

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2014-680

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07D 207/12 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **06.10.2014**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.04.2016**

(Věstník č. 15/2016)

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

(72) Původce:
Iva Obadalová, Praha 6, CZ
Tomáš Chvojka, Poděbrady, CZ
Jan Hrubý, Praha 10, CZ
Ondřej Dammer, Hostivice, CZ
Marcela Tkadlecová, Praha 6, CZ
Josef Reitmajer, Praha 4, CZ
Naděžda Novotná, Praha 4, CZ
Petr Lehnert, Praha 5, CZ

(74) Zástupce:
ROTT, RŮŽIČKA & GUTTMANN
Patentová, známková a advokátní kancelář, Ing.
Jana Fuchsová, Vinohradská 37, 120 00 Praha 2

(54) Název přihlášky vynálezu:
Způsob přípravy glykopyrronium bromidu

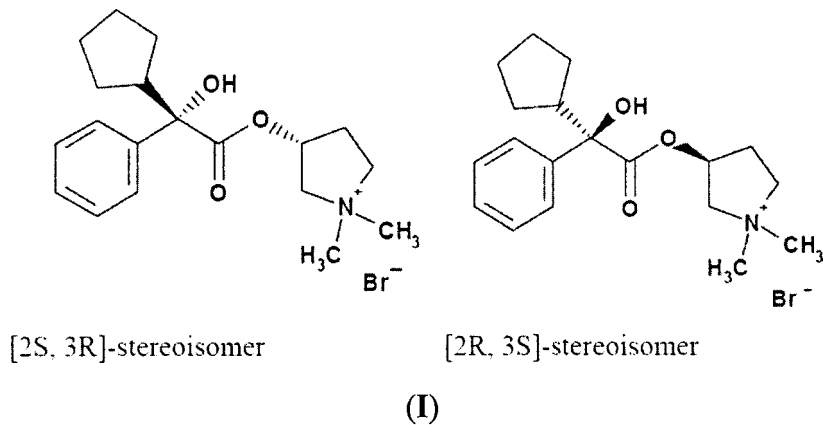
(57) Anotace:
Řešení se týká způsobu přípravy glykopyrronium bromidu ve formě [R,S] a [S,R] diastereoisomerů, přičemž způsob spočívá v odkrystalizování těchto žádoucích diastereoisomerů ze směsi diastereoisomerů [R,S], [S,R], [R,R] a [S,S] dvěma nebo více řízenými krystalizacemi z roztoku rozpouštědla voleného ze skupiny 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, *terc*-butanol.

CZ 2014 - 680 A3

Způsob přípravy glykopyrronium bromidu

Oblast techniky

Vynález se týká nového způsobu přípravy glykopyrronium bromidu, (3*RS*)-3-[(2*SR*)-(2-cyklopentyl-2-hydroxy-2-fenylacetyl)oxy]-1,1-dimethylpyrrolidinium bromidu (I). Konkrétně se jedná o rozdělení směsi čtyř izomerů krystalizací z nových rozpouštědel, přičemž žádoucí je směs [2*S*, 3*R*]- a [2*R*, 3*S*]-izomerů.



Glykopyrronium bromid se vyznačuje anticholinergními bronchodilatačními účinky. To znamená, že rozšiřuje dýchací cesty tím, že blokuje určité receptory ve svalových buňkách v plicích, tzv. muskarinové receptory, které kontrolují stahy svalů. Po inhalaci léčivé látky, obsahující glykopyrronium bromid, dochází k uvolnění svalů dýchacích cest, což napomáhá udržet dýchací cesty průchozí a umožňuje pacientovi snáze dýchat. Glykopyrronium bromid je indikován jako inhalační anticholinergikum u spolupracujících nemocných s diagnózou CHOPN (chronická obstrukční plicní nemoc). CHOPN je definována jako preventabilní a léčitelné onemocnění, jež je charakterizováno perzistujícím omezením průtoku vzduchu v průduškách (bronchiální obstrukcí), která obvykle progreduje a je spojena se zesílenou zánětlivou odpovědí dýchacích cest na škodlivé částice nebo plyny. Hlavním cílem léčby CHOPN je zlepšení současné kontroly, tj. odstranění příznaků, zlepšení tolerance fyzické námahy, zlepšení zdravotního stavu a snížení budoucího rizika, tj. prevence a léčba exacerbací, prevence progresse nemoci a snížení mortality.



Dosavadní stav techniky

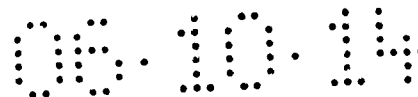
V patentu EP 1 856 041B1 je popsán postup přípravy směsi dvou možných diastereomerních párů glykopyrroonium bromidu, $[R,S]$ a $[S,R]$ pár a $[R,R]$ a $[S,S]$ pár. Rozdělení těchto dvou diastereomerních párů glykopyrroonium bromidu krystalizací je zde popsáno ze směsi rozpouštědel, methanolu a methylethylketonu, v poměrech pohybujících se v rozmezí 1:5 až 1:8. Z patentu vyplývá, že při použití těchto rozpouštědel je k dosažení vyhovující optické čistoty produktu potřeba trojnásobná krystalizace, přičemž celkový výtěžek těchto tří krystalizací je zde uveden 33%. Podle patentových údajů by se měl produkt vyznačovat velikostí částic maximálně do 100 mikrometrů, které se následně výhodně mikronizují pro použití do lékové formy, nejsou zde však uvedeny žádné bližší informace k distribuci velikosti částic, použité analytické metodě atd. Reprodukci postupu přípravy podle patentu však bylo zjištěno, že velikost částic získaných touto metodou, se pohybuje v rozmezí 15 až 240 μm .

Podstata vynálezu

Podstatou tohoto vynálezu je proces krystalizace, při kterém je s vysokým výtěžkem získán žádoucí diastereomerní pár, $[R,S]$ a $[S,R]$, glykopyrroonium bromidu o vysoké diastereomerní čistotě. Produkt se dále vyznačuje úzkou distribucí částic, které se v některých provedeních dají s výhodou použít pro přípravu lékové formy bez potřeby následné mikronizace.

Podrobný popis vynálezu

Podstatou tohoto vynálezu je proces krystalizace, kdy se ze směsi dvou diastereomerních párů glykopyrroonium bromidu, $[R,S]$ a $[S,R]$ pár a $[R,R]$ a $[S,S]$ pár, odkrystaluje pomocí vhodného rozpouštědla žádoucí $[R,S]$ a $[S,R]$ pár. Jako vhodné rozpouštědlo byl použit 2-propanol, 1-propanol, 1-butanol a *terc.*butanol. Ve výhodném provedení podle tohoto vynálezu se směs dvou diastereomerních párů glykopyrroonium bromidu rozpustí za horka ve vybraném rozpouštědle a roztok se následně ochladí, přičemž žádoucí pár $[R,S]$ a $[S,R]$ z rozpouštědla vykryštaluje. Toto ochlazení je výhodné provádět řízeným teplotním gradientem, který zajišťuje vyhovující distribuci velikosti částic. Oproti použití soustavy rozpouštědel (rozpouštědlo - antirozpouštědlo) je tedy výhodné použít pouze jedno rozpouštědlo, kdy se pak lépe kontroluje teplotní gradient chlazení a řídí se tak samotná krystalizace.



V patentu EP1 856 041B1, při použití methanolu a 2-butanonu jako antirozpouštědla, jsou popsány tři rekrystalizace potřebné k dosažení vyhovující optické čistoty, přičemž celkový výtěžek těchto tří krystalizací je zde uveden 33 %. Velikost částic, získaných touto metodou, se pohybuje v rozmezí 15 až 240 μm .

V případě krystalizací z 2-propanolu, 1-propanolu, 1-butanolu a *tert.*butanolu stačí k dosažení vyhovující diastereomerní čistoty (ne méně než 99,9%) pouze dvě krystalizace a celkový výtěžek se pohybuje v rozmezí 40 až 45 %. V případě 2-propanolu se získají částice o velikosti 8 až 170 μm , v případě 1-propanolu částice o velikosti 2 až 11 μm , v případě 1-butanolu se získají částice o velikosti 2 až 14 μm a v případě *tert.*butanolu částice o velikosti 2 až 30 μm . V případě 1-propanolu, 1-butanolu vznikají krystaly s úzkou distribucí částic, pohybující se pod 20 μm , které jsou s výhodou použitelné pro lékovou formu bez potřeby mikronizace. Při všech krystalizacích byl získán glykopyrroonium bromid v krystalické formě A, charakterizovaný spektrem XRPD na obr. 1 a uhlíkovým NMR spektrem v pevném stavu na obr. 2.

Přehled obrázků

Obr. 1: XRPD záznam krystalického glykopyrroonium bromidu připraveného podle příkladu 3

Obr. 2: ssNMR záznam krystalického glykopyrroonium bromidu připraveného podle příkladu 3

Obr. 3: Záznam distribuce velikosti částic z mikroskopu glykopyrroonium bromidu překrystalovaného ze směsi methanol - 2-butanon (příklad 1)

Obr. 4: Záznam distribuce velikosti částic z mikroskopu glykopyrroonium bromidu překrystalovaného z 2-propanolu (příklad 3)

Obr. 5: Záznam distribuce velikosti částic z mikroskopu glykopyrroonium bromidu překrystalovaného z 1-propanolu (příklad 4)

Obr. 6: Záznam distribuce velikosti částic z mikroskopu glykopyrroonium bromidu překrystalovaného z 1-butanolu (příklad 5)

Obr. 7: Záznam distribuce velikosti částic z mikroskopu glykopyrroonium bromidu překrystalovaného z *tert.*butanolu (příklad 6)

Obr. 8: Fotografický snímek částic glykopyrroonium bromidu překrystalovaného ze směsi methanol - 2-butanon z mikroskopu (příklad 1)

Obr. 9: Fotografický snímek částic glykopyrroonium bromidu překrystalovaného z 2-propanolu z mikroskopu (příklad 3)

Obr. 10: Fotografický snímek částic glykopyrroonium bromidu překrystalovaného z 1-propanolu z mikroskopu (příklad 4)



Příklady provedení

Výchozí surová směs dvou diastereomerních párů glykopyrroonium bromidu pro rekrystalizace byla připravena podle patentu EP 1 856 041B1. Chemická čistota takto připravené směsi byla 98,1 % (HPLC). Směs obsahovala $[R,S]$ a $[S,R]$ pár a $[R,R]$ a $[S,S]$ pár v poměru 60 : 40 (CE).

Příklad 1 - referenční

Rekrystalizace glykopyrroonium bromidu z methanolu a 2-butanonu podle patentu EP1856041B1, krok 3

První rekrystalizace:

Surová směs glykopyrroonium bromidu (4 g, 10,1 mmol) byla zahřívána ve 3,5 ml methanolu a 24 ml 2-butanonu k 80 °C. Následně bylo přidáno dalších 36 ml 2-butanonu a zahříváno 30 minut při 80 °C. Pak byla směs ochlazována tempem 30 °C / hod na konečných -10 °C. Vzniklé krystaly byly odsáty a promyty chladným 2-butanonem (12 ml). Bylo získáno 1,9 g produktu, chemická čistota 99,1 % (HPLC), diastereomerní čistota 94,2 % (CE).

Druhá rekrystalizace:

Produkt z první rekrystalizace (1,9 g, 4,8 mmol) byl zahříván ve 2,8 ml methanolu a 12,2 ml 2-butanonu k 80 °C. Následně bylo přidáno dalších 17,6 ml 2-butanonu a zahříváno 30 minut při 80 °C. Pak byla směs ochlazována tempem 30 °C / hod na konečných -10 °C. Vzniklé krystaly byly odsáty a promyty chladným 2-butanonem (8 ml). Bylo získáno 1,4 g produktu, chemická čistota 99,9 % (HPLC), diastereomerní čistota 99,7 % (CE).

Třetí rekrystalizace:

Produkt z druhé rekrystalizace (1,4 g, 3,5 mmol) byl zahříván v 1,1 ml methanolu a 8,7 ml 2-butanonu k 80 °C. Následně bylo přidáno dalších 12,4 ml 2-butanonu a zahříváno 30 minut při 80 °C. Pak byla směs ochlazována tempem 30 °C / hod na konečných -10 °C. Vzniklé krystaly byly odsáty a promyty chladným 2-butanonem (5 ml). Bylo získáno 1,3 g (celkový výtěžek tří krystalizací 33 %) čistě bílé krystalické látky s chemickou čistotou 99,95 % (HPLC) a diastereomerní čistotou 99,9 % (CE). ^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 1,24 (m, 1H); 1,50-1,72 (m, 7H); 2,13 (m, 1H); 2,69 (m, 1H); 3,02 (s, 3H); 3,15 (qui, $J = 8,5$ Hz, 1H); 3,18 (s, 3H); 3,56 (m, 2H); 3,73 (d, $J = 13,9$ Hz, 1H); 3,83 (dd, $J = 13,9$ Hz, $J = 6,0$ Hz, 1H); 5,50 (m, 1H); 7,38 (m, 1H); 7,45 (m, 2H); 7,63 (m, 2H). ^{13}C NMR (125,8 MHz, D_2O): δ 28,4; 28,7; 28,8; 29,3; 32,6; 47,6; 51,5; 55,6; 56,2; 67,5; 72,8; 76,7; 83,4; 128,7; 131,0; 131,4; 143,3; 177,1. XRPD: krystalická forma A.

PSD (microscope): 15 - 240 μm – viz. tabulka 1.

Tabulka 1: Distribuce velikosti částic (PSD) – procentuální zastoupení částic o určité velikosti ve vzorku

GLP6_ME_BU_K2

Velikost (μm)	V (%) v kategorii	V (%) kumulativní
15	0,58%	0,58%
20	2,85%	3,43%
30	12,49%	15,91%
50	29,52%	45,43%
60	13,42%	58,85%
80	19,05%	77,90%
100	10,31%	88,21%
120	4,78%	93,00%
140	3,45%	96,45%
160	1,50%	97,95%
180	0,76%	98,70%
200	0,78%	99,48%
220	0,27%	99,75%
240	0,25%	100,00%

Příklad 2

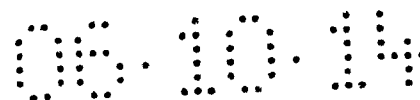
Rekrystalizace glykopyrronium bromidu z 2-propanolu

První rekrystalizace:

Surová směs glykopyrronium bromidu (4 g, 10,1 mmol) byla zahřívána v 60 ml 2-propanolu k 80 °C a při této teplotě míchána 30 minut. Následně byl roztok ochlazován tempem 20 °C / hod na konečných -10 °C, při 50 až 60 °C bylo naočkováno krystaly žádoucího diastereoismerního páru. Při -10 °C byla směs udržována 15 minut a vzniklé krystaly byly pak odsáty a promyty chladným 2-propanolem (10 ml). Byly získány 2 g produktu, chemická čistota 99,3 % (HPLC), diastereomerní čistota 94,6 % (CE).

Druhá rekrystalizace:

Produkt z první rekrystalizace (2 g, 5 mmol) byl zahříván 30 minut ve 35 ml 2-propanolu při 80 °C. Následně byl roztok ochlazován tempem 20 °C / hod na konečných -10 °C, při 50 až



60 °C bylo naočkováno krystaly žádoucího diastereoismerního páru. Při -10 °C byla směs udržována 30 minut a vzniklé krystaly byly odsáty a promyty chladným 2-propanolem (10 ml). Bylo získáno 1,75 g (celkový výtěžek dvou krystalizací 44 %) čistě bílé krystalické látky s chemickou čistotou 99,95 % (HPLC) a diastereomerní čistotou 99,9 % (CE). ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 1,24 (m, 1H); 1,50-1,72 (m, 7H); 2,13 (m, 1H); 2,69 (m, 1H); 3,02 (s, 3H); 3,15 (qui, *J* = 8,5 Hz, 1H); 3,18 (s, 3H); 3,56 (m, 2H); 3,73 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H); 3,83 (dd, *J* = 13,9 Hz, *J* = 6,0 Hz, 1H); 5,50 (m, 1H); 7,38 (m, 1H); 7,45 (m, 2H); 7,63 (m, 2H). ¹³C NMR (125,8 MHz, D₂O): δ 28,4; 28,7; 28,8; 29,3; 32,6; 47,6; 51,5; 55,6; 56,2; 67,5; 72,8; 76,7; 83,4; 128,7; 131,0; 131,4; 143,3; 177,1. XRPD: krystalická forma A. PSD (microscope): 8 - 170 μm.

Příklad 3

Rekrystalizace glykopyrronium bromidu z 2-propanolu

První rekrystalizace:

Surová směs glykopyrronium bromidu (2 g, 5 mmol) byla zahřívána ve 30 ml 2-propanolu k 80 °C a při této teplotě míchána 30 minut. Následně byl roztok ochlazován tempem 20 °C/hod na konečných -10 °C, při 50 až 60 °C bylo naočkováno krystaly žádoucího diastereoismerního páru. Při -10 °C byla směs udržována 15 minut a vzniklé krystaly byly pak odsáty a promyty chladným 2-propanolem (5 ml). Bylo získáno 0,95 g produktu, chemická čistota 99,3 % (HPLC), diastereomerní čistota 95,9 % (CE).

Druhá rekrystalizace:

Produkt z první rekrystalizace (0,95 g, 2,4 mmol) byl zahříván 30 minut v 17 ml 2-propanolu při 80 °C. Následně byl roztok ochlazován tempem 20 °C / hod na konečných -10 °C, při 50 až 60 °C bylo naočkováno krystaly žádoucího diastereoismerního páru. Při -10 °C byla směs udržována 30 minut a vzniklé krystaly byly odsáty a promyty chladným 2-propanolem (4 ml). Bylo získáno 0,80 g (celkový výtěžek dvou krystalizací 40 %) čistě bílé krystalické látky s chemickou čistotou 99,95 % (HPLC) a diastereomerní čistotou 99,95 % (CE). ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 1,24 (m, 1H); 1,50-1,72 (m, 7H); 2,13 (m, 1H); 2,69 (m, 1H); 3,02 (s, 3H); 3,15 (qui, *J* = 8,5 Hz, 1H); 3,18 (s, 3H); 3,56 (m, 2H); 3,73 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H); 3,83 (dd, *J* = 13,9 Hz, *J* = 6,0 Hz, 1H); 5,50 (m, 1H); 7,38 (m, 1H); 7,45 (m, 2H); 7,63 (m, 2H). ¹³C NMR (125,8 MHz, D₂O): δ 28,4; 28,7; 28,8; 29,3; 32,6; 47,6; 51,5; 55,6; 56,2; 67,5; 72,8; 76,7; 83,4; 128,7; 131,0; 131,4; 143,3; 177,1. XRPD: krystalická forma A.

PSD (microscope): 6 - 160 μm. – viz. tabulka 2.

Tabulka 2: Distribuce velikosti částic (PSD) – procentuální zastoupení částic o určité velikosti ve vzorku

GLP7_IP_K2

Velikost (μm)	V (%) v kategorii	V (%) kumulativní
8	0,54%	0,54%
10	0,95%	1,48%
20	19,02%	20,51%
30	26,85%	47,36%
40	17,72%	65,08%
50	13,29%	78,37%
60	7,24%	85,61%
80	9,04%	94,65%
100	2,80%	97,45%
120	1,43%	98,88%
140	0,57%	99,45%
160	0,37%	99,83%
170	0,17%	100,00%

Příklad 4

Rekrytalizace glykopyrronium bromidu z 1-propanolu

První rekrytalizace:

Surová směs glykopyrronium bromidu (2 g, 5 mmol) byla zahřívána ve 15 ml 1-propanolu k 80 °C a při této teplotě míchána 30 minut. Následně byl roztok ochlazován tempem 20 °C/hod na laboratorní teplotu, při 50 až 60 °C bylo naočkováno krystaly žádoucího diastereoismerního páru. Za pomalého míchání nechána směs krystalovat za laboratorní teploty do druhého dne. Následující den byly vzniklé krystaly odsáty a promyty chladným 1-propanolem (2 ml). Bylo získáno 0,9 g produktu, chemická čistota 99,4 % (HPLC), diastereomerní čistota 94,6 % (CE).

Druhá rekrytalizace:

Produkt z první rekrytalizace (0,9 g, 4,5 mmol) byl při 80 °C míchán 30 minut ve 13 ml 1-propanolu. Následně byl roztok ochlazován tempem 20°C/hod na laboratorní teplotu, při 50 až 60 °C byla naočkována krystaly žádoucího diastereoismerního páru. Za pomalého míchání nechána směs krystalovat za laboratorní teploty do druhého dne. Následující den byly vzniklé krystaly odsáty a promyty chladným 1-propanolem (2 ml). Bylo získáno 0,86 g (celkový výtěžek



dvou krystalizací 43 %) čistě bílé krystalické látky s chemickou čistotou 99,9 % (HPLC) a diastereomerní čistotou vyšší než 99,9 % (CE). ^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 1,24 (m, 1H); 1,50-1,72 (m, 7H); 2,13 (m, 1H); 2,69 (m, 1H); 3,02 (s, 3H); 3,15 (qui, $J = 8,5$ Hz, 1H); 3,18 (s, 3H); 3,56 (m, 2H); 3,73 (d, $J = 13,9$ Hz, 1H); 3,83 (dd, $J = 13,9$ Hz, $J = 6,0$ Hz, 1H); 5,50 (m, 1H); 7,38 (m, 1H); 7,45 (m, 2H); 7,63 (m, 2H). ^{13}C NMR (125,8 MHz, D_2O): δ 28,4; 28,7; 28,8; 29,3; 32,6; 47,6; 51,5; 55,6; 56,2; 67,5; 72,8; 76,7; 83,4; 128,7; 131,0; 131,4; 143,3; 177,1. XRPD: krystalická forma A.

PSD (microscope): 2 - 11 μm – viz. tabulka 3.

Tabulka 3: Distribuce velikosti částic (PSD) – procentuální zastoupení částic o určité velikosti ve vzorku

GLP3_NP_K1

Velikost (μm)	V (%) v kategorii	V (%) kumulativní
2	5,32%	5,32%
3	30,48%	35,79%
4	37,96%	73,75%
5	19,33%	93,08%
6	4,64%	97,73%
8	1,97%	99,69%
10	0,15%	99,84%
11	0,16%	100,00%

Příklad 5

Rekrytalizace glykopyrronium bromidu z 1-butanolu

První rekrytalizace:

Surová směs glykopyrronium bromidu (4 g, 10,1 mmol) byla zahřívána ve 30 ml 1-butanolu k 80 °C a při této teplotě míchána 30 minut. Následně byl roztok ochlazován tempem 20 °C/hod na laboratorní teplotu, při 50 až 60 °C bylo naočkováno krystaly žádoucího diastereoismerního páru. Za pomalého míchání nechána směs krystalovat za laboratorní teploty do druhého dne. Následující den byly vzniklé krystaly odsáty a promyty chladným 1-butanolem (4 ml). Bylo získáno 1,85 g produktu, chemická čistota 99,5 % (HPLC), diastereomerní čistota 94,4 % (CE).

Druhá rekrystalizace:

Produkt z první rekrystalizace (1,85 g, 4,7 mmol) byl při 80 °C míchán 30 minut ve 15 ml 1-butanolu. Následně byl roztok ochlazován tempem 20 °C / hod na laboratorní teplotu, při 50 až 60 °C byla naočkována krystaly žádoucího diastereoisomerního páru. Za pomalého míchání nechána směs krystalovat za laboratorní teploty do druhého dne. Následující den byly vzniklé krystaly odsáty a promyty chladným 1-butanolem (2 ml). Bylo získáno 1,65 g (celkový výtěžek dvou krystalizací 41 %) čistě bílé krystalické látky s chemickou čistotou 99,9 % (HPLC) a diastereomerní čistotou 99,9 % (CE). ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 1,24 (m, 1H); 1,50-1,72 (m, 7H); 2,13 (m, 1H); 2,69 (m, 1H); 3,02 (s, 3H); 3,15 (qui, *J* = 8,5 Hz, 1H); 3,18 (s, 3H); 3,56 (m, 2H); 3,73 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H); 3,83 (dd, *J* = 13,9 Hz, *J* = 6,0 Hz, 1H); 5,50 (m, 1H); 7,38 (m, 1H); 7,45 (m, 2H); 7,63 (m, 2H). ¹³C NMR (125,8 MHz, D₂O): δ 28,4; 28,7; 28,8; 29,3; 32,6; 47,6; 51,5; 55,6; 56,2; 67,5; 72,8; 76,7; 83,4; 128,7; 131,0; 131,4; 143,3; 177,1. XRPD: krystalická forma A.

PSD (microscope): 2 - 14 μm – viz. tabulka 4.

Tabulka 4: Distribuce velikosti částic (PSD) – procentuální zastoupení částic o určité velikosti ve vzorku

GLP4_NB_K1

Velikost (μm)	V (%) v kategorii	V (%) kumulativní
2	5,85%	5,85%
3	41,09%	46,94%
4	28,77%	75,72%
5	12,67%	88,38%
6	6,50%	94,89%
8	3,51%	98,39%
10	1,02%	99,42%
14	0,58%	100,00%

Příklad 6

Rekrystalizace glykopyrronium bromidu z *tert.*butanolu*První rekrystalizace:*

Surová směs glykopyrronium bromidu (2 g, 5 mmol) byla zahřívána v 15 ml *tert.*butanolu k 80 °C a při této teplotě míchána 30 minut. Následně byl roztok ochlazován tempem 20 °C/hod na laboratorní teplotu, při 50 až 60 °C bylo naočkováno krystaly žádoucího diastereoismerního páru. Za pomalého míchání nechána směs krystalovat za laboratorní teploty do druhého dne. Následující den byly vzniklé krystaly odsáty a promyty chladným *tert.*butanolem (1 ml). Bylo získáno 0,85 g produktu, chemická čistota 99,3 % (HPLC), diastereomerní čistota 94,9 % (CE).

Druhá rekrystalizace:

Produkt z první rekrystalizace (0,85 g, 2,1 mmol) byl při 80°C míchán 30 minut v 6 ml *tert.*butanolu. Následně byl roztok ochlazován tempem 20 °C/hod na laboratorní teplotu, při 50 až 60 °C byla naočkována krystaly žádoucího diastereoismerního páru. Za pomalého míchání nechána směs krystalovat za laboratorní teploty do druhého dne. Následující den byly vzniklé krystaly odsáty a promyty chladným *tert.*butanolem (1 ml). Bylo získáno 0,8 g (celkový výtěžek dvou krystalizací 40 %) čistě bílé krystalické látky s chemickou čistotou 99,8 % (HPLC) a diastereomerní čistotou 99,9 % (CE). ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 1,24 (m, 1H); 1,50-1,72 (m, 7H); 2,13 (m, 1H); 2,69 (m, 1H); 3,02 (s, 3H); 3,15 (qui, *J* = 8,5 Hz, 1H); 3,18 (s, 3H); 3,56 (m, 2H); 3,73 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H); 3,83 (dd, *J* = 13,9 Hz, *J* = 6,0 Hz, 1H); 5,50 (m, 1H); 7,38 (m, 1H); 7,45 (m, 2H); 7,63 (m, 2H). ¹³C NMR (125,8 MHz, D₂O): δ 28,4; 28,7; 28,8; 29,3; 32,6; 47,6; 51,5; 55,6; 56,2; 67,5; 72,8; 76,7; 83,4; 128,7; 131,0; 131,4; 143,3; 177,1. XRPD: krystalická forma A.

PSD (microscope): 2 - 30 μm – viz. tabulka 5.

Tabulka 5: Distribuce velikosti částic (PSD) – procentuální zastoupení částic o určité velikosti ve vzorku

GLP5_TB_K1

Velikost (μm)	V (%) v kategorii	V (%) kumulativní
2	1,49%	1,49%
3	16,99%	18,48%
4	22,94%	41,42%
5	16,76%	58,18%
6	13,40%	71,58%
8	17,28%	88,86%
10	6,66%	95,51%
15	3,35%	98,86%
20	0,89%	99,76%
25	0,11%	99,87%
30	0,00%	99,87%
31	0,13%	100,00%

Seznam analytických metod

Měřící parametry XRPD: Difraktogramy byly naměřeny na difraktometru X'PERT PRO MPD PANalytical, použité záření $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=0,1542$ nm (1,542 Å)), excitační napětí: 45 kV, anodový proud: 40 mA, měřený rozsah: 2 - 40° 2 θ , velikost kroku: 0,01° 2 θ , měření probíhalo na plochém práškovém vzorku, který byl nanesen na Si destičku. Pro nastavení primární optiky byly použity programovatelné divergenční clonky s ozářenou plochou vzorku 10 mm, Sollerovy clonky 0,02 rad a protirozptylová clonka ¼°. Pro nastavení sekundární optiky byl použit detektor X'Celerator s maximálním otevřením detekční štěrbin, Sollerovy clonky 0,02 rad a protirozptylová clonka 5,0 mm.

Chemická čistota byla měřena kapalinovou chromatografií (HPLC):

Přístroj: Waters Acquity UPLC, PDA detekce
Příprava vzorku: 10,0 mg zkoušeného vzorku rozpustit v 10,0 ml 50% acetonitrilu R
Kolona:
 - rozměr: l = 0,10 m, \varnothing = 4,6 mm
 - *stacionární fáze:* Waters CSH Phenyl-Hexyl, 2,5 μm částice
 - *teplota kolony:* 35 °C.

Mobilní fáze: A: 0,2% roztok trifluoroctové kyseliny ve vodě

B: acetonitril R

Gradientová eluce:

Čas (min)	Průtok (ml/min)	% A	% B
0	0,7	75	25
9	0,7	40	60
10	0,7	75	25
11	0,7	75	25

Detekce: spektrofotometr 220 nm

Nástřik: 2 μ l

Teplota vzorku: 20 °C

Koncentrace vzorku: 1 mg/ml

Diastereomerní čistota byla měřena kapilární elektroforézou (CE):

Zařízení: kapilární elektroforéza s vestavěným detektorem (DAD) a datovou stanicí

Kapilára: křemenná, vnitřní průměr 50 μ m, celková délka 48,5 cm, účinná délka 40,0 cm

Teplota kapiláry: 30 °C

Použité napětí: -10 kV

Detekce: UV při 192 nm

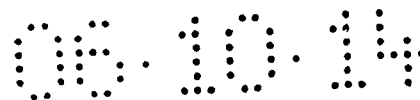
Nástřik: hydrodynamický, 4 s, 50 mbar přetlaku

Příprava roztoků:

Základní elektrolyt: 1,08 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) se rozpustí v 90 ml vody pro chromatografii R, přidavkem 85% kyseliny fosforečné R se upraví pH na hodnotu $3,0 \pm 0,05$ a roztok se zředí vodou pro chromatografii R na 100 ml.

*Separáčn*í elektrolyt: 55 mg sulfátovaného γ -cyklodextrinu (HS- γ -CD) (Cyclolab) se rozpustí v 0,8 ml základního elektrolytu. *Poznámka:* separáčn

í elektrolyt musí být vždy připraven čerstvý – v den analýzy.



Porovnávací roztok: 5 mg každého diastereoisomeru se naváží do 5 ml odměrné baňky, rozpustí se ve 3 ml *vody pro chromatografii R* a doplní vodou pro *chromatografii R* na 5 ml.

Zkoušený roztok: obsah jedné kapsle se rozpustí se 3 ml *vody pro chromatografii R* a doplní vodou pro *chromatografii R* na 5 ml.

Každodenní kondicionování kapiláry:

Kapilára se promyje 5 min *vodou pro chromatografii R*, 5 min 1M hydroxidem sodným, 5 min *vodou pro chromatografii R* a 5 min separačním elektrolytem (vše za přetlaku 950 mbar).

Postup měření:

Před každou analýzou se kapilára promyje 2 min separačním elektrolytem (přetlak 950 mbar). Potom se nastříkne vzorek (50 mbar, 4 s do nástřikové vialky). Oba konce kapiláry se ponoří do separačního elektrolytu a aplikuje se napětí -10 kV.

Migrační časy: Diastereoisomer 1: kolem 13,0 min
Diastereoisomer 2: kolem 14,3 min
Diastereoisomer 3: kolem 14,7 min
Diastereoisomer 4: kolem 15,2 min

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla naměřena na přístroji Avance 500 od firmy Bruker. ^1H spektra byla měřena při frekvenci 500,13 MHz, ^{13}C při frekvenci 125,8 MHz. Vzorek byl měřen v deuterovaném rozpouštědle uvedeném u konkrétní analýzy, standardně při 25°C (pokud není u konkrétní analýzy uvedeno jinak). Chemický posun δ je vyjádřen jako ppm, interakční konstanty J jsou uvedeny v Hz. Spektra byla standardně vztahována ke zbytkovému signálu rozpouštědla. V případě D_2O byl jako interní standard použit DSS.

Uhlíková spektra nukleární magnetické rezonance v pevném stavu (ssNMR) byla měřena na přístroji Avance 400 WB Bruker metodou CP/MAS v rotoru 4 mm při otáčkách 13 kHz, standardně při 25 °C.

Distribuce velikosti částic (PSD) byla změřena na optickém mikroskopu Nikon eclipse N80i, objektiv LU PLAN Fluor 10x, okulár CFI10/22x, použité suspenční médium - parafinový olej.

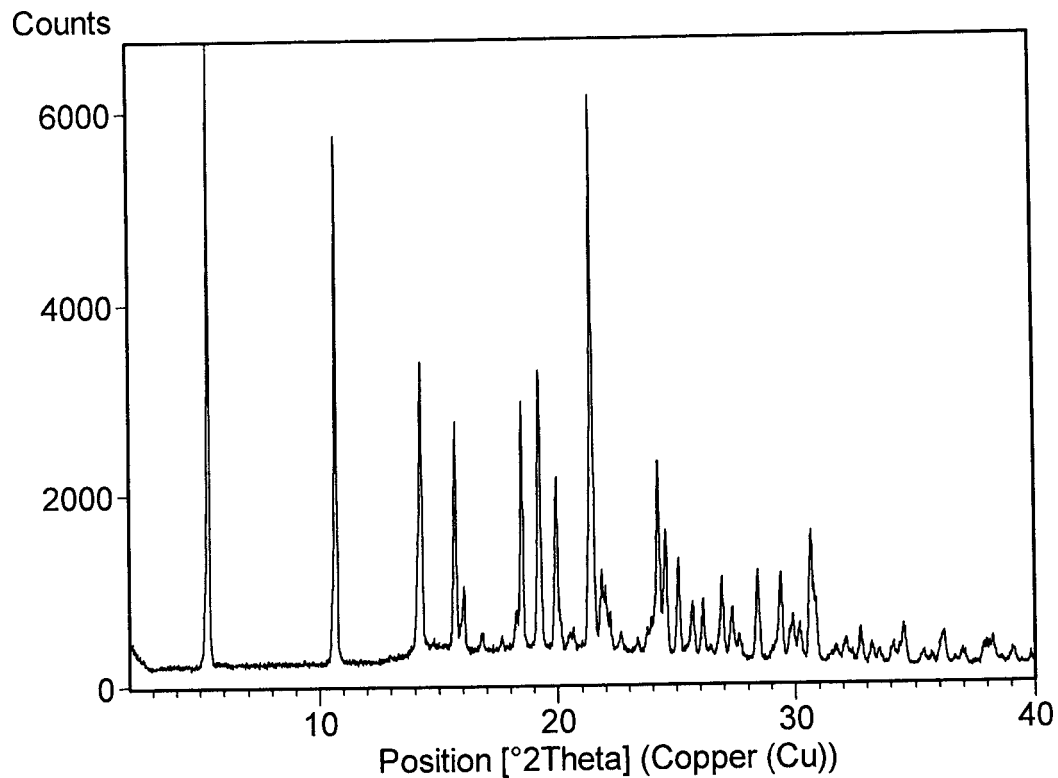
Patentové nároky

1. Způsob přípravy glykopyrronium bromidu ve formě [R,S] a [S,R] diastereoisomerů, vyznačující se tím, že spočívá v odkrystalizování těchto žádoucích diastereoisomerů ze směsi diastereoisomerů [R,S], [S,R], [R,R] a [S,S] dvěma nebo více řízenými krystalizacemi z roztoku rozpouštědla voleného ze skupiny 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, *terc.*butanol.
2. Způsob přípravy podle nároku 1, vyznačující se tím, že diastereoisomerní čistota produktu je alespoň 99,9 % R,S / S,R.
3. Způsob přípravy podle nároku 1 až 2, vyznačující se tím, že řízená krystalizace spočívá v rozpuštění směsi diastereoisomerů za horka a následném ochlazení roztoku na laboratorní teplotu rychlostí 20 °C/h.
4. Způsob přípravy podle nároku 3, vyznačující se tím, že se směs diastereoisomerů rozpustí v rozpouštědle při teplotě 50 °C až teplotě varu daného rozpouštědla.
5. Způsob přípravy podle nároku 1 až 4, vyznačující se tím, že se použije rozpouštědlo 1-propanol nebo 1-butanol.
6. Způsob přípravy podle nároku 5, vyznačující se tím, že velikost všech částic produktu je menší než 20 μm, při měření pomocí optického mikroskopu.
7. Krystalický glykopyrronium bromid ve formě [R,S] a [S,R] diastereoisomerů, připravitelný způsobem podle nároků 1 až 6, s velikostí všech částic menších než 20 μm, při měření pomocí optického mikroskopu, a diastereoisomerní čistotou produktu alespoň 99,9 % R,S / S,R.

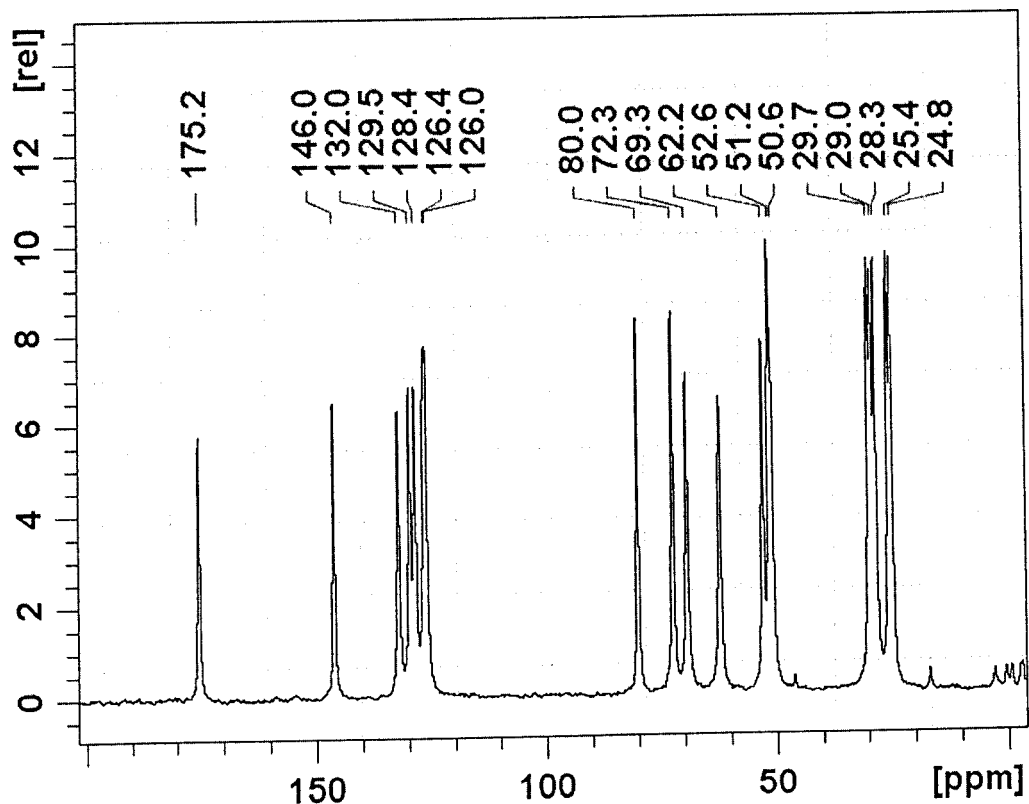
Obrázky

1/7

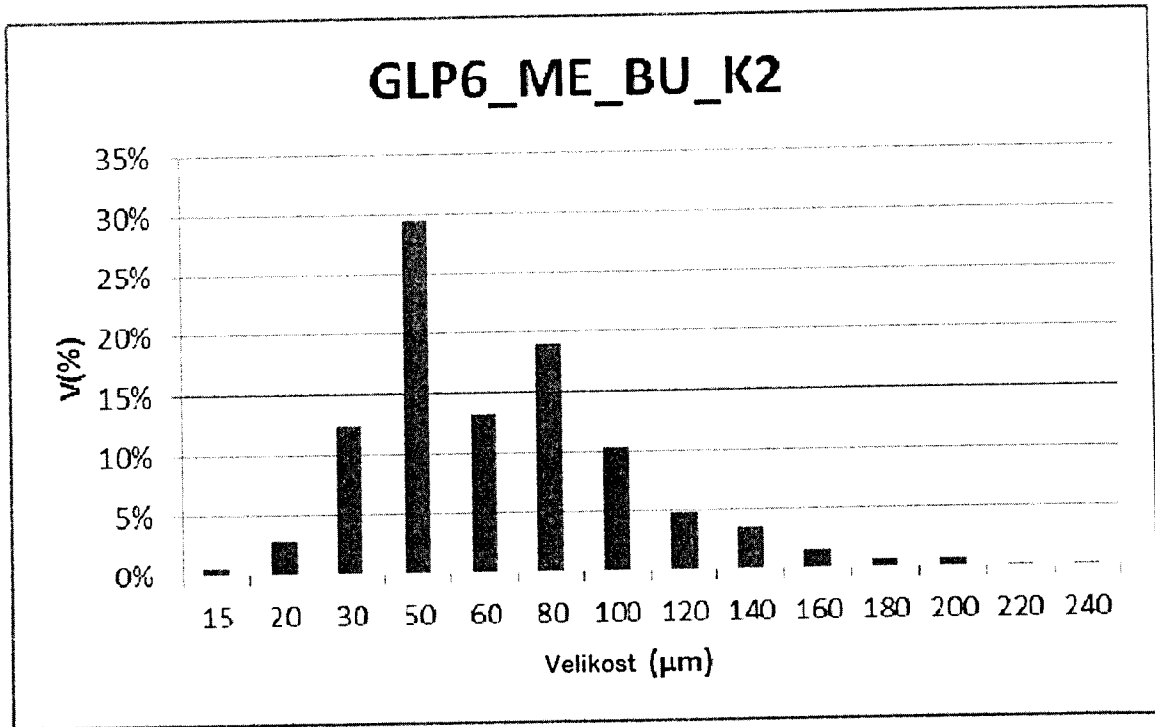
Obr. 1



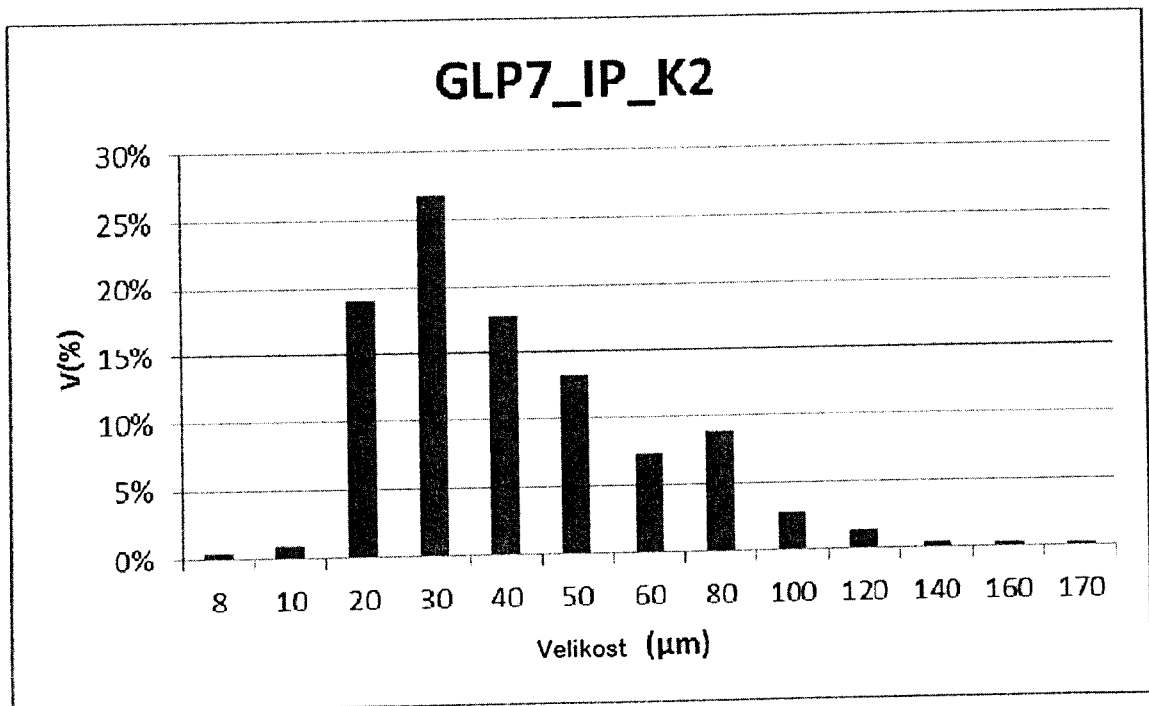
Obr. 2



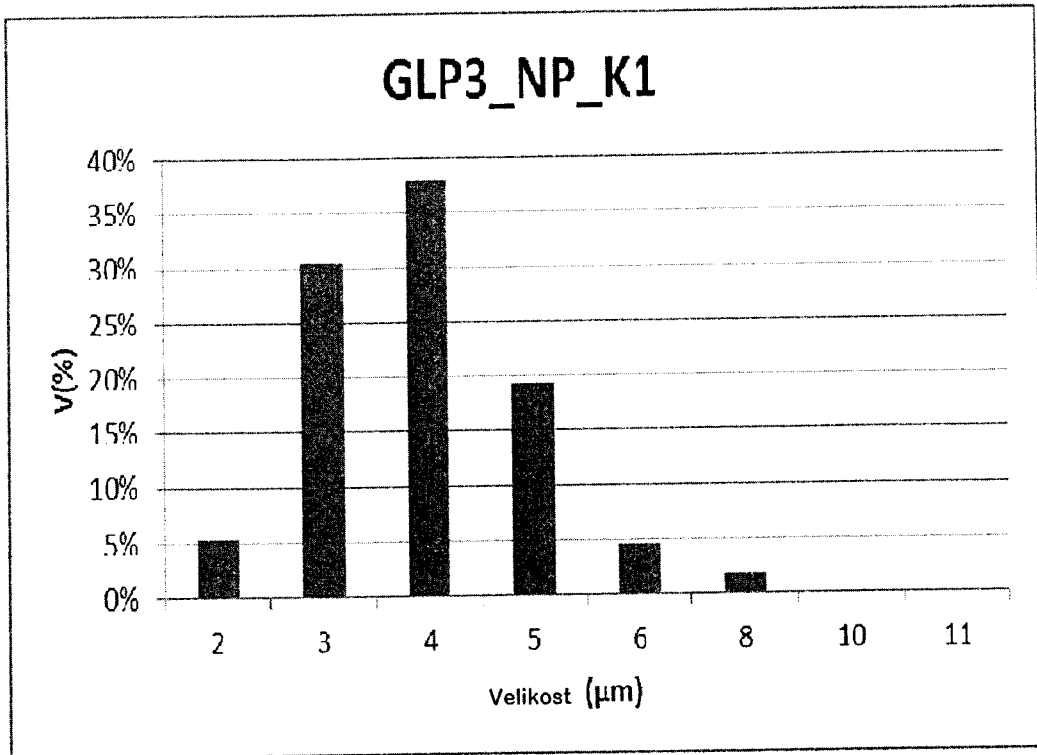
Obr. 3



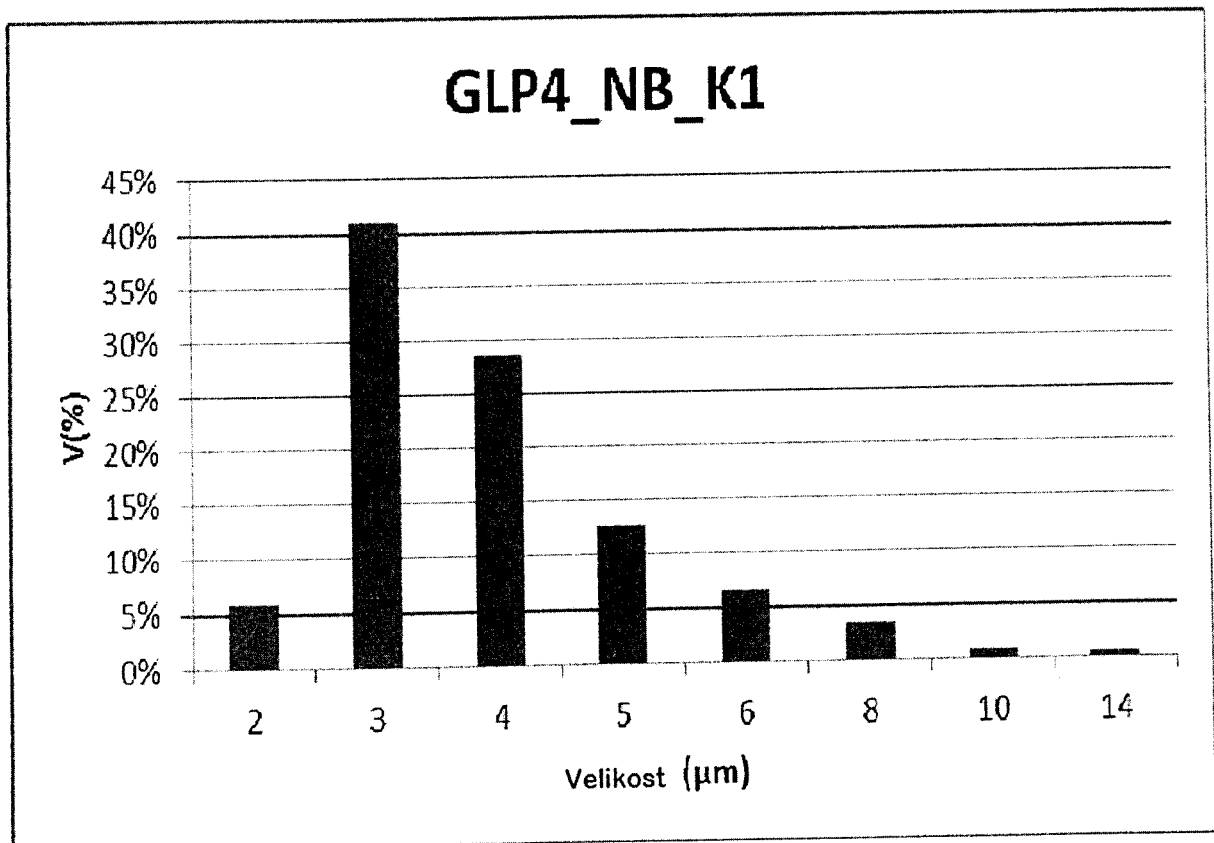
Obr. 4



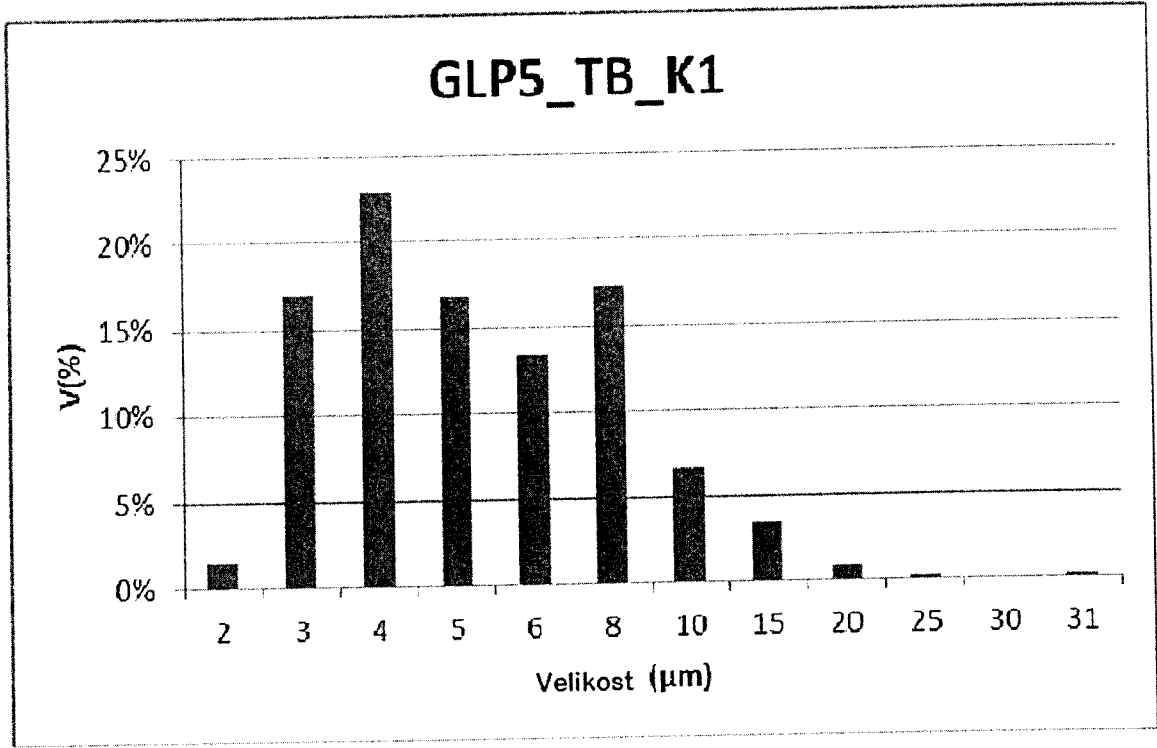
Obr. 5



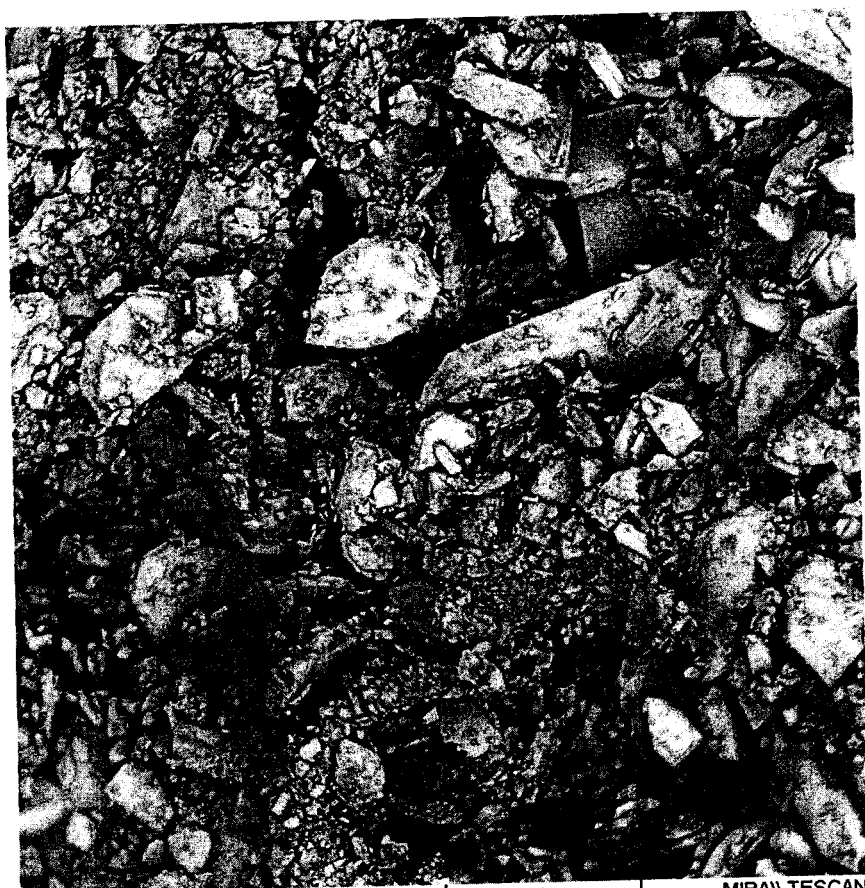
Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8



SEM HV: 5.00 kV WD: 8.000 mm MIRA\ TESCAN
View field: 433.4 µm Det: BSE 100 µm
SEM MAG: 500 x Date(m/d/y): 05/13/14 Zentiva

PV 2014-680

05.10.14

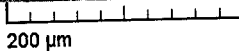
6/7

Obr. 9



SEM HV: 5.00 kV
View field: 722.3 μm
SEM MAG: 300 x

WD: 8.718 mm
Det: BSE
Date(m/d/y): 05/15/14



MIRAX TESCAN

Zentiva

PV 2014-680
05.10.14

7/7

Obr. 10

