

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-203**
(22) Přihlášeno: **19.07.1999**
(30) Právo přednosti: **20.07.1998 US 1998/119345**
04.06.1999 US 1999/326093
(40) Zveřejněno: **16.05.2001**
(Věstník č. 5/2001)
(47) Uděleno: **06.06.2007**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **18.07.2007**
(Věstník č. 29/2007)
(86) PCT číslo: **PCT/US1999/016334**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/004016**

(11) Číslo dokumentu:

298 188

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C07D 417/12 (2006.01)
C07D 277/30 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 5 567 823; US 5 541 206; US 5 674 882; US 5 635 523.

(73) Majitel patentu:

ABBOTT LABORATORIES, Abbott Park, IL, US

(72) Původce:

Bauer John F., Lake Bluff, IL, US
Saleki-Gerhardt Azita, Libertyville, IL, US
Narayanan Bikshandarkoil A., Mundelein, IL, US
Chemburkar Sanjay R., Gurnee, IL, US
Patel Ketan, Arlington Heights, IL, US
Spiwek Harry O., Kenosha, WI, US
Bauer Philip E., Grayslake, IL, US
Allen Kimberley A., Trevor, WI, US

(74) Zástupce:

JUDr. Ing. Michal Guttman, Nad Štolou 12, Praha 7,
17000

(54) Název vynálezu:

**Krystalický polymorf ritonaviru a způsob jeho
přípravy**

(57) Anotace:

Popisuje se krystalický polymorf ritonaviru, neboli (2S, 3S, 5S)-5-(N-(N-((N-methyl-N-((2-isopropyl-4-thiazolyl)methyl)amino)karbonyl)-L-valinyl)amino)-2-(N-((5-thiazolyl)methoxykarbonyl)amino)-1,6-difenyl-3-hydroxyhexanu, a způsoby jeho přípravy.

CZ 298188 B6

Krystalický polymorf ritonaviru a způsob jeho přípravy

Oblast techniky

5

Tento vynález se týká nového krystalického polymorfu (2S,3S,5S)-5-(N(N-((N-methyl-N-((2-izopropyl-4-thiazolyl)methyl)amino)karbonyl)-L-valinyl)amino)-2-(N-((5-thiazolyl)methoxykarbonyl)amino)-1,6-difenyl-3-hydroxyhexanu, a způsobů jeho přípravy, jeho použití jako farmaceutického přípravku a farmaceutické kompozice obsahujícího nový krystalický polymorf.

10

Dosavadní stav techniky

Inhibitory proteáz viru lidské imunodeficiencie (HIV) jsou již několik let schváleny pro léčbu infekce HIV. Zvláště účinný inhibitor proteáz HIV je (2S,3S,5S)-5-(N(N-((N-methyl-N-((2-izopropyl-4-thiazolyl)methyl)amino)karbonyl)-L-valinyl)amino)-2-(N-((5-thiazolyl)methoxykarbonyl)amino)-1,6-difenyl-3-hydroxyhexan (ritonavir), který je značen jako NORVIR®. Je známo, že ritonavir má inhibiční účinek na proteázu HIV, inhibuje infekci HIV, inhibuje monooxygenázu cytochromu P450 a zvyšuje farmakokinetiku sloučenin, které jsou metabolizovány monooxygenázou cytochromu P450. Ritonavir je zvláště účinný jako inhibitor HIV infekce, a to je-li použit samotný nebo v kombinaci s jedním nebo více inhibitory reverzní transkriptázy a/nebo s jedním nebo více dalšími inhibitory HIV proteáz.

Ritonavir a způsoby jeho přípravy jsou popsány v patentu US 5 541 206, vydaném 30. července 1996. Tento patent popisuje postupy přípravy ritonaviru, který produkuje krystalický polymorf ritonaviru, nesoucí označení krystalická forma I. Podstatně čistá forma I má práškový difrakční rentgenogram, ¹³C nukleární magnetické rezonanční spektrum pevného stavu, FT blízké infračervené spektrum a FT střední infračervené spektrum, které jsou na obr. 1, 4, 6 a 8. Úhlové pozice (2 theta) charakteristických píků práškového difrakčního rentgenogramu podstatně čisté formy I v Obr. 1 jsou 3,33° ± 0,1°, 6,76° ± 0,1°, 8,33° ± 0,1°, 14,61° ± 0,1°, 16,33° ± 0,1°, 16,76° ± 0,1°, 17,03° ± 0,1°, 18,02° ± 0,1°, 18,62° ± 0,1°, 19,47° ± 0,1°, 19,86° ± 0,1°, 20,25° ± 0,1°, 21,46° ± 0,1°, 23,46° ± 0,1° a 24,36° ± 0,1°.

Další postupy přípravy ritonaviru jsou popsány v patentu US 5 567 823, vydaném 22. října 1996. Postupem popsaným v tomto patentu se také produkuje ritonavir jako krystalická forma I.

Farmaceutické prostředky obsahující ritonavir nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, jsou popsány v patentech US 5 541 206, vydaném 30. července 1996; US 5 484 801, vydaném 16. ledna 1996; US 5 725 878, vydaném 10. března 1998; a US 5 559 158, vydaném 24. září 1996 a v mezinárodní přihlášce WO 98/22106, publikované 28. května 1998 (odpovídající US patentové přihlášce 08/966 495, ze 7. listopadu 1997).

Použití ritonaviru pro inhibici infekce HIV je popsáno v patentu US 5 541 206, vydaném 30. července 1996. Použití ritonaviru v kombinaci s jedním nebo více inhibitory reverzní transkriptázy pro inhibici infekce HIV je popsáno v patentu US 5 635 523, vydaném 3. června 1997. Použití ritonaviru v kombinaci s jedním nebo více inhibitory HIV proteáz pro inhibici infekce HIV je popsáno v patentu US 5 674 882, vydaném 7. října 1997. Použití ritonaviru pro inhibici monooxygenázy cytochromu P450 a zvýšení farmakokinetiky sloučeniny metabolizovaných monooxygenázou cytochromu P450 je popsáno ve spisu WO 97/01349, publikovaném 16. ledna 1997 (odpovídající US přihlášce 08/687 774, ze 26. června 1996).

Neočekávaně se zjistilo, že ritonavir může být připraven jako nový krystalický polymorf, který nese označení krystalická forma II.

Všechny publikace, vydané patenty a patentové přihlášky jsou zde začleněny formou odkazu.

Přehled obrázků na výkresech

5 Obr. 1 je práškový difrakční rentgenogram podstatně čisté formy I krystalického polymorfu rito-
naviru.

Obr. 2 je práškový difrakční rentgenogram podstatně čisté formy II krystalického polymorfu rito-
naviru.

10 Obr. 3 je 400 MHz ^{13}C nukleární magnetické rezonanční spektrum pevné podstatně čisté formy I
krystalického polymorfu rito-
naviru (za účelem porovnání).

Obr. 4 je 400 MHz ^{13}C nukleární magnetické rezonanční spektrum pevné podstatně čisté formy II
krystalického polymorfu rito-
naviru.

15 Obr. 5 je FT blízké infračervené spektrum podstatně čisté formy I krystalického polymorfu
ritonaviru.

20 Obr. 6 je FT blízké infračervené spektrum podstatně čisté formy II krystalického polymorfu
ritonaviru.

Obr. 7 je FT střední infračervené spektrum podstatně čisté formy I krystalického polymorfu rito-
naviru (za účelem porovnání).

25 Obr. 8 je FT střední infračervené spektrum podstatně čisté formy I9 krystalického polymorfu rito-
naviru.

Podstata vynálezu

30 Ve shodě s tímto vynálezem se uvádí nový podstatně čistý krystalický polymorf (2S,3S,5S)-5-
(N(N-((N-methyl-N-((2-izopropyl-4-thiazolyl)methyl)amino)karbonyl)-L-valinyl)amino)-2-
(N-((5-thiazolyl)methoxykarbonyl)amino)-1,6-difenyl-3-hydroxyhexanu (ritonavir). V zájmu
35 identifikace je tento krystalický polymorf nazýván jako forma II krystalického polymorfu rito-
naviru.

Podstatně čistá forma II má práškový difrakční rentgenogram, ^{13}C nukleární magnetické rezonan-
ční spektrum pevného stavu, FT blízké infračervené spektrum a FT střední infračervené spek-
trum, které jsou uvedeny v obr. 2, 4, 6 a 8. 2-theta úhlové pozice charakteristických píků práško-
vého difrakčního rentgenogramu podstatně čisté formy II uvedené na obr. 2 jsou: $8,67^\circ \pm 0,1^\circ$,
40 $9,88^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,11^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,70^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,36^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,78^\circ \pm 0,1^\circ$, $18,40^\circ \pm 0,1^\circ$, $18,93^\circ$
 $\pm 0,1^\circ$, $20,07^\circ \pm 0,1^\circ$, $20,65^\circ \pm 0,1^\circ$, $21,71^\circ \pm 0,1^\circ$ a $25,38^\circ \pm 0,1^\circ$.

Přednostněji, podstatně čistá forma II je charakterizována píky práškového difrakčního rentge-
nogramu majících 2-theta úhlové pozice uvedené na obr. 2: $8,67^\circ \pm 0,1^\circ$, $9,51^\circ \pm 0,1^\circ$, $9,88^\circ$
45 $\pm 0,1^\circ$, $10,97^\circ \pm 0,1^\circ$, $13,74^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,11^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,70^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,36^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,78^\circ \pm 0,1^\circ$,
 $18,40^\circ \pm 0,1^\circ$, $18,93^\circ \pm 0,1^\circ$, $19,52^\circ \pm 0,1^\circ$, $19,80^\circ \pm 0,1^\circ$, $20,07^\circ \pm 0,1^\circ$, $20,65^\circ \pm 0,1^\circ$, $21,49^\circ$
 $\pm 0,1^\circ$, $21,71^\circ \pm 0,1^\circ$, $22,23^\circ \pm 0,1^\circ$, $25,38^\circ \pm 0,1^\circ$, $26,15^\circ \pm 0,1^\circ$ a $28,62^\circ \pm 0,1^\circ$.

50 Podstatně čistá forma II krystalického polymorfu rito-
naviru může být připraven z amorfního rito-
naviru kontaktem amorfního rito-
naviru s C1-C3 alkoholem. Metoda kontaktu může být buď
nasycením amorfni sloučeniny v rozpouštědle při teplotě místnosti a následným stáním směsi po
delší dobu (například, přes noc), nebo rozpuštěním amorfni sloučeniny v rozpouštědle za zvýšené
teploty, nejlépe pod refluxem, následným zchlazením na teplotu místnosti a izolací formy II.

55

V dalším provedení podstatně čistá forma II krystalického polymorfu ritonaviru může být připravena z amorfního ritonaviru přípravou saturovaného roztoku amorfního ritonaviru v C_1-C_3 alkoholu při teplotě místnosti a izolací formy II, která vznikne. V praxi to může být provedeno rozpouštěním dostatečného množství amorfního ritonaviru v C_1-C_3 alkoholu za zvýšené teploty (pod refluxem) tak, že ochlazením roztoku na teplotu místnosti vznikne nasycený roztok, ze kterého precipituje forma II a může být izolována. Preferovaným rozpouštědlem na přípravu formy II je bezvodý ethanol. Izolace výsledné pevné látky poskytne požadovanou formu II.

Podstatně čistý amorfní ritonavir je připraven z formy I krystalického polymorfu ritonaviru táním formy I ritonaviru a následným rychlým zchlazením roztáté látky. Izolace výsledné pevné látky poskytne amorfní ritonavir.

Podstatně čistý amorfní ritonavir může být také připraven pomalým přidáváním roztoku ritonaviru formy I ve vhodném rozpouštědle (methylenchlorid a podobně; nejlépe methylenchlorid) o koncentraci nejlépe okolo 1 g ritonaviru na 1,5 až 2,0 ml rozpouštědla (nejlépe okolo 1 g ritonaviru/ na přibližně 1,5 ml methylenchloridu) do anti-rozpouštědla (například hexan nebo heptan a podobně; nejlépe však hexan) na koncentraci okolo 60 až 110 ml antirozpouštědla/g ritonaviru; nejlépe okolo 85 až 90 ml hexanu/g ritonaviru, a následnou izolací (například filtrací) vzniklé pevné látky.

Podobně, podstatně čistý amorfní ritonavir může být také připraven pomalým přidáváním roztoku ritonaviru formy I ve vhodném rozpouštědle, jako je methanol nebo podobně, o koncentraci okolo 1 g ritonaviru na přibližně 1,5 až 2,0 ml rozpouštědla (nejlépe okolo 1 g ritonaviru/ 1,5 ml methanolu) do antirozpouštědla, jako je methyl *t* butyl ether (MTBE) nebo podobně, na koncentraci okolo 60 až 150 ml antirozpouštědla/g ritonaviru, nejlépe okolo 90 až 110 ml MTBE/g ritonaviru a ještě lépe okolo 100 ml MTBE/g ritonaviru, a následnou izolací (například filtrací) vzniklé pevné látky.

Podstatně čistý amorfní ritonavir může být také připraven pomalým přidáváním roztoku ritonaviru formy I ve vhodném rozpouštědle (např. methanolu a podobně; preferovaný je methanol) o koncentraci okolo 1 g ritonaviru na 1,5 až 2,0 ml rozpouštědla (nejlépe okolo 1 g ritonaviru/přibližně 1,6 ml methanolu) do vody o teplotě okolo 0 °C na koncentraci 400 až 500 ml vody/g ritonaviru (nejlépe okolo 400 ml vody/g ritonaviru), následnou izolací (například filtrací) a sušením výsledné pevné látky.

Podstatně čistý amorfní ritonavir může být také připraven lyofilizací z roztoku ritonaviru formy I. Preferovaná rozpouštědla jsou C_1-C_6 alkoholy. Nejpreferovanějším rozpouštědlem je izobutanol.

Nebo alternativní preferovaný postup: podstatně čistá forma II může být připravena naočkováním roztoku ritonaviru formy I ve vhodném rozpouštědle (nejlépe C_1-C_3 alkohol; ještě lépe ethanol) nerozpustným (2S)-N-((1S)-1 benzyl-2-((4S,5S)-4-benzyl-2 oxo-1,3-oxazolidin-5-yl)ethyl)-2-(((2-izopropyl-1,3-thiazol-4-yl)methyl)amino)karbonyl)amino)-3-methylbutanamidem. V preferované metodě je ritonavir formy I rozpuštěn v ethanolu (nejlépe 200 proof ethanol, *proof* = jednotka stupňovitosti lihu, asi 0,5 %) na koncentraci od okolo 150 g/l do koncentrace okolo 200 g/l, nejlépe okolo 160 g/l. Do roztoku se přidají očkovací krystaly (2S)-N-((1S)-1-benzyl-2-((4S,5S)-4-benzyl-2 oxo-1,3-oxazolidin-5-yl)ethyl)-2-(((2-izopropyl-1,3-thiazol-4-yl)methyl)amino)karbonyl)amino)-3-methylbutanamidu v množství od asi 0,02 g do asi 0,10 g očkovacích krystalů/g ritonaviru. Použité množství očkovacích krystalů je takové, že převyšuje saturační množství v použitém rozpouštědle, což má za následek přítomnost nerozpustných očkovacích krystalů v roztoku ritonaviru. Směs se ponechá stát při teplotě od asi 0 do asi 15 °C (nejlépe okolo 5 °C) po dobu od asi 12 hodin do asi 48 hodin (nejlépe okolo 24 hodin). Výsledný krystalický ritonavir formy II je izolován filtrací.

V další alternativní upřednostňované metodě, podstatně čistá forma II může být připravena rekrystalizací formy I nebo směsí formy I a formy II z roztoku ve vhodném rozpouštědle (napří-

klad ethylacetát nebo izopropylacetát nebo chloroform a jiná rozpouštědla s podobnou dielektrickou konstantou; nejlépe však ethylacetát), naočkováním krystalů formy II a následným přidáním anti-rozpouštědla s podobnou dielektrickou konstantou; preferovaný je heptan). Množství přidaných očkovacích krystalů je takové, že převyšuje saturační množství v použitém rozpouštědle, co má za následek stálou přítomnost nerozpustných očkovacích krystalů v roztoku ritonaviru. V preferovaném postupu se ritonavir (forma I nebo směs formy I a formy II) rozpustí v ethylacetátu (od 4,0 l do okolo 6,0 l/kg ritonaviru) za zvýšené teploty (při teplotě od asi 65 do teploty okolo 70 °C). Roztok se pomalu zchladí na teplotu asi 55 až asi 50 °C, nejlépe na teplotu okolo 52 °C. Přidají se očkovací krystaly ritonaviru formy II (od 0,5 g očkovacích krystalů formy II/kg ritonaviru do 10,0 g očkovacích krystalů formy II/kg ritonaviru, nejlépe přibližně 1,25 g očkovacích krystalů formy II/g ritonaviru) a směs se míchá po dobu 1 hodiny při teplotě od asi 55 do asi 50 °C, nejlépe při teplotě přibližně 52 °C. Množství přidaných očkovacích krystalů je takové, že převyšuje saturační množství v použitém rozpouštědle, co má za následek stálou přítomnost nerozpustných očkovacích krystalů v roztoku ritonaviru. Přidá se heptan (přibližně 1,0 l/kg ritonaviru až asi 4,0 l/kg ritonaviru; nejlépe však okolo 2,8 l/kg ritonaviru) za stálého míchání a směs se nechá pomalu chladit na přibližně 25 °C, poté se míchá po dobu nejméně 12 hodin při teplotě asi 25 °C. Produkt se izoluje filtrací/centrifugací a suší se za tepla pod vakuem. Ve výrobním měřítku (300 až 400 kg dávek), se zjistilo, že izolace filtrací/centrifugací je značně rychlejší pro formu II než pro odpovídající množství formy I (16 hodin oproti 24 až 30 hodinám).

Bylo také zjištěno, že forma II nebo směsi formy II a formy I mohou být převedeny na podstatně čistou formu I rozpuštěním za tepla formy II nebo směsi formy II a formy I ve vhodném rozpouštědle (například ethylacetát nebo izopropylacetát a podobně; nejlépe však ethylacetát) na koncentraci 1 kg ritonaviru/4 l rozpouštědla (nejlépe ethylacetát). Horký roztok ritonaviru se pomalu přidá (nejlépe přes filtr) do kašovitě suspenze očkovacích krystalů ritonaviru formy I (asi 0,5 až asi 10 hmotnostních % vztaženo na množství ritonaviru formy II nebo směsi formy II a formy I; lépe okolo 0,5 až asi 5 hmotnostních % a nejlépe 0,5 až 1 hmotnostních %) ve vhodném antirozpouštědle (například heptan nebo hexan a podobně; nejlépe však heptan) na koncentraci okolo 1 kg ritonaviru (forma II nebo směs formy II a formy I) na přibližně 4 až 8 l antirozpouštědla (nejlépe 1 kg ritonaviru (forma II nebo směs formy II a formy I)/přibližně 4 l heptanu). Směs se zchladí na teplotu okolo 20 °C a míchá se po dobu nejméně 3 hodiny. Izoluje se (například filtrací) a sušením výsledné pevné látky se získá ritonavir formy I.

Následující příklady se zde uvádějí pro naznačení přípravy nových forem ritonaviru podle tohoto vynálezu a převedení formy II na formu I.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava amorfního ritonaviru

Krystalický polymorf ritonavir formy I (100 g) se nechá roztát zahříváním při 125 °C. Roztátý polymorf se udržuje při teplotě 125 °C po dobu 3 hodin. Poté se rychle zchladí umístěním kontejneru s polymorfem do Dewarovy nádoby s tekutým dusíkem. Vzniklá sklovina se rozmělní pomocí hmoždíře a tloučku, čímž se získá amorfní ritonavir (100 g). Prášková difrakční rentgenová analýza potvrdí, že produkt je amorfní. Diferenciálně snímanou kalorimetrickou analýzou se stanoví bod skelného přechodu, a to od asi 45 do přibližně 49 °C. (Měření začalo při 45,4 a skončilo při 49,08 °C, se středem při 48,99 °C).

Příklad 2

Příprava krystalického ritonaviru (forma II)

Amorfní ritonavir (40,0 g) se rozpustí ve vroucím bezvodém ethanolu (100 ml). Zchladnutím roztoku na teplotu místnosti se získá nasycený roztok. Roztok se ponechá stát přes noc při teplotě místnosti a vzniklá pevná látka se izoluje ze směsi filtrací a suší se na vzduchu, čímž se získá forma II (přibližně 24,0 g).

Příklad 3

Příprava (2S)-N-((1S)-1-benzyl-2-((4S,5S)-4-benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl)ethyl)-2-(((2-izopropyl-1,3-thiazol-4-yl)methyl)amino)karbonyl)amino)-3-methylbutanamidu

Příklad 3a

Příprava (4S,5S)-5-((2S)-2-t-butyloxykarbonylamino-3-fenylpropyl)-4-benzyl-1,3-oxazolidin-2-onu

Sůl (2S,3S,5S)-2-amino-3-hydroxy-5-t-butyloxykarbonylamino-1,6-difenylhexansukcinátu (30 g, 63 mmol; patent US 5 654 466), ((5-thiazolyl)methyl)-(4-nitrofenyl)karbonáthydrochlorid (22,2 g; Patent US 5 597 926) a hydrogenuhličitan sodný (16,2 g) se smísí s 300 ml vody a 300 ml ethylacetátu a směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 30 minut. Poté se oddělí organická vrstva a zahřívá se při 60 °C po dobu 12 hodin. Poté se míchá při 20 až 25 °C po dobu 6 hodin a přidají se 3 ml hydroxidu amonného (29% amoniak ve vodě) a směs se míchá po dobu 1,5 hodiny. Výsledná směs se promyje 4 x 200 ml 10% vodným uhličitánem draselným a organická vrstva se oddělí a odpaří pod vakuem do vzniku oleje. Olej se suspenduje v 250 ml heptanu. Heptan se odpaří pod vakuem, čímž se získá žlutá pevná látka. Žlutá pevná látka se rozpustí ve 300 ml THF a přidá se 25 ml 10% vodného hydroxidu sodného. Po třech hodinách míchání se směs upraví na pH 7 přidávkem 4N HCl (kolo 16 ml). THF se odpaří pod vakuem do vzniku vodného zbytku, do kterého se přidá 300 ml destilované vody. Po zamíchání vznikne jemná suspenze pevných látek. Pevná látka se shromáždí filtrací a zfiltrovaná pevná látka se promyje vodou (1400 ml) v několika dávkách. Výsledkem je požadovaný produkt.

Příklad 3b

Příprava (4S,5S)-5-((2S)-2-amino-3-fenylpropyl)-4-benzyl-1,3-oxazolidin-2-onu

Surový mokrý produkt z příkladu 3a se rozmělní v 1 N HCl (192 ml) a kaše se zahřeje na 70 °C za stálého míchání. Po hodině se přidá THF (100 ml) a míchání pokračuje při 65 °C po dobu 4 hodiny. Směs se poté nechá vychladnout na teplotu 20 až 25 °C a míchá se při této teplotě přes noc. THF se odstraní odpařením pod vakuem a výsledný vodný roztok se zchladí na teplotu okolo 5 °C, což zapříčiní částečné srážení. Vodná směs se upraví na pH 7 přidávkem 50 % vodného hydroxidu sodného (přibližně 18,3 g). Výsledná směs se extrahuje ethylacetátem (2 x 100 ml) při teplotě okolo 15 °C. Spojené organické extrakty se promyjí 100 ml solanky a organická vrstva se oddělí a míchá se síranem sodným (5 g) a Darco G-60 (3 g). Tato směs se ohřívá na horké plotně po dobu 1 hodina při 45 °C. Horká směs se zfiltruje přes vrstvu křemeliny a filtrační podložka se promyje ethylacetátem (100 ml). Filtrát se odpaří pod vakuem, čímž se získá olej. Olej se znovu rozpustí v methylenchloridu (300 ml) a rozpouštědlo se odpaří pod vakuem. Výsledný olej se suší při pokojové teplotě pod vakuem. Získá se požadovaný produkt (18,4 g) jako sklovitý sirup.

Příklad 3c

Příprava (2S)-N-((1S)-1-benzyl-2-((4S,5S)-4-benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl)ethyl)-2-(((2-izopropyl-1,3-thiazol-4-yl)methyl)amino)karbonyl)amino)-3-methylbutanamidu

5 N-((N-methyl-N((2-izopropyl-4-thiazolyl)methyl)amino)karbonyl)-L- valin (10,6g, 33,9 mmol; patent US 5 539 122 a mezinárodní patentová přihláška WO 98/00410), produkt z příkladu 3b (10,0 g, 32,2 mmol) a l-hydroxybenzotriazol (5,2 g, 34 mmol) se rozpustí v THF (200 ml). Poté se přidá 1,3-dicyklohexylkarbodiimid (DCC, 7,0 g, 34 mmol) do THF směsi
10 a směs se míchá při 22 °C po dobu 4 hodiny. Přidá se kyselina citrónová (25 ml 10% vodný roztok) a míchání pokračuje po dobu 30 minut. THF se poté odpaří pod vakuem. Zbytek se rozpustí v ethylacetátu (250 ml) a promyje se 10% roztokem kyseliny citrónové (175 ml). Pro zrychlení separace vrstev se přidá NaCl (5 g). Organická vrstva se postupně promyje 10% vodným uhličitá-
15 nem sodným (2 x 200 ml) a vodou (200 ml). Organická vrstva se poté suší nad síranem sodným (20 g), zfiltruje se a odpaří pod vakuem. Výsledný produkt (20,7 g pěny) se rozpustí v horkém ethylacetátu (150 ml) a poté se přidá heptan (75 ml). Po zchlazení se přidá dalších 75 ml heptanu a směs se zahřívá pod refluxem. Po zchlazení na teplotu místnosti se ne vytvoří žádný precipitát. Rozpouštědla se odpaří pod vakuem a zbytek se znovu rozpustí ve směsi 200 ml ethylacetátu/100 ml heptanu. Malé množství nerozpustné pevné látky se odstraní filtrací. Filtrát se odpaří
20 pod vakuem a zbytek se rozpustí ve směsi 100 ml ethylacetátu/50 ml heptanu, čímž vznikne čirý roztok. Roztok se ochladí na -10 °C, čímž se vytvoří bílý precipitát. Směs se ponechá stát při -15 °C po dobu 24 hodin. Výsledná pevná látka se shromáždí filtrací, promyje směsí 1 : 1 ethylacetát/heptan (2 x 24 ml) a suší se ve vakuové peci při 55 °C. Získá se požadovaný produkt jako běžová pevná látka (16,4 g).

25 ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 7,84 (1H, dublet J = 8,6), 7,71 (1H, singlet), 7,32 – 7,11 (11H, multiplet), 6,09 (1H, dublet, J = 8,5), 4,51 (1H AB J = 16, 2), 4,43 (1H AB J = 16,2), 4,22 (1H, multiplet), 4,07 (1H, multiplet), 3,96 (1H, dublet dubletu J = 7,3, 7,4), 3,65 (1H, multiplet), 3,23 (1H, septuplet J = 6,9), 2,89 (3H, singlet), 2,84 – 2,60 (4H, multiplet), 1,94 (1H, multiplet), 1,76 – 1,49
30 (2H, multiplet), 1,30 (6H, dublet J = 6,9), 0,80 (3H, dublet J = 5,8), 0,77 (3H, dublet J = 5,8).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 177,2, 171,5, 157,6, 157,5, 152,8, 138,3, 136,5, 129,5, 129,2, 128,2, 128,0, 126,4, 126,0, 114,0, 77,2, 59,9, 57,6, 48,2, 46,2, 40,4, 40,1, 39,1, 34,5, 32,4, 30,3, 22,8, 22,8, 19,4, 18,3.

Příklad 4

Příprava krystalického ritonaviru (forma II)

40 Do roztoku 1,595 g ritonaviru formy I v 10 ml 200 proof ethanolu se přidá takové množství produktu z příkladu 3c (přibližně 50 mikrogramů), že se nerozpustí všechny přidané produkty příkladu 3c. Tato směs se ponechá stát při teplotě 5 °C po dobu 24 hodiny. Výsledné krystaly se izolují filtrací skrz 0,45 mikronový nylonový filtr a suší se na vzduchu, čímž se získá ritonavir formy II.

Příklad 5

Alternativní příprava krystalického ritonaviru (forma II)

50 Ethylacetát (6,0 L/kg ritonaviru) se přidá do ritonaviru (forma I nebo směs formy I a formy II) v reakční nádobě. Směs se míchá a zahřívá 70 °C dokud se všechna pevná látka nerozpustí. Roztok se zfiltruje (použitím centrifugační pumpy a 5x20 palců filtrů majících pórovitost 1,2 mikronů) a filtrát se zchladí na 52 °C rychlostí 2 až 10 °C/hodinu. Do tohoto roztoku se přidá takové
55 množství očkovacích krystalů ritonaviru formy II (okolo 1,25 g očkovacích krystalů formy II/kg

ritonaviru), že se všechny krystaly nerozpustí a směs se míchá při 52 °C po dobu ne méně než 1 hodina při třepací rychlosti 15 ot/min. Směs se poté zchladí na 40 °C rychlostí 10 °C/hodinu. Přidá se heptan (2,8 l/kg ritonaviru) při rychlosti 7 l/minutu za stálého míchání. Směs se nechá zchladit na 25 °C rychlostí 10 °C/hodina za stálého míchání. Poté se směs míchá po dobu ne méně než 12 hodin při 25 °C. Produkt se izoluje filtrací, použije se centrifuga Heinkelova typu (pracovní doba přibližně 16 hodin). Produkt se suší při 55 °C pod vakuem (50 mm Hg) po dobu 16 až 25 hodin, čímž se získá krystalický ritonavir formy II.

10 Porovnávací příklad 6

Příprava amorfního ritonaviru

Ritonavir formy I (40 g) se rozpustí v methylenchloridu (60 ml). Tento roztok se pomalu přidává po dobu 15 minut do baňky s kulatým dnem, vybavené vrchním míchadlem a obsahující hexany (3,5 l). Výsledná kaše se ponechá v chladu po dobu 10 minut. Precipitát se zfiltruje a suší se při teplotě místnosti ve vakuové peci, čímž se získá amorfní ritonavir (40 g).

20 Porovnávací příklad 7

Příprava amorfního ritonaviru

Ritonavir formy I (5 g) se rozpustí v methanolu (8 ml). Tento roztok se pomalu přidá do baňky s kulatým dnem vybavené vrchním míchadlem a obsahující destilovanou vodu (2 l), po tuto dobu se vnitřní teplota udržuje blízko teploty 0 °C. Výsledná pevná látka se zfiltruje, čímž se získá lep-
kavá pevná látka, která se suší ve vakuové peci při 20 až 25 °C po dobu 12 až 18 hodin. Získá se amorfní ritonavir (2,5 g).

30 Porovnávací příklad 8

Příprava ritonaviru formy I

Ritonavir forma II (1 kg) se přidá do reaktoru (A) a následně se přidá ethylacetát (4 l). Tato směs se refluxuje dokud se všechna pevná látka nerozpustí. Do odděleného reaktoru (B) se přidá takové množství očkovacích krystalů ritonaviru formy I (5 g), následovaných přidavkem heptanu (4 l), že všechny očkovací krystaly se nerozpustí. Tato směs (kaše) se míchá při 23 °C ± 5 °C.

Horký roztok z reaktoru A se pomalu filtruje, použitím 0,2 mikronové filtrační vložky, do směsi v reaktoru B po dobu ne méně než 2 hodiny. Výsledná kaše v reaktoru B se zchladí na 20 °C a míchá se po dobu ne méně než 3 hodiny. Výsledná kaše se zfiltruje, zfiltrovaná pevná látka se promyje heptanem a poté se suší ve vakuové peci při 65 °C. Získá se ritonavir formy I.

Preferované farmaceutické kompozice obsahující ritonavir, speciálně ritonavir formy II, mají následující složení, zapouzdřené v jemné elastické želatinové kapsli.

Ritonavir formy II	100,0 mg
Ethanol, bezvodý	120,0 mg
50 Olejová kyselina	709,75 mg
Butylovaný hydroxytoluen	0,25 mg
Polyoxyl 35 ricínový olej (Cremophor EL [®])	60,0 mg
Voda	10,0 mg

Preferované kompozice mohou být připraveny následující metodou.

Následující protokol je použit pro přípravu 1000 jemných želatinových kapslí:

5

	Hmotnost (mg/kapsle)	Název	Množství (g)
	Q. S.	Dusík, N. F.	Q. S.
10	118,0	Ethanol, absolutní, USP, 200 Proof	118,0
	2,0	Ethanol, absolutní, USP, 200 Proof	2,0
	0,25	Butylovaný hydroxytoluen, NF	0,25
15	704,75	Olejová kyselina, NF	704,75
	100,0	Ritonavir forma II	100,0
	10,0	Voda, přečištěná, USP (destilovaná)	10,0
	60,0	Polyoxyl 35 ricinový olej, NF	60,0
	5,000	Olejová kyselina, NF	5,000

20

Pozn.: Q.S. = pokud stačí.

25

30

Mísicí tank a vhodný kontejner se propláchne dusíkem. Naváží se 118,0 g ethanolu, překryje se dusíkem a uchová se pro pozdější použití. Poté se naváží druhý podíl ethanolu (2 g) a míchá se s 0,25 g butylovaného hydroxytoluenu dokud se nevyjasní. Směs se překryje dusíkem a uschová se. Hlavní mísicí tank se zahřeje na 28 °C (ne více než 30 °C). 704,75 g olejové kyseliny se poté přelije do mísicího tanku. 100,0 g ritonaviru formy II se poté přidá do olejové kyseliny a míchá se. Poté se přidá ethanol/butylovaný hydroxytoluen do mísicího tanku a poté se přidává předtím navážených 118,0 g ethanolu a míchá se po dobu nejméně 10 minut. Poté se do tanku přelije 10 g vody a míchá se dokud se roztok nevyčechří (ne méně než 30 minut). 60,0 g Polyoxyl 35 ricinového oleje se přelije do tanku a míchá se dokud se homogenizuje. Roztok se uchová při 2 až 8 °C dokud se nevloží do kapslí. Podle postupu popsáném v mezinárodní patentové přihlášce WO 98/22106 se každá jemná želatinová kapsle naplní 1,0 g roztoku a jemné želatinové kapsle se poté suší a uchovávají při 2 až 8 °C.

35

40

45

Jak zde bylo použito, termín „podstatně čistý“, je-li použit ve vztahu k polymorfu ritonaviru, se týká polymorfu ritonaviru, formy I nebo formy II, jehož čistota je vyšší než okolo 90 %. To znamená, že polymorf ritonaviru neobsahuje více než asi 10 % kterýchkoliv jiných sloučenin a zvláště pak neobsahuje více než asi 10 % žádné jiné formy ritonaviru. Přednostněji termín „podstatně čistý“ se týká polymorfu ritonaviru, formy I nebo formy II, jehož čistota je vyšší než asi 95 %. To znamená, že polymorf ritonaviru neobsahuje více než asi 5 % kterýchkoliv jiných sloučenin a zvláště pak neobsahuje více než asi 5 % žádné jiné formy ritonaviru. Ještě lépe termín „podstatně čistý“ se týká polymorfu ritonaviru, formy I nebo formy II, jehož čistota je vyšší než asi 97 %. To znamená, že polymorf ritonaviru neobsahuje více než asi 3 % kterýchkoliv jiných sloučenin a zvláště pak neobsahuje více než asi 3 % žádné jiné formy ritonaviru.

50

Rentgenová difrakční analýza práškových vzorků byla provedena následujícím způsobem. Vzorky pro rentgenovou difrakční analýzu se připraví rozprostřením práškového vzorku (bez nutného předchozího roztření) do tenké vrstvy na držáku vzorků a jemným zarovnáním vzorku mikroskopickým podložním sklíčkem. Byl použit Nicolet 12/V rentgenový difrakční systém s následujícími parametry: zdroj rentgenového záření: Cu-K α 1; rozsah: 2,00 – 40,00° 2 theta; snímací

rychlost: 1,00 stupeň/minutu; velikost kroku: 0,02 stupně; vlnová délka: 1,540562 angstromů, tj. $1,540562 \cdot 10^{-10}$ m.

Charakteristické pozice piků práškové rentgenové difrakce jsou pro polymorfy uvedeny v termínech úhlové pozice (2 theta) s přípustnou variabilitou $\pm 0,1^\circ$. Tato přípustná variabilita je specifikována v US Pharmacopeia, strany 1843-1844 (1995). Variabilita $\pm 0,1^\circ$ má smysl při porovnávání dvou práškových difrakčních rentgenogramů. V praxi, jestliže je difrakční vzorový pík z jednoho vzorku stanoven rozsahem úhlových poloh (2 theta), tedy měřená poloha píku je $\pm 0,1^\circ$ a difrakční vzorový pík z jiného vzorku je určen rozsahem úhlových poloh (2 theta), tedy měřená poloha píku je $\pm 0,1^\circ$ a pokud se tyto rozsahy poloh piků překrývají, pak se uvažuje, že tyto dva píky mají stejnou úhlovou polohu (2 theta). Například, jestliže je difrakční vzorový pík z jednoho vzorku určen polohou $5,20^\circ$, pro účely srovnání přípustná variabilita dovoluje, aby byl pík určen polohou v rozsahu $5,10^\circ$ až $5,30^\circ$. Jestliže je srovnávací pík z jiného difrakčního vzorku určen polohou píku $5,35^\circ$, pro účely srovnání přípustná variabilita dovoluje, aby byl pík určen polohou v rozsahu $5,25^\circ$ až $5,45^\circ$. Protože je zde překrytí mezi dvěma rozsahy poloh piků (tj., $5,10^\circ$ až $5,30^\circ$ a $5,25^\circ$ až $5,45^\circ$) tyto dva srovnávané píky jsou uvažovány jako píky se stejnou úhlovou polohou (2 theta).

Nukleární magnetická rezonanční analýza pevných vzorků byla provedena následujícím způsobem. Byl použit přístroj Bruker AMX-400 MHz s následujícími parametry: CP – MAS (příčné polarizovaný magický úhel rotace); frekvence spektrometru pro ^{13}C : 100,627952576 MHz; pulzní sekvence: cp2lev; kontaktní doba: 2,5 milisekund; teplota: $27,0^\circ\text{C}$; spinový poměr: 7000 Hz; relaxační prodleva: 6,000 sekund; šířka 1. impulsu: 3,8 mikrosekund; šířka 2. impulsu: 8,6 mikrosekund; akviziční čas: 0,034 sekund; šířka rozmitání 30303,0 Hz; 2000 snímků.

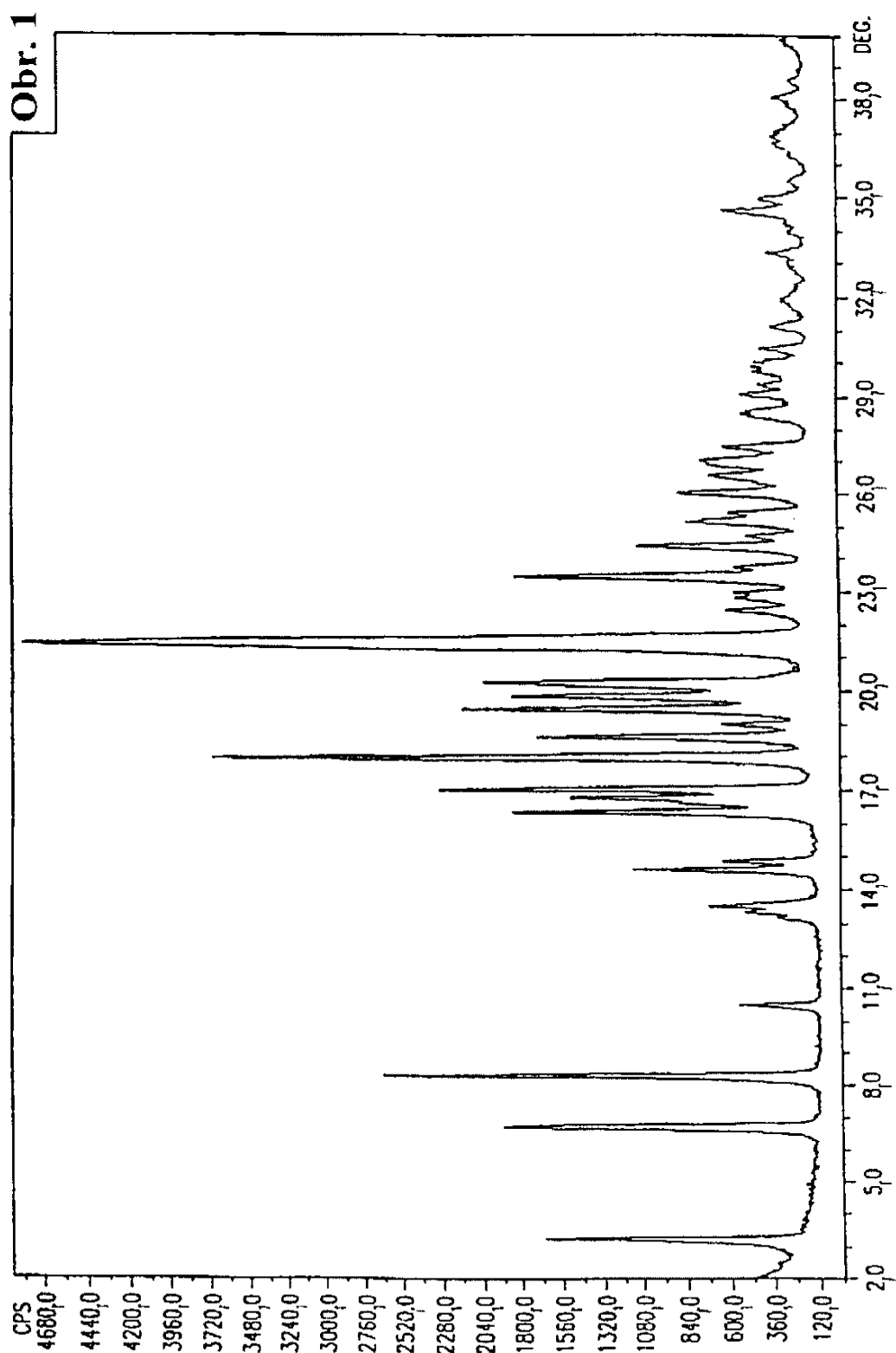
FT blízká infračervená analýza vzorků byla provedena následujícím způsobem. Vzorky byly analyzovány jako bez příměsí, naředěné prášky v čisté skleněné lékovce objemu $3,55\text{cm}^3$. Byl použit Nicolet Magna System 750 FT-IR spektrometr s přístrojem blízké infračervené oblasti Nicolet SabIR s optovláknovou sondou mající následující parametry: zdroj: bílé světlo, detektor: PbS; rozdělovač světla: CaF_2 ; rozteč vzorku: 1,0000; digitizer bitů: 20; rychlost zrcadla: 0,3165; apertura: 50,00; zisk vzorku: 1,0; horní propustný filtr: 200,0000; dolní propustný filtr: 11000,0000; počet měření vzorku: 64; délka snímání 75,9 sekund; rozlišení: 8,000; počet měřených bodů: 8480; počet bodů FFT: 8192; frekvence laseru: $15798,0\text{ cm}^{-1}$; pozice píku interferogramu: 4096; apodizace: Happ–Genzel; počet měření pozadí: 64 a zisk pozadí: 1,0.

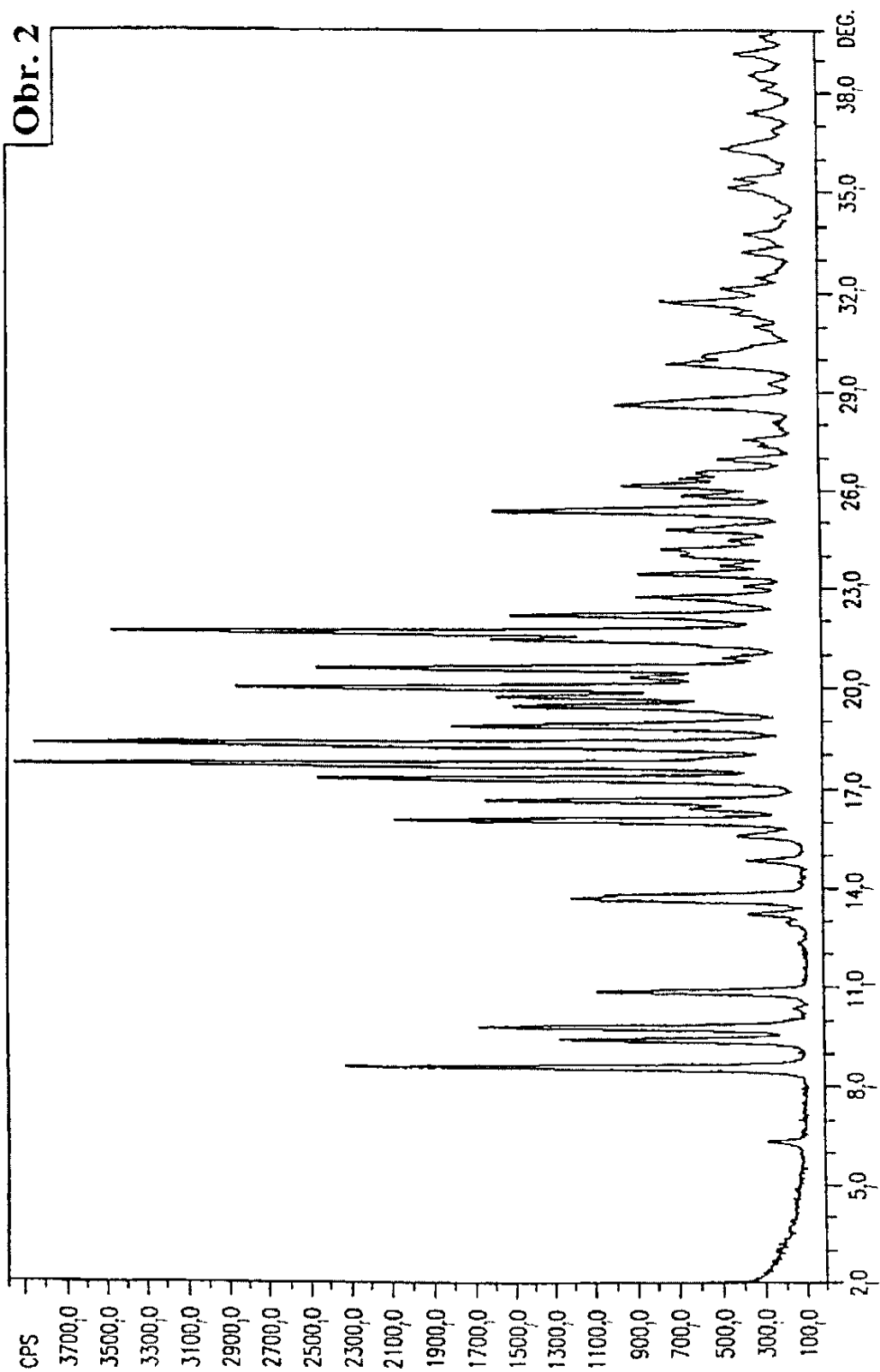
FT střední infračervená analýza vzorků byla provedena následujícím způsobem. Vzorky byly analyzovány jako bez příměsí, naředěné prášky. Byl použit Nicolet Magna System 750 FT-IR spektrometr se Spectra-Tech InspectIR video-microanalytickým příslušenstvím a Germaniový krystal s utlumenou totální odrazovostí (Ge ATR) s následujícími parametry: infračervený zdroj; detektor MCT/A; rozmitač svazku KBr; vzdálenost vzorků: 2,0000; digitizer bitů: 20; zrcadlová rychlost: 1,8988; apertura: 100,00; zisk vzorku: 1,0; horní propustný filtr: 200,0000; dolní propustný filtr: 20000,0000; počet snímků vzorku: 128; délka snímání: 79,9 sekund; rozlišení: 4,000; počet snímáných bodů: 8480; počet FFT bodů: 8192; laserová frekvence: $15798,0\text{ cm}^{-1}$; pozice píku interferogramu: 4096; apodizace: trojúhelníková; počet snímků pozadí: 128 a zisk pozadí 1,0.

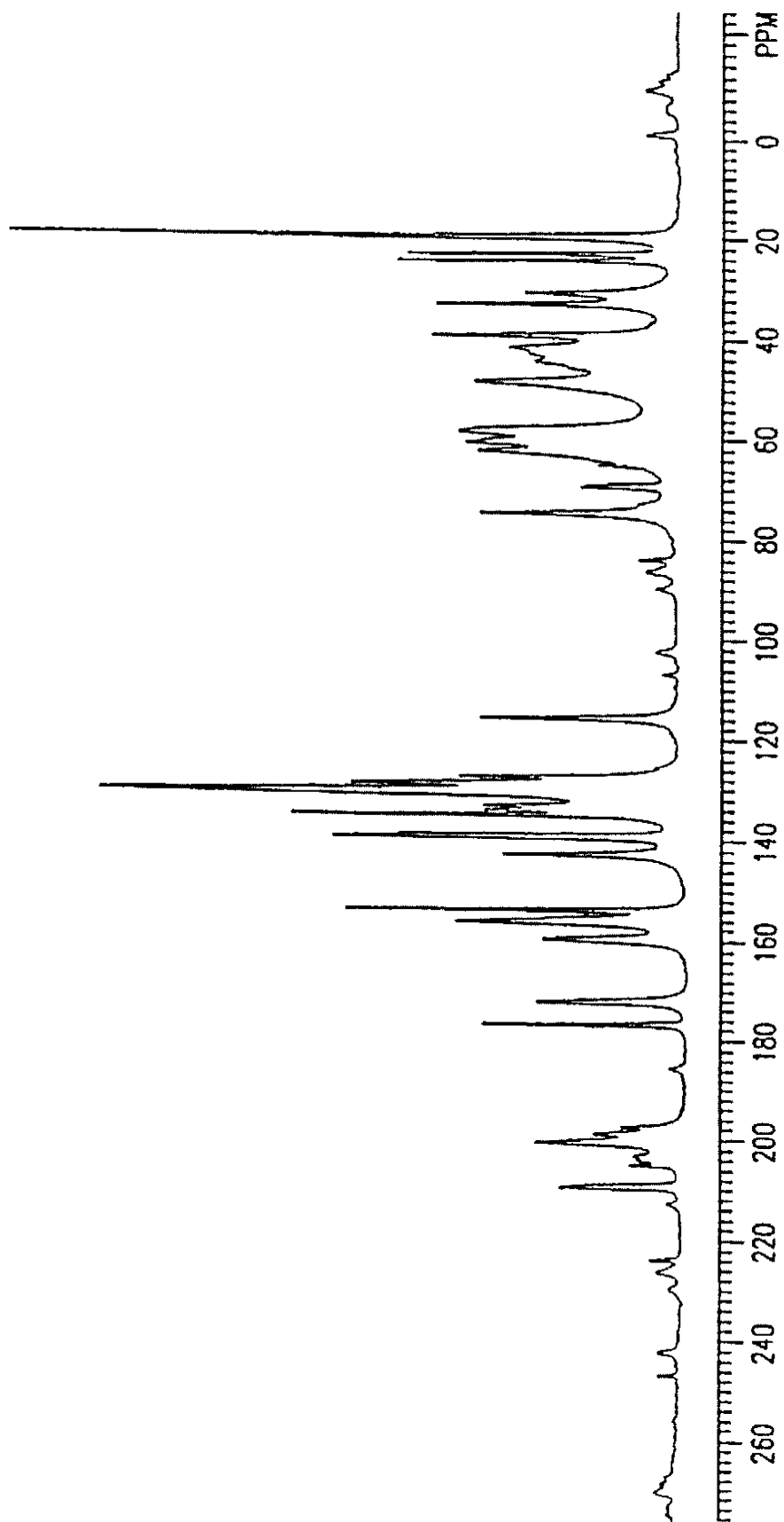
Diferenciálně snímaná kalorimetrická analýza vzorků byla provedena následujícím způsobem: Byl použit A.T.A. Teplotní Analyzátor 3100 s diferenciálním kalorimetrickým modulem 2910 společně s Modulovaným DSC softwarem verze 1,1A. Parametry analýzy: hmotnost vzorku: 2,28 mg, vzorek umístěn v kryté neizolované hliníkové misce; rychlost zahřívání: od pokojové teploty do 150°C při $5^\circ\text{C}/\text{minutu}$ při dusíkovém zavzdušnění.

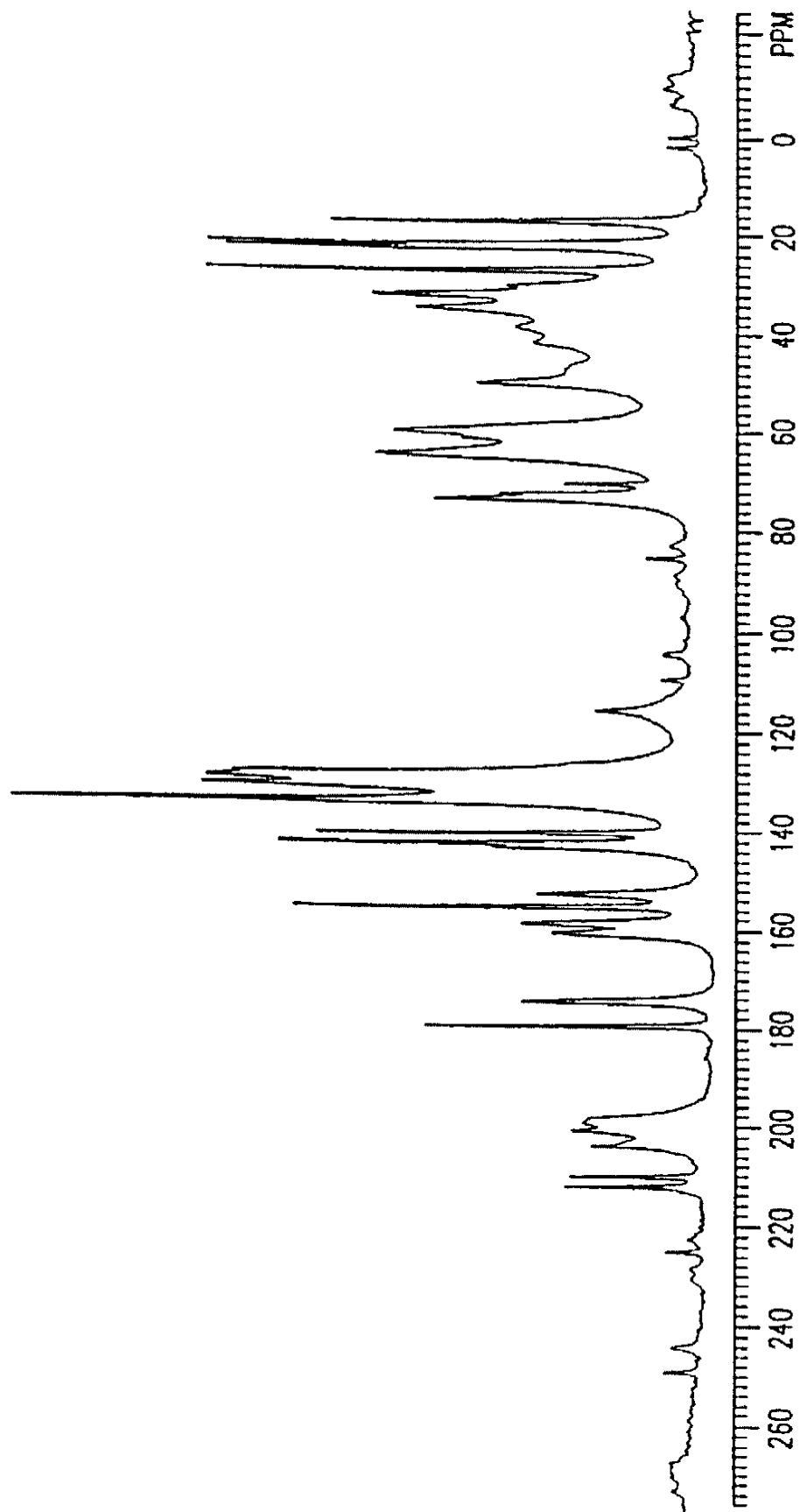
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Krystalický polymorf (2S,3S,5S)-5-(N-(N-((N-methyl-N-((2-izopropyl-4-thiazolyl)-methyl)amino)karbonyl)-L-valinyl)amino)-2-(N-((5-thiazolyl)methoxykarbonyl)amino)-1,6-difenyl-3-hydroxyhexanu nazývaný ritonavir, s charakteristickými píky práškového difrakčního rentgenogramu s hodnotami 2 theta: $8,67^\circ \pm 0,1^\circ$, $9,88^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,11^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,70^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,36^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,78^\circ \pm 0,1^\circ$, $18,40^\circ \pm 0,1^\circ$, $18,93^\circ \pm 0,1^\circ$, $20,07^\circ \pm 0,1^\circ$, $20,65^\circ \pm 0,1^\circ$, $21,71^\circ \pm 0,1^\circ$ a $25,38^\circ \pm 0,1^\circ$.
2. Krystalický polymorf podle nároku 1, s charakteristickými píky v práškovém difrakčním rentgenogramu s hodnotami 2 theta: $8,67^\circ \pm 0,1^\circ$, $9,51^\circ \pm 0,1^\circ$, $9,88^\circ \pm 0,1^\circ$, $10,97^\circ \pm 0,1^\circ$, $13,74^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,11^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,70^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,36^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,78^\circ \pm 0,1^\circ$, $18,40^\circ \pm 0,1^\circ$, $18,93^\circ \pm 0,1^\circ$, $19,52^\circ \pm 0,1^\circ$, $19,80^\circ \pm 0,1^\circ$, $20,07^\circ \pm 0,1^\circ$, $20,65^\circ \pm 0,1^\circ$, $21,49^\circ \pm 0,1^\circ$, $21,71^\circ \pm 0,1^\circ$, $22,23^\circ \pm 0,1^\circ$, $25,38^\circ \pm 0,1^\circ$, $26,15^\circ \pm 0,1^\circ$ a $28,62^\circ \pm 0,1^\circ$.
3. Krystalický polymorf (2S,3S,5S)-5-(N-(N-((N-methyl-N-((2-izopropyl-4-thiazolyl)-methyl)amino)karbonyl)-L-valinyl)amino)-2-(N-((5-thiazolyl)methoxykarbonyl)amino)-1,6-difenyl-3-hydroxyhexanu, nazývaný ritonavir, o čistotě větší než 90 % s charakteristickými píky práškového difrakčního rentgenogramu s hodnotami 2 theta: $8,67^\circ \pm 0,1^\circ$, $9,88^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,11^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,70^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,36^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,78^\circ \pm 0,1^\circ$, $18,40^\circ \pm 0,1^\circ$, $18,93^\circ \pm 0,1^\circ$, $20,07^\circ \pm 0,1^\circ$, $20,65^\circ \pm 0,1^\circ$, $21,71^\circ \pm 0,1^\circ$ a $25,38^\circ \pm 0,1^\circ$.
4. Krystalický polymorf o čistotě větší než 90 % podle nároku 3, s charakteristickými píky práškovém difrakčním rentgenogramu s hodnotami 2 theta: $8,67^\circ \pm 0,1^\circ$, $9,51^\circ \pm 0,1^\circ$, $9,88^\circ \pm 0,1^\circ$, $10,97^\circ \pm 0,1^\circ$, $13,74^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,11^\circ \pm 0,1^\circ$, $16,70^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,36^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,78^\circ \pm 0,1^\circ$, $18,40^\circ \pm 0,1^\circ$, $18,93^\circ \pm 0,1^\circ$, $19,52^\circ \pm 0,1^\circ$, $19,80^\circ \pm 0,1^\circ$, $20,07^\circ \pm 0,1^\circ$, $20,65^\circ \pm 0,1^\circ$, $21,49^\circ \pm 0,1^\circ$, $21,71^\circ \pm 0,1^\circ$, $22,23^\circ \pm 0,1^\circ$, $25,38^\circ \pm 0,1^\circ$, $26,15^\circ \pm 0,1^\circ$ a $28,62^\circ \pm 0,1^\circ$.
5. Způsob přípravy krystalického polymorfu o čistotě větší než 90 % podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje naočkování roztoku ritonaviru očkovacími krystaly (2S)-N-((1S)-1-benzyl-2-((4S,5S)-4-benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl)ethyl)-2-(((2-izopropyl-1,3-thiazol-4-yl)methyl)amino)karbonyl)amino)-3-methylbutanamidu v takovém množství, že v roztoku ritonaviru jsou nerozpuštěné očkovací krystaly.
6. Způsob přípravy krystalického polymorfu o čistotě větší než 90 % podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje naočkování roztoku ritonaviru v C_1-C_3 alkoholu očkovacími krystaly (2S)-N-((1S)-1-benzyl-2-((4S,5S)-4-benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl)ethyl)-2-(((2-izopropyl-1,3-thiazol-4-yl)methyl)amino)karbonyl)amino)-3-methylbutanamidu v takovém množství, že v roztoku ritonaviru jsou nerozpuštěné očkovací krystaly.
7. Způsob podle nároku 6, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že C_1-C_3 alkohol je ethanol.
8. Způsob přípravy krystalického polymorfu o čistotě větší než 90 % podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje naočkování roztoku ritonaviru očkovacími krystaly ritonaviru formy II a s následným přidáním anti-rozpouštědla.
9. Způsob přípravy krystalického polymorfu o čistotě větší než 90 % podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje naočkování roztoku ritonaviru v ethylacetátu očkovacími krystaly ritonaviru formy II a s následným přidáním heptanu.
10. Způsob přípravy krystalického polymorfu o čistotě větší než 90 % podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje naočkování roztoku ritonaviru v ethylacetátu při teplotě od 50 do 55 °C očkovacími krystaly ritonaviru formy II a následným přidáním heptanu a zchlazením na teplotu 25 °C.

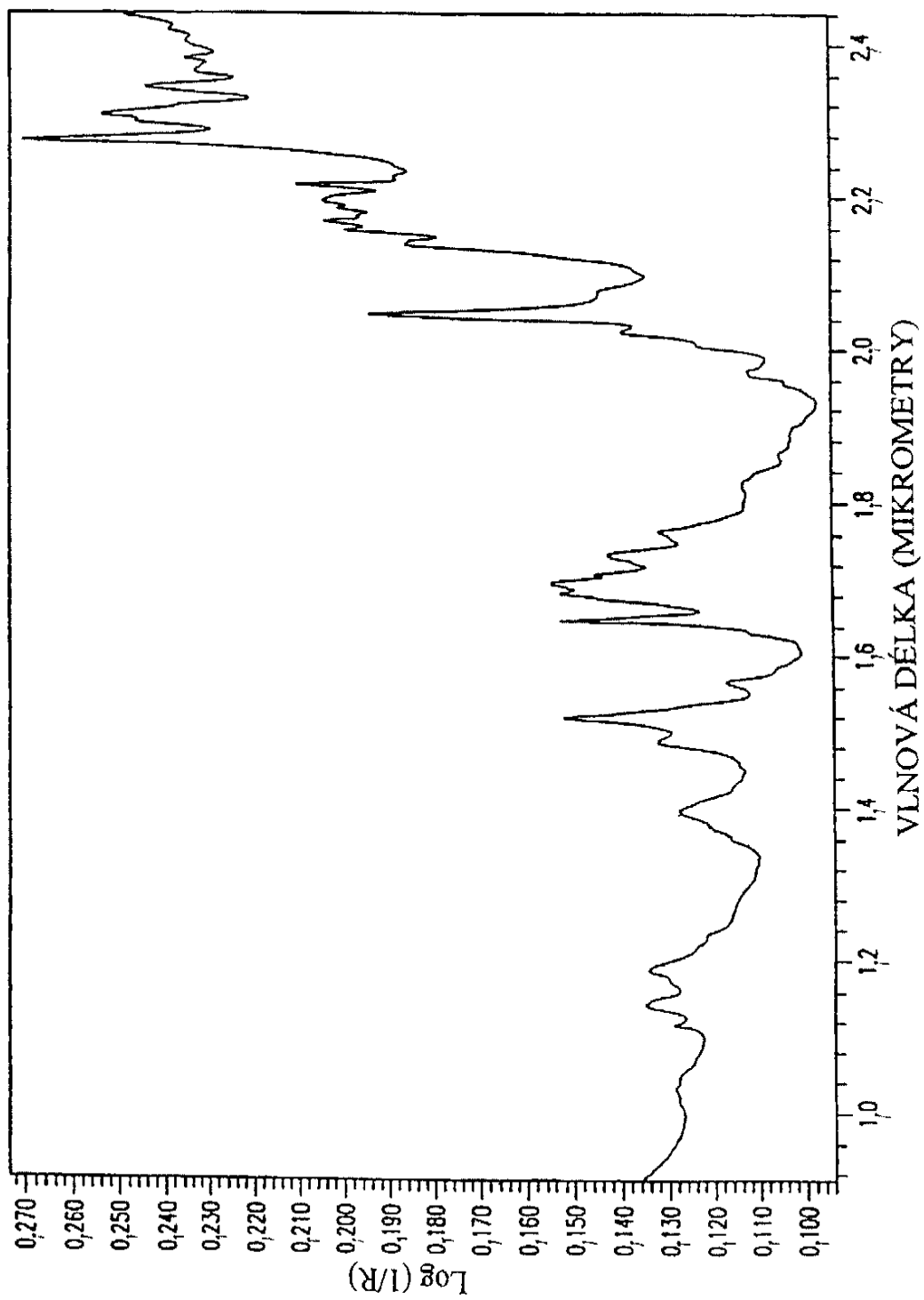


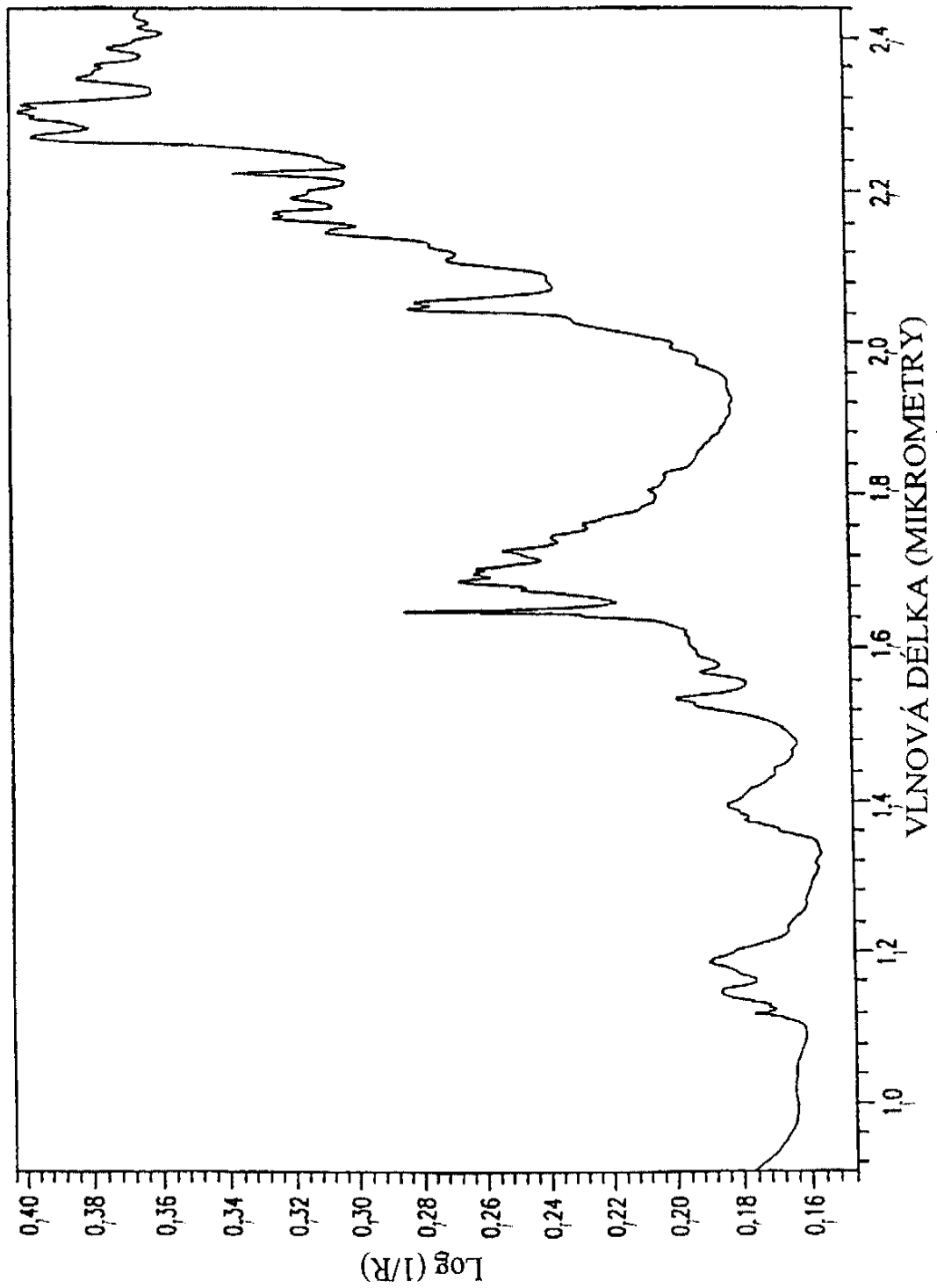


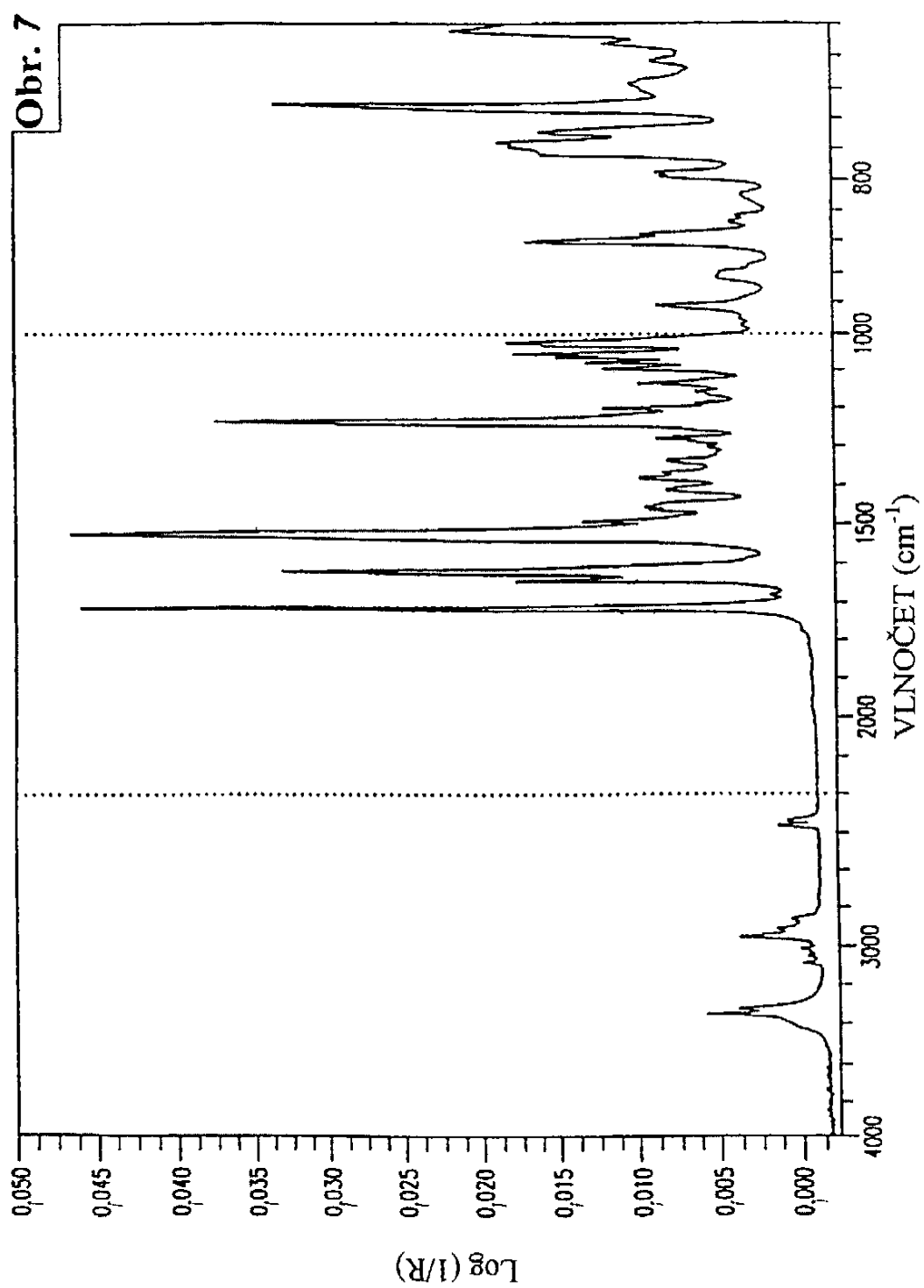
**Obr. 3**

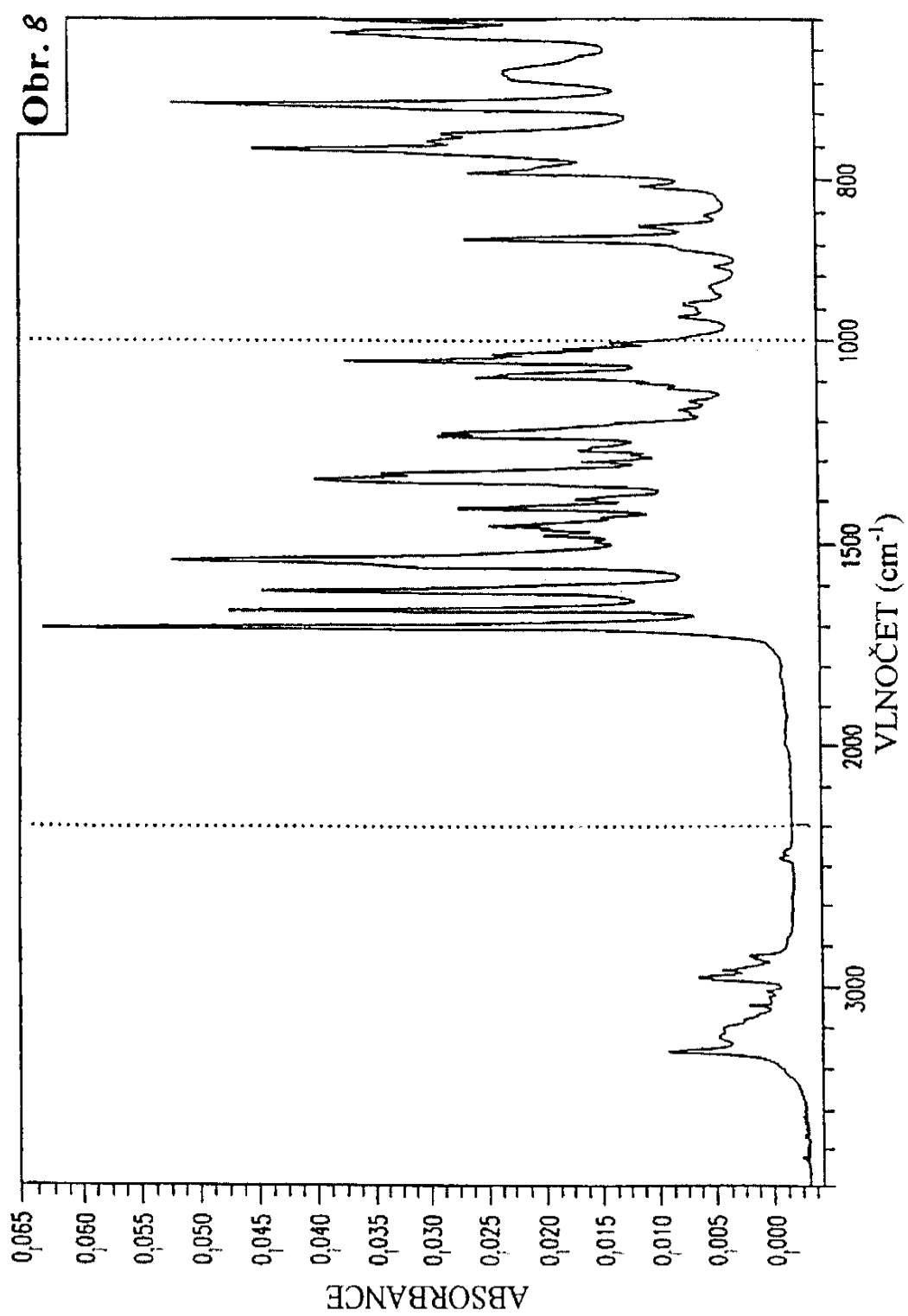
**Obr. 4**

Obr. 5



**Obr. 6**





Konec dokumentu