

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 294**

21 Número de solicitud: 201130204

51 Int. Cl.:

**G01N 33/49** (2006.01)

**C07D 495/04** (2006.01)

**C07C 63/04** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **15.02.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**19.09.2012**

71 Solicitante/s:

**FUNDACIÓN PEDRO BARRIÉ DE LA MAZA  
CONDE DE FENOSA  
Cantón Grande 9  
15003 A Coruña, ES;  
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA y  
Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica  
Hospital Clínico Universitario de Santiago de  
Compostela**

72 Inventor/es:

**Ducati Luchessi, André ;  
Concheiro Guisán, Marta;  
Brión Martínez, María;  
Hiroyuki Hirata, Mario;  
Iñiguez Romo, Andrés y  
Carracedo Álvarez, Angel**

74 Agente/Representante:

**Arias Sanz, Juan**

54 Título: **MÉTODO DE MONITORIZACIÓN DE CLOPIDOGREL Y ÁCIDO ACETILSALICÍLICO**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un método analítico para la detección y cuantificación de clopidogrel, ácido salicílico y SR26334 en plasma mediante cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MS/MS), y su aplicación en medicina, más concretamente en la monitorización de un tratamiento con clopidogrel y ácido acetilsalicílico.

ES 2 387 294 A1

## DESCRIPCIÓN

Método de monitorización de clopidogrel y ácido acetilsalicílico.

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un método analítico para la detección y cuantificación de clopidogrel, ácido salicílico y SR26334 en plasma, y su aplicación en medicina, más concretamente en la monitorización de un tratamiento con clopidogrel y ácido acetilsalicílico.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El clopidogrel y el ácido acetilsalicílico (AAS) son fármacos antiplaquetarios ampliamente utilizados, tanto solos como en combinación, para el tratamiento y/o la prevención de diferentes enfermedades cardiovasculares. Entre estas enfermedades se encuentran la arteriosclerosis y las enfermedades vasculares periféricas (Anand, S. et al., *The New England Journal of Medicine*, 2007, 357(3):217-227), la trombosis (Sofi F et al., *The Pharmacogenomics Journal*, 2010, doi:10.1038/tpj.2010.21), la hemorragia (Wallentin, L. et al., *The Lancet*, 2010, 376(9749):1320-1328), las enfermedades coronarias (Azam, S.M. and Jozic, J., *Translational Research*, 2009, 154(6):309-313; Gurbel, P.A. et al., *Circulation*, 2009, 120(25):2577-2585 y otros; Wiviott, S. D. et al., *The New England Journal of Medicine*, 2007, 357(20):2001-2015), el infarto de miocardio (Mega, J.L. et al., *The Lancet*, 2010, 376(9749):1312-1319) y los accidentes cerebrovasculares (Simon, T. et al., *The New England Journal of Medicine*, 2009, 360(4):363-375).

15 El incumplimiento de los tratamientos por parte de los pacientes ha sido reconocido como una de las principales causas de la falta de respuesta a estos medicamentos (van der Wal et al, *Eur J Heart Fail*, 2005, 7:5-17; Cline et al, *Eur J Heart Fail*, 1999, 1(2):145-149), por lo que resulta conveniente disponer de medios que permitan realizar el seguimiento de los tratamientos y detectar su incumplimiento.

20 El clopidogrel es un profármaco que requiere biotransformación hepática al metabolito activo del clopidogrel (MAC), el cual actúa inhibiendo el receptor adenosina difosfato P2Y<sub>12</sub> (Savi, P. et al, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1994; 72:313-317). En la bibliografía se han divulgado dos métodos de análisis para la determinación del MAC (Delavenne, X. et al., *Journal of Separation Science*, 2010; 33:1968-1972; Takahashi M, et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008; 48:1219-1224). Sin embargo, el MAC es un metabolito muy lábil, que se degrada rápidamente en la sangre después de su recolección (Srinivas, N.R. and Mamidi, R.N., *Biomedical Chromatography*, 2003, 17(5):285-291), por lo tanto se requiere su derivatización en el momento de la recogida de muestras (Takahashi, M. et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008; 48:1219-1224). El clopidogrel, (+)-(S) 2-(2-clorofenil)-2-(6,7-dihidrotieno[3,2-c]piridina-5(4H)-yl)acetato de metilo también se metaboliza a un derivado en forma de ácido carboxílico, el SR26334. Este metabolito SR26334 es inactivo y el compuesto mayoritario en la circulación.

25 En el estado de la técnica se ha descrito el empleo de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem, LC-MS/MS, para el análisis en plasma de clopidogrel (Nirogi R.V.S. et al., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006; 20:1695-1700; Robinson, A. et al., *Journal of Chromatography B*, 2007, 848:344-354; Shin, B.S. and Yoo, S.D., *Biomedical Chromatography*, 2007, 21:883-889), de su metabolito inactivo SR26334 (Ksycinska, H. et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41:533-539) y para el análisis de ambos (Patel, N.K. et al., *Journal of Chromatographic Science*, 2008, 46:867-875; Reddy, R. et al., *Journal of Chromatography B*, 2010, 878:502-508). La mayoría de estos métodos emplea un extracción líquido-líquido (Nirogi et al, 2006; Ksycinska et al, 2006; Robinson et al, 2007; Shin et al, 2007), uno hace uso de una extracción en fase sólida, (Patel et al, 2008), y otro utiliza una extracción en fase sólida en línea (Reddy et al, 2010). Sin embargo, cabe señalar que además de ser procedimientos de extracción caros y de requerir mucho tiempo, ninguno los métodos de monitorización simultánea del clopidogrel y de SR26334 publicados hasta el momento cumplen con los requisitos de la FDA (Food and Drug Administration, 2003) y la EUC (European Union Commission, 2002) para la identificación de compuestos. Estos requisitos son: presencia de dos transiciones por compuesto, y una relación relativa de iones adecuada ( $\pm 20\%$  si la relación es  $>50\%$ ,  $\pm 25\%$  si la relación es 20-50%,  $\pm 30\%$  si la relación es 10-20%, y  $\pm 50\%$  si es  $\leq 10\%$ ).

45 El ácido acetilsalicílico (AAS) inhibe la ciclooxigenasa-1 (Hennekens, C. et al, *Circulation*, 1989; 80:749-756). El AAS se hidroliza rápidamente en el cuerpo, teniendo una vida media en plasma de 20 min, para formar el ácido salicílico (AS), que es el metabolito activo (Reilly I.A. y Fitzgerald G.A., *Drugs*, 1988; 35(2):154-176). Por tanto, al igual que se ha expuesto para el MAC, la determinación de AAS en la práctica clínica habitual entraña ciertas dificultades.

50 El ácido salicílico (AS) ha sido analizado en el plasma por LC-MS/MS, junto con ácido acetilsalicílico (AAS) (Bae, S.K., *Biomedical Chromatography*, 2008, 22:590-595; Xu, X. et al., *Biomedical Chromatography*, 2009, 23:973-979), y junto con otros fármacos (Gonzalez, O. et al., *Journal of Chromatography B*, 2010, 878(28): 2685-2692; Hori, Y. et al., *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29(1):7-13; Simonsen, K.W. et al, *Journal of Analytical Toxicology*, 2010, 35:367-373; Sørensen, L. K., *Forensic Science International*, 2010, doi:10.1016/j.forsciint.2010.07.016). Cuatro de los anteriores autores emplearon un procedimiento de precipitación de proteínas (Bae et al, 2008; Gonzalez et al, 2010;

Sorensen, 2010; Xu et al, 2009), Hori (Hori et al, 2006) usó extracción en fase sólida y Simonsen (Simonsen et al, 2010) extracción líquido-líquido. Sin embargo, todos los métodos mostraron límites de cuantificación muy elevados.

5 A pesar de estos antecedentes, no se ha descrito hasta la fecha ningún método que permita monitorizar de manera simultánea ambos fármacos en plasma ya que el clopidogrel y el AAS (así como sus correspondientes metabolitos) presentan propiedades físico-químicas muy diferentes (básico vs ácido).

10 Por consiguiente, teniendo en cuenta que el uso combinado de clopidogrel con ácido acetilsalicílico es una terapia muy habitual en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades cardiovasculares, existe la necesidad de desarrollar un método de análisis para la detección y cuantificación de clopidogrel y ácido acetilsalicílico simultáneamente, ya sea por sí mismos o a través de sus metabolitos, que pudiera ser utilizado como herramienta para comprobar el correcto seguimiento de la terapia. Además, desde el punto de vista de su potencial aplicación industrial, dicho método preferentemente debería ser sencillo y económico, cumpliendo también con las normativas que regulan la identificación de compuestos.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 Los inventores de la presente invención han desarrollado y validado plenamente un método de análisis eficaz para la determinación simultánea y cuantitativa de clopidogrel, SR26334 y AS en plasma empleando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Este método permite llevar a cabo en un mismo procedimiento analítico la detección y cuantificación de todos los compuestos anteriores, empleando además una única y pequeña muestra de plasma, ahorrándose por lo tanto tiempo y recursos económicos. Así mismo, el método que se describe en esta invención es el primero que cumple con los requisitos de la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y la Comisión de la Unión Europea (CUE) para la identificación simultánea del clopidogrel y del SR26334.

20 Por lo tanto, en un aspecto de la presente invención se proporciona un método analítico para la detección y cuantificación simultánea de clopidogrel, ácido salicílico y SR26334 en plasma, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- 25 a) adición de un patrón interno a una muestra del plasma y separación de las proteínas,  
 b) análisis de la muestra desproteinizada por cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MS/MS), y  
 c) comparación de los datos obtenidos en el análisis anterior con los datos proporcionados por disoluciones de calibración.

30 El método de la presente invención ha sido empleado de manera exitosa para el análisis de 175 muestras de plasma de pacientes tratados con clopidogrel y AAS. Así, en un aspecto adicional la presente invención se relaciona con un método para la monitorización simultánea de clopidogrel y AAS en pacientes tratados con dichos compuestos, que comprende el método de detección y cuantificación descrito anteriormente.

35 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del método de detección y cuantificación de clopidogrel, ácido salicílico y SR26334 en plasma para monitorizar un tratamiento con clopidogrel y AAS.

Estos aspectos y las realizaciones preferidas de los mismos están también definidos en las reivindicaciones.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 La presente invención proporciona una herramienta simple y económica para monitorizar la terapia con clopidogrel y AAS en plasma y así detectar el posible incumplimiento de dicha terapia por los pacientes. Esto es especialmente importante en pacientes fácilmente susceptibles de incumplir el tratamiento como son niños, ancianos o individuos con ciertas deficiencias mentales.

45 Como se ha comentado en los antecedentes, ambos compuestos se metabolizan en el cuerpo: así el clopidogrel se metaboliza al metabolito inactivo SR26334 y por biotransformación hepática al metabolito activo del clopidogrel (MAC), mientras que el AAS se hidroliza rápidamente en el cuerpo para formar el ácido salicílico (AS). De acuerdo a la presente invención, es posible monitorizar clopidogrel y AAS a la vez por medio de la identificación y cuantificación en una única muestra de plasma de los siguientes compuestos: clopidogrel, AS y SR26334.

En particular, el método de la presente invención para la detección y cuantificación simultánea de clopidogrel, ácido salicílico y SR26334 en plasma comprende las siguientes etapas:

- a) adición de un patrón interno a una muestra del plasma y separación de las proteínas,

b) análisis de la muestra desproteínizada por cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MS/MS), y

c) comparación de los datos obtenidos en el análisis anterior con los datos proporcionados por disoluciones de calibración.

5 Una de las ventajas del método de la presente invención es que no requiere grandes cantidades de plasma para ser eficaz. Por un lado, únicamente se precisa una sola muestra, sobre la que es posible seguir ambos fármacos: clopidogrel y ácido acetilsalicílico. Por otro, el tamaño de la muestra es reducido: así, muestras de plasma con un volumen igual o menor de 300 µL, como por ejemplo entre aproximadamente 200 y aproximadamente 300 µL, serían apropiadas. En una realización preferida, la muestra de plasma tiene un volumen de aproximadamente 250 µL.

10 La preparación de la muestra incluye la adición de disolución de patrón interno (IS, *Internal Standard*). Algunos ejemplos de patrones internos, no limitativos, útiles en la presente invención son: glimepiride (Patel, N.K. et al., *Journal of Chromatographic Science*, 2008, 46:867-875), ticlopidina (Reddy, R. et al., *Journal of Chromatography B*, 2010, 878:502-508) para clopidogrel y SR26334; simvastatina (Bae, S.K., *Biomedical Chromatography*, 2008, 22:590-595), pravastatina (Gonzalez, O. et al., *Journal of Chromatography B*, 2010, 878(28): 2685-2692) para AS. En una realización preferida, se emplean como patrones internos diazepam-d<sub>5</sub> (7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona) para clopidogrel y SR26334, y 6-metoxiAS (ácido 6-metoxisalicílico) para AS. En esta invención se entiende que un patrón interno (IS) es una sustancia no contenida en la muestra objeto de análisis, es decir, en el plasma, de propiedades físico-químicas próximas a las del analito(s) que ha de identificarse en el análisis y que se añade a cada muestra y disolución de calibración. Las disoluciones de patrón interno son muestras de concentraciones conocidas y se emplean para la elaboración de una curva de calibrado que relacione el cociente entre el área del pico cromatográfico del analito y el área del pico del patrón interno, frente a las concentraciones del analito en la matriz.

20 La separación de las proteínas de la muestra (desproteínización) se puede realizar en principio por cualquier método convencional conocido por el experto en la materia, empleando como disolvente, por ejemplo, metanol (Gu, G.Z. et al., *Journal of Chromatography B*, 2010, doi:10.1016/j.jchromb.2010.12.034) o acetonitrilo (Delavenne, X. et al., *Journal of Separation Science*, 2010; 33:1968-1972). Tal como el experto en la materia apreciará, la adición de un patrón interno a la muestra se debe realizar antes de la separación de las proteínas. Por su simplicidad y bajo coste, de manera preferente, dicha separación incluye la precipitación de las proteínas de la muestra. De hecho, la precipitación de proteínas es especialmente adecuada para el análisis de alto rendimiento ("high-throughput"). Un procedimiento particular de precipitación comprende las siguientes etapas:

30 i. añadir un disolvente orgánico (o mezcla de disolventes) a la muestra de plasma: entre los ejemplos de disolventes adecuados se incluyen, sin limitación, metanol o acetonitrilo, siendo acetonitrilo particularmente preferido. Para favorecer la precipitación resulta conveniente que el disolvente esté frío, a una temperatura inferior a 0° C, pero superior al punto de congelación del disolvente, preferiblemente a aproximadamente -10 °C. A modo ilustrativo, cuando se usa acetonitrilo, éste se enfría previamente en un congelador a -10°C. Como el experto en la materia entenderá, la cantidad de disolvente a añadir dependerá del disolvente elegido; por ejemplo, para un tamaño de muestra de plasma típico (aproximadamente 250 µL), aproximadamente 1 mL de acetonitrilo proporciona una buena precipitación.

35 ii. agitar la mezcla anterior: este paso se lleva a cabo preferentemente con algún dispositivo agitador simple de laboratorio, como por ejemplo un agitador tipo vórtex o mezclador de vórtice.

40 iii. centrifugar la muestra: a modo de ejemplo, velocidades de en torno a 14.000-15.000 rpm proporcionan una buena separación del precipitado y el sobrenadante en poco tiempo. Así, aproximadamente 10 min de centrifugación a una velocidad de aproximadamente 14.500 rpm (12x4g) (g, campo gravitacional) son suficientes para una muestra típica.

iv. separar el sobrenadante del precipitado.

45 El sobrenadante anterior (muestra de plasma con patrón interno y desproteínizada) debe prepararse para poder ser analizado por cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MS/MS). Este paso es común para el experto en la materia y habitualmente implica el secado de una parte del sobrenadante (por ejemplo, con una corriente de gas, e.g. nitrógeno o helio) y la reconstitución con una pequeña cantidad de la fase móvil (e.g. 50 – 150 µL) del análisis cromatográfico. Por ejemplo, para las condiciones del análisis descritas a continuación, la reconstitución se puede realizar con una mezcla de (A) 0,1% de ácido fórmico en agua y (B) 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo, en una relación 80:20.

50 De la muestra reconstituida se toma una pequeña alícuota para ser inyectada en la columna analítica y ser analizada por LC-MS/MS. La separación cromatográfica se puede realizar con una columna de fase reversa C-18, sometida al procedimiento de "end-capping", de medidas 50 x 2,1 mm, 100 x 2,1 mm o 150 x 2,1 mm. La temperatura de la columna puede oscilar entre 20-35°C. La fase móvil está formada por ácido fórmico entre 0,01% y 0,1% en agua (A) y ácido fórmico entre 0,01% y 0,1% en acetonitrilo (B), siempre y cuando el porcentaje de ácido fórmico en la fase acuosa y en

## ES 2 387 294 A1

la fase orgánica sea el mismo. La velocidad de flujo puede estar comprendida entre 0,1 y 0,4 mL/min. El gradiente puede comenzar con una mezcla inicial con un porcentaje de disolvente acuoso mayor del 50% que pasa a una mezcla final con un porcentaje de disolvente orgánico mayor del 50%, para finalmente volver a las condiciones iniciales que se emplean además para acondicionar la columna. En una realización particular, las condiciones del análisis por cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MS/MS) son:

- 5
- HPLC:
  - Columna: Atlantis T3 3 µm 100 x 2,1 mm (Waters, Milford, MA, USA) a 25 °C
  - Fase móvil: ácido fórmico en agua 0,1% (A) + ácido fórmico en acetonitrilo 0,1% (B)
  - Velocidad de flujo: 0,2 mL/min
- 10
- Gradiente: la mezcla inicial (80% A, 20% B) se incrementó a 100% B en 5 min. El 100% B se mantuvo durante 4 minutos, y se regresó a las condiciones iniciales, 80% A, 20% B, durante 1 minuto, seguido de un equilibrado de 4 minutos en estas mismas condiciones, llegando a un tiempo de ejecución total de 14 minutos.
  - MS:
  - Voltaje capilar: 3kV
- 15
- Temperatura de la fuente: 100 °C
  - Gas de solvatación: nitrógeno a 300 °C suministrado a 700 L/h, y el
  - Gas del cono: 300 L/h.
  - Presión en la célula de colisión:  $3 \times 10^{-6}$  bar de argón.

- 20
- Los datos pueden ser grabados en el modo MRM ("Multiple Reaction Monitoring"). El modo de ionización, las transiciones de MRM, la tensión de cono y la energía de colisión seleccionadas para clopidogrel, AS, SR26334 y las disoluciones estándar de diazepam-d<sub>5</sub> y 6-metoxiAS, así como los tiempos de retención obtenidos de acuerdo a las condiciones de análisis anteriores se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Función	Analito	Transición	Cono (V)	Energía de colisión (V)	Tiempo de retención (min)	IS
Función 1: ESI +	SR26334	308.2>152.2	25	25	5.0	diazepam-d <sub>5</sub>
		<b>308.2&gt;198.3</b>	25	17		
Función 2: ESI -	AS	137.0>64.8	26	26	6.1	6-metoxiAS
	6-metoxiAS	<b>137.0&gt;93.0</b>	26	15	6.3	
Función 3: ESI +	Diazepam-d <sub>5</sub>	167.0>123.1	14	10	7.4	
	Clopidogrel	290.2>154.2	40	27	8.0	diazepam-d <sub>5</sub>
		<b>322.3&gt;184.2</b>	25	23		
		<b>322.2&gt;212.3</b>	25	15		

- 25
- Finalmente, se reproduce el análisis LC-MS/MS con disoluciones de calibración para cuantificar clopidogrel, AS y SR26334, con un método validado (véase Ejemplos).

El método descrito anteriormente constituye un método sensible, específico, reproducible y confiable para el análisis cuantitativo y simultáneo de clopidogrel, SR26334 y AS, que se puede utilizar de manera ventajosa para evaluar el correcto seguimiento de una terapia con clopidogrel y AAS.

La eficacia del método se ha puesto de manifiesto en el análisis de un elevado número de muestras de plasma de pacientes bajo terapia de combinación de clopidogrel y AAS (véase ejemplos). Además, a diferencia de los métodos descritos en el estado de la técnica, el método de la invención cumple con los requisitos de la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y la Comisión de la Unión Europea (CUE) para la identificación simultánea del clopidogrel y del SR26334.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” significa una ligera variación del valor especificado, preferiblemente dentro del 10 por ciento del valor especificado. No obstante, el término “aproximadamente” puede significar una mayor tolerancia de variación dependiendo de, por ejemplo, la técnica experimental usada. El experto entiende dichas variaciones de un valor especificado y éstas se encuentran dentro del contexto de la presente invención. Además, para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas facilitadas en el presente documento no van calificadas con el término “aproximadamente”. Se entiende que, se use o no de manera explícita el término “aproximadamente”, cada cantidad dada en el presente documento pretende referirse al valor dado real, y también pretende referirse a la aproximación de tal valor dado que se deduciría de manera razonable basándose en la experiencia común en la técnica, incluyendo equivalentes y aproximaciones debidas a las condiciones experimentales y/o de medición para tal valor dado.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar en mayor medida la invención, pero no deberían ser considerados como una definición de los límites de la misma.

## **EJEMPLOS**

### Materiales y aparatos

El clopidogrel y el sólido en polvo de SR26334 se obtuvieron de Galchimia (O Pino, A Coruña, España). El AS se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Las ampollas de diazepam-d<sub>5</sub> de 100 µg/mL se obtuvieron de Cerilliant (Round Rock, Texas, EE.UU.) y el sólido en polvo del ácido 6-metoxisalicílico (6-metoxiAS) se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). El metanol de calidad HPLC y el acetonitrilo de calidad LC-MS fueron obtenidos de Panreac (Barcelona, España). El ácido fórmico (99%) fue obtenido de Scharlau (Sentmenat, España). El agua utilizada fue purificada utilizando un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Le Mont-sur-Lausanne, Suiza). Las muestras de plasma humano libre de fármacos (plasma-blanco), se obtuvieron de un banco de sangre local (Centro de Transfusión de Galicia, Santiago de Compostela, España).

El sistema HPLC empleado fue un módulo de separación Waters Alliance 2795 con una columna con sistema de calefacción/refrigeración de la serie Waters Alliance (Waters, Milford, MA, EE.UU.). La detección se realizó utilizando un espectrómetro de masas Quattro Micro™ de triple cuadrupolo (Waters, Milford, MA, EE.UU.). La adquisición de datos, la integración de los picos y los cálculos fueron asignados en un estación de trabajo que ejecuta los software MassLynx NT 4.1 y QuanLynx 4.1. Se empleó un vórtex de IKA® (Staufen, Alemania) y una centrifuga MiniSpin Plus de Eppendorf (San Sebastián de los Reyes, Madrid, España). La evaporación de disolvente se realizó con un evaporador TurboVap LV de Zymark (Hopkinton, Massachusetts, EE.UU.).

### Disoluciones de trabajo y patrón interno

En primer lugar, se prepararon disoluciones madre de concentración 1 mg/mL en metanol a partir de los compuestos sólidos clopidogrel, ácido salicílico y SR26334. También se prepararon las siguientes disoluciones madre para los patrones internos: 100 µg/mL de diazepam-d<sub>5</sub> y 1 mg/mL de 6-metoxiAS.

De cara a obtener una curva de calibración, se prepararon diferentes disoluciones de trabajo (o disoluciones estándar) a 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 µg/mL para cada uno de los compuestos clopidogrel, SR26334 y AS por dilución apropiada en metanol de las disoluciones madre. Así mismo, se preparó una disolución de patrones internos de 0,1 µg/mL de diazepam-d<sub>5</sub> y 1 µg/mL de 6-metoxiAS por dilución de sus respectivas disoluciones madre.

### Muestras de calibración y de control de calidad

Además se prepararon disoluciones de calibración (“calibradores”) añadiendo a 25 µL o 50 µL de la correspondiente disolución de trabajo y 25 µL de una disolución de los patrones internos (0,1 µg/mL diazepam-d<sub>5</sub> y 1 µg/mL 6-metoxiAS) a 250 µL de plasma-blanco. En la siguiente tabla se muestra, de manera general, el volumen de disolución de trabajo empleado ( $V_{stock}$ ), su concentración, ( $[conc.]_{stock}$ ), el volumen final de la disolución ( $V_{final}$ ), la concentración final ( $[conc.]_{final}$ ) obtenida y la cantidad de analito en la disolución.

$V_{stock}$ (µL)	50	25	25	50	25	25	25	25	50
$[conc.]_{stock}$ (µg/mL)	0,01	0,05	0,1	0,1	0,5	1	5	10	10

V <sub>final</sub> (µL)	325	300	300	325	300	300	300	300	325
[conc.] <sub>final</sub> (ng/mL)	1,54	4,17	8,33	15,38	41,67	83,33	416,7	833,3	1538
Cantidad de analito (ng)	0,5	1,25	2,5	5,0	12,5	25	125	250	500

Las concentraciones finales de las disoluciones de calibración obtenidas para cada uno de los analitos se muestran a continuación:

Analitos	Cantidad de analito en las disoluciones de calibración (ng)								
Clopidogrel	0,5	1,25	2,5	5,0	12,5	25	125		
SR26334	0,5	1,25	2,5	5,0	12,5	25	125	250	500
AS	0,5	1,25	2,5	5,0	12,5	25	125	250	500

- 5 Se prepararon muestras de control de calidad de manera semejante a los calibradores, mediante la mezcla de 25 µL de solución de trabajo, 25 µL de la disolución de los patrones internos (IS) y 250 µL de plasma-blanco. En concreto se prepararon dos muestras para cada compuesto con cantidades de analito 1,25 y 25 ng (4,17 y 83,33 ng/mL, respectivamente) para el clopidogrel y 12,5 y 250 ng (41,67 y 833,3 ng/mL respectivamente) para SR26334 y AS.

#### Preparación de la muestra de plasma

- 10 Se añadieron 25 µL de la disolución de los patrones internos (IS) y 1 mL de acetonitrilo a -10 °C a 250 µL de plasma. Después de agitación en un vórtex durante 30 segundos y centrifugar 10 minutos a 14.500 rpm (12x4g), se recogieron 800 µL del sobrenadante. El disolvente de este sobrenadante se evaporó con una corriente de nitrógeno a 35 °C durante 30 min. Para reconstituir la muestra se utilizaron 100 µL de fase móvil, que constaba de (A) 0,1% de ácido fórmico en agua: (B) 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo, en una relación 80:20. Por último, se inyectaron 20 µL de ésta muestra para ser analizada por LC-MS/MS.
- 15

#### Cromatografía Líquida y Espectrometría de Masas

- 20 La separación cromatográfica se realizó con una columna de fase reversa C-18, en particular, con una columna Atlantis T3, 3 µm, 2,1 x 100 mm (Waters, Milford, MA, EE.UU.), a 25 °C. La fase móvil fue suministrada con un flujo de 0,2 mL/min y estaba formada por 0,1% de ácido fórmico en agua (A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B) en gradiente, con una mezcla inicial de 80% A y 20% B que se incrementó a 100% de B en 5 minutos. El 100% B se mantuvo durante 4 minutos, y se regresó a las condiciones iniciales, 80% A, 20% B, durante 1 minuto, seguido de un equilibrado de 4 minutos llegando a un tiempo de ejecución total de 14 minutos.

- 25 Los mejores resultados del análisis por espectrometría de masas se obtuvieron con voltaje capilar de 3kV, una temperatura de la fuente de 100 °C, nitrógeno como gas de desolvatación a 300 °C suministrado a 700 L/h, y el gas del cono a 300 L/h. La presión en la célula de colisión fue de  $3 \times 10^{-6}$  bares de Argón. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 1 anterior.

#### Validación: Resultados

- Para validar el método se emplearon muestras de plasma-blanco, es decir, muestras de plasma libre de fármacos de individuos que no están recibiendo el tratamiento de clopidogrel y AAS.
- 30 Los parámetros de validación incluyeron linealidad, límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC), la imprecisión, la recuperación, la eficacia de la extracción, el efecto de la matriz, la eficacia del proceso, la integridad de la dilución, y estudios de estabilidad.

- 35 La "linealidad" es el rango de masa ó concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin una desviación arbitraria. El significado práctico de la linealidad del detector es que indica la concentración para la cual el detector es confiable. Hay dos límites en la curva de linealidad:

- El límite de concentración inferior, que es dado por el límite de cuantificación (LDC) y,

- El límite de concentración superior, definido por un porcentaje de desviación arbitrario de la curva de linealidad, normalmente se toma un 5% de desviación.

5 La linealidad se determinó mediante regresión por mínimos cuadrados con una ponderación de  $1/x^2$ . Se consideró una linealidad aceptable cuando el coeficiente de determinación fue de al menos 0,9 y las disoluciones de calibración cuantificaron dentro del  $\pm 20\%$  del LDC y  $\pm 15\%$  en otras concentraciones. Los LDD y los LDC fueron evaluados con concentraciones decrecientes de analito en el plasma-blanco fortificado con los compuestos clopidogrel, ácido salicílico y SR26334 antes de la precipitación de las proteínas.

10 En general, el límite de detección (LDD) es la menor cantidad de una sustancia que puede distinguirse o diferenciarse de la ausencia de esa sustancia. En esta invención, el LDD se definió como la concentración más baja con una cromatografía aceptable, es decir, en la que todos los iones del determinado compuesto están presentes con una relación señal/ruido de al menos 3:1, y un tiempo de retención (TR) de  $\pm 0,2$  min del TR promedio del analito en las disoluciones de calibración.

15 En general, el límite de cuantificación (LDC) es la mínima concentración de una sustancia que puede ser identificado y medido cuantitativamente en una muestra utilizando un método analítico que haya sido validado con una exactitud y precisión especificadas. El LDC en esta invención fue la concentración más baja que cumplió los criterios del LDD y una relación señal/ruido de al menos 10:1, con una imprecisión inferior al 20%, y una recuperación analítica entre 80-120%.

20 En las condiciones descritas, no se observaron interferencias con ningún compuesto endógeno extraíble del plasma (n = 10). La linealidad de la relación del área de los picos del analito y de los patrones internos frente a la concentración teórica fue verificada en el plasma con la regresión lineal ponderada  $1/x^2$  de 1,54 a 416,7 ng/mL para el clopidogrel (7 puntos de calibración), de 1,54 a 1538 ng/mL para SR26334 (9 puntos de calibración) y de 15,38 a 1538 ng/mL para el AS (6 puntos de calibración). La curvatura probada en un conjunto de cuatro curvas de calibración aportó unos coeficientes de determinación ( $r^2$ ) por encima de 0,98 (Clopidogrel, ordenada en el origen=  $2,3040 \pm 0,5299$ , pendiente=  $2,7037 \pm 0,5374$ ,  $r^2 = 0,9923 \pm 0,0019$ ; SR26334, ordenada en el origen=  $0,9044 \pm 0,1880$ , pendiente=  $1,1651 \pm 0,1285$ ,  $r^2 = 0,9838 \pm 0,0028$ ; AS, ordenada en el origen=  $10,5486 \pm 6,2235$ , pendiente=  $0,7723 \pm 0,1151$ ,  $r^2 = 0,9818 \pm 0,0174$ ), con los residuos dentro del  $\pm 20\%$  en el límite de cuantificación y entre  $\pm 15\%$  a otras concentraciones de las disoluciones de calibración. El límite de detección fue de 0,42 ng/mL para clopidogrel y SR26334, y 8,33 ng/mL para el AS. El límite de cuantificación fue de 1,54 ng/mL para clopidogrel y SR26334, y 15,38 ng/mL para el AS.

Estos resultados son mucho mejores que los reportados en el estado de la técnica, tal como se aprecia en la siguiente tabla:

30

Tabla 2

LDC	Clopidogrel (ng/mL)	SR26334 (ng/mL)	SA (ng/mL)
Presente invención	1,54	1,54	15,38
Nirogi et al, 2006	0,005		-----
Patel et al, 2008	0,25	50	
Reddy et al, 2010	0,1	70	
Robinson et al, 2007	0,01		
Shin et al, 2007	0,01		
Ksycinska et al, 2006		20	
Bae et al, 2008			
Gonzalez et al, 2010			
Hori et al, 2006	-----		
Simonsen et al, 2010			
Sorensen, 2010			

La imprecisión y la recuperación de análisis se determinaron en dos concentraciones (concentraciones de las disoluciones de control de calidad) mediante el análisis de 5 repeticiones cada día en 4 días diferentes (n = 20). La

5 imprecisión, que es como se suele expresar la precisión (grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas y predeterminadas), se expresa como el tanto por ciento de la desviación estándar relativa (RSD%, *Relative Standard Deviation*) de los valores medidos y se espera que sea inferior al 15%. Cuanto mayor es la desviación estándar (SD) menor es la precisión, es decir, mayor es la imprecisión. Las directrices dadas por Krouwer y Rabinowitz (Krouwer, J.S. and Rabinowitz, R., *Clinical Chemistry*, 1984, 30: 290-292) se han seguido para el cálculo del agrupamiento de las imprecisiones en los ensayos realizados en el mismo día (intra-día), en días distintos (inter-día), y la imprecisión total. La recuperación analítica se define como el porcentaje de la concentración real de una sustancia añadida a la muestra, recuperado durante el procedimiento analítico. En esta invención la recuperación analítica se consideró aceptable si el porcentaje de la recuperación se encontraba entre el 85 y 115% de la concentración objetivo (n= 20).

10 La imprecisión y los resultados de recuperación analítica fueron satisfactorios para todas las concentraciones ensayadas (Tabla 3).

15 La eficacia de extracción para cada analito se midió en muestras (n = 5) de plasma-blanco fortificadas con los analitos a las concentraciones de control de calidad y con la disolución de patrones internos antes y después de la precipitación de proteínas. La eficacia de extracción se calculó como sigue:  $100 \times (\text{área promedio del analito de las muestras fortificadas antes de la precipitación de las proteínas} / \text{área promedio del analito de las muestras fortificadas después de la precipitación de proteínas})$ .

20 El efecto de la matriz se evaluó mediante la comparación de las áreas de los picos del analito en 10 muestras diferentes de plasma-blanco fortificadas después de la precipitación de proteínas con concentraciones de analito de control de calidad y disolución patrón y las áreas de los picos de las muestras preparadas con las mismas concentraciones de analito y patrón interno que las muestras de plasma-blanco fortificadas después de la precipitación de proteínas, pero preparadas en una mezcla 80:20 de la fase móvil A:B. Es decir, el efecto matriz se calculó como sigue:  $100 \times (\text{área promedio de analito añadido postextracción} / \text{área promedio de analito en fase móvil}) - 100$ .

25 La eficacia del proceso examinó el efecto global de la eficacia de la extracción por precipitación de las proteínas y el efecto de la matriz en la cuantificación de los analitos de interés. El tanto por ciento de la eficacia del proceso se expresa como, el área promedio del analito en 5 muestras fortificadas antes de la precipitación de proteínas dividido entre el área promedio del analito en fase móvil, multiplicado por cien.

30 La eficacia de extracción de todos los analitos varió desde 44,8 hasta 61,2%, y la eficacia de los procesos desde 30,0 a 63,6%. El efecto de la matriz varió desde -44,2 a 19,1% con una variación (CV), entre 10 muestras diferentes de plasma, menor de 9,4%. No se detectó efecto de la matriz importante para SR26334 y AS, pero sí para clopidogrel que mostró una supresión de iones de hasta -44,2% (n=10) (Tabla 3).

Para las disoluciones de patrón interno, diazepam-d<sub>5</sub> y 6-methoxiAS, el efecto de la matriz fue de -5,4% (coeficiente de variación, CV 5,2%) y -21,3% (CV 5,6%), respectivamente.

Tabla 3

Analito	Clopidogrel		SR26334		SA	
	4,17	83,33	41,67	833,3	41,67	833,3
Concentración (ng/mL)	4,17	83,33	41,67	833,3	41,67	833,3
Imprecisión (n=20, CV)						
Intra-día	9,3	7,6	7,2	6,0	8,2	5,0
Inter-día	7,4	8,4	2,8	3,9	4,8	5,6
Total	11,9	11,3	7,7	7,1	9,5	7,5
Recuperación (n=20, %)	102,7	102,3	112,7	93,5	113,2	91,8
Eficacia de extracción (n=5, %)	52,8	55,0	44,8	55,1	57,9	61,2
Eficacia del proceso (n=5, %)	30,0	30,7	53,3	53,9	63,6	50,5
Efecto de la matriz (n=10, %) ± CV (%)	-43,2 ±7,9	-44,2 ±9,4	19,1 ±7,7	-2,2 ±6,4	9,8 ±8,9	-17,4 ±4,9

5 La integridad de la dilución, se evaluó mediante la dilución de muestras de 25 µL de plasma blanco (n = 3) de 1538 y 4167 ng/mL de concentración de cada analito con 225 µL de muestra de plasma-blanco, para obtener una dilución 1:10. La disolución de patrones internos se añadió a las muestras diluidas que posteriormente fueron extraídas, por precipitación de las proteínas, como se ha descrito anteriormente. La integridad de la dilución se mantiene cuando las muestras cuantifican dentro del ± 15% de 153,8 y 416,7 ng/mL. En el presente ejemplo, las muestras cuantificaron entre el -13,9% y 9,7% de 153,8 y 416,7 ng/mL, lo que confirma la integridad de la dilución.

10 La estabilidad de los analitos fue evaluada por triplicado para muestras de plasma-blanco fortificadas con los 3 analitos (clopidogrel, ácido salicílico y SR26334) a los dos límites de concentración, alto y bajo (4,17 y 83,33 ng/mL para el clopidogrel y 41,67 y 833,3 ng/mL para SR26334 y AS), de las muestras control de calidad. Estas muestras fueron analizadas tras ser almacenadas a temperatura ambiente (22 °C) durante 24 h, tras ser refrigeradas a 4 °C durante 72 h, y después de 3 ciclos de congelación-descongelación (C/D), es decir, 24 horas de congelado, y posterior descongelación tras mantenerse a temperatura ambiente durante 2h. La estabilidad fue considerada aceptable si las muestras cuantificaban dentro del ± 15% de las concentraciones de las disoluciones de control de calidad.

15 Clopidogrel fue estable después de ser almacenado a temperatura ambiente (22 °C) durante 24 h, en refrigeración a 4 °C durante 72 h, y después de tres ciclos de congelación y descongelación (C/D). Se observó un cierto aumento en las concentraciones de 833,3 ng/mL del SR26334 (25.5-30.1%) en las diferentes condiciones, debido probablemente a la aparición de sustancias interferentes que modifican la ionización del compuesto. Por otro lado, se observaron pérdidas de AS en todas las condiciones de almacenamiento, estando los porcentajes de pérdida entre -42,4% a -19,5%. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.

20 Tabla 4

Analito	Clopidogrel		SR26334		SA	
	Concentración (ng/mL)		41,67	833,3	41,67	833,3
24h, 22°C (% pérdida, n=3)	-1,1	-3,2	12,7	30,1	-32,7	-29,3
72h, 4°C (% pérdida, n=3)	-4,1	-3,5	0,7	27,5	-42,4	-22,8
3 ciclos C/D (% pérdida, n=3)	-0,7	-2,0	9,3	25,5	-27,3	-19,5

25 Aunque estudios previos han documentado la estabilidad del AS durante 24h a temperatura ambiente (Bae et al, 2008; Xu et al, 2009; González et al, 2010), 1 mes a -20 ° C (González et al, 2010), y después de 3 ciclos de congelación y descongelación (Bae et al, 2008; Xu et al, 2009; González et al, 2010). Bae y Xu añadieron KF para inhibir la actividad enzimática.

Criterios de identificación

30 Los criterios de identificación incluyen la obtención de TR de los analitos dentro de ± 0,2 minutos del TR medio del analito en las disoluciones de calibración, la presencia de dos transiciones, y que las intensidades relativas de los iones, en tanto por ciento, calculadas como la relación resultante de dividir el área del pico correspondiente a la transición más abundante entre el área del pico correspondiente a la transición menos abundante sea igual al obtenido para el calibrador teniendo en cuenta las tolerancias recogidas en la siguiente tabla de tolerancias máximas permitidas para intensidades relativas de los iones usando LC-MS/MS establecidas en la Decisión de la Unión Europea, 2002/657/EC (*Official Journal of the European Communities*, 221:8-36).

Tabla 5

Intensidad relativa (% del pico base)	Tolerancia permitida
≥ 50 %	± 20 %
> 20 -50 %	± 25 %
> 10 - 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

35

Estos valores fueron comparados con el promedio de intensidades relativas de los iones de todos los analitos en las disoluciones de calibración.

5 Como se ha comentado previamente, ninguno de los métodos de determinación de clopidogrel y su metabolito, descritos en el estado de la técnica cumplen las regulaciones de la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y la Comisión de la Unión Europea (CUE) para la identificación simultánea del clopidogrel y del SR26334. Estas directrices (FDA, 2003; CUE, 2002) requieren separación cromatográfica, un mínimo de dos transiciones por analito (LC-MSMS) o 3 iones característicos (LCMS), e intensidades de ion relativas aceptables. Un criterio de confirmación debe ser empleado en todos los pasos para poder garantizar la validez de los datos. En el estado de la técnica, se han reportado varios ejemplos de falsos positivos que utilizaban una única transición (Allen KR. *Clin Toxicol (Phila)* 2006; 44:147. Nordgren et al *J Anal Toxicol* 2005; 29:234), poniendo de manifiesto la importancia de seguir las directrices. En un estudio clínico, se conocen los analitos esperados pero no las posibles interferencias. La presencia del ion calificador y la proporción de iones correcta cuantificador/calificador confirman que el compuesto sea correctamente identificado, y que no existe ninguna interferencia que pudiera conducir en una sobre- o subestimación de concentraciones de fármaco. La interferencia con el ion cuantificador pero no con el calificador modificaría la proporción de iones y evitaría la posibilidad de una identificación o cuantificación incorrectas. En los trabajos previamente publicados, únicamente se monitorizaron una transición o un ión. Sin embargo, el método de la presente invención monitoriza de modo ventajoso dos transiciones, pudiendo ser comprobado que las intensidades de ion relativas sean aceptables.

#### Monitorización en pacientes

20 El método anterior fue exitosamente aplicado al análisis de 175 muestras de plasma que se tomaron de pacientes tratados con 75 mg/día de clopidogrel y 100 mg/día de AAS, desde 1 a 24 horas tras la administración. La tabla 6 muestra estos resultados:

Tabla 6

N = 175	Clopidogrel	SR26334	AS
N casos positivos	37	164	134
Media $\pm$ SD(ng/mL)	1,9 $\pm$ 6,1	572,7 $\pm$ 850,9	500,5 $\pm$ 988,8
Mediana (ng/mL)	0	247,6	61,5
Concentración máxima (ng/mL)	46,2	6924	5843
Concentración mínima (ng/mL)	2	19,5	20

## REIVINDICACIONES

1. Método analítico para la detección y cuantificación simultánea de clopidogrel, ácido salicílico (AS) y SR26334 en plasma, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:
  - a) adición de un patrón interno a una muestra del plasma y separación de las proteínas,
  - 5 b) análisis de la muestra desproteinizada por cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MS/MS), y
  - c) comparación de los datos obtenidos en el análisis anterior con los datos proporcionados por disoluciones de calibración.
2. El método según la reivindicación 1 donde las condiciones de separación cromatográfica son:
  - 10 - columna cromatográfica de fase reversa C18, sometida al procedimiento de "end-capping", de medidas 50 x 2,1 mm, 100 x 2,1 mm o 150 x 2,1 mm, a una temperatura que puede oscilar entre 20-35°C,
  - la fase móvil está formada por ácido fórmico entre 0,01% y 0,1% en agua (A) y ácido fórmico entre 0,01% y 0,1% en acetonitrilo (B), siempre y cuando el porcentaje de ácido fórmico en la fase acuosa y en la fase orgánica sea el mismo,
  - 15 - la velocidad de flujo está comprendida entre 0,1 y 0,4 mL/min, y
  - el gradiente comienza con una mezcla inicial con un porcentaje de disolvente acuoso (A) mayor del 50% que pasa a una mezcla final con un porcentaje de disolvente orgánico (B) mayor del 50%, para finalmente volver a las condiciones iniciales que se emplean para acondicionar la columna.
3. El método según la reivindicación 2 donde la columna cromatográfica es una columna Atlantis T3 3 µm 100 x 2,1 mm a 25 °C.
4. El método según las reivindicaciones 2 y 3 donde la fase móvil está formada por ácido fórmico en agua 0,1% (A) + ácido fórmico en acetonitrilo 0,1% (B).
5. El método según las reivindicaciones 2-4 donde velocidad de flujo es 0,2 mL/min.
6. El método según las reivindicaciones 2-5 donde el gradiente comienza con una mezcla inicial de 80% A y 20% B, que pasa en 5 min a 100% B, el cual se mantiene durante 4 min y vuelve a la mezcla inicial en 1 min, siguiendo 4 minutos con la mezcla inicial para equilibrar la columna resultando en un tiempo total de 14 min.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el patrón interno para clopidogrel y SR26334 es diazepam-d<sub>5</sub>.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el patrón interno para AS es el ácido 6-metoxisalicílico.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la etapa de separación de las proteínas comprende precipitar las proteínas de la muestra.
10. El método según la reivindicación 9 donde la precipitación de las proteínas comprende las etapas de:
  - i. añadir un disolvente orgánico a la muestra de plasma,
  - 35 ii. agitar la mezcla anterior
  - iii. centrifugar la muestra, y
  - iv. separar el sobrenadante del precipitado.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el plasma ha sido extraído de pacientes tratados con AAS y/o clopidogrel.
- 40 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la muestra de plasma tiene un volumen de entre 200 y 300 µL.

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la muestra de plasma tiene un volumen de 250  $\mu\text{L}$ .
14. Método para la monitorización simultánea de clopidogrel y AAS en pacientes tratados con dichos compuestos, que comprende el método de detección y cuantificación descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130204

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.02.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PATEL, N. Et al. "Rapid LC-ESI-MS-MS Method for the Simultaneous Determination of Clopidogrel and its Carboxylic Acid Metabolite in Human Plasma". Journal of Chromatography Science, 2008, Vol. 46, N. 10, páginas 867875. Ver Resumen.	1-14
A	GONZALEZ, O. et al. "LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma". Journal of Chromatography B, 2010, Vol. 878, páginas 2685-2692. Ver Resumen; Apartado 2, Experimental.	1-14
A	ANANDAKUMAR, K. et al. "RP-HPLC analysis of aspirin and clopidogrel bisulphate in combination". Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, Vol. 69, N. 4, páginas 597-599. [on line] abril 2006 [recuperado el 05/06/2012]. Recuperado de internet: <URL:http://www.ijpsonline.com/article.asp?issn=0250-474X;year=2007;volume=69;issue=4;spage=597;epage=599;auiast=Anandakumar;type=0>. Ver Resumen; párrafos 5-9.	1-14
A	SULTANA, N. et al. "Simultaneous Determination of Clopidogrel and Aspirin by RP-HPLC from Bulk Material and Dosage Formulations Using Multivariate Calibration Technique". Journal of Chromatographic Science, 2011, Vol. 49, Número 2, páginas 165-169. Ver Resumen.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
26.06.2012

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N33/49** (2006.01)

**C07D495/04** (2006.01)

**C07C63/04** (2006.01)

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

G01N, C07D, C07C

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, XPEXP, BIOSIS, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.06.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PATEL, N. Et al. "Rapid LC-ESI-MS-MS Method for the Simultaneous Determination of Clopidogrel and its Carboxylic Acid Metabolite in Human Plasma". Journal of Chromatography Science, 2008, Vol. 46, N. 10, páginas 867875.	2008
D02	GONZALEZ, O. et al. "LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma". Journal of Chromatography B, 2010, Vol. 878, páginas 2685-2692. Ver Resumen; Apartado 2, Experimental.	06.08.2010
D03	ANANDAKUMAR, K. et al. "RP-HPLC analysis of aspirin and clopidogrel bisulphate in combination". Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, Vol. 69, N. 4, páginas 597-599. [on line] abril 2006 [recuperado el 05/06/2012]. Recuperado de internet: <URL:http://www.ijpsonline.com/article.asp?issn=0250-474X;year=2007;volume=69;issue=4;spage=597;epage=599;aulast=Anandakumar;type=0>.	20.04.2006
D04	SULTANA, N. et al. "Simultaneous Determination of Clopidogrel and Aspirin by RP-HPLC from Bulk Material and Dosage Formulations Using Multivariate Calibration Technique". Journal of Chromatographic Science, 2011, Vol. 49, Número 2, páginas 165-169.	13.01.2011

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

La solicitud se refiere a un método analítico para la detección y cuantificación simultánea de clopidogrel, su metabolito SR26334 y ácido salicílico en plasma que comprende las etapas de adición de un patrón interno a una muestra de sangre, separación de las proteínas, análisis de la muestra desproteínada por HPLC/MS y comparación de los datos obtenidos con los proporcionados por disoluciones de calibración.

El documento D01 divulga un método de determinación simultánea de clopidogrel y su metabolito SR26334 en plasma humano. La extracción de SR26334 y clopidogrel del plasma se realiza mediante tratamiento con ácido fosfórico seguido de extracción de fase sólida, a continuación se emplea un método de cromatografía líquida-ionización en electrospray- mass spectrometry para la estimación de dichos compuestos (Resumen).

El documento D02 divulga método analítico para la detección y cuantificación simultánea en plasma de varios compuestos usualmente utilizados de forma combinada en terapias cardiovasculares, como son ácido salicílico, atenolol, bisoprolol, hidroclorotiazida, clortalidona, enalapril, valsartan y fluvastatina. El método comprende las etapas de adición de un patrón interno (pravastatina) a una líquota de plasma, separación de las proteínas mediante precipitación, análisis de la muestra desproteínada por cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MS/MS) y comparación de los datos obtenidos en el análisis anterior con los datos proporcionados por disoluciones de calibración. Como fase móvil en la fase cromatográfica se utiliza acetonitrilo y ácido fórmico. Dicho método cumple con los requisitos de la FDA y CUE (Resumen; Apartado 2, Experimental).

El documento D03 divulga un método de estimación simultánea de clopidogrel bisulfito y ácido acetil-salicílico en formulaciones farmacéuticas. La separación y detección de dichos compuestos se realiza mediante HPLC de fase reversa (columna phenomenax). Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo, metanol y tampón fosfato (Resumen; Párrafos 5-9).

El documento D04 divulga un método de determinación conjunta de clopidogrel y aspirina en composiciones farmacéuticas donde se utiliza como patrón interno meloxicam. Las muestras se analizan mediante cromatografía líquida de fase reversa (Resumen).

Dichos documentos D01-D04 divulgan métodos de detección de clopidogrel y su metabolito SR26334 en plasma sin que se realice la separación de proteínas o bien, un método semejante al definido en la solicitud pero para la detección simultánea de otros compuestos utilizados en terapias cardiovasculares, se considera por lo tanto, que la información contenida en dichos documentos no divulga ni dirigiría al experto en la materia sin la necesaria experimentación, hacia un método de detección simultánea en plasma de clopidogrel, su metabolito SR26334 y ácido salicílico donde el análisis de dichos compuestos se realiza sobre muestras desproteïnadas, constituyendo un método específico y sensible para el análisis cuantitativo y simultáneo de dichos compuestos.

Por lo tanto, la invención definida en las reivindicaciones 1-14 de la solicitud es nueva y posee actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).