

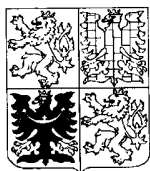
# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**2000 - 4555**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18.06.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.06.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/981428**

(33) Země priority: **FI**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.05.2001**  
(Věstník č. 5/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/FI99/00539**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/65888**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 07 D 307/33**

**C 07 D 237/04**

**B 01 D 15/08**

(71) Přihlašovatel:

ORION CORPORATION, Espoo, FI;

(72) Původce:

Bäckström Reijo, Helsinky, FI;

Heinonen Tuula, Espoo, FI;

Hauta-Aho Tuula, Vantaa, FI;

(74) Zástupce:

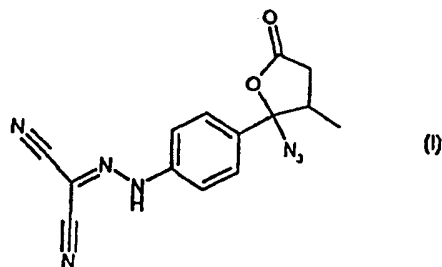
Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Referenční sloučenina pro použití v analýze šarží  
levosimendanu**

(57) Anotace:

Řešení se týká pyridazinylového derivátu vzorce I a jeho použití jako referenční sloučeniny pro stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích levosimendanu. Řešení se dále týká také analytické metody stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích levosimendanu, kde se jako referenční sloučenina použije sloučenina vzorce I. Levosimendan je účinný při léčbě srdečního selhání.



CZ 2000 - 4555 A3

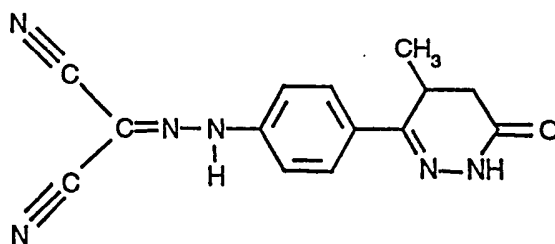
Referenční sloučenina pro použití v analýze šarží  
levosimendanu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitrilu (I) a jeho použití jako referenční sloučeniny v analýze syntézy šarží levosimendanu, zejména pro stanovení potencionálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarží levosimendanu. Předkládaný vynález se také týká analytického způsobu stanovení potencionálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarží levosimendanu, kde [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitril (I) je použit jako referenční sloučenina.

Dosavadní stav techniky

Levosimendan, který je enantiomerem [[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-metyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]hydrazono]propandinitrilu, a způsob jeho přípravy jsou popsány např. v patentu EP 565546 B1. Levosimendan je účinný v léčbě srdečního selhání a významně se váže v závislosti na kalciu na troponin. Použití levosimendanu v léčbě ischemie myokardu je popsáno ve WO 93/21921. Hemodynamické účinky levosimendanu u člověka jsou popsány v práci Sundberg, S. et al. Am. J. Cardiol., 1995; 75: 1061-1066. Levosimendan je reprezentován vzorcem:

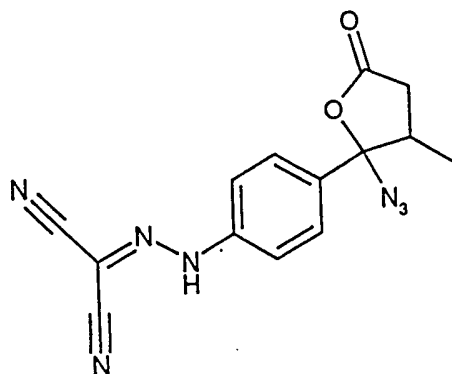


Klinické studie potvrdily prospěšné účinky levosimendanu u pacientů se srdečním selháním.

Levosimendan může být připraven vysoce čistý a v téměř kvantitativních výtěžcích reakcí (-)-6-(4-aminofenyl)-5-methyl-4,5-dihydro-3-(2H)-pyridazinonu s dusitanem sodným a malononitrilem, jak je popsáno v patentu EP 565546 B1. Bylo však zjištěno, že syntetizované vzorky levosimendanu vykazují občas v testu na mutagenitu bakterií (Ames test) potenciální genotoxické vlastnosti.

#### Popis vynálezu

Nyní bylo zjištěno, že potenciální genotoxické vlastnosti vzorků levosimendanu jsou způsobeny nečistotou tvořenou azido derivátem majícím vzorec (I)



Azido derivát je účinný mutagen, který se může vytvořit během syntézy levosimendanu v množství, které je dostatečné pro vytvoření pozitivního výsledku v testu mutageneze bakterií. Tato sloučenina, nazývaná [[4-(2-azido-3-methyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitril (I), je proto užitečná jako referenční sloučenina v rutinní analýze syntézy šarží levosimendanu, obzvláště pro stanovení potenciálně genotoxických nečistot v šaržích levosimendanu. Přítomnost sloučeniny (I) v šarži levosimendanu ukazuje, že je

nezbytné provést další rekrystalizaci pro získání levosimendanu vhodného pro použití jako léku.

#### Stručný popis obrázků

Obr. 1 je HPLC chromatogram standardy [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitrilu (0,04 ug/ml).

Obr. 2 je HPLC chromatogram levosimendanu ve formě hrubého materiálu.

#### Detailní popis obrázků

Předkládaný vynález poskytuje referenční sloučeninu mající vzorec (I) pro stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarže levosimendanu. Předkládaný vynález také poskytuje referenční preparát pro stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarže levosimendanu obsahující sloučeninu (I) volitelně spolu s analyticky přijatelným nosičem a zejména v podstatě s nepřítomnými deriváty pyridazinylu.

Předkládaný vynález také poskytuje použití sloučeniny (I) jako referenční sloučeniny pro stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarže levosimendanu.

Předkládaný vynález také poskytuje analytický způsob stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarže levosimendanu charakterizované tím, že sloučenina (I) je použita jako referenční sloučenina a obzvláště tím, že řečený vzorek levosimendanu je analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Dále předkládaný vynález poskytuje analytický způsob stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarže

levosimendanu, kterýžto způsob zahrnuje přípravu referenčního standardního roztoku rozpuštěním sloučeniny (I) v roztoku, přípravu testovaného roztoku rozpuštěním vzorku šarže levosimendanu v roztoku, získání HPLC chromatogramu řečeného standardního roztoku, získání HPLC chromatogramu řečeného referenčního testovaného roztoku a stanovení koncentrace sloučeniny (I) ve vzorku.

Termín "analyticky přijatelný nosič" zde znamená nosič, který nezabraňuje kvalitativní nebo kvantitativní analýze sloučeniny (I). Výběr vhodného analyticky přijatelného nosiče je dobře znám osobám znalým oboru. Příkladem analyticky přijatelného nosiče je dimetylsulfoxid.

Sloučenina (I) může být připravena reakcí 6-(4-aminofenyl)-5-metyl-4,5-dihydro-3-(2H)-pyridazinonu s dusitanem sodným a malononitrilem, kde dusitan sodný je použit v molárním nadbytku, a dále separací sloučeniny (I) z reakční směsi. Postup je popsán detailně v Příkladu 1.

Produkt šarže levosimendanu je přednostně analyzován za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Vhodné zařízení zahrnuje například C-8 HPLC kolonu s reverzní fází s UV detekcí při 360 nm. Mobilní fází je například směs fosfátového pufru, pH 2,1, a acetonitrilu. Vzorek levosimendanu je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle, jako je například směs dimetylsulfoxidu, metanolu a vody. Referenční roztoky jsou připraveny rozpuštěním sloučeniny (I) ve vhodném rozpouštědle. Retenční časy levosimendanu a sloučeniny (I) nebo jejich diastereomerů jsou stanoveny podle použitých chromatografických podmínek. Množství sloučeniny (I) ve vzorku levosimendanu je určeno srovnáním chromatogramů roztoku se vzorkem a roztoku referenčního. Postup je popsán detailně v Příkladu 2.

Množství nežádoucí nečistoty (I) v šarži levosimendanu může být sníženo pomocí metod známých v oboru, jako je například rekrystalizace. Rekrystalizace levosimendanu může být provedena z jakéhokoli vhodného rozpouštědla, kdy přednostním rozpouštědlem je aceton.

#### Příklady provedení vynálezu

Příklad 1. Příprava [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitrilu (směsi diastereomerů)

6-(4-aminofenyl)-4,5-dihydro-5-metyl-3-(2H)-pyridazinon (153 g, 0,75 molu) bylo rozpuštěno v kyselině octové (750 ml). Do roztoku byl pomalu přidán při teplotě 10-20°C dusitan sodný v pevné formě (210 g, 3,0 moly). Reakční směs byla rychle nalita do roztoku malononitrilu (150 g, 2,3 molu) o teplotě 20°C a vody (1500 ml). Výsledná směs byla promíchávána při teplotě 20-25°C po dobu 60 minut a poté zfiltrována a promyta vodou. Vlhký pevný materiál byl postupně extrahován tetrahydrofuranem (300 ml) a etyl acetátem (1900 ml). Zkombinované extrakty byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědla byla odpařena ve vakuu. Reziduum bylo rozmělněno v etylacetátu (200 ml), zfiltrováno a filtrát byl pod vakuem odpařen. Reziduum (8,0 g) bylo purifikováno chromatograficky na silika gelu za použití toluenu-etyl acetátu 2:1 jako elučního činidla. Po krystalizaci z toluenu byl výtěžek čisté směsi diastereomerů 1,0 g. Hlavní složka směsi může být obohacena vícečetnou krystalizací z toluenu, ale pro účely analytické je směs dostatečná. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, σ) hlavní diastereomer 1,06 (d, 3H, J = 6 Hz), 2,55 (dd, 1H, J = 16 Hz, 11 Hz), 2,67 (m, 1H), 2,78 (dd, 1H, J = 16 Hz, 8 Hz), 7,59 (d, 1H, J = 9 Hz), 7,62 (d, 1H, J = 9 Hz), 12,6 (široké s, 1H), vedlejší diastereomer 0,60 (d, 3H, J = 7 Hz), 2,43 (dd, 1H, J = 18 Hz, 2 Hz), 2,78 (m, 1H), 3,14 (dd, 1H, j = 8 Hz, 18

Hz), 7,54 (d, 1H,  $J = 9$  Hz), 7,61 (d, 1H,  $J = 9$  Hz), 12,6 (široké s, 1H).

Příklad 2. Použití [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitrilu (I) jako referenční sloučeniny pro HPLC chromatografii

HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie) sloučeniny (I) v hrubém materiálu levosimendanu byla založena na chromatografii na C-8 HPLC koloně s reverzní fází s UV detekcí při 360 nm. Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem a fosfátovým pufr, pH 2,1.

Činidla:

1. Metanol, HPLC čistota
2. Dihydrogenfosforečnan sodný,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , Merck
3. Kyselina ortofosforečná,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Merck
4. Fosfátový pufr, pH 2,1:

Rozpusťte 1,8 g dihydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ve vodě a přidejte 2,0 ml kyseliny fosforečné. Upravte pH, pokud je nutné, pomocí 2M hydroxidu sodného nebo 1M kyseliny fosforečné. Nařeďte vodou do 1000,0 ml.

5. Dimetylsulfoxid, HPLC čistota, BDH
6. Acetonitril, HPLC čistota
7. Rozpouštědlo: Smíchejte 200 ml metanolu s 800 ml vody
8. Referenční standard [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitril

Standardní roztoky (referenční preparáty sloučeniny (I)):

Zásobní roztok: 10,00 mg [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitrilu je rozpuštěno ve 100 ml volumetrické nádobě v 20 ml dimetylsulfoxidu a nádoba je naplněna do objemu metanolem.

09.01.01

Standardní roztok 1 (50 ug/ml): 5,00 ml zásobního roztoku je rozpouštědlem naředěno do 10,0 ml.

Standardní roztok 2 (0,4 ug/ml = 40 ppm): 1,00 ml zásobního roztoku je rozpouštědlem naředěno do 250,0 ml.

Limitní roztok pro výpočet (0,1 ug/ml = 10 ppm): 5,00 ml standardního roztoku 2 je rozpouštědlem naředěno do 20,0 ml.

#### Testovaný roztok

100 mg testovaného vzorku je rozpuštěno v 10 ml volumetrické nádobě v 8 ml dimetylsulfoxidu a nádoba je naplněna rozpouštědlem do objemu nádoby.

#### Chromatografické podmínky:

Zařízení	Kapalinový chromatograf
Detektor	UV-VIS, detekční vlnová délka 360 nm
Kolona	Symetrická C8, 3,0 um, 7,5 cm x 4,6 mm
Teplota pece	Okolní
Mobilní fáze	A: fosfátový pufr, pH 2,1 B: acetonitril
%B	0 min 20% 5 min 30% 15 min 30% 30 min 90%
Průtok	0,8 ml/min
Injekční objem	100 ul
Trvání analýzy	30 minut
Vymývání	10 minut
Retenční časy:	levosimendan 13 minut Sloučenina (I) vedlejší diastereomer: okolo 24 minut Sloučenina (I) hlavní diastereomer: okolo 25 minut

Vhodnost systému

1. Replikátní nástřiky limitního roztoku pro výpočet musí být opakovatelné; 6 nástřiků, RSD = 10%.

Postup

Po splnění kritérií vhodnosti systému nastříknete standardu a vzorek.

Výpočet

Koncentrace hlavního diastereomeru sloučeniny (I) v ppm bude vypočtena podle následující rovnice:

$$\frac{C_{st} \cdot R_x \cdot 10 \cdot 1000000}{R_{st} \cdot w}$$

$C_{st}$  = koncentrace hlavního diastereomeru sloučeniny (I) v standardním roztoku [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitrilu (mg/ml)

$R_x$  = oblast vrcholu hlavního diastereomeru sloučeniny (I) v chromatogramu testovaného roztoku.

$R_{st}$  = oblast vrcholu hlavního diastereomeru sloučeniny (I) v chromatogramu standardního roztoku [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitrilu

$w$  = váha vzorku

10 = faktor ředění vzorku (ml)

Koncentrace vedlejšího diastereomeru sloučeniny (I) v ppm bude vypočtena podle následující rovnice:

$$\frac{C_{st} \cdot R_x \cdot 10 \cdot 1000000}{R_{st} \cdot w} \cdot 1,023$$

$C_{st}$  = koncentrace vedlejšího diastereomeru sloučeniny (I) v standardním roztoku [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitrilu (mg/ml)

$R_x$  = oblast vrcholu vedlejšího diastereomeru sloučeniny (I) v chromatogramu testovaného roztoku.

$R_{st}$  = oblast vrcholu vedlejšího diastereomeru sloučeniny (I) v chromatogramu standardního roztoku [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitrilu

$W$  = váha vzorku

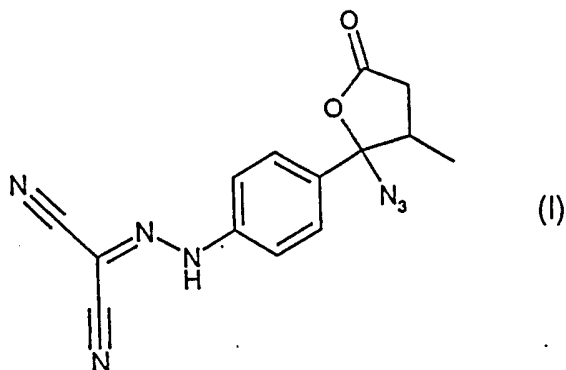
$l_0$  = faktor ředění vzorku (ml)

1,023 = korekční faktor pro vedlejší diastereomer sloučeniny (I)

Získaný chromatogram standardy [[4-(2-azido-3-metyl-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)fenyl]hydrazono]propandinitrilu (0,4 ug/ml) je uveden na Obr. 1. Retenční čas pro hlavní diastereomer sloučeniny (I) je 25,180 minut a pro vedlejší diastereomer sloučeniny (I) je 24,866 minut. Chromatogram levosimendanu ve formě hrubého materiálu je uveden na Obrázku 2.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučenina charakterizovaná strukturálním vzorcem I

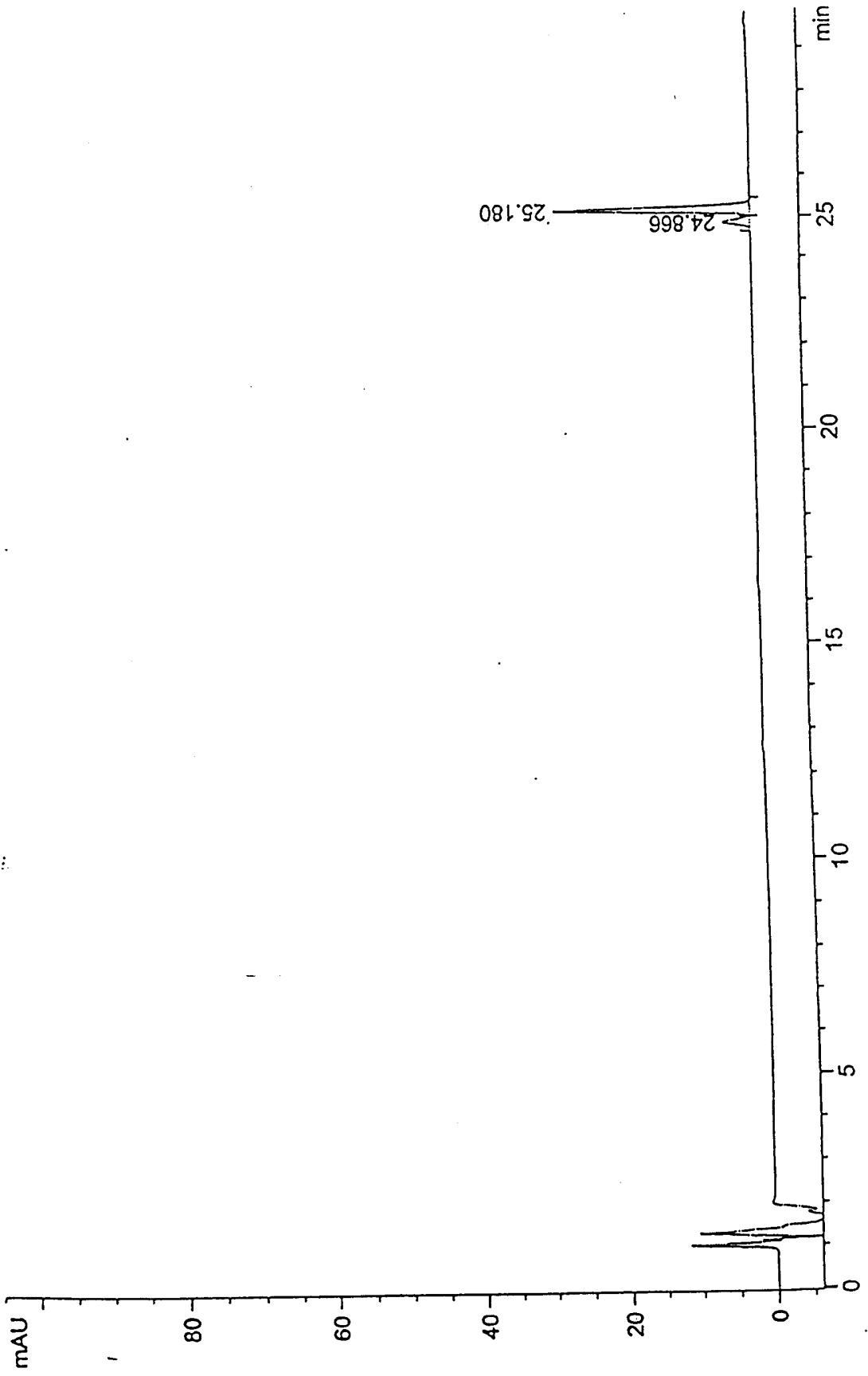


a její diastereomery

2. Referenční preparát pro stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarže levosimendanu obsahujících sloučeninu, která je předmětem patentového nároku 1.
3. Preparát podle patentového nároku 2 v podstatě s nepřítomnými pyridazinylovými sloučeninami.
4. Referenční preparát pro stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarže levosimendanu obsahujících sloučeninu, která je předmětem patentového nároku 1, spolu s analyticky přijatelným nosičem.
5. Preparát podle patentového nároku 4 v podstatě s nepřítomnými pyridazinylovými sloučeninami.
6. Použití sloučeniny, která je předmětem patentového nároku 1, jako referenční sloučeniny pro stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarže levosimendanu.
7. Analytický způsob pro stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarže levosimendanu charakterizovaný tím, že sloučenina, která je předmětem patentového nároku 1, je použita jako referenční sloučenina.

8. Způsob podle patentového nároku 7 charakterizovaný tím, že vzorek šarže levosimendanu je analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).
9. Analytický způsob pro stanovení potenciálně genotoxických nečistot ve vzorcích šarže levosimendanu, kterýžto způsob zahrnuje přípravu referenčního standardního roztoku rozpuštěním sloučeniny, která je předmětem patentového nároku 1, v roztoku, přípravu testovaného roztoku rozpuštěním vzorku šarže levosimendanu v roztoku, získání HPLC chromatogramu řečeného referenčního standardního roztoku, získání HPLC chromatogramu řečeného testovaného roztoku a stanovení koncentrace sloučeniny, která je předmětem patentového nároku 1, ve vzorku.

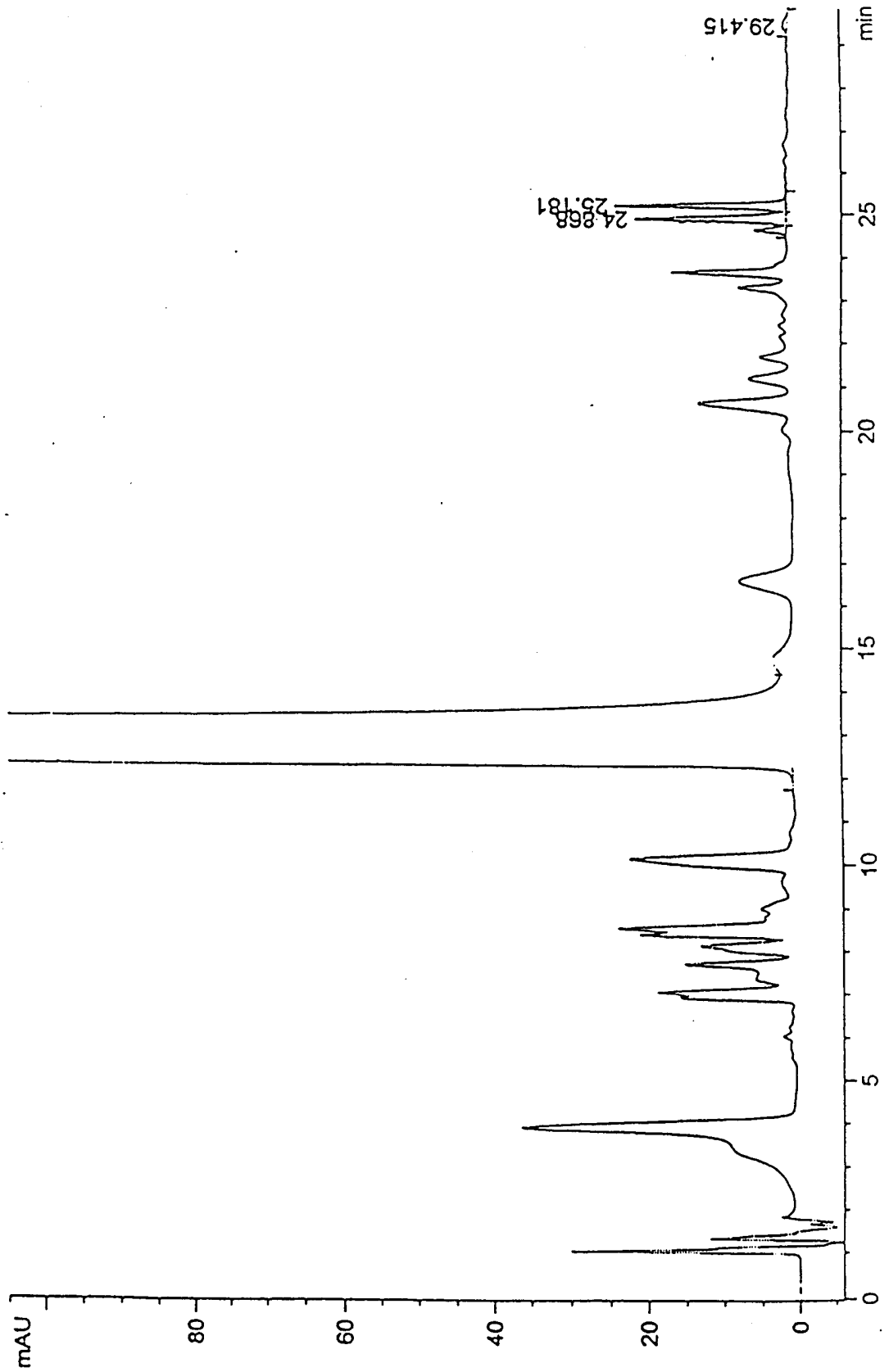
09.01.01 PV 2000-4555



Obr. 1

RV

09.01.01 PV 2000-4555



Obr. 2

22