

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2004-738**
(22) Přihlášeno: **17.06.2004**
(40) Zveřejněno: **15.02.2006**
(Věstník č. 2/2006)
(47) Uděleno: **31.03.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **07.05.2008**
(Věstník č. 19/2008)

(11) Číslo dokumentu:

299 175

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C07D 207/34 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 02/055519.

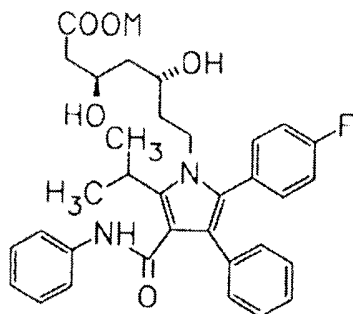
(73) Majitel patentu:
Zentiva, a. s., Praha, CZ

(72) Původce:
Veverka Miroslav Ing. CSc., Bratislava, SK
Lehotay Jozef Prof. DrSc., Bratislava, SK
Bednáriková Alena Ing. PhD., Trnava, SK
Klvanová Jana Ing. PhD., Bratislava, SK
Rojkovičová Tatiana Ing., Selec, SK
Dohnal Jiří Ing. CSc., Praha, CZ
Grafnetterová Taťjana RNDr., Praha, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Ivana Jirotková, Nad Štolou 12, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:
Způsob stanovení enantiomerní čistoty 2-(4-fluorfenyl)-beta,delta-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny a jejích solí

(57) Anotace:
Způsob stanovení enantiomerní čistoty 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny a jejích solí vzorce I metodou chirální chromatografie. Stanovení je možno použít při kontrole substance léčiva nebo v kapalných a pevných lékových formách.



M = H, Li, Na, K, Ca, Mg.

CZ 299175 B6

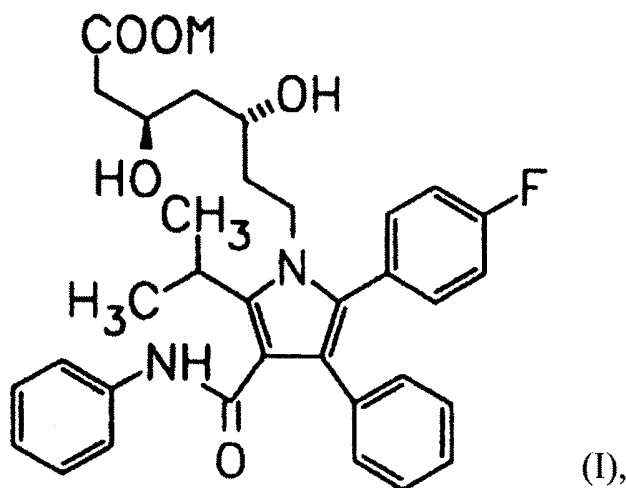
Způsob stanovení enantiomerní čistoty 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny a jejích solí

5 Oblast techniky

Vynález se týká způsobu stanovení enantiomerní čistoty 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny a jejích solí metodou chirální chromatografie. Stanovení je možno použít při kontrole substance nebo v kapalných a pevných lékových formách.

Dosavadní stav techniky

15 Sloučeniny 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny obecného vzorce I



20 kde M představuje atom vodíku, lithia, sodíku, draslíku, vápníku nebo hořčíku, jsou inhibitory HMG CoA reduktáz a byly popsány v patentu US 4 681 893, US 5 273 995, US 5 273 995.

V této řadě hemivápenatá sůl R-(R*,R*)-7-(3-fenyl-4-fenylkarbamoyl-2-(4-fluorfenyl)-5-isopropylpyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanové kyseliny Je antihypercholesterolemikum známé pod názvem atorvastatin kalcium.

30 Postup přípravy krystalických forem této látky je zveřejněn v patentech, např. US 5 96 9156, US 6 121 461. Pro hemivápenatou sůl atorvastatinu používanou jako substance léčiva někteří výrobci deklarují specifickou optickou otáčivost v rozmezí $-6,5$ až $8,8$ °(pro stanovení 1% roztoku v dimethylsulfoxidu, 25 °C). Pro chirální čistotu se uvádí přítomnost (-) enantiomeru stanovená jako odpovídající lakton.

35 Pro stanovení chirální čistoty se používají např. chirální spektroskopické metody, jsou však limitované při multikomponentním stanovení anebo vyžadují opakovanou přípravu vzorků. GC analýzy enantiomerních sloučenin jsou rutinně využívány, nutné derivatizační reagenty modifikují specifické funkční skupiny a produkují diastereomery, použití derivatizačních reagens s vysokou enantiomerní čistotou je tedy prakticky nevyhnutelné.

40 Tyto i další separační techniky jako kapilární elektroforesa jsou přehledně uvedeny v: Chiral Chromatography, T. E. Beesley, R., P. W. Scott, Wiley, N.Y., 2002.

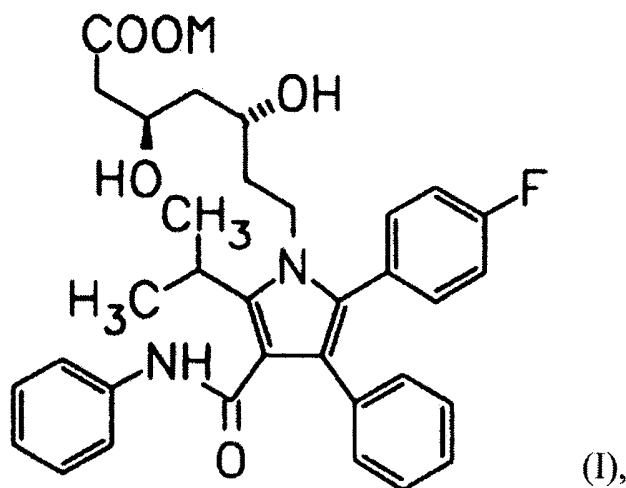
Nejsou však popsány práce zabývající se enantiomerní čistotou atorvastatinu nebo látek ze skupiny statinů metodou chirální chromatografie. Nejsou publikovány ani práce popisující separaci enantiomeru atorvastatinu metodou chirální chromatografie.

- 5 Nyní bylo zjištěno, že enantiomerní čistotu (hmotnostní %) 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny a jejich solí lze stanovit postupem podle vynálezu na základě separace jednotlivých enantiomerů metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie v chirálním prostředí.
- 10 Vynález se tedy týká způsobu stanovení enantiomerní čistoty 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny a jejich solí metodou chirální chromatografie.

15 Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je způsob stanovení enantiomerní čistoty 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny a jejich solí obecného vzorce I,

20



- kde M představuje atom vodíku, lithia, sodíku, draslíku, vápníku nebo hořčíku, spočívající v tom, že se k 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyselině vzorce I, kde M představuje atom lithia, draslíku, sodíku, vápníku nebo hořčíku, ve vodě a/nebo organickém rozpouštědle vybraném ze skupiny dipolárních aprotických nebo polárních rozpouštědel přidá organická kyselina s hodnotou pK < 4,7 nebo kyselina sírová, kyselina chlorovodíková, kyselina chloristá, kyselina fosforečná a její soli v molárním poměru 0,9 až 10 mol na jeden mol sloučeniny vzorce I, případně vzniklá sraženina se oddělí, a uvolněná kyselina vzorce I, kde M představuje atom vodíku, se dává do chromatografické chirální kolony a po detekci se na základě poměru ploch píků jednotlivých enantiomerů na chromatogramu určí enantiomerní čistota.

- Rozpouštědla pro přípravu roztoku jsou vybrána ze skupiny rozpouštědel jako voda, methanol, ethanol, acetonitril, dioxan, tetrahydrofuran, dimethylformamid nebo jejich směsi. S výhodou se použijí rozpouštědla aplikovaná při chromatografii jako mobilní fáze. Tato reakce se uskutečňuje při teplotách od 15 °C do teploty 35 °C, s výhodou při laboratorní teplotě, a reakční doba se pohybuje od 1 hodiny do 5 hodin.

- 40 Z důvodu sterických problémů při enantiomerních interakcích se stacionární fází, zvláště u relativně velkých rozměrů molekuly soli (například u vápenaté nebo hořečnaté soli), se před separací

enantiomerů uvolní odpovídající kyselina. Jako kyseliny s $pK < 4,7$ se použijí organické kyseliny jako například kyselina mravenčí, kyselina octová, kyselina benzensulfonová, kyselina chloroctová, kyselina trichloroctová, kyselina šťavelová, kyselina citrónová, kyselina vinná apod. Je možno použít roztoky anorganických kyselin jako kyseliny sírové, kyseliny chlorovodíkové, kyseliny chloristé, kyseliny fosforečné nebo její soli, jako například dihydrogenfosforečnan sodný nebo draselný. Kyseliny se přidávají přímo do roztoku vzorku látky I nebo rozpuštěny v rozpouštědle použitým na přípravu roztoku vzorku látky I v 0,9 až 10 násobku ekvimolárního množství na jeden mol sloučeniny vzorce I. Použití většího množství kyseliny má vliv na stabilitu a vede ke vzniku nežádoucích produktů. Bylo však zjištěno, že za použitých podmínek v průběhu reakce mezi organickou kyselinou s $pK < 4,7$ nebo zředěnou kyselinou sírovou, kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou chloristou, kyselinou fosforečnou nebo s výhodou její soli a 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanovou kyselinou nedochází k racemizaci. Protože jednotlivé enantiomery mají stejnou odezvu spektrofotometrického detektoru nebo jiného detektoru, je možno z poměru ploch určit zastoupení i v případě nekvantitativního průběhu reakce při definované době reakce.

Jako stacionární fáze pro separaci enantiomerů se použijí speciální chemicky modifikované chirální stacionární fáze, např. deriváty celulózy, amylosy, bílkovin (peptidy), cyklodextriny, makrocyclická antibiotika, fáze Pirklova typu, polysiloxany, chirálně substituované polymery – polymetakryláty s helickou strukturou, proteiny – immobilizovaný albumin, α -glykoproteiny (AGP), ovomukoid OVM, avidin nebo některé synteticky připravené fáze, jako např. Whelk 01, makrocyclické étery, kovové komplexy, např. komplex Cu s aminokyselinami, immobilizovaný L-prolin, L-valin, D-kyselina vinná apod. Zvláště výhodná je stacionární fáze TEICOPLANIN TAG, která má charakter slabého amfoterního ionexu, což je možno využít pro separaci volných kyselin. Je zřejmé, že je možné použít i jiné kolony s uvedenými vlastnostmi. Většina separací se provádí při pokojové teplotě, ale teplota kolony může být upravena pro dosažení vyšší účinnosti. Během analýzy však musí být udržována konstantní teplota mobilní fáze a kolony.

Na základě chromatografických záznamů, jako bylo dokumentováno DV spektry jednotlivých píků enantiomeru, se dosáhlo separace enantiomerů s hodnotou rozlišení $R_{ij} = 2,1$. Pořadí eluce jednotlivých enantiomerů je možno zjistit např. nádvko váním čistého enantiomeru.

Výhodných separačních podmínek se dosáhne při použití chirální kolony typu slabého amfoterního ionexu, např. TEICOPLANIN TAG, permethylovaný TEICOPLANIN, TEICOPLANIN, RISTOCETIN, VANCOMYCIN s mobilní fází methanol, methanol – voda, acetonitril, acetonitril – voda, ethanol, ethanol – voda.

Výhodné je provést separaci s přidavkem tlumivého roztoku k mobilní fázi, jako například kyselina octová – diethylamin, kyselina propionová – diethylamin, kyselina mravenčí – diethylamin, je možno použít i jiné aminy jako např. triethylamin nebo amoniak a jeho soli. Při použití svrchu uvedených mobilních fází nedochází k nežádoucí kvalitativní změně separovaných enantiomerů v průběhu chromatografického procesu (tvar píku zůstával symetrický a reprodukovatelný). Vzájemným porovnáním ploch píků jednotlivých enantiomerů z chromatografického záznamu se určí enantiomerní čistota. Je zřejmé, že je možno vypočítat obsah za pomoci kalibračních křivek získaných s kalibračními standardy jednotlivých enantiomerů. Jako detektor možno použít detekci spektrofotometrem s diodovým polem, ale i jiný detektor.

Předkládaný vynález poskytuje spolehlivý způsob stanovení enantiomerní čistoty 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny a jejích soli metodou chirální chromatografie. Vynález je ilustrován v následujících příkladech provedení bez toho, aby se na ně omezoval.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

5

Určení enantiomerní čistoty hemivápenaté soli [R-(R*R*)-2-(4-fluorfenyl)-β,δ-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny

10

Použila se chirální chromatografická kolona CHIROBIOTIC TAG (250 mm x 4,6 mm x 5 μm). Složení mobilní fáze: methanol/kyselina octová/diethylamin v poměru 100/ 0,1/ 0,05 (v/v/v).

15

Do chromatografické kolony se dávkovaly methanolicke roztoky enantiomerů s koncentrací 0,5 mg/ml a s ekvimolárním přídavkem kyseliny šťavelové. Průtok mobilní fáze 0,5 ml/min. Měření se prováděla při teplotě 20 °C s použitím termostatu kolon LCT 5100.

Na základě poměru ploch jednotlivých enantiomerů se zjistila enantiomerní čistota.

	1 hod po přidání kyseliny šťavelové	2 hod po přidání kyseliny šťavelové	5 hod po přidání kyseliny šťavelové
20	98,5 ± 1,8	98,8 ± 2,0	98,3 ± 2,0

Příklad 2

25

Určení enantiomerního složení u vzorku racemátu hemivápenaté soli 2-(4-fluorfenyl)-β,δ-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny

30

Použily se stejné podmínky jako v příkladu 1. Na základě poměru ploch jednotlivých enantiomerů se zjistilo procentuální zastoupení ve vzorku.

Vzorek racemátu 1

	1 hod po přidání kyseliny šťavelové	2 hod po přidání kyseliny šťavelové	5 hod po přidání kyseliny šťavelové
35	44,7 ± 3 : 55,3 ± 3	46,7 ± 3 : 53,3 ± 3	49,4 ± 1,5 : 50,6 ± 1,0

Vzorek racemátu 2

	1 hod po přidání kyseliny šťavelové	2 hod po přidání kyseliny šťavelové	5 hod po přidání kyseliny šťavelové
40	42,6 ± 3 : 57,3 ± 3	46,1 ± 2,5 : 53,9 ± 3	48,2 ± 1,7 : 51,8 ± 1,5

Příklad 3

45

Určení enantiomerní čistoty sodné soli [R-(R*R*)-2-(4-fluorfenyl)-β,δ-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny

50

Byly použity stejné podmínky jako v příkladu 1 s tím, že se použil ekvimolární přídavek 0,01 N roztoku kyseliny chloristé. Na základě poměru ploch jednotlivých enantiomerů se zjistilo procentuální zastoupení ve vzorku 98,3 ± 2,0 %.

Příklad 4

Určení enantiomerní čistoty hemivápenaté soli [R-(R*,R*)-2-(4-fluorfenyl)-β,δ-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny

5

Byla použita chirální chromatografická kolona CHIROBIOTIC TAG (250 mm x 4,6 mm x 5 μm). Složení mobilní fáze: methanol/voda/kyselina octová/diethylamin v poměru 98/2/0,1/0,05 (v/v/v/v).

10 Do chromatografické kolony se dávkoval methanolický roztok vzorků s koncentrací 0,5 mg/ml s 10 násobným molárním přídatkem kyseliny šťavelové. Průtok mobilní fáze 0,5 ml/min. Měření se prováděla při teplotě 20 °C s použitím termostatu kolon LCT 5100.

Na základě poměru ploch jednotlivých enantiomerů se zjistila enantiomerní čistota.

	1 hod po přidání kyseliny šťavelové	2 hod po přidání kyseliny šťavelové	5 hod po přidání kyseliny šťavelové
15	98,5 ± 1,8	98,8 ± 2,0	98,3 ± 2,0

Příklad 5

20

Určení enantiomerní čistoty hemivápenaté soli [R-(R*,R*)-2-(4-fluorfenyl)-β,δ-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny

25 Byla použita chirální chromatografická kolona CHIROBIOTIC TAG (250 mm x 4,6 mm x 5 μm). Složení mobilní fáze: methanol/kyselina octová/diethylamin v poměru 100/0,1/0,05 (v/v/v/v).

30 Do chromatografické kolony se dávkovaly methanolické roztoky (20 μl) vzorků enantiomerů s koncentrací 0,5 mg/ml s 10 násobným molárním přídatkem kyseliny šťavelové. Průtok mobilní fáze 0,5 ml/min. Měření se prováděla při teplotě 20 °C s použitím termostatu kolon LCT 5100, při použití detektoru v ultrafialovém světle při 220 až 400 nm.

Za těchto podmínek je retenční doba pravotočivého enantiomeru I 6,8 minut a retenční doba levotočivého enantiomeru II je 7,6 minut.

35 Přesnost stanovení optické čistoty obou enantiomerů byla stanovena pro oba připravené enantiomery jako takové a také pro směs se stoupajícím množstvím jednoho enantiomeru. Stanovila se 2 % hmotnostní levotočivého enantiomeru ve vzorku pravotočivého enantiomeru.

40 Příklad 6

Určení enantiomerní čistoty hemivápenaté soli [R-(R*,R*)-2-(4-fluorfenyl)-β,δ-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny

45 Byla použita chirální chromatografická kolona CHIROBIOTIC TAG (250 mm x 4,6 mm x 5 μm). Složení mobilní fáze: tetrahydrofuran/octan amonný (0,01 mol/l, voda) poměr 99,95/0,05 (v/v).

50 Do 10,0 ml odměrné baňky se odpipetuje 2 ml roztoku atorvastatinu Ca (c=1,0 mg/ml, THF) a přidá se 200 μl zředěné HCl (1:100 v tetrahydrofuranu). Průtok mobilní fáze 0,5 ml/min. Měření se provádí po 2 hodinách, při teplotě 20 °C s použitím termostatu kolon LCT 5100, při použití detektoru v ultrafialovém světle při 220 až 400 nm. Na základě poměru ploch jednotlivých enantiomerů se zjistila enantiomerní čistota 98,5 %.

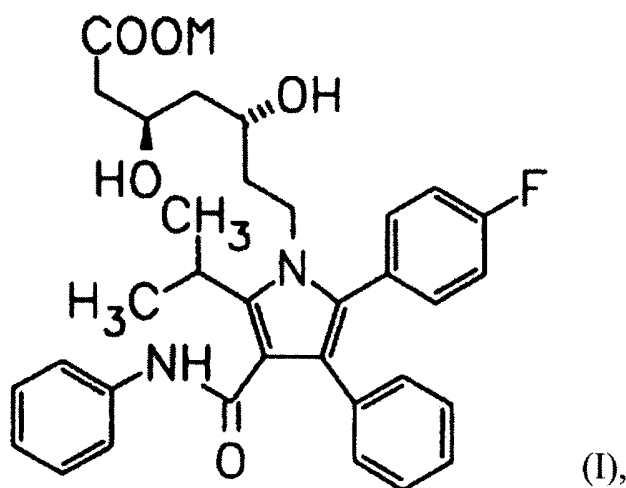
Příklad 7

Určení enantiomerní čistoty hemivápenaté soli [R-(R*,R*)]-2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny

Byla použita chirální chromatografická kolona CHIROBIOTIC TAG (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m). Použily se stejné podmínky jako v příkladu 6 s tím, že se jako rozpouštědlo použil methanol a octan amonný (0,01 mol/l, methanol) jako tlumivý roztok. Do 10,0 ml odměrné baňky se odpipetuje 2 ml roztoku atorvastatinu Ca (c=1,0 mg/ml, metanol), přidá se 200 μ l zředěné HCl (1:100 v methanolu), detekce 248 nm. Na základě poměru ploch jednotlivých enantiomerů se zjistila enantiomerní čistota 99,7 %.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob stanovení enantiomerní čistoty 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)-karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyseliny a jejich solí obecného vzorce I



kde M představuje atom vodíku, lithia, sodíku, draslíku, vápníku nebo hořčíku, **v y z n a ě u j í - c í s e t í m**, že se k 2-(4-fluorfenyl)- β,δ -dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-4-[(fenylamino)karbonyl]-1H-pyrrol-1-heptanové kyselině vzorce I, kde M představuje atom lithia, draslíku, sodíku, vápníku nebo hořčíku, ve vodě a/nebo organickém rozpouštědle vybraném ze skupiny dipolárních aprotických nebo polárních rozpouštědel přidá organická kyselina s hodnotou $pK < 4,7$ nebo kyselina sírová, kyselina chlorovodíková, kyselina chloristá, kyselina fosforečná nebo její soli v molárním poměru 0,9 až 10 mol na jeden mol sloučeniny vzorce I, případně vzniklá sraženina se oddělí, a uvolněná kyselina vzorce I, kde M představuje atom vodíku, se dávkuje do chromatografické chirální kolony se stacionární fází typu makrocyclického antibiotika nebo cykloextrinového typu a po detekci se na základě poměru ploch píku jednotlivých enantiomerů na chromatogramu určí enantiomerní čistota.

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že M představuje atom vápníku.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se jako anorganická kyselina použije kyselina chlorovodíková.

4. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako organická kyselina použije kyselina šťavelová.
5. Způsob podle nároků 1 až 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako mobilní fáze použije methanol – voda nebo methanol.
6. Způsob podle nároků 1 až 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že k detekci se použije spektrofotometr s diodovým polem v oblasti 190 nm až 450 nm.
- 10 7. Způsob podle nároků 1 až 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se mobilní fáze upraví přídavkem amoniaku nebo jeho soli.

15

Konec dokumentu
