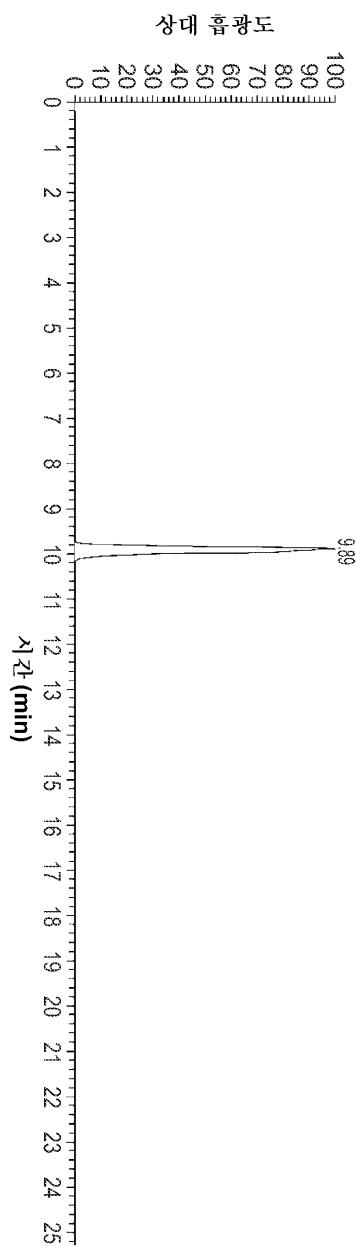
도면2



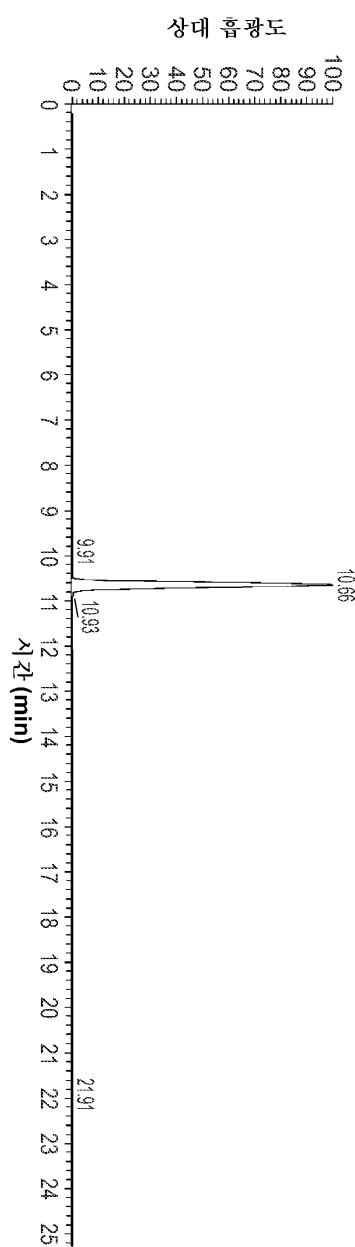
도면3



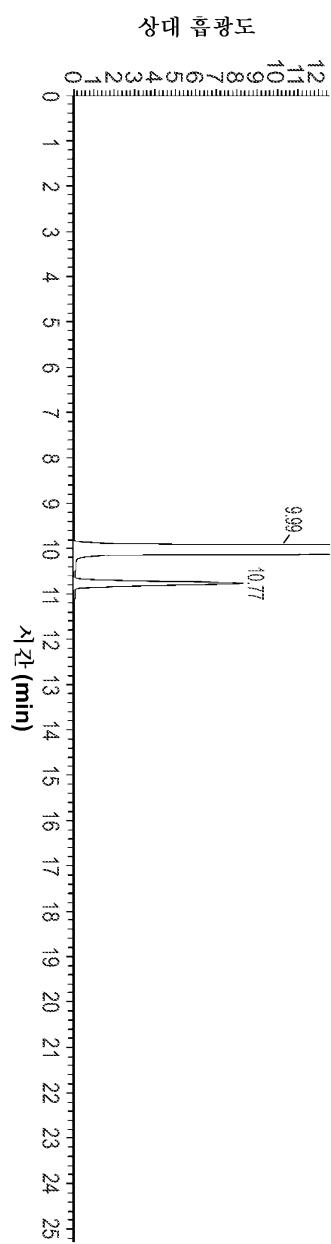
도면4a



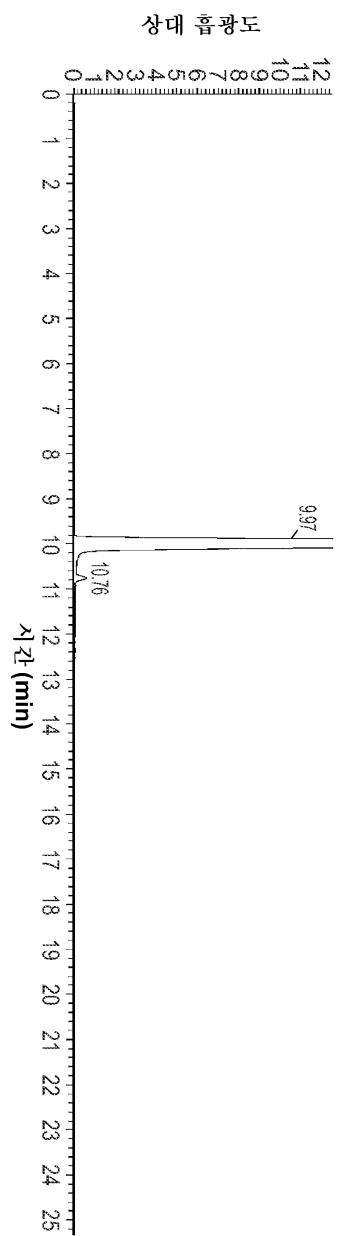
도면4b



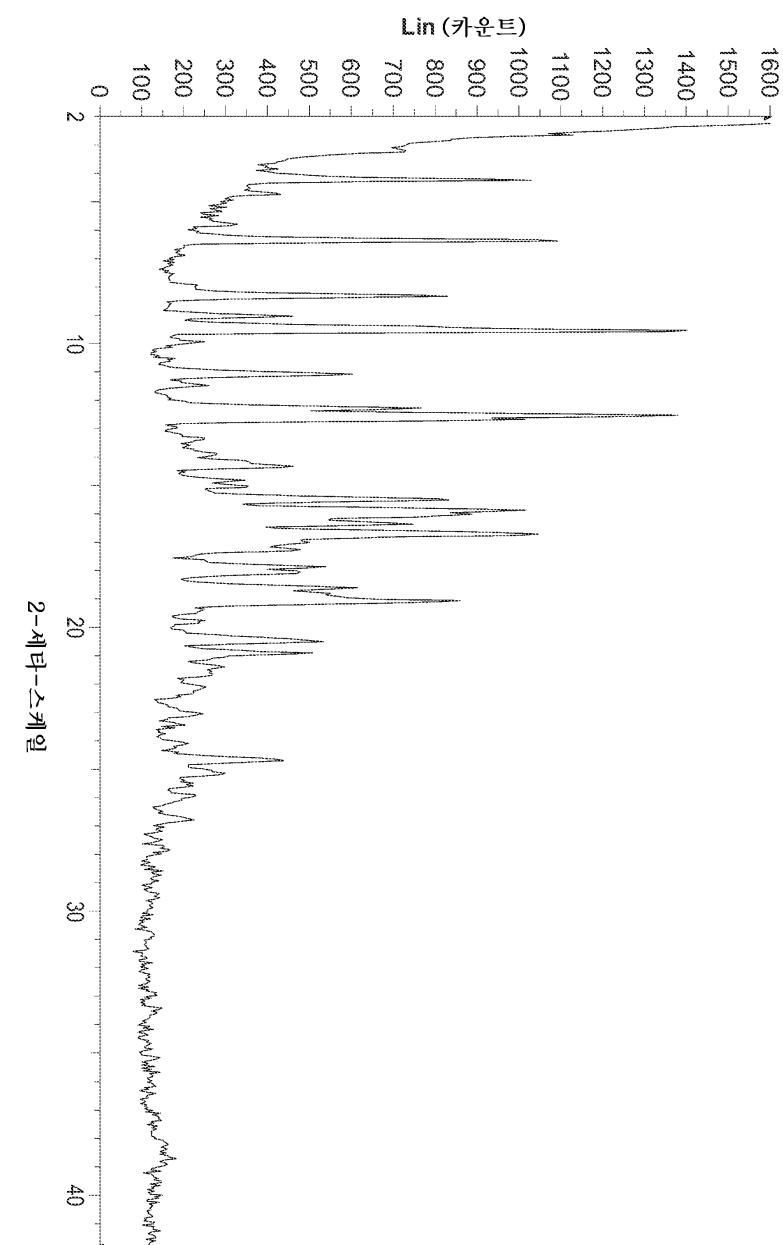
도면4c



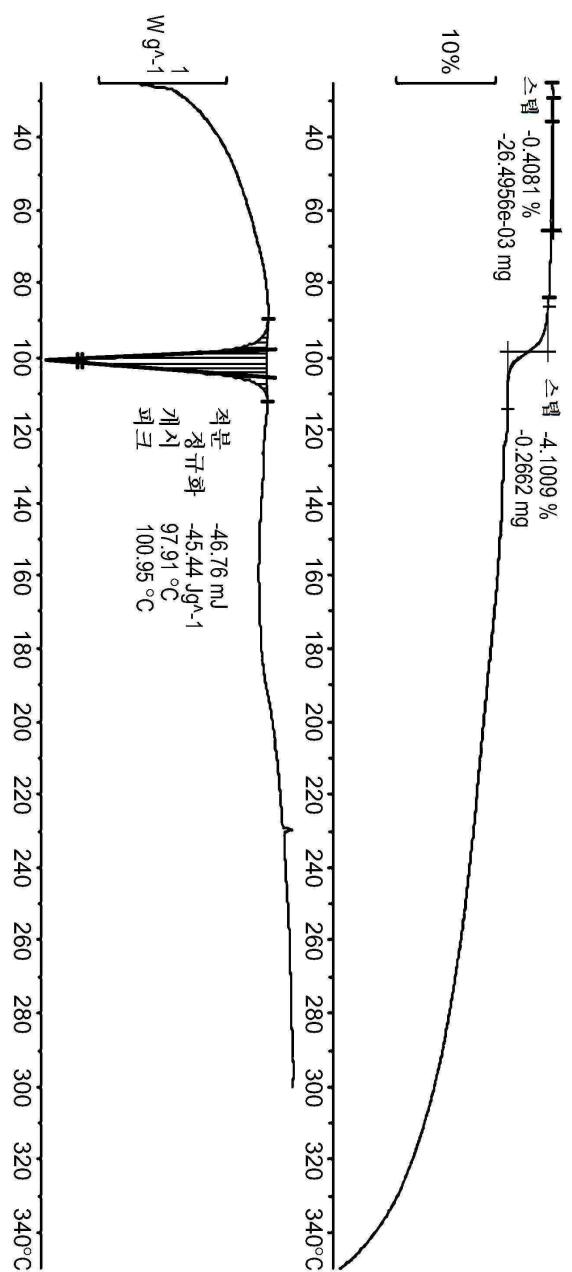
도면4d



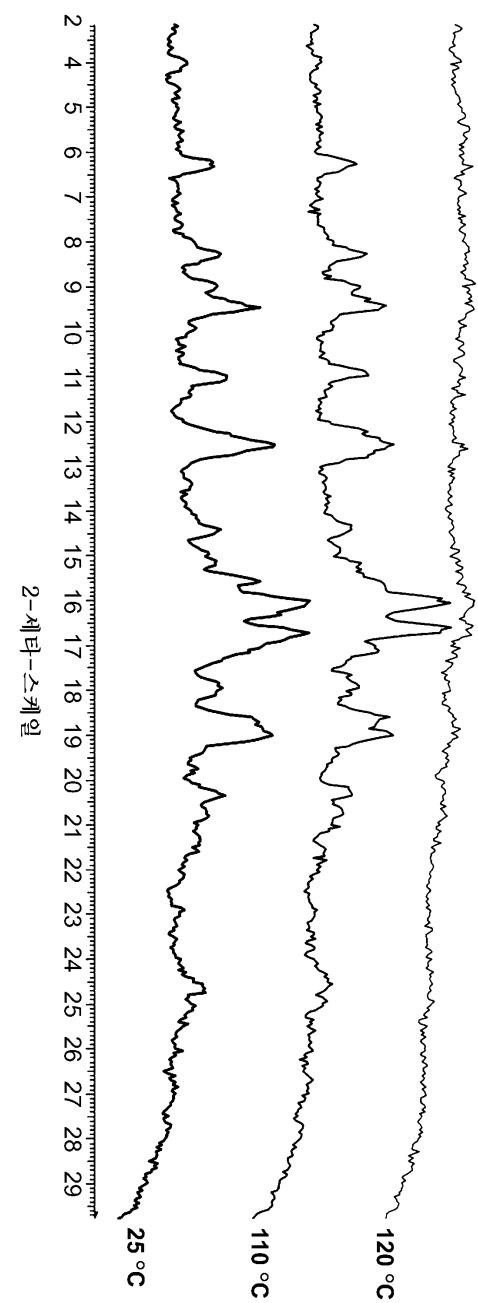
도면5



도면6

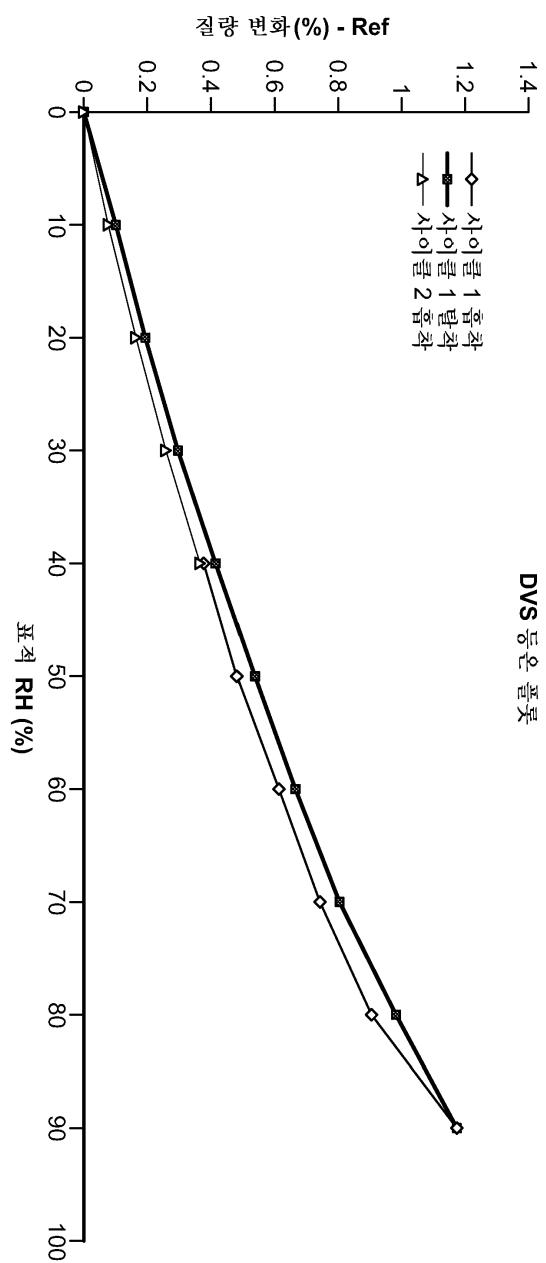


도면7

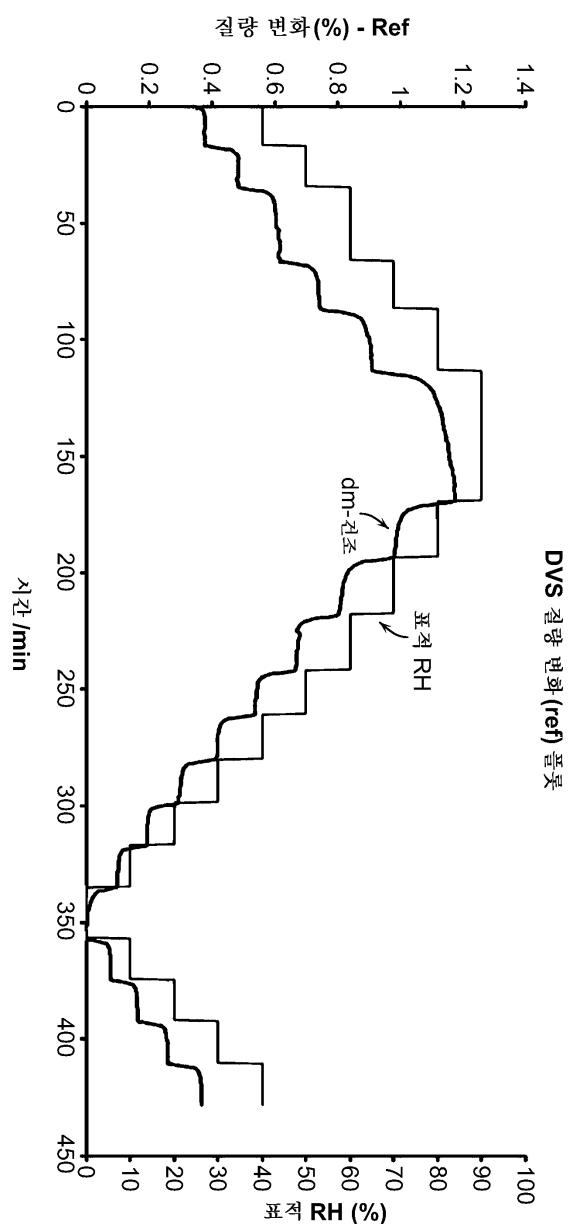


2-세타-스케일

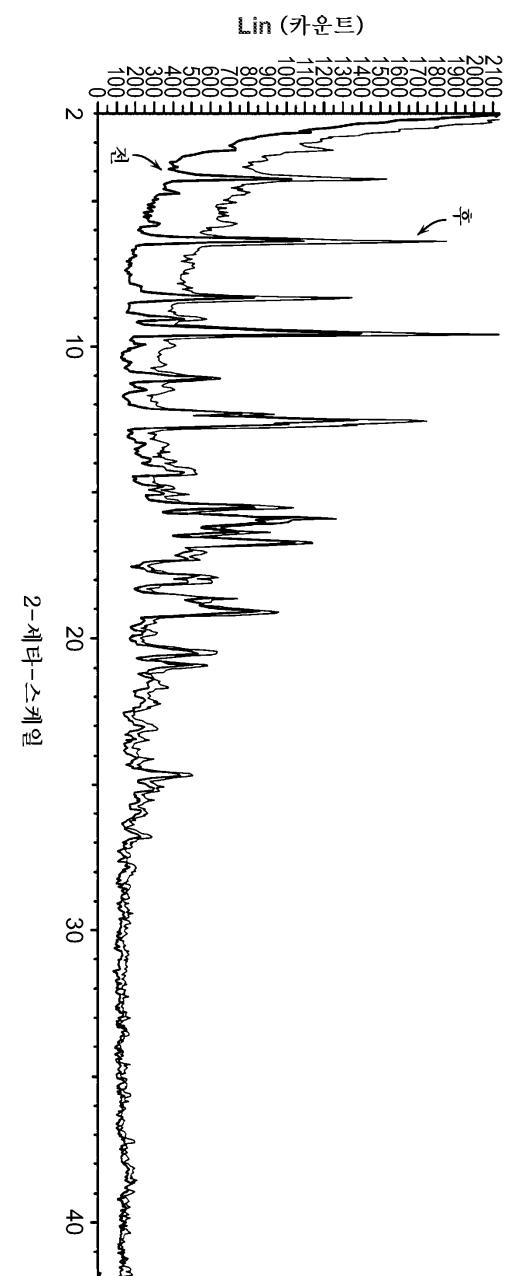
도면8a



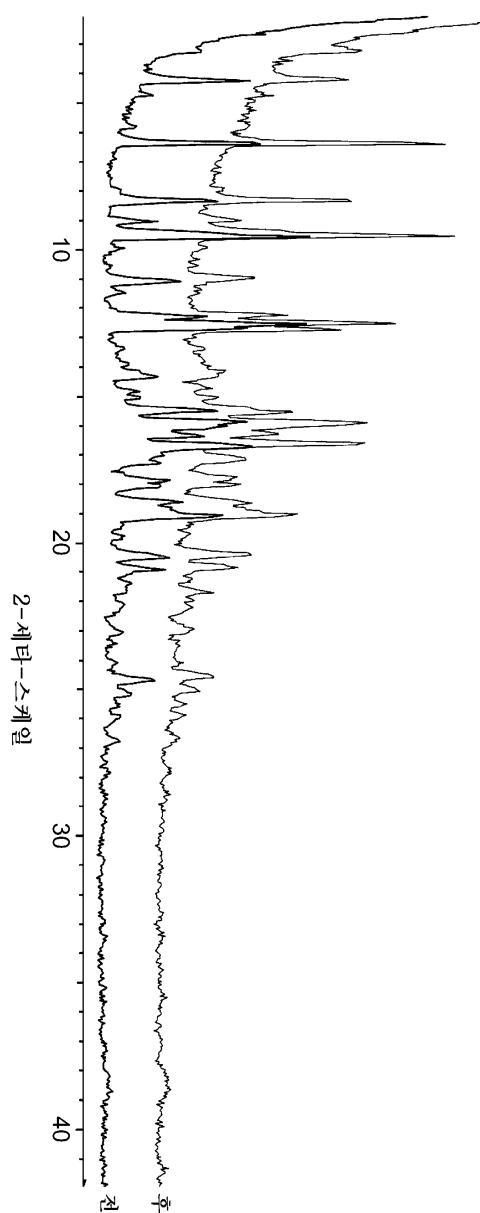
도면8b



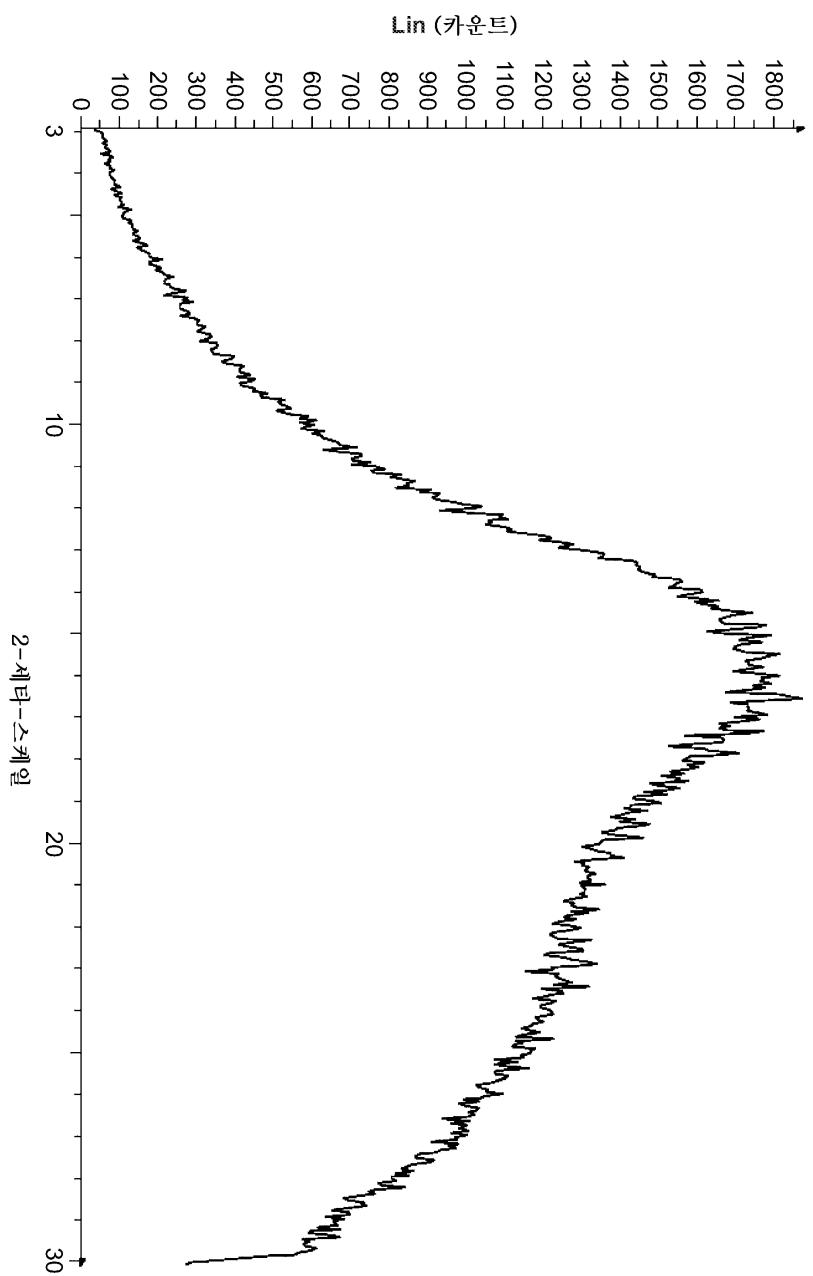
도면8c



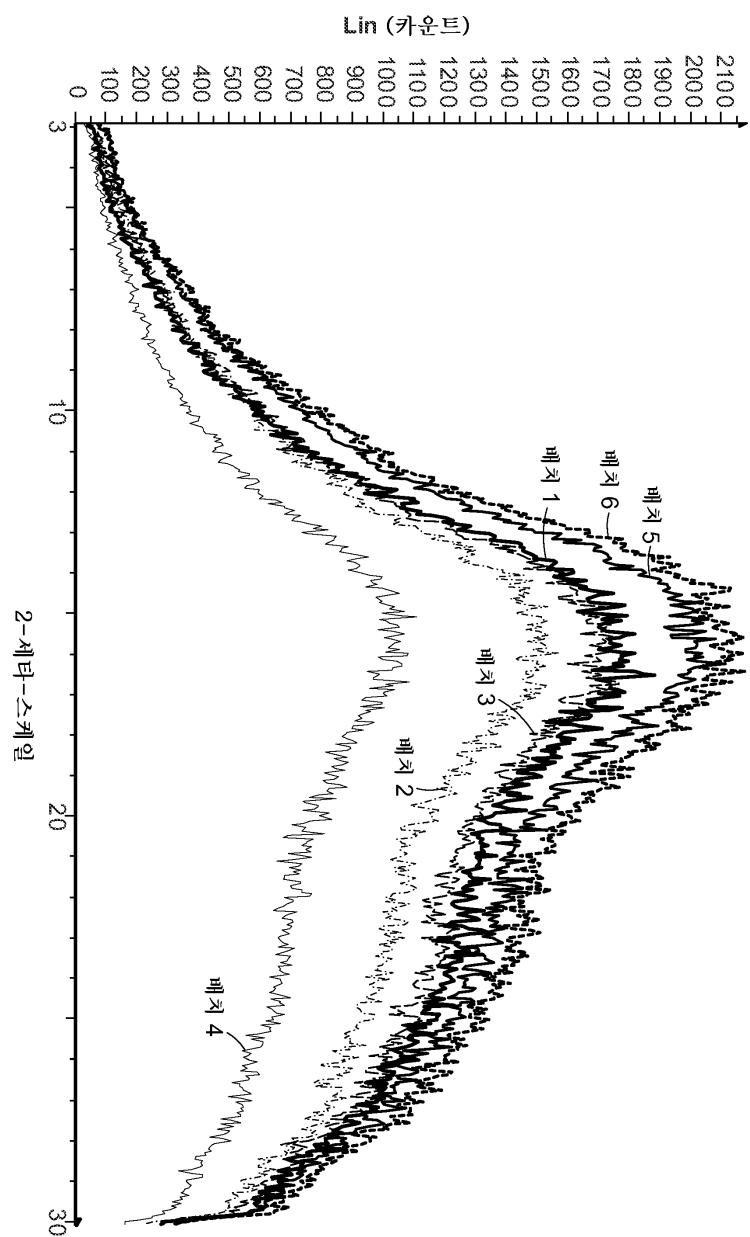
도면9



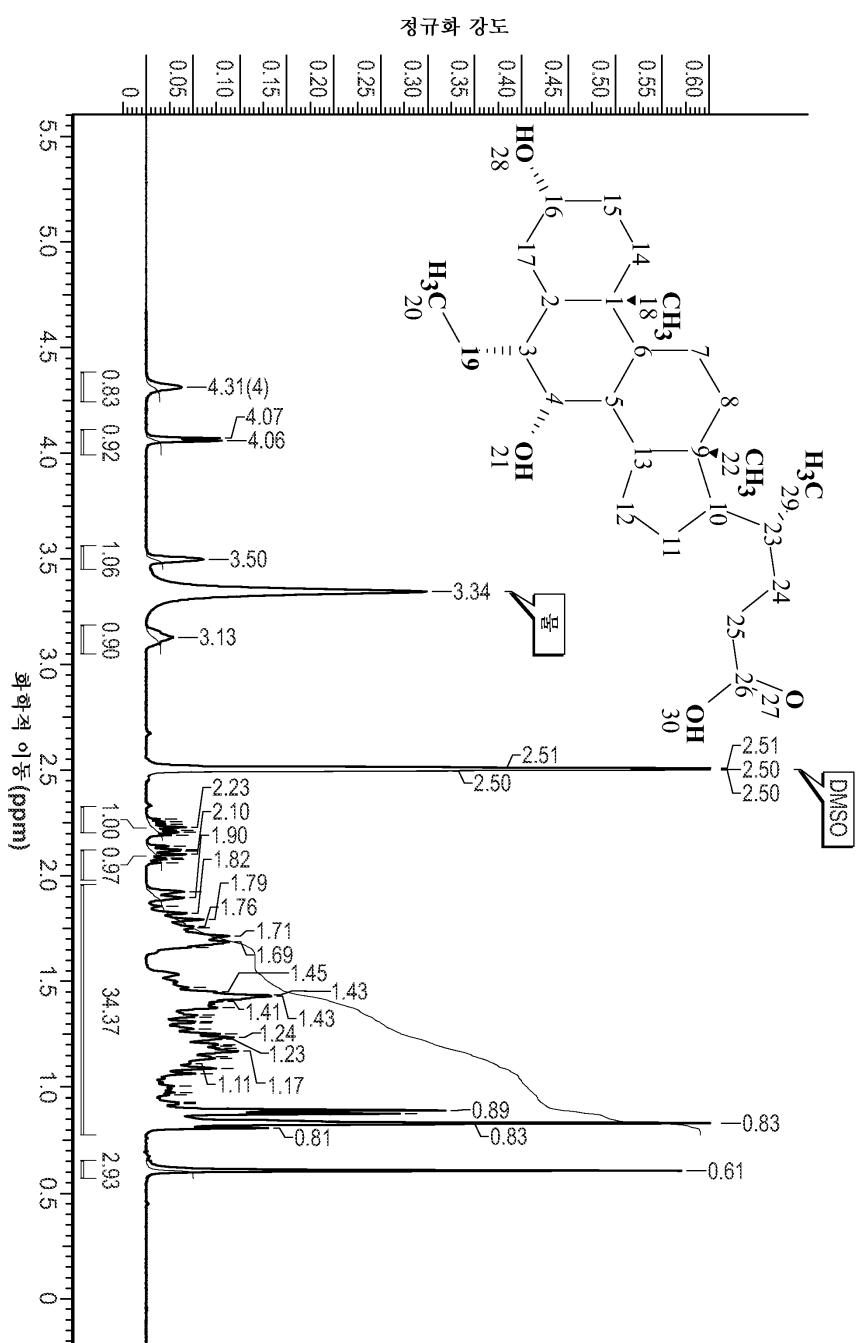
도면10



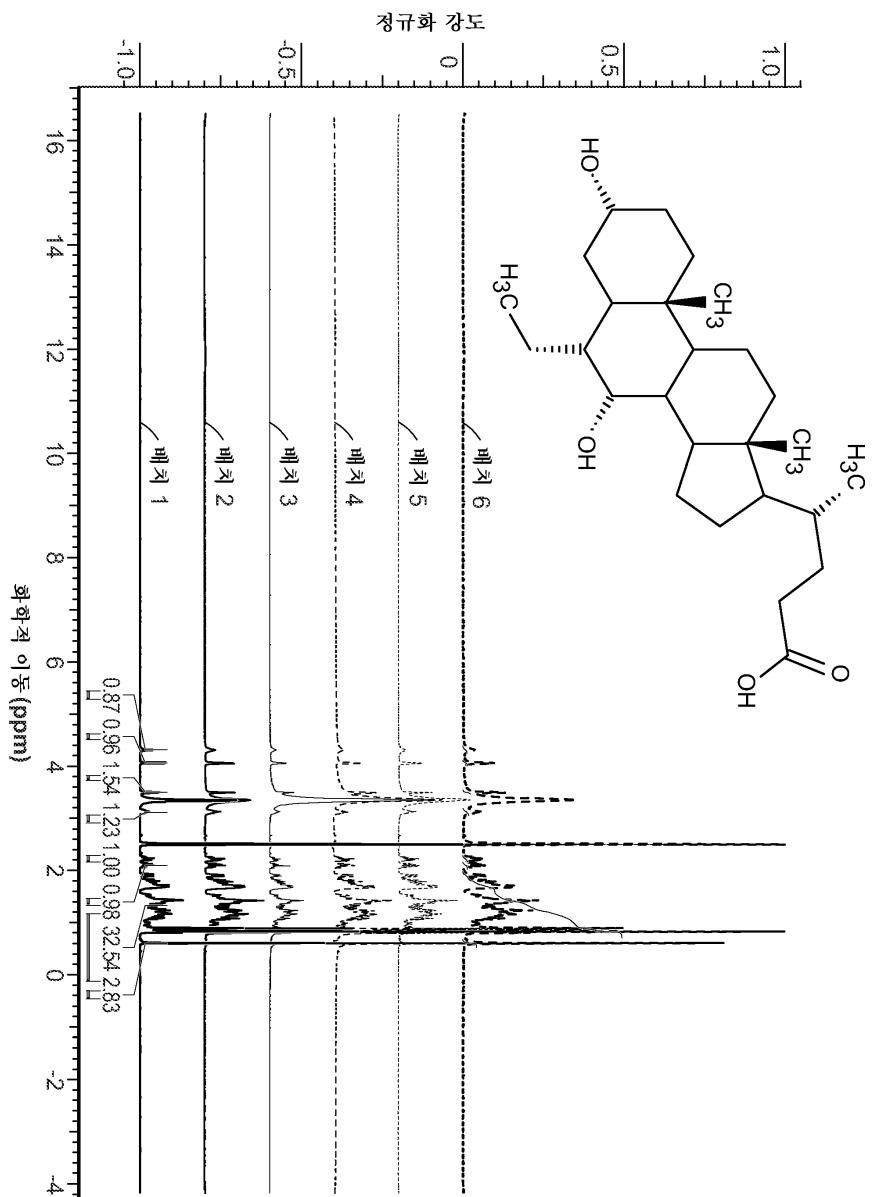
도면11



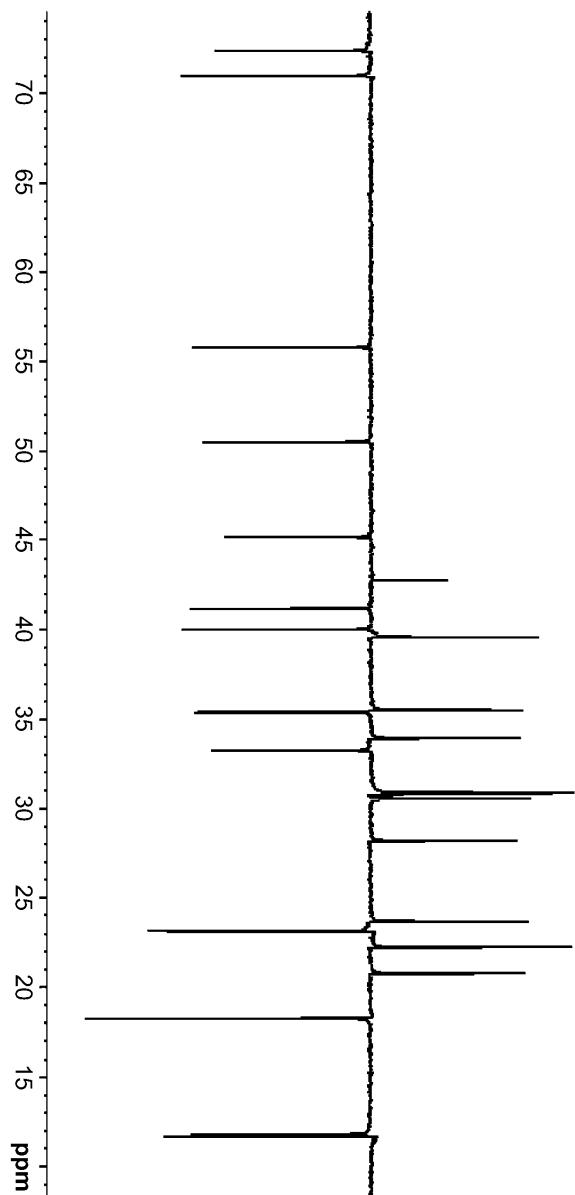
도면12



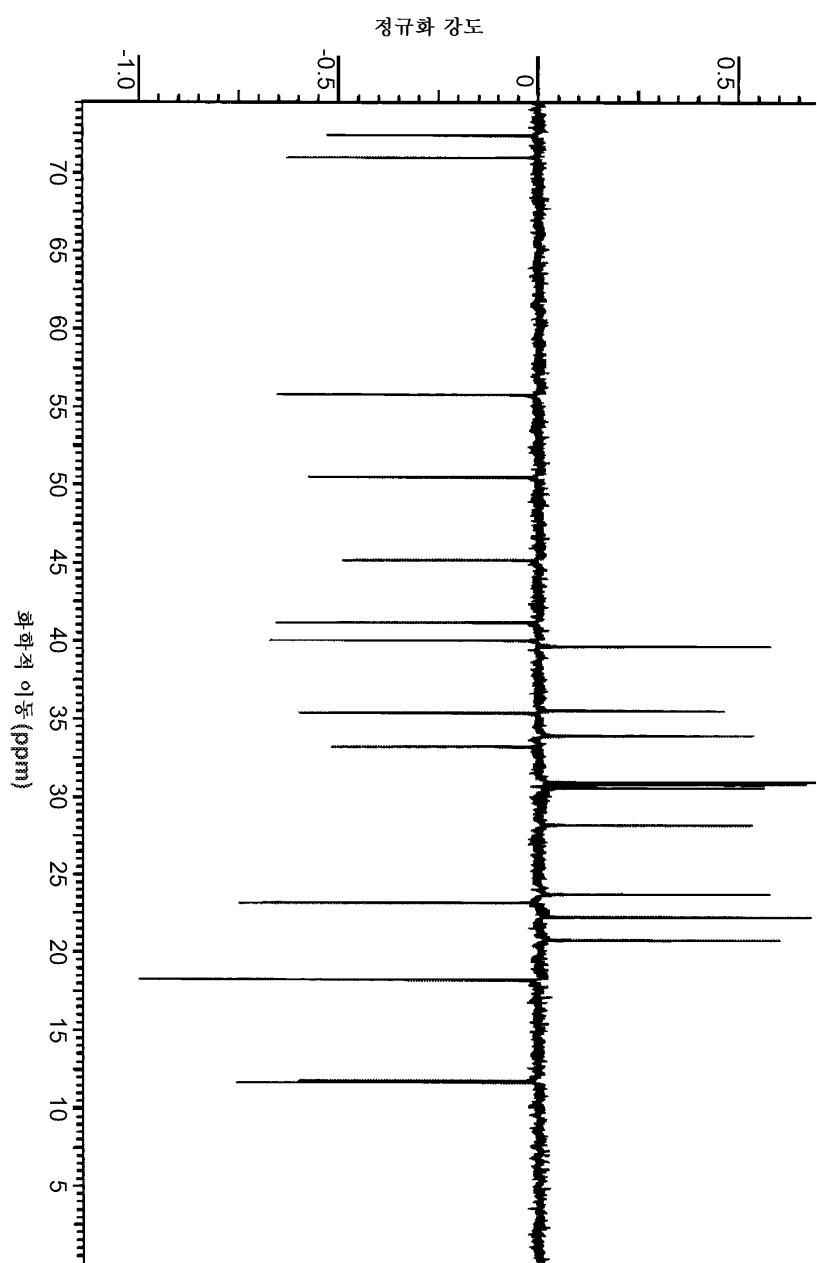
도면13



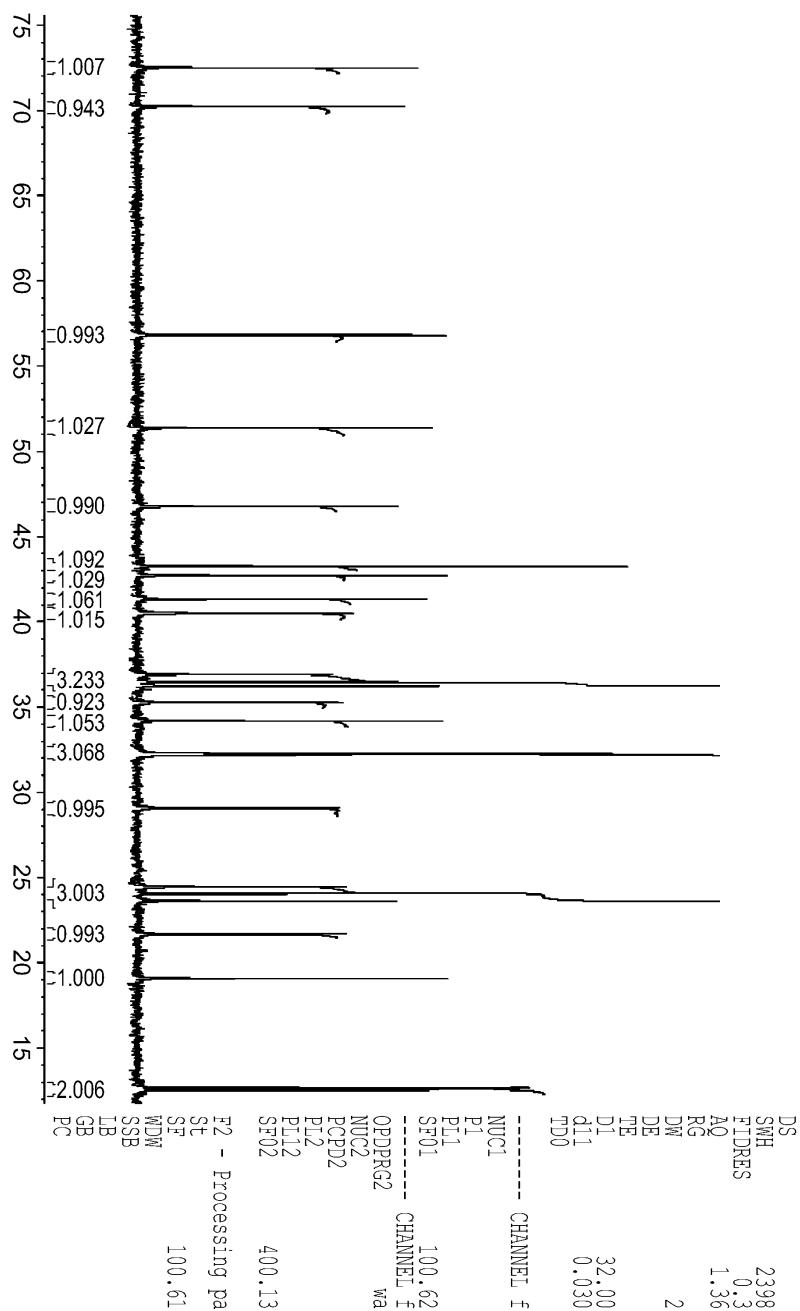
도면14



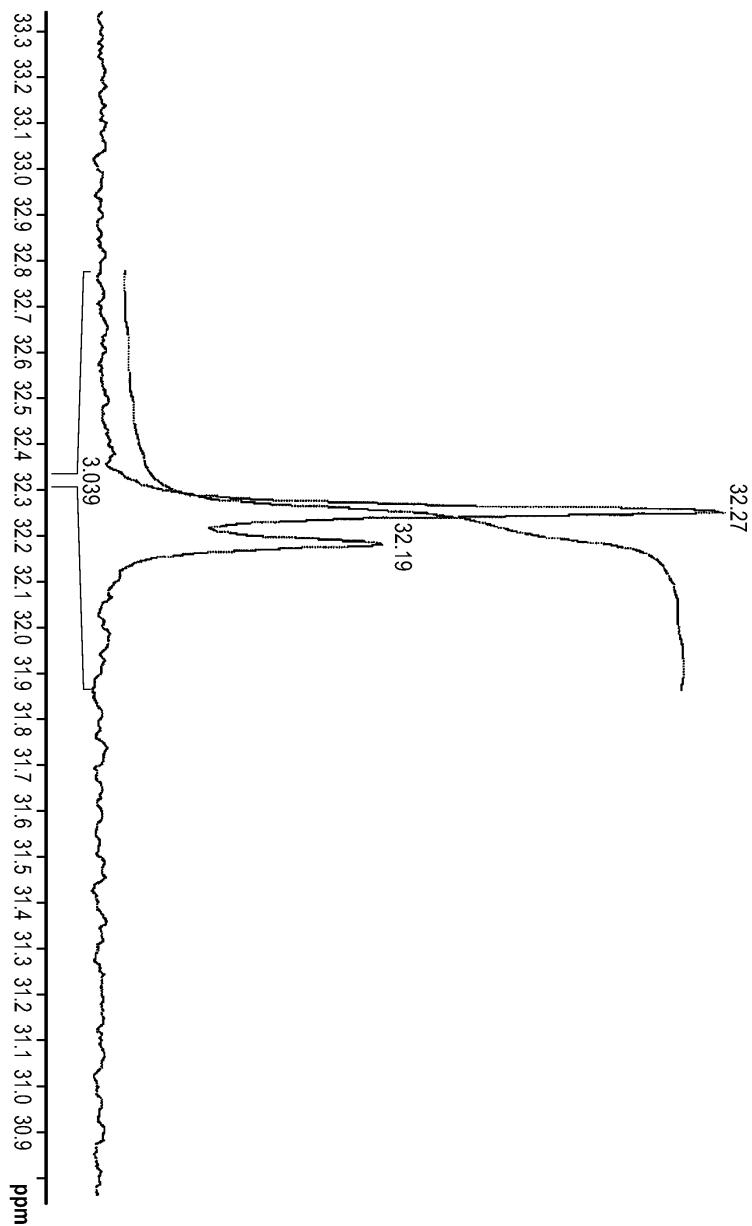
도면15



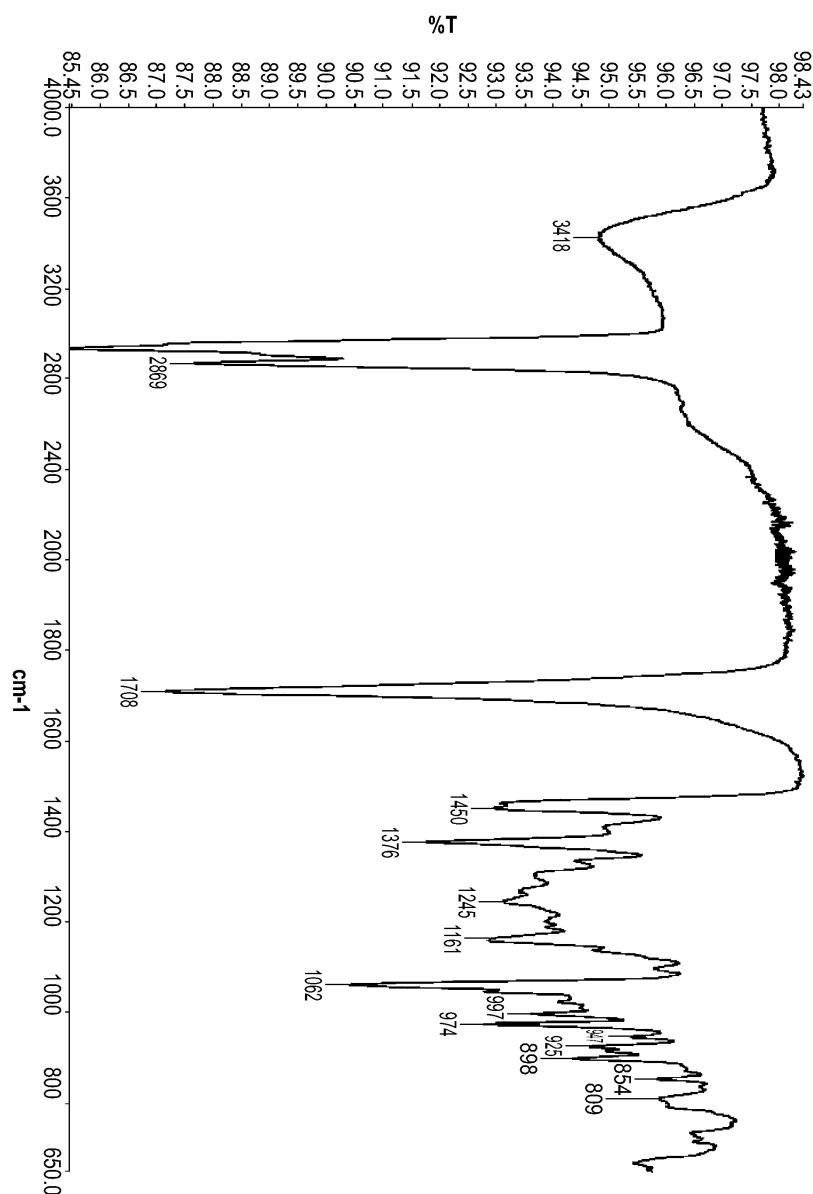
도면16



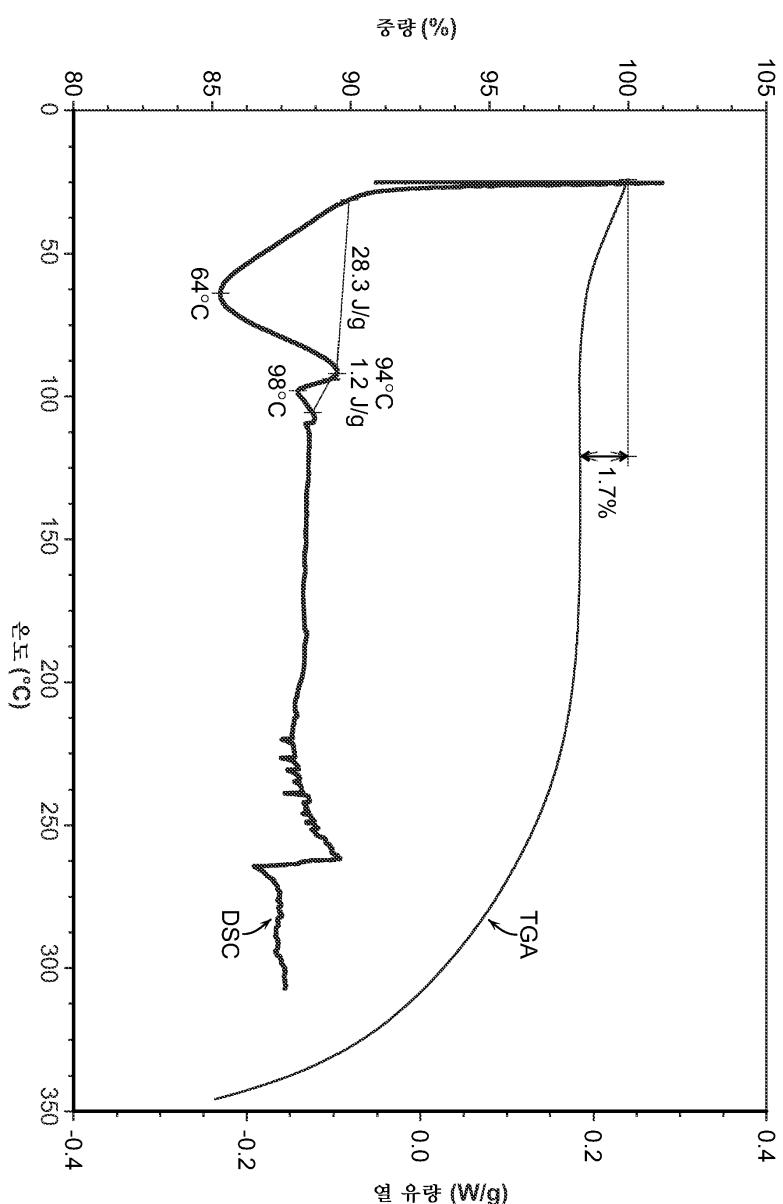
도면17



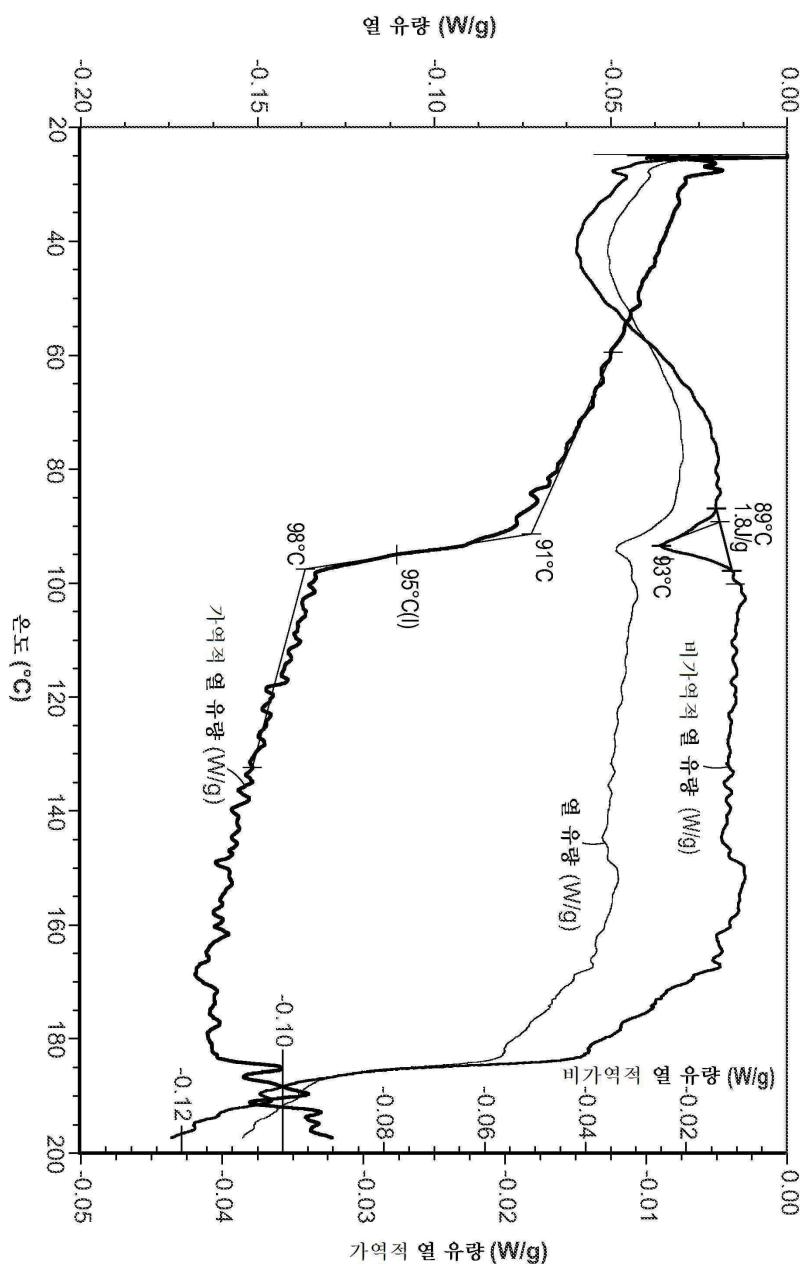
도면18



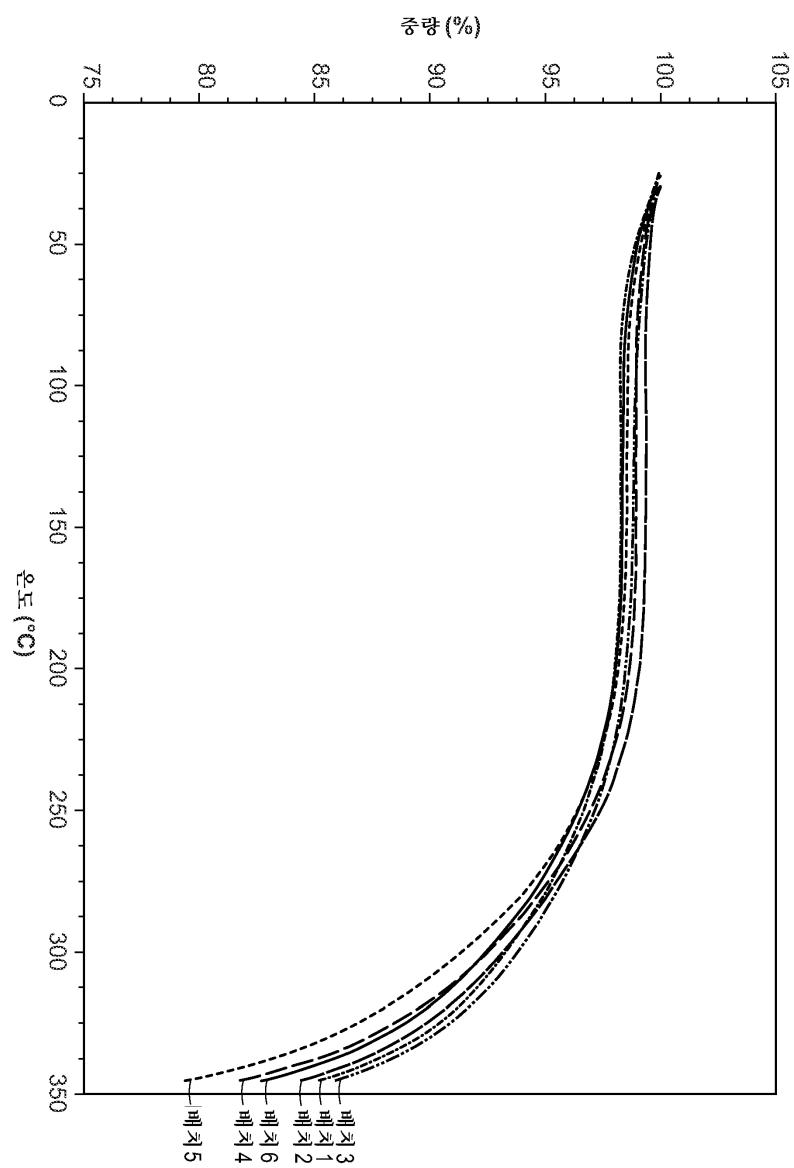
도면19



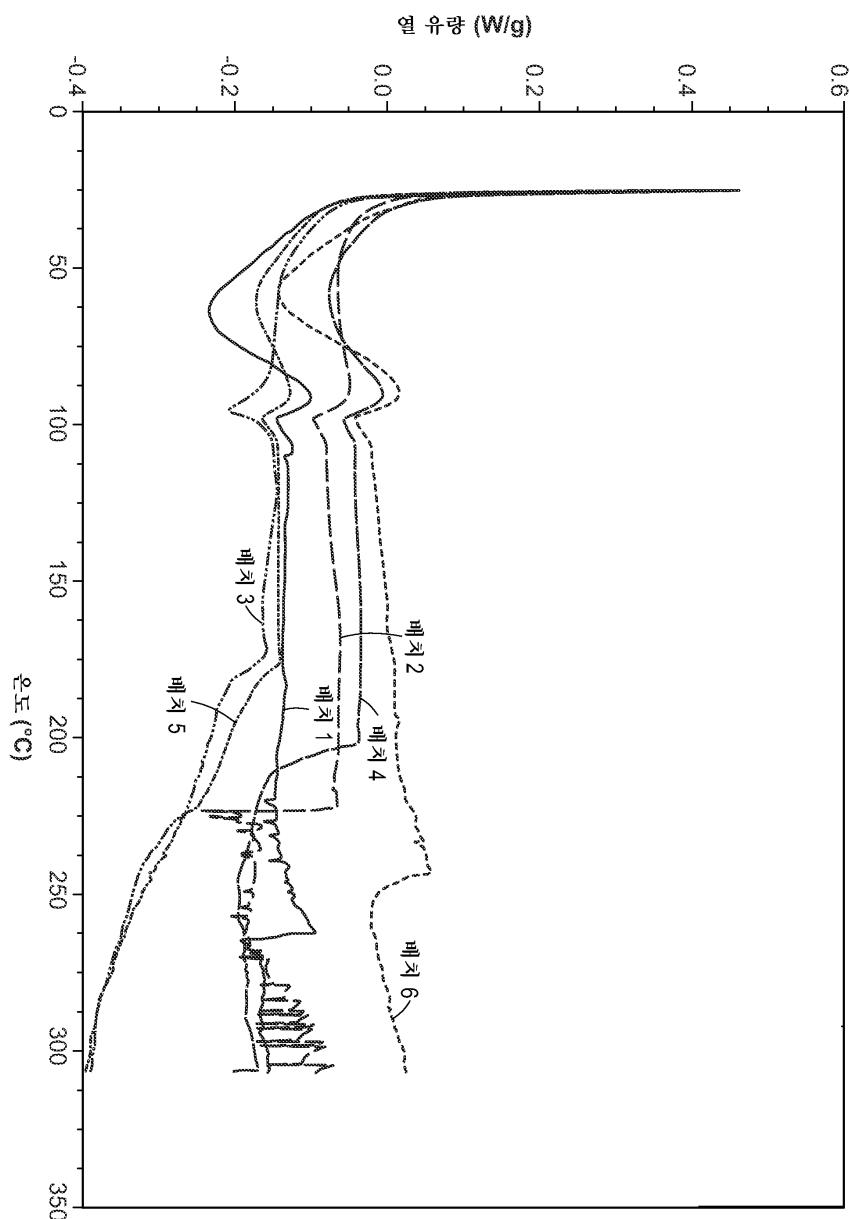
도면20



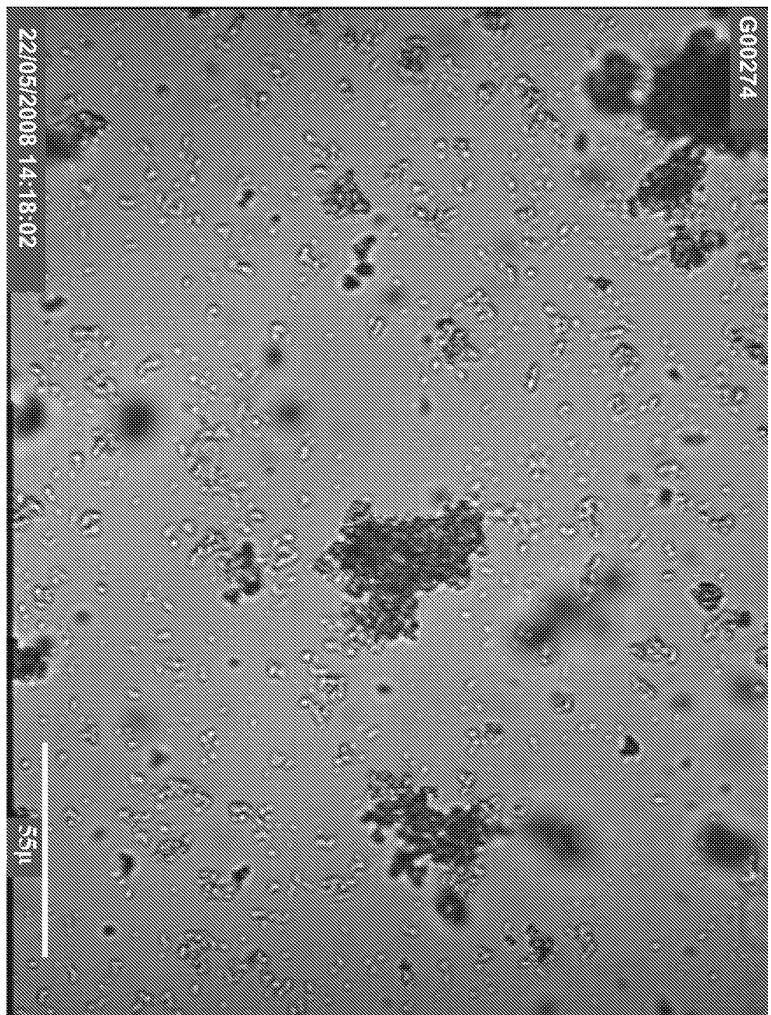
도면21



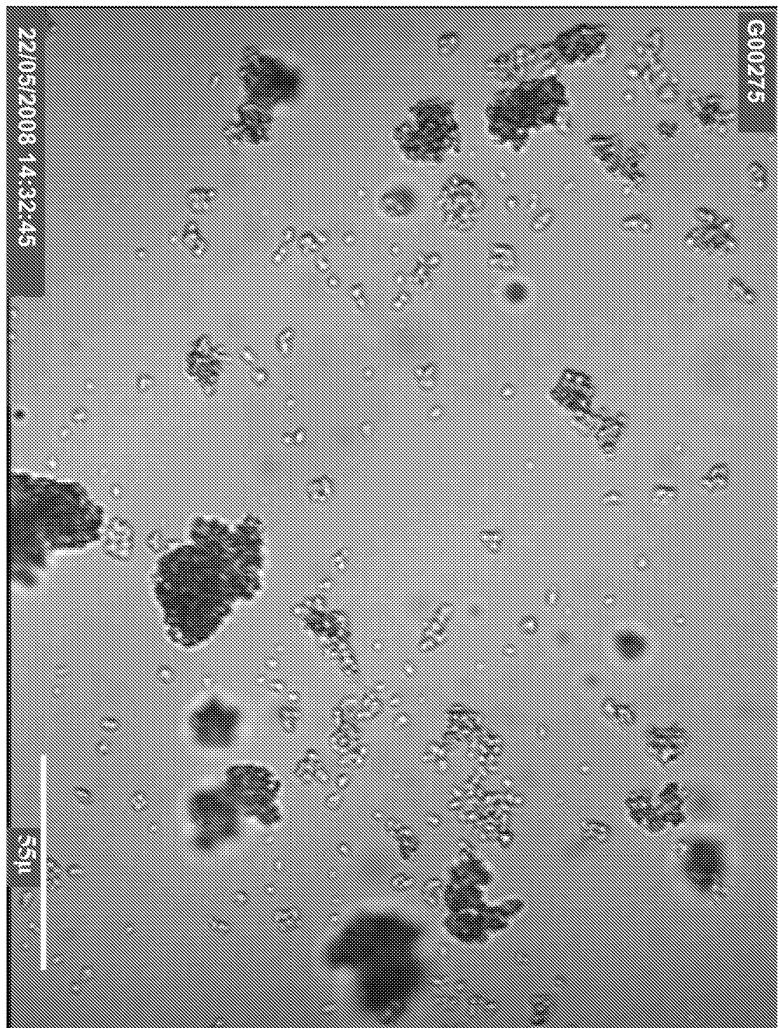
도면22



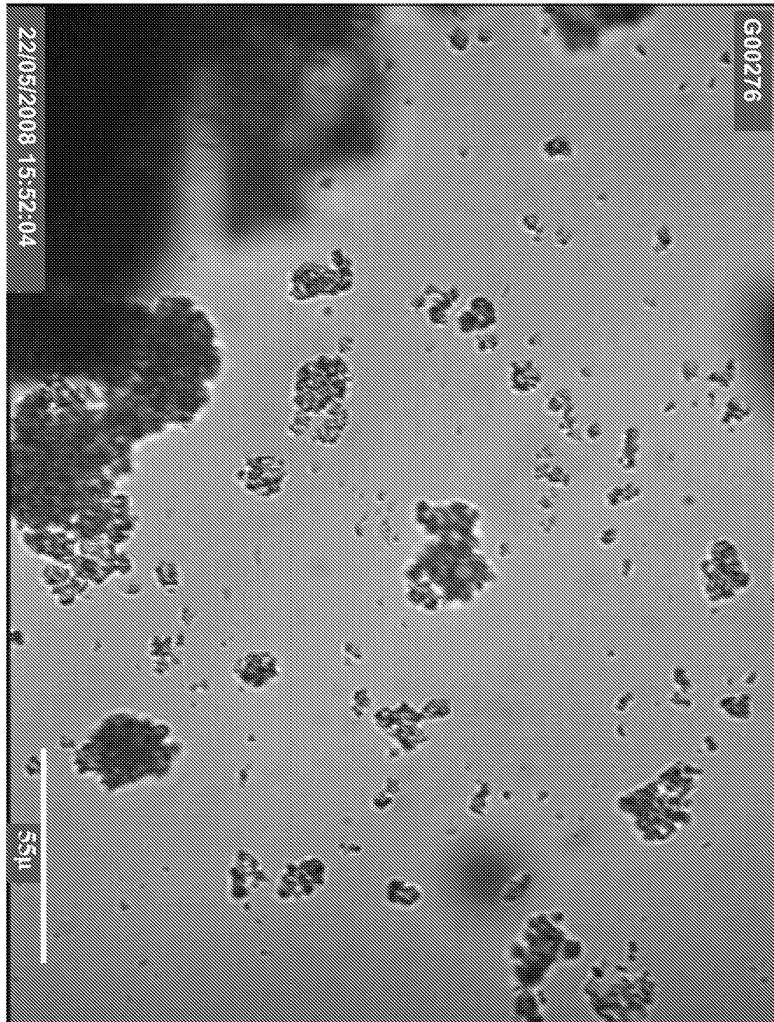
도면23a



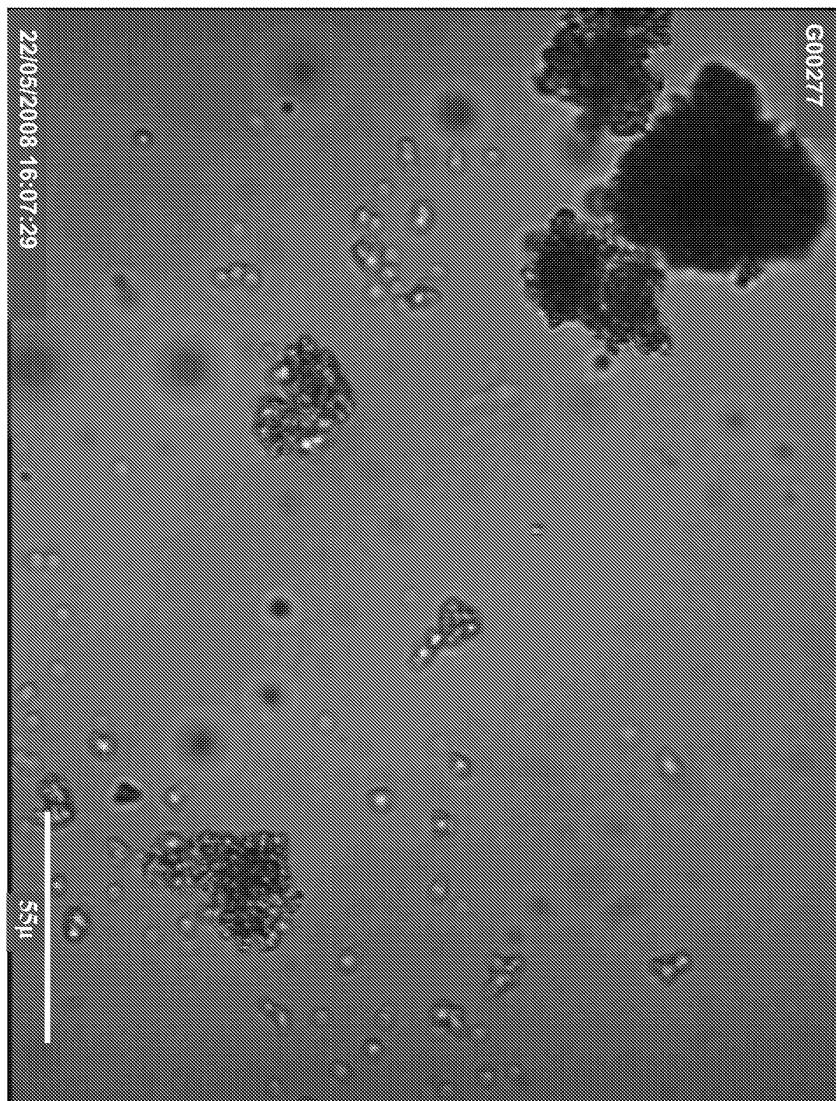
도면23b



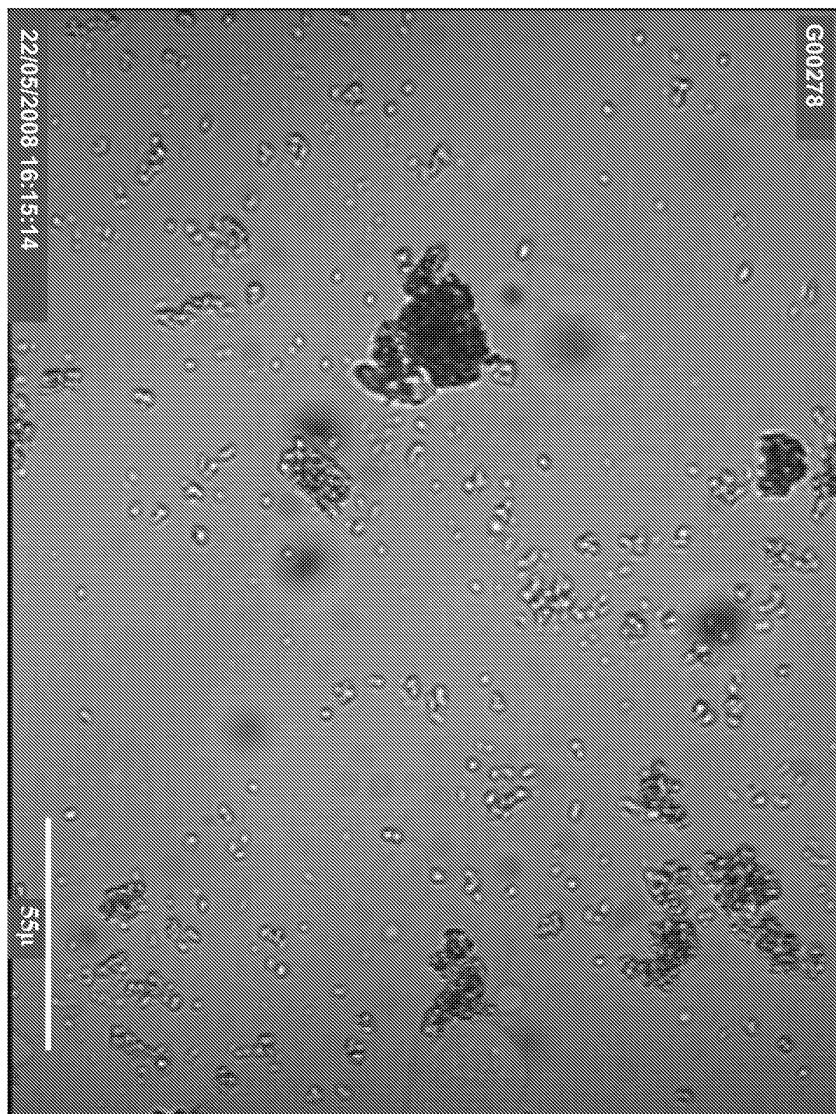
도면23c



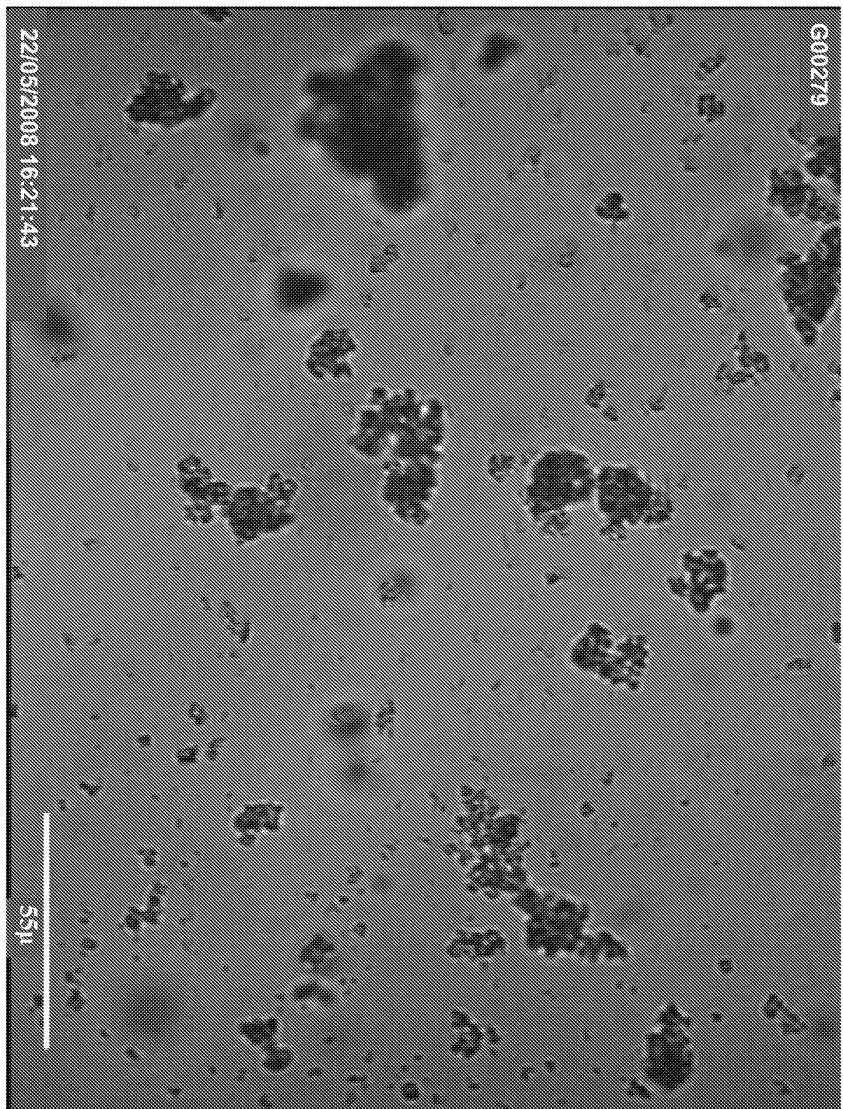
도면23d



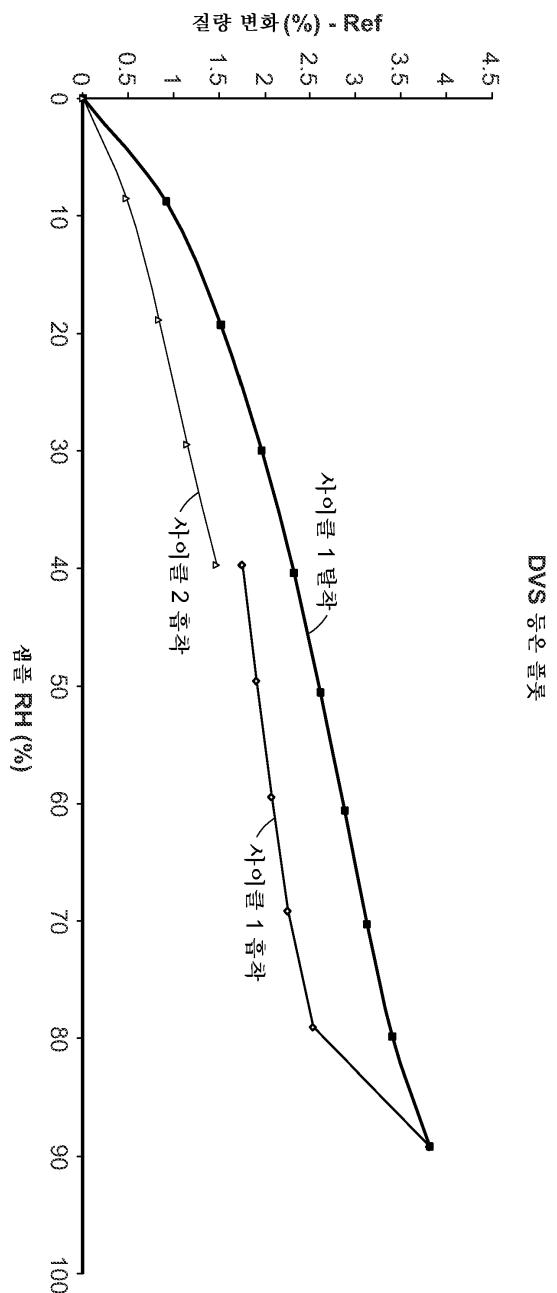
도면23e



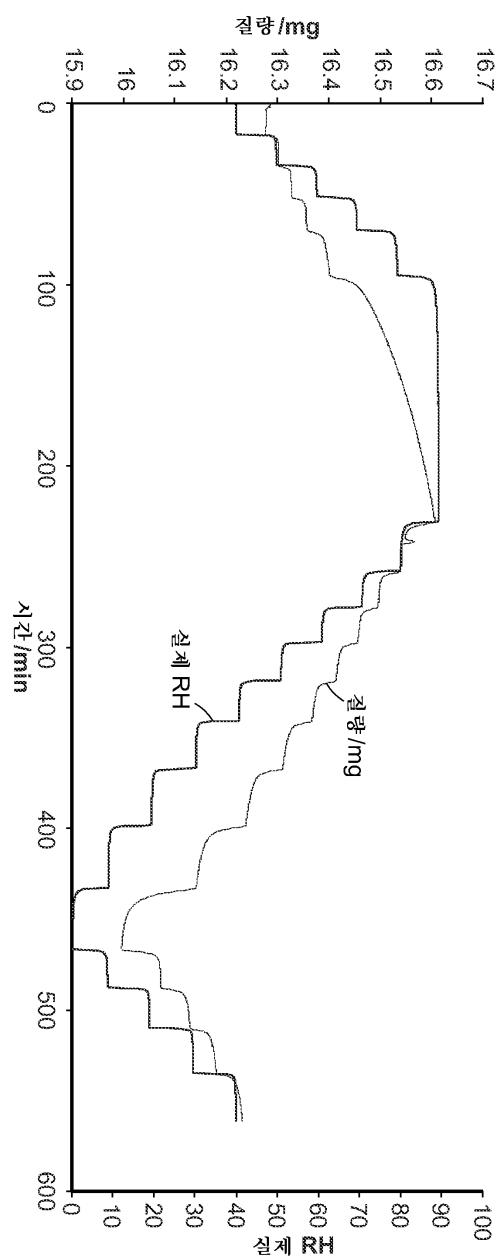
도면23f



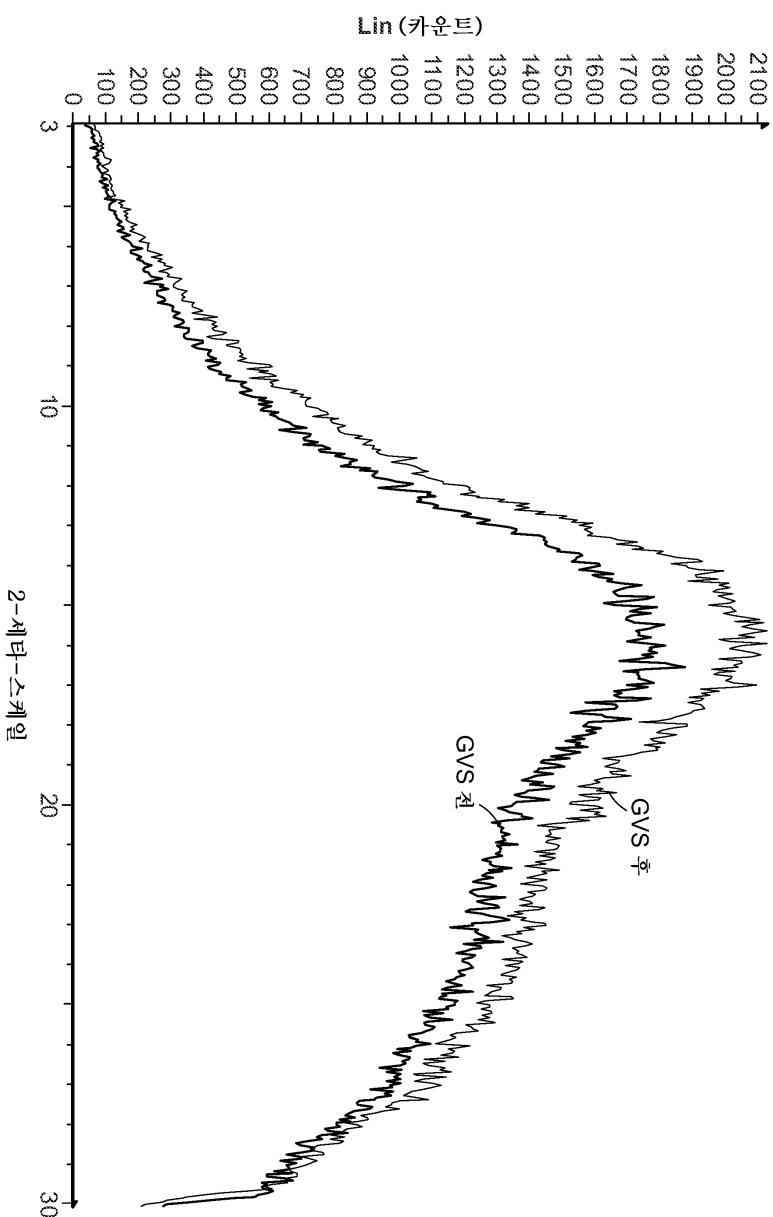
도면24



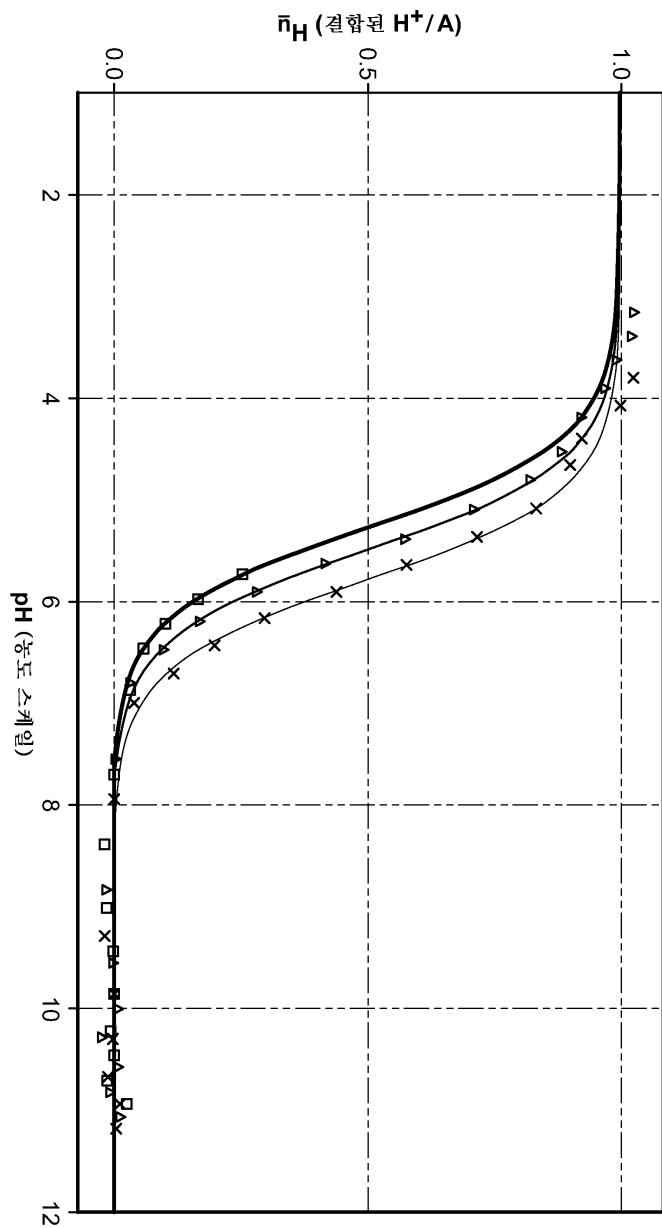
도면25



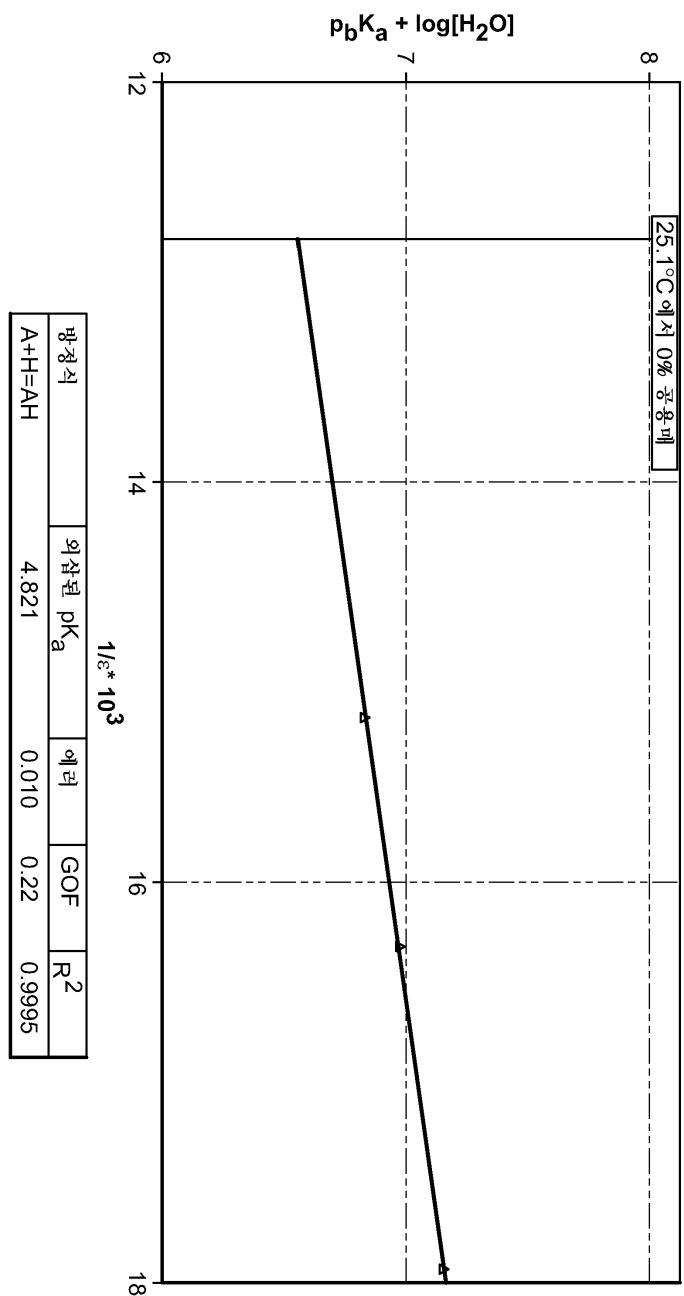
도면26



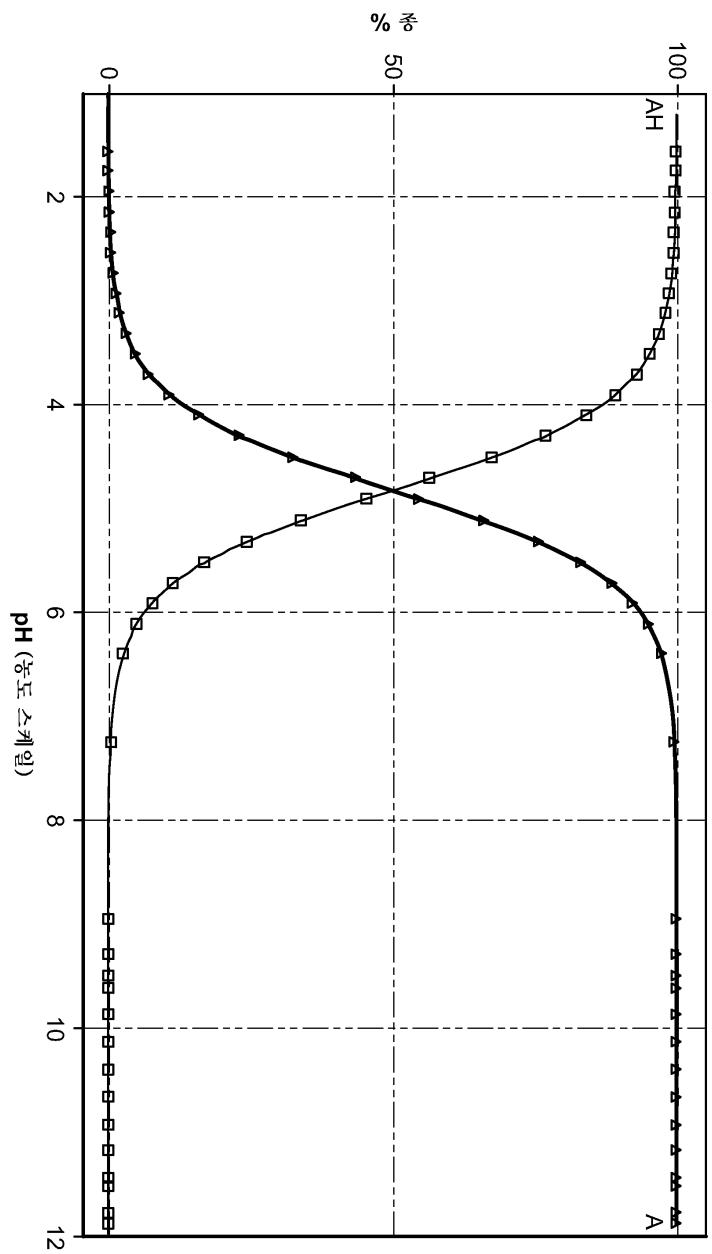
도면27



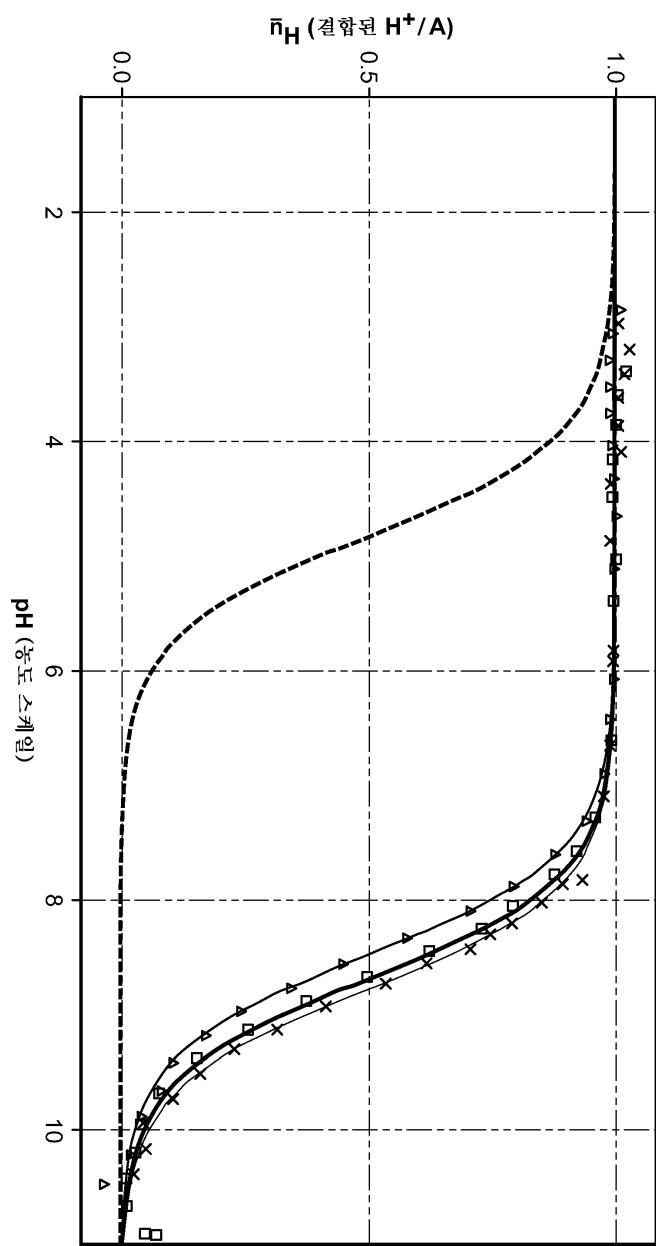
도면28



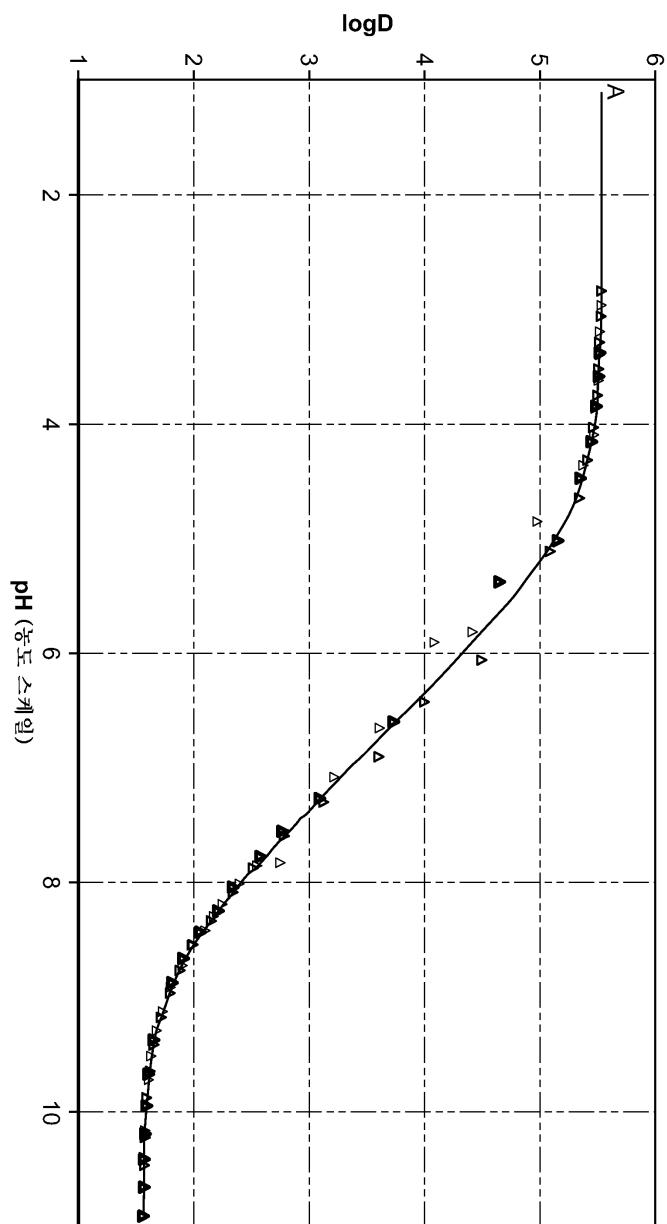
도면29



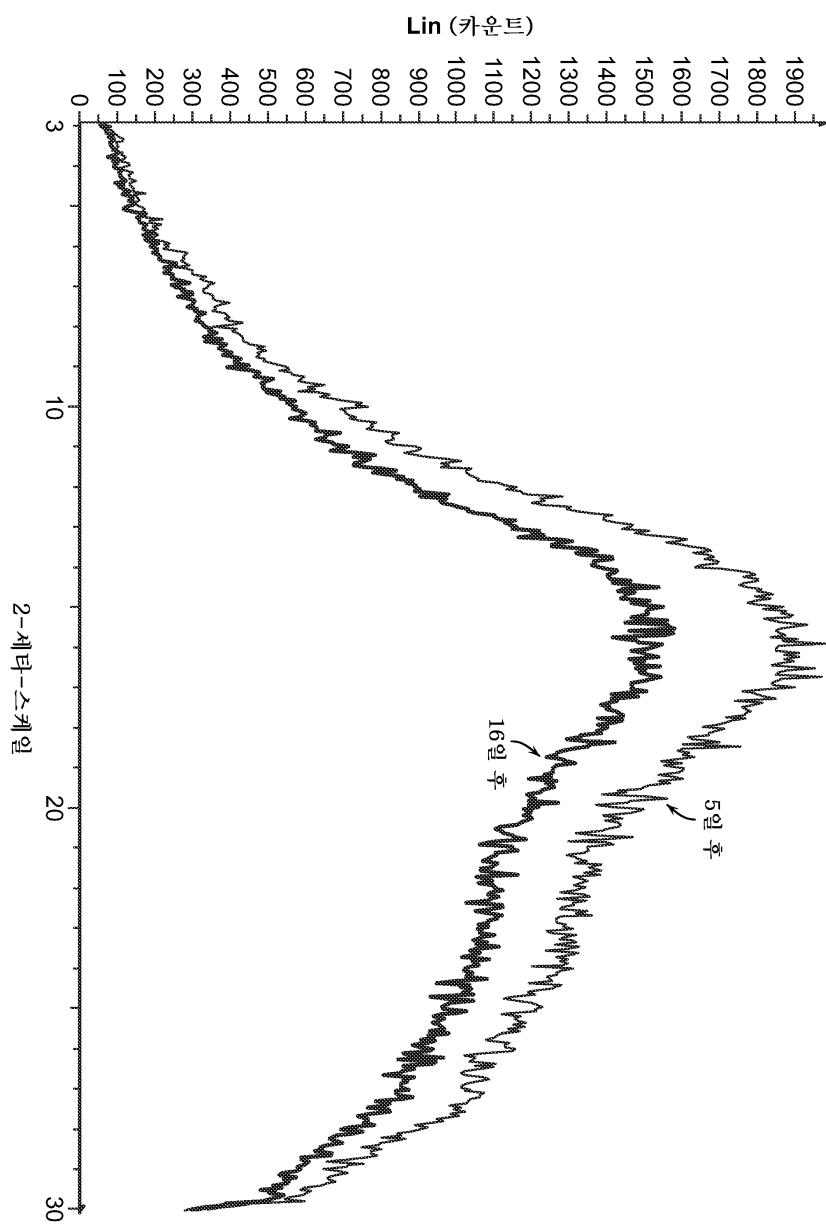
도면30



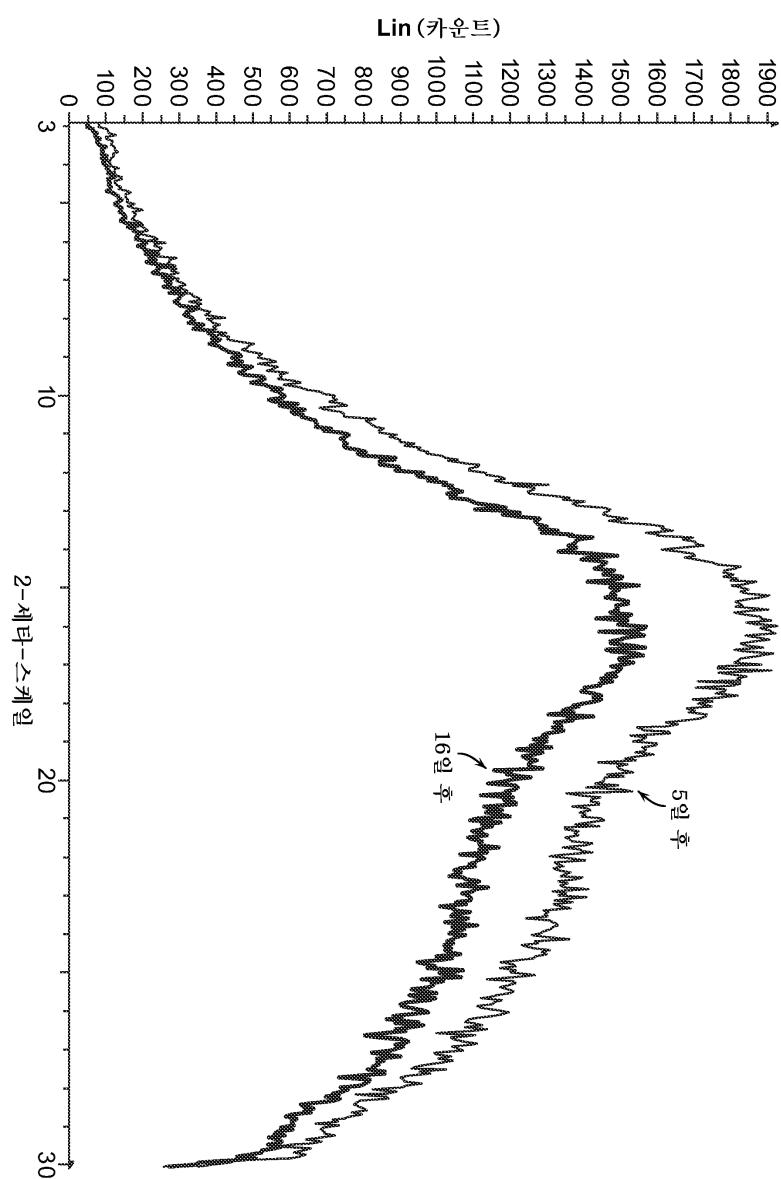
도면31



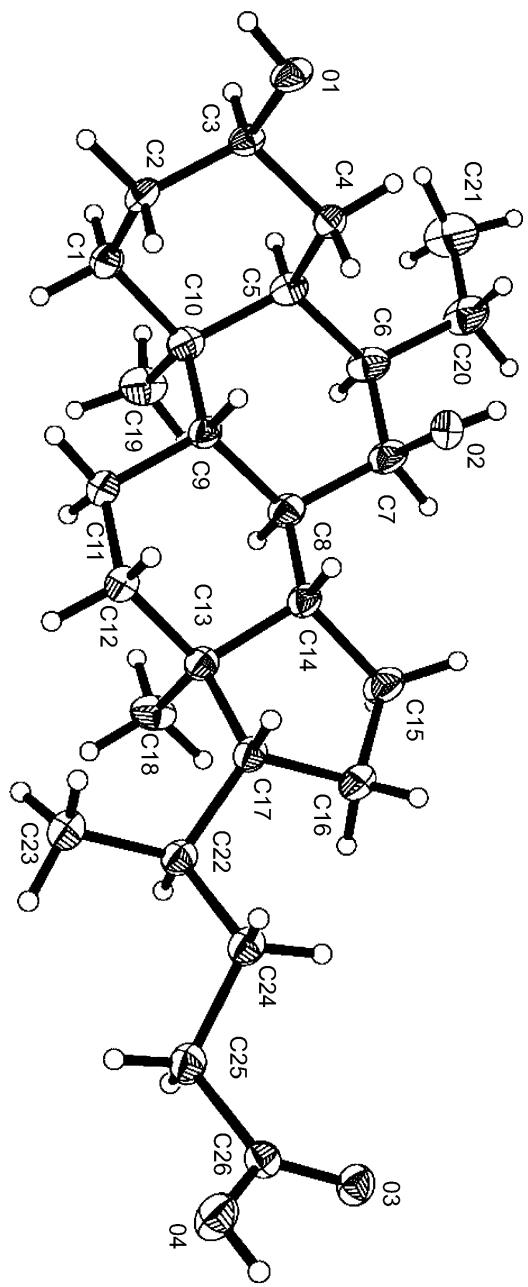
도면32



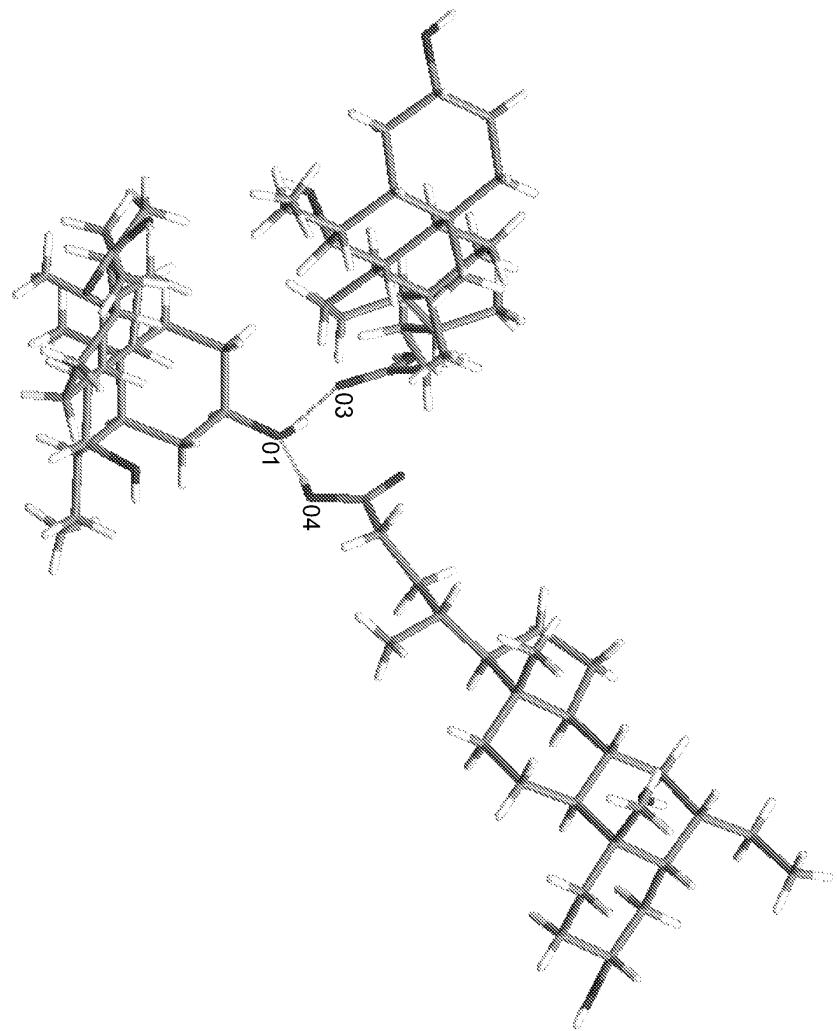
도면33



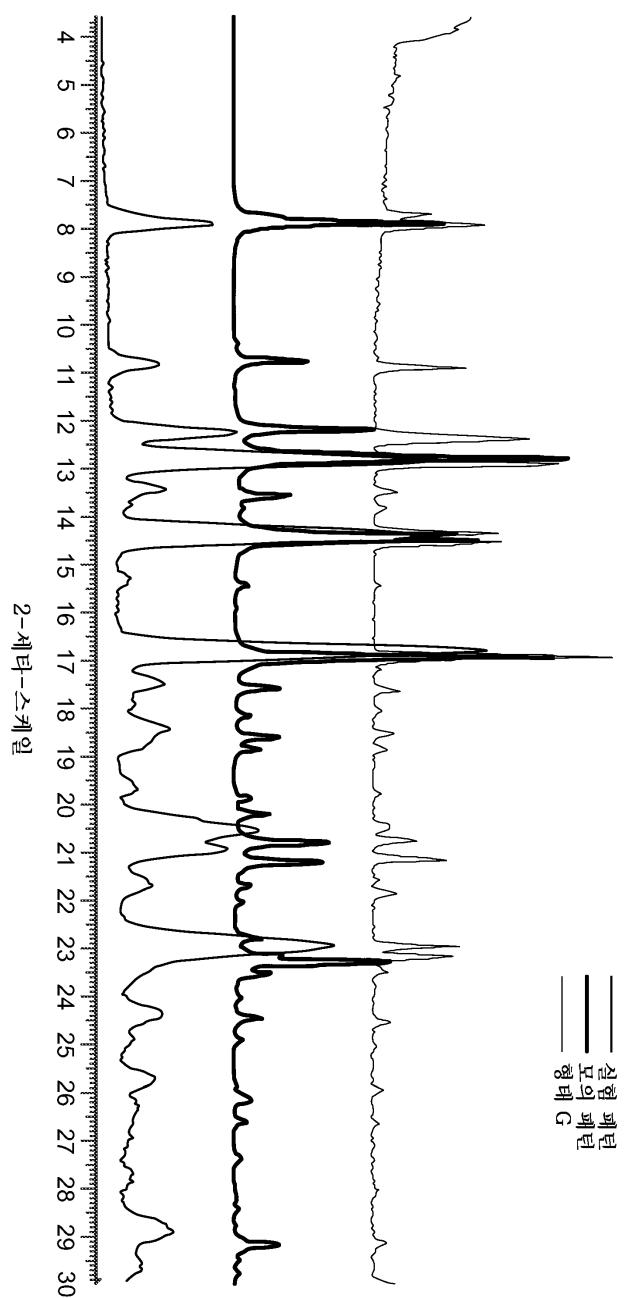
도면34



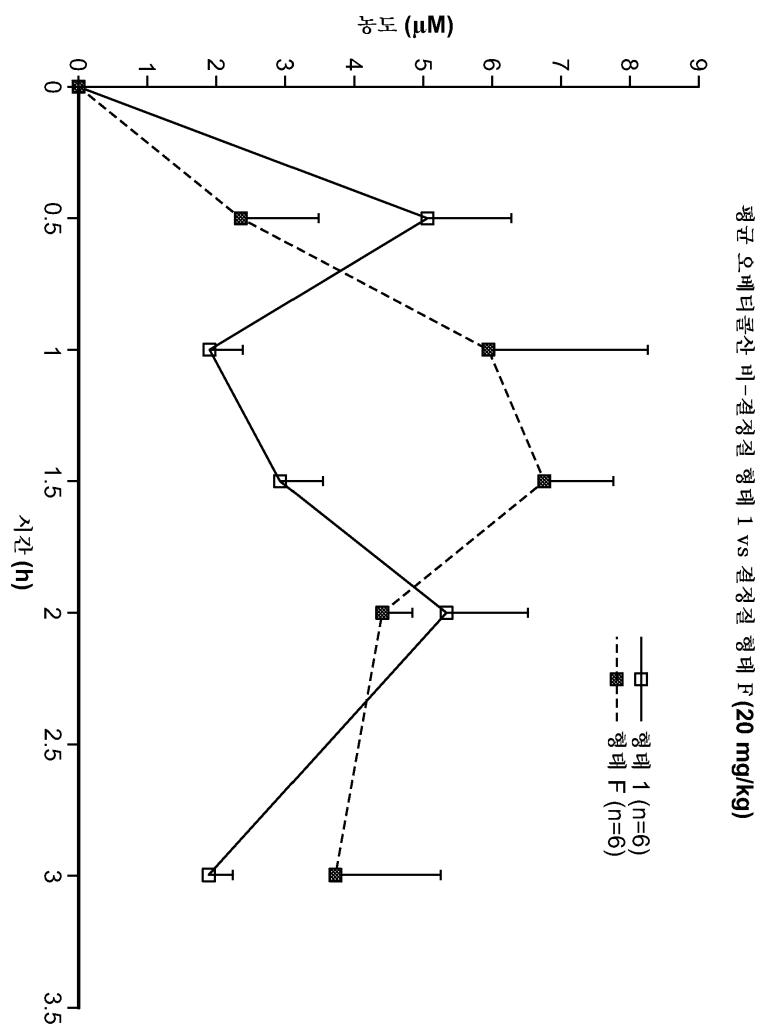
도면35



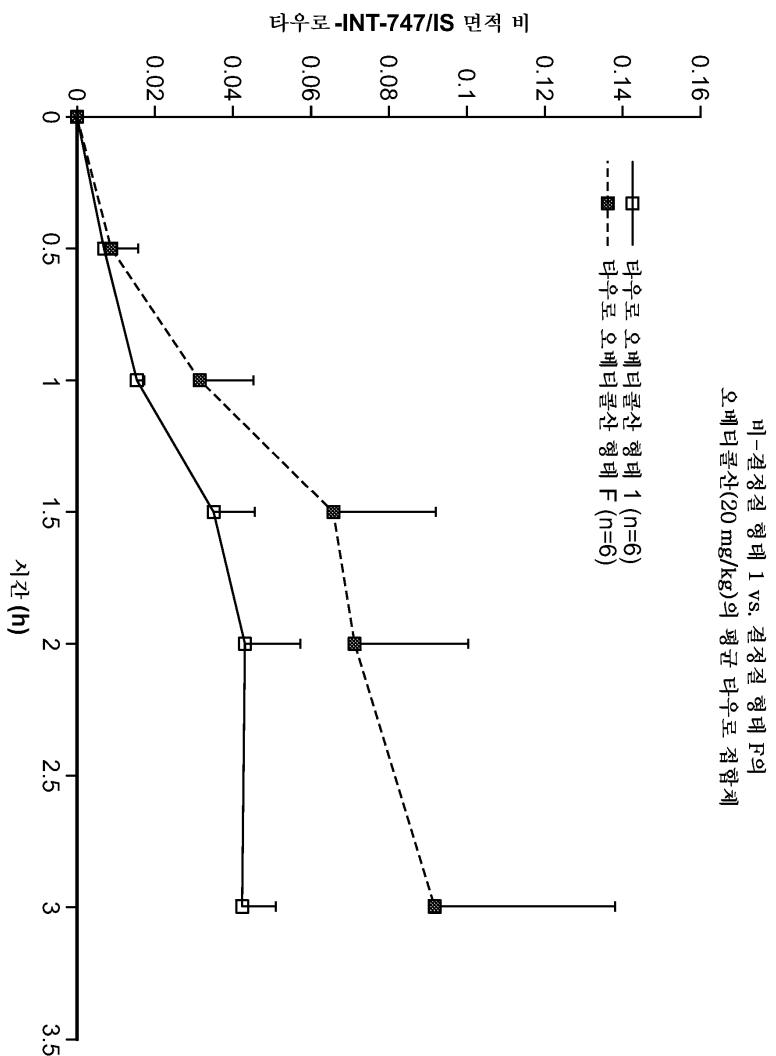
도면36



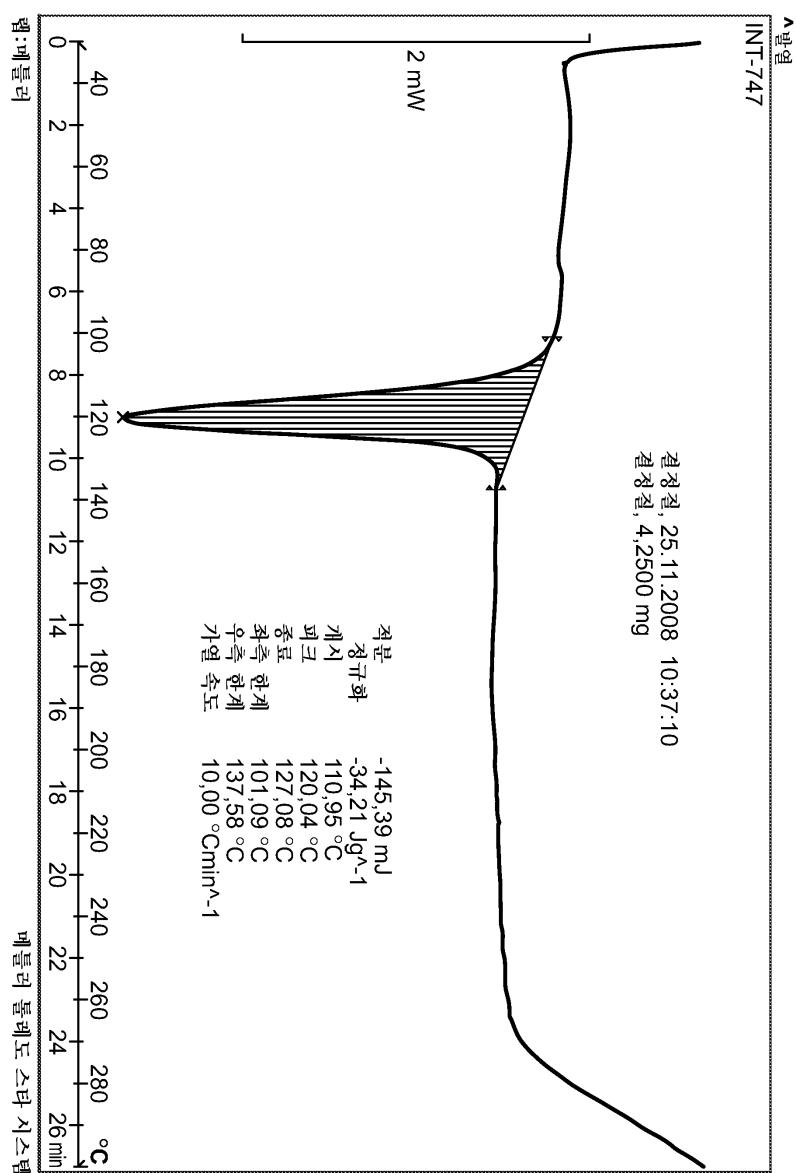
도면37



도면38



도면39



도면40

