



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 351 651**

② Número de solicitud: 201050007

⑤ Int. Cl.:
C07D 417/12 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)
B01D 1/08 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **01.07.2004**

⑩ Prioridad: **02.07.2003 US 60/484,861**
04.03.2004 US 60/550,098

④ Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2011**

Fecha de la concesión: **16.09.2011**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **28.09.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.09.2011

⑥ Número de la solicitud inicial: **200550088**

⑦ Titular/es: **GILEAD SCIENCES Inc.**
333, Lakeside Driver
Foster City, California 94404, US

⑧ Inventor/es: **Szabo, Csaba;**
Bodi, Istvan;
Singer, Claude y
Gyollai, Viktor

⑨ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑤ Título: **Método para la determinación de impurezas en una sal de lisina de aztreonam amorfa.**

⑥ Resumen:

Método para la determinación de impurezas en una sal de lisina de aztreonam amorfa.

La presente invención describe un método para la determinación de impurezas en una sal de lisina de aztreonam amorfa que comprende las etapas de formación de una solución de muestra, inyección de una muestra de la solución de sal de lisina de aztreonam en una columna de HPLC, elusión de la muestra inyectada como una mezcla y determinación de la cantidad de al menos una impureza.

ES 2 351 651 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

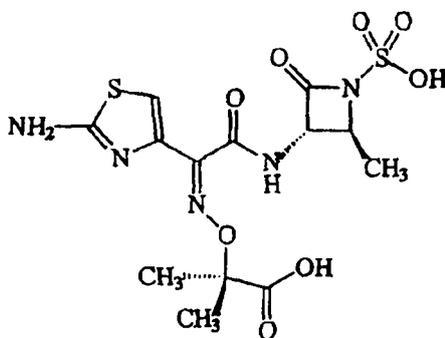
Método para la determinación de impurezas en una sal de lisina de aztreonam amorfa.

5 **Campo de la invención**

La presente invención describe un método para la determinación de impurezas en una sal de lisina de aztreonam amorfa.

10 **Antecedentes de la invención**

El aztreonam es un antibiótico de monobactama descrito en la patente US 4.775.670, que se incorpora aquí mediante referencia, en su totalidad. El aztreonam tiene el nombre químico ácido (Z)-2-[[[(2-amino-4-tiazolil)[(2S,-3S)-2-metil-4-oxo-1-sulfo-3-azetidínil]carbamoil]metileno]amino]oxi]-2-metilpropiónico. El aztreonam también se conoce como ácido [3S-[3 α (Z),4 β]]-3-[[[(2-amino-4-tiazolil)[(1-carboxi-1-metiletoxi)imino]acetil]amino]-4-metil-2-oxo-1-azetidínulfónico y ácido (2S,3S)-3-[[2-[2-amino-4-tiazolil)-(Z)-2-[(1-carboxi-1-metiletoxi)imino]acetil]amino]-4-metil-2-oxo-1-azetidín-1-sulfónico. El aztreonam tiene la estructura:



La patente US 4.775.670 describe un procedimiento para elaborar aztreonam y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Sin embargo, la patente US 4.775.670 no enseña cómo preparar sales de aztreonam con aminos o aminoácidos.

Los solicitantes encontraron dificultades no esperadas cuando trataban de preparar sales de aztreonam con aminos y aminoácidos mediante la disolución del ácido y la base en un disolvente y la precipitación de la sal. En la mayoría de los experimentos se obtenía un aceite, que era imposible de cristalizar y que se descomponía muy rápidamente.

Los solicitantes han descubierto métodos que permiten la preparación de una sal de L-lisina de aztreonam sólida estable.

45 **Exposición sumaria de la invención**

La presente invención describe un método para la determinación de impurezas en una sal de lisina de aztreonam amorfa que comprende las etapas de formación de una solución de muestra, inyección de una muestra de la solución de sal de lisina de aztreonam en una columna de HPLC, elusión de la muestra inyectada como una mezcla y determinación de la cantidad de al menos una impureza.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, se refiere a un método para determinar el nivel de impurezas en una sal de lisina de aztreonam amorfa, que comprende las etapas de:

- formar una solución de muestra que comprende la sal de lisina de aztreonam en una primera solución tampón de fosfato monobásico a un pH inicial.
- inyectar una muestra de la solución de sal de lisina de aztreonam en una columna de HPLC.
- eluir la muestra inyectada con una mezcla que comprende una segunda solución tampón de fosfato monobásico.
- determinar una cantidad de al menos una impureza.

ES 2 351 651 B2

En este mismo sentido y según una realización preferida, en dicho método, inicialmente, la muestra se eluye con un eluyente que comprende aproximadamente 100 por cien en volumen de un eluyente (A), en donde el eluyente (A) comprende una solución tampón de KH_2PO_4 que tiene una concentración de aproximadamente 0,02 M y un pH ajustado hasta aproximadamente 3 con ácido fosfórico aproximadamente al 25 por ciento, en peso durante un primer período de tiempo, la cantidad de eluyente (A) se reduce y se añade al eluyente una cantidad de un eluyente de acetonitrilo (B); durante un segundo período de tiempo, la cantidad de eluyente (A) se reduce adicionalmente y la cantidad de eluyente (B) se incrementa, y durante un tercer período de tiempo, la cantidad de eluyente (A) se incrementa hasta aproximadamente 100 por cien, en volumen, y la cantidad de eluyente (B) se reduce hasta aproximadamente 0 por ciento, en volumen.

Ejemplos

El contenido de impurezas de la sal de lisina de aztreonam usando el método de HPLC se determina como sigue:

- a. Una muestra de sal de lisina de aztreonam se disuelve en diluyente de solución tampón de KH_2PO_4 0,02 M (pH ajustado hasta 2,0 con ácido fosfórico al 25% p/p),
- b. La solución de muestra (alrededor de 10 μl) se inyecta en una columna de HPLC RP-18 de 3 μm de 100,0 mm x 4,0 mm,
- c. Eluyendo en gradiente con una mezcla de solución tampón de KH_2PO_4 0,02 M (pH ajustado aproximadamente hasta 3,0 con ácido fosfórico al 25% p/p) (A) y acetonitrilo (B) de acuerdo con el siguiente perfil:

Gradiente de HPLC

Caudal [ml/min]	Tiempo [min]	Eluyente A [% v/v]	Eluyente B [% v/v]
1,2	0,0	100,0	0,0
1,2	16,0	84,0	16,0
1,2	25,0	70,0	30,0
1,2	25,1	100,0	0,0
1,2	30,0	100,0	0

- d. Las cantidades de cada impureza se midieron a una longitud de onda de 230 nm con un detector UV y un dispositivo de registro apropiado.
- e. La cantidad de cada impureza se calculó en referencia a un patrón de trabajo de aztreonam a una concentración de 2,5 g/ml.

En el método anterior, el aztreonam tiene un tiempo de retención de aproximadamente 10,2 minutos.

El ensayo de sal de lisina de aztreonam usando el método de HPLC se determinó como sigue:

- a. Disolviendo muestra de sal de lisina de aztreonam en una mezcla de solución tampón de KH_2PO_4 0,02 M (pH ajustado hasta 3,0 con ácido fosfórico al 25% p/p) y diluyente de metanol (80:20).
- b. Inyectando la solución de muestra (alrededor de 10 μl) en una columna de HPLC RP-18 de 3 μm de 50,0 mm x 4,6 mm.
- c. Eluyendo isocráticamente a 1,5 ml/min con una mezcla de solución tampón de KH_2PO_4 0,02 M (pH ajustado hasta 3,0 con ácido fosfórico al 25% p/p) y metano en una relación de 83:17% v/v.
- d. Medida de las cantidades de cada impureza a una longitud de onda de 270 nm con un detector UV y un dispositivo de registro apropiado.
- e. Cálculo del ensayo con referencia al patrón de trabajo de aztreonam a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

ES 2 351 651 B2

En el método anterior, el aztreonam tiene un tiempo de retención de aproximadamente 2,3 minutos.

Habiendo descrito así la invención con referencia a modalidades preferidas particulares y habiéndola ilustrado con ejemplos, los expertos en la técnica pueden apreciar modificaciones de la invención como las descritas e ilustradas que no se apartan del espíritu y el alcance de la invención según se describe en la memoria descriptiva.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 351 651 B2

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar un nivel de impurezas en una sal de lisina de aztreonam amorfa, que comprende:

- a. formar una solución de muestra que comprende la sal de lisina de aztreonam en una primera solución tampón de fosfato monobásico a un pH inicial;
- b. inyectar una muestra de la solución de sal de lisina de aztreonam en una columna de UPLC;
- c. eluir la muestra inyectada con una mezcla que comprende una segunda solución tampón de fosfato monobásico; y
- d. determinar una cantidad de al menos una impureza.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra inyectada se eluye en gradiente.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que:

- a. la muestra de sal de lisina de aztreonam se disuelve en una solución tampón de KH_2PO_4 , que tiene una concentración de aproximadamente 0,02 M y un pH ajustado hasta aproximadamente 2 con ácido fosfórico aproximadamente al 25 por ciento en peso;
- b. la muestra inyectada se eluye con una mezcla de solución tampón de KH_2PO_4 (A) y acetonitrilo (B), en donde la solución tampón (A) tiene una concentración de aproximadamente 0,02 M y un pH ajustado hasta aproximadamente 3 con ácido fosfórico aproximadamente al 25 por ciento en peso;
- c. la cantidad de la al menos una impureza se mide a una longitud de onda de aproximadamente 230 nm con un detector UV; y
- d. la cantidad de la impureza se determina mediante referencia a un patrón de trabajo de aztreonam a una concentración de aproximadamente 2,5 g/ml.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que:

- a. inicialmente, la muestra se eluye con un eluyente que comprende aproximadamente 100 por cien en volumen de un eluyente (A), en donde el eluyente (A) comprende una solución tampón de KH_2PO_4 que tiene una concentración de aproximadamente 0,02 M y un pH ajustado hasta aproximadamente 3 con ácido fosfórico aproximadamente al 25 por ciento, en peso;
- b. durante un primer periodo de tiempo, la cantidad de eluyente (A) se reduce y se añade al eluyente una cantidad de un eluyente de acetonitrilo (B);
- c. durante un segundo período de tiempo, la cantidad de eluyente (A) se reduce adicionalmente y la cantidad de eluyente (B) se incrementa, y
- d. durante un tercer período de tiempo, la cantidad de eluyente (A) se incrementa hasta aproximadamente 100 por cien, en volumen, y la cantidad de eluyente (B) se reduce hasta aproximadamente 0 por ciento, en volumen.

5. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra inyectada se eluye isocráticamente.

6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que:

- a. la muestra de sal de lisina de aztreonam se disuelve en una mezcla de solución tampón de KH_2PO_4 , que tiene una concentración de aproximadamente 0,02 M y un pH ajustado hasta aproximadamente 3 con ácido fosfórico aproximadamente al 25 por ciento, en peso, y metanol;
- b. la muestra inyectada se eluye a aproximadamente 1,5 ml/min con una mezcla de una solución tampón de KH_2PO_4 , que tiene una concentración de aproximadamente 0,02 M y un pH ajustado hasta aproximadamente 3 con ácido fosfórico aproximadamente al 3 por ciento en peso, y metanol en una relación en volumen de aproximadamente 83:17;
- c. la cantidad de la al menos una impureza se mide a una longitud de onda de aproximadamente 270 nm con un detector UV; y
- d. la cantidad de la impureza se determina mediante referencia a un patrón de trabajo de aztreonam a una concentración de aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:201050007

②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.07.2004

③② Fecha de prioridad: **02-07-2003**
04-03-2004

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KIRSCHBAUM, J.J. & NOROSKI, J.E. "Simple high-performance chromatographic methods for resolving complex mixtures". Trends in Analytical Chemistry 1989, Volumen 8, Número 5, páginas 166-171. Ver página 166, resumen; página 168, columna 2, párrafo 2; página 168, figura 4.	1-6
A	LOFTSSON, T. & ÓLAFSDÓTTIR, B.J. "Cyclodextrin-accelerated degradation of β -lactam antibiotics in aqueous solutions". International Journal of Pharmaceutics 1991, Volumen 67, páginas R5-R7. Ver página R5, resumen; página R6, columna 1.	1-6
A	HUSAIN, S. & RAO, R.N. "Monitoring of Process Impurities in Drugs". Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences 1998, Capítulo 19, páginas 833-888. Ver especialmente página 834, apartado 19.1; página 838, apartado 19.2.	1-6
P,A	US 20050063912 A1 (MONTGOMERY, A.B. et al.) 24.03.2005, párrafos [0120]-[0125].	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.06.2010

Examinador
G. Esteban García

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D417/12 (01.01.2006)

G01N30/88 (01.01.2006)

B01D1/08 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, G01N, B01D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, EMBASE, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KIRSCHBAUM, J.J. & NOROSKI, J.E. Trends in Analytical Chemistry 1989, Vol. 8, Nº 5, pp. 166-171	1989
D02	LOFTSSON, T. & ÓLAFSDÓTTIR, B.J. International Journal of Pharmaceutics 1991, Vol. 67, pp. R5-R7	1991
D03	HUSAIN, S. & RAO, R.N. Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences 1998, Capítulo 19, pp. 833-888	1998

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un método para determinar el nivel de impurezas en una sal de lisina de aztreonám amorfa en una columna de HPLC utilizando una solución tampón de fosfato monobásico.

El documento D01 divulga la utilización de técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para llevar a cabo diversos procedimientos de análisis de muestras, como es la separación de mezclas complejas (ver página 166, resumen), permitiendo el análisis simultáneo del producto final, sus precursores sintéticos y posibles impurezas (ver página 168, columna 2, párrafo 2). Entre otros ejemplos se divulga la separación de aztreonám de una muestra que contiene además arginina, junto con diversas impurezas añadidas, utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y una solución de ácido fosfórico al 0,1 %, realizándose la detección mediante absorción UV a 206 nm (ver página 168, figura 4).

El documento D02 divulga un estudio sobre el efecto de diversas ciclodextrinas en la degradación de aztreonám y fenoximetilpenicilina en soluciones acuosas tamponadas (ver página R5, resumen). La determinación cuantitativa de aztreonám se realiza por medio de HPLC, con detección UV a 254 nm y utilizando como fase móvil una mezcla metanol/agua/ácido acético (25:73:2) (ver página R6, columna 1).

Estos documentos, D01 y D02, divulgan la determinación de aztreonám y no de la sal de lisina del mismo.

Por otro lado, el documento D03 divulga una revisión sobre la monitorización de impurezas en productos farmacéuticos, utilizando diversas técnicas, entre las que se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución, siendo la elección del gradiente de elución, la temperatura y la longitud de onda del método de detección, de gran importancia para asegurar la determinación de todos los componentes presentes (ver página 834, apartado 19.1; página 838, apartado 19.2).

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado sólo o en combinación con los otros contiene divulgación o sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia un método de determinación del nivel de impurezas en una sal de lisina de aztreonám por medio de HPLC como el de la invención.

Por tanto, se considera que la invención recogida en las reivindicaciones 1-6 reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.