



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) PI 0808581-1 A2



* B R P I 0 8 0 8 5 8 1 A 2 *

(22) Data de Depósito: 05/03/2008
(43) Data da Publicação: 16/09/2014
(RPI 2280)

(51) *Int.Cl.*:
C07D 217/20
C07B 57/00

(54) **Título:** "MÉTODO PARA SEPARAR
CISATRACÚRIO COM ALTA PUREZA DE UMA
MISTURA DE ISÔMEROS DE (1R, 1'R) - ATRACÚRIO"

(57) **Resumo:**

(30) **Prioridade Unionista:** 26/03/2007 US 60/908,088

(73) **Titular(es):** Chemagis Ltd

(72) **Inventor(es):** ELENA OSTROVSKY

(74) **Procurador(es):** Antonio Mauricio Pedras Arnaud

(86) **Pedido Internacional:** PCT IL2008000291 de 05/03/2008

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/117271 de
02/10/2008

"MÉTODO PARA SEPARAR CISATRACÚRIO COM ALTA PUREZA DE UMA MISTURA DE ISÔMEROS DE (1R,1'R)-ATRACÚRIO".

Campo da invenção

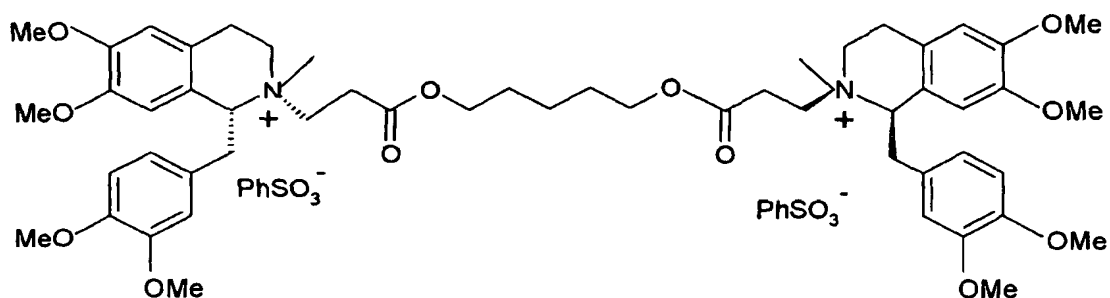
A presente invenção refere-se à cromatografia e, mais particularmente, a um método melhorado para separar os isômeros de sais de (1R,1'R)-atracúrio por meio de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

Antecedentes da invenção

Agentes bloqueadores neuromusculares (p.ex., besilato de atracúrio brometo de pacurônio, brometo de rocurônio, brometo de vecurônio) são conhecidos por apresentarem atividade paralisante muscular que é semelhante ao alcalóide do curare ou d-curarina. Os agentes bloqueadores neuromusculares interrompem a transmissão de impulsos nervosos na junção neuromuscular esquelética e são tipicamente divididos em dois tipos: bloqueadores competitivos, estabilizantes (agentes neuromusculares não despolarizantes) e agentes não competitivos, despolarizantes (agentes neuromusculares despolarizantes). Ambos os tipos evitam que a acetilcolina dispare a contração muscular e são tipicamente usados como adjuvante de anestesia no campo das operações para auxiliar na entubação, p.ex., no relaxamento das cordas vocais, traquéia, músculos maxilares, etc., e também em cirurgias, i.é, provendo relaxamento muscular generalizado, como relaxantes durante eletrochoques, em estados convulsivos, etc. Tipicamente, a terapia é realizada por administração i.v. de uma forma de dosagem adequada.

O besilato de atracúrio dibenzenossulfonato de [2,2'-[1,5-pentanodiilbis[oxi(3-oxo-3,1-propanodiil)]bis[1-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-2-metil-isoquinolínio] foi primeiramente aprovado para uso médico em 1982. O isômero 1R-cis-1'R-cis-2,2',2',2'-[1,5-pentanodiilbis [oxi(3-oxo-3,1-propanodiil)]bis[1-[(3,4-dimetoxifenil) metil]-1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-2-metil-isoquinolínio é

denominado de besilato de cisatracúrio e é 3-4 vezes mais potente que o próprio besilato de atracúrio. O produto foi lançado pela GSK e Abbott Laboratories em 1996 sob a designação comercial NIMBEX®. O NIMBEX® é uma solução aquosa não pirogênica, estéril que é ajustada em pH 3,25 a 3,65 com ácido benzenossulfônico. O fármaco é provido em ampolas de 2,5 mL, 5 mL e 10 mL tendo uma potência de 2 mg/mL de besilato de cisatracúrio. Adicionalmente, um frasco de 30 mL contendo 5 mg/mL de besilato de cisatracúrio também está comercialmente disponível. O besilato de cisatracúrio tem a seguinte fórmula estrutural abaixo:



Besilato de cisatracúrio (I)

Devido ao fato de composto de atracúrio possuir 4 centros quirais, existem teoricamente 16 possíveis isômeros. Devido à simetria da molécula, o número de isômeros é reduzido para 10 (isômeros óticos e geométrico). Isto é discutido em detalhe por J.B. Stenlake et al., em "Biodegradable neuromuscular blocking agents *Eur. Med. Chem. - Chem. Ther.*, 19, n° 5, páginas 441-450 (1984). A preparação do besilato de cisatracúrio é descrita nas patentes U.S. n°s 5.453.519, e 5.556.987 e conforme mostra o esquema 1 abaixo. O processo envolve reagir 1,5-pentanodiol com ácido 3-bromopropiônico em tolueno com um vestígio de ácido p-toulenossulfônico para produzir diacrilato de 1,5-pentametileno. Hidrocloreto de (+)-tetrahidropapaverina é resolvido com N-acetil-L-leucina para obter N-acetil-L-leucinato de (R)-tetrahidropapaverina, que é convertido na base livre e

reagido com diacrilato de 1,5-pentametileno em ácido acético glacial quente, purificado em cromatografia de coluna, e tratado com ácido oxálico para dar (1R,1'R)-2,2'-(3,11-dioxo-4,10-dioxatridecileno)-bis-(1,2,3,4-

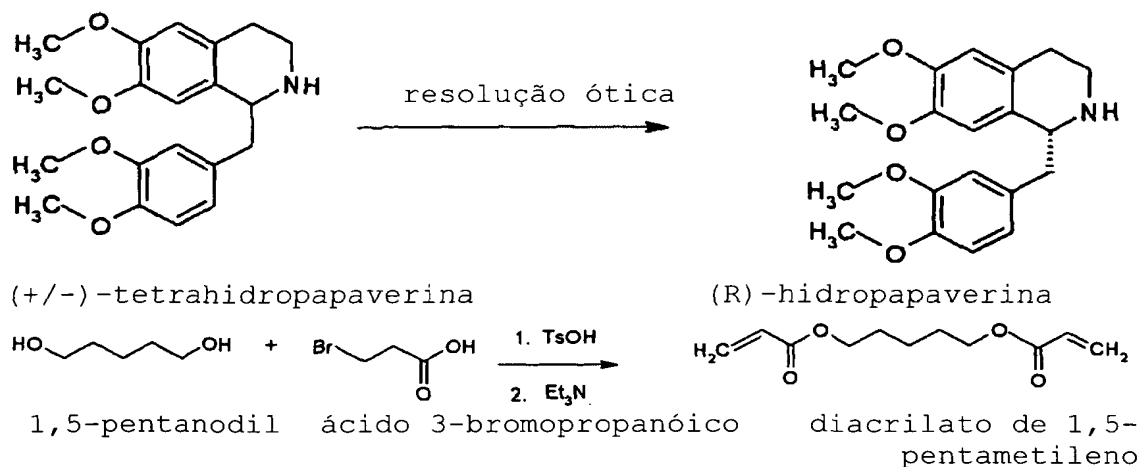
5 tetrahydro-,67-di8metóxi-2-metil-1-veratriliso-

quinolíniodioxalato (II), que é tratado como benzenossulfonato de metila para obter besilato de (1R,1'R)-atracúrio, i.é, isômeros (1R-cis,1'R-cis), (1R-

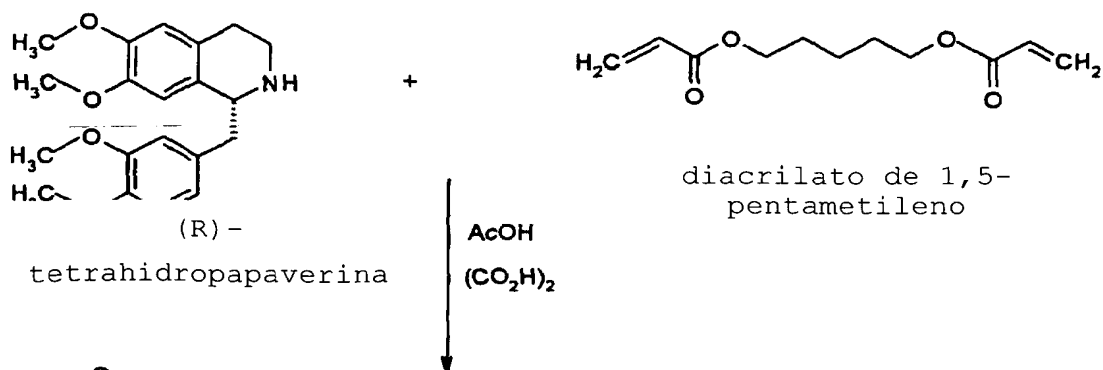
10 cis,1'R-trans), (1R-trans,1'R-trans), em uma proporção de 58:34:6, respectivamente. A mistura é separada por meio de cromatografia líquida, usando uma coluna de sílica irregular ou esférica um uma mistura de diclorometano e um ácido forte, p.ex., ácido metanossulfônico, ou uma

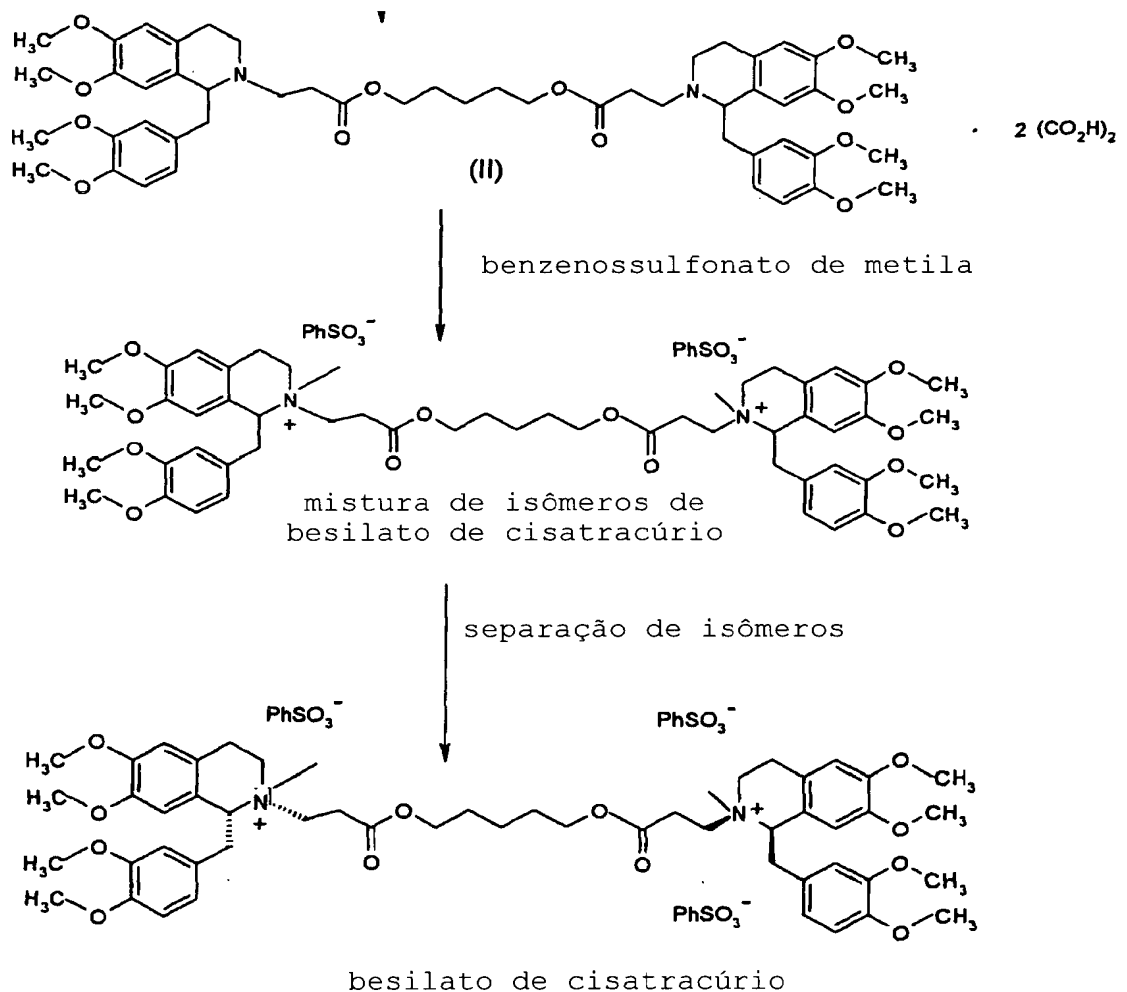
15 mistura de diclorometano, metanol e um ácido forte, p.ex., ácido benzenossulfônico.

Esquema 1



20





A patente U.S. n° 5.453.510 (coluna 1, linhas 31-39) ensina que fases móveis aquosas não permitem a recuperação dos isômeros do (1R,1'R)-atracúrio sem substancial degradação do produto. A instabilidade dos isômeros do (1R,1'R)-atracúrio em fases aquosas móveis é problemática e preclui o uso de métodos que poderiam de outra maneira ser desejáveis para purificar besilato de cisatracúrio, particularmente em uma escala comercial.

5 Ademais, os métodos de HPLC para separar isômeros de besilato de (1R,1'R)-cisatracúrio usando ácidos fortes poderão ser insatisfatórios para produções em larga escala uma vez que o aço inoxidável (comumente usado em instrumentos de HPLC) não é compatível com ácidos fortes

10 (tais como o ácido benzenossulfônico) devido a uma corrosão excessiva dos componentes de aço inoxidável

15

resultando numa possível contaminação do produto, que também é indesejável, especialmente em larga escala. Consequentemente, existe uma necessidade de um método melhorado para separar os isômeros do besilato de (1R,1'R)-cisatracúrio, particularmente um método comercialmente viável, que empregue uma fase aquosa móvel e ainda assim evite problemas associados com a instabilidade da fase móvel aquosa. A presente invenção provê tais métodos.

10 Sumário da invenção

Em uma concretização, a presente invenção provê um método cromatográfico para separar misturas de isômeros de sais de (1R,1'R)-atracúrio (p.ex., sal besilato), que inclui Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), de Fase Reversa, para produzir o isômero 1R-cis,1'R-cis altamente puro. De acordo com a presente invenção, o desejado isômero 1R-cis,1'R-cis poderá ser separado da mistura de isômeros de sais de (1R,1'R)-atracúrio:

20 carregando uma solução de sal de 1R,1'R-atracúrio (p.ex., o sal besilato) em um sistema de HPLC equipado com uma coluna de separação compreendendo uma fase estacionária de Fase Reversa (RP);

eluindo a coluna com um eluente, que inclua uma fase aquosa, um solvente orgânico ou uma mistura destes;

25 coletando pelo menos uma fração compreendendo o produto desejado; e

isolando o produto.

Fases estacionárias de RP adequadas poderão incluir, por exemplo, uma fase estacionária de C1, uma fase estacionária de C3, uma fase estacionária de C4, uma fase estacionária de C8, uma fase estacionária de C14, uma fase estacionária de C18, outro carregamento polimérico, p.ex., de poliamida, polimetacrilato, poliestireno, e assemelhados.

35 Daí, um método preferido da invenção inclui realizar uma separação por HPLC usando uma fase estacionária de C18, que é eluída com uma fase móvel compreendendo um tampão,

isto é, uma mistura de um ácido fraco e seu sal conjugado (p.ex., ácido acético e acetato de sódio, ácido cítrico e citrato de sódio, ou formiato de amônio e ácido fórmico) e um solvente tal como metanol.

5 Breve descrição dos desenhos

A figura 1 representa o efeito da concentração do tampão na retenção do isômero 1R-cis,1'R-cis;

A figura 2 representa o efeito da concentração do tampão na resolução dos isômeros 1R-cis,1'R-trans e 1R-cis,1'R-cis;

10

A figura 3A representa o cromatograma de uma amostra de referência de besilato de atracúrio;

A figura 3B lista dados de pico associados com o cromatograma representado na figura 3A;

15

A figura 4A representa o cromatograma do besilato de atracúrio, amostra 1;

A figura 4B lista dados de pico associados com o cromatograma representado na figura 4A;

20

A figura 5A representa o cromatograma do besilato de atracúrio, amostra 2;

A figura 5B lista dados de pico associados com o cromatograma representado na figura 5A;

25

A figura 6A representa o cromatograma do besilato de (1R,1'R)-atracúrio obtido de acordo com o gradiente detalhado na tabela 3;

A figura 6B lista dados de pico associados com o cromatograma representado na figura 6A;

A figura 7 representa a estabilidade do besilato de (1R,1'R)-atracúrio com diferentes valores de pH.

30

Descrição detalhada da invenção

Contrariamente aos ensinamentos da patente U.S. nº 5.453.510, foi descoberto surpreendentemente pelos inventores da presente invenção que métodos em cromatografia de coluna de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) de Fase Reversa (RP) podem ser aplicados para separar os isômeros de sais de (1R,1'R)-atracúrio (p.ex., sal besilato) e para obter o isômero

35

1R-cis,1'R-cis em forma altamente pura, usando uma fase móvel ligeiramente ácida ou tamponada, p.ex., uma mistura de ácido fraco, tal como ácido acético e seu sal conjugado, tal como acetato de sódio. Portanto, usando
 5 uma fase móvel contendo um solvente e uma fase aquosa ligeiramente ácida ou tamponada possibilita separar os isômeros em condições nas quais o isômero 1R-cis,1'R-cis seja estável.

O termo fase móvel "ligeiramente ácida", conforme
 10 descrito aqui, refere-se a uma fase móvel contendo um solvente e uma fase aquosa, que inclui um ácido orgânico, tendo um valor de pKa de 2,5 e superior, tal como ácido acético. A fase móvel "ligeiramente ácida" é distinguível dos métodos acima, usando ácidos fortes (tendo valores de
 15 pKa de 0 e inferiores), tais como o ácido benzenossulfônico.

O termo fase móvel "tamponada", conforme descrito aqui, refere-se a fases móveis contendo uma fase aquosa, que inclui um ácido orgânico fraco e seu sal conjugado, tal
 20 como ácido fórmico como formiato de sódio.

Conforme usado aqui, o termo "substancialmente livre de outros isômeros geométricos e óticos" significa que nenhum outro isômero geométrico e ótico poderá ser detectado dentro dos limites do método de HPLC.

25 O termo "pureza isomérica", conforme definido aqui, refere-se à área percentual do pico correspondente ao isômero 1R-cis,1'R-cis relativo às áreas do (isômero 1R-cis,1'R-cis), isômeros (1R-cis,1'R-trans) e (1R-trans,1'R-trans). A pureza isomérica poderá ser expressa
 30 em termos da seguinte equação:

$$\text{Pureza isomérica} = \frac{A}{A+B+C} \times 100$$

onde A = área % do isômero 1R-cis,1'R-cis, B = área do
 35 isômero 1R-cis,1'R-trans, e C = área do isômero 1R-trans,1'R-trans.

Portanto, a presente invenção provê um método cromatográfico para separar os isômeros do sal de

(1R,1'R)-atracúrio (p.ex., sal besilato), que usa um método de HPLC de Fase Reversa (RP HPLC) para obter um produto altamente puro, que é o sal isômero 1R-cis,1'R-cis (p.ex., o sal besilato), tendo uma pureza superior a 99,5%.

De acordo com uma outra concretização da presente invenção, é separado o desejado isômero 1R-cis,1'R-cis de uma mistura de isômeros por um método, que inclui: carregar uma solução de sal de (1R,1'R)-atracúrio (p.ex., o sal besilato) em um sistema de HPLC de Fase Reversa, equipado com uma coluna de separação adequada compreendendo uma fase estacionária; eluir a coluna com uma fase móvel eluente que inclua uma fase aquosa, um solvente orgânico ou uma mistura destes; coletar pelo menos uma fração compreendendo o produto desejado; e isolar o produto.

O isômero 1R-cis,1'R-cis obtido de acordo com a presente invenção preferivelmente estará substancialmente livre de outros isômeros geométricos e óticos. Conforme ficará evidente da seção experimental do presente pedido, o sal de isômero 1R-cis,1'R-cis (p.ex., o sal besilato) obtido contém menos que cerca de 1% do isômero 1R-trans,1'R-trans e/ou 1R-cis,1'R-trans, preferivelmente menos que cerca de 0,1% do isômero 1R-trans,1'R-trans e/ou 1R-cis,1'R-trans. Portanto, o isômero 1R-cis,1'R-cis altamente puro é obtido tendo uma pureza de isômero de pelo menos 98,5%, e preferivelmente tendo uma pureza de isômero superior a 99,5%.

De acordo com a presente invenção, uma coluna de fase estacionária de RP adequada poderá incluir uma fase estacionária de C1, uma fase estacionária de C3, uma fase estacionária de C4, uma fase estacionária de C8, uma fase estacionária de C14, uma fase estacionária de C18, outro carregamento polimérico, p.ex., de poliamida, polimetacrilato, poliestireno, e assemelhados. O método de separação por RP HPLC da presente invenção

poderá ser utilizado em escalas analítica, semi-preparativa e preparativa. Fases reversas ligadas orgânicas preferidas para obter o isômero 1R-cis,1'R-cis incluem fases de C1, C4 e C18. Os resultados de métodos de RP exemplificativos para isolar o isômero 1R-cis,1'R-cis da mistura de isômeros de besilato de (1R,1'R)-atracúrio em diferentes fases estacionárias são providos na tabela 1 abaixo.

Tabela 1

Fase Estacionária	Resultado
C18	Separação completa de todos os isômeros
C4	Separação completa de todos os isômeros
C1	Separação completa de todos os isômeros
CN	Separação pobre do isômero 1R-cis,1'R-cis do isômero 1R-cis,1'R-trans, boa separação do isômero 1R-trans,1'R-trans
Fenila	Nenhuma separação do isômero 1R-cis,1'R-cis do isômero 1R-cis,1'R-trans, boa separação do isômero 1R-trans,1'R-trans

De acordo com uma concretização preferida da presente invenção, o eluente inclui uma fase aquosa que contenha pelo menos um solvente orgânico. A fase aquosa preferivelmente compreende uma mistura aquosa de um ácido e opcionalmente também um sal inorgânico (p.ex., NaCl) ou uma amina (p.ex., trietilamina).

Em uma concretização preferida, a fase aquosa inclui ainda um tampão (p.ex., uma mistura de um ácido fraco e seu sal conjugado (p.ex., ácido acético e acetato de sódio ou ácido cítrico e citrato de sódio). Tampões adequados incluem, por exemplo, misturas de ácido acético e acetato de sódio, ácido cítrico e citrato de sódio, ácido fórmico e formiato de amônio, e assemelhados. O ácido poderá ser orgânico ou inorgânico. Ácidos orgânicos preferidos incluem, por exemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido canfórico, ácido adamantanoacético e assemelhados, e combinações destes. Ácidos inorgânicos preferidos incluem, por exemplo, ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido fosfórico, ácido

bórico, ácido nítrico, e assemelhados, e combinações destes.

Solventes adequados que poderão ser incluídos na fase móvel aquosa de acordo com a presente invenção incluem, por exemplo, acetonitrila, metanol, etanol, álcool isopropílico, tetrahidrofurano (THF), e assemelhados, e misturas destes.

Em uma concretização, os isômeros do besilato de (1R-cis,1'R-cis)-atracúrio são separados eluindo com uma fase aquosa que contenha um sal de um ácido, ou um ácido e um sal conjugado de um ácido (p.ex., ácido nítrico e nitrato de sódio), a um pH de cerca de 1,0 a cerca de 5,5, e mais preferivelmente a um pH de cerca de 3,0 a cerca de 3,5. Sais de ácidos adequados poderão incluir, por exemplo, formiato de amônio, formiato de sódio, acetato de amônio, acetato de sódio, nitrato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de bário, brometo de sódio, brometo de cálcio, dihidrogenofosfato monocálcico, dihidrogenofosfato monossódico, e assemelhados, e combinações destes.

Concentrações de tampão preferidas, para isolar o isômero 1R-cis,1'R-cis, variam de cerca de 30 mM a cerca de 40 mM. Em alguns casos, uma concentração de tampão em uma faixa superior aumenta o tempo de retenção do isômero 1R-cis,1'R-cis, conforme representado na figura 1, e também melhora a separação do isômero, conforme representado na figura 2.

O sal de cisatracúrio é substancialmente estável sob as condições de separação da presente invenção. Por exemplo, a extensão da degradação do cisatracúrio é apenas ligeiramente (menor que 2%) após 26 horas à temperatura ambiente em uma mistura solvente, p.ex., a PH 2, usando tampão de nitrato, e quase nenhuma degradação (0,2%) foi observada após 26 horas em uma mistura solvente a 4°C usando um tampão de nitrato (vide exemplo 6, tabela 12).

Um contra-íon desejado poderá ser introduzido, p.ex., por um processo de troca iônica, que poderá incluir, p.ex.,

adicionar os contra-íons desejados ao sistema para troca com outros ânions utilizados no processo de separação, que poderá associar com um ou mais dos isômeros de (1R,1'R)-atracúrio. Quaisquer métodos de troca iônica
5 adequados poderão ser utilizados também, p.ex., uma resina de troca iônica adequada.

O isolamento do cisatracúrio da mistura líquida de eluição poderá ser realizado por qualquer método adequado tal como por Extração em Fase Sólida (SPE). Um exemplo
10 não limitativo de um método para isolar a solução de cisatracúrio do líquido de eluição é por SPE. Por exemplo, o isolamento poderá ser feito sucessivamente transferindo uma amostra de solução de besilato de cisatracúrio (contendo a fase aquosa e o solvente
15 orgânico) e água através de um sorvente de C18, o que ocasiona a separação do besilato de cisatracúrio da espécie de tampão. O besilato de cisatracúrio retido pelo sorvente poderá então ser removido, p.ex., eluindo o sorvente com metanol. A avaliação dos ânions é
20 preferivelmente efetuada por HPLC, e os cátions são preferivelmente avaliados indiretamente (uma vez que os cátions e os ânions são removidos à mesma taxa). A recuperação do material isolado e os ânions poderá ser verificada após cada etapa do método de SPE.

25 Daí, a presente invenção provê um método por SPE para isolar um produto (p.ex., um isômero de besilato de (1R,1'R)-atracúrio) de uma mistura líquida de eluição, o qual método preferivelmente inclui:

30 sucessivamente transferir a solução de amostra e água através de um sorvente;

eluir o produto do sorvente com um solvente orgânico, p.ex., metanol; e

lavar o sorvente com um solvente orgânico, p.ex., metanol.

35 O método de SPE da presente invenção poderá ser utilizado para isolar o isômero 1R-cis,1'R-cis de uma mistura líquida de eluição por HPLC deste. Em uma concretização,

o método inclui:

opcionalmente evaporar pelo menos uma porção do solvente orgânico de um líquido de eluição por HPLC aquoso contendo um solvente orgânico;

5 adicionar um solvente orgânico e separar as fases e opcionalmente lavar a camada orgânica;

isolar o produto da fase aquosa secando por aspensão ou secagem criogênica.

O solvente orgânico adicionado no método de SPE da
10 presente invenção poderá incluir, por exemplo, acetato de etila, acetato de n-propila, acetato de isopropila, acetato de n-butila, acetato de isobutila, tolueno, clorofórmio, diclorometano, e assemelhados, e misturas destes. Um solvente preferido para o método de SPE da
15 presente invenção é diclorometano.

A presente invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo besilato de cisatracúrio substancialmente puro, que poderá ser obtido de acordo com a presente invenção, e poderá ser empregado, p.ex., em cirurgias
20 como um agente bloqueador neuromuscular como uma formulação para administração, p.ex., por injeção ou infusão.

A figura 3 representa o cromatograma de uma amostra de referência obtida diluindo uma amostra de besilato de
25 atracúrio liofilizada, contendo, dentre outros, aproximadamente 54% de isômero 1R-cis,1'R-cis, 34% de 1R-cis,1'R-trans e 6% de 1R-trans,1'R-trans (daqui por diante amostra de referência), e uma pequena quantidade de ácido benzenossulfônico na correspondente fase aquosa,
30 e injetando a mistura em um sistema de HPLC, equipado com uma fase estacionária de C18 de acordo com um método gradiente no qual o eluente contenha uma mistura de uma fase aquosa e pelo menos um solvente. A figura 4 representa o cromatograma de uma amostra de partida
35 exemplificativa de mistura de isômero de besilato de (1R,1'R)-atracúrio (daqui por diante ("amostra 1"), e a figura 5 representa o cromatograma de uma solução tampão

de besilato de cisatracúrio (NIMBEX®) (daqui por diante "amostra 2").

Os seguintes exemplos ilustram adicionalmente a invenção, mas, evidentemente, não deverão ser considerados de nenhuma maneira como limitativos da sua abrangência.

EXEMPLOS

Besilato de cisatracúrio foi analisado por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC). Separações por HPLC exemplificativas foram realizadas usando, p.ex., as seguintes condições: coluna e carregamento - Hypersil Hyperprep HS C18, 250x21,2 mm, 15µ, P.N. 37115-125; detecção de UV - UV operado a 280 nm; taxa de fluxo: 13 mL/min; Fase móvel: Eluente A: NaNO₃ 20mM, pH ajustado em 2,0 com HNO₃. Eluente B: metanol. A eluição gradiente é conforme detalhada na tabela 2:

Tabela 2

Tempo, minutos	% Eluente A	% Eluente B
0	60	40
65	60	40
67	55	45
90	55	45

Outro exemplo de separação por HPLC usando a mesma coluna do exemplo anterior é: detecção de UV em 280 nm; taxa de fluxo: 13 mL/min; Fase móvel: Eluente A: solução tampão 40 mM contendo dietilamina (DEA), pH ajustado em 3,5 com ácido fórmico; Eluente B: metanol. A eluição gradiente é conforme detalhada na tabela 3:

Tabela 3

Tempo, minutos	% Eluente A	% Eluente B
0	65	35
70	65	35
72	55	45
90	55	45

O cromatograma correspondente à separação de besilato de (1R,1'R)-atracúrio, de acordo com o método usando o gradiente detalhado na tabela 3, é mostrado na figura 6.

EXEMPLO 1

Este exemplo demonstra um procedimento de Fase Reversa para isolar besilato de cisatracúrio em fase estacionária

de C18 usando diferentes fases aquosas. Amostra de referência de besilato de atracúrio (10 mg/mL) foi analisada em uma fase estacionária de C18 por eluição gradiente, usando diferentes fases aquosas nas misturas de solventes com metanol. Coluna e carregamento: Alltech, Altima C18, 250x4,65x5 μ , Cat. n° 88056; detecção de UV: 280 nm; taxa de fluxo: 1 mL/min. Os resultados, incluindo as eluições gradiente, estão detalhados na tabela 4:

Tabela 4

	Fase aquosa	Gradiente			Resultado*		
		Tempo	% Tampão	% MeOH	Isômero	RT	Resolução
1	Solução aquosa a pH=3 com ácido trifluoroacético (TFA)	0	65	35	trans-	26,4	1,8 1,5
		20	65	35	trans	39,6	
		25	60	40	cis-trans	33,0	
		60	60	40	cis-cis		
		61	65	35			
		70	65	35			
2	10 mL trietilamina (TEA) em 1L água, pH=3,0, com TFA	0	65	35	trans-	45,5	3,7 >4,5
		20	65	35	trans	51,8	
		25	55	45	cis-trans	59,5	
		60	55	45	cis-cis		
		61	65	35			
		70	65	35			
3	Solução aquosa a pH=3,0, com TFA	0	80	20	Nenhuma separação entre os isômeros (RT's = 27 - 30 min)		
		30	60	40			
		65	60	40			
		61	80	20			
		61	80	20			
		70	80	20			
4	2 mL TEA em 1L de água a pH=3,5 (com ácido acético)	0	70	30	trans-	35,5	>2,0 >1,5
		30	60	40	trans	37,8	
		60	60	40	cis-trans	41,0	
		61	70	30	cis-cis		
		61	70	30			
		70	70	30			

5	6,45 g de citrato de sódio + 5 g de ácido cítrico em de 1L água a pH=3,5	Tempo	% Tampão	% MeOH	Isômero	RT	Resolução
		Mesmo gradiente do experimento n° 4			trans-trans cis-trans cis-cis	31,2 34,5 38,4	2,5 1,9
6	Solução aquosa a pH=3,0 (com ácido fórmico)	Tempo	% Tampão	% MeOH	Isômero	RT	Resolução
		0	75	25	trans-	29,0	
		30	65	35	trans	32,1	>2,5
		60	65	35	cis-trans	35,5	~2,0
		61	75	25	cis-cis		
70	75	25					
7	1,26 g de formiato de amônio (0,02M) em 1L de água a pH=3,0 (com ácido fórmico)	Tempo	% Tampão	% MeOH	Isômero	RT	Resolução
		0	70	35	Nenhuma separação entre os isômeros (RT's = 20 - 26 min)		
		30	60	35			
		60	60	35			
		61	70	25			
70	70	25					
8	Solução aquosa a pH=3,0 (com HCl)	Tempo	% Tampão	% MeOH	Isômero	RT	Resolução
		Mesmo gradiente do exemplo 7			Nenhuma separação entre os isômeros (RT's = 00 - 20 min)		
9	1,25 g de NaCl em 1L de água (0,02M), pH= 3,0 (com HCl)	Tempo	% Tampão	% MeOH	Isômero	RT	Resolução
		Mesmo gradiente do exemplo 7			trans-trans cis-trans cis-cis	32,1 35,5 40,0	2,0 1,6
10	4,16 g BaCl ₂ (0,02M Ba ²⁺) em 1L de água a pH=3,0 (com HCl)	Tempo	% Tampão	% MeOH	Isômero	RT	Resolução
		Mesmo gradiente do exemplo 7			trans-trans cis-trans cis-cis	33,3 36,9 41,6	>2,0 >2,0

* A ordem de eluição dos isômeros de atracúrio na fase

C18 é a seguinte: trans-trans, cis-trans, cis-cis, RT = Tempo de Retenção (minutos)

Resolução = $2(t_2 - t_1) / (w_1 - w_2)$, onde t_1 , t_2 são tempos de retenção (RT) dos picos eluídos e w_1 , w_2 são as correspondentes larguras nas bases dos picos obtidos extrapolando os lados relativamente retos dos picos à linha base.

EXEMPLO 2

Este exemplo demonstra a comparação de tampões de acetato e formiato em separações cromatográficas de RP de isômeros de besilato de (1R,1'R)-atracúrio.

A fórmula de dosagem acabada do besilato de (1R,1'R)-atracúrio (a amostra de referência), tendo uma concentração de 10 mg/mL, foi analisada em uma fase estacionária de C18 por eluição gradiente, usando uma mistura de metanol e tampão (pH 3,5). Dois tampões foram comparados: tampão de acetato e tampão de formiato (ambos preparados usando o correspondente sal de AMÔNIA). Os resultados são apresentados na tabela 5.

20

Tabela 5

Tampão de Acetato				Tampão de Formiato			
Isômero	RT, min	Resolução	Área %	Isômero	RT, min	Resolução	Área %
trans-trans	40,5		5,8	trans-trans	20,1		5,8
cis-trans	46,1	1,5	34,9	cis-trans	29,2	1,5	34,5
cis-cis	54,3	1,2	55,1	cis-cis	32,6	1,2	54,5

min = minutos

EXEMPLO 3

Este exemplo demonstra o efeito do pH em separações cromatográficas de isômeros de besilato de (1R,1'R)-atracúrio.

A fórmula de dosagem acabada do besilato de (1R,1'R)-atracúrio (a amostra de referência), tendo uma concentração de 10 mg/mL, foi analisada em uma fase estacionária de C18 por eluição gradiente, usando uma mistura de metanol e um tampão. O pH do tampão de acetato de amônio (20 mM) foi variado de 3,0 a 5,5. Os resultados

30

são mostrados na tabela 6.

Tabela 6

pH	Isômero trans-trans, (min)	Isômero cis-trans, (min)	Isômero cis-cis, (min)	Resolução Isô-meros cis-trans e cis-cis
3,0	19,1	21,4	24,3	1,0
3,5	24,5	27,2	30,5	1,1
4,0	26,5	29,4	32,8	1,1
4,5	27,1	30,0	33,4	1,1
5,5	30,2	32,9	35,9	1,2

min = minutos

EXEMPLO 4

5 Este exemplo demonstra o efeito da concentração de sal tampão na separação cromatográfica de (RP) dos isômeros do besilato de (1R,1'R)-atracúrio.

A fórmula de dosagem acabada do besilato de (1R,1'R)-atracúrio (a amostra de referência), tendo uma
 10 concentração de 10 mg/mL, foi analisada em uma fase estacionária de C18 por eluição gradiente, usando uma mistura de metanol e tampão. A concentração do tampão de acetato de amônio (pH = 3,5) foi variada de 5 mM a 100 mM. Os resultados estão representados na tabela 7.

15

Tabela 7

Concentração de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4$ (mM)	RT de trans-trans (min)	RT de cis-trans (min)	RT de cis-cis (min)	Resolução de isômeros cis-trans e cis-cis
5,0	36,9	39,3	41,8	0,9
10,0	39,7	41,8	44,1	1,2
20,0	41,6	44,0	46,1	1,4
100,0	43,1	45,6	47,7	1,6

min = minutos

Este exemplo demonstra a separação da amostra de referência de besilato de (1R,1'R)-atracúrio.

A amostra de referência de besilato de (1R,1'R)-atracúrio
 20 foi separada pelo método de HPLC de Fase Reversa conforme segue: Hypersil Hyperprep HS C18, 250x21,2 mm, coluna de 15 μ , NaNO_3 20 mM, pH ajustado em 2,0 com HNO_3 . Eluente B: metanol. Taxa de fluxo: 13 mL/minuto. A eluição gradiente é conforme detalhada na tabela 2.

As soluções de amostras para a separação por HPLC preparativa foram preparadas conforme segue: Solução 1, 827,3 mg da amostra de referência foram dissolvidos em 20 mL de eluente A (concentração: 33,1 mg/mL). Solução 2, 623,5 mg da amostra de referência de besilato de (1R,1'R)-atracúrio foram dissolvidos em 20 mL de eluente A (concentração: 31,2 mg/mL). Uma amostra de referência de besilato de (1R,1'R)-atracúrio, tendo uma concentração de 1,56 mg/mL foi preparada e mantida fria para uso na identificação e quantificação dos isômeros.

As soluções de amostras para a separação preparativa foram carregadas na coluna de C18 de Fase Reversa. A coluna foi eluída com solução de NaNO₃ 20 mM (pH ajustado em 2,0 com HNO₃) e metanol. A tabela 8 sumariza os resultados de 11 partidas de análises de frações combinadas.

Tabela 8

Partida	Concentração da mistura isomé-rica, mg/mL	Carregamento da mistura isomé-rica, mg	Carregamento total do isô-mero cis-cis, mg	Carregamento total do cátion cis-cis, mg
1	33,1	49,6	27,8	20,7
2	33,1	49,6	27,8	20,7
3	33,1	49,6	27,8	20,7
4	33,1	49,6	27,8	20,7
5	33,1	49,6	27,8	20,7
6	33,1	49,6	27,8	20,7
7	33,1	49,6	27,8	
8	31,2	46,8	26,2	19,5
9	31,2	46,8	26,2	19,5
10	31,2	46,8	26,2	19,5
11	31,2	46,8	26,2	19,5
Total		534,4	299,4	222,9

Frações do eluato da coluna foram coletadas, e aquelas frações contendo o isômero 1R-cis,1'R-cis (cisatracúrio), foram combinadas e analisadas contra a solução de referência. A tabela 9 sumariza os resultados de análises dos isômeros do besilato de (1R,1'R)-atracúrio. Conforme indicado nas tabelas 9 e 10, o carregamento total de besilato de (1R,1'R)-atracúrio foi de 299,4 mg

e o carregamento total de cisatracúrio base foi de 222,9 mg (90% de rendimento).

Tabela 9

Fração N°	Volume total, mL	Teor de cisatracúrio base total, mg	Área % do isômero cis-cis	Área % do isômero cis-trans	Quantidade do isômero cis-cis, mg
1	705	74,2	100,0	0,0	99,4
2	245	51,1	99,5	0,5	68,5
3	165	28,8	98,7	1,2	38,6
4	110	16,8	96,0	3,9	22,5
5	125	16,8	95,8	4,1	22,5
6	120	13,7	92,2	7,8	18,4
7	13	1,3	76,0	11,5	1,7
Total		202,7			271,6

Tabela 10

N°	% Pureza isomérica	% Pureza Total	Quantidade do besilato de cisatracúrio, mg	Rendimento do besilato de cisatracúrio, %
1	>99,5	>99,5	167,8	56,0
2	>98,5	>98,5	38,6	12,9
3	>95,5	>95,5	45,0	15,0
4	>92,0	>92,0	18,4	6,1
Total			269,8	90,0

5

EXEMPLO 6

Este exemplo demonstra a estabilidade do besilato de (1R,1'R)-atracúrio em diferentes tampões e a diferentes temperaturas. A estabilidade da solução de besilato de (1R,1'R)-atracúrio à temperatura ambiente para períodos de tempo de até 24 horas foi verificada usando diferentes tipos de tampões (variando com a natureza do cátion e do ânion). O diluente era uma mistura de 90% de tampão e 10% de metanol. A concentração de cátions em cada tampão era de 20 mM. As condições de HPLC foram de acordo com o procedimento USP. Os resultados são representados nas tabelas 10 e 11. A degradação (D), de acordo com os dados apresentados na tabela 11, foram calculados conforme segue:

$$D = \frac{X_0 - X_{24}}{X_0} \times 100$$

onde, X_0 = % de cisatracúrio em T_0 e X_{24} = % de

cisatracúrio após 24 horas.

Tabela 11

Nº	Tampão	pH	% de besilato de cisatracúrio em T=0	% de besilato de cisatracúrio após 24 h	% Degradação
1	$\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{CH}_3\text{COOH}$	3,5	54,7	52,9	3,3
2	$\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{HCOOH}$	3,5	54,6	54,3	0,5
3	$\text{Na}^+\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{CH}_3\text{COOH}$	3,5	54,5	52,5	3,7
4	$\text{Na}^+\text{NO}_3^-/\text{HNO}_3$	3,0	54,5	54,5	0
5	$\text{K}^+\text{H}_2\text{PO}_4$	3,0	54,7	53,7	1,8
6	$\text{CaBr}^{2-}/\text{HBr}$	3,5	54,4	54,4	0
7	dietilamina/ CH_3COOH	3,5	54,7	53,2	2,7
8	triethylamina/ CH_3COOH	3,5	54,4	52,1	4,2
9	$\text{Na}^+\text{ClO}_4/\text{HClO}_4$	O besilato de cisatracúrio é precipitado na presença de um íon ClO_4			

Um gráfico representando a estabilidade do isômero 1R-cis,1'R-trans em diferentes valores de pH é provido na figura 7, que demonstra que em pH 3, após 20 horas a área % do isômero 1R-cis,1'R-cis é apenas ligeiramente reduzida enquanto que em pH 5,5 a área % do isômero 1R-cis,1'R-cis é significativamente reduzida.

A degradação (D) de acordo com os dados apresentados na tabela 12 foi calculada conforme segue:

$$D = \frac{X_0 - X_{21}}{X_0} \times 100$$

onde, X_0 = % de cisatracúrio em T_0 e X_{21} = % de cisatracúrio após 21 horas.

Tabela 12

Tempo, horas	pH					
	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,50
0,0	53,4	53,6	53,4	53,9	53,6	53,6
10,0	51,3	51,0	50,5	49,9	46,1	40,8
21,0	50,0	49,2	47,9	46,2	38,4	27,8
Degradação %*	6,4	8,2	10,3	14,3	28,4	48,1

* O tampão usado foi o tampão $\text{Na}^+\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{CH}_3\text{COOH}$ com 3 diferentes valores de pH, isto é, valores de pH de 3,0, 4,6 e 5,5. Os valores da tabela são apresentados como % de besilato de cisatracúrio.

Uma solução amostra de besilato de (1R,1'R)-atracúrio (10

mg/mL) foi preparada usando duas soluções tampões em valores de pH de 1,0 e 2,0 e analisada na fase estacionária de C18 por eluição gradiente [tampão de KNO₃ 20 mM (no pH correspondente à preparação da amostra) - metanol]. A estabilidade da solução amostra nos valores mencionados de pH foi demonstrada à temperatura ambiente e a 4°C, conforme mostrado na tabela 13.

Tabela 13

Tempo (horas)	Área % do isômero cis-cis							
	pH = 1				pH = 2			
	RT	D, %	4°C	D, %	RT	D, %	4°C	D, %
0	54,9		54,9		54,8		54,8	
6	50,2	8,6	53,8	1,8	54,5	0,5	54,8	0
26	38,8	29,3	52,8	3,8	53,8	1,8	54,7	0,2

RT = Temperatura ambiente, D = degradação

10

$$D = \frac{X_0 - X_{6/26}}{X_0} \times 100$$

onde, X₀ = % de cisatracúrio em T₀ e X_{6/26} = % de cisatracúrio após 6 ou 26 horas.

15

EXEMPLO 7

Este exemplo demonstra um método para a purificação da solução de cisatracúrio da mistura de tampões por Extração em Fase Sólida (SPE).

Uma série de soluções amostra de mistura de isômeros de besilato de (1R,1'R)-atracúrio (55% de isômero cis-cis, 35% de cis-trans e 6% de trans-trans) foi preparada em diluentes contendo diferentes tampões (variando na natureza do cátion e do ânion). Os diluentes consistiram de uma mistura de 90% de tampão e 10% de metanol. As soluções amostra foram purificadas usando um cartucho de SPE C18.

A avaliação dos ânions do tampão foi efetuada por HPLC. Os cátions foram avaliados indiretamente. A recuperação do isolado (isômero 1R-cis,1'R-cis) e ânions foi verificada após cada etapa do método de SPE, que compreende as etapas de:

30 1) sucessivamente transferir a solução amostra e água através do sorvente;

- 2) eluição da amostra com metanol; e
3) lavar o sorvente com metanol.

Os resultados estão sumarizados na tabela 14.

Tabela 14

N°	Tampão	Remoção de ânions (%)			Recuperação de isômero cis-cis (%)		
		Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
1	$\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$ / CH_3COOH , 20 mM, pH = 3,5	91,5	11,5	2,9	0,2	66,35	0,1
2	$\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$ / HCOOH , 20 mM, pH = 3,5	79,02	6,04	1,34	1,23	71,4	0,2
3	$\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$ / NaCOOH , 20 mM, pH = 3,5	85,73	15,66	ND	10	90,8	ND
4	Na^+NO_3^- / HNO_3 , 20 mM, pH = 3,0	NE	NE	NE	ND	98,23	0,2
5	CaBr_2 / HBr , pH = 3,0	100,42	35	ND	ND	103,8	0,1

5 ND-Não Detectado, NE-Não Avaliado

EXEMPLO 8

Este exemplo mostra um método de isolamento do produto. Frações de eluatos de coluna contendo o isômero 1R-cis,1'R-cis foram coletados manualmente por Hypersil
10 Hyperprep HS C18, 250x21,2 mm, 15 μ , P.N. 37115-125, usando os seguintes eluentes:

Eluente A: solução aquosa de NaNO_3 20 mM, pH ajustado em 2,0 com HNO_3

Eluente B: metanol.

15 O gradiente foi conforme descrito na tabela 3, e a detecção foi de 280 nm. A taxa de fluxo foi de 14 mL/min e o besilato de cisatracúrio foi isolado da mistura de besilato de (1R,1'R)-atracúrio e analisado usando um sistema de HPLC. As frações foram combinadas
20 correspondentemente ao teor de isômero 1R-cis,1'R-cis, conforme detalhado na tabela 15.

Tabela 15

Concentração da solução amostra (mg/mL)	Volume de Carregamento (mL)	Peso de Carregamento (mg/coluna)	Peso de Carregamento do isômero cis-cis (mg/coluna)	% de Isômero cis-cis
30,7	1	30,7	17,2	99,1
30,7	1	30,7	17,2	99,6
30,7	2	61,4	34,4	99,6
30,7	2	61,4	34,4	99,5
Total		184,2	103,2	

As frações foram combinadas (400 mL) e misturadas com 200 mL de salmoura acidificada (pH=2 com ácido benzenossulfônico) e extraídas com 150 mL de diclorometano (três extrações consecutivas, 50 mL de diclorometano em cada extração). As fases orgânicas foram coletadas, secadas com MgSO₄ e evaporadas até a secura para produzir um óleo semi-sólido (91 mg), que foi dissolvido em 18 mL de água e o pH foi ajustado em ~3 com ácido benzenossulfônico. A solução aquosa foi colocada em um secador criogênico (em três frascos de vidro) durante 40 horas. A solução aquosa foi liofilizada para produzir 72 mg de besilato de cisatracúrio com 60% de rendimento, tendo uma pureza de 96,3% (por HPLC).

Todas as referências, incluindo publicações, pedidos de patente, e patentes, citados aqui são aqui incorporadas por referência até como se cada referência estivesse individualmente e especificamente indicada para ser incorporada por referência e estivesse integralmente apresentada aqui.

O uso dos termos "um" e "uma" e "o" e "a" e referências semelhantes no contexto de descrever a invenção (especialmente no contexto das reivindicações a seguir) deverão ser entendidos como cobrindo tanto o singular quanto o plural, salvo indicação em contrário aqui ou claramente contradito no texto. Os termos "compreendendo", "tendo", "incluindo" e "contendo" deverão ser entendidos como termos com limites abertos (i.é, significando "incluindo, mas não limitado a"),

salvo indicação em contrário. A apresentação de faixas de valores aqui é pretendida meramente para servir como um método abreviado para se referir individualmente a cada valor separado caindo dentro da faixa, salvo indicação em

5 contrário aqui, e cada valor separado é aqui incorporado ao descritivo como se apresentado individualmente. Todos os métodos descritos aqui poderão ser realizados em qualquer ordem adequada salvo indicação em contrário ou

10 dos ou de todos os exemplos, ou linguagem exemplificativa (p. ex., "tal como") provido aqui, é pretendido meramente para melhor iluminar a invenção e não impõe nenhuma limitação à abrangência da invenção, salvo reivindicação em contrário. Nenhuma linguagem no descritivo deverá ser

15 entendido como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial para a prática da invenção. Concretizações preferidas da invenção são descritas aqui, incluindo o melhor modo de conhecimento dos inventores para praticar a invenção. Variações dessas concretizações

20 preferidas poderão se tornar aparentes aqueles medianamente entendidos no assunto através da leitura da descrição acima. Os inventores esperam que aqueles entendidos no assunto empreguem tais variações como apropriadas, e os inventores pretendem que a invenção

25 seja praticada diferentemente do especificamente descrito aqui. Consequentemente, esta invenção inclui todas as modificações e equivalentes desta matéria conforme reivindicada nas reivindicações apenas conforme permitido legalmente. Ademais, qualquer combinação dos

30 elementos descritos acima em todas as variações possíveis destes estará englobada pela invenção salvo indicação em contrário ou claramente contradito pelo texto.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para separar cisatracúrio com alta pureza de uma mistura de isômeros de (1r,1'r)-atracúrio, caracterizado pelo fato de compreender eluir a mistura de
5 isômeros de uma fase estacionária de Fase Reversa (RP) com uma fase móvel ligeiramente ácido ou tamponada, para separar o isômero 1R-cis,1'R-cis (cisatracúrio) da mesma com alta pureza isomérica.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
10 pelo fato de o isômero 1R-cis,1'R-cis exibir uma taxa de degradação na fase móvel de menos que 2% após 26 horas à temperatura ambiente.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender:
15 carregar uma solução de uma mistura de isômeros de sais de (1R,1'R)-atracúrio em um sistema de HPLC de fase reversa equipado com uma coluna de separação e uma fase estacionária de fase reversa;
eluir a coluna com um eluente, que inclua uma fase
20 aquosa, um solvente orgânico ou uma mistura destes, para separar um sal de cisatracúrio da mistura de isômeros;
coletar pelo menos uma fração compreendendo o sal de cisatracúrio; e
isolar o sal de cisatracúrio.
- 25 4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de a fase estacionária de fase reversa ser uma fase estacionária de C1, uma fase estacionária de C3, uma fase estacionária de C4, uma fase estacionária de C8, uma fase estacionária de C14, uma fase estacionária de C18,
30 ou um carregamento polimérico.
5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de a fase estacionária de fase reversa ser uma fase estacionária de C18.
6. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado
35 pelo fato de a fase móvel ser uma fase aquosa, que compreendea um ácido e, opcionalmente, um sal ou uma amina.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de a fase aquosa compreender um tampão, que seja uma mistura de um ácido e um sal conjugado deste.
8. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado
5 pelo fato de a fase aquosa compreender um sal, que seja um formiato de amônio, formiato de sódio, acetato de amônio, acetato de sódio, nitrato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de bário, brometo de sódio, brometo de cálcio, dihidrogenofosfato
10 monopotássico, dihidrogenofosfato monossódico, ou uma combinação destes.
9. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de o ácido ser ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido fosfórico, ácido bórico, ácido nítrico,
15 ou uma combinação destes.
10. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de a fase aquosa compreender ácido nítrico e nitrato de sódio.
11. Método, de acordo com a reivindicação 6,
20 caracterizado pelo fato de o ácido ser ácido acético, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido canfórico, ácido adamantanoacético ou uma combinação destes.
12. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de o tampão ser uma mistura de
25 ácido acético e acetato de sódio, uma mistura de ácido cítrico e citrato de sódio, uma mistura de ácido fórmico e formiato de amônio, ou uma combinação destes.
13. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de a fase aquosa compreender um
30 sal de um ácido e ter um pH de 1,0 a 5,5.
14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de a fase aquosa ter um pH de 3,0 a 3,5.
15. Método, de acordo com a reivindicação 7,
35 caracterizado pelo fato de a concentração do tampão na fase aquosa ser de 20 mM a 40 mM.
16. Método, de acordo com a reivindicação 3,

caracterizado pelo fato de o eluente compreender pelo menos um solvente orgânico, que seja acetonitrila, metanol, etanol, álcool isopropílico, tetrahidrofurano (THF), ou uma mistura destes.

5 17. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de compreender efetuar uma etapa de troca iônica.

18. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de o sal de cisatracúrio ser
10 isolado da mistura líquida de eluição por HPLC por um método de Extração em Fase Sólida (SPE), o qual método compreende:

contatar o líquido de eluição por HPLC com um sorvente; e eluir o produto do sorvente com um solvente orgânico.

15 19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de o método de SPE compreender ainda:

opcionalmente evaporar pelo menos uma porção de um solvente orgânico do líquido de eluição por HPLC;

20 adicionar um solvente orgânico ao líquido de eluição por HPLC e separar as fases e opcionalmente lavar a camada orgânica;

opcionalmente mudar o ânion usando um método de troca iônica adequado; e

25 isolar o produto da fase aquosa.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de o solvente orgânico adicionado ser acetato de etila, acetato de n-propila, acetato de isopropila, acetato de n-butila, acetato de isobutila,
30 tolueno, clorofórmio, diclorometano, ou uma mistura destes.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de o solvente orgânico adicionado ser diclorometano.

35 22. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de o sal de cisatracúrio ser isolado como besilato de cisatracúrio tendo uma pureza

isomérica de pelo menos 98%.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de o sal de cisatracúrio ser isolado como besilato de cisatracúrio tendo uma pureza isomérica de pelo menos 99%.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de o sal de cisatracúrio ser isolado como besilato de cisatracúrio tendo uma pureza isomérica de pelo menos 99,5%.

1/11

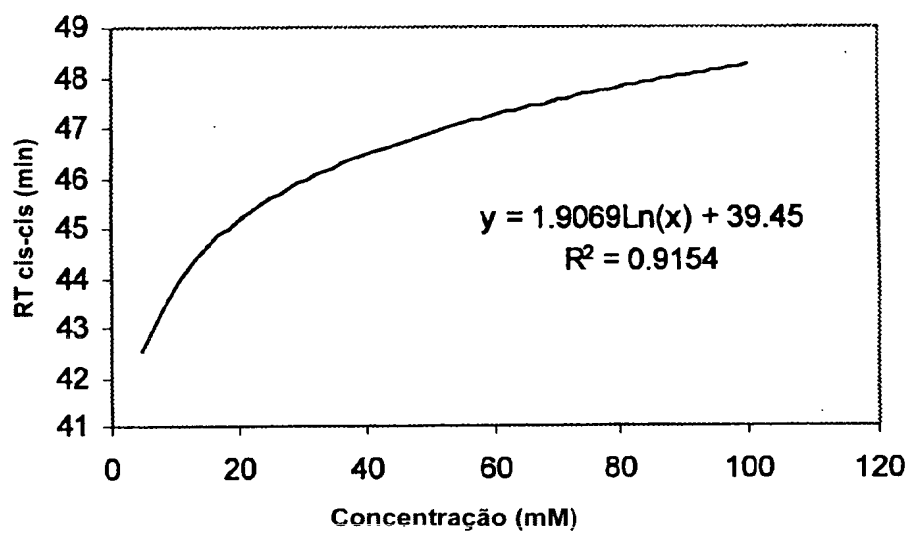


FIG.1

2/11

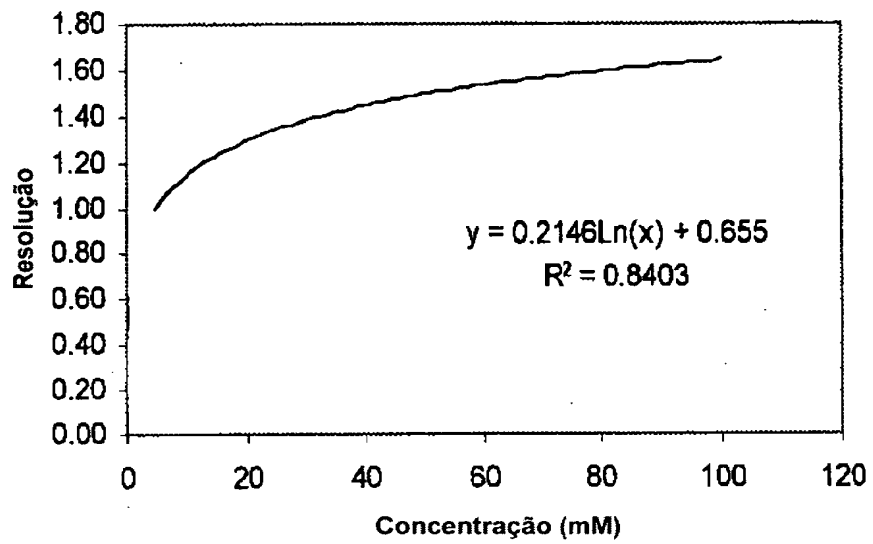


FIG.2

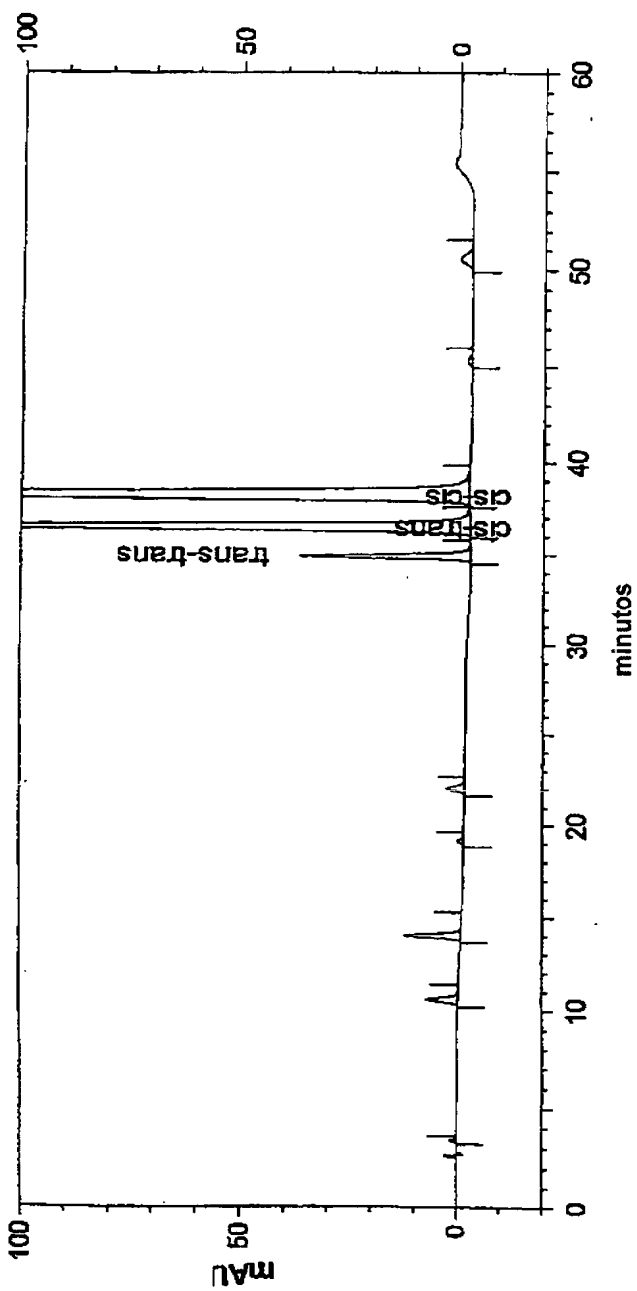


FIG.3A

Pico #	Tempo de Retenção	Área	Área percentual	Altura	Largura	Pratos Teóricos (USP)	Pratos Teóricos (DAB)	Resolução (USP)	Resolução (DAB)	Assimetria
1	3.398	10145	0.10	1597	0.4	8504	9762	0.00	0.00	0.91
2	10.640	114028	1.16	7038	1.2	10431	11117	25.67	26.83	1.17
3	14.025	190047	1.93	13248	1.7	23327	24314	8.63	8.89	1.15
4	19.140	25749	0.26	1810	0.8	43230	44510	13.91	14.19	1.12
5	22.043	82082	0.84	4349	1.1	31687	32740	6.72	6.85	1.11
6	34.898	560543	5.70	39340	1.3	141617	145855	29.68	30.23	1.21
7	36.433	3367479	34.27	168741	1.7	74180	77255	3.39	3.46	1.53
8	38.135	5349327	54.44	221689	2.2	54201	57667	2.86	2.94	1.81
9	45.330	25168	0.26	957	1.0	66590	0	10.60	0.00	0.00
10	50.570	101023	1.03	2875	1.6	45865	48335	6.36	0.00	1.11
Totals		9825591	100.00	461644						

FIG.3B

5/11

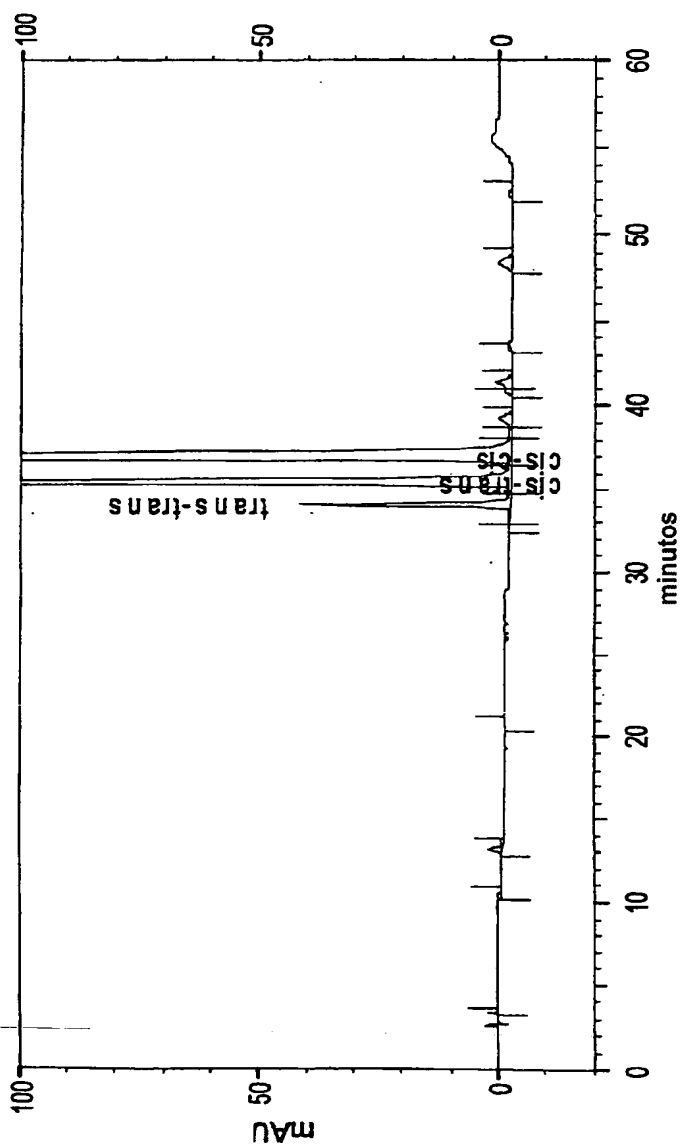


FIG.4A

Pico #	Tempo de Retenção	Área	Área percentual	Altura	Largura	Pratos Teóricos (USP)	Pratos Teóricos (DAB)	Resolução n (USP)	Resolução (DAB)	Assimetria
1	3.362	9785	0.10	1806	0.4	10518	11755	0.00	0.00	0.93
2	10.350	8473	0.09	691	0.7	17462	0	31.45	0.00	0.00
3	13.143	40651	0.42	2924	1.0	21311	22362	8.30	0.00	1.12
4	20.708	12723	0.13	496	0.9	14041	12381	14.28	13.84	1.42
5	32.723	7709	0.08	495	0.5	106840	0	21.86	0.00	0.00
6	34.060	573929	5.92	43400	1.8	168130	174417	3.65	0.00	1.24
7	35.438	3418568	35.26	188508	1.6	86353	89523	3.38	3.46	1.52
8	36.922	5319157	54.87	244582	1.6	62650	66715	2.77	2.84	1.77
9	38.303	21344	0.22	816	0.7	30557	0	1.88	0.00	0.00
10	39.300	72112	0.74	2417	1.2	38242	36672	1.19	0.00	0.00
11	40.863	33788	0.35	1597	0.7	45052	0	1.99	0.00	0.00
12	41.350	73426	0.76	3070	1.0	63316	65763	0.68	0.00	0.00
13	43.520	8429	0.09	509	0.5	0	139311	0.00	3.92	0.77
14	48.352	82016	0.85	2479	1.5	48543	50001	0.00	7.28	1.10
15	52.297	12022	0.12	320	1.3	37932	0	4.04	0.00	0.00
Totais		9694132	100.00	494110						

FIG.4B

7/11

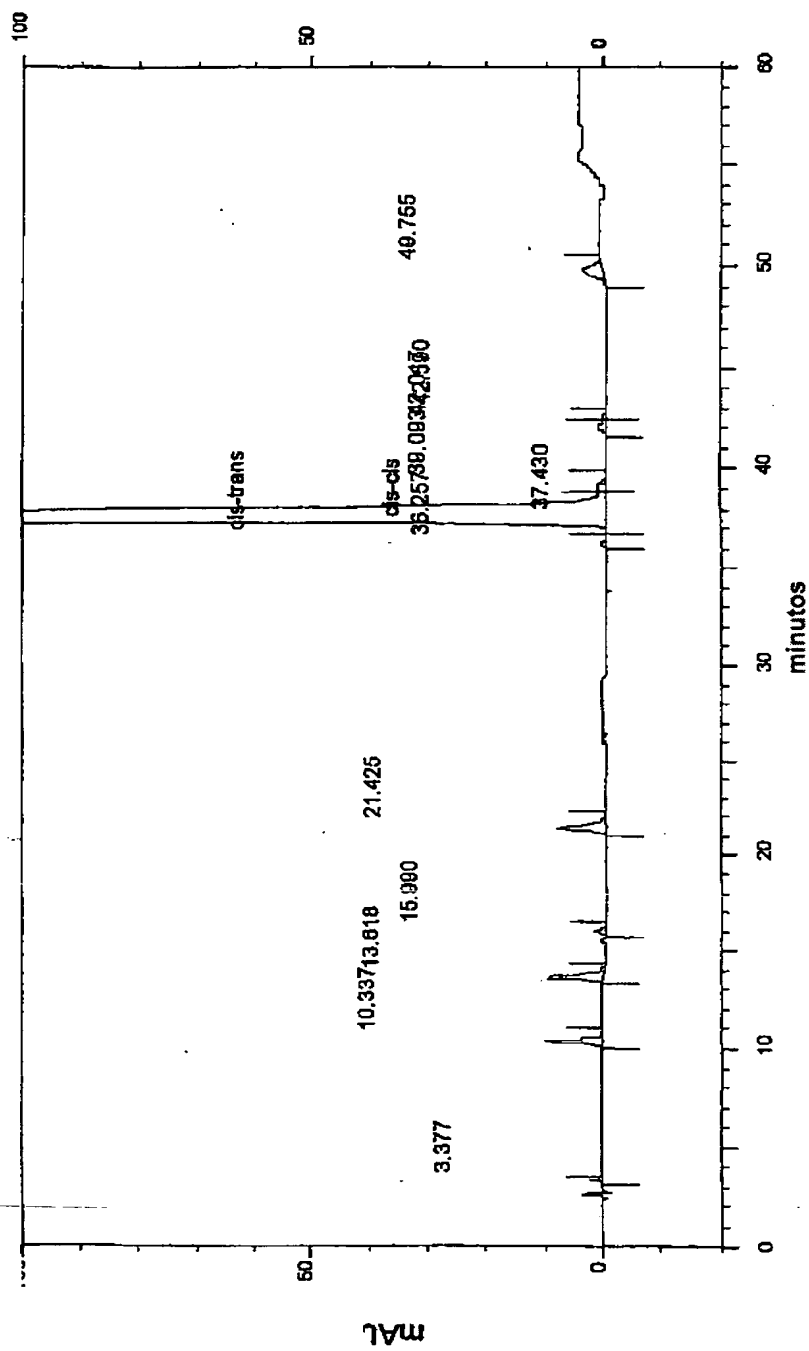


FIG.5A

Pico #	Tempo de Retenção	Área	Área percentual	Altura	Largura	Pratos Teóricos (USP)	Pratos Teóricos 1 (DAB)	Resolução (USP)	Resolução (DAB)	Assimetria
1	3.377	12929	0.10	2273	0.4	9973	10858	0.00	0.00	0.96
2	10.337	131220	0.99	10027	1.1	14865	15489	29.34	30.22	1.11
3	13.618	132805	1.00	9457	1.1	22369	23582	9.33	9.58	1.15
4	15.990	24120	0.18	1736	0.7	30343	31611	6.49	6.66	1.07
5	21.425	153785	1.15	8269	1.3	31568	32960	12.80	13.10	1.13
6	36.257	20193	0.15	1064	0.8	88421	93999	30.58	31.45	0.00
7	37.430	12819739	94.74	424547	2.1	31657	34669	1.77	1.84	2.42
8	39.093	49290	0.37	1493	1.2	13672	0	1.53	0.00	0.00
9	42.017	40399	0.30	1618	0.8	60712	64007	2.90	0.00	0.00
10	42.590	14006	0.11	592	0.6	32207	0	0.70	0.00	0.00
11	49.755	121464	0.91	3492	1.6	45878	47663	7.63	0.00	1.06

Totais		13319950	100.00	464588						
--------	--	----------	--------	--------	--	--	--	--	--	--

FIG.5B

9/11

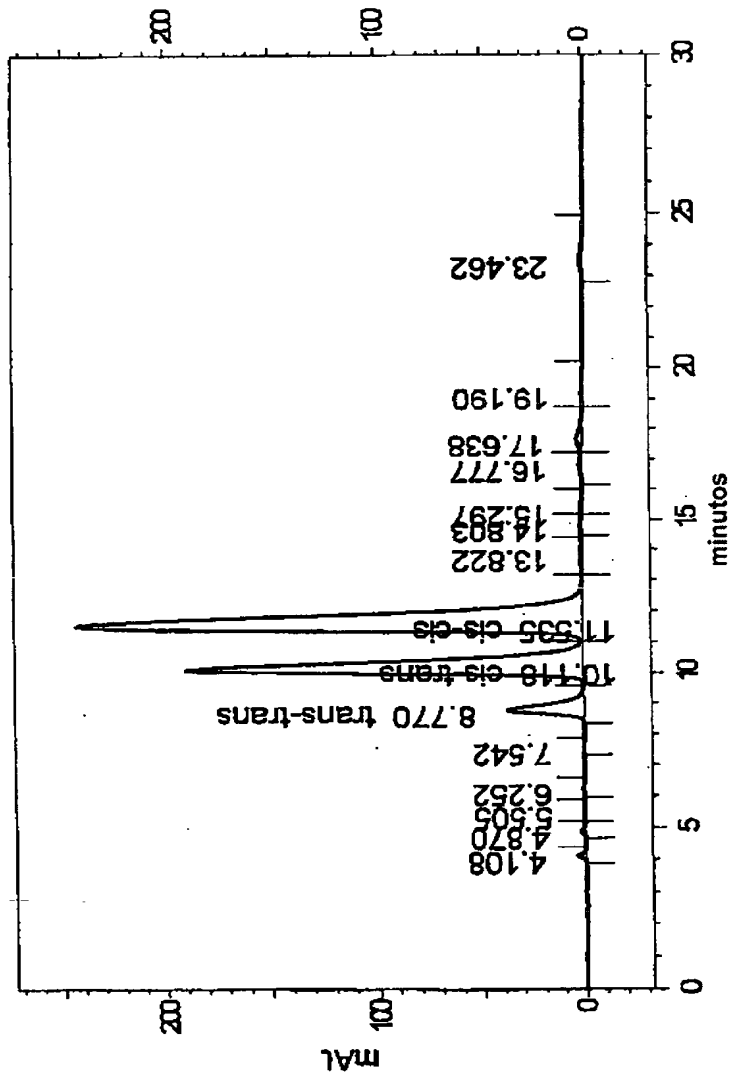


FIG.6A

10/11

Pico #	Tempo de Retenção	Área	Área percentual	Pratos Teóricos (USP)	Resolução (USP)	Assimetria	Altura
1	4.108	32878	0.24	5435	0.0	1.4	3851
2	4.870	21012	0.15	5161	3.1	1.4	2003
3	5.505	3957	0.03	3770	2.0	0.0	256
4	6.252	9629	0.07	5048	2.1	1.2	728
5	7.542	3622	0.03	4237	3.2	1.3	223
6	8.770	784690	5.64	4145	2.4	1.4	37692
7	10.118	4939085	35.47	3337	2.2	1.6	189633
8	11.535	7816208	56.14	2925	1.8	1.8	242364
9	13.822	18062	0.13	2524	2.3	0.9	454
10	14.803	19936	0.14	5786	1.0	0.0	753
11	15.297	13557	0.10	4294	0.6	0.0	502
12	16.777	52163	0.37	3255	1.4	0.0	1441
13	17.638	117465	0.84	3816	0.7	0.0	2798
14	19.190	21879	0.16	5026	1.4	0.0	538
15	23.462	68677	0.49	5197	3.6	0.0	1381
TOTALS		13923021	100.00				484615

FIG.6B

11/11

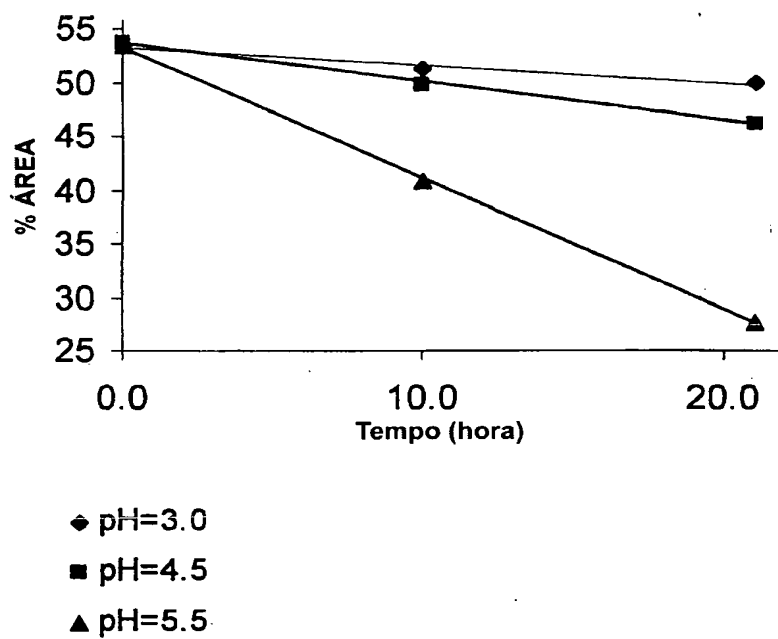


FIG.7

RESUMO

"MÉTODO PARA SEPARAR CISATRACÚRIO COM ALTA PUREZA DE UMA MISTURA DE ISÔMEROS DE (1R,1'R)-ATRACÚRIO".

5 É provido um método para separar cisatracúrio de uma mistura de isômeros de atracúrio, o qual método inclui eluir de uma fase estacionária de Fase Reversa (RP) com uma fase móvel na qual os isômeros estão estáveis. O método da presente invenção pode ser convenientemente e economicamente expandido.