



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112014021163-9 A2



(22) Data do Depósito: 26/02/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 27/10/2020

(54) **Título:** MÉTODOS ANALÍTICOS APRIMORADOS PARA ANALISAR E DETERMINAR IMPUREZAS EM DIANIDROGALACTITOL

(51) **Int. Cl.:** G01N 30/28; G01N 33/15.

(71) **Depositante(es):** DEL MAR PHARMACEUTICALS.

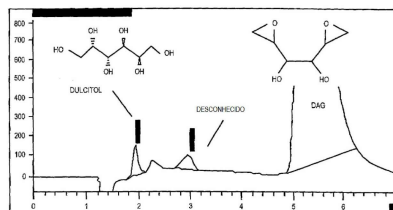
(72) **Inventor(es):** XIAOYUN LU.

(86) **Pedido PCT:** PCT IB2013000793 de 26/02/2013

(87) **Publicação PCT:** WO 2013/128285 de 06/09/2013

(85) **Data da Fase Nacional:** 27/08/2014

(57) **Resumo:** MÉTODOS ANALÍTICOS APRIMORADOS PARA ANALISAR E DETERMINAR IMPUREZAS EM DIANIDROGALACTITOL. Trata-se de um método analítico aprimorado para análise de preparações de dianidrogalactitol que fornece um método para determinar a pureza de dianidrogalactitol e detectar impurezas em preparações de dianidrogalactitol, bem como identificar tais impurezas. O método emprega a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em particular, a HPLC com detecção de índice refrativo (RI); a HPLC pode ser seguida pela espectroscopia de massa em tandem. O método pode compreender adicionalmente a etapa de realização da coleta de HPLC preparatória de pelo menos um pico de substância específica presente em uma preparação de dianidrogalactitol.



**“MÉTODOS ANALÍTICOS APRIMORADOS PARA ANALISAR
E DETERMINAR IMPUREZAS EM DIANIDROGALACTITOL”**

REFERÊNCIAS CRUZADAS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório N^o US 61/603.464, intitulado “Improved Analytical Methods for Analyzing and Determining Impurities in Dianhydrogalactitol” de Xiaoyun Lu, depositado no dia 27 de fevereiro de 2012, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] Esta invenção é direcionada a métodos analíticos aprimorados para dianidrogalactitol, envolvendo especialmente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] O dianidrogalactitol (1,2:5,6 dianidrogalactitol ou DAG) é um dentre vários hexitóis ou derivados de hexitol que têm atividade farmacológica significativa, incluindo atividade quimioterápica. Em particular, o dianidrogalactitol foi sugerido para uso em quimioterapia, como na Patente N^o U.S. 7.157.079 para Nielsen et al., incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

[0004] O dianidrogalactitol tem atividade contra vários neoplasmas. No entanto, se o dianidrogalactitol deve ser usado de modo bem sucedido como um agente terapêutico, um grau extremamente alto de pureza e a remoção de impurezas é essencial. A presença de impurezas pode levar a efeitos colaterais indesejados. Um exemplo ocorreu vários anos atrás, quando as impurezas presentes em um lote do triptofano de ácido amino, um constituinte normal de proteína, foram responsáveis para uma deflagração significativa de síndrome de eosinofilia-mialgia, que causou um grande número de casos de deficiência permanente e pelo menos 37 mortes. Isso é particularmente importante se o agente terapêutico como dianidrogalactitol deve ser empregado em pacientes com sistemas imunológicos

comprometidos ou disfunção hepática ou renal ou em pacientes idosos. Tais pacientes podem experimentar uma maior incidência dos efeitos colaterais indesejados devido a sua sensibilidade a contaminantes.

[0005] Uma das impurezas encontradas nas preparações de dianidrogallactitol é o dulcitol. Existem outras impurezas nas preparações de dianidrogallactitol também, dependendo do método de preparação.

[0006] Portanto, existe uma necessidade de métodos analíticos aprimorados detectem as impurezas e os produtos de degradação nas preparações de dianidrogallactitol para fornecer preparações de pureza maior dos que são menos prováveis para induzir efeitos colaterais quando o dianidrogallactitol é administrado para finalidades terapêuticas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0007] Um método analítico aprimorado para determinar a pureza de dianidrogallactitol e detectar as impurezas e os produtos de degradação nas preparações de dianidrogallactitol que satisfazem essas necessidades está descrito no presente documento.

[0008] Em geral, esse método analítico emprega a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em particular, a HPLC com detecção de índice refrativo (RI).

[0009] Em uma alternativa, um método analítico para analisar a presença e quantidade de impurezas presentes em uma preparação de dianidrogallactitol compreende as etapas de:

(1) analisar uma preparação de dianidrogallactitol submetendo a preparação a cromatografia líquida de alta eficiência com uso de eluição com um gradiente de fase móvel para separar o dianidrogallactitol do dulcitol e outros contaminantes da preparação e

(2) determinar a concentração relativa de um ou mais picos resolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência que representam compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol.

[0010] Os compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol

podem ser pelo menos um de: (1) dulcitol; (2) uma impureza diferente do dulcitol e (3) um produto de degradação de dianidrogallactitol.

[0011] Em uma alternativa desse método, a eluição está com um gradiente de NaOH de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM. Preferencialmente, a eluição está com um gradiente de NaOH de cerca de 1,5 mM a cerca de 0,1 mM. Mais preferencialmente, a eluição está com um gradiente de NaOH de cerca de 1 mM a cerca de 0,1 mM.

[0012] Em outra alternativa desse método, a eluição está com um gradiente de uma combinação de hidróxido de amônio e um sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio e a concentração total do formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM. Preferencialmente, a concentração total do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 1,5 mM a cerca de 0,1 mM. Mais preferencialmente, a concentração total do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 1 mM a cerca de 0,1 mM. Tipicamente, a proporção de hidróxido de amônio e de sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é variada de cerca de 100:1 no começo da eluição a cerca de 1:100 no fim de eluição.

[0013] Tipicamente, nesse método, a etapa de determinação da concentração relativa de um ou mais picos resolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência que representa compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol é realizada por detecção de difusão de luz evaporativa. Tipicamente, a detecção de difusão de luz evaporativa é compatível com LC/MS por eletroaspersão. Tipicamente, a detecção de difusão de luz evaporativa compreende a adição de coluna posterior de um solvente volátil para aumentar a evaporação de 100% da fase móvel aquosa. Tipicamente, o

solvente volátil é selecionado a partir do grupo que consiste em metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila.

[0014] Em uma alternativa, um espectrômetro de massa em tandem de eletroaspersão é instalado e conectado em tempo real a um sistema HPLC com ELSD. Tipicamente, nessa alternativa, os dados espectrais de massa que fornecem informações químicas para cada uma das impurezas podem estar presentes em uma preparação de dianidrogallactitol são coletados. Além disso, tipicamente, nessa alternativa, os dados espectrais de massa em tandem que fornecem informações estruturais para cada uma das impurezas que podem estar presentes em uma preparação de dianidrogallactitol são coletados.

[0015] O método pode compreender adicionalmente a etapa de realizar a coleta de HPLC preparatória de pelo menos um pico de substância específica presente em uma preparação de dianidrogallactitol. O pelo menos um pico de substância presente na preparação de dianidrogallactitol pode ser uma impureza.

[0016] Em outra alternativa, ao invés do eluição de gradiente, a eluição isocrática pode ser usada. Quando a eluição isocrática é usada, em geral, o método compreende as etapas de:

- (1) analisar uma preparação de dianidrogallactitol submetendo a preparação a cromatografia líquida de alta eficiência com uso de eluição com uma fase móvel isocrática para separar o dianidrogallactitol do dulcitol e outros contaminantes da preparação e

- (2) determinar a concentração relativa de um ou mais picos resolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência que representam compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol.

[0017] Em uma alternativa, quando a eluição isocrática é usada, a fase móvel isocrática é NaOH e a concentração de NaOH é de cerca de 5 mM a 0,1 mM. Preferencialmente, a concentração de NaOH é de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM. Mais preferencialmente, a concentração de NaOH é

cerca de 1 mM.

[0018] Em outra alternativa, quando a eluição isocrática é usada, a fase móvel isocrática é uma combinação de hidróxido de amônio e um sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio e a concentração total do hidróxido de amônio e o sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 5 mM a 0,1 mM. Preferencialmente, a concentração total do hidróxido de amônio e o acetato de amônio volátil é de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM. Mais preferencialmente, a concentração total do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é cerca de 1 mM. Tipicamente, a proporção de hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é cerca de 50:50.

[0019] Tipicamente, nessa alternativa, a etapa de determinar a concentração relativa de um ou mais picos resolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência que representam compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol é realizada por detecção de difusão de luz evaporativa (ELSD), conforme descrito acima. Tipicamente, a detecção de difusão de luz evaporativa é compatível com LC/MS por eletroaspersão. Tipicamente, a detecção de difusão de luz evaporativa compreende a adição de coluna posterior de um solvente volátil para aumentar a evaporação de 100% da fase móvel aquosa. Tipicamente, o solvente volátil é selecionado a partir do grupo que consiste em metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila.

[0020] Também nessa alternativa, um espectrômetro de massa em tandem de eletroaspersão pode ser instalado e conectado em tempo real a um sistema HPLC com ELSD. Tipicamente, nessa alternativa, os dados espectrais de massa que fornecem informações químicas para cada uma das impurezas que podem estar presentes em uma preparação de dianidrogallactitol são coletados. Além disso, tipicamente, nessa alternativa,

os dados espectrais de massa em tandem que fornecem as informações estruturais para cada uma das impurezas que podem estar presentes em uma preparação de dianidrogallactitol são coletados.

[0021] Essa alternativa de um método de acordo com a presente invenção pode compreender adicionalmente a etapa de realizar a coleta de HPLC preparatória de pelo menos um pico de substância específica presente em uma preparação de dianidrogallactitol. O pelo menos um pico de substância presente na preparação de dianidrogallactitol pode ser uma impureza.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0022] Esses e outros recursos, aspectos e vantagens da presente invenção se tornarão melhor entendidos em relação à descrição seguinte, reivindicações anexas e desenhos anexados em que:

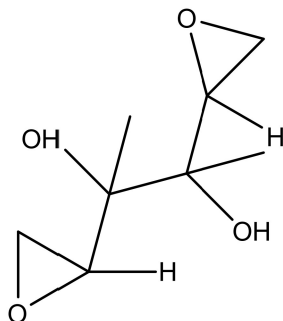
[0023] A Figura 1 é um cromatograma de HPLC/RI representativo de uma preparação de dianidrogallactitol, que mostra resolução de dulcitol e uma substância relativa desconhecida em RRT ~0,6 no fármaco farmacêutica e produto farmacêutico.

[0024] A Figura 2 mostra cromatogramas de HPLC/RI representativos que mostram resolução de dianidrogallactitol e dulcitol em um padrão, e, para comparação, um branco de água; na Figura 2, o padrão de dianidrogallactitol-dulcitol é mostrado no painel de topo e o branco de água é mostrado no painel inferior.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

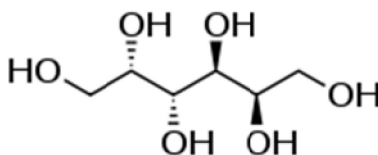
[0025] Esta invenção é direcionada a métodos analíticos aprimorados para determinar a pureza de dianidrogallactitol e determinar a existência e concentração de impurezas presentes nas preparações de dianidrogallactitol.

[0026] A estrutura de dianidrogallactitol é mostrada abaixo na Fórmula (I).



(I)

[0027] Uma das impurezas significantes presentes nas preparações de dianidrogallactitol é o dulcitol. A estrutura de dulcitol é mostrada abaixo na Fórmula (II). Outras impurezas são conhecidas para existir nas preparações de dianidrogallactitol.



(II)

[0028] Um método melhorado de analisar as preparações de dianidrogallactitol é baseado em HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) com detecção de difusão de luz evaporativa (ELSD). Em uma alternativa, para detectar e identificar todos os componentes significantes presentes em tais preparações de dianidrogallactitol, o HPLC é combinado com a espectroscopia de massa (MS).

[0029] A teoria e prática de HPLC são descritas em L.R. Snyder et al., "Introduction to Modern Liquid Chromatography" (3ª ed., John Wiley & Sons, Nova York, 2009). A teoria e prática de MS são descritas em E. de Hoffmann & V. Stroobant, "Mass Spectroscopy: Principles and Applications" (3ª ed., John Wiley & Sons, Nova York, 2007).

[0030] O método HPLC demonstrou a resolução de um intermediário sintético, dulcitol, nas preparações de dianidrogallactitol, em adição a resolução de uma substância relativa desconhecida observada em RRT 0,6 (Figura 1). A Figura 1 é um cromatograma HPLC/RI representativo de uma preparação de dianidrogallactitol, que mostra a resolução de dulcitol e

uma substância relativa desconhecida em RRT ~0,6 do fármaco farmacêutica e produto farmacêutico. Os cromatogramas de HLPC representativos que mostram resolução de dianidrogallactitol e dulcitol em um padrão, e, para comparação, um branco de água, são mostrados na Figura 2. Na Figura 2, o padrão de dianidrogallactitol-dulcitol é mostrado no painel de topo e o branco de água é mostrado no painel inferior.

[0031] A aplicação presente descreve a cromatografia de HPLC melhorada para resolução de substâncias de coeluição de modo potencial. Uma amostra de produto de dianidrogallactitol estressado tipicamente é avaliado para fornecer confirmação das condições cromatográficas apropriadas para a resolução de dulcitol e outras impurezas e produtos de degradação relacionados. De modo subsequente, o LC/MS e o LC/MS/MS são realizados para caracterizar a substância de DAG relacionado desconhecida em RRT ~ 0,6 para fornecer caracterização e determinação espectral de massa da estrutura química desse componente não identificado.

[0032] O dianidrogallactitol e as substâncias relacionadas ao mesmo podem ser analisados por condições de HPLC que envolvem a eluição isocrática com uma fase móvel de NaOH de 50 mM. Em um aprimoramento nessas condições, empregadas como do método revelado no presente documento, uma fase móvel de gradiente é empregada. Uma alternativa é o uso de NaOH em um gradiente de concentração. Se o NaOH é empregado em um gradiente de concentração, a eluição tipicamente está com um gradiente de NaOH de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM. Preferencialmente, a eluição está com um gradiente de NaOH de cerca de 1,5 mM a cerca de 0,1 mM. Mais preferencialmente, a eluição está com um gradiente de NaOH de cerca de 1 mM a cerca de 0,1 mM.

[0033] Em outra alternativa, uma combinação de hidróxido de amônio e um sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio pode ser usada como eluente. Nessa alternativa, a concentração total do formato de amônio e

acetato de amônio é de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM. Preferencialmente, a concentração total do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 1,5 mM a cerca de 0,1 mM. Mais preferencialmente, a concentração total do hidróxido de amônio e o sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 1 mM a cerca de 0,1 mM. Tipicamente, a proporção de hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é variada de cerca de 100:1 no começo da eluição a cerca de 1:100 no fim da eluição.

[0034] Outros esquemas de eluição de gradiente são conhecidos na técnica.

[0035] Tipicamente, nos métodos analíticos de HPLC de acordo com a presente invenção, a detecção é por meio de difusão de luz evaporativa (ELSD). Um detector de difusão de luz evaporativa (ELSD) atomiza o eluente de coluna, iluminar a luz nos componentes particulados resultantes e detectar a luz espalhada resultante. Teoricamente, um ELSD pode detectar qualquer componente não volátil. A detecção de difusão de luz evaporativa de um componente não cromatogênico é baseada na nebulização do eluente de HPLC e evaporação de solventes de fase móvel para produzir partículas de soluto de atomização para detecção de difusão de luz. Esse processo de nebulização e de evaporação de solvente para produzir partículas de soluto de analito de atomização é comparável ao procedimento de LC/MS por eletroaspersão. Tipicamente, a detecção de ELSD é compatível com o LC/MS por eletroaspersão.

[0036] Implantação de um método HPC com a detecção de ELSD que é compatível com a aplicação de LC/MS por eletroaspersão envolve a adição de coluna posterior de um solvente volátil para aumentar a evaporação de 100% da fase móvel aquosa. O solvente volátil é tipicamente

selecionado a partir do grupo que consiste em metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila.

[0037] Consequentemente, nos métodos de acordo com a presente invenção, um espectrômetro de massa em tandem de eletroaspersão é instalado e conectado em tempo real a um sistema HPLC com ELSD. Os dados espectrais de massa que fornecem informações moleculares e dados espectrais de massa em tandem que fornecem informações estruturais químicas para cada uma das impurezas que podem estar presentes em uma preparação de dianidrogallactitol podem ser controlados. A espectroscopia de massa em tandem com HPLC irá fornecer informações de íon molecular e possíveis estruturas químicas que têm um consistente peso molecular com as informações de íon molecular para cada uma das impurezas e produtos de degradação observados.

[0038] Em outra alternativa, a coleta de HPLC preparatória de picos de substância de DAG relacionado específico, que inclui impurezas presentes em uma preparação de DAG, pode ser realizada.

[0039] Consequentemente, um método analítico para analisar a presença e a quantidade de impurezas presentes em uma preparação de dianidrogallactitol compreende as etapas de:

(1) analisar uma preparação de dianidrogallactitol submetendo a preparação a cromatografia líquida de alta eficiência com uso de eluição com um gradiente de fase móvel para separar o dianidrogallactitol do dulcitol e outros contaminantes da preparação e

(2) determinar a concentração relativa de um ou mais picos resolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência que representa compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol.

[0040] Os compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol pode ser pelo menos um de: (1) dulcitol; (2) uma impureza diferente do dulcitol e (3) um produto de degradação de dianidrogallactitol.

[0041] Tipicamente, em uma alternativa, nesse método, o

gradiente de fase móvel é um gradiente de hidróxido de sódio.

[0042] Em outra alternativa, nesse método, o gradiente de fase móvel é um gradiente de uma combinação de hidróxido de amônio e um sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio.

[0043] Tipicamente, nesse método, a detecção é por difusão de luz evaporativa. Tipicamente, quando a difusão de luz evaporativa é empregada, o método compreende adicionalmente a etapa de adição de coluna posterior de um solvente volátil para aumentar a evaporação de componentes da fase móvel.

[0044] Tipicamente, a presente invenção compreende adicionalmente a etapa de analisar uma ou mais eluição de picos a partir da cromatografia líquida de alta eficiência por espectroscopia de massas tandem por electrospray.

[0045] Em uma alternativa, a presente invenção compreende adicionalmente a etapa de coleta de HPLC preparatória de pelo menos um pico de substância de DAG relacionado específico.

[0046] Se uma impureza ou produto de degradação (diferente do dulcitol) existe, a impureza ou produto de degradação desconhecidos podem ser identificados por separação por cromatografia de coluna seguida por pelo menos um procedimento de purificação para render uma amostra desconhecida de sólido que pode, então, ser caracterizada para identificação por pelo menos um procedimento analítico padrão selecionado a partir do grupo que consiste em ressonância magnética nuclear (NMR), espectroscopia de massa (MS), espectroscopia infravermelho transformada de Fourier (FT-IR), análise elementar, determinação de pureza por HPLC e determinação do teor de água pelo método de titulação Karl Fisher. Esses métodos são bem conhecidos na técnica.

[0047] Em outra alternativa, o método compreende:

(1) analisar uma preparação de dianidrogallactitol

submetendo a preparação a cromatografia líquida de alta eficiência com uso de eluição com uma fase móvel isocrática para separar o dianidrogallactitol do dulcitol e outros contaminantes da preparação e

(2) determinar a concentração relativa de um ou mais picos resolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência que representa compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol.

[0048] Como no método que emprega a eluição de gradiente, os compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol pode ser pelo menos um de: (1) dulcitol; (2) uma impureza diferente do dulcitol e (3) um produto de degradação de dianidrogallactitol.

[0049] Nessa alternativa, a eluição com a fase móvel isocrática pode também ser eluição com hidróxido de sódio ou eluição com uma combinação de hidróxido de amônio e um sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio. Se a fase móvel isocrática é o hidróxido de sódio, tipicamente, a concentração de NaOH é de cerca de 5 mM a 0,1 mM. Preferencialmente, a concentração de NaOH é de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM. Mais preferencialmente, a concentração de NaOH é cerca de 1 mM. Se a fase móvel isocrática é uma combinação de hidróxido de amônio e um sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio, a concentração total do hidróxido de amônio e o sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 5 mM a 0,1 mM. Preferencialmente, a concentração total do hidróxido de amônio e o acetato de amônio volátil é de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM. Mais preferencialmente, a concentração total do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é cerca de 1 mM. Tipicamente, a proporção de hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionados a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é cerca de 50:50.

[0050] A invenção é ilustrada pelo exemplo seguinte. Esse exemplo é para somente finalidade ilustrativa e não é destinado a limitar a invenção.

EXEMPLO

ANÁLISE DE HPLC DE PREPARAÇÕES DE DIANIDROGALACTITOL QUE EMPREGAM A ELUIÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO ISOCRÁTICO

[0051] O procedimento descrito nesse exemplo é usado para determinar o dulcitol e as impurezas relacionadas em uma preparação de fármaco de dianidrogalactitol por cromatografia líquida de alta eficiência de permuta de íon com detecção de índice refrativo.

[0052] Nesse procedimento, as amostras são preparadas com dianidrogalactitol em uma concentração alvo de 5 mg/ml. O Dulcitol, o dianidrogalactitol e as impurezas relacionadas são separadas com uso de uma coluna de permuta de ânion (Hamilton RCX-10, 250 × 4,1 mm, 7 µm), com 50 mM NaOH como a fase móvel isocrática com detecção de índice refrativo. A concentração de dulcitol é determinada com um padrão de referência externa e os teores de substâncias relacionadas são estimado com uso de um padrão de referência DAG.

[0053] Um sistema HPLC adequado e sistema de aquisição de dados é um sistema HPLC Agilent Technologies 1200 Series ou equivalente equipado com o seguinte: bomba Quat, Modelo G1311A ou equivalente; autoamostrador, Modelo 1329A ou equivalente; detector RID, Modelo 1362A ou equivalente, controlador de temperatura de coluna com capacidade de 30 ± 3 °C e desgaseificador, Modelo G1322 ou equivalente. A coluna é uma coluna de permuta de ânion Hamilton RCX 250 × 4,1 mm, 7 µm, P/N 79440 ou equivalente. A aquisição de dados é realizada por um sistema de Cliente/Servidor ChemStation e ChemStore ou um sistema de dados equivalente.

[0054] As substâncias químicas seguintes são usadas. A água é água Milli-Q ou água desionizada. O hidróxido de sódio é grau purificado

padrão. O padrão de referência de Dulcitol é de pureza 99,95%. O padrão de referência DAG é de pureza 98,72%.

[0055] Para a fase móvel (50 mM NaOH), 2,0 g NaOH são dissolvidos em 1 litro de água. A solução é filtrada através de um filtro de 0,45 µm. A fase móvel pode ser armazenada até 1 mês em temperatura ambiente. Para a solução de estoque de referência de dulcitol (nominal 500 µg/ml), 25 mg de padrão de referência de Dulcitol são exatamente pesados em um frasco volumétrico de 50 ml. O dulcitol é diluído para o volume com a água desionizada e bem misturado. A solução de estoque preparada pode ser armazenada até 3 dias a 2 a 8 °C. Para a solução de estoque de referência DAG (nominal 500 µg/ml), 25 mg de padrão de referência DAG são exatamente pesados em um frasco volumétrico de 50 ml. O DAG é diluído para o volume com água desionizada e bem misturado. A solução de estoque preparada pode ser armazenada até 3 dias a 2 a 8 °C. Para a solução padrão dulcitol-DAG (dulcitol 50 µg/ml + DAG 50 µg/ml; cada um em 1% de 5 mg/ml de DAG), 1,0 ml de estoque de dulcitol e 1,0 ml de estoque de DAG são, cada um, transferidos quantitativamente em um frasco volumétrico de 10 ml, diluídos para o volume com água e bem misturados.

[0056] Para a preparação de amostra de DAG a partir de uma amostra de API (nominal 1 mg/ml), cerca de 25 mg de amostra de API de DAG são exatamente pesadas em um frasco volumétrico de 25 ml puro. A amostra de API de DAG é dissolvida em aproximadamente 5 ml de água desionizada, diluída para o volume com água desionizada e misturada. Uma alíquota de 1 a 2 ml da amostra teste é transferida em uma ampola de HPLC. As amostras preparadas podem ser armazenadas por até 2 dias a 2 a 8 °C.

[0057] Para a preparação de amostra DAG (nominal 5 mg/ml) para uma amostra API, cerca de 50 mg da amostra API são exatamente medidas em um frasco volumétrico de 10 ml puro. A amostra de API de DAG é dissolvida em aproximadamente 5 ml de água, diluída para o volume com água e misturada.

[0058] Para a preparação de amostra de DAG a partir de uma amostra liofilizada (40 mg/ampola), a amostra é removida do refrigerador no qual a amostra é armazenada e a vedação removida. Um volume de água de 5,0 ml é quantitativamente transferido e a solução é misturada para dissolver o DAG, rendendo uma solução de 8 mg/ml. Uma alíquota de 1,0 g da solução reconstituída é diluída para 8,0 g com água desionizada e misturada. Uma alíquota adicional de 1 a 2 ml da amostra teste é transferida em uma ampola de HPLC. As amostras preparadas podem ser armazenadas por até 2 dias a 2 a 8 °C.

[0059] Para a preparação de amostra de DAG (nominal 5 mg/ml) para o produto farmacêutico com uso de pó liofilizado (40 mg/ampola), o fechamento da ampola é limpo e removido. A ampola liofilizada é reconstituída com 8,0 ml de água para render uma solução de 5 mg/ml. Uma alíquota de 1 a 2 ml é transferida para uma ampola HPLC. As amostras são preparadas em duplicatas (com uso de duas ampolas). As amostras preparadas podem ser armazenadas a 2 a 8 °C por até 24 horas.

[0060] Para análise HPLC, o sistema HPLC é ligado e o detector é autorizado a aquecer por pelo menos 20 minutos. Se necessário, colocar a fase móvel HPLC preparada conforme descrito acima na entrada de solvente apropriada. A linha de solvente é preparada com a fase móvel. O sistema e a coluna são equilibrados com a fase móvel HPLC em uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min por pelo menos 30 minutos. Uma sequência de análise de amostra é criada. Uma vez que a adequação de sistema foi confirmada, um branco de água é injetado seguido por injeções dos padrões e, então, as amostras. Um padrão dulcitol-DAG é inserido após todas as 10 injeções de amostras e, então, um último padrão de escalonamento no fim da execução. Uma sequência de análise de amostra adequada é mostrada na Tabela 1.

TABELA 1

SEQUÊNCIA DE ANÁLISE DE AMOSTRA

Descrição	Nº de injeções
-----------	----------------

Branco (100% de água)	1
Teste de Adequação de Sistema, Padrão Dul-DAG (50 µg/ml cada)	6
Branco (100% de água)	1
Amostras Teste (substância de fármaco de DAG e/ou produto farmacêutico) ensaio (preparações de duplicata)	2(n ≤ 20)
Padrão de escalonamento, Padrão de Dul-DAG (50 µg/ml cada)	2
Branco (água)	1

[0061] As amostras são analisadas com uso de RID. Conforme indicado acima, uma coluna adequada é uma coluna de permuta de íon de Hamilton RCX (250 × 4,1 mm, 7 µm), P/N 79440 ou equivalente. A fase móvel é 50 mM de NaOH em água desionizada (eluição isocrática). A taxa de fluxo é de 1,5 ml/min. A temperatura de coluna é de 30 °C. O volume de injeção é de 50,0 µl. A detecção é por RID a 35 °C. O tempo de execução é de 8 minutos.

[0062] Para análise e integração das cromatografias, o software de HPLC é usado. As cromatografias para o branco, as amostras e os padrões de teste são examinadas e comparadas. A atribuição e integração manual de alguns picos pode ser necessária. Os parâmetros de integração como sensibilidade de declive, largura de pico, valor limiar de altura de pico para rejeição, tipo de integração de pico secundário, linha de referência e pico de divisão, bem como outros parâmetros, são ajustados para obter valores e integração apropriada para esses parâmetros, que são anotados e aplicados a todas as amostras e padrões.

[0063] A adequação do sistema é avaliada conforma a seguir. As seis injeções replicadas da solução padrão dulcitol-DAG são avaliadas com uso de requisitos de desempenho cromatográfico da Tabela 2.

TABELA 2
REQUISITOS DE DESEMPENHO CROMATOGRÁFICO

Tempo de retenção de dulcitol (RT):	~ 2 min.
-------------------------------------	----------

Tempo de retenção de DAG (RT):	~ 6 min.
Variação de resposta de área %RSD:	≤ 10,0 %
Variação de tempo de retenção %RSD:	≤ 2,0%

[0064] A área de pico de dulcitol e DAG nas injeções de solução de padrão de escalonamento deve ser de 80% a 120% da área de pico média de cada uma das injeções SST anteriores. No caso de um padrão de escalonamento não cumprir o critério, as amostras analisadas após o padrão de escalonamento de passagem final devem ser reanalisadas.

[0065] Na análise dos dados, a área de pico relativa = (área de pico/ área de pico total) × 100, em que a “área de pico” é a área de pico individual e a “área de pico total” é a soma das áreas de pico de todos os picos.

[0066] A concentração de dulcitol é calculada conforme indicado: Dulcitol (Cu, µg/ml) = Cs × área de pico de amostra média / área de pico de dulcitol médio das injeções padrão Dul-DAG, em que Cs é a concentração de dulcitol in µg/ml.

[0067] O teor de dulcitol (porcentagem em peso) em substância de fármaco DAG ou produto farmacêutico é calculado conforme indicado: Dulcitol porcentagem em peso = Cu (µg/ml) /1000 / SC (mg/ml) x 100%, em que o Cu é a concentração de dulcitol (µg/ml) calculada conforme acima e SC é a concentração de amostra (mg/ml) conforme preparada por substância de fármaco ou produto farmacêutico. Se o dulcitol está presente, a porcentagem em peso de dulcitol é relatada se igual a ou maior do que 0,05%; a mesma é relatada para o mais próximo de 0,01%.

[0068] Se uma impureza não identificada anteriormente ou desconhecida diferente do dulcitol está presente na preparação DAG, a concentração é calculada conforme a seguir: Concentração de impureza desconhecida (µg/ml) = Cs × área de pico de amostra média / área de pico de DAG médio das injeções padrão Dul-DAG. Se presente, a porcentagem em peso de impureza desconhecida é calculada conforme a seguir: Cu (µg/ml)

$/1000 / SC \text{ (mg/ml)} \times 100\%$, em que Cu = concentração desconhecida ($\mu\text{g/ml}$) calculada conforme acima e SC = concentração de amostra (mg/ml) conforme preparado em 8.2.2 para a substância de fármaco ou 8.2.3 para o produto farmacêutico. Cada impureza desconhecida, se presente, é relatada se igual a ou maior do que 0,05%; a mesma é relatada para o mais próximo de 0,01%.

[0069] Os resultados de ensaio na porcentagem em peso são calculados para cada amostra e para a média das amostras duplicadas.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[0070] A presente invenção fornece um método analítico aprimorado para a detecção e quantificação das impurezas presentes nas preparações de dianidrogallactitol, incluindo dulcitol e impurezas desconhecidas, bem como métodos para isolamento e identificação de impurezas desconhecidas presentes nas preparações de dianidrogallactitol. Os métodos da presente invenção permitem a preparação de dianidrogallactitol de grande escala da alta pureza adequada para uso farmacêutico e reduzem a possibilidade de efeitos colaterais significativos causados pela presença de impurezas nas preparações de dianidrogallactitol destinadas para uso farmacêutico.

[0071] Os métodos de acordo com a presente invenção possuem aplicabilidade industrial para análise de preparações de dianidrogallactitol e determinação e quantificação de impurezas nas preparações de dianidrogallactitol.

[0072] Com relação às faixas de valores, a invenção abrange cada valor de intervenção entre os limites superiores e inferiores da faixa para pelo menos um décimo da unidade do limite inferior, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Ademais, a invenção abrange quaisquer outros valores e faixas de intervenção declarados incluindo qualquer um ou ambos os limites superior e inferior da faixa, a menos que especificadamente excluídos da faixa declarada.

[0073] A menos que definido de outro modo, os significados de

todos os termos específicos e técnicos usados no presente documento são aqueles comumente entendidos por aqueles de habilidade comum na técnica a qual esta invenção pertence. Um de habilidade comum na técnica também irá verificar que quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àquele descrito no presente documento também podem ser usados para praticar ou testar esta invenção.

[0074] As publicações e patentes discutidas no presente documento são fornecidas somente para sua revelação antes dos dados de preenchimento da presente aplicação. Nada no presente documento é para ser interpretado como uma admissão de que a presente invenção não é intitulada para antedatar tal publicação por virtude da invenção anterior. Além disso, as datas da publicação fornecida podem ser diferentes das datas da atual publicação que podem necessitar serem independentemente confirmadas.

[0075] Todas as publicações citadas são incorporadas no presente documento em referência a sua totalidade, incluindo todas as patentes publicadas, pedidos de patente e referências de literatura, bem como aquelas publicações que foram incorporadas naqueles documentos publicados. No entanto, na medida em que qualquer publicação incorporada no presente documento por referência se refere às informações a serem publicadas, os requerentes não admitem que quaisquer informações publicadas após a data de preenchimento dessa aplicação sejam da técnica anterior.

[0076] Conforme usado neste relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares incluem as formas plurais. Por exemplo os termos “uma”, “um”, “a” a “o” incluem referências plurais a menos que o contexto indique claramente o contrário. Adicionalmente, o termo “pelo menos” que antecede uma série de elementos é para ser entendido como se referindo a todo elemento na série. As invenções descritas de modo ilustrativo no presente documento podem ser adequadamente praticadas na ausência

de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações, reveladas não especificadamente no presente documento. Assim, por exemplo, os termos “compreende”, “inclui”, “contém”, etc. devem ser lidos expansivamente e sem limitação. Adicionalmente, os termos e expressões empregados no presente documento foram usados como termos de descrição e não de limitação e existe nenhuma intenção no uso de tais termos e expressões em excluir quaisquer equivalentes do futuro mostrado e descrito ou qualquer porção do mesmo e é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Assim, deve ser entendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente revelada por modalidades preferenciais e recursos opcionais, modificação e variação das invenções no presente documento revelado podem ser utilizadas por aqueles versados na técnica e aquelas tais modificações e variações são consideradas a estarem dentro do escopo das invenções reveladas no presente documento. As invenções foram descritas ampla e genericamente no presente documento. Cada uma das espécies estreias e agrupamentos subgenéricos que estão dentro do escopo da revelação genérica também formam parte dessas invenções. Isso inclui a descrição genérica de cada invenção com uma condição especial ou limitação negativa que remove qualquer assunto do gênero, independentemente de haver ou não os materiais excisados especificamente resididos no mesmo. Além disso, em que recursos ou aspectos de uma invenção são descritos em termos do grupo Markush, aqueles treinados na técnica reconhecerão que a invenção também é descrita através da mesma em termos de qualquer membro ou subgrupo individuais de membros do grupo de Markush. Também deve ser entendido que a descrição acima se destina a ser ilustrativa e não restritiva. Muitas modalidades serão evidentes àqueles versados na técnica mediante a revisão da descrição acima. O escopo da invenção deve, portanto, ser determinado não em referência à descrição acima, mas deve, antes, ser determinado em referência às reivindicações anexas, ao longo de todo o escopo de

equivalentes aos quais tais reivindicações são intituladas. Aqueles versados na técnica irão reconhecer ou poderão certificar com o uso de não mais do que a experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descrita. Tais equivalentes destinam-se a serem abrangidos pelas reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Método analítico para analisar a presença e quantidade de impurezas presentes em uma preparação de dianidrogallactitol **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) analisar uma preparação de dianidrogallactitol submetendo a preparação a cromatografia líquida de alta eficiência com uso de eluição com um gradiente de fase móvel para separar o dianidrogallactitol de dulcitol e outros contaminantes da preparação; e

(b) determinar a concentração relativa de um ou mais picos resolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência que representa os compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol são pelo menos um dentre: (1) dulcitol; (2) uma impureza diferente de dulcitol e (3) um produto de degradação de dianidrogallactitol.

3. Método analítico, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a eluição está com um gradiente de NaOH de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM.

4. Método analítico, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a eluição está com um gradiente de NaOH de cerca de 1,5 mM a cerca de 0,1 mM.

5. Método analítico, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a eluição está com um gradiente de NaOH de cerca de 1 mM a cerca de 0,1 mM.

6. Método analítico, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a eluição está com um gradiente de uma combinação de hidróxido de amônio e um sal de amônio volátil selecionado a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio e a

concentração total do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionado a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM.

7. Método analítico, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração total do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionado a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 1,5 mM a cerca de 1,0 mM.

8. Método analítico, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração total do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionado a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 1,0 mM a cerca de 0,1 mM.

9. Método analítico, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proporção do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionado a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é variada de cerca de 100:1 no começo da eluição a cerca de 1:100 no fim da eluição.

10. Método analítico, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de determinação da concentração relativa de um ou mais picos resolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência que representa compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol é realizada pela detecção de difusão de luz evaporativa.

11. Método analítico, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a detecção de difusão de luz evaporativa é compatível com o LC/MS por eletroaspersão.

12. Método analítico, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a detecção de difusão de luz evaporativa

compreende a adição de coluna posterior de um solvente volátil para aumentar a evaporação de 100% da fase móvel aquosa.

13. Método analítico, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o solvente volátil é selecionado a partir do grupo que consiste em metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila.

14. Método analítico, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que um espectrômetro de massa em tandem de eletroaspersão é instalado e conectado em linha direta a um sistema HPLC com ELSD.

15. Método analítico, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os dados espectrais de massa em tandem que fornecem informações químicas para cada uma das impurezas e os produtos de degradação que podem estar presentes em uma preparação de dianidrogallactitol são coletados.

16. Método analítico, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a espectroscopia de massa em tandem com o HPLC fornece informações de íon molecular e possíveis estruturas químicas que têm um consistente peso molecular com as informações de íon molecular para cada uma das impurezas e produtos de degradação observados.

17. Método analítico, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma impureza ou produto de degradação é identificado pela separação por cromatografia de coluna seguida por pelo menos um procedimento de purificação para render uma amostra desconhecida de sólido.

18. Método analítico, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a amostra desconhecida de sólido é caracterizada para identificação por pelo menos um procedimento analítico padrão selecionado a partir do grupo que consiste na ressonância magnética

nuclear (RMN), espectroscopia de massa (MS), espectroscopia infravermelho transformada de Fourier (FT-IR), análise elementar, determinação de pureza por HPLC e determinação de teor de água pelo método de titulação Karl Fisher.

19. Método analítico, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de realização da coleta de HPLC preparatória de pelo menos um pico de substância específica presente em uma preparação de dianidrogallactitol.

20. Método analítico, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um pico de substância presente na preparação de dianidrogallactitol é uma impureza.

21. Método analítico, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um pico de substância presente na preparação de dianidrogallactitol é um produto de degradação.

22. Método analítico **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) analisar uma preparação de dianidrogallactitol submetendo a preparação a cromatografia líquida de alta eficiência com uso de eluição com uma fase móvel isocrática para separar o dianidrogallactitol do dulcitol e outros contaminantes da preparação; e

(b) determinar a concentração relativa de um ou mais picos resolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência que representa os compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol.

23. Método analítico, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol são pelo menos um dentre: (1) dulcitol; (2) uma impureza diferente de dulcitol e (3) um produto de degradação de dianidrogallactitol.

24. Método analítico, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a fase móvel isocrática é NaOH e a

concentração de NaOH é de cerca de 5 mM a cerca de 0,1 mM.

25. Método analítico, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração de NaOH é de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM.

26. Método analítico, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração de NaOH é cerca de 1 mM.

27. Método analítico, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a fase móvel isocrática é uma combinação de hidróxido de amônio e um sal de amônio volátil selecionado a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio e a concentração total do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionado a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 5 mM a cerca de 0,1 mM.

28. Método analítico, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração total do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionado a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é de cerca de 2,5 mM a cerca de 0,1 mM.

29. Método analítico, de acordo com a reivindicação 28, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração total do hidróxido de amônio e do sal de amônio volátil selecionado a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é cerca de 1 mM.

30. Método analítico, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proporção de hidróxido de amônio e de sal de amônio volátil selecionado a partir do grupo que consiste em formato de amônio e acetato de amônio é cerca de 50:50.

31. Método analítico, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de determinação da concentração

relativa de um ou mais picos resolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência que representa compostos diferentes do próprio dianidrogallactitol é realizada pela detecção de difusão de luz evaporativa.

32. Método analítico, de acordo com a reivindicação 31, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a detecção de difusão de luz evaporativa é compatível com o LC/MS por eletroaspersão.

33. Método analítico, de acordo com a reivindicação 32, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a detecção de difusão de luz evaporativa compreende a adição de coluna posterior de um solvente volátil para aumentar a evaporação de 100% da fase móvel aquosa.

34. Método analítico, de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o solvente volátil é selecionado a partir do grupo que consiste em metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila.

35. Método analítico, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que um espectrômetro de massa em tandem de eletroaspersão é instalado e conectado em linha direta a um sistema HPLC com ELSD.

36. Método analítico, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os dados espectrais de massa em tandem que fornecem informações estruturais para cada uma das impurezas que podem estar presentes em uma preparação de dianidrogallactitol são coletados.

37. Método analítico, de acordo com a reivindicação 36, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a espectroscopia de massa em tandem com o HLPC fornece informações de íon molecular e possíveis estruturas químicas que têm um consistente peso molecular com as informações de íon molecular para cada uma das impurezas e produtos de degradação observados.

38. Método analítico, de acordo com a reivindicação 36, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma impureza ou produto de

degradação é identificado pela separação por cromatografia de coluna seguida por pelo menos um procedimento de purificação para render uma amostra desconhecida de sólido.

39. Método analítico, de acordo com a reivindicação 38, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a amostra desconhecida de sólido é caracterizada para identificação por pelo menos um procedimento analítico padrão selecionado a partir do grupo que consiste na ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de massa (MS), espectroscopia infravermelho transformada de Fourier (FT-IR), análise elementar, determinação de pureza pela HPLC e determinação de teor de água pelo método de titulação Karl Fisher.

40. Método analítico, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de realizar a coleta de HPLC preparatória de pelo menos um pico de substância específica presente em uma preparação de dianidrogallactitol.

41. Método analítico, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um pico de substância presente na preparação de dianidrogallactitol é uma impureza.

42. Método analítico, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um pico de substância presente na preparação de dianidrogallactitol é um produto de degradação.

FIG. 1

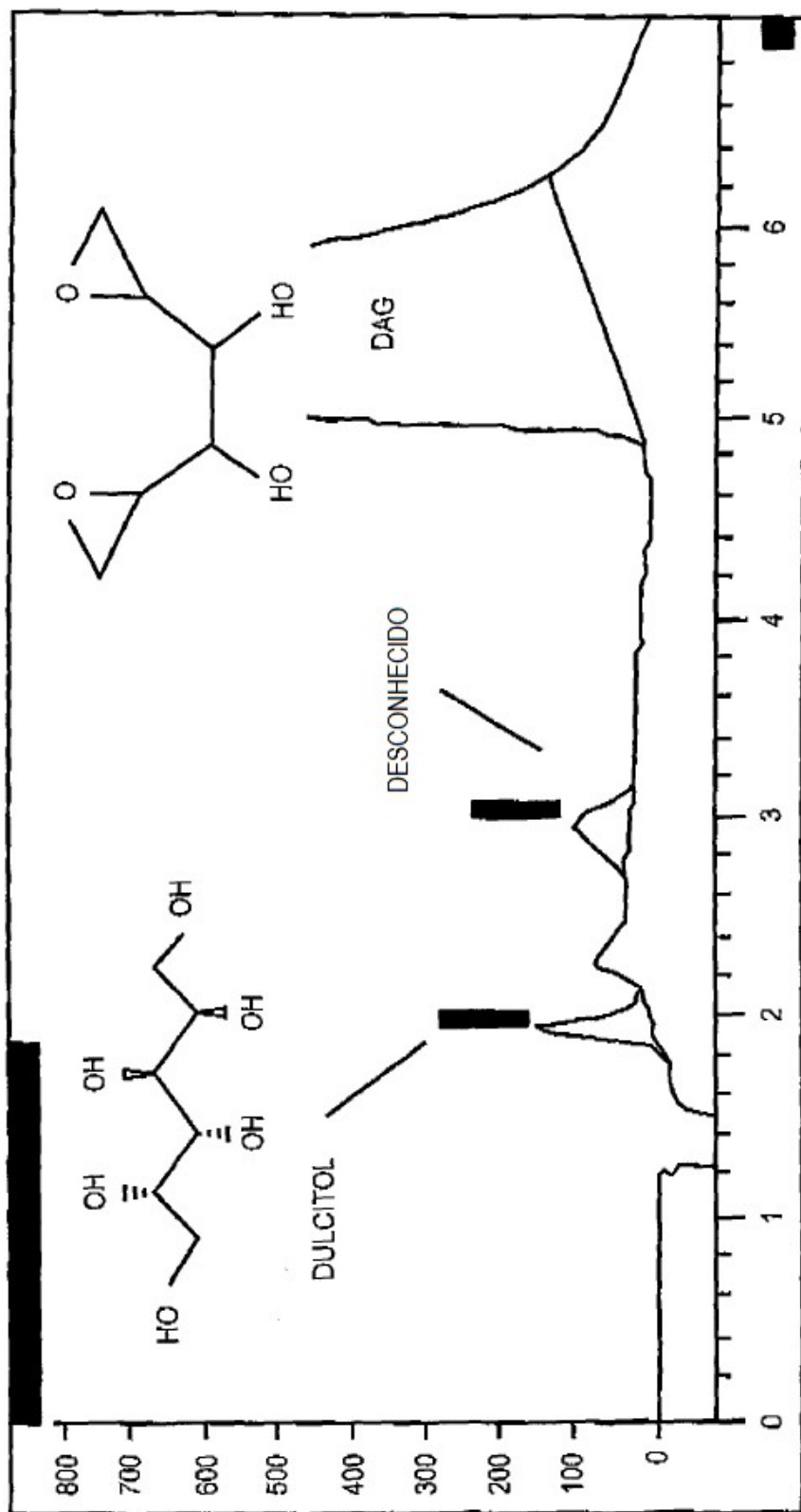
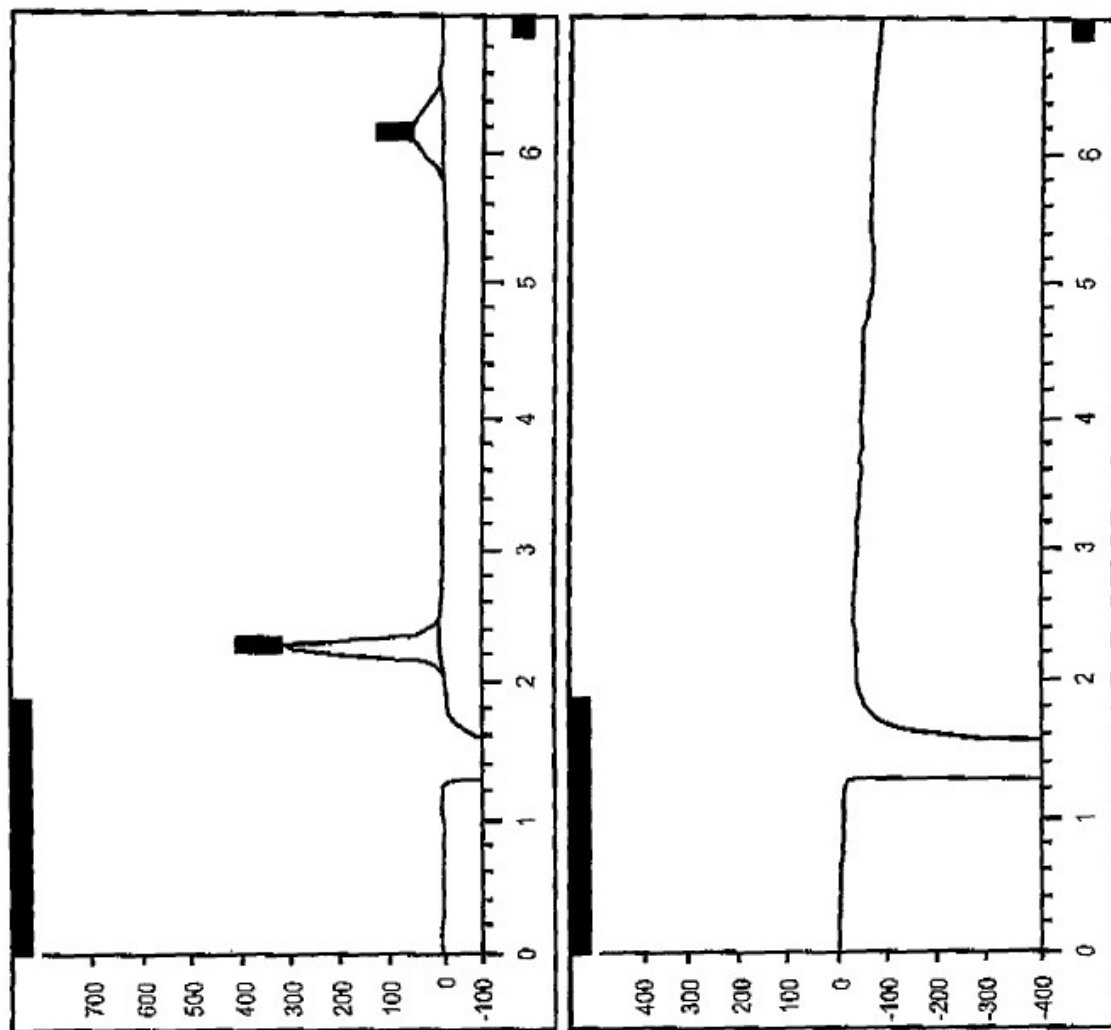


FIG. 2



RESUMO**“MÉTODOS ANALÍTICOS APRIMORADOS PARA ANALISAR E
DETERMINAR IMPUREZAS EM DIANIDROGALACTITOL”**

Trata-se de um método analítico aprimorado para análise de preparações de dianidrogalactitol que fornece um método para determinar a pureza de dianidrogalactitol e detectar impurezas em preparações de dianidrogalactitol, bem como identificar tais impurezas. O método emprega a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em particular, a HPLC com detecção de índice refrativo (RI); a HPLC pode ser seguida pela espectroscopia de massa em tandem. O método pode compreender adicionalmente a etapa de realização da coleta de HPLC preparatória de pelo menos um pico de substância específica presente em uma preparação de dianidrogalactitol.