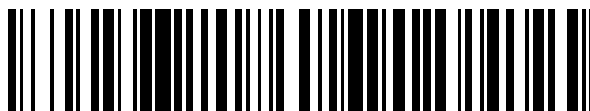


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 865 261**

51 Int. Cl.:

<b>G01N 30/88</b>	(2006.01)
<b>C07D 303/14</b>	(2006.01)
<b>C07D 301/02</b>	(2006.01)
<b>G01N 30/22</b>	(2006.01)
<b>B01D 15/30</b>	(2006.01)
<b>G01N 30/34</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2016 PCT/US2016/063362**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017 WO17091588**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2016 E 16869177 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021 EP 3380462**

54 Título: **Procedimientos para el análisis y resolución de preparaciones de dianhidrogalactitol y derivados o análogos de los mismos**

30 Prioridad:

**25.11.2015 US 201562260019 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.10.2021**

73 Titular/es:

**DEL MAR PHARMACEUTICALS (BC) LTD.  
(100.0%)  
720-999 West Broadway  
Vancouver, BC V5Z 1K5, CA**

72 Inventor/es:

**XU, QIANG**

74 Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

ES 2 865 261 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para el análisis y resolución de preparaciones de dianhidrogalactitol y derivados o análogos de los mismos

5

CAMPO DE LA INVENCION

**[0001]** La presente invención se refiere a procedimientos analíticos mejorados para dianhidrogalactitol y derivados o análogos del mismo, especialmente los que implican cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

**[0002]** El dianhidrogalactitol (1,2:5,6 dianhidrogalactitol o DAG) es uno de un número de hexitoles o derivados de hexitol que tienen actividad farmacológica significativa, que incluye actividad quimioterapéutica. En particular, el dianhidrogalactitol se ha sugerido para su uso en quimioterapia, tal como en la Patente de los Estados Unidos No. 7.157.079 de Nielsen et al.

15

**[0003]** El dianhidrogalactitol tiene actividad contra un número de neoplasmas. Sin embargo, si el dianhidrogalactitol se usa con éxito como agente terapéutico, es esencial un grado extremadamente alto de pureza y la eliminación de impurezas. La presencia de impurezas puede llevar a efectos secundarios no deseados. Un ejemplo ocurrió hace unos años, cuando las impurezas presentes en un lote del aminoácido triptófano, un constituyente normal de proteína, fueron responsables de un brote importante de síndrome de eosinofilia-mialgia, que causó un gran número de casos de incapacidad permanente y al menos 37 muertes. Esto es particularmente importante si el agente terapéutico, tal como dianhidrogalactitol, se utiliza en pacientes con sistemas inmunitarios comprometidos o disfunción de hígado o riñón o en pacientes de edad avanzada. Tales pacientes pueden experimentar una incidencia más alta de efectos secundarios no deseados debido a su sensibilidad a contaminantes.

20

25

**[0004]** Una de las impurezas encontradas en preparaciones de dianhidrogalactitol es dulcitol. También existen otras impurezas en preparaciones de dianhidrogalactitol, que dependen de su procedimiento de preparación.

30

**[0005]** El documento US2014/315318 A1 da a conocer un procedimiento analítico para analizar la presencia y la cantidad de impurezas presentes en una preparación de dianhidrogalactitol. El documento WO2013/128285 A2 da a conocer un procedimiento analítico para analizar la presencia y la cantidad de impurezas presentes en una preparación de dianhidrogalactitol.

35

**[0006]** Por lo tanto, existe una necesidad de procedimientos analíticos mejorados para detectar impurezas y productos de degradación en preparaciones de dianhidrogalactitol para producir preparaciones de mayor pureza que sean menos probables de provocar efectos secundarios cuando se administra dianhidrogalactitol con fines terapéuticos.

40

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

**[0007]** La presente invención se define en las reivindicaciones. En el presente documento se describe un procedimiento analítico mejorado para determinar la pureza de dianhidrogalactitol y derivados o análogos del mismo y detectar impurezas y productos de degradación en preparaciones de dianhidrogalactitol y derivados o análogos del mismo que cubra estas necesidades. En particular, el procedimiento analítico descrito en el presente documento es adecuado para determinar la pureza de dianhidrogalactitol y detectar impurezas y productos de degradación en preparaciones de dianhidrogalactitol.

45

**[0008]** En general, este procedimiento analítico utiliza cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), en particular, HPLC con detector evaporativo POR dispersión de luz (ELSD).

50

**[0009]** En particular, un procedimiento analítico según la presente invención puede detectar las impurezas de dulcitol y dibromodulcitol en una preparación de dianhidrogalactitol.

55

**[0010]** un aspecto de la presente invención es un procedimiento analítico para analizar la presencia y la cantidad de impurezas presentes en una preparación de dianhidrogalactitol que comprende las etapas de:

(1) analizar una preparación de dianhidrogalactitol sometiendo la preparación a cromatografía líquida de alto rendimiento utilizando una columna de amida de fase inversa que usa química de amidas en un modo de interacción hidrofílica y tecnología híbrida con puente de etileno (BEH) con elución con un gradiente de fase móvil, donde una primera fase móvil es 100 % acetonitrilo y una segunda fase móvil es 100 % agua para separar dianhidrogalactitol de dulcitol y otros contaminantes de la preparación; y

60

(2) determinar la concentración relativa de uno o más picos resueltos por cromatografía líquida de alto rendimiento que representan compuestos diferentes al propio dianhidrogalactitol.

65

**[0011]** Normalmente, el procedimiento detecta y cuantifica por lo menos uno de: (1) dulcitol; (2) dibromodulcitol; (3) una impureza distinta a dulcitol; y (4) un producto de degradación de dianhidrogalactitol.

**[0012]** Normalmente, el caudal es de aproximadamente 0,72 ml/min hasta aproximadamente 0,88 ml/min. Preferiblemente, el caudal es de aproximadamente 0,80 ml/min.

5 **[0013]** Normalmente, el esquema para elución es (1) 0,00 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo; 10 % de 100 % de agua; (2) 3,00 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo; 10 % de 100 % de agua; (3) 20,00 minutos, 75 % de 100 % de acetonitrilo, 25 % de 100 % de agua; (4) 25,00 minutos, 50 % de 100 % de acetonitrilo, 50 % de 100 % de agua; (5) 30,00 minutos, 50 % de 100 % de acetonitrilo, 50 % de 100 % de agua; (6) 30,10 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo, 10 % de 100 % de agua; y (7) 40,00 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo, 10 % de 100 % de agua.

10 **[0014]** Normalmente, el volumen de inyección es de aproximadamente 15 µl hasta aproximadamente 35 µl. Preferiblemente, el volumen de inyección es de aproximadamente 25 µl.

15 **[0015]** Normalmente, la temperatura de columna es de aproximadamente 28 °C hasta aproximadamente 32 °C. Preferiblemente, la columna de temperatura es de aproximadamente 30 °C.

**[0016]** Normalmente, el tiempo de ejecución es de aproximadamente 40 minutos.

20 **[0017]** En una alternativa, la temperatura de inyector es de aproximadamente 5°C. En otra alternativa, la temperatura de inyector es de aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 22 °C.

**[0018]** El procedimiento puede incluir un lavado de aguja con 100 % de acetonitrilo.

25 **[0019]** En un procedimiento según la presente invención, normalmente, la detección es mediante evaporación de dispersión de luz (ELSD). Normalmente, la detección por dispersión de luz evaporativa comprende la adición posterior a la columna de un disolvente volátil para potenciar la evaporación de la fracción acuosa de cualquier fase móvil presente. Se puede seleccionar el disolvente volátil del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol y acetonitrilo. En una alternativa preferida, las condiciones de detección por ELSD son una temperatura desde aproximadamente 36 °C hasta aproximadamente 44 °C, una presión de gas desde aproximadamente 2,0 bar hasta aproximadamente 3,0 bar y una ganancia de 7. En una alternativa más preferida, las condiciones de ELSD son una temperatura desde aproximadamente 38 °C hasta aproximadamente 42 °C, una presión de gas desde aproximadamente 2,25 bar hasta aproximadamente 2,75 bar y una ganancia de 7. En una alternativa todavía más preferida, las condiciones de ELSD son una temperatura de aproximadamente 40 °C, una presión de gas de aproximadamente 2,5 bar y una ganancia de 7. El detector evaporativo de dispersión de luz puede ser compatible con LC/MS por electrospray. Cuando el detector evaporativo de dispersión de luz es compatible con LC/MC por electrospray, se puede instalar un espectrómetro de masas en tándem por electrospray y conectarlo en línea a un sistema HPLC con ELSD. Cuando un espectrómetro de masas en tándem por electrospray se instala y se conecta en línea, se pueden recopilar datos de espectrómetro de masas en tándem que proporcionan información para cada una de las impurezas y los productos de degradación que pueden estar presentes en una preparación de dianhidrogalactitol. La espectrometría de masas en tándem con HPLC puede proporcionar información de iones moleculares y posibles estructuras químicas que tienen un peso molecular consistente con la información de iones moleculares para cada una de las impurezas observadas y los productos de degradación. En esta alternativa, al menos una impureza o un producto de degradación se identifica mediante separación por cromatografía de columna seguido de al menos un proceso de purificación para producir una muestra sólida desconocida. La muestra sólida desconocida se puede caracterizar para la identificación utilizando al menos un proceso analítico estándar seleccionado del grupo que consiste en resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (MS), espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), análisis elemental, determinación de pureza mediante HPLC y determinación de contenido de agua utilizando el procedimiento de valoración de Karl Fischer.

50 **[0020]** En el procedimiento tal como se describe anteriormente, el procedimiento puede comprender además la etapa de realizar un conjunto de HPLC preparativas de al menos un pico de sustancia específica en una preparación de dianhidrogalactitol. El al menos un pico de sustancia específica presente en la preparación de dianhidrogalactitol puede ser una impureza. Alternativamente, el al menos un pico de sustancia específica presente en la preparación de dianhidrogalactitol puede ser un producto de degradación.

55 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

**[0021]** Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con referencia a las siguientes descripciones, reivindicaciones adjuntas y dibujos adjuntos, donde:

60 La Figura 1 es un gráfico que muestra cromatogramas superpuestos de blanco, una muestra reciente de comprimido, una solución patrón y una solución de muestra simulada (DAG es dianhidrogalactitol y DBD es dibromodulcitol).

65 La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de cromatografía de una solución de dulcitol de 0,004 mg/ml (0,05 % de la concentración nominal) para determinar el límite de detección (LOD) para dulcitol.

La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de cromatografía de una solución de dulcitol de 0,008 mg/ml (0,1 % de la concentración nominal) para determinar el límite de cuantificación (LOQ) para dulcitol.

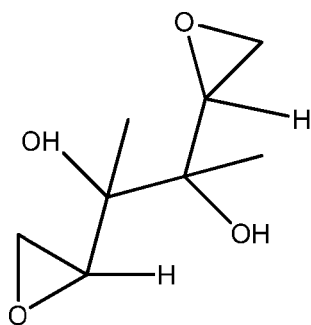
La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de una prueba de linealidad utilizando dulcitol.

La Figura 5 es un gráfico que muestra impurezas en una solución de muestra.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

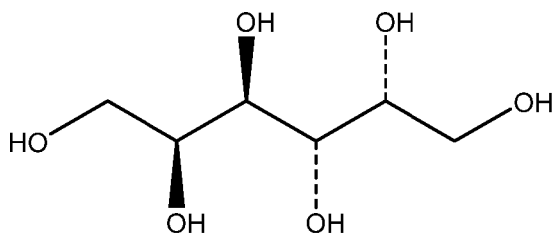
**[0022]** La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente invención se dirige a procedimientos analíticos mejorados para determinar la pureza de dianhidrogalactitol y derivados o análogos del mismo y determinar la existencia y la concentración de impurezas presentes en preparaciones de dianhidrogalactitol y derivados o análogos del mismo. En el presente documento se describe un procedimiento analítico mejorado para determinar la pureza de dianhidrogalactitol y derivados o análogos del mismo y para detectar impurezas y productos de degradación en preparaciones de dianhidrogalactitol y derivados o análogos del mismo que cubra estas necesidades. En particular, el procedimiento analítico es adecuado para determinar la pureza de dianhidrogalactitol y detectar impurezas y productos de degradación en preparaciones de dianhidrogalactitol.

**[0023]** La estructura de dianhidrogalactitol se muestra, a continuación como la Fórmula (I):



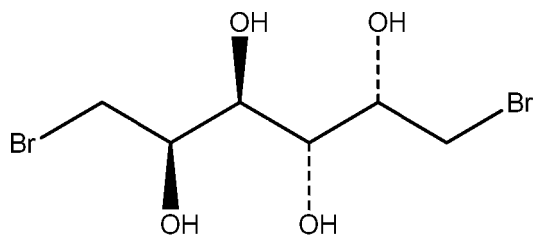
(I).

**[0024]** Una de las impurezas significantivas presentes en preparaciones de dianhidrogalactitol es dulcitol. La estructura de dulcitol se muestra, a continuación en la Fórmula (II).



(II)

**[0025]** Otra impureza adicional que puede estar presente en preparaciones de dianhidrogalactitol es dibromodulcitol. La estructura de dibromodulcitol se muestra, a continuación en la Fórmula (III)



(III)

5 **[0026]** En preparaciones de dianhidrogalactitol pueden estar presentes otras impurezas. La identidad exacta de tales impurezas puede depender de las vías de síntesis y purificación para dianhidrogalactitol. Tales impurezas pueden también representar productos de degradación de dianhidrogalactitol.

10 **[0027]** Un procedimiento mejorado de análisis de preparaciones de dianhidrogalactitol se basa en HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) con detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD). En una alternativa, para detectar e identificar todos los componentes significativos presentes en tales preparaciones de dianhidrogalactitol, se combina HPLC con espectrometría de masas (MS).

15 **[0028]** La teoría y la práctica de HPLC se describe en L.R. Snyder et al., "Introduction to Modern Liquid Chromatography" (3ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York, 2009). La teoría y la práctica de MS se describe en E. de Hoffmann & V. Stroobant, "Mass Spectrometry: Principles and Applications" (3ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York, 2007).

20 **[0029]** En una alternativa preferida, la HPLC se realiza utilizando una columna de amida de fase inversa. Una columna de amida particularmente preferida es una columna de 4,6 mm x 250 mm que utiliza química de amidas en un modo de interacción hidrofílica; la columna utiliza tecnología híbrida con puente de etileno (BEH). Las partículas de la columna son de forma esférica y tienen un tamaño de partícula de 3,5 µm. Las partículas tienen un sustrato híbrido y tienen un tamaño de poro de 130 Å. Una columna de amida de fase inversa particularmente preferida es una columna de amida Waters XBridge BEH Número 186004870 (Waters, Milford MA). Otras columnas de amida de fase inversa se conocen en la técnica.

25 **[0030]** Para la fase móvil, una alternativa preferida es usar 100 % de acetonitrilo como Fase móvil A y 100 % de agua como Fase móvil B. Un caudal preferido es desde aproximadamente 0,72 ml/min hasta aproximadamente 0,88 ml/min; un caudal particularmente preferido es aproximadamente 0,80 ml/min.

30 **[0031]** Un esquema preferido para la elución es el siguiente: (1) 0,00 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo; 10 % de 100 % de agua; (2) 3,00 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo; 10 % de 100 % de agua; (3) 20,00 minutos, 75 % de 100 % de acetonitrilo; 25 % de 100 % de agua; (4) 25,00 minutos, 50 % de 100 % de acetonitrilo, 50 % de 100 % de agua; (5) 30,00 minutos, 50 % de 100 % de acetonitrilo, 50 % de 100 % de agua; (6) 30,10 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo, 10 % de 100 % de agua; y (7) 40,00 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo, 10 % de 100 % de agua.

35 **[0032]** El volumen de inyección puede ser desde aproximadamente 15 µl hasta aproximadamente 35 µl. Un volumen de inyección preferido es aproximadamente 25 µl.

40 **[0033]** La temperatura de columna puede ser de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 32 °C. Una temperatura de columna preferida es aproximadamente 30 °C.

45 **[0034]** Un tiempo de ejecución preferido es de aproximadamente 40 minutos. La temperatura del inyector puede ser de aproximadamente 5 °C o temperatura ambiente (desde aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 22 °C). El procedimiento analítico puede incluir un lavado de aguja con 100 % de acetonitrilo.

50 **[0035]** Normalmente, en procedimientos analíticos con HPLC según la presente invención, la detección se realiza mediante evaporación de dispersión de luz (ELSD). Un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) atomiza el eluido de columna, proyecta luz sobre los componentes particulados resultantes y detecta la luz dispersada resultante. Teóricamente, un ELSD puede detectar cualquier componente no volátil. El detector evaporativo de dispersión de luz de un compuesto no cromogénico se basa en la nebulización del eluyente de HPLC y la evaporación de disolventes de la fase móvil para producir partículas de soluto atomizantes para detección de dispersión de luz. Este proceso de nebulización y evaporación de disolvente para producir partículas de soluto analito atomizantes es comparable con el procedimiento de LC/MS por electrospray. Normalmente, la detección con ELSD es compatible con LC/MS por electrospray.

55 **[0036]** La puesta en práctica de un procedimiento de HPLC con detección con ELSD que es compatible con aplicación de LC/MS por electrospray normalmente implica adición posterior a la columna de un disolvente volátil para aumentar la evaporación de la fracción acuosa de cualquier fase móvil presente. Normalmente el disolvente volátil se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol y acetonitrilo.

60 **[0037]** Normalmente, las condiciones de detección con ELSD son una temperatura desde aproximadamente 36 °C hasta aproximadamente 44 °C, una presión de gas desde aproximadamente 2,0 bar hasta aproximadamente 3,0 bar y una ganancia de 7. Preferiblemente, las condiciones de ELSD son una temperatura desde aproximadamente 38 °C hasta aproximadamente 42 °C, una presión de gas desde aproximadamente 2,25 bar hasta aproximadamente 2,75 bar y una ganancia de 7. Más preferiblemente, las condiciones de ELSD son una temperatura de aproximadamente 40 °C, una presión de gas de aproximadamente 2,5 bar y una ganancia de 7.

65

**[0038]** Normalmente, la detección evaporativo de dispersión de luz es compatible con LC/MS por electrospray. Por consiguiente, en los procedimientos según la presente invención, se puede instalar un espectrómetro de masas en tándem por electrospray y conectarlo en línea a un sistema de HPLC con ELSD. Se pueden recopilar los datos del espectrómetro de masas que proporcionan información molecular y datos de espectrómetro de masas en tándem que proporcionan información estructural química para cada una de las impurezas que pueden estar presentes en una preparación de dianhidrogalactitol. La espectrometría de masas en tándem con HPLC proporcionará información de iones molecular y posibles estructuras químicas que tienen un peso molecular consistente con la información de iones moleculares para cada una de las impurezas observadas y productos de degradación.

**[0039]** En otra alternativa, se puede realizar un conjunto de HPLC preparativas de picos específicos de sustancia relacionada con DAG que incluyen impurezas presentes en una preparación de DAG.

**[0040]** Por consiguiente, un procedimiento analítico para analizar la presencia y la cantidad de impurezas presentes en una preparación de dianhidrogalactitol comprende las etapas de:

(1) analizar una preparación de dianhidrogalactitol sometiendo la preparación a cromatografía líquida de alto rendimiento utilizando una columna de amida de fase inversa que usa química de amidas en un modo de interacción hidrofílica y tecnología híbrida con puente de etileno (BEH) con elución con un gradiente de fase móvil, donde una primera fase móvil es 100 % acetonitrilo y una segunda fase móvil es 100 % agua para separar dianhidrogalactitol de dulcitol y otros contaminantes de la preparación; y

(2) determinar la concentración relativa de uno o más picos resueltos por cromatografía líquida de alto rendimiento que representan compuestos diferentes al propio dianhidrogalactitol.

**[0041]** Los compuestos distintos al propio dianhidrogalactitol pueden ser al menos uno de: (1) dulcitol; (2) dibromodulcitol; (3) una impureza distinta a dulcitol; y (4) un producto de degradación de dianhidrogalactitol.

**[0042]** Las condiciones adecuadas para el análisis cromatográfico de fase inversa y la detección con ELSD son como se describen anteriormente.

**[0043]** En una alternativa, un procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende además la etapa de analizar uno o más picos que eluyen de cromatografía líquida de alto rendimiento mediante espectrometría de masas en tándem por electrospray. En otra alternativa, un procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende además la etapa de un conjunto de HPLC preparativas de al menos un pico específico de sustancia relacionada con dianhidrogalactitol.

**[0044]** Si existe una impureza o un producto de degradación (distinto a dulcitol), se puede identificar la impureza o el producto de degradación desconocidos mediante separación por cromatografía en columna, seguida de al menos un procedimiento de purificación para producir una muestra sólida desconocida, que, a continuación, se puede caracterizar para identificación utilizando al menos un proceso analítico estándar seleccionado del grupo que consiste en resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (MS), espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), análisis elemental, determinación de pureza mediante HPLC y determinación del contenido de agua utilizando el procedimiento de valoración Karl Fischer. Estos procedimientos son bien conocidos en la técnica.

**[0045]** En el procedimiento tal como se describe anteriormente, el procedimiento puede comprender además la etapa de realizar un conjunto de HPLC preparativas de al menos un pico de sustancia específica en una preparación de dianhidrogalactitol. El al menos un pico de sustancia específica presente en la preparación de dianhidrogalactitol puede ser una impureza. Alternativamente, el al menos un pico de sustancia específica presente en la preparación de dianhidrogalactitol puede ser un producto de degradación.

**[0046]** La presente invención se ilustra mediante el siguiente Ejemplo. El Ejemplo tiene propósitos ilustrativos solamente y no pretende limitar la invención.

#### Ejemplo

#### Análisis por HPLC de Fase Inversa de Preparaciones de Dianhidrogalactitol utilizando un Gradiente de Acetonitrilo y Agua

**[0047]** De manera resumida, este procedimiento de prueba se usa para determinar una o más sustancias o sustancias relacionadas en una preparación de sustancia farmacológica y producto farmacológico de dianhidrogalactitol (DAG) utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detección con ELSD (HPLC-ELSD). Se usa una columna de fase inversa (Waters Amide, 3,5 µm, 4,6 x 250 mm) con 100 % de acetonitrilo (ACN) como Fase móvil A y 100 % de agua como Fase móvil B. El caudal es de 0,8 mg/ml. El pico de DAG se detecta con un tiempo de retención de aproximadamente 5,20 minutos. Las muestras de DAG se preparan con una concentración diana de 8 mg/ml.

#### Reactivos y patrones de referencia

**[0048]** Los reactivos y patrones de referencia incluyen: (1) agua purificada (H<sub>2</sub>O), grado HPLC o equivalente; (2)

acetonitrilo (ACN), grado HPLC o equivalente; y (3) patrón de referencia de dulcitol.

Instrumentos y Equipos

5 **[0049]** Instrumentos y Equipos incluyen: (1) sistema HPLC Shimadzu LC20A o equivalente equipado con detector de ELSD; (2) columna de HPLC de fase inversa de Waters Amide, 3,5 µm, 4,6 x 250 mm, PN: 186004870); (3) Generador de agua purificada; y (4) balance analítico.

Preparación de Soluciones

10 **[0050]** Se pueden escalar o desescalar los volúmenes según sea apropiad para las pruebas. Se puede preparar un disolvente con acetonitrilo/agua (85:15, v/v) mezclando a fondo 850 ml de ACN y 150 ml de agua. Las fases móviles son 100 % ACN (Fase Móvil A) y 100 % de agua (Fase Móvil B). Se preparan soluciones patrón de linealidad de dulcitol de 0,016 mg/ml (0,2 %), 0,08 mg/ml (1 %) y 0,4 mg/ml (5 %). Los pesos y los volúmenes indicados son las cantidades recomendadas para el análisis cuantitativo rutinario. Se pueden usar cantidades alternativas, siempre y cuando las concentraciones finales permanezcan iguales. Los objetos de cristal se deben preenjuagar 5 veces con agua purificada y ACN para minimizar la potencial contaminación.

20 **[0051]** Se pueden preparar otras concentraciones. Por ejemplo, para una concentración estándar de dulcitol de 3 % (0,24 mg/ml), se pesan con precisión aproximadamente 24 mg de patrón de referencia de dulcitol en un matraz volumétrico de 100 ml, se añaden 15 ml de agua purificada y sonicar para disolver, se enrasan con acetonitrilo y se mezclan bien. Se etiquetan como L-3 %-#1 (STD#1) y L-3 %-#2 (STD#2). El matraz volumétrico se debe limpiar completamente enjuagando con agua purificada y ACN antes de su uso.

25 **[0052]** Se puede preparar una réplica para 0,08 mg/ml (1 %). Por ejemplo, se pesan con precisión aproximadamente 20 mg de patrón de referencia de dulcitol en un matraz volumétrico de 250 ml, se añaden 37,5 ml de agua purificada y se sonicar para disolver, se enrasa con ACN y se mezcla bien. Se etiqueta como L-1 %.

30 **[0053]** Se puede preparar una réplica para 0,016 mg/ml (0,2 %). Esto se puede preparar tal como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1

Niveles	Procedimiento de Dilución de Ejemplo	Etiqueta AS	Concentración Diana (mg/ml)
0,2 %	2 ml L-1 % → 10 ml	L-0,2 %	0,016

40 **[0054]** Las soluciones patrón se pueden almacenar hasta 48 horas a 2-8 °C y se pueden almacenar hasta 52 horas en condición ambiental de laboratorio. Las soluciones patrón se pueden usar para generar una curva estándar como la que se describe más adelante.

45 **[0055]** Se puede preparar una réplica de una solución de sensibilidad de dulcitol (0,008 mg/ml (0,1 %), tal como se muestra en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2

Niveles	Procedimiento de Dilución de Ejemplo	Etiquetas AS	Concentración Diana (mg/ml)
0,1 %	1 ml L-5 %-#1 → 50 ml	SS	0,008

50 **[0056]** Se puede preparar una solución patrón de dianhidrogalactitol (DAG) (8 mg/ml) (solamente con fines identificativos) de la siguiente manera: se pesa con precisión, en una réplica, aproximadamente 80 mg de patrón de trabajo de DAG en matraces volumétricos limpios de 10 ml. Se disuelve el patrón de trabajo de DAG en aproximadamente 5 ml de disolvente, se enrasa con disolvente y se mezcla. Se puede destilar la solución y almacenarla congelada para futuros usos hasta que no se detecten más picos relevantes en el cromatograma.

55 **[0057]** Se preparan las soluciones de muestra de prueba (nominal 8 mg/ml) de la siguiente manera. La preparación de muestras de sustancia o API farmacológico de DAG puede ser la siguiente. Se pesa con precisión, por duplicado, aproximadamente 80 mg de muestra API de DAG en matraces volumétricos limpios de 10 ml. Se disuelve la muestra de API de DAG en aproximadamente 5 ml de disolvente, se enrasa con disolvente y se mezcla. La preparación de muestras para producto farmacológico de DAG (polvo liofilizado, 40 mg/vial) puede ser la siguiente. Se limpia y extrae el cierre del vial. Se reconstituye el vial liofilizado con 5,0 ml de disolvente para producir una solución de 8 mg/ml. Se preparan las muestras por duplicado (utilizando 2 viales). Las soluciones de muestra se pueden almacenar hasta 48 horas a 2-8 °C y 52 horas en condiciones ambientales de laboratorio.

Condiciones Cromatográficas

Las condiciones cromatográficas se muestran en la Tabla 3.

[0058]

Tabla 3

<b>Fase Móvil</b>	Fase móvil A:100 % de ACN Fase móvil B:100 % de agua			
<b>Columna</b>	Waters Amide 4,6*250mm, 3,5 µm			
<b>Gradiente</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Caudal (ml/min)</b>	<b>MPA %</b>	<b>MPB %</b>
	0,00	0,8	90	10
	3,00	0,8	90	10
	20,00	0,8	75	25
	25,00	0,8	50	50
	30,00	0,8	50	50
	30,10	0,8	90	10
	40,00	0,8	90	10
<b>Condiciones de ELSD</b>	Temperatura: 40 °C Presión de gas 2,5 bar Ganancia: 7			
<b>Volumen de inyección</b>	25 µl			
<b>Temperatura de Columna</b>	30°C			
<b>Tiempo de Ejecución</b>	40 min			
<b>Temperatura de Inyector</b>	T ambiente o 5 °C			
<b>Lavado de Aguja</b>	100 % de ACN			

[0059] La columna de HPLC se programará con condiciones de procedimiento inicial y se equilibrará antes del análisis de muestras.

Secuencia de Inyección

[0060] Después de asegurar que los requisitos de idoneidad del sistema expresados, a continuación se cumplen, se puede llevar a cabo el análisis de muestras. La secuencia de inyección se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Número de Serie	Nombre de Muestra	Número de Inyección
1	Blanco (Disolvente)	1 o más
2	Solución de Sensibilidad (SS)	1
3	L-0,2 %	1
4	L-1 %	1
5	STD#1 (L-3 %#1)	5
6	STD#2 (L-3 %#2)	1
7	Solución patrón de DAG (solamente con fin identificativo)	1
8	Soluciones de Muestra	1 de cada
9	STD#1 (L-3 %#1)	1

**[0061]** La secuencia está delimitada por inyección STD#1 (L-3 %#1) una vez, seguida de no más de 6 inyecciones de solución de muestra y, al final de la secuencia, inyectar una vez más STD#1 (L-3 %#1).

#### Idoneidad del sistema

**[0062]** Para el blanco, debe asegurarse que el sistema sea limpio y estable y que no haya pico de interferencia observado en los cromatografías de blanco en la retención de tiempo de dulcitol. Si existe cualquier interferencia, la interferencia no debería ser más que el pico de dulcitol en la solución de sensibilidad.

**[0063]** Para la solución de sensibilidad, la relación señal/ruido (S/R) del pico de dulcitol en la solución de sensibilidad no debe ser inferior a 10.

**[0064]** Para correlación (r), la correlación de la curva de calibración logarítmica para L-0,2 %, L-1 % y L-3 % #1 (primera inyección) no debe ser inferior a 0,980.

**[0065]** Para la solución patrón, la desviación estándar relativa (RSD) de Lg (área de pico) de dulcitol para las primeras cinco inyecciones iniciales de STD#1 (L-3 %#1) debe ser  $\leq 5$  %. El factor de cola del pico de dulcitol en la primera inyección de STD#1 (L-3 %#1) debe ser  $\leq 2,0$ . La recuperación de STD#2 (L-3 %#2) debe estar dentro de 95 %-105 %. La recuperación de solución patrón #2 se calcula según la Ecuación (1):

$$\text{Recuperación de patrón de comprobación} = \frac{\text{Ig}(C_{\text{STD}\#1})}{\text{Ig}(C_{\text{STD}\#2})} \times \frac{\text{Ig}(A_{\text{STD}\#2})}{\text{Ig}(A_{\text{STD}\#1})} \times 100\%$$

#### Ecuación (1)

donde: CSTD#1 es la concentración del patrón de referencia de dulcitol en solución patrón #1 (STD#1) (mg/ml); CSTD#2 es la concentración del patrón de referencia de dulcitol en solución patrón #2 (STD#2) (mg/ml); ASTD#1 es el área de pico promedio de dulcitol en cinco inyecciones iniciales de solución patrón #1 (STD#1); y ASTD#2 es el área de pico promedio de dulcitol en cinco inyecciones iniciales de solución patrón #2 (STD#2).

**[0066]** Para agrupar la solución patrón, la relación entre Lg (área de pico) de inyección de agrupación y el promedio de Lg (área de pico) de las primeras cinco inyecciones de STD#1 (L-3 %#1) debe estar dentro de 95 %-105 %.

**[0067]** Para el límite de detección (LOD), la relación de señal/ruido (S/R) no debe ser inferior a 3. La determinación del límite de detección (LOD) para dulcitol, una de las impurezas previsibles en una preparación de dianhidrogalactitol, se muestra en la Figura 2. La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de cromatografía de una solución de dulcitol de 0,004 mg/ml (0,05 % de la concentración nominal) para determinar el límite de detección (LOD) para dulcitol.

**[0068]** Para el límite de cuantificación (LOQ), la relación de señal/ruido (S/R) no debe ser inferior a 10. La determinación del límite de cuantificación (LOQ) para dulcitol se muestra en la Figura 3. La Figura 3 es un gráfico que

muestra los resultados de cromatografía de una solución de dulcitol de 0,008 mg/ml (0,1 % de la concentración nominal) para determinar el límite de cuantificación (LOQ) para dulcitol.

5 **[0069]** El promedio de recuperación (n = 3) para cada nivel debe estar desde aproximadamente 80 % hasta aproximadamente 120 %.

**[0070]** Para capacidad de repetición, para los niveles de 0,1 % hasta 0,4 %, se debe registrar el % de RSD. Para 0,5 % y superior, el % de RSD debe ser ≤ 20 %. El % de RSD combinado debe ser ≤ 20 %.

10 **[0071]** Para variabilidad de resultados con respecto a la presión de gas con ELSD, la diferencia absoluta no debería ser superior al 0,2 % para una impureza a ≤ 1,0 %. Para una impureza >1,0 %, la diferencia relativa se debería controlar dentro de ±20 %. No deberían observarse nuevas impurezas ≥ 0,1 %.

15 **[0072]** Con respecto a la estabilidad de solución, la recuperación de las soluciones envejecidas debería estar dentro de 85 %-115 % del ensayo inicial. La diferencia absoluta no debe ser superior al 0,2 % para una impureza de ≤ 1,0 %. Para una impureza de >1,0 %, el resultado de la solución envejecida debería estar dentro de 80 %-120 % del original. No deberían observarse nuevas impurezas ≥ 1,0 %.

20 Identificación

**[0073]** Para placebo, no se puede detectar ningún pico cromatográfico más que el pico de dulcitol en la Solución de Sensibilidad (SS) que corresponde al pico de DAG en el cromatograma de patrones de DAG. Para una sustancia activa de DAG, el tiempo de retención para DAG en la muestra y el patrón de DAG son esencialmente los mismos (dentro de ± 5 %).

25 Cálculo

30 **[0074]** Para sustancias individuales relacionadas, la curva de cálculo de dulcitol que usa patrones de trabajo de linealidad se realiza de la siguiente manera (Ecuación (2)):

$$\lg A_{STD} = b + k \times \lg\left(\frac{W_{STD} \times P}{V_{STD}}\right)$$

(Ecuación (2)),

35 donde: A<sub>STD</sub> representa el área de dulcitol para la Solución Patrón de Linealidad (para L-3 %, se pueden usar las primeras inyecciones de STD#1); V<sub>STD</sub> es el volumen de dilución para la Solución Patrón de Linealidad (ml); W<sub>STD</sub> es el peso de dulcitol de la Solución Patrón de Linealidad (mg); P es la pureza (o contenido) de dulcitol; b es la intersección en Y de la curva de calibración establecida; y k es la pendiente de la curva de calibración establecida. El porcentaje de la sustancia individual relacionada se calcula utilizando la Ecuación (3).

$$\text{Sustancia individual relacionada } \% = \frac{10(\lg A_{SPL} - b)/k \times V_{SPL}}{LC \text{ or } W_{SPL}} \times 100$$

(Ecuación 3),

40 donde: A<sub>SPL</sub> es el área de sustancia individual relacionada; V<sub>SPL</sub> es el volumen de dilución de solución de muestra; b es la intersección con Y de la curva de calibración establecida; k es la pendiente de la curva de calibración establecida; LC es la declaración en la etiqueta (la cantidad nominal que consta en la etiqueta) de DAG en cada vial (LC = 40 mg para Producto Farmacológico); y W<sub>SPL</sub> es el peso de sustancia farmacológica de DAG (mg). Los resultados de una prueba de linealidad utilizando dulcitol se muestran en la Figura 4; estos resultados son de la Tabla 18, a continuación.

50 **[0075]** Para la sustancia relacionada total, el cálculo para las sustancias relacionadas totales debe sumar todas las sustancias individuales no inferiores al 0,1 %. Los picos nulos y de blanco no se deben añadir a las sustancias relacionadas totales.

Información

**[0076]** Para informar sobre sustancias individuales, para todas las impurezas que no son inferiores al 0,1 %, se informa de todas las impurezas que son inferiores al 0,1 % en referencia a su tiempo de retención relativo (RRT) o nombre, y se presentan con hasta dos cifras decimales. Si dos resultados de prueba no son menores del límite de especificación (0,1 %), el resultado promedio se debe indicar como el resultado final. Pero si un resultado de prueba es menor de 0,1 %, el resultado máximo se debe indicar como el resultado final. Para sustancias relacionadas totales (impurezas totales), la suma de todas las impurezas que no sean inferiores al 0,1 %. Se indican las sustancias relacionadas totales con hasta dos cifras decimales.

## 10 Referencias

**[0077]** Los patrones de referencia se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Composición	Fórmula de Unidad	
	Cantidad (mg)/Vial	p/p, %
DAG para inyección	40	100
<b>Total</b>	40	100

## 25 Resultados

**[0078]** Se cumplieron todos los criterios de idoneidad del sistema. No se observaron picos de interferenci destacados en el tiempo de retención del pico de DAG, DBD y dulcitol en el cromatograma con disolvente. La diferencia del tiempo de retención de picos de DAG en la muestra y las soluciones patrón varió entre 0 % y 3 %. La relación señal/ruido (S/N) con respecto al límite de detección fue de 6, 6 y 3 en réplicas por triplicado. La relación señal/ruido (S/N) con respecto al límite de detección fue de 22, 20 y 16 en réplicas por triplicado. El coeficiente de correlación (r) fue de 0,9985 con una pendiente de 1,7212 y una intersección con y de 7,7258. La recuperación media para niveles de 0,5 %, 1,0 % y 3,0 % se muestra en la Tabla 6, a continuación. Los % de RSD se muestran en las Tablas 7 (Ejecución 1) y la Tabla 8 (Ejecución 2), a continuación, para dos ejecuciones por duplicado. Para P-0,5 % (los contaminantes están presentes en un nivel de 0,5 % o mayor), el dulcitol se muestra en la Tabla 9, a continuación; en la Tabla 9 el dulcitol se mostró que estaba presente en un nivel del 0,59 %. El % de RSD combinado para una precisión intermedia (una medición de precisión bajo una serie definida de condiciones: el mismo procedimiento de medición, el mismo sistema de medición, la misma ubicación y las medidas de repetición del mismo objeto o similares durante un periodo de tiempo prolongado) para el nivel del 0,5 % se muestran en la Tabla 10, a continuación. Las diferencias absolutas para las presiones de gas de ELSD de 2,6 bar y de 2,4 bar se muestran en la Tabla 11, a continuación. No se observó ninguna impureza a > 1,0 %, y no se observó ninguna nueva impureza a  $\geq 0,1$  %. Los resultados de temperaturas de ELSD de 39 °C y de 41 °C se muestran en la Tabla 12, a continuación. No se observó ninguna impureza a > 1,0 %, y no se observó ninguna nueva impureza a  $\geq 0,1$  %.

## 45 Estabilidad de Solución

**[0079]** La estrategia experimental para determinar la estabilidad de solución fue la siguiente: Para una solución patrón, se preparó una solución patrón de dulcitol con 1,0 % de concentración nominal de DAG en una réplica y se colocó la solución en condiciones ambientales de laboratorio y condiciones de enfriamiento (2-8 °C), respectivamente, utilizando soluciones patrón de linealidad al 1 %. La solución se volvió a analizar en diferentes intervalos de tiempo, tales como 2 horas, 4 horas, 24 horas y 48 horas. Para los puntos de tiempo menores de 24 horas, la estabilidad de solución se evalúa según patrones recientes. Se evalúa la recuperación de soluciones envejecidas. Para las soluciones de muestra, se preparó una solución de muestra con una concentración nominal de DAG específica en una réplica y se colocó en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente o en condiciones de enfriamiento (2-8 °C). La solución se volvió a analizar en diferentes intervalos de tiempo, tales como 2 horas, 4 horas, 24 horas y 48 horas. Para los puntos de tiempo menores de 24 horas, la estabilidad de solución se evalúa según patrones recientes.

**[0080]** Los resultados de variabilidad con respecto a envejecimiento a 2-8 °C y en condiciones ambientales de laboratorio se muestran en la Tabla 13, a continuación. Para las impurezas en relación a envejecimiento en condiciones ambientales de laboratorio, se muestran los resultados en la Tabla 14, a continuación. No se observaron nuevas impurezas  $\geq 0,1$  %. Para las impurezas, en relación al envejecimiento a 2-8 °C, se muestran los resultados en la Tabla 15, a continuación. No se observaron nuevas impurezas  $\geq 0,1$  %.

65

Tabla 6

Nivel	Promedio Recuperación (%)	RSD % (n=3)
0,5 %	120	2,1
1,0 %	116	0,9
3,0 %	95	0,1

Tabla 7

Ejecución 1:		
Nombre de Pico	Contenido promedio (%)	RSD (n=6)
RRT 0,48	0,18	2,9
RRT 0,51	0,34	1,1
RRT 0,56	0,28	1,0
RRT 0,71	1,06	0,7
Dulcitol	0,15	2,9
RRT 1,02	0,08	5,2
RRT 1,07	0,08	4,0

Tabla 8

Ejecución 2:		
Nombre de Pico	Contenido Promedio (%)	RSD (n=6)
RRT 0,48	0,23	1,5
RRT 0,56	0,35	1,8
RRT 0,71	0,67	0,8
Dulcitol	0,20	1,8
RRT 1,07	0,21	3,8
RRT 1,19	0,15	2,8
RRT 1,27	0,12	10,1

Tabla 9

P-0,5 %		
Nombre de Pico	Contenido Promedio (%)	RSD (n=6)
Dulcitol	0,59	0,9

Tabla 10

Nivel	RSD % (n=12)
0,5 %	2,1

Tabla 11

	2,6 bar:	
5	Nombre de Pico	Diferencia absoluta (%)
	RRT 0,48	0,001
	RRT 0,51	0,01
10	RRT 0,56	0,01
	RRT 0,71	0,02
	2,6 bar:	
15	Nombre de Pico	Diferencia absoluta (%)
	Dulcitol	0,004
20	2,4 bar:	
	Nombre de Pico	Diferencia absoluta (%)
25	RRT 0,48	0,01
	RRT 0,51	0,01
	RRT 0,56	0,01
	RRT 0,71	0,02
30	Dulcitol	0,001

Tabla 12

35	39°C:	
	Nombre de Pico	Diferencia Absoluta (%)
40	RRT 0,48	0,01
	RRT 0,51	0,01
	RRT 0,56	0,003
45	RRT 0,71	0,04
	Dulcitol	0,02
	RRT 1,02	0,01
50	RRT 1,07	0,01
	41°C:	
55	Nombre de Pico	Diferencia Absoluta (%)
	RRT 0,48	0,001
	RRT 0,51	0,0001
60	RRT 0,56	0,01
	RRT 0,71	0,01
	Dulcitol	0,002
65	RRT 1,02	0,001
	RRT 1,07	0,01

Tabla 13

Condiciones ambientales del laboratorio	
Punto de tiempo (h)	Recuperación (vs. inicial, %)
0	ND
2	100
4	99
8	99
27	101
52	99
2-8 °C	
Punto de tiempo (h)	Recuperación (vs. inicial, %)
0	ND
2	100
4	100
8	99
25	100
48	100

5

Tabla 14

Condiciones ambientales de laboratorio											
Nombre de Muestra	Contenido (%)						Diferencia absoluta (%)				
	0 h	2 h	4 h	8 h	25 h	48 h	2 h	4 h	8 h	25 h	48 h
RRT 0,48	0,15	0,16	0,15	0,16	0,18	0,17	0,01	0,004	0,01	0,03	0,02
RRT 0,51	0,32	0,32	0,32	0,31	0,33	0,33	0,002	0,01	0,01	0,01	0,01
RRT 0,56	0,37	0,36	0,36	0,36	0,38	0,38	0,01	0,004	0,01	0,02	0,01
Dulcitol	0,19	0,19	0,20	0,19	0,21	0,20	0,001	0,01	0,003	0,02	0,01
RRT 1,02	0,12	0,11	0,12	0,11	0,13	0,12	0,004	0,01	0,01	0,01	0,01
RRT 1,07	0,15	0,14	0,13	0,13	0,16	0,14	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01
RRT 1,19	0,11	0,10	0,10	0,10	0,11	0,09	0,002	0,01	0,004	0,01	0,01
RRT 1,27	0,08	0,09	0,07	0,08	0,08	0,08	0,004	0,01	0,002	0,002	0,004
Nombre de Muestra	Contenido (%)						Porcentaje Vs. Inicial (%)				
	0 h	2 h	4 h	8 h	25 h	48 h	2 h	4 h	8 h	25 h	48 h
RRT 0,71	1,24	1,24	1,22	1,22	1,24	1,21	100	98	98	100	98

10

15

20

25

30

35

40

45

Tabla 15

2-8 °C											
Nombre de muestra	Contenido (%)						Diferencia absoluta (%)				
	0 h	2 h	4 h	8 h	27 h	52 h	2 h	4 h	8 h	27 h	52 h
RRT 0,48	0,15	0,16	0,17	0,18	0,25	0,29	0,002	0,01	0,02	0,1	0,1
RRT 0,51	0,32	0,31	0,32	0,32	0,34	0,32	0,01	0,001	0,002	0,02	0,005
RRT 0,56	0,36	0,35	0,37	0,36	0,37	0,36	0,01	0,01	0,0004	0,01	0,001
Dulcitol	0,23	0,24	0,24	0,25	0,25	0,24	0,004	0,01	0,01	0,02	0,01
RRT 1,02	0,11	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13	0,01	0,01	0,003	0,02	0,01
RRT 1,07	0,15	0,14	0,14	0,15	0,18	0,15	0,002	0,01	0,0005	0,03	0,001
RRT 1,19	0,10	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,01	0,01	0,01	0,001	0,01
RRT 1,22-1,23	0,08	0,09	0,08	0,07	0,09	0,08	0,01	0,003	0,01	0,01	0,0004
RRT 1,27	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10	0,09	0,002	0,01	0,0003	0,003	0,01
Nombre de muestra	Contenido (%)						Diferencia absoluta (%)				
	0 h	2 h	4 h	8 h	27 h	52 h	2 h	4 h	8 h	27 h	52 h
RRT 0,71	1,10	1,13	1,11	1,12	1,13	1,12	103	101	102	103	102

- 5 **[0081]** Detalles adicionales sobre la idoneidad del sistema se muestran en las Tablas 16 y 17, a continuación, mostrando que se cumplen los criterios para la consistencia de recuperación.

Tabla 16

Número de Ejecución	Blanco	S/N	Correlación (r)	RSD	Factor de Cola	Recuperación Estándar	Recuperación Agrupada
Ejecución 1:	Cumplido	23	0,9959	0,3 %	Cumplido	99 %	99 %, 98 %, 98 %, 97 %, 96 %, 96 %, 96 %, 96 %, 96 %, 96 %, 96 %
Ejecución 2:	Cumplido	19	0,9974	0,02 %	Cumplido	100 %	100 %
Ejecución 3:	Cumplido	14	0,9975	0,1 %	Cumplido	98 %	100 %
Ejecución 4:	Cumplido	12	0,9973	0,01 %	Cumplido	97 %	100 %
Ejecución 5:	Cumplido	14	0,9975	0,1 %	Cumplido	101 %	100 %
Ejecución 6:	Cumplido	13	0,9939	0,2 %	Cumplido	99 %	100 %
Ejecución 7:	Cumplido	13	0,9948	0,5 %	Cumplido	98 %	99 %

Tabla 17

Número de Ejecución	En blanco	S/N	Correlación (r)	RSD	Factor de Cola	Recuperación Estándar	Recuperación agrupada
Ejecución 8:	Cumplido	14	0,9983	0,02 %	Cumplido	100 %	100 %, 100 %, 100 %, 100 %, 100 %
Ejecución 9:	Cumplido	10	0,9981	0,1 %	Cumplido	100 %	100 %, 100 %, 100 %, 100 %
Ejecución 10:	Cumplido	13	0,9988	0,1 %	Cumplido	100 %	100 %, 100 %, 100 %, 100 %

[0082] La Figura 1 es un gráfico que muestra cromatogramas superpuestos de blanco, una muestra de comprimido reciente, una solución patrón y una solución de muestra de prueba (DAG es dianhidrogalactitol y DBD es dibromodulcitol). En la Figura 1, no se observan picos de interferencia destacados en los tiempos de retención del pico de DAG, DBD y dulcitol, de manera que se establece claramente la resolución de estas sustancias. Los tiempos de retención del pico de DAG en la muestra y la solución patrón están dentro del  $\pm 5$  %.

[0083] La Figura 5 es un gráfico que muestra las impurezas en una solución de muestra. Las impurezas, además de dulcitol, incluyen impurezas en tiempos de retención relativos (RRTs) de 0,48, 0,51, 0,56, 0,71, 1,02, 1,07, 1,19, 1,23 y 1,27.

[0084] La Tabla 18, a continuación, muestra los resultados de linealidad para dulcitol.

Tabla 18

Nivel	Concentración real (mg/ml)	Ig (Concentración real)	Área de Pico	Ig (Área de Pico)	Pendiente	Intersección Y	Correlación (r)
0,1 %	0,00797	-2,0985	11663	4,0668	1,7212	7,7258	0,9985
0,5 %	0,03985	-1,3996	236370	5,3736			
1,0 %	0,07970	-1,0985	774592	5,8891			
2,0 %	0,15940	-0,7975	2238583	6,3500			
3,0 %	0,23910	-0,6214	3939708	6,5955			

[0085] La Tabla 19, a continuación, muestra los resultados de precisión para dulcitol.

Tabla 19

Nivel	Réplica	Área de Pico	Recuperación (%)	Promedio de Recuperación (%) (n=3)	RSD % (n=3)
Control	1	0	N/D		
	2	0			
	3	0			
0,5 %	1	253384	117,95	120	2,1
	2	254422	118,22		
	3	270620	122,46		
1,0 %	1	839048	116,78	116	0,9
	2	829611	116,03		
	3	812409	114,65		
3,0 %	1	4021051	95,18	95	0,1
	2	4003232	94,94		
	3	4004851	94,96		

[0086] La Tabla 20, a continuación, muestra los resultados de precisión (capacidad de repetición) para la Ejecución 1.

Tabla 20

Nombre de pico	Contenido (% , #1)	Contenido (% , #2)	Contenido (% , #3)	Contenido (% , #4)	Contenido (% , #5)	Contenido (% , #6)	Contenido promedio (%)	RSD % (n= 6)
RRT 0,48	0,17	0,17	0,17	0,18	0,18	0,18	0,18	2,9
RRT 0,51	0,33	0,34	0,33	0,34	0,34	0,34	0,34	1,1
RRT 0,56	0,27	0,28	0,27	0,28	0,28	0,28	0,28	1,0
RRT 0,71	1,06	1,07	1,07	1,05	1,07	1,06	1,06	0,7
Dulcitol	0,15	0,16	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	2,9
RRT 1,02	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	5,2
RRT 1,07	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	4,0

5

[0087] La Tabla 21, a continuación, muestra los resultados de precisión (capacidad de repetición) para la Ejecución 2.

Tabla 21

Nombre de pico	Contenido (% , #1)	Contenido (% , #2)	Contenido (% , #3)	Contenido (% , #4)	Contenido (% , #5)	Contenido (% , #6)	Contenido promedio (%)	RSD % (n= 6)
RRT 0,48	0,22	0,23	0,22	0,23	0,23	0,23	0,23	1,5
RRT 0,56	0,35	0,34	0,34	0,34	0,35	0,35	0,35	1,8
RRT 0,71	0,67	0,68	0,67	0,68	0,67	0,67	0,67	0,8
Dulcitol	0,20	0,20	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20	1,8
RRT 1,07	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,19	0,21	3,8
RRT 1,19	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	2,8
RRT 1,27	0,12	0,14	0,12	0,11	0,14	0,11	0,12	10,1

10

[0088] La Tabla 22, a continuación, muestra los resultados de precisión (capacidad de repetición) a P-0,5 %.

Tabla 22

Nombre de Pico	Contenido (%)	Contenido promedio (%)	RSD de Contenido (% , n=6)
Dulcitol	0,5796	0,59	0,9
	0,5789		
	0,5878		
	0,5930		
	0,5890		
	0,5859		

15

20

25

[0089] La Tabla 23, a continuación, muestra los resultados de precisión (precisión intermedia) para dulcitol.

30

Tabla 23

Analista	Contenido (%)	Contenido promedio (% , n=12)	RSD de Contenido (% , n=12)
1°	0,5796	0,58	2,1
	0,5789		
	0,5878		
	0,5930		
	0,5890		
	0,5859		
2°	0,5683		
	0,5570		
	0,5716		
	0,5682		
	0,5618		
	0,5597		

[0090] La Tabla 24, a continuación, muestra los resultados de un estudio con variación de temperatura de ELSD.

Tabla 24

Nombre de Muestra	% Contenido 40°C	% Contenido 39°C	% Contenido 41°C	Diferencia Absoluta entre 39°C y 40°C	Diferencia Absoluta entre 41°C y 40°C
RRT0,48	0,1787	0,1704	0,1795	0,01	0,001
RRT0,51	0,3164	0,3113	0,3163	0,01	0,0001
RRT0,56	0,3021	0,2992	0,3096	0,003	0,01
RRT0,71	0,8608	0,8961	0,8724	0,04	0,01
Dulcitol	0,1814	0,1660	0,1789	0,02	0,002
RRT1,02	0,1037	0,0932	0,1044	0,01	0,001
RRT1,07	0,1094	0,1005	0,1197	0,01	0,01

[0091] La Tabla 25, a continuación, muestra los resultados de un estudio con variación de presión de gas de ELSD.

Tabla 25

Nombre de Muestra	% Contenido 2,5 bar	% Contenido 2,6 bar	% Contenido 2,4 bar	Diferencia Absoluta entre 2,6 bar y 2,5 bar	Diferencia Absoluta entre 2,4 bar y 2,5 bar
RRT0,48	0,2041	0,2051	0,2092	0,001	0,01
RRT0,51	0,2511	0,2616	0,2651	0,01	0,01
RRT0,56	0,2626	0,2687	0,2694	0,01	0,01
RRT0,71	0,8570	0,8730	0,8771	0,02	0,02
Dulcitol	0,1591	0,1631	0,1578	0,004	0,001

[0092] La Tabla 26, a continuación, muestra los resultados de estabilidad de solución patrón a 2-8°C para la Ejecución 1.

Tabla 26

Punto de tiempo	Concentración (mg/ml)	Evaluación (%)	Recuperación (vs. Inicial, %)
0h	0,0895	109,233	N/D
2h	0,0894	109,076	100
4h	0,0895	109,164	100
8h	0,0888	108,302	99
25h	0,0894	109,056	100
48h	0,0893	108,947	100

[0093] La Tabla 27, a continuación, muestra los resultados de estabilidad de solución patrón a 2-8 °C para la Ejecución 2.

Tabla 27

Nombre de Muestra	Contenido (%)						Diferencia absoluta (%)				
	0 h	2 h	4 h	8 h	25 h	48 h	2 h	4 h	8 h	25 h	48 h
RRT 0,48	0,15	0,16	0,15	0,16	0,18	0,17	0,01	0,004	0,01	0,03	0,02
RRT 0,51	0,32	0,32	0,32	0,31	0,33	0,33	0,002	0,01	0,01	0,01	0,01
RRT 0,56	0,37	0,36	0,36	0,36	0,38	0,38	0,01	0,004	0,01	0,02	0,01
Dulcitol	0,19	0,19	0,20	0,19	0,21	0,20	0,001	0,01	0,003	0,02	0,01
RRT 1,02	0,12	0,11	0,12	0,11	0,13	0,12	0,004	0,01	0,01	0,01	0,01
RRT 1,07	0,15	0,14	0,13	0,13	0,16	0,14	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01
RRT 1,19	0,11	0,10	0,10	0,10	0,11	0,09	0,002	0,01	0,004	0,01	0,01
RRT 1,27	0,08	0,09	0,07	0,08	0,08	0,08	0,004	0,01	0,002	0,002	0,004
Nombre de Muestra	Contenido (%)						Porcentaje Vs. Inicial (%)				
	0 h	2 h	4 h	8 h	25 h	48 h	2 h	4 h	8 h	25 h	48 h
RRT 0,71	1,24	1,24	1,22	1,22	1,24	1,21	100	98	98	100	98

[0094] La Tabla 28, a continuación, muestra los resultados de estabilidad de solución patrón en condiciones ambientales de laboratorio para la Ejecución 1.

Tabla 28

Punto de tiempo	Concentración (mg/ml)	Evaluación (%)	Recuperación (vs. Inicial, %)
0h	0,0898	109,944	N/D
2h	0,0897	109,778	100
4h	0,0891	109,059	99
8h	0,0887	108,590	99
25h	0,0903	110,553	101
48h	0,0891	108,986	99

[0095] La Tabla 29, a continuación, muestra los resultados de estabilidad de solución patrón en condiciones ambientales de laboratorio para la Ejecución 2.

Tabla 29

Nombre de muestra	Contenido (%)						Diferencia absoluta (%)				
	0 h	2 h	4 h	8 h	27 h	52 h	2 h	4 h	8 h	27 h	52 h
RRT 0,48	0,15	0,16	0,17	0,18	0,25	0,29	0,002	0,01	0,02	0,1	0,1
RRT 0,51	0,32	0,31	0,32	0,32	0,34	0,32	0,01	0,001	0,002	0,02	0,005
RRT 0,56	0,36	0,35	0,37	0,36	0,37	0,36	0,01	0,01	0,0004	0,01	0,001
Dulcitol	0,23	0,24	0,24	0,25	0,25	0,24	0,004	0,01	0,01	0,02	0,01
RRT 1,02	0,11	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13	0,01	0,01	0,003	0,02	0,01
RRT 1,07	0,15	0,14	0,14	0,15	0,18	0,15	0,002	0,01	0,0005	0,03	0,001
RRT 1,19	0,10	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,01	0,01	0,01	0,001	0,01
RRT 1,22-1,23	0,08	0,09	0,08	0,07	0,09	0,08	0,01	0,003	0,01	0,01	0,0004
RRT 1,27	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10	0,09	0,002	0,01	0,0003	0,003	0,01
Nombre de muestra	Contenido (%)						Diferencia absoluta (%)				
	0 h	2 h	4 h	8 h	27 h	52 h	2 h	4 h	8 h	27 h	52 h
RRT 0,71	1,10	1,13	1,11	1,12	1,13	1,12	103	101	102	103	102

5 **[0096]** Los siguientes criterios de aceptación se estableció para los procedimientos analíticos.

Criterios de Aceptación para la Idoneidad del Sistema/Parámetros Cromatográficos

10 **[0097]** Estos criterios de aceptación son para los parámetros de especificidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y robustez. Para el blanco (disolvente), el sistema tiene que estar limpio y estable y no se debe observarse ningún pico de interferencia en los cromatogramas del blanco en el tiempo de retención de dulcitol. Si existe cualquier interferencia, la interferencia no debería ser más que el pico de dulcitol en la solución de sensibilidad. Para la solución de sensibilidad, la relación señal/ruido (S/R) del pico de dulcitol en la solución de sensibilidad no debe ser inferior a 10. Para la correlación (r), la correlación de la curva de calibración logarítmica para L-0,2 %, L-1 % y L-5 % #1 (primera inyección) no debe ser inferior a 0,980. Para la solución patrón, la desviación estándar relativa (RSD) de Lg (área de pico) de dulcitol para las primeras cinco inyecciones iniciales de STD#1 (L-5 % #1) debe ser  $\leq 5\%$ . El factor de cola del pico de dulcitol en la primera inyección de STD#1 (L-5 % # 1) debe ser  $\leq 2,0$ . La recuperación de STD#2 (L-5 % #2) debe estar dentro de 95 %-105 %. Para agrupar las soluciones patrón, la relación entre el Lg (área de pico) de la inyección de agrupación y el Lg promedio (área de pico) de las primeras cinco inyecciones de STD#1 (L-5 % #1) debe estar dentro de 95 %-105 %.

25 **[0098]** Estos criterios de aceptación son para los parámetros de linealidad, intervalo, precisión (capacidad de repetición e intermedio), precisión y estabilidad de solución. Para el blanco (disolvente), el sistema tiene que estar limpio y estable y no se debe observar ningún pico de interferencia en los cromatogramas de blanco en el tiempo de retención de dulcitol. Si existe cualquier interferencia, la interferencia no debería ser más que el pico de dulcitol en la solución de sensibilidad. Para la solución de sensibilidad, la relación señal/ruido (S/R) del pico de dulcitol en la solución de sensibilidad no debe ser inferior a 10. Para la correlación (r), la correlación de la curva de calibración logarítmica para L-0,2 %, L-1 % y L-3 % #1 (primera inyección) no debe ser inferior a 0,980. Para la solución patrón, la RSD de Lg (área de pico) de dulcitol para las primeras cinco inyecciones iniciales de STD#1 (L-3 % #1) debe ser  $\leq 5\%$ . El factor de cola del pico de dulcitol en la primera inyección de STD#1 (L-3 % #1) debe ser  $\leq 2,0$ . La recuperación de STD#2 (L-3 % #2) debe estar dentro de 95 %-105 %. Para agrupar las soluciones patrón, la relación entre el Lg (área de pico) de inyección de agrupación y el Lg promedio (área de pico) de las primeras cinco inyecciones de STD#1 (L-5 % #1) debe estar dentro de 95 %-105 %.

35 **[0099]** Para la especificidad, no deberían observarse picos de interferencia destacables en el tiempo de retención del pico de DAG, DBD y dulcitol en el cromatograma con disolvente. Si existe cualquier pico de interferencia, la interferencia con el DAG debería ser no más que el pico de dulcitol en la solución de sensibilidad. Los tiempos de retención del pico de DAG en la muestra y la solución patrón son esencialmente los mismos (dentro de  $\pm 5\%$ ).

40 **[0100]** Para el límite de detección (LOD), la relación de señal/ruido (S/R) no debe ser inferior a 3.

**[0101]** Para el límite de cuantificación (LOQ), la relación de señal/ruido (S/R) no debe ser inferior a 10.

**[0102]** Para linealidad e intervalo, el coeficiente de correlación (r) debe ser no inferior a 0,980.

**[0103]** Para precisión, la recuperación media (n = 3) para cada nivel debe estar dentro de 80 %-120 %.

**[0104]** Para precisión y capacidad de repetición, en niveles del 0,5 % y superiores, la desviación estándar relativa debería ser  $\leq 20$  %.

**[0105]** Para una precisión intermedia, el % de RSD combinado debería ser  $\leq 20$  %.

**[0106]** Para robustez, la diferencia absoluta no debe ser más del 0,2 % para una impureza de  $\leq 1,0$  %. Para una impureza de  $> 1,0$  %, la diferencia relativa se debe controlar dentro de  $\pm 20$  %. No deberían observarse nuevas impurezas. Estos criterios de robustez se aplican a variaciones de la presión de gas de ELSD y la temperatura de ELSD.

**[0107]** Para estabilidad de la solución, la recuperación de las soluciones envejecidas debería estar dentro de 85 %-115 % del ensayo inicial. Para la muestra, la diferencia absoluta no debe ser más del 0,2 % para una impureza de  $\leq 1,0$  %. Para una impureza de  $> 1,0$  %, el resultado de la solución envejecida debería estar dentro de 80 %-120 % del resultado inicial. No deberían observarse nuevas impurezas  $\geq 0,1$  %.

**[0108]** En condiciones ambientales de laboratorio, se cumplieron todos los criterios de aceptación durante los intervalos de tiempo de hasta 52 horas. En condiciones de enfriamiento (2-8 °C), se cumplieron todos los criterios de aceptación durante los intervalos de tiempo de hasta 48 horas.

#### Conclusión

**[0109]** El sistema y el procedimiento analíticos descritos en este ejemplo cumplen todos los criterios para sensibilidad, precisión, robustez, estabilidad y relación señal/ruido, incluyendo la relación señal/ruido en el límite de detección. Por consiguiente, este sistema y procedimiento analíticos son útiles para el análisis de dianhidrogalactitol e impurezas encontrados en las preparaciones de dianhidrogalactitol, que incluyen dulcitol, dibromodulcitol y otras impurezas.

**[0110]** Los procedimientos de acuerdo con la presente invención poseen relevancia industrial para el análisis de preparaciones de dianhidrogalactitol y la determinación y la cuantificación de impurezas en las preparaciones de dianhidrogalactitol.

**[0111]** Con respecto a los intervalos de valores, la presente invención abarca cada valor intermedio entre los límites superior e inferior del intervalo hasta al menos un décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, la presente invención abarca cualquier otro valor intermedio indicado e intervalos que incluyen cualquiera de los dos o ambos de los límites superior e inferior, a menos que se excluya específicamente del intervalo expresado.

**[0112]** A menos que se defina de otro modo, los significados de todos los términos técnicos o científicos que se usan en el presente documento son aquellos que se entienden comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Un experto en la materia también entenderá que cualquier procedimiento y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento se puede usar para poner en práctica o probar la presente invención.

**[0113]** Las publicaciones y las patentes analizadas en el presente documento se proporcionan solamente para su divulgación anterior a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento se debe interpretar como una admisión que la presente invención no está autorizada para preceder dicha publicación debido a una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes a las fechas de publicación reales que deben confirmarse de manera independiente.

**[0114]** En la medida en que cualquier publicación descrita en el presente documento se refiere a información por publicar, los solicitantes no admiten que tal información que se publique después de la fecha de presentación de esta solicitud sea técnica anterior.

**[0115]** Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular pueden incluir las formas en plural. Por ejemplo, los términos "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Adicionalmente, el término "al menos" que precede una serie de elementos se debe entender que se refiere a cada elemento en la serie. Las invenciones que de manera ilustrativa se describen en el presente documento se pueden poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no divulgadas de manera específica en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. deberán leerse ampliamente y sin limitación.

Adicionalmente, los términos y las expresiones empleadas en el presente documento se han usado como términos de descripción y no de limitación, y no existe ninguna intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir algún equivalente del futuro mostrado y descrito o cualquier parte de los mismos, y se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la presente invención reivindicada. Por lo tanto, se debe entender que aunque la presente invención se ha dado a conocer de manera específica mediante realizaciones preferidas y características opcionales, expertos en la materia pueden recurrir a modificaciones y variaciones de las invenciones que se dan a conocer en el presente documento y que tales modificaciones y variaciones se considera que están dentro del alcance de las invenciones que se dan a conocer en el presente documento. Las presentes invenciones se han descrito de manera amplia y genérica en el presente documento. Cada una de las especies más limitadas y agrupaciones subgenéricas que se encuentran dentro del alcance de la divulgación genérica también forma parte de estas invenciones. Esto incluye la descripción genérica de cada invención con una condición o una limitación negativa que elimina cualquier materia del género, independientemente de si los materiales eliminados se encuentran o no específicamente en ella. Adicionalmente, cuando se describen características o aspectos de una invención en términos del grupo Markush, aquellos expertos en la técnica reconocerán que la presente invención también se describe de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush. También se entiende que la descripción anterior tiene como objetivo ser ilustrativa y no restrictiva. Muchas realizaciones serán evidentes para aquellos expertos en la técnica después de analizar la descripción anterior. Por lo tanto, el alcance de la presente invención debería determinarse no con referencia a la descripción anterior, sino que debería determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento analítico para analizar la presencia y la cantidad de impurezas presentes en una preparación de dianhidrogalactitol que comprende las etapas de:
- 5 (a) analizar una preparación de dianhidrogalactitol sometiendo la preparación a cromatografía líquida de alto rendimiento utilizando una columna de amida de fase inversa utilizando química de amidas en un modo de interacción hidrofílica y tecnología híbrida con puente de etileno (BEH) con elución con un gradiente de fase móvil, donde una primera fase móvil es 100 % acetonitrilo y una segunda fase móvil es 100 % agua para separar dianhidrogalactitol de dulcitol y otros contaminantes de la preparación; y
- 10 (b) determinar la concentración relativa de uno o más picos resueltos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento que representan compuestos diferentes al propio dianhidrogalactitol.
2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento detecta y cuantifica al menos uno de: (1) dulcitol; (2) dibromodulcitol; (3) una impureza distinta a dulcitol; y (4) un producto de degradación de dianhidrogalactitol.
- 15 3. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el caudal es de aproximadamente 0,72 ml/min a aproximadamente 0,88 ml/min.
4. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el esquema para la elución es (1) 0,00 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo; 10 % de 100 % de agua; (2) 3,00 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo; 10 % de 100 % de agua; (3) 20,00 minutos, 75 % de 100 % de acetonitrilo, 25 % de 100 % de agua; (4) 25,00 minutos, 50 % de 100 % de acetonitrilo, 50 % de 100 % de agua; (5) 30,00 minutos, 50 % de 100 % de acetonitrilo, 50 % de 100 % de agua; (6) 30,10 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo, 10 % de 100 % de agua; y (7) 40,00 minutos, 90 % de 100 % de acetonitrilo, 10 % de 100 % de agua.
- 20 25 5. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el volumen de inyección es de aproximadamente 15 µl a aproximadamente 35 µl.
6. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de columna es de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 32 °C.
- 30 7. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura del inyector es de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 22 °C.
- 35 8. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que la detección se realiza mediante dispersión de luz evaporativa (ELSD).
9. Procedimiento de la reivindicación 8, en el que la detección por dispersión de luz evaporativa comprende la adición posterior a la columna de un disolvente volátil para aumentar la evaporación de la fracción acuosa de cualquier fase móvil presente.
- 40 10. Procedimiento de la reivindicación 9, en el que el disolvente volátil se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol y acetonitrilo.
- 45 11. Procedimiento de la reivindicación 8, en el que las condiciones de detección por ELSD son una temperatura de aproximadamente 36 °C a aproximadamente 44 °C, una presión de gas de aproximadamente 2,0 bar a aproximadamente 3,0 bar y una ganancia de 7.
- 50 12. Procedimiento de la reivindicación 8, comprende además un espectrómetro de masas en tándem por electrospray conectado al sistema HPLC con ELSD.
13. Procedimiento de la reivindicación 12, en el que la espectrometría de masas en tándem con HPLC proporcionará información de iones moleculares y posibles estructuras químicas que tienen un peso molecular consistente con la información de iones moleculares para cada una de las impurezas y los productos de degradación observados.
- 55 14. Procedimiento de la reivindicación 12, en el que al menos una impureza o un producto de degradación se identifica mediante separación por cromatografía de columna seguido de al menos un proceso de purificación para producir una muestra sólida desconocida.
- 60 15. Procedimiento analítico de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de realizar un conjunto de HPLC preparativas de al menos un pico de sustancia específica en una preparación de dianhidrogalactitol.

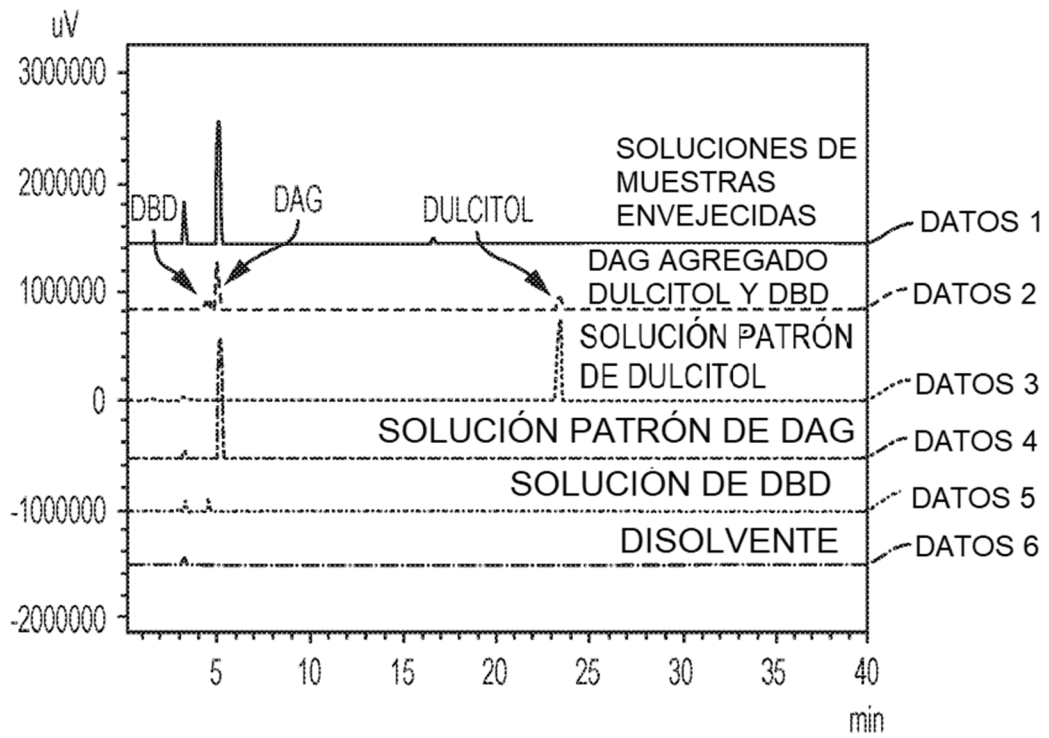


FIG. 1

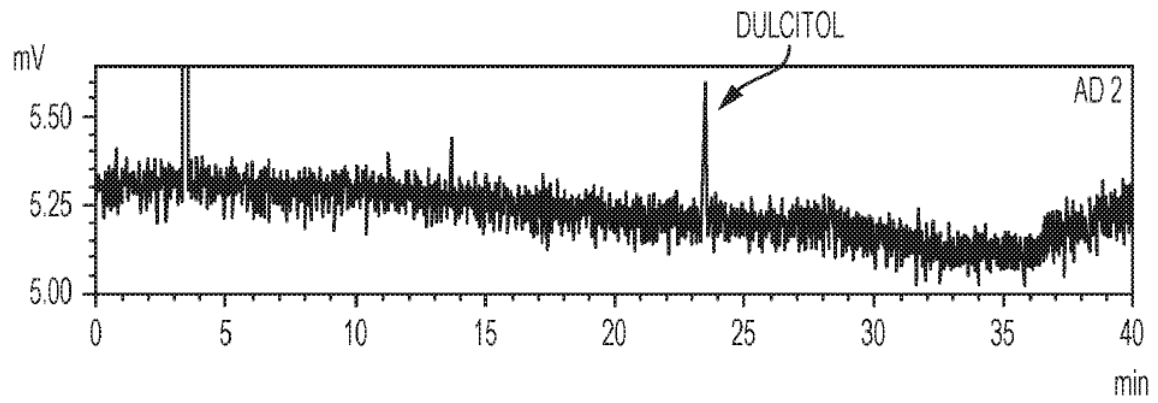


FIG. 2

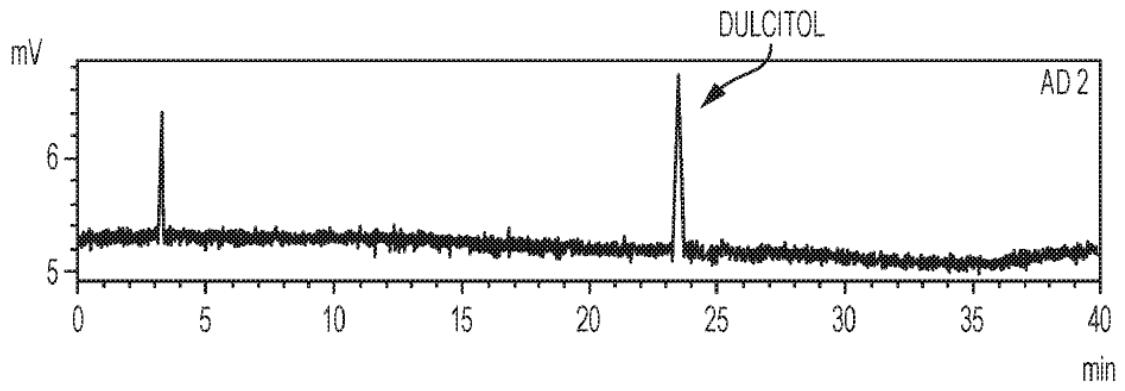


FIG. 3

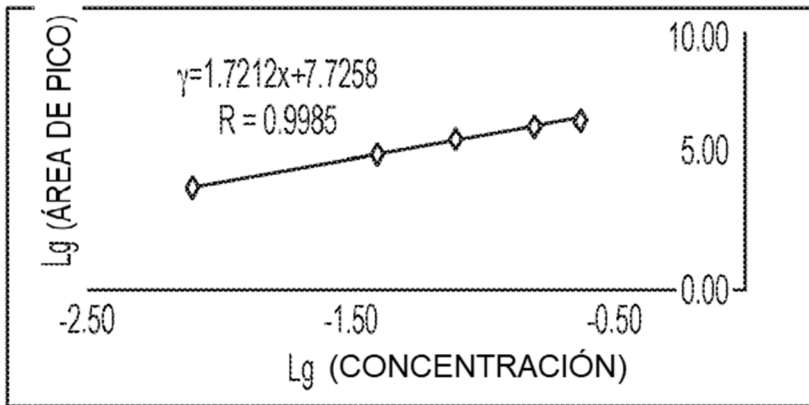


FIG. 4

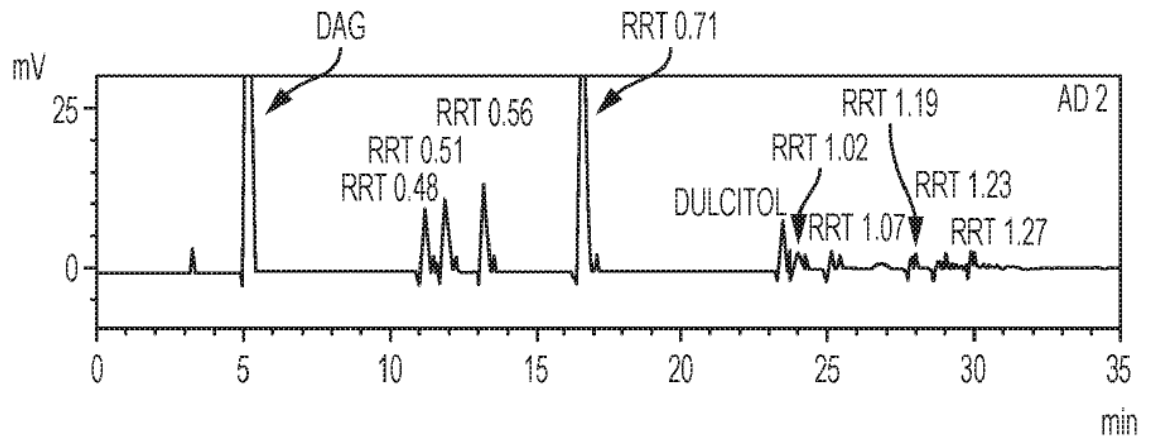


FIG. 5