

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 076**

21 Número de solicitud: 201930256

51 Int. Cl.:

G01N 30/02 (2006.01)

C07F 9/655 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

21.03.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.09.2020

Fecha de concesión:

05.04.2021

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.04.2021

73 Titular/es:

**LABORATORIOS ERN, S.A. (100.0%)
C/ Perú, 228
08020 Barcelona (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

**DIVASTO, Robert y
MARIÑO BERMÚDEZ, Marta María**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FOSFOMICINA Y DE SUS IMPUREZAS Y/O PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN**

57 Resumen:

Método para la detección y cuantificación de fosfomicina y de sus impurezas y/o productos de degradación.

La presente invención se refiere a un método para la detección y cuantificación de fosfomicina y de sus impurezas y/o productos de degradación, tanto en muestras del principio activo solo, como en formulaciones farmacéuticas que lo contienen. El método comprende el uso de cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) utilizando una fase móvil de elución por gradiente entre acetonitrilo (fase móvil A) y una solución acuosa de acetato de amonio (fase móvil B) y la detección mediante un detector de aerosol cargado (CAD).

ES 2 784 076 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FOSFOMICINA Y DE SUS IMPUREZAS Y/O PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

5

Campo de la técnica

La presente invención se refiere un método para detectar y cuantificar el antibiótico fosfomicina y sus impurezas y/o productos de degradación, tanto en muestras del principio activo solo, como en formulaciones farmacéuticas que lo contienen.

10

Estado de la técnica anterior

La fosfomicina es un antibiótico de amplio espectro que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana.

15

La fosfomicina puede administrarse tanto por vía oral como por inyección intramuscular o intravenosa.

20 Cuando se administra por vía oral, generalmente se emplea la sal cálcica o la sal trometamol de la fosfomicina, en formas farmacéuticas tales como cápsulas, o granulado o polvo para ser reconstituido con agua, y está indicada principalmente en el tratamiento de infecciones urinarias.

25 Cuando se administra por vía parenteral, generalmente se emplea la fosfomicina disódica, en formulaciones pulverulentas, habitualmente con ácido succínico como excipiente, destinadas a ser reconstituidas antes de su inyección.

30 Por vía intramuscular, la fosfomicina está indicada para el tratamiento de infecciones del tracto genitourinario, del tracto respiratorio y en infecciones de tejidos blandos, entre otras. Por vía intravenosa, la fosfomicina está indicada en infecciones complicadas o graves urinarias, dermatológicas, ginecológicas, respiratorias, del aparato digestivo o locomotor, postquirúrgicas, septicemias, endocarditis y meningitis, entre otras.

35 Al igual que para cualquier otro principio activo farmacéutico, resulta imprescindible disponer

de métodos analíticos efectivos para la determinación cuantitativa de la fosfomicina y de sus impurezas y/o productos de degradación, tanto en muestras de la propia sustancia activa como en formulaciones farmacéuticas, para poder garantizar que se mantienen los niveles de pureza necesarios.

5

La determinación de la fosfomicina resulta problemática debido a que se trata de una molécula pequeña, de carácter ácido, hidrofílica y altamente polar, por lo que las técnicas más habituales, tales como la cromatografía líquida de fase reversa o de fase normal, resultan totalmente inadecuadas. Otra dificultad añadida radica en que la molécula de fosfomicina carece de un cromóforo, por lo que el uso de un detector ultravioleta (UV) estándar resulta también ineficaz.

Por lo tanto, persiste la necesidad de disponer de un método analítico eficaz para la determinación de la fosfomicina y de sus impurezas y/o productos de degradación, tanto en muestras de la sustancia activa como en formulaciones farmacéuticas, que permita la identificación y cuantificación esencialmente de todas las impurezas y/o productos de degradación presentes en las muestras.

Objeto de la invención

20

El objeto de la presente invención es un método para la detección y cuantificación de fosfomicina y de sus impurezas y/o productos de degradación.

Descripción detallada de la invención

25

El objeto de la presente invención es un método para la detección y cuantificación de fosfomicina y de sus impurezas y/o productos de degradación en muestras de fosfomicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o de formulaciones farmacéuticas que comprenden fosfomicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, caracterizado porque comprende:

30

(a) someter la muestra a cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) utilizando una fase móvil de elución por gradiente entre acetonitrilo (fase móvil A) y una solución acuosa de acetato de amonio (fase móvil B); y

35

(b) detectar y cuantificar la fosfomicina, impurezas y/o productos de degradación separados en la etapa a) utilizando un detector de aerosol cargado (CAD).

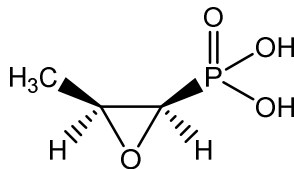
Después de evaluar infructuosamente muchas opciones analíticas, los autores de la presente invención han desarrollado un método basado en cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) combinada con un detector de aerosol cargado (CAD) que permitió
5 identificar hasta 15 impurezas o productos de degradación de la fosfomicina.

A lo largo de la presente descripción, así como en las reivindicaciones, las formas en singular “el”, “la”, “un”, “una” incluyen también el plural, a no ser que el contexto claramente indique lo contrario. El término “aproximadamente” antepuesto a un determinado valor indica que se
10 incluye dicho valor concreto y también una variación de $\pm 5\%$ alrededor de dicho valor. Cuando se indican rangos numéricos, se entiende que se incluyen los dos límites indicados del rango, y todos los valores intermedios.

La fosfomicina

15

La fosfomicina es la denominación común internacional (DCI) correspondiente al ácido [(2*R*,3*S*)-3-metiloxiran-2-il]fosfónico (número CAS 23155-02-4) y presenta la siguiente estructura:

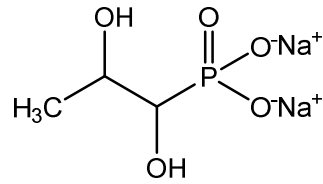


20

Se trata de un antibiótico de amplio espectro que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Químicamente, se trata de una sustancia ácida, concretamente un ácido fosfónico, y habitualmente se emplea en terapia en forma de sal, por ejemplo, como la sal disódica, la sal cálcica o la sal con trometamina.

25

En las monografías de la fosfomicina disódica, cálcica y la sal con trometamina en la Farmacopea Europea solamente se identifica una impureza, denominada “impureza A”, que corresponde al (1,2-dihidroxiopropil)fosfonato, es decir, a la apertura del anillo de oxirano. Por ejemplo, para el caso de la fosfomicina disódica, la impureza A presenta la siguiente
30 estructura:



Entre las diversas formas farmacéuticas de fosfomicina disponibles de forma comercial está una forma inyectable que contiene fosfomicina disódica como ingrediente activo y ácido succínico como excipiente.

En una realización de la invención, el método se refiere a la detección y cuantificación de fosfomicina y sus impurezas y/o productos de degradación en una muestra de fosfomicina disódica.

En otra realización, el método se refiere a la detección y cuantificación de fosfomicina y sus impurezas y/o productos de degradación en una muestra de una formulación farmacéutica que comprende fosfomicina disódica como ingrediente activo y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida de la invención, la formulación farmacéutica consiste esencialmente en fosfomicina disódica y ácido succínico como excipiente, preferiblemente la cantidad de ácido succínico en la formulación está entre 1-5 % (p/p).

El método analítico de la invención

Detector de aerosol cargado (CAD)

Los detectores de aerosol cargado (*Charged Aerosol Detection, CAD*), también denominados “Corona” son bien conocidos como detectores universales en cromatografía líquida, y su acción se basa en una nebulización de la fase móvil para formar un aerosol, seleccionándose las gotas más pequeñas, y evaporándose el solvente para formar partículas, que son cargadas y cuantificadas (ver, por ejemplo, *Charged Aerosol Detection for Liquid Chromatography and Related Separation Techniques*, P.H. Gamache Editor, John Wiley & Sons, 2017).

Cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC)

La cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC, *hydrophilic interaction liquid chromatography*) se caracteriza por utilizar mezclas de agua o solución tampón con solventes orgánicos como fase móvil, mientras que las fases estacionarias son adsorbentes polares muy hidrofílicos.

5

Ejemplos de fases estacionarias son la sílice, o sílice con algún grupo polar enlazado, como aminas, amidas, zwitteriones, o polioles.

En una realización preferida de la invención se utiliza una fase estacionaria de tipo zwitteriónico. Este tipo de columnas están disponibles de forma comercial. Por ejemplo, puede utilizarse la columna de HPLC ZIC® -pHILIC (Merck SeQuant AB).

10

Como fase móvil se utiliza una mezcla de acetonitrilo (fase móvil A) y una solución acuosa de acetato de amonio (fase móvil B).

15

Generalmente, la concentración del acetato de amonio en la fase móvil B está comprendida entre 10 y 40 mM, preferiblemente entre 15 y 35 mM, más preferiblemente entre 20 y 30 mM, aún más preferiblemente es de aproximadamente 25 mM, y aún más preferiblemente es de 25 mM.

20

El tiempo de elución de la fase móvil está comprendido generalmente entre 45 y 60 minutos, preferiblemente es de aproximadamente 50 minutos, y más preferiblemente es de 50 minutos.

El flujo de la fase móvil es generalmente de entre 0,7 y 1 ml/min, preferiblemente es de aproximadamente 0,8 ml/min, y más preferiblemente es de 0,8 ml/min.

25

La elución de la fase móvil se realiza según un gradiente entre las fases A (acetonitrilo) y B (solución acuosa de acetato de amonio).

Preferiblemente, dicho gradiente se inicia ($t=0$) y se finaliza (t =tiempo de elución) con una relación A:B de 85:15, con una disminución gradual de la relación hasta 40:60 aproximadamente a $t=35$, y un subsiguiente incremento hasta llegar de nuevo 85:15 al finalizar la elución.

En una realización particularmente preferida de la invención, el tiempo de elución es de 50

35

minutos, y el gradiente expresado como la relación entre la fase móvil A y la fase móvil B es: 85:15 (0 min), 85:15 (5,0 min), 40:60 (35,0 min), 40:60 (38,0 min), 85:15 (38,1 min) y 85:15 (50,0 min).

- 5 Los autores de la presente invención observaron que utilizando estas condiciones específicas la separación entre las diversas sustancias, esto es, la fosfomicina y sus impurezas y/o productos de degradación era óptima, llegándose a separar hasta 15 sustancias diferentes, incluida la "impureza A".
- 10 La identificación de la conocida "impureza A" se realizó utilizando como patrón dicha sustancia obtenida de fuentes comerciales.

Para identificar el resto de sustancias, se empleó la técnica de la espectrometría de masas (MS).

15

20

REIVINDICACIONES

- 1.- Método para la detección y cuantificación de fosfomicina y de sus impurezas y/o productos de degradación en muestras de fosfomicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o de formulaciones farmacéuticas que comprenden fosfomicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, caracterizado porque comprende:
- 5 misma o de formulaciones farmacéuticas que comprenden fosfomicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, caracterizado porque comprende:
- (a) someter la muestra a cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) utilizando una fase móvil de elución por gradiente entre acetonitrilo (fase móvil A) y una solución acuosa de acetato de amonio (fase móvil B); y
- 10 (b) detectar y cuantificar la fosfomicina, impurezas y/o productos de degradación separados en la etapa a) utilizando un detector de aerosol cargado (CAD).
- 2.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza una fase estacionaria de tipo zwitteriónico.
- 15
- 3.- Método según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la fase móvil B es una solución acuosa de acetato de amonio de concentración aproximadamente 25 mM.
- 4.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el tiempo de elución de la fase móvil es de 50 minutos y el flujo de 0,8 ml/min.
- 20
- 5.- Método según la reivindicación 4, caracterizado porque el gradiente expresado como la relación entre la fase móvil A y la fase móvil B es: 85:15 (0 min), 85:15 (5,0 min), 40:60 (35,0 min), 40:60 (38,0 min), 85:15 (38,1 min) y 85:15 (50,0 min).
- 25
- 6.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la identificación de las impurezas y/o productos de degradación de la fosfomicina se realiza por espectrometría de masas (MS).
- 30
- 7.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se refiere a la detección y cuantificación de fosfomicina y sus impurezas y/o productos de degradación en una muestra de fosfomicina disódica.
- 8.- Método cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se refiere a la
- 35 detección y cuantificación de fosfomicina y sus impurezas y/o productos de degradación en

una muestra de una formulación farmacéutica que comprende fosfomicina disódica como ingrediente activo y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 9.- Método según la reivindicación 8, caracterizado porque la formulación farmacéutica consiste esencialmente en fosfomicina disódica y ácido succínico como excipiente.

10.- Método según la reivindicación 9, caracterizado porque la cantidad de ácido succínico en la formulación está entre 1-5 % (p/p).

10