

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 571**

51 Int. Cl.:
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08795303 .0**
96 Fecha de presentación: **14.08.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2187741**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2010**

54 Título: **Formas novedosas de éster metílico de CDDO**

30 Prioridad:
15.08.2007 US 955939 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.06.2012

73 Titular/es:
**REATA PHARMACEUTICALS, INC.
2801 GATEWAY DRIVE, SUITE 150
IRVING, TX 75063-2648, US**

72 Inventor/es:
**WALLING, John;
PARENT, Stephan, D.;
JONAITIS, David, T. y
KRAL, Robert, M.**

74 Agente/Representante:
Lazcano Gainza, Jesús

ES 2 382 571 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

Formas novedosas de éster metílico de CDDO

5 **Referencia cruzada a solicitudes de patente relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense 60/955.939, presentada el 15 de agosto de 2007.

10 **Antecedentes de la invención**

Los triterpenoides se biosintetizan en plantas mediante la ciclación de escualeno. Aunque son candidatas para uso medicinal, estas moléculas que se producen de manera natural presentan una actividad biológica relativamente débil. Por consiguiente, los químicos han tratado de sintetizar análogos de potencia aumentada (Honda *et al.*, 1997 & 1998).

Se notifican varios análogos sintéticos para suprimir la formación *de novo* de iNOS y COX-2 en macrófagos que se han estimulado mediante IFN- γ o LPS (Suh *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 2002). Otro triterpenoide sintético, 2-ciano-3,12-dioxolean-1,9(11)-dien-28-oato (CDDO), presenta actividad antiinflamatoria y antiproliferativa (Honda *et al.*, 1998 & 2000).

El estudio del éster metílico de CDDO, que es 2-ciano-3,12-dioxoleana-1,9(11)-dien-28-oato de metilo (éster metílico de CDDO), Bore *et al.* (2002) determinó una estructura cristalina. En esa forma, que está hidratada, el agua coordina interacciones que generan una estructura y un empaquetamiento cristalinos particulares.

25 **Sumario de la invención**

En una realización de la presente invención, se proporciona una forma cristalina no hidratada de éster metílico de CDDO. La forma cristalina no hidratada tiene preferiblemente un grupo espacial de $P4_3 2_1 2$ con dimensiones de la celda unidad de $a = 14,2 \text{ \AA}$, $b = 14,2 \text{ \AA}$ y $c = 81,6 \text{ \AA}$. La invención también contempla una composición farmacéutica en forma de dosificación sólida, que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de una forma cristalina no hidratada de éster metílico de CDDO con (ii) un vehículo comestible.

Adicionalmente, la presente invención se presenta en una forma sólida vítrea de éster metílico de CDDO, que tiene un espectro de difracción de rayos X de polvo con un pico de halo a aproximadamente $13,5^\circ$ de 2θ , tal como se muestra en la figura 2C, y una temperatura de transición vítrea (T_g). En realizaciones particulares, la T_g puede oscilar entre aproximadamente 120°C y aproximadamente 135°C . En otras realizaciones, la T_g oscila entre aproximadamente 125°C y aproximadamente 130°C . La forma sólida vítrea de éster metílico de CDDO puede tener un espectro de PDF con picos similares a los de la figura 28 de desde aproximadamente 5 \AA hasta aprox 20 \AA .

Además, la invención proporciona una composición farmacéutica en forma de dosificación sólida, que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de una forma sólida vítrea de éster metílico de CDDO con (ii) un vehículo comestible. A este respecto, una aplicación de la invención es una metodología para tratar un paciente con cáncer, que comprende: administrar una composición farmacéutica de este tipo a un paciente con cáncer. Una aplicación de la invención también contempla administrar la forma vítrea de éster metílico de CDDO en combinación con otro fármaco anticancerígeno. Por ejemplo, el fármaco anticancerígeno puede ser gemcitabina y el cáncer puede ser cáncer de páncreas. Una aplicación de la invención engloba también una metodología para el tratamiento de enfermedades o trastornos que implican inflamación y estrés oxidativo agudos o crónicos, particularmente los que se caracterizan en parte por la sobreexpresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) o ciclooxigenasa inducible (COX-2).

Además, la invención se centra en una forma de solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO, que tiene un espectro de difracción de rayos X de polvo con picos característicos tal como se muestra en la tabla 18 y un espectro de DSC tal como se muestra en la figura 24. De conformidad con la invención, la forma de solvato de dimetanol puede usarse como producto intermedio para la producción de una forma sólida vítrea de éster metílico de CDDO. Un método para la producción de la forma sólida vítrea de éster metílico de CDDO, a través de la forma de solvato de dimetanol, comprende preparar una forma de solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO y secar la forma de solvato de dimetanol.

Según otra realización, la invención se centra en un método de crecimiento de un cristal de dimetanolato de éster metílico de CDDO, que comprende preparar una disolución de éster metílico de CDDO purificado en metanol anhidro caliente, añadir la disolución caliente a un recipiente de metanol enfriado, y filtrar los cristales resultantes.

Según otra realización, la invención se centra en una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de éster metílico de CDDO y (ii) un excipiente que es un formador de vidrio, de manera que la composición tiene una T_g .

El excipiente puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en (A) un hidrato de carbono, derivado de hidrato de carbono, o polímero de hidrato de carbono, (B) un polímero orgánico sintético, (C) una sal de ácido orgánico, (D) una proteína, un polipéptido, o péptido, y (E) un polisacárido de alto peso molecular. Son ilustrativos de la clase de excipientes de polímero orgánico sintético una hidroxipropil-metilcelulosa, tal como éster de ftalato de hidroxipropil-metilcelulosa, un poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etileno] o copolímero del mismo, tal como PVP/VA, y un copolímero de ácido metacrílico, tal como copolímero de ácido metacrílico - acrilato de etilo (1:1).

Otro excipiente a modo de ejemplo a este respecto es copovidona, que es copolímero de 1-vinil-2-pirrolidona - acetato de vinilo (3:2).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la estructura química del éster metílico de CDDO.

La figura 2 presenta el espectro de XRPD de la forma A (parte superior) y la forma B (parte inferior). De arriba hacia abajo parte superior a parte inferior: forma A no micronizada; forma A micronizada; y forma B.

La figura 3 muestra la curva de DSC y TG del éster metílico de CDDO (forma A).

La figura 4 muestra en análisis en platina caliente de la forma A - no micronizada.

La figura 5 muestra la isoterma de sorción dinámica de vapor de la forma A - no micronizada.

La figura 6 muestra las imágenes de SEM de la forma A - no micronizada.

La figura 7 muestra la forma A antes (parte superior) y después (parte inferior) de estrés a 195°C.

La figura 8 muestra el espectro de RMN de la forma A - no micronizada.

La figura 9 muestra la curva de MDSC de la forma B de éster metílico de CDDO.

La figura 10 muestra la forma B de éster metílico de CDDO antes (parte superior) y después (parte inferior) de estrés térmico a 200°C/HR ambiental durante 60 minutos.

La figura 11 muestra el espectro de RMN de la forma B de éster metílico de CDDO.

La figura 12 muestra un dibujo de ORTEP de una molécula individual de la forma A con marcaje. Se representan los átomos mediante elipsoides térmicos anisotrópicos de una probabilidad del 50%.

La figura 13 muestra un dibujo de ORTEP del contenido de la unidad asimétrica de los cristales de la forma A. Se representan los átomos mediante elipsoides térmicos anisotrópicos de una probabilidad del 50%.

La figura 14 muestra un diagrama de empaquetamiento de los cristales de la forma A observados a lo largo del eje a cristalográfico.

La figura 15 muestra un diagrama de empaquetamiento de los cristales de la forma A observados a lo largo del eje b cristalográfico.

La figura 16 muestra un diagrama de empaquetamiento de los cristales de la forma A observados a lo largo del eje c cristalográfico.

La figura 17 muestra el espectro de polvo de rayos X calculado de la forma A

La figura 18 muestra el XRPD experimental de la forma A.

La figura 19 presenta una comparación de los espectros de XRPD calculado y experimental para la forma A de éster metílico de CDDO.

La figura 20 muestra un gráfico representativo del área bajo la curva para la forma A y la forma B, tras una administración oral de 4,1 mg/kg a monos macacos. Cada punto de dato representa la concentración en plasma media de éster metílico de CDDO en 8 animales. Las barras de error representan la desviación estándar dentro de la población de la que se tomaron muestras.

La figura 21 muestra una comparación de la concentración en plasma de la forma B de éster metílico de CDDO frente a la forma A en el animal 505M (panel superior) y el animal n.º 507F (panel inferior).

La figura 22 presenta una comparación de la concentración en plasma de la forma B de éster metílico de CDDO frente a la forma A entre el animal n.º 508F (panel superior) y el animal n.º 502M (panel inferior).

5 La figura 23 representa termogramas de solvato de hemibenceno de éster metílico de CDDO.

La figura 24 muestra termogramas de solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO.

La figura 25 representa datos de TGIR relativos al solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO.

10 La figura 26 presenta espectros de XRPD de solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO, antes (parte superior) y después (parte inferior) de análisis TGIR (hasta 140°C).

15 La figura 27 es una representación de superposición de datos de PDF para la forma A frente a la forma B. El orden local es similar desde aproximadamente 5 Å hasta aproximadamente 20Å.

La figura 28 es una representación de superposición de espectros amorfos de rayos X para diferentes preparaciones de la forma B, que muestran una uniformidad sustancial entre las preparaciones.

20 La figura 29 es una representación esquemática del grupo espacial $P4_32_12$ (n.º 96).

La figura 30 muestra las concentraciones en sangre medias de éster metílico de CDDO tras administraciones orales únicas de cápsulas de éster metílico de CDDO a monos macacos macho (fases 2 y 3).

25 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Tal como se indicó, el estudio de los triterpenoides como supresores de la actividad de iNOS, y específicamente en la inhibición de la producción de NO, ha demostrado la alta potencia de CDDO y éster metílico de CDDO ($CI_{50} <$ nivel de 1 nM). Véase Honda *et al.* (2000). Estos estudios se centraron en el éster metílico de CDDO solubilizado, proporcionando una escasa caracterización de un sólido de éster metílico de CDDO. El trabajo de Bore *et al.* (2002) elucidó una estructura, la primera publicada para un triterpenoide, de una forma cristalina solvatada, individual de éster metílico de CDDO.

35 Para darse cuenta del potencial terapéutico del éster metílico de CDDO, representado en la figura 1 (estructura química) y en la figura 12 (dibujo de ORTEP), los presentes inventores investigaron otras formas del compuesto que presentaban propiedades, tales como mayor solubilidad en agua y estabilidad química, que son ventajosas para el desarrollo de una especialidad farmacéutica con farmacocinética adecuada. Por consiguiente, los inventores descubrieron dos formas de éster metílico de CDDO, distintas de la forma cristalina elucidada por Bore *et al.* (2002), que tienen tales propiedades, y por tanto, son candidatos para el desarrollo de fármacos por derecho propio.

40 “La forma A” inventiva de éster metílico de CDDO no está solvatada (no hidratada) y se caracteriza por una estructura cristalina distintiva, con un grupo espacial de $P4_3 2_12$ (n.º96), mostrada en la figura 29, dimensiones de la celda unidad de $a = 14,2 \text{ \AA}$, $b = 14,2 \text{ \AA}$ y $c = 81,6 \text{ \AA}$, y por una estructura de empaquetamiento, representada en las figuras 14-16, mediante lo cual se empaquetan tres moléculas de modo helicoidal a lo largo del eje b cristalográfico. La tabla 10 a continuación enumera datos cristalinos adicionales para la forma A, junto con datos cristalográficos-parámetros de recogida.

45 La otra “forma B” de la invención está en una monofase pero carece de una estructura cristalina definida de ese tipo. Más bien, la forma B se tipifica mediante un espectro de difracción de rayos X de polvo (XRPD) que difiere del de la forma A (véase la figura 2, entre otros). Además, la forma B presenta una biodisponibilidad que es sorprendentemente mejor que la de la forma A (véase el ejemplo 7).

50 Se ha publicado la metodología para la síntesis de éster metílico de CDDO. Véanse la patente estadounidense n.º 6.326.507, Honda *et al.* (1998), y Honda *et al.* (2000). Los inventores han descubierto que tanto la forma A como la forma B de éster metílico de CDDO se preparan fácilmente a partir de una variedad de disoluciones del compuesto, ilustradas por las detalladas en la tabla 3-5, más adelante. En particular, la forma B puede prepararse mediante evaporación rápida o evaporación lenta en MTBE, THF, tolueno o acetato de etilo. De igual modo, la forma A puede prepararse a través de evaporación rápida, evaporación lenta o enfriamiento lento de una disolución de éster metílico de CDDO en etanol o metanol. Las preparaciones de éster metílico de CDDO en acetona pueden producir o bien la forma A, usando evaporación rápida, o la forma B, usando evaporación lenta. A continuación se describen métodos de preparación adicionales, incluyendo las tablas proporcionadas en los mismos.

60 Puesto que no tiene una estructura cristalina definida, la forma B carece asimismo de picos de XRPD diferenciados, tales como los que tipifican la forma A, y en su lugar se caracteriza por un espectro de XRPD de “halo” general. En particular, la forma B no cristalina se clasifican en la categoría de sólidos “amorfo en rayos X” debido a que su espectro de XRPD presenta tres o menos halos de difracción primarios (véase la figura 10, por ejemplo). Dentro de

esta categoría, la forma B es un material "vítreo": Tal como se muestra mediante la PDF, las interacciones átomo-átomo de los vecinos más próximos coinciden con las observadas para la forma A cristalina, pero no se aplica la noción de una celda unidad promedio debido a que no se manifiesta ordenación a larga distancia.

5 A diferencia de la forma A, por tanto, las muestras de la forma B no muestran una correlación molecular a larga distancia, es decir, superior a aproximadamente 20 Å (véase la figura 27). Además, el análisis térmico de las muestras de la forma B revela una temperatura de transición vítrea (T_g). En cambio, un material nanocristalino desordenado, no presenta una T_g sino en su lugar sólo una temperatura de fusión (T_f), por encima de la cual la estructura cristalina se convierte en un líquido.

10 La presente descripción también caracteriza una forma de solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO que puede usarse para preparar la forma B (véase el ejemplo 9). También se caracteriza en el presente documento una forma de hemibencenato éster metílico de CDDO (véase el ejemplo 8).

15 Aunque se ha descubierto que la micronización de otros materiales cristalinos afecta los espectros de XRPD, el análisis de XRPD de la forma A micronizada da como resultado un espectro similar al de la forma A no micronizada. Véase la figura 2 para una comparación de unas junto a otras de la forma A no micronizada, la forma A micronizada y la forma B de éster metílico de CDDO.

20 Pueden usarse diversos medios de caracterización en conjunto para distinguir la forma A y la forma B de éster metílico de CDDO entre sí y de otras formas de éster metílico de CDDO. Son ilustrativas de las técnicas adecuadas para este fin la resonancia magnética nuclear de estado sólido (RMN), difracción de rayos X de polvo, cristalografía de rayos X, calorimetría diferencial de barrido (DSC *dynamic scanning calorimetry*), sorción/desorción dinámica de vapor (DVS *dynamic vapour sorption*), análisis de Karl Fischer (KF), microscopía de platina caliente, calorimetría diferencial de barrido modulada, FT-IR y espectroscopía Raman.

25 En particular, el análisis de los datos de XRPD y DSC puede distinguir la forma A, la forma B y formas de hemibencenato de éster metílico de CDDO.

30 Las propiedades de las formas inventivas de éster metílico de CDDO son tanto distintivas, tal como se mencionó anteriormente, como propicias para su uso como agentes farmacéuticos. Por ejemplo, la biodisponibilidad de la forma B y la forma A de éster metílico de CDDO variaron en monos cuando los monos recibieron dosificaciones equivalentes de las dos formas por vía oral, en cápsulas de gelatina. Véase el ejemplo 7. Además, la estabilidad de las formas de éster metílico de CDDO recién identificadas será útil en la producción de composiciones farmacéuticas. De manera similar a la distinción de la forma A y la forma B de éster metílico de CDDO entre sí y de otras formas de éster metílico de CDDO, las dispersiones de éster metílico de CDDO que conservan un carácter "amorfo en rayos X", tal como se describe con mayor detalle a continuación, pueden distinguirse de dispersiones que contienen la forma A cristalina de éster metílico de CDDO mediante una variedad de técnicas, incluyendo Análisis de XRPD y DSC. Por tanto, las dispersiones que contienen la forma A cristalina de éster metílico de CDDO presentan normalmente picos diferenciados característicos de la forma A pura de éster metílico de CDDO, particularmente los que aparecen a aproximadamente 13,35 y 8,78 ($^{\circ}$ de 2θ) (por ejemplo, véase la tabla 17, más adelante).

35 Las propiedades de una dispersión de excipiente de polímero de éster metílico de CDDO de la invención son tanto distintivas como propicias para su uso como agentes farmacéuticos. Por ejemplo, la biodisponibilidad de dispersiones seleccionadas de éster metílico de CDDO, formuladas con aditivos inactivos adicionales, varió en monos cuando los monos recibieron dosificaciones equivalentes de las dispersiones en cápsulas de gelatina. Véase el ejemplo 7, más adelante, fases del estudio 2 y 3. En varios casos, formulaciones que contenían dispersiones de excipiente de polímero de CDDO-metilo produjeron mejoras adicionales sorprendentes en la biodisponibilidad, incluso con relación a formulaciones producidas a partir de la forma B pura de éster metílico de CDDO.

40 La presencia de múltiples formas, incluyendo polimorfos, en sólidos farmacéuticos se ha descrito previamente, por ejemplo, por Cui (2007). Las formas cristalinas y amorfas de un compuesto pueden presentar diferentes características físicas y químicas. Por ejemplo, las formas amorfas pueden tener mayor solubilidad con relación a la forma cristalina. Sin embargo, cada compuesto es único a este respecto, y el grado en que un material amorfo diferirá del estado cristalino debe investigarse en cada caso y no puede predecirse *a priori*. Además, algunos materiales amorfos se prestan a recristalización.

45 En el presente contexto, puede surgir variabilidad en la recogida de datos debido a una pluralidad de factores. Por consiguiente, esta descripción usa los términos "aproximadamente" o "de manera aproximada" para indicar variaciones en los datos usados para describir las formas de éster metílico de CDDO. Por ejemplo, una temperatura de fusión puede variar basándose en la instrumentación o las condiciones. Con respecto a la precisión de la medición, la USP <891> establece que "En el caso de la fusión, pueden determinarse tanto una temperatura de "inicio" como una "máxima" de manera objetiva y reproducible, a menudo con un margen de unas pocas decenas de grado." La experiencia práctica indica que esto no es cierto para medir la T_g de un material. La T_g dependerá de muchos factores: cómo se preparó la muestra, la historia térmica de la muestra (relajación), disolvente residual que puede volatilizarse o no antes de la T_g , el instrumento, la preparación de muestras (masa de muestra, tamaño de

partícula, empaquetamiento, diluyentes), los parámetros usados para medir la T_g (particularmente, la velocidad de barrido), los parámetros usados para determinar la ubicación de la T_g (temperatura de inicio, temperatura de punto medio, temperatura de punto de inflexión o temperatura de desviación), si está presente una endoterma de relajación a T_g , y otros factores. Algunos factores disminuirán la T_g (plastificación debida a disolvente/agua residual), mientras que otros aumentarán la T_g (velocidad de barrido más rápida, relajación) y pueden hacerlo en tanto como 10-15°C. El cambio en la capacidad calorífica a T_g (ΔC_p) puede ser importante, tal como notificaron Zhou *et al.*, J. Pharmaceutical Sciences 91: 1863-72 (2002).

La presente descripción comenta diferentes espectros en cuanto a sus picos “característicos”. La colección o el grupo de tales picos es único para una forma polimórfica dada, dentro de la incertidumbre que puede atribuirse a los instrumentos individuales y a las condiciones experimentales, respectivamente.

Para cada una de las formas cristalinas, se enumera un grupo de cinco picos característicos en las tablas 17-19, a continuación. La variación típica puede ser de $\pm 0,1^\circ$ de 2θ , pero la posición de pico puede variar hasta $\pm 0,2^\circ$ de 2θ o más en algunos experimentos.

Tabla 17 - Forma A

Posición de pico ($^\circ$ de 2θ)
13,35
8,78
17,4
12,94
14,18

Tabla 18 - Dimetanolato

Posición de pico ($^\circ$ de 2θ)
8,87
11,26
16,63
16,9
13,72

Tabla 19 - Hemibencenato

Posición de pico ($^\circ$ de 2θ)
14,17
9,25
16,32
14,62
17,11

El espectro de XRPD del material vítreo (forma B) muestra un pico de halo ancho a aproximadamente $13,5^\circ$ de 2θ , que parece ser característico de la forma B. Otros halos no están tan bien definidos, y la forma/posición de este espectro puede cambiar en función del instrumento y las condiciones experimentales. La variación en la posición de este pico ancho será mayor que la de los picos característicos de las formas cristalinas respectivamente. En particular, puede esperarse una variabilidad de hasta $\pm 1^\circ$ de 2θ para el pico ancho de la forma B en determinados instrumentos.

El espectro de XRPD de materiales vítreos producidos como dispersiones de excipiente de éster metílico de CDDO también muestran un pico de halo ancho, normalmente centrado a aproximadamente $13,5^\circ$ de 2θ . Estos materiales presentan asimismo una T_g mediante calorimetría diferencial de barrido modulada (mDSC). De manera similar a las muestras de la forma B pura de éster metílico de CDDO, la forma y posición del espectro de XRPD para una dispersión de excipiente puede cambiar en función del instrumento usado, las condiciones experimentales y el excipiente específico empleado para producir las dispersiones.

La presente invención se refiere además a dispersiones de excipiente de la forma A, la forma B, y vítrea, amorfa en XRPD de éster metílico de CDDO, respectivamente, para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con inflamación, incluyendo un estado canceroso y diversas patologías que afectan al sistema nervioso central. Una aplicación de la invención incluye el tratamiento de estas enfermedades, comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de las formas novedosas de éster metílico de CDDO enumeradas en el presente documento. Estos compuestos tienen utilidad para mejorar o prevenir la inflamación implicada en la etiología del cáncer, la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), artritis reumatoide (AR) y otras enfermedades autoinmunitarias, enfermedad inflamatoria

del intestino, y otros estados patológicos relacionados con la producción excesiva o bien de óxido nítrico o bien de prostaglandinas.

5 Tal como se indicó previamente, la expresión aberrante o excesiva o bien de ciclooxigenasa-2 (COX-2) o bien de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se ha implicado en la patogénesis de muchos procesos patológicos, incluyendo carcinogénesis en el colon. Se ha notificado que varios análogos sintéticos de triterpenoides, incluyendo éster metílico de CDDO, suprimen la expresión de iNOS. Estudios relacionados han mostrado que la supresión de triterpenoides tanto de la expresión de iNOS como de COX-2 en macrófagos que se han estimulado mediante IFN- γ o LPS (Suh *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 2002). Por tanto, se espera que los tratamientos que administran formas de éster metílico de CDDO afecten la supresión de iNOS y COX-2.

15 La sobreexpresión del gen para COX-2 es un acontecimiento temprano y central en la carcinogénesis del colon (Prescott y White, 1996; Dubois *et al.*, 1996). Los ratones con defectos en el gen de APC (poliposis adenomatosa colónica) desarrollan altos números de pólipos intestinales a una edad temprana, y se han encontrado elevaciones notables en los niveles de la enzima COX-2 en estos pólipos. Estos hallazgos en animales se correlacionan con el hallazgo de niveles elevados de proteína y ARNm de COX-2 en muchos cánceres de colon primarios humanos y líneas celulares de cáncer de colon (Prescott y White, 1996), y se cree que esta elevación en COX-2 conduce a una supresión de la apoptosis, que conduciría habitualmente a la muerte de células pre-neoplásicas (Tsuji y DuBois, 1996). Se ha demostrado la relevancia funcional de COX-2 para la tumorigénesis intestinal mediante la desactivación del gen de COX-2 (Oshima *et al.*, 1996). Se aparearon ratones que portaban esta desactivación con ratones formadores de pólipos que portaban lesiones en el gen de APC; la desactivación de COX-2 provocó una disminución drástica en el número de pólipos en la descendencia. Además, se ha notificado que el tratamiento de animales de experimentación o bien con inhibidores selectivos de COX-2 o bien con inhibidores no selectivos de COX-1/COX-2 es un enfoque potente para la quimioprevención del cáncer intestinal (Mamett, 1992; Oshima *et al.*, 1996; Boolbol *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996; Sheng *et al.*, 1997). En cuanto al papel de iNOS en la carcinogénesis, está claro que NO es un mutágeno potente (Tamir y Tannebaum, 1996), y que el óxido nítrico también puede activar COX-2 (Salvemini *et al.*, 1993, 1994). También existe un aumento notable en iNOS en tumores de colon de rata inducidos por el carcinógeno, azoximetano (Takahashi *et al.*, 1997). De manera similar, se ha notificado la sobreexpresión de iNOS en tumores humanos como un factor de pronóstico negativo (por ejemplo, Ekemekcioglu *et al.*, 2006).

35 Las rutas de señalización inflamatorias y otras rutas de señalización asociadas con enfermedad, tal como se inducen por angiotensina II, estimulan frecuentemente la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (RONS), incluyendo superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y peroxinitrito. Se ha mostrado que el éster metílico de CDDO es un potente inductor de actividad antioxidante y un potente inhibidor de procesos inflamatorios en muchos tipos celulares diferentes (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Liby *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2006; Shishodia *et al.*, 2006). La inflamación aguda, grave debida a una variedad de causas incluyendo infección, traumatismo, quemaduras y exposición química puede ser potencialmente mortal y puede provocar insuficiencia hepática, insuficiencia renal, insuficiencia respiratoria o insuficiencia cardíaca. La inflamación crónica y el estrés oxidativo asociado contribuyen a la patología de muchas enfermedades importantes incluyendo enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, artritis reumatoide, lupus, soriasis y esclerosis múltiple), enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis e insuficiencia cardíaca), diabetes (tipo I y tipo II), enfermedades respiratorias (por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma), enfermedad renal crónica, insuficiencia renal, insuficiencia hepática y síndromes de dolor (por ejemplo, dolor neuropático, fibromialgia y migraña). Además, se ha mostrado que los triterpenoides inhiben la replicación de VIH-1 en macrófagos (Vazquez *et al.*, 2005) y así pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades virales, particularmente aquéllas en las que se produce una morbilidad significativa por inflamación de un órgano o tejido (por ejemplo, hepatitis viral, gripe, herpes simple).

50 Se sabe que la EM es un estado inflamatorio del sistema nervioso central (Williams, Ulvestad y Hickey, 1994; Merrill y Beneviste, 1996; Genain y Nauser, 1997). Pueden estar implicados mecanismos inflamatorios, oxidativos o inmunitarios en la patogénesis de EM, EA, EP y ELA (Bagasra *et al.*, 1995; Griffin *et al.*, 1995; McGeer y McGeer, 1995; Good *et al.*, 1996; Simonian y Coyle, 1996; Kaltschmidt *et al.*, 1997). Se han implicado tanto los astrocitos reactivos como la microglía activada en la causalidad de NDD/NID; ha habido un énfasis particular en la microglía como células que sintetizan tanto NO como prostaglandinas como productos de las respectivas enzimas, iNOS y COX-2. La formación *de novo* de estas enzimas puede estar dirigida por citocinas inflamatorias tales como interferón-gamma o interleucina-1. A su vez, la producción excesiva de NO puede conducir a cascadas inflamatorias y/o a daño oxidativo en las células y tejidos de muchos órganos, incluyendo neuronas y oligodendrocitos del sistema nervioso, con las consiguientes manifestaciones en EA y EM, y posiblemente EP y ELA (Coyle y Puttfarcken, 1993; Goodwin *et al.*, 1995; Beal, 1996; Good *et al.*, 1996; Merrill y Benvenist, 1996; Simonian y Coyle, 1996; Vodovotz *et al.*, 1996). Los datos epidemiológicos indican que el uso crónico de AINE, que bloquean la síntesis de prostaglandinas a partir de araquidonato, disminuye notablemente el riesgo de desarrollo de EA (McGeer *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 1997). Por consiguiente, la forma A y la forma B de éster metílico de CDDO, como agentes que bloquean la formación de NO y prostaglandinas, deben ser útiles en enfoques terapéuticos para tratar o prevenir NDD.

Tal como se describió anteriormente, en una variedad de estudios preclínicos CDDO-Me ha demostrado una capacidad para inhibir la expresión de COX-2 y iNOS, enzimas asociadas tanto con inflamación como con carcinogénesis. También se mostró que CDDO-Me inhibe la activación del factor nuclear-kappa B (NF-KB) y el transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3), factores de transcripción asociados con inflamación, progresión tumoral y resistencia tumoral a la terapia. Los estudios iniciales evidenciaron que CDDO-Me inhibió el crecimiento de muchas líneas celulares de cáncer; el valor de CI_{50} promedio para CDDO-Me en el panel de líneas celulares tumorales de NCI-60 fue de aproximadamente 35 nM. Estudios *in vivo* confirmaron que CDDO-Me inhibió eficazmente el crecimiento de tumores formados por líneas celulares tumorales humanas implantadas en roedores o líneas celulares cancerosas singénicas implantadas en roedores (tabla 16). Las dosis usadas en estos estudios estuvieron generalmente en el intervalo de 10 a 100 mg/kg/día, dependiendo de la especie, raza y método de administración.

Los estudios detallados a continuación proporcionan datos de seres humanos que reflejan el efecto beneficioso del éster metílico de CDDO en pacientes que presentan un estado canceroso. Véase el ejemplo 10.

A la luz de lo anterior, la presente invención engloba formas de dosificación estables, de liberación controlada que contienen una forma de éster metílico de CDDO. Una forma de dosificación de la invención puede ser para la administración una vez al día, para liberación retardada o para liberación pulsátil, para optimizar de ese modo la terapia haciendo coincidir el rendimiento farmacocinético con los requisitos farmacodinámicos.

Puede administrarse por vía oral cualquiera de la forma B, la forma A, y formulaciones que contienen dispersiones de excipiente de éster metílico de CDDO. El compuesto activo puede recubrirse en un material para proteger el compuesto frente a la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puede inactivar el compuesto. Otros modos de administración, tales como tópico, subcutáneo, intravenoso e intraperitoneal también son parte de la presente invención.

Para administrar el compuesto terapéutico, puede ser necesario recubrir el compuesto con o coadministrar el compuesto con un material para impedir su inactivación. Por tanto, puede administrarse o bien la forma B o bien la forma A de éster metílico de CDDO a un sujeto en un vehículo apropiado, tal como liposomas, o en un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y disoluciones tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales. Véase, por ejemplo, Strejan *et al.*, J. Neuroimmunol. 7: 27(1984).

El compuesto terapéutico puede administrarse por vía oral, con aditivos, diluyentes inertes o un vehículo comestible, para formar una composición farmacéutica. Para ello, el compuesto terapéutico de la invención, con otros componentes, puede encerrarse en una cápsula de gelatina dura o blanda, someterse a compresión para dar comprimidos o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, la forma A o la forma B pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos comestibles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. De manera similar, una dispersión de excipiente de la presente invención puede presentarse en una variedad de tipos de forma de dosificación, incluyendo los descritos en el presente documento para la forma A o la forma B. El porcentaje del compuesto terapéutico en las composiciones y preparaciones puede variarse, según la práctica convencional, para efectuar una dosificación adecuada del principio activo.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la forma B de éster metílico de CDDO o la forma A, en asociación con uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos y, si se desea, otros principios activos. Tal como se indicó anteriormente, el compuesto activo puede producirse como una dispersión homogénea de excipiente, partiendo o bien de la forma B o bien de la forma A. Una dispersión de excipiente de éster metílico de CDDO de este tipo es una disolución sólida y puede verse como una dispersión homogénea a nivel molecular. Tales dispersiones pueden formularse ventajosamente junto con otros aditivos farmacéuticamente aceptables, para estabilizar el compuesto activo y, en algunos casos, para proporcionar mejoras adicionales en la biodisponibilidad.

En la formulación del éster metílico de CDDO como una dispersión de excipiente, la elección de un excipiente para la dispersión está guiada por los criterios de que el excipiente sea tanto un buen "formador de vidrio" como farmacéuticamente aceptable. Más generalmente, el excipiente debe formar una matriz vítrea homogénea, estable, que establezca la dispersión proporcionando una T_g que es superior a las condiciones de almacenamiento típicas a la temperatura ambiental. Un criterio adicional a este respecto es que el excipiente usado para la dispersión debe ser químicamente compatible con otros aditivos, tales como aglutinantes, cargas, lubricantes, deslizantes, y similares, que pueden emplearse en la formulación final para conferir las propiedades funcionales deseadas.

Para satisfacer estos criterios, puede seleccionarse un excipiente, de conformidad con la invención, a partir de varios compuestos caracterizados por valores de T_g adecuadamente altos, tales como (A) hidratos de carbono, derivados de hidratos de carbono y polímeros de hidrato de carbono, (B) polímeros orgánicos sintéticos, (C) sales de ácidos orgánicos, (D) proteínas, polipéptidos y péptidos, y (E) polisacáridos de alto peso molecular tales como heparina que es un polisacárido sulfatado, y ácido hialurónico, un mucopolisacárido.

5 Son ilustrativos de la clase (A): derivados de celulosa, tales como hidroxipropil-celulosa (HPC), hidroxipropil-metilcelulosa (HPMC), y etil-celulosa; polisacáridos, tales como rafinosa, maltotriosa, estaquiosa, dextrinas (incluyendo maltodextrinas y ciclodextrinas, entre otros), dextrans y almidón soluble; alditoles, tales como manitol, xilitol y sorbitol; y disacáridos, tales como lactosa, trehalosa, maltosa, y sacarosa. Un excipiente preferido de esta clase es el éster ftálico de hidroxipropil-metilcelulosa (HPMC-P).

10 La clase (B) se ejemplifica mediante poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etileno], también conocido como povidona o polivinilpirrolidona (PVP) y copolímeros relacionados, tales como PVP/VA, de pesos moleculares variables. También está incluida en esta clase familia de copolímeros del ácido metacrílico, tales como copolímero de ácido metacrílico tipo C (USP/NF).

15 La clase (C) se ilustra mediante sales, tales como sales de sodio, potasio, calcio y magnesio, de ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucónico y ácido glutámico, respectivamente. Por tanto, sales representativas a este respecto son citrato de sodio, lactato de sodio, maleato de sodio, gluconato de magnesio y ascorbato de sodio.

20 Excipientes de la clase (D) a modo de ejemplo son: albúmina sérica humana; un poliaminoácido, por ejemplo, polialanina, poliarginina, poliglicina y poli(ácido glutámico); caseína; colágeno; gelatina y proteínas de gelatina purificadas; y determinados compuestos farmacológicamente activos, tales como insulina.

25 Los excipientes pueden alterar algunas de las características físicas de las formulaciones farmacéuticas, tal como se indicó. Por ejemplo, la dispersión dentro de los diversos excipientes poliméricos puede conducir a una reducción en la T_g observada de la formulación. Normalmente, la T_g es una propiedad aditiva basada en las proporciones de los materiales implicados. Por consiguiente, cuando se utilizan polímeros con valores de T_g que son inferiores a los de la forma B amorfa, existen expectativas de una reducción en la T_g observada para las dispersiones (mezclas). Adicionalmente, a menudo están presentes trazas de humedad o disolvente orgánico residual, lo que tiende a reducir también la T_g . Para los fines de generar una dispersión sólida de CDDO-Me, la elección óptima del excipiente normalmente debe determinarse empíricamente. Por ejemplo, los intentos de producir dispersiones vítreas, amorfas en XRPD usando la familia de excipientes del polietilenglicol (PEG), tales como PEG 6000, produjeron mezclas que contenían picos característicos asociados con la presencia de la forma A de éster metílico de CDDO. Se obtuvieron resultados similares usando vitamina E - TPGS, un excipiente producido esterificando succinato ácido de d-alfa-tocoferilo con polietilenglicol 1000, así como usando copolímeros de óxido de etileno - óxido de propileno tales como Pluronic®. Como ilustran los ejemplos a continuación, determinados excipientes poliméricos usados para formar dispersiones con CDDO-Me, de conformidad con la invención, presentan mejoras sorprendentes en la biodisponibilidad oral con relación al principio activo de la forma B pura.

35 Pueden variar los métodos para preparar dispersiones homogéneas, vítreas; amorfas en rayos X de CDDO-Me con excipientes farmacéuticamente aceptables, y los ejemplos presentados en el presente documento utilizan secado por pulverización para generar tales dispersiones. Pueden usarse otros métodos de fabricación para producir dispersiones de la invención con utilidad y propiedades equivalentes. Véase Repka *et al.*, 2002, y la bibliografía citada en el mismo. Otros métodos de este tipo incluyen pero no se limitan a evaporación de disolvente y extrusión, tal como extrusión por fusión en caliente.

45 Además de un excipiente, pueden incluirse otros aditivos para ayudar en la estabilidad del principio activo, para ajustar el pH (es decir, un agente tamponante), para mejorar la dispersabilidad, para ayudar a proporcionar uniformidad de suministro, y para lograr otras características deseada para una formulación farmacéutica.

50 La cantidad administrada del compuesto o composición de la presente invención variará, dependiendo del paciente y el modo de administración, y puede ser cualquier cantidad eficaz.

55 Puede desarrollarse un régimen de tratamiento dado para la administración de una composición de la presente invención por medio de pruebas preclínicas y clínicas normales y rutinarias, cuyos detalles son una función de la indicación terapéutica, entre otros factores. La cantidad del principio activo administrado puede variar en un amplio intervalo, para proporcionar de ese modo, en una dosificación unitaria, una cantidad farmacológicamente eficaz basada en el peso corporal del paciente al día, para lograr el efecto deseado. La dosificación deseada también puede variar según el estado que esté tratándose. Por ejemplo, el tratamiento de cáncer agudo puede requerir una dosis significativamente mayor que el tratamiento de un estado inflamatorio tal como artritis.

60 En particular, una composición de la presente invención se presenta como una dosis unitaria y se toma preferiblemente de desde 1 hasta 3 veces al día, lo más preferiblemente una vez al día para lograr el efecto deseado.

65 Además, una composición de la presente invención puede tomarse cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días o una vez a la semana.

Las composiciones de la presente invención también pueden administrarse solas o en combinación con otros fármacos basándose en las necesidades particulares de un paciente. En particular, las composiciones de la presente invención pueden administrarse con agentes anticancerígenos como parte de un régimen de tratamiento. Por ejemplo, el éster metílico de CDDO puede administrarse con gemcitabina, u otros agentes, durante el tratamiento de un cáncer, tal como cáncer de páncreas.

En general, se preparan las composiciones farmacéuticas de la invención usando materiales y técnicas convencionales, tales como mezclado, combinación y similares. Además, un medicamento que contiene la forma A o la forma B también puede contener otros componentes, incluyendo pero sin limitarse a adyuvantes, vehículos, excipientes y estabilizantes adecuados, etc. Una formulación terapéutica de la invención es preferiblemente un sólido pero, en principio, podría ser un líquido, tal como una suspensión o emulsión.

De conformidad con la invención, la dosis de mantenimiento oral es normalmente de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 1000 mg, preferiblemente administrada una vez al día. La dosificación puede variarse o adecuarse al peso de un sujeto. Dosificaciones típicas pueden ser de desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta 100 mg/kg, incluyendo las formas de dosificación unitarias preferidas los comprimidos y las cápsulas.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos sólo y no pretenden limitar la presente invención. Los materiales y métodos empleados en los ejemplos se exponen a continuación:

a. Materiales

Se adquirieron los disolventes y otros reactivos a proveedores comerciales y eran de calidad o bien HPLC o bien ACS.

b. Métodos experimentales

i. Método de adición de disolvente – solubilidad aproximada

Se trató una muestra pesada con alícuotas del disolvente de prueba a temperatura ambiente. Se determinó la disolución completa del material de prueba mediante inspección visual. Se estimó la solubilidad basándose en el disolvente total usado para proporcionar la disolución completa. La solubilidad real puede ser mayor que el valor calculado por el uso de alícuotas de disolvente que eran demasiado grandes o debido a una lenta velocidad de disolución. La solubilidad se expresa como “menor que” si no se produjo disolución durante el experimento. Si se logró la disolución completa como resultado de sólo una adición de alícuota, la solubilidad se expresa como “mayor que.”

ii. Selección de polimorfos

Se emplearon técnicas de cristalización tanto termodinámicas como cinéticas. Estas técnicas se describen con más detalle a continuación. Una vez que se recogieron muestras sólidas de los intentos de cristalización, o bien se examinaron bajo un microscopio para determinar la morfología o bien se observaron a simple vista. Se indicó cualquier forma cristalina, pero a veces el sólido presentó una morfología desconocida, debido al pequeño tamaño de partícula. Entonces se analizaron muestras sólidas mediante XRPD, y se compararon los espectros entre sí para determinar nuevas formas cristalinas o no cristalinas.

(i) Precipitación en frío (CP, *cold precipitation*)

Se prepararon disoluciones en diversos disolventes a temperatura elevada. Entonces se filtraron las disoluciones a través de un filtro de PTFE o nailon de 0,2 μm en un antidisolvente a temperatura inferior a la ambiente. Se indicó la presencia o ausencia de sólidos. Si no había sólidos presentes, o si se evaluó que la cantidad de sólidos era demasiado pequeña para el análisis de XRPD, se puso el vial en un congelador. Se aislaron los sólidos resultantes mediante filtración y se secaron antes del análisis.

(ii) Evaporación rápida (FE, *fast evaporation*)

Se prepararon disoluciones en diversos disolventes y se sonicaron entre adiciones de alícuota para ayudar en la disolución. Una vez que una mezcla alcanzó la disolución completa, tal como se evaluó mediante observación visual, se filtró la disolución a través de un filtro de nailon de 0,2 μm . Se permitió que la disolución filtrada se evaporase a temperatura ambiente en un vial sin tapar. Se aislaron y se analizaron los sólidos que se formaron.

(iii) Liofilización (FD, *freeze dry*)

Se prepararon disoluciones en 1,4-dioxano, se filtraron a través de un filtro de nailon de 0,2 μm , y se congelaron usando hielo seco. Se liofilizó la muestra congelada usando un sistema FTS Flexi-Dry. No se controló la temperatura de liofilización.

(iv) Micronización

- 5 Puede lograrse la micronización de materiales en molinos de energía de fluido y puede reducirse el tamaño de partícula a de 1 a 20 micrómetros. Puede hallarse una descripción adicional de estos procedimientos en PERRY'S CHEMICAL ENGINEERS' HANDBOOK, 7ª ed. (McGraw Hill, 1998).

(v) Trituración

- 10 Se puso una muestra sólida en un rotor de molienda de acero inoxidable con una pequeña bola de metal. Algunas muestras tenían una pequeña cantidad de agua añadida (trituration en húmedo). Entonces se trituró la muestra a 30 Hz en un molino mezclador Retesh de tipo MM220 durante aproximadamente 20 minutos. Se aislaron y se analizaron los sólidos resultantes.

15 (vi) Criotrituración

- 20 Se puso una muestra sólida en un recipiente de trituración de acero inoxidable con una varilla de trituración. Entonces se trituró la muestra a 15 Hz en un criomolino SPEX Certiprep modelo 6750 durante una cantidad de tiempo fijada. Se sumergió el recipiente de trituración en un baño de nitrógeno líquido durante el experimento. Se aislaron y se analizaron los sólidos.

(vii) Fusión/enfriamiento rápido

- 25 Se puso una muestra sólida sobre un portaobjetos de vidrio para microscopio y se niveló. Entonces se puso el portaobjetos sobre una placa calefactora a una temperatura fijada hasta que se fundió el sólido. Tras la fusión, se retiró el portaobjetos de la placa calefactora y se puso sobre una encimera fría para enfriarlo rápidamente. Se secaron los sólidos resultantes bajo nitrógeno y se analizaron.

30 (viii) Evaporación rotatoria

Se prepararon disoluciones en diversos disolventes y se filtraron a través de un filtro de nailon de 0,2 μm . Se puso la muestra en el evaporador rotatorio y se retiró cuando se secó. Se aislaron y se analizaron los sólidos resultantes.

35 (ix) Evaporación lenta (SE, *slow evaporation*)

- 40 Se prepararon disoluciones en diversos disolventes y se sonicaron entre adiciones de alícuota para ayudar en la disolución. Una vez que una mezcla alcanzó la disolución completa, tal como se evaluó mediante observación visual, se filtró la disolución a través de un filtro de nailon de 0,2 μm . Se permitió que la disolución filtrada se evaporase a temperatura ambiente o bajo nitrógeno en un vial cubierto con lámina de aluminio perforada con orificios. Se aislaron y se analizaron los sólidos así formados.

(x) Enfriamiento lento (SC, *slow cool*)

- 45 Se prepararon disoluciones saturadas en diversos disolventes a aproximadamente 60°C y se filtraron a través de un filtro de nailon de 0,2 μm en un vial abierto mientras todavía estaban calientes. Se cubrió el vial y se permitió que se enfriase lentamente hasta temperatura ambiente. Se indicó la presencia o ausencia de sólidos. Si no había sólidos presentes, o si se evaluó que la cantidad de sólidos era demasiado pequeña para el análisis de XRPD, se puso el vial en una nevera. De nuevo, se indicó la presencia o ausencia de sólidos y, si no había ninguno, se puso el vial en un congelador. Se aislaron los sólidos que se formaron mediante filtración y se permitió que se secasen antes del análisis.

(xi) Experimentos con disolución espesa

- 55 Se prepararon disoluciones añadiendo suficientes sólidos a un disolvente dado de modo que estuvieran presentes sólidos en exceso. Entonces se agitó la mezcla en un vial sellado a temperatura ambiente. Después de o bien 7 o bien 10 días, se aislaron los sólidos mediante filtración a vacío y se analizaron.

(xii) Experimentos de estrés

- 60 Se sometieron a estrés los sólidos en diferentes entornos de temperatura y/o humedad relativa (HR) durante un periodo de tiempo medido. Se lograron valores de HR específicos poniendo las muestras dentro de cámaras selladas que contenían disoluciones salinas saturadas o dentro de cabinas de humedad y temperatura ESPEC. Se seleccionaron las disoluciones salinas y se prepararon siguiendo un procedimiento de las normas ASTM. Se analizaron las muestras mediante XRPD inmediatamente después de la retirada del entorno de estrés.

65

iii. Determinación de la estructura de monocristal

(i) Preparación de muestras

5 Se preparó una disolución saturada de éster metílico de CDDO en metanol a ~60°C y se filtró a través de un filtro de 0,2 μm en un vial abierto mientras todavía estaba caliente. Se cubrió el vial y se permitió que se enfriase lentamente hasta temperatura ambiente. Se observó la presencia de pastillas piramidales después de 1 día.

(ii) Recogida de datos

10 Se montó una placa incolora de CDDO-Me (C₃₂H₄₃NO₄) que tenía dimensiones aproximadas en dos lados de 0,01 x 0,01 mm, en una fibra de vidrio en una orientación aleatoria. Se realizaron el examen preliminar y la recogida de datos con radiación K_α de Mo (λ = 0,71073 Å) en un difractor KappaCCD de Nonius equipado con un monocromador de haz incidente de cristal de grafito. Se realizaron refinamientos en un PC LINUX usando SHELX97 (Sheldrick, 1997) [1].

15 Se obtuvieron las constantes de celda y una matriz de orientación para la recogida de datos a partir del refinamiento por mínimos cuadrados usando los ángulos de ajuste de 46742 reflexiones en el intervalo de 2° < θ < 22°. La mosaicidad refinada de DENZO/SCALEPACK [2] era de 0,32°, indicando una buena calidad del cristal. Se determinó el grupo espacial mediante el programa XPREP [3]. A partir de la presencia sistemática de las siguientes condiciones: h00 h = 2n, 00l l = 4n, y a partir del posterior refinamiento por mínimos cuadrados, se determinó que el grupo espacial era P4₃2₁2 (n.º 96).

20 Se recogieron los datos hasta un valor de 2θ máximo de 44,43°, a una temperatura de 150 ± 1 K.

(iii) Reducción de los datos

25 Se integraron tramas con DENZO-SMN [2]. Se recogió un total de 46742 reflexiones, de las que 9168 eran únicas. Se aplicaron correcciones de polarización y de Lorentz a los datos. El coeficiente de absorción lineal es de 0,074 mm⁻¹ para la radiación K_α de Mo. Se aplicó una corrección de absorción empírica usando SCALEPACK [2]. Los coeficientes de transmisión oscilaron entre 0,9995 y 0,9999. Se promediaron las intensidades de reflexiones equivalentes. El factor de concordancia para el promediado fue del 9,3% basado en la intensidad.

(iv) Refinamiento y resolución de la estructura

35 Se resolvió la estructura mediante métodos directos usando SHELXS97 [1]. Se ubicaron los átomos restantes en sucesivas síntesis de diferencias de Fourier. Se incluyeron los átomos de hidrógeno en el refinamiento pero se limitaron a depender del átomo al que están unidos. Se refinó la estructura en mínimos cuadrados de matriz completa minimizando la función:

$$40 \quad \sum w \left(|F_o|^2 - |F_c|^2 \right)^2$$

El peso w se define como $1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0176P)^2 + (0,0000P)]$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$.

45 Se tomaron los factores de dispersión de las "International Tables for Crystallography" (Tablas internacionales de cristalografía) [5]. De las 9168 reflexiones usadas en los refinamientos, sólo se usaron las reflexiones con $F_o^2 > 2\sigma(F_o^2)$ en el cálculo de R. Se usó un total de 5421 reflexiones en el cálculo. El ciclo final de refinamiento incluyó 1024 parámetros variables y convergió (el mayor cambio de parámetro fue < 0,01 veces su desviación estándar estimada) con factores de concordancia no ponderados y ponderados de:

$$50 \quad R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o = 0,051$$

$$R_w = \sqrt{\sum w (F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w (F_o^2)^2} = 0,085$$

55 La desviación estándar de una observación de peso unitario era de 1,05. El mayor pico en la Fourier de diferencia final tenía una altura de 0,22 e/Å³. El pico negativo mínimo tenía una altura de -0,25 e/Å³.

(v) Espectro de difracción de rayos X de polvo (XRPD) calculado

60 Se generó un espectro de XRPD calculado para radiación de Cu usando PowderCell 2.3 [6] y las coordenadas atómicas, el grupo espacial y los parámetros de celda unidad procedentes de los datos de monocristal.

(vi) Diagramas de empaquetamiento y ORTEP

Se preparó el diagrama ORTEP usando ORTEPIII [7][9]. Se representan los átomos mediante elipsoides térmicos anisotrópicos de una probabilidad del 50%. Se prepararon los diagramas de empaquetamiento usando el software de modelado CAMERON [8]. Se generaron figuras y predicciones de morfología BFDH adicionales usando Mercury 1.4.1 [4].

c. Técnicas instrumentales

10 i. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

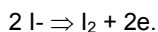
Se llevaron a cabo análisis en un calorímetro diferencial de barrido 2920 o Q1000 de TA Instruments. Se calibró el instrumento usando indio como material de referencia. Se puso la muestra en una cápsula de aluminio para DSC convencional con una configuración de tapa de fijación a presión, y se registró con precisión el peso. Se equilibró la celda de muestra a 25°C y se calentó bajo una purga de nitrógeno a una velocidad de 10°C/min, hasta una temperatura final de 250°C.

ii. Sorción/desorción dinámica de vapor (DVS)

Se recogieron datos sorción/desorción de humedad en un analizador de sorción de vapor SGA-100 de VTI en un intervalo humedad relativa (HR) del 5% al 95% a intervalos del 10% de HR bajo una purga de nitrógeno. No se secaron las muestras antes del análisis. Los criterios de equilibrio usados para el análisis fueron un cambio de peso inferior al 0,010% en 5 minutos, con un tiempo de equilibración máximo de 3 horas si no se cumplía el criterio del peso. No se corrigieron los datos para el contenido de humedad inicial de las muestras. Se usaron cloruro de sodio y polivinilpirrolidina como patrones de calibración.

iii. Karl Fischer (KF)

Se realizó el análisis coulombimétrico de Karl Fischer (KF) para la determinación de agua usando un valorador Karl Fischer DL39 de Mettler Toledo. Se pusieron aproximadamente 24-32 mg de muestra en el recipiente de valoración KF que contenía Hydranal - Coulomat EA. Entonces se valoró la muestra por medio de un electrodo generador que produce yodo mediante oxidación electroquímica: se obtuvieron tres duplicados para garantizar la reproducibilidad.



Se obtuvieron tres duplicados para garantizar la reproducibilidad.

iv. Microscopía de platina caliente

Se realizó microscopía de platina caliente usando una platina caliente Linkam (modelo FTIR 600) montado en un microscopio Leica DM LP. Se observaron las muestras usando un objetivo 20x (obj.) con polarizadores cruzados (CP, *cross polarizers*) y compensador lambda (λ). Se pusieron las muestras sobre un cubreobjetos. Entonces se puso un segundo cubreobjetos sobre la muestra. Se observó visualmente cada muestra a medida que se calentaba la platina. Se captaron imágenes usando una cámara digital en color SPOT Insight™ con Software SPOT v. 4.5.9. Se calibró la platina caliente usando patrones de punto de fusión según la USP.

v. Calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC)

Se obtuvieron datos de calorimetría diferencial de barrido modulada en un calorímetro diferencial de barrido de TA Instruments equipado con un sistema de enfriamiento refrigerado (RCS, *refrigerated cooling system*). Se puso la muestra en una cápsula de aluminio para DSC, y se registró con precisión el peso. Se cubrió la cápsula con una tapa y se fijó a presión. Se obtuvieron los datos de MDSC usando una amplitud de modulación de +/- 0,8°C y un periodo de 60 segundos con una velocidad de calentamiento subyacente de 2°C/min de desde -25 hasta 250°C. Se calibraron la temperatura y la capacidad calorífica usando metal indio y zafiro como los patrones de calibración, respectivamente. Se obtiene la temperatura de transición vítrea notificada a partir de la inflexión del cambio sustancial en la curva de flujo de calor reversible frente a la temperatura.

vi. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se recogieron los espectros de ¹H-RMN en fase de disolución por Spectra Data Services, Inc. Se imprimen los parámetros de adquisición en cada espectro. Los espectros se tomaron con referencia a tetrametilsilano interno a 0,0 ppm.

vii. Microscopía óptica

Se recogieron las observaciones realizadas mediante microscopía óptica en un microscopio óptico de polarización

Wolfe a un aumento de 4x. Se usaron polarizadores cruzados (CP) para observar birrefringencia en las muestras.

viii. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

5 Se realizó la microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un microscopio electrónico de barrido Quanta 200 de FEI. En modo a alto vacío, se usó un detector de retrodispersión de estado sólido (Etd). La tensión del haz era de 5,0 kV. Se recubrieron por pulverización las muestras usando una recubridora por pulverización 108auto de Cressington a -20 mA y ~0,13 mbar (Ar) con Au/Pd durante 75 segundos. Se preparon muestras para el análisis poniendo una pequeña cantidad sobre cinta adhesiva doble de carbono fijada a un portamuestras de aluminio. Se
10 calibró el instrumento para el aumento usando patrones de NIST. Se recogieron datos usando xTm (v. 2,01), número de montaje 1564 y se analizaron usando XT Docu (v. 3.2). Se calcularon los aumentos notificados en las imágenes de SEM tras la adquisición inicial de datos. La barra de escala notificada en la parte inferior de cada imagen es exacta tras el redimensionamiento de las imágenes y debe utilizarse cuando se realizan determinaciones de tamaño.

15 ix. Termogravimetría (TG)

Se llevaron a cabo análisis en un analizador termogravimétrico 2950 de TA Instruments. Los patrones de calibración fueron níquel y Alumel™. Se puso cada muestra en una cápsula para muestra de aluminio y se insertó en el horno para TG. En primer lugar se equilibraron las muestras a 25°C, luego se calentaron bajo una corriente de nitrógeno a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, hasta una temperatura final de 350°C a menos que se especifique lo contrario.

x. Difracción de rayos X de polvo (XRPD)

25 (i) XRG-3000 de Inel

También se realizaron análisis de difracción de rayos X de polvo en un difractor XRG-3000 de Inel, equipado con un detector sensible a la posición curvado con un intervalo de 2θ de 120°. Se recogieron datos en tiempo real usando radiación $K\alpha$ de Cu a una resolución de 0,03° de 2θ . Se fijaron el amperaje y la tensión del tubo en 40 kV y 30 mA, respectivamente. Se visualizan los espectros desde 2,5 hasta 40° de 2θ para facilitar las comparaciones directas con espectros. Se prepararon muestras para el análisis mediante su empaquetamiento en capilares de vidrio de pared delgada. Se montó cada capilar sobre un cabezal de goniómetro que está motorizado para permitir el giro del capilar durante la adquisición de datos. Se realizó la calibración del instrumento diariamente usando un patrón de referencia de silicio.

35

d. Técnicas de cálculo adicionales

i. PDF

40 Una técnica usada en el análisis computacional de datos amorfos en rayos X es la función de distribución de pares (PDF, *pair distribution function*). Tal como sugiere su nombre, la PDF se compone de una suma lineal de todas las interacciones átomo-átomo coherentes dentro del material. Los materiales defectuosos (desordenados) presentarán las mismas interacciones átomo-átomo que la fase cristalina, pero a lo largo de una escala de longitud reducida. Por tanto, tales materiales pueden compararse con materiales cristalinos originales examinando los picos en la PDF a lo
45 largo de algunos de los primeros nanómetros. Las comparaciones entre espectros en el intervalo de 0 Å a aproximadamente 5 Å son difíciles debido a los artefactos en esta región.

Con la formación del material vítreo, los picos de PDF presentarán cierto movimiento desde las posiciones de los picos cristalinos ya que las moléculas se relajan en sus posiciones. Esto es similar a un acontecimiento de dilatación/contracción térmica en el que, aunque los picos de PDF se mueven ligeramente, las intensidades relativas de los picos deben poder reconocerse todavía como que están relacionadas con el material cristalino original. A medida que el material entra en el estado amorfo termodinámico, algunas de las relaciones de simetría de grupos puntuales se perderán proporcionando una PDF de complejidad reducida. También habrá cierto movimiento de picos. Los materiales vítreos/amorfos presentarán PDF que rápidamente se reducirán a cero a lo largo de distancias
50 de 2 a 3 vecinos más próximos (NN, *nearest neighbor*).

55

Se usan condiciones de medición para minimizar el fondo en los espectros de rayos X y se usan algoritmos para calcular la PDF a partir de los datos de rayos X medidos. Se calcularon las PDF usando PatternMatch v2.2.1, usando todo el intervalo de datos medidos para todas las muestras.

60

Ejemplo 1 – Estimaciones de solubilidad

Se determinaron solubilidades aproximadas en diversos disolventes a temperatura ambiente, con los resultados proporcionados en la tabla 2. El éster metílico de CDDO presenta alta solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos usados. La solubilidad en agua parece ser inferior a 0,1 mg/ml.

65

Ejemplo 2 – Resultados de la selección de polimorfos

Se realizaron aproximadamente 50 experimentos de selección de polimorfos. Se observó la forma A a partir de aproximadamente el 50% de las muestras. La formación de la forma A no se limitó a una condición de cristalización particular y se preparó a partir de una variedad de diferentes experimentos y disolventes. Se preparó material de la forma B a partir de liofilización, fusión/enfriamiento rápido, y varios experimentos de evaporación.

Se enumeran alfabéticamente las muestras de la selección de polimorfos en las tablas 3-5 por el disolvente usado. Se comparan espectros de XRPD representativos de materiales de la forma A y la forma B en la figura 2. Se resumen los datos de caracterización de las formas en los ejemplos a continuación.

Ejemplo 3 - Caracterización de éster metílico de CDDO - forma A (no micronizada)

La forma A no está solvatada (tabla 6). Se determinó la estructura de monocristal de la forma A basándose en los métodos descritos anteriormente. Se hicieron crecer cristales de éster metílico de CDDO y se enviaron para el análisis de la estructura de monocristal. Se determinó la estructura cristalina mediante difracción de rayos X de monocristal. Se muestra la estructura propuesta del éster metílico de CDDO en la figura 1.

Los parámetros de celda tetragonal y el volumen calculado son: $a = 14,21620(10) \text{ \AA}$, $b = 14,21620(10) \text{ \AA}$, $c = 81,5875(12) \text{ \AA}$, $\alpha = 90,00^\circ$, $\beta = 90,00^\circ$, $\gamma = 90,00^\circ$, $V = 16488,9(3) \text{ \AA}^3$. El peso molecular del éster metílico de CDDO es de 505,70 g/mol siendo $Z = 24$, lo que da como resultado una densidad calculada de $1,222 \text{ g cm}^{-3}$. Se determinó que el grupo espacial era $P4_32_12$ (n.º 96). Se proporciona un resumen de los datos cristalinos y parámetros de recogida de los datos cristalográficos en la tabla 10.

La calidad de la estructura obtenida en alta, tal como se indica mediante el valor de R de 0,05 (5,1%). Habitualmente se citan valores de R en el intervalo de 0,02 a 0,06 para las estructuras determinadas de la manera más fiable.

Se muestra un dibujo de ORTEP de una molécula individual de éster metílico de CDDO en la figura 12. La unidad asimétrica mostrada en la figura 13 contiene tres moléculas de éster metílico de CDDO. Las moléculas son las mismas que la estructura propuesta a partir de la figura 1.

Se muestran diagramas de empaquetamiento visualizados a lo largo de los ejes a, b y c cristalográficos en las figuras 14-16, respectivamente. Sin enlaces de hidrógeno, la estructura cristalina incluye numerosas interacciones de van der Waals. La vista a lo largo del eje b cristalográfico (figura 15) destaca la naturaleza helicoidal de la disposición de empaquetamiento del eje helicoidal tetragonal y la morfología BFDH predicha. La morfología predicha concuerda bien con el hábito observado en el monocristal usado en la recogida de datos.

Se proporciona el espectro de XRPD calculado del éster metílico de CDDO, generado a partir de los datos de monocristal, en la figura 17. Se muestra el espectro de XRPD experimental del éster metílico de CDDO en la figura 18. Se proporcionan picos característicos para el espectro de XRPD de la forma A en la tabla 17. Una comparación de los espectros de XRPD calculados y experimentales (figura 19) revela que todos los picos en los espectros experimentales están representados en el espectro de XRPD calculado, lo que indica que el material a granel es probablemente una única fase. El ligero desplazamiento sistemático observado en la ubicación de los picos se debe probablemente al hecho de que el espectro de polvo experimental se recogió a temperatura ambiente, y los datos de monocristal se recogieron a 150°K. Se usan bajas temperaturas en el análisis de monocristal para mejorar la calidad de la estructura.

En resumen, se determinó la estructura de monocristal de la forma A del éster metílico de CDDO A para confirmar la estructura molecular propuesta. Se determinó que el grupo espacial era $P4_32_12$ (n.º 96). La estructura del éster metílico de CDDO consiste en tres moléculas de una naturaleza helicoidal a lo largo del eje b cristalográfico. Todos los picos en los espectros experimentales están representados en el espectro de XRPD calculado, lo que indica que el material a granel es probablemente una única fase.

Se muestran los datos térmicos para la forma A en la figura 3. La curva de DSC muestra un desplazamiento con respecto a la línea base a aproximadamente 157°C y una endoterma con una temperatura de inicio de aproximadamente 222°C (máximo de señal a ~224°C). Se confirmó el acontecimiento a ~224°C como la fusión mediante microscopía de platina caliente (figura 4). La curva de termogravimetría (TG) presenta una pérdida de peso insignificante del 0,34% hasta 150°C, seguido por una pérdida de peso del 1,2% desde 150 hasta 210°C. Los datos de Karl Fischer muestran que el material contiene aproximadamente el 0,38% de agua residual, lo que concuerda con la pérdida de peso inicial observada mediante TG.

Los datos de DVS indican que la forma A no es higroscópica (figura 5). El material muestra un cambio de peso insignificante a lo largo de todo el experimento. Se analizó el material resultante mediante XRPD y es la forma A.

Se muestran imágenes de SEM en la figura 6. Se observan varios hábitos, incluyendo piramidal, pastilla y similar a una placa.

Se investigó la estabilidad física de la forma A en diversas condiciones (tabla 7). Las muestras sometidas a estrés o bien a 25°C/HR del 60% o bien a 40°C/HR del 75% durante 7 días mostraron ambas un cambio de peso insignificante (pérdida del 0,6% y aumento del 0,2%, respectivamente) lo que sugiere que la forma A no es higroscópica. Se trituraron dos muestras en un molino de bolas durante aproximadamente 20 minutos, una seca y otra con una pequeña cantidad de agua. Se volvieron a analizar todas las muestras mediante XRPD y seguían siendo la forma A. Se sometió a estrés una muestra a 195°C durante 15 minutos y mostró una pérdida de peso del 2%. El XRPD del material resultante es similar al de la forma A; sin embargo, es evidente un aumento en el ruido de la línea base (figura 7).

Se muestra el espectro de RMN en disolución en la figura 8. El espectro concuerda con la estructura de éster metílico de CDDO. Los picos a aproximadamente 1,6 y 7,3 ppm se asignan a agua y cloroformo (debido al intercambio), respectivamente.

La forma A no está solvatada y no es higroscópica, por tanto, y funde a aproximadamente 228°C, basándose en observaciones del analista durante la microscopía de platina caliente.

Ejemplo 4 - Caracterización de éster metílico de CDDO - forma A (micronizada)

Se determinó que la forma A micronizada de éster metílico de CDDO era la forma A mediante XRPD (figura 2, tabla 1). Puede producirse material micronizado mediante la metodología convencional, ampliamente conocida en el campo, tal como molienda con chorro de aire. Estos hallazgos parecen indicar que la micronización no afecta a la forma A para alterar su espectro de XRPD.

Ejemplo 5 - Caracterización de éster metílico de CDDO - forma B

Puede prepararse material de la forma B a partir de liofilización, fusión/enfriamiento rápido, y otros varios experimentos de evaporación, tal como se facilita en la tabla 3.

Se muestran los datos de DSC modulada (MDSC) en la figura 9. La curva reversible muestra una temperatura de transición vítrea (T_g) a aproximadamente 125°C. La curva no reversible muestra una exoterma con máximo de señal a 195°C y una endoterma con máximo de señal a 223°C. Los acontecimientos no reversibles se deben de la manera más probable a la cristalización de material de la forma B (exoterma) seguida por la fusión del material cristalizado (endoterma).

Se investigó la estabilidad física de material de la forma B a diversas condiciones (tabla 9). Las muestras sometidas a estrés a 22°C/HR del 97%, 40°C/HR del 75%, 80°C/HR del 0% y 195°C/HR ambiental seguían siendo la forma B. El someter a estrés el material a 200°C/HR ambiental durante 60 minutos produjo la forma A más material minoritario de la forma B (figura 10).

Se muestra el espectro de RMN en disolución en la figura 11. El espectro concuerda con la estructura de éster metílico de CDDO. Los picos a aproximadamente 1,6, 5,3, y 7,3 ppm se asignan a agua, diclorometano y cloroformo, respectivamente.

La forma B no es higroscópica, cristaliza en la forma A a aproximadamente 200°C, y tiene una temperatura de transición vítrea (T_g) de aproximadamente 125°C - 130°C.

En resumen, la forma B no es higroscópica. Los datos de MDSC indican que la temperatura de transición vítrea (T_g) de la forma B es de aproximadamente 125°C - 130°C. El material de la forma B cristaliza en la forma A cuando se somete a estrés a aproximadamente 200°C.

Ejemplo 6 – Estudios de estabilidad para la forma B de éster metílico de CDDO y dispersiones de excipiente de polímero de éster metílico de CDDO

(i) Estudios de la forma B purificada

La forma B de éster metílico de CDDO se sometió a condiciones de estrés variables. La tabla 15 proporciona algunos de los resultados de estos estudios. La forma B de éster metílico de CDDO producida mediante una realización útil pero menos preferida de esta invención, que implica el uso de acetato de etilo como disolvente, muestra una estabilidad considerable. No obstante, las pruebas de muestras de la forma B producidas en presencia de acetato de etilo revelaron la formación de la forma A después de 28 días de almacenamiento a temperaturas de 60°C e inferiores. Por el contrario, todas las muestras producidas según una realización preferida de esta invención, siendo el ejemplo 11 a continuación ilustrativo de la misma, conservaron las características amorfas después de las pruebas de estrés en condiciones particularmente rigurosas (véase la tabla 15). Estos estudios muestran la sorprendente estabilidad de material de la forma B, especialmente cuando se prepara según la realización preferida, mencionada anteriormente.

Además, se analizaron muestras de la forma B preparadas en condiciones variables para determinar si tenían propiedades químicas similares. Tal como se describió anteriormente, es decir, se prepararon muestras de la forma B mediante métodos de criotrituración, fusión-enfriamiento rápido, y secado por pulverización. Además, se micronizó forma B no micronizada para producir forma B micronizada. Se realizó el análisis de PDF en las muestras (figura 28), que se determinó que eran de naturaleza vítrea.

(ii) Estudios con preparaciones de dispersión de CDDO-Me

Se realizaron estudios para comparar el rendimiento de diferentes dispersiones sólidas de forma B:polímero producidas mediante secado por pulverización. Los atributos del producto estudiados incluyeron estabilidad y perfil de disolución del fármaco.

Se usaron diferentes polímeros a tres razones de principio activo farmacéutico (API) con respecto a polímero (20:80; 40:60 y 60:40%p/p).

Se seleccionaron los siguientes tres polímeros:

Copolímero de ácido metacrílico - acrilato de etilo (1:1)

Copovidona [copolímero de 1-vinil-2-pirrolidona - acetato de vinilo (3:2)]

Ftalato de hipromelosa.

Se disolvieron disoluciones de CDDO-Me, o bien material cristalino de la forma A o bien material de la forma B, y el polímero elegido para el estudio en un disolvente adecuado a las razones en peso apropiadas, normalmente para producir desde el 10-20% en peso de sólidos en disolución. El disolvente empleado normalmente era acetona. Se secaron por pulverización las disoluciones resultantes por medio de una secadora por pulverización a escala de laboratorio (BÜCHI, modelo B-290), equipado con una boquilla de dos fluidos, usando nitrógeno como gas portador y de secado. Normalmente se emplearon temperaturas de entrada de gas portador de 65-85°C y temperaturas de salida de 50-60°C. Se recogieron los sólidos y se secaron posteriormente a vacío los polvos secados por pulverización, para reducir adicionalmente los niveles de los disolventes orgánicos.

Se analizaron los polvos secados por pulverización para determinar el nivel de disolventes orgánicos residuales, la temperatura de transición vítrea (T_g) y la densidad aparente. Después del secado posterior, también se analizaron los polvos para determinar la pureza, el contenido de agua, el tamaño de partícula promedio, la ausencia de material cristalino mediante difracción de rayos X de polvo (XRPD) y perfil de disolución.

Se evaluaron las características fisicoquímicas de las dispersiones después de someterlas a estrés a corto plazo (después de 5 días, 40°C / HR del 75%) mediante XRPD y calorimetría diferencial de barrido modulada (mDSC).

Estos estudios encontraron que la temperatura de transición vítrea, T_g , disminuyó cuando se sometió a estrés a corto plazo, probablemente debido a la captación de humedad a lo largo del transcurso del estrés. La disminución fue más pronunciada con las formulaciones que tenían bajas razones de éster metílico de CDDO : polímero. Para las muestras antes del estrés a corto plazo, se observaron una o dos transiciones endotérmicas a mayores temperaturas, aunque estas temperaturas son algo menores que las observada inicialmente. La entalpía asociada con estas transiciones disminuyó a medida que disminuyó el contenido en polímero. Esto es una indicación de que esta transición está relacionada de la manera más probable con el polímero y no con la fusión de una forma cristalina. De hecho, para las dispersiones producidas con PVP/VA, la temperatura de esta transición endotérmica fue similar a la observada para el excipiente puro, tal como se recibió del fabricante. En cada caso, el perfil de XRPD después del estrés continuó siendo el espectro de halo característico centrado aproximadamente en $13,5^\circ$ de 2θ , y no se detectaron picos asociados con la forma cristalina.

Se llevaron a cabo estudios de secado por pulverización adicionales con dos formulaciones, usando equipo de secado por pulverización a mayor escala. En estos casos, se empleó una secadora a escala piloto modelo PSD-1 (mobile minor 2000) de Niro. También se emplearon condiciones de boquilla y secado por pulverización equivalentes a las descritas anteriormente. Las tablas 20 y 21 resumen las disoluciones preparadas para secado por pulverización y sus características tras el secado por pulverización. Las formulaciones mostraron una menor T_g , con relación a la forma B pura, debido a que la formulación incluía polímeros con una menor T_g que la forma B.

Ejemplo 7 - Administración de éster metílico de CDDO: forma B frente a forma A en monos macacos

En la fase 1 de este estudio, se preparó una cantidad de cápsulas de gelatina dura, que contenían la forma A micronizada pura de CDDO-Me o la forma B micronizada pura de CDDO-Me, mediante (i) añadir una cantidad pesada de manera apropiada de la forma pura del principio activo a una cápsula de gelatina dura de tamaño 1 y luego (ii) cerrar la cápsula. No se emplearon excipientes adicionales. Se administró o bien la forma B o bien la forma

A de éster metílico de CDDO por vía oral en una cápsula de gelatina a monos macados (dosis = 4,1 mg/kg en todos los casos).

La administración de la forma B de éster metílico de CDDO proporcionó una mediana de exposición que era aprox un 520% mayor que la dosis equivalente de la forma A de éster metílico de CDDO en monos. La tabla 11 compara las exposiciones al fármaco de los animales individuales. Se implementó un diseño cruzado en este estudio para aumentar el valor de 'n' y para mejorar la fiabilidad de los datos. Se implementó un periodo de lavado de 1 semana durante el cruce. La figura 20 demuestra las concentraciones en plasma logradas de ambas formas de éster metílico de CDDO con el tiempo en la población de la que se tomaron muestras. La figura 21 representa concentraciones en plasma de éster metílico de CDDO comparativas de los animales n.º 505M y n.º 507F. La figura 22 representa concentraciones en plasma de éster metílico de CDDO comparativas de los animales n.º 508F y n.º 502M.

Para evaluar adicionalmente la biodisponibilidad comparativa de las formas de dosificación oral de éster metílico de CDDO, incluyendo las que contienen dispersiones de excipiente de éster metílico de CDDO, se llevaron a cabo dos fases de estudio adicionales, 2 y 3, tal como se detalla a continuación. Estos estudios incluyeron algunas de las dispersiones de polímero de la forma B de CDDO-Me descritas en el ejemplo 6. Todas las formulaciones incluían aditivos de formulación usados comúnmente.

Fase 2:

Se produjo una suspensión acuosa de CDDO-Me nanocrystalino, partiendo de una muestra de material de la forma A micronizada. Se cargó un molino planetario de bolas Retsch® modelo PM 400, que contenía bolas de zircona de 2 mm de tamaño promedio, con 25 g de CDDO-Me micronizado (distribución de tamaño de partícula promedio de 6,1 μM), 5 g de docusate sodio, 1 g de Tween 80 y 68,3 g de agua. Se inició la trituración a aproximadamente 400 RPM y se continuó durante 2 horas. Se obtuvo una determinación de la distribución de tamaño de partícula distribución (PSD, *particle size distribution*) usando un granulómetro de luz que indicó una PSD promedio de 0,37 μM . A esta suspensión espesa se le añadieron 1 g de celulosa microcristalina y 0,2 g de goma xantana, con breve mezclado, y se almacenó refrigerada la suspensión.

Se recubrió por pulverización la nanosuspensión molida en molino de bolas sobre una combinación de excipiente seca en un lecho fluido Strea 1a de Aeromatic a escala de laboratorio, teniendo el conjunto de pulverización superior un tamaño de boquilla de pulverización de 0,4 mm. Se fijó la temperatura de entrada en 55°C. El intervalo de temperatura de salida durante la pulverización fue de 32 a 35°C. Se secó la granulación resultante durante aproximadamente 5 minutos, hasta que la temperatura de salida alcanzó los 38°C (Anexo 3-5). Se facilita a continuación la composición de los materiales recubiertos.

Composición teórica de la formulación de 30 mg de CDDO-Me nanocrystalino

Artículo	Componente	%	mg/unidad
1	CDDO-Me	5,7	19
2	Tween 80	0,12	0,4
3	DOS	1,14	3,8
4	Celulosa microcristalina en suspensión	0,21	0,7
5	Goma xantana	0,03	0,1
6	Celulosa microcristalina en granulación	24,4	81,55
7	Almidón Pregel	58,5	195,3
8	Povidona K29/32	0,5	1,75
9	Crospovidona	8,4	28
10	Dióxido de silicio coloidal	0,5	1,75
11	Estearato de magnesio	0,5	1,75
Total:		100,0	334,1

Se envió la granulación seca resultante para análisis de HPLC para determinar la valoración del principio activo. Se determinó que esa valoración era del 14,4% (p/p), sustancialmente mayor que el valor teórico (5,7%). Basándose en el análisis de HPLC, se llenaron cápsulas de modo que se proporcionara un contenido neto de CDDO-Me de 30 mg.

Se produjeron formulaciones de la forma A micronizada cristalina y la forma B micronizada, amorfa mediante un proceso de combinación de polvos secos convencional, usando, como aditivos, celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado, crospovidona (que funciona como disgregante), dióxido de silicio coloidal, y estearato de magnesio de calidad vegetal. Se usó forma A micronizada de CDDO-Me de PSD promedio de 6,1 μM para la formulación de la forma A, mientras que se empleó forma B micronizada de CDDO-Me de PSD promedio de 10,8 μM para la formulación correspondiente de forma B de CDDO-Me. La tabla a continuación presenta la composición cuantitativa de ambas formulaciones.

Composición cuantitativa de cápsula de 30 mg de la forma A y forma B

Identidad	% p/p	mg por cápsula
CDDO-Me (micronizada)	18,18	30,0
Celulosa microcristalina	18,55	30,6
Almidón pregelatinizado	53,45	88,2
Crospovidona	8,72	14,4
Dióxido de silicio coloidal	0,55	0,9
Estearato de magnesio (calidad vegetal)	0,55	0,9
Contenido total de la cápsula	100,00	165 mg

5 Cada uno de 15 monos macacos, *Macaca fascicularis*, recibieron una administración oral única de éster metílico de CDDO (3 formulaciones diferentes, 5 monos por formulación) a un nivel de dosis objetivo de 10 mg/kg. Los monos oscilaban entre 1-3 años de edad y 2,5-3,5 kg de tamaño. Se extrajeron muestras de sangre hasta 72 horas tras la dosis.

Fase 3:

10 Se formularon adicionalmente dispersiones de excipiente de CDDO-Me descritas en el ejemplo 6 fueron mediante un proceso de combinación de polvos secos convencional, usando celulosa microcristalina, lactosa monohidratada, crospovidona (que funciona como disgregante), y laurilsulfato de sodio como aditivos. La composición cuantitativa de cada formulación aparece a continuación.

Composición de dispersiones de excipiente de CDDO-Me combinadas con aditivos en la formulación de cápsula

Componente	40% de CDDO-Me / 60% de copolímero de ácido metacrílico de tipo C	60% de CDDO-Me/ 40% de PVP/VA	60% de CDDO-Me/ 40% de HPMC-P
Dispersión de CDDO-Me	60,0%	50,0%	50,0%
Celulosa microcristalina	12,8%	16,0%	16,0%
Lactosa monohidratada	20,0%	25,0%	25,0%
Crospovidona	6,4%	8,0%	8,0%
Laurilsulfato de sodio	0,8%	1,0%	1,0%
Contenido total de la cápsula	100%	100%	100%
Masa de llenado	125mg	100mg	100mg

20 Después de un periodo de lavado adecuado (de 7 a 10 días), los mismos 15 monos macacos macho usados en la fase 2 recibieron cada uno una administración oral única de éster metílico de CDDO (3 formulaciones diferentes, 5 monos por formulación) a un nivel de dosis objetivo de 10 mg/kg. Se extrajeron muestras de sangre hasta 72 horas tras la dosis.

25 El cuadro a continuación resume cada fase del estudio.

Número de fase	Vía de administración	Formulación de CDDO-Me	Nivel de dosis objetivo	Número de animales (machos)
2	Oral (cápsula)	Forma A nanocristalina	30 mg/por animal (10 mg/kg)	5
		Forma B micronizada amorfa		5
		Forma A micronizada cristalina		5
3	Oral (cápsula)	Forma B de PVP/VA	30 mg/por animal (10 mg/kg)	5
		Forma B de HPMC-P		5
		Forma B de copolímero de ácido metacrílico de tipo C		5

Se resumen a continuación las dosis orales e intravenosas medias recibidas por los monos macacos macho y las concentraciones medias de éster metílico de CDDO:

Número de fase	Formulación	Peso corporal medio (kg)	Dosis media (mg/kg)
2	v.o. (forma A nanocristalina)	2,89 ± 0,267	10,5 ± 0,971
	v.o. (forma B micronizada amorfa)	2,87 ± 0,177	10,5 ± 0,635
	v.o. (forma A micronizada cristalina)	2,91 ± 0,202	10,3 ± 0,702
3	Forma B v.o. (PVP/VA)	2,98 ± 0,311	10,2 ± 1,06
	Forma B v.o. (HPMC-P)	2,93 ± 0,183	10,3 ± 0,627
	Forma B v.o. (Copolímero de ácido metacrílico de tipo C)	2,93 ± 0,142	10,2 ± 0,486

v.o. Administración oral mediante cápsula.

5 Se usó una cápsula de gelatina de tamaño 2 para suministrar las formulaciones en la fase 2 y se usó una cápsula de gelatina de tamaño 1 para el suministro en la fase 3. El contenido neto de fármaco en cada cápsula era de 30 mg, correspondiente a una dosificación de 10 mg/kg de fármaco, basándose en la suposición de que cada mono pesaba 3 kg. Se unió la cápsula a una sonda nasogástrica, se sondó el animal, y se liberó la cápsula desde el extremo de la sonda nasogástrica mediante presión de aire procedente de una jeringa vacía. Se administró una pequeña cantidad de agua (aproximadamente 10 ml) por vía oral después de la administración de la última cápsula.

10 Se extrajeron muestras de sangre en serie (de aproximadamente 1 ml) de la arteria o la vena femoral de cada animal y se transfirieron a tubos que contenían K₂-EDTA en cada uno de los siguientes puntos de tiempo (se registraron los tiempos reales):

Fase 2 Antes de la dosis, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 h tras la dosis
 Fase 3 Antes de la dosis, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 h tras la dosis

15 Se mezclaron meticulosamente todas las muestras tras la extracción y se pusieron en hielo húmedo, antes de refrigerarse a aproximadamente 4°C. Se analizaron las concentraciones en sangre de éster metílico de CDDO mediante HPLC-EM/EM.

20 Se proporcionan los resultados en la tabla 22 y en la figura 30. Para la fase 2, la forma B mostró una biodisponibilidad significativamente mejor que las dos formulaciones de la forma A sometidas a prueba. Los resultados de la fase 3 muestran que cada una de las formulaciones a base de dispersión de CDDO-Me : polímero tenía una biodisponibilidad mucho mayor que las formulaciones de o bien la forma A micronizada o bien la forma A nanocristalina. Las formulaciones de copolímero de ácido metacrílico tipo C y HPMC-P mostraron la mayor biodisponibilidad en los monos objeto.

25 Ejemplo 8 - Caracterización de la forma de hemibencenato de éster metílico de CDDO

30 Se realizaron diversos experimentos, reproduciendo la última etapa de recuperación a partir de la síntesis de éster metílico de CDDO. Honda *et al.*, 2000. El objetivo era el aislamiento de material cristalino a partir de una mezcla en disolución de benceno/acetona (10:1).

35 Se disolvieron aproximadamente 100 mg de éster metílico de CDDO en 300 µl de benceno/acetona (10:1) y se filtraron a través de un filtro de nailon de 0,2 µm. Entonces se sonicó la disolución usando un procesador ultrasónico durante 10 minutos y se permitió que se evaporase a temperatura ambiente en un vial sin tapar durante la noche. Se formó un gel transparente y se añadieron 100 µl de benceno/acetona (10:1). Se sometió la disolución a sonicación en un procesador ultrasónico durante aproximadamente 30 minutos. Se formó un precipitado blanco. Se permitió que los sólidos se secasen al aire.

40 En otros experimentos, se disolvieron aproximadamente 200 mg de éster metílico de CDDO en 0,8 ml de benceno/acetona (10:1) y se filtraron a través de un filtro de nailon de 0,2 µm. Entonces se dividió uniformemente la disolución en dos viales de 1 dragma. Se permitió que las muestras A y B se evaporaran rápidamente a temperatura ambiente durante unas cuantas horas. Se tapó la muestra A y se puso en un congelador. Después de congelarse la muestra, se permitió que la muestra se descongelase a temperatura ambiente. Se introdujo un pequeño rayado usando una espátula y se permitió que la muestra se evaporase a temperatura ambiente. Se formaron sólidos blancos y se permitió que se secasen al aire. Se tapó la muestra B, se dejó a temperatura ambiente y era una disolución transparente después de asentarse a temperatura ambiente durante la noche. Se introdujo un pequeño rayado usando una espátula y se permitió que la muestra se evaporase a temperatura ambiente. Se formaron sólidos blancos y se permitió que se secasen al aire.

50 Se obtuvo material cristalino, que se determinó que era un hemibencenato, a partir de varios de estos experimentos. Tal como se describió anteriormente, perturbaciones menores, tales como sonicación o meramente introducir un pequeño rayado dentro del recipiente de recogida, facilitarán la cristalización del solvato de benceno (tabla 12).

Se resumen los datos de caracterización del hemibencenato en la tabla 13. Se proporcionan los picos característicos para el espectro de XRPD del hemibencenato en la tabla 19. La curva de DSC presenta una endoterma ancha cerca de 133°C, asociada con ~7,0% de pérdida de peso en la figura 23 del termógrafo TG. La pérdida de peso se debe probablemente a la volatilización de benceno (véase la discusión de RMN a continuación), y corresponde a 0,5 moles de benceno por cada mol de éster metílico de CDDO. La endoterma de DSC observada cerca de 223°C resulta de la manera más probable de la fusión de material desolvatado.

Estos datos distinguen formas aisladas previamente de éster metílico de CDDO de la presente invención.

Ejemplo 9 - Caracterización de la forma novedosa de dimetanolato de éster metílico de CDDO

Se preparó un solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO según el procedimiento a continuación. Se disolvieron aproximadamente 500 mg de éster metílico de CDDO en 20 ml de metanol a 60°C. Entonces se añadió lentamente la disolución a 20 ml de metanol frío a -10°C con agitación. Se recogieron sólidos blancos mediante filtración a vacío y entonces se almacenaron en un congelador.

Se resumen los datos de caracterización en la tabla 14. Se proporcionan los picos característicos para el espectro de XRPD del dimetanolato en la tabla 18.

La curva de DSC muestra una endoterma ancha cerca de 102°C, asociada con -11% de pérdida de peso en el termógrafo TG (figura 24). Los datos de TGIR confirman que la pérdida de peso se debe a la volatilización de ~2,0 moles de metanol (figura 25). Se recuperó el material resultante del experimento de TGIR y era amorfo mediante XRPD (figura 26). También se observan un desplazamiento con respecto a la línea base a aproximadamente 130°C, una exoterma ancha cerca de 203°C seguida por una endoterma aguda (inicio: 223°C) en la curva de DSC. Estos acontecimientos son indicativos de la manera más probable de la T_g del material amorfo (forma B) obtenido a través de la desolvatación del solvato de dimetanol seguida por la cristalización del material amorfo en la forma A y la fusión de ese material cristalino.

Se obtuvo el espectro de RMN de protón en disolución. No se realizaron las asignaciones químicas; sin embargo parecen concordar con la estructura química de éster metílico de CDDO. Los picos a ~3,51 ppm se asignan a metanol y corresponden a ~1,7 moles. Este resultado concuerda con los datos térmicos anteriores.

Ejemplo 10 - Estudios clínicos con éster metílico de CDDO

Se seleccionó CDDO-Me, formulado usando la forma A micronizada, para el desarrollo clínico y se sometió a prueba en primer lugar en un estudio orientado a la seguridad de fase I en pacientes con cáncer avanzado que no habían respondido adecuadamente a terapias previas. En este ensayo de aumento a escala de la dosis de fase I, se administró CDDO-Me a 21 pacientes adultos con diversas formas de cáncer avanzado (metastásico). Se administró a los pacientes dosis diarias de cápsulas de CDDO-Me a dosis que oscilaron entre 5 y 900 mg/día (específicamente 5, 10, 20, 40, 80, 150, 300, 600 ó 900 mg/día). Se administró CDDO-Me en "ciclos" que se repitieron hasta que el paciente experimentó una toxicidad inaceptable o mostró evidencias de progresión de la enfermedad. En este estudio, un ciclo de CDDO-Me consistió en 21 días consecutivos de dosificación seguidos por un periodo de descanso de 7 días después de que el paciente fuera elegible para iniciar el siguiente ciclo.

Se revisaron tanto la seguridad como la actividad antitumoral de CDDO-Me. Además, se caracterizaron los efectos biológicos de CDDO-Me. CDDO-Me se toleró muy bien en estos pacientes, sin acontecimientos adversos relacionados con el fármaco significativos notificados. Se consideró que varios pacientes (aproximadamente el 75% de los pacientes evaluables) tenían una enfermedad estable (basándose en criterios radiológicos y clínicos convencionales) en el primer punto de evaluación tras la finalización del segundo ciclo de tratamiento. No se evaluaron formalmente los pacientes que se encontró que tenían evidencias de enfermedad progresiva antes de completar el segundo ciclo, y no se incluyeron en el grupo de pacientes evaluables. Cinco pacientes, incluyendo pacientes con melanoma y cáncer de células renales, continuaron mostrando enfermedad estable, algunos con evidencias de regresión de lesiones tumorales individuales, después de cuatro ciclos de tratamiento. Se consideró que cuatro pacientes tenían enfermedad estable después de al menos seis ciclos de tratamiento. No se desarrollaron nuevas metástasis en ningún paciente que recibió una dosis de al menos 40 mg de CDDO-Me al día según la pauta prescrita.

Basándose en las propiedades antiinflamatorias conocidas de CDDO-Me, se evaluaron las citocinas inflamatorias circulantes en los pacientes en el ensayo de fase I. A dosis de tan sólo 5 mg/día, hubo una reducción de varias quimiocinas y citocinas inflamatorias circulantes incluyendo MMP-9, TNF α , IL-8 y VEGF. En particular, TNF α , que se sabe que desempeña un papel significativo en el proceso inflamatorio de enfermedades tales como artritis reumatoide, se redujo sustancialmente o hasta por debajo de límites detectables en 3 pacientes con niveles de TNF elevados en el nivel inicial (un paciente a cada una de las dosis de tratamiento de 10, 20, y 40 mg al día). A diferencia de los anticuerpos monoclonales anti-TNF, que se unen a y vuelven las dianas inactivas, CDDO-Me reduce la producción de TNF α y los niveles circulantes resultantes de TNF α .

Adicionalmente, se han monitorizado los productos génicos de la fase 2, incluyendo enzimas de detoxificación y antioxidantes, en células mononucleares de sangre periférica de pacientes en el estudio de fase I. Se ha observado una inducción significativa de NQO1 (NAD(P)H: quinona oxidoreductasa), un marcador de actividad transcripcional de fase 2, a dosis de 10 mg/día e inferiores.

Los datos de biopsias tumorales de varios pacientes, tomados después de dos ciclos de tratamiento con CDDO-Me, indicaron reducciones pronunciadas en los niveles en tejido tumoral de ciclooxigenasa-2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y STAT3 fosforilado (pSTAT3). Se sabe que los altos niveles de expresión de cada una de estas proteínas se correlacionan con la progresión tumoral y malos desenlaces clínicos. Los datos de biopsias tumorales en varios pacientes también indicaron un grado pronunciado de muerte de células tumorales después de dos ciclos de tratamiento con CDDO-Me. Los niveles de creatinina en suero fueron significativamente menores en el día 21, en comparación con el nivel inicial antes del tratamiento, en más del 80% de los pacientes en este estudio. Varios pacientes que continuaron con el tratamiento durante múltiples ciclos mostraron reducciones continuadas en la creatinina en suero. Puesto que la creatinina en suero es un indicador de la función renal usado ampliamente, estas observaciones indican que el tratamiento con CDDO-Me mejora la función renal.

Estos estudios proporcionan datos en pacientes humanos con cáncer que muestran el efecto beneficioso del éster metílico de CDDO en pacientes que tienen cáncer. Los datos indican además que es probable que CDDO-Me tenga efectos clínicamente útiles en pacientes que tienen otras enfermedades relacionadas con la inflamación, incluyendo la disfunción renal.

Ejemplo 11 - Producción a gran escala de la forma B usando un producto intermedio de solvato de dimetanol

Se disolvió un kilogramo de la forma A de CDDO-Me en metanol a $60 \pm 5^\circ\text{C}$ para proporcionar una disolución completa. Se añadió la disolución de CDDO-Me caliente resultante a un recipiente que contenía metanol frío a de -5°C a -15°C , mientras se mantenía agitación y una temperatura de -5°C a -15°C a lo largo de toda la adición. Se filtró la suspensión de solvato de dimetanol cristalino de CDDO-Me resultante. Se secaron los sólidos resultantes, que presentaban un espectro de XRPD que concuerda con el presentado en la figura 26 (antes de análisis TGIR), en un horno a $70 \pm 5^\circ\text{C}$. Se continuó el secado hasta que el perfil de XRPD no presentó reflexiones características de la sustancia cristalina. Se hicieron pasar los sólidos de CDDO-Me amorfos en XRPD resultantes a través de un tamiz y se envasaron. La recuperación del producto oscila entre el 65-95%.

Ejemplo 12 - Forma A y forma B sometidas a criotrituración

Se sometió a criotrituración y se analizó la forma A. Los datos de rayos X medidos de la muestra obtenida a través de criotrituración (2 horas) mostraron cierto ensanchamiento en el pico a aproximadamente $13,5^\circ$ de 2θ . El análisis de PDF de la forma A sometida a criotrituración produjo resultados similares al análisis de la forma B. Estos resultados sugieren que la forma A sometida a criotrituración es un material vítreo y que la criotrituración puede proporcionar un método alternativo para producir la forma B.

Se sometió a criotrituración y se analizó la forma B. Los datos de rayos X medidos de la muestra obtenida a través de criotrituración (1 hora) fueron similares a los del material de partida de la forma B. Estos resultados indican que la forma B es estable y no cambia de forma debido a la criotrituración.

Tabla 1 – Información de las muestras

INFORMACIÓN DE LAS MUESTRAS	DESCRIPCIÓN	RESULTADO DE XRPD
No micronizada	Polvo blanco	A
micronizada	-	A

Tabla 2 - Solubilidades aproximadas de éster metílico de CDDO

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD (mg/ml) ^a
Acetona	70
ACN (acetonitrilo)	66
DCM (diclorometano)	> 194
1,4-Dioxano	21
EtOH (etanol)	4
EtOAc (acetato de etilo)	36
Hexanos	< 1
(10:1) Isopropanol/agua	4
MeOH (metanol)	8
MTBE (terc-butil metil éter)	4
THF (tetrahidrofurano)	97
Tolueno	38

Agua	< 0,1
a Se calcularon las solubilidades basándose en el disolvente total usado para proporcionar una disolución; las solubilidades reales pueden ser mayores por el volumen de las porciones de disolvente usadas o una lenta velocidad de disolución. Se redondean las solubilidades al mg/ml más cercano.	

Tabla 3 - Experimentos de cristalización con éster metílico de CDDO

DISOLVENTE	CONDICIONES ^a	HÁBITO/DESCRIPCIÓN	RESULTADO DE XRPD
Acetona	FE	Fragmentos blancos	A
	SE	Vidrio roto blanco	Forma B
Acetona/hexanos (3:10)	SC	Ningún sólido	-
ACN	FE	Vidrio roto blanco	A + Forma B
	SE	Fragmentos blancos	A
ACN/agua (7:5)	SC	Pequeñas hojas blancas	A
DCM	Rotovap	Vidrio roto blanco	Forma B
	FE	Vidrio roto	Forma B
	SE	Vidrio roto blanco	Forma B
DCM/hexanos (1:5)	SC	Ningún sólido	-
1,4-Dioxano	FD	Sólido blanco esponjoso	Forma B
EtOH	FE	Fragmentos blancos	A
	SE	Trozos defectuosos blancos	A
	SC	Pequeñas pastillas blancas	A
EtOAc	FE	Vidrio roto blanco	Forma B
	SE	Vidrio roto blanco	Forma B
	SC	Ningún sólido	-
IPA/agua (10:1)	SC	Pequeñas pastillas blancas	A
MeOH	FE	Fragmentos blancos	A
	SE	Pastillas blancas, trozos defectuosos	A
	SC	Pastillas piramidales	A ^b
MTBE	FE	Vidrio roto blanco	Forma B
	SE	Vidrio roto blanco	Forma B
	SC	Ningún sólido	-
THF	FE	Vidrio roto blanco	Forma B
	SE	Vidrio roto blanco	Forma B
THF/hexanos (1:2)	SC	Ningún sólido	-
Tolueno	FE	Fragmentos blancos	Forma B
	SE	Vidrio roto blanco	Forma B
	SC	Ningún sólido	-
-	Fusión/enfriamiento rápido	Vidrio roto transparente	Forma B

^a FE = evaporación rápida, SE = evaporación lenta, SC = enfriamiento lento, las temperaturas son aproximadas, FD = liofilización. rotovap = evaporación rotatoria

^b determinación de la estructura de monocristal

5

Tabla 4 – Experimentos de suspensión espesa de éster metílico de CDDO

DISOLVENTE	TIEMPO (DÍAS)	HÁBITO/DESCRIPCIÓN	RESULTADO DE XRPD
IPA/agua (10:1)	7	Pedazos blancos	A
MTBE	10	Fragmentos blancos	A
MeOH	10	Fragmentos blancos	A

Tabla 5 - Experimentos de precipitación en frío de éster metílico de CDDO

DISOLVENTE	ANTIDISOLVENTE	HÁBITO/DESCRIPCIÓN	RESULTADO DE XRPD
Acetona	Hexanos	Ningún sólido	-
	Agua	Sólido blanco	A
DCM	Hexanos	Ningún sólido	-
THF	Agua	Sólido blanco	A

Tabla 6 - Datos de caracterización de la forma A

5

TÉCNICA ANALÍTICA	RESULTADOS ^a
XRPD	A
DSC	Desplazamiento con respecto a la línea base a 157°C, endoterma a 224°C
TGA	pérdida de peso del 0,3% hasta 150°C pérdida de peso del 1,2% desde 150 hasta 210°C
KF	0,38%
Platina caliente	28,9: comienzo del calentamiento 150,1: - 176,4: - 200,2: sin cambios 225,9: fusión 227,9: punto de fusión
MB	Cambio de peso insignificante a lo largo de todo el experimento
XRPD tras MB	A
SEM ^b	Piramidales, pastillas y placas
RMN (CDCl ₃)	Concuera con la estructura
^a todas las temperaturas son en °C, endo = endoterma	
^b resultados basados en las imágenes tomadas	

Tabla 7 – Estudios de estrés de la forma A

CONDICIONES ^a	HÁBITO/ DESCRIPCIÓN	RESULTADO DE XRPD
25°C/HR del 60% 3 días: pérdida del 1,5% 7 días: pérdida del 0,6%	Polvo blanco	A
40°C/HR del 75% 3 días: pérdida del 1,4% 7 días: aumento del 0,2%	Polvo blanco	A
195°C ^b 15 minutos: pérdida del 2%	Polvo blanco	A
molienda de 20 min., en seco	Polvo blanco	A
molienda en húmedo de 20 min., agua	Polvo blanco	A

10

Tabla 8 - Datos de caracterización de la forma B de éster metílico de CDDO

TÉCNICA ANALÍTICA	RESULTADOS ^a
XRPD	Forma B
MDSC	Tg ~125°C
RMN (CDCl ₃)	Concuera con la estructura

Tabla 9 - Estudios de estrés de la forma B de éster metílico de CDDO

CONDICIONES ^a	HÁBITO/DESCRIPCIÓN	RESULTADO DE XRPD ^c
22°C/HR del 97% 7 días	Vidrio roto	Forma B
40°C/HR del 75% 8 días	Vidrio roto	Forma B
80°C/HR del 0% -24 horas	Vidrio roto blanco, fragmentos redondeados transparentes	Forma B
195°C ^b 5 minutos	Finos blancos	Forma B
200°C ^b 60 minutos	Pedazos birrefringentes blancos	A + Forma B

		(min)
^a RH = humedad relativa, Tg = temperatura de transición vítrea ^b humedad iab ambiental se midió que era 74% RH ^c min = minoritario		

Tabla 10 – Datos cristalinos y parámetros de recogida de datos de la forma A

fórmula	C ₃₂ H ₄₃ NO ₄
peso fórmula	505,70
grupo espacial	P 43 21 2 (n.º 96)
a, Å	14,21620(10)
c, Å	81,5875(12)
V, Å ³	16488,9(3)
Z	24
d _{calc.} g cm ⁻³	1,222
dimensiones del cristal, mm	0,01 x 0,01 x 0,00 ^b
temperatura, K	150.
radiación (longitud de onda, Å)	Mo K _α (0,71073)
nonocromador	grafito
coef. de abs. lineal, mm ⁻¹	0,074
corrección de absorción aplicada	empirical ^a
factores de transmisión: min, max	0,9995, 0,9999
difractómetro	Nonius KappaCCD
intervalo h, k, l	-15 a 15 -10 a 10 -86 a 72
intervalo de 2 θ, grados	4,08-44,43
mosaicidad, grados	0,32
programas usados	SHELXTL
F000	6576,0
ponderación 1/[σ ² (F _o ²)+(0,0176P) ² +0,0000P]	
donde P=(F _o ² +2F _c ²)/3	
datos recogidos	46742
datos únicos	9168
R _{int}	0,093
datos usados en el refinamiento	9168
corte usado en los datos de los cálculos del factor R	F _o 2>2,0σ(F _o 2)
datos con I>2,0σ(I)	5421
número de variables	1024
mayor desplazamiento/esd en el ciclo final	0,00
R(F _o)	0,051
R _w (F _o ²)	0,085
bondad del ajuste	1,045

^a Otwinowski Z. & Minor, W. Methods Enzymol., 1997, 276, 307.

^b Las dimensiones del cristal son aproximadas

5

Tabla 11 – Resumen del área bajo la curva de concentración en plasma (AUC) frente al tiempo en todos los animales estudiados (n=8)

ESTUDIO DE FORMULACIONES DE ÉSTER METÍLICO DE CDDO – COMPUESTO ORIGINAL			
n.º de mono objeto	AUC de la forma A (ng/ml*h)	AUC de la forma B (ng/ml*h)	% de forma B con respecto a forma A
501M	37,5	203,4	542
502M	28,3	204,7	723
503F	21,3	107,3	504
504F	N/A	175	N/A
505M	60,4	158,3	262
506M	N/A	N/A	N/A
507F	57,3	164	286
508F	37,3	228	611
Media	40,4	177,2	439
Mediana	37,4	175,0	523
Intervalo (min-max)	21 - 60,4	158 - 228	262 - 723%
N/A - sin determinar.			

Tabla 12 - Experimentos de cristalización de éster metílico de CDDO.

DISOLVENTE	CONDICIONES ^a	DESCRIPCIÓN	RESULTADO DE XRPD
Benceno/acetona 10:1	RE, temperatura ambiente	Sólido blancos	Amorfo en rayos X
Benceno/acetona 10:1	FE seguido por secado a 60°C	Gel transparente	-
Benceno/acetona 10:1	FE con capilares	Película transparente	-
Benceno/acetona 10:1	FE, se tapó y se puso en un congelador durante la noche, se rayó el vial usando una espátula de metal y se dejó evaporar a temperatura ambiente	Sólido blanco	Solvato de benceno
Benceno/acetona 10:1	FE, se tapó y se dejó asentar a temperatura ambiente durante la noche, se rayó el vial usando una espátula de metal y se dejó evaporar a temperatura ambiente	Sólido blanco	Solvato de benceno
Benceno/acetona 10:1	FE con sonicación	Sólido blancos	Solvato de benceno

^a RE = evaporación rotatoria, FE = evaporación rápida

5

Tabla 13 - Caracterización de solvato de hemibenceno de éster metílico de CDDO

TÉCNICA ANALÍTICA	RESULTADOS
XRPD	Solvato de hemibenceno
	Endoterma 133°C
DSC, 10°C/min	Endoterma 223°C (inicio a 221°C) Pérdida de peso del 7,0% hasta 160°C
TG, 10°C/min	Corresponde a 0,5 moles de benceno
¹ H-RMN (CDCl ₃)	Concuerda con la estructura ~0,5 moles de benceno evidentes

Tabla 14 - Caracterización de Éster metílico de CDDO Solvato de dimetanol

TÉCNICA ANALÍTICA	RESULTADOS
XRPD	Solvato de dimetanol
	Endoterma a 102°C Desplazamiento con respecto a la línea base a 130°C Exoterma ancha a 203°C Endoterma a 225°C (inicio: 223°C)
DSC, 10°C/min	Pérdida de peso del 11% hasta 110°C Corresponde a ~2,0 moles de metanol
TG, 10°C/min	Pérdida de peso del 9,8% hasta 110°C Corresponde a ~1,7 moles de metanol
TGIR, 20°C/min	Componente volátil identificado como metanol
XRPD tras TGIR	Amorfo en rayos X
IR	Concuerda con la estructura
¹ H-NMR (CDCl ₃)	Concuerda con la estructura ~1,7 moles de metanol evidentes

10

Tabla 15 - Estudios de estrés de la forma B micronizada de éster metílico de CDDO

Condiciones de estrés ^a	FORMA B PRODUCIDA MEDIANTE EL PROCEDIMIENTO DEL EJEMPLO 11		FORMA B PRODUCIDA MEDIANTE AISLAMIENTO A PARTIR DE MEZCLAS DE ACETATO DE ETILO Y ETANOL	
	Resultado de XRPD	Resultado de KF	Resultado de XRPD	Resultado de KF
80°C/P ₂ O ₅ , 14d	Forma B	NP	NP	NP
80°C/ P ₂ O ₅ , 28 d	Forma B	1,10	100% de forma A	0,37
60°C/23% RH, 28d	Forma B	0,04	-50% de forma A + Forma B	0,02
40°C/48% RH, 28d	Forma B	0,00 ^b	Forma B	0,39

25°C/HR del 75%, 14d	Forma B	NP	NP	NP
25°C/HR del 75%, 28d	Forma B	0,77	Forma B	0,58
^a RH = humedad relativa				
^b El valor actual fue negativo				

Tabla 16 – Actividad anticancerígena del agente individual CDDO-Me

MODELO	AGENTE/VÍA	ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA	COMENTARIOS
Xenoinjerto de cáncer de pulmón NCI-H460 (rata atímica)	CDDO-Me, v.o.	78% de TGI ¹	Efectos dependientes de dosis.
Xenoinjerto de cáncer de mama MCF-7/Her-2 (ratón atímico)	CDDO-Me, i.v.	15% de regresión	CDDO-Me tan eficaz como la radiación
Modelo de metástasis de cáncer de mama singénico 4T1 (ratón) – tratamiento temprano	CDDO-Me, i.v.	100% de supresión	Resultados superiores obtenidos en tumores que sobre expresaron Her-2a
Modelo de metástasis de cáncer de mama singénico 4T1 (ratón) – tratamiento retrasado	CDDO-Me, i.v.	67% de supresión	Todos los animales quedaron libres de tumores en el día de sacrificio el día 85 ^b
Xenoinjerto de cáncer de páncreas L3.6PL (ratón atímico)	CDDO-Me, i.v	51% de TGI	33% de los animales libres de tumores en el día de sacrificio el día 95 ²
Xenoinjerto de cáncer de próstata DU-145 (rata atímica)	CDDO-Me, v.o.	77% de TGI	CDDO-Me supera Gemcitabine
			Múltiples pautas sometidas a prueba - TGI 60-77%
¹ TGI = los datos de inhibición del crecimiento tumoral son de dosis a o inferiores a la MTD (definida como ≤10% de mortalidad y ≤20% de pérdida de peso).			

5

Tabla 20 – Disoluciones preparadas para secado por pulverización

RAZÓN DE SÓLIDOS	40% de la forma B, 60% de polímero	60% de la forma B, 40% de polímero
POLÍMERO	Copolímero de ácido metacrílico de tipo C	HPMCP HP-55
DISOLVENTE	Acetona	Acetona
CONC. % p/p	10	10
TEMPERATURA °C	-20	-20
OBSERVACIONES	La disolución mostró cierta turbidez que tras la carga del polímero. Se calentó una muestra de la solución hasta 35/40°C, pero la turbidez no desapareció y se observó cierta floculación.	La disolución era completamente transparente tras la carga del polímero. Las dos ejecuciones realizadas usaron la disolución en el mismo día que se preparó.
^a Konopleva, <i>et al.</i> , "Synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induce growth arrest in HER2-overexpressing breast cancer cells," <i>Mol Cancer Ther.</i> 2006, 5: 317-28.		
^b Ling, <i>et al.</i> , "The novel triterpenoid C-28 methyl ester of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid inhibits metastatic murine breast tumor growth through inactivation of STAT3 signaling," <i>Cancer Res.</i> 2007, 67: 4210-8.		

Tabla 21 - Características de las formulaciones sometidas a prueba

Polímero	Copolímero de ácido metacrílico, tipo C	HPMCP HP-55
Pruebas		
Descripción	Sólido blanco	Sólido blanco
Difracción de rayos X de polvo	No se detectaron picos cristalinos	No se detectaron picos cristalinos
Agua	1,50% p/p	-
DSC - Tg (punto de inflexión)	106°C	118°C
Valoración (mediante HPLC)	409% p/p (calculado con respecto a una base anhidra y libre de disolvente)	59,4% p/p (calculado con respecto a una base anhidra y libre de disolvente)
Total de impurezas (HPLC)ti	área del 1,14%	área del 0,42%

Tamaño de partícula (D50)	21 µm	
Densidad aparente	0,18g/cm ³ (calculado con 4 g de producto)	0,19 g/cm ³ (calculado con 4 g de producto)

Tabla 22 - Concentraciones medias de CDDO-Me en plasma de monos macacos en muestras de fase 2 y 3

Concentraciones medias de éster metílico de CDDO (ng/ ml)						
Tiempo	Forma A v.o. (nanocristalina)	Forma B v.o. (micronizada)	Forma A v.o. (micronizada cristalina)	Forma B v.o. (PVP/VA)	Forma B v.o. (HPMCP)	Forma B v.o. (Eudragit L100-55)
Antes de la dosis	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
5 min	NST	NST	NST	NST	NST	NST
10 min	NST	NST	NST	NST	NST	NST
15 min	NST	NST	NST	NST	NST	NST
30 min	NST	NST	NST	NST	NST	NST
1 h	1,53 ± 1,49	6,01 ± 5,67	0,619 ± 0,207	9,45 ± 3,64	9,94 ± 4,83	9,06 ± 4,38
2 h	3,00 ± 2,02	14,5 ± 9,63	0,505 ± 0,260	14,8 ± 3,04	24,1 ± 13,2	22,2 ± 11,7
4 h	3,52 ± 1,30	32,0 ± 11,6	1,15 ± 0,73	27,3 ± 3,79	50,7 ± 10,0	50,6 ± 19,3
8 h	8,56 ± 2,32	33,3 ± 8,44	4,31 ± 1,35	30,4 ± 10,8	40,0 ± 15,6	51,1 ± 8,72
16 h	7,90 ± 2,26	14,2 ± 5,68	5,39 ± 1,12	13,3 ± 3,92	15,4 ± 7,41	25,6 ± 13,9
24 h	4,40 ± 2,33	5,23 ± 1,86	3,05 ± 1,42	6,39 ± 2,02	5,79 ± 2,95	7,47 ± 4,10
36 h	NST	NST	NST	NST	NST	NST
48 h	0,649 ± 0,342	0,576 ± 0,175	0,419 ± 0,291	1,78 ± 1,61	0,983 ± 0,34	1,37 ± 0,626
72 h	0,312 ± 0,390	0,408 ± 0,368	0,0169 ± 0,0252	0,395 ± 0,319	0,448 ± 0,283	0,344 ± 0,461

NST No se tomó muestra.

BLQ Por debajo del límite de cuantificación (1,00 ng/ml).

i.v. administración intravenosa.

v.o. Administración oral mediante cápsula.

Los valores en negrita y cursiva se calcularon usando todos los valores presentados en el Apéndice 3, por consiguiente la media puede diferir de las medias calculadas cuando se supone que los valores que están BLQ son cero.

5

Publicaciones citadas

- Sheldrick, G. M. SHELX97, A PROGRAM FOR CRYSTAL STRUCTURE REFINEMENT, University of Gottingen, Germany (1997).
- Otwinowski, Z.; Minor, W. Methods Enzymol. 1997, 276, 307.
- Bruker, XPREP en SHELXTL v. 6,12., Bruker AXS Inc., Madison, WI (2002).
- Bruno, *et al.*, Acta Crystallogr. 2002, B58, 389
- INTERNATIONAL TABLES FOR CRYSTALLOGRAPHY, Vol. C, Tables 4.2.6.8 y 6.1.1.4, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands (1992).
- Kraus, W., y G. Nolze, POWDER CELL FOR WINDOWS VERSIÓN 2.3, Federal Institute for Materials Research and Testing, Berlin (1999).
- Johnson, C. K. ORTEP III, Report ORNL-6895, Oak Ridge National Laboratory, TN, U.S.A. 1996.
- Watkin, D. J.; Prout, C. K.; Pearce, L. J. Cameron, CHEMICAL CRYSTALLOGRAPHY LABORATORY, University of Oxford, Oxford, 1996.
- OPTEP-3 for Windows V1.05., Farrugia, L.J., J. Appl. Cryst. 1997, 30, 565.
- Bore, *et al.*, Acta Cryst. 2002, C.58, o199-o200.
- Honda, *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1997, 7, 1623.
- Honda, *et al.*, loc. cit. 1998, 8, 2711-14.
- Honda, *et al.*, J. Med. Chem. 2000, 43, 1866.

35

14. Honda, *et al.*, loc. cit., 4233.
15. Honda, *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2002, 12, 1027.
- 5 16. Zhou, *et al.*, J. Pharmaceutical Sciences 2002, 91, 1863.
17. Cui *et al.*, Int'l J. Pharmaceutics, 2007 339, 3-18.
- 10 18. Repka *et al.*, Hot-melt extrusión technology In: ENCLOPEDIA OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, 2ª ed (Marcel Dekker, 2002), páginas 203-06.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Forma sólida vítrea de éster metílico de CDDO, que tiene un espectro de difracción de rayos X de polvo con un pico de halo a aproximadamente $13,5^\circ$ de 2θ , tal como se muestra en la figura 2C, y una T_g .
2. Forma de solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO, que tiene un espectro de difracción de rayos X de polvo con picos característicos tal como se muestra en la tabla 18 y un espectro de DSC tal como se muestra en la figura 24.
- 10 3. Composición farmacéutica en forma de dosificación sólida, que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma sólida vítrea de éster metílico de CDDO según la reivindicación 1 con (ii) un vehículo comestible.
- 15 4. Método para la producción de la forma sólida vítrea de éster metílico de CDDO según la reivindicación 1, que comprende (a) preparar una forma de solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO, que tiene un espectro de difracción de rayos X de polvo con picos característicos tal como se muestra en la tabla 18 y un espectro de DSC tal como se muestra en la figura 24, y (b) secar la forma de solvato de dimetanol para obtener dicha forma sólida vítrea.
- 20 5. Forma sólida vítrea de éster metílico de CDDO según la reivindicación 1, que tiene un espectro de PDF con los picos característicos de la figura 28 de desde aproximadamente 5 Å hasta aproximadamente 20 Å.
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de un estado canceroso.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, que comprende además otro fármaco anticancerígeno.
- 25 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que el otro fármaco anticancerígeno es gemcitabina y el estado canceroso es cáncer de páncreas.
9. Forma sólida vítrea de éster metílico de CDDO según la reivindicación 1, que tiene un valor de T_g en el intervalo de aproximadamente 120°C a aproximadamente 135°C .
- 30 10. Forma sólida vítrea de éster metílico de CDDO según la reivindicación 1, que tiene un valor de T_g en el intervalo de aproximadamente 125°C a aproximadamente 130°C .
- 35 11. Composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de éster metílico de CDDO y (ii) un excipiente que es un formador de vidrio, de manera que dicha composición tiene una T_g .
- 40 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que el excipiente se selecciona del grupo que consiste en (A) un hidrato de carbono, derivado de hidrato de carbono o polímero de hidrato de carbono, (B) un polímero orgánico sintético, (C) una sal de ácido orgánico, (D) una proteína, un polipéptido o péptido, y (E) un polisacárido de alto peso molecular.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, en la que el excipiente es un polímero orgánico sintético.
- 45 14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, en la que el excipiente se selecciona del grupo que consiste en una hidroxipropil-metilcelulosa, un poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etileno] o copolímero de los mismos, y un copolímero de ácido metacrílico.
- 50 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, en la que el excipiente es éster de ftalato de hidroxipropil-metilcelulosa.
16. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, en la que el excipiente es PVP/VA.
- 55 17. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, en la que el excipiente es copolímero de ácido metacrílico - acrilato de etilo (1:1).
18. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, en la que el excipiente es copovidona.

Figura 1 - Estructura química del éster metílico de CDDO

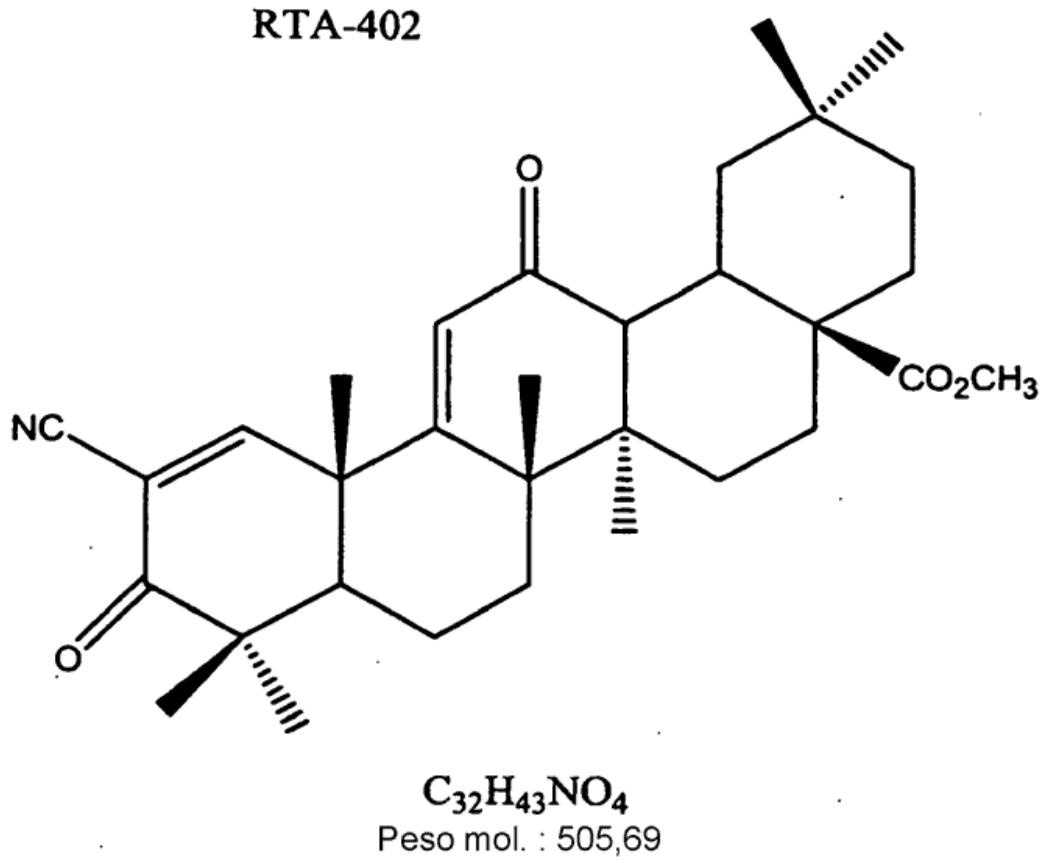


Figura 2 - Espectro de XRPD de la forma A (parte superior) y la forma B (parte inferior).
De arriba hacia abajo: forma A no micronizada (2A), forma A micronizada (2B) y forma B (2C).

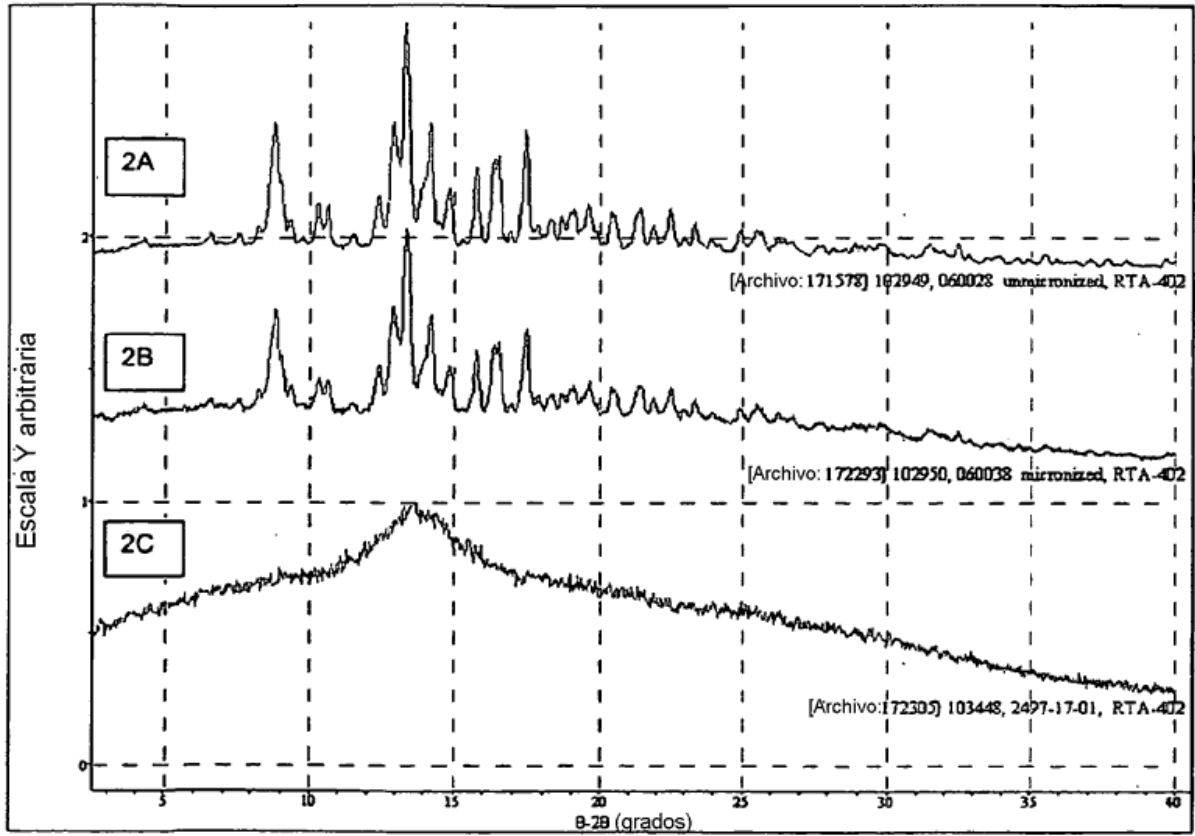


Figura 3 - Curva de DSC y TG del éster metílico de CDDO

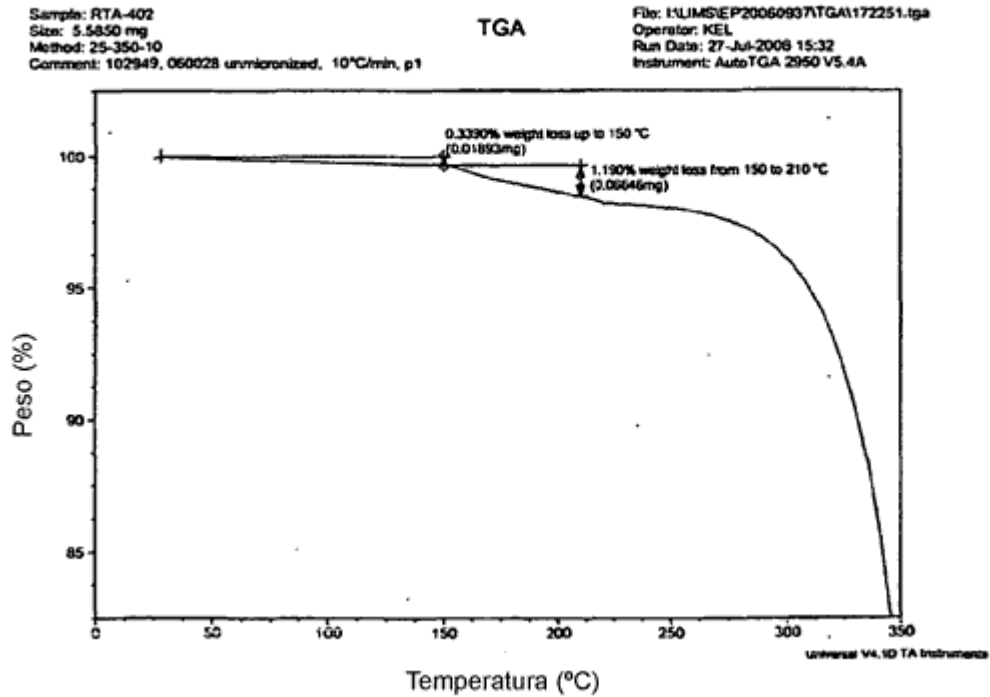
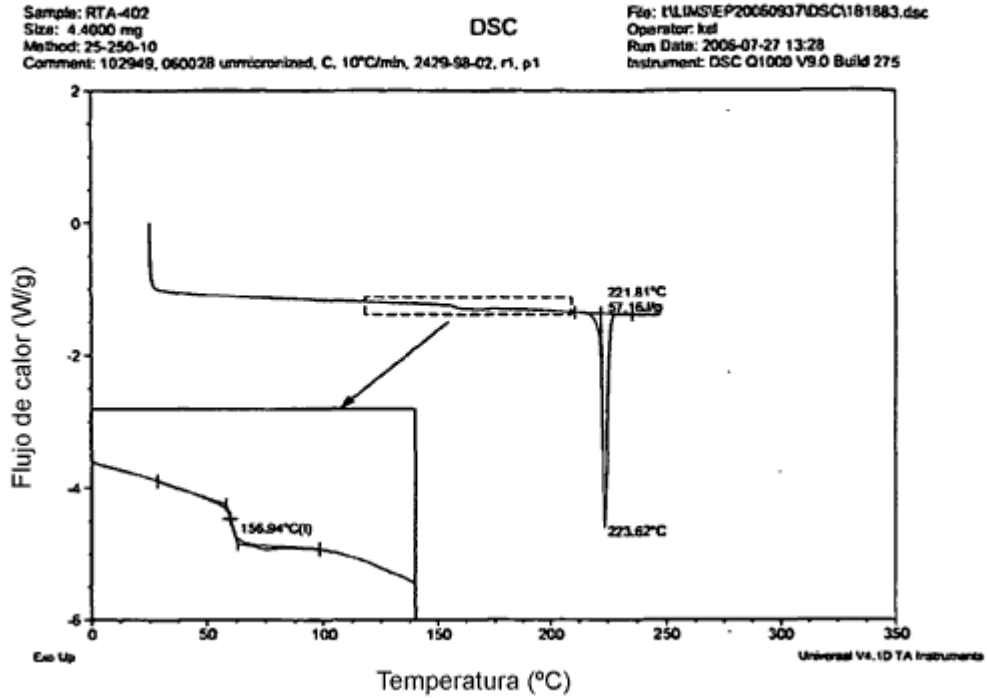


Figura 4 - Análisis en platina caliente de la forma A - no micronizada

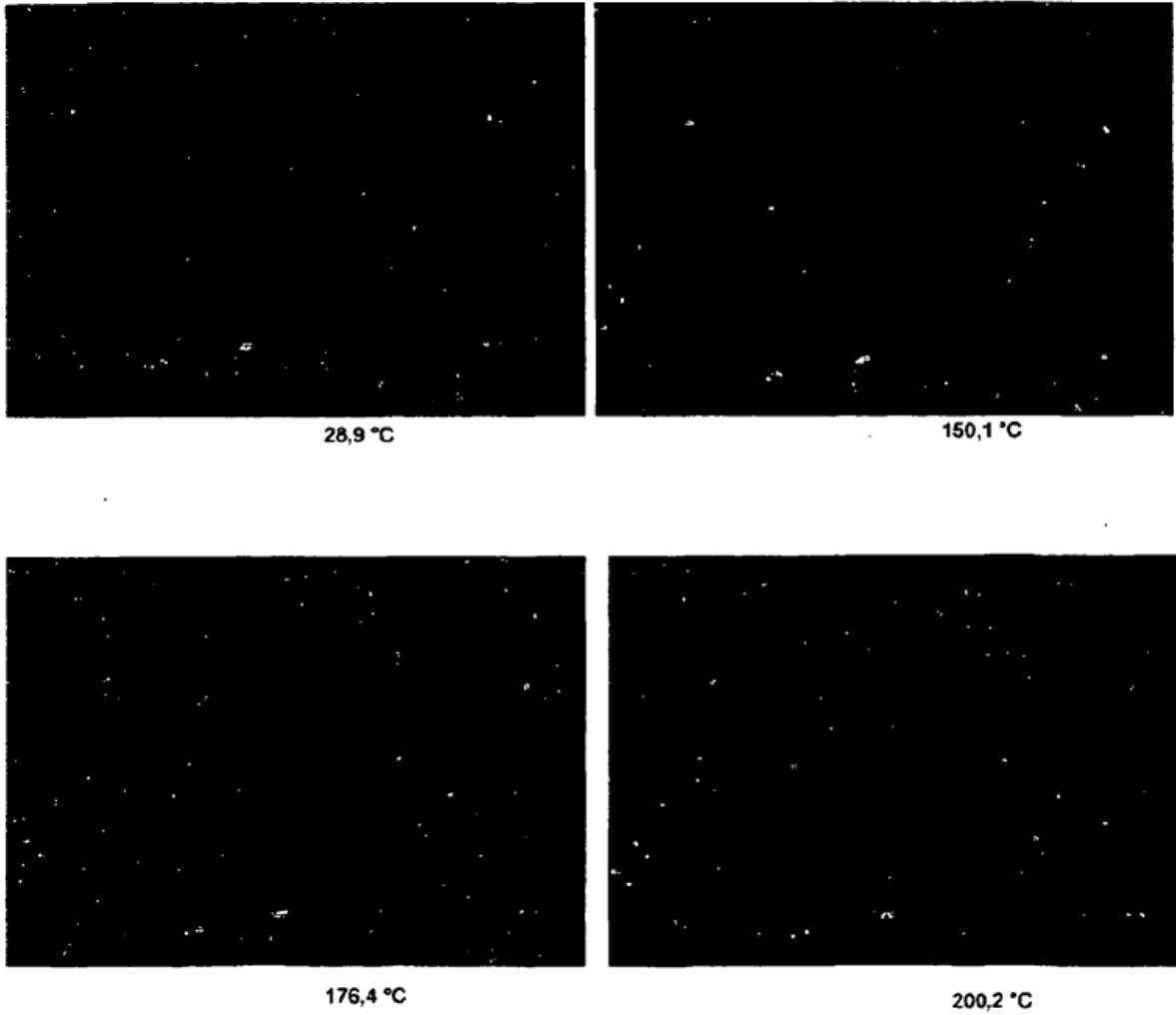
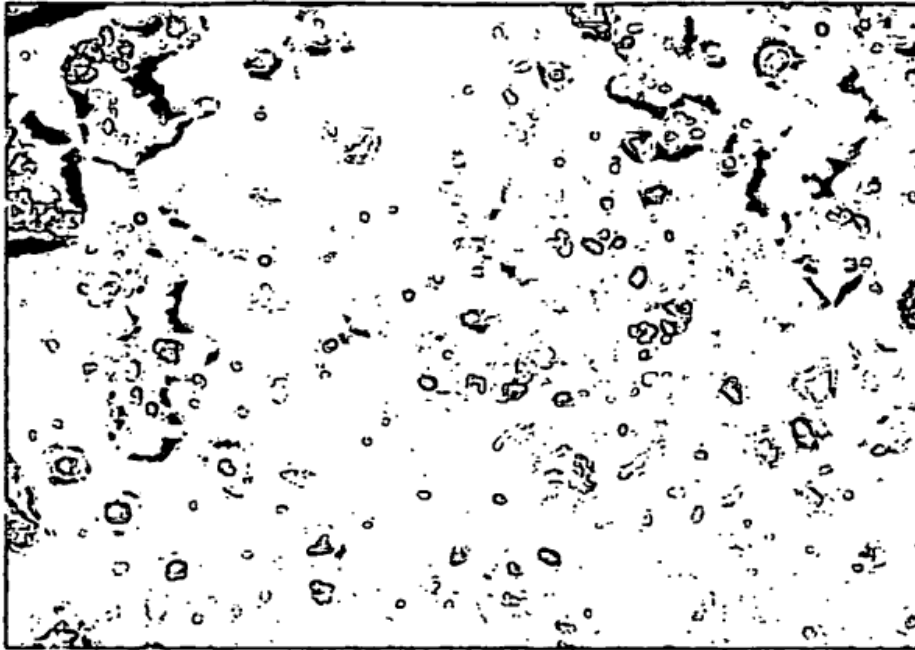


Figura 4 (continuación) - Análisis en platina caliente de la forma A - no micronizada



225,9 °C

Figura 5 - Isoterma de sorción dinámica de vapor de la forma A - no micronizada

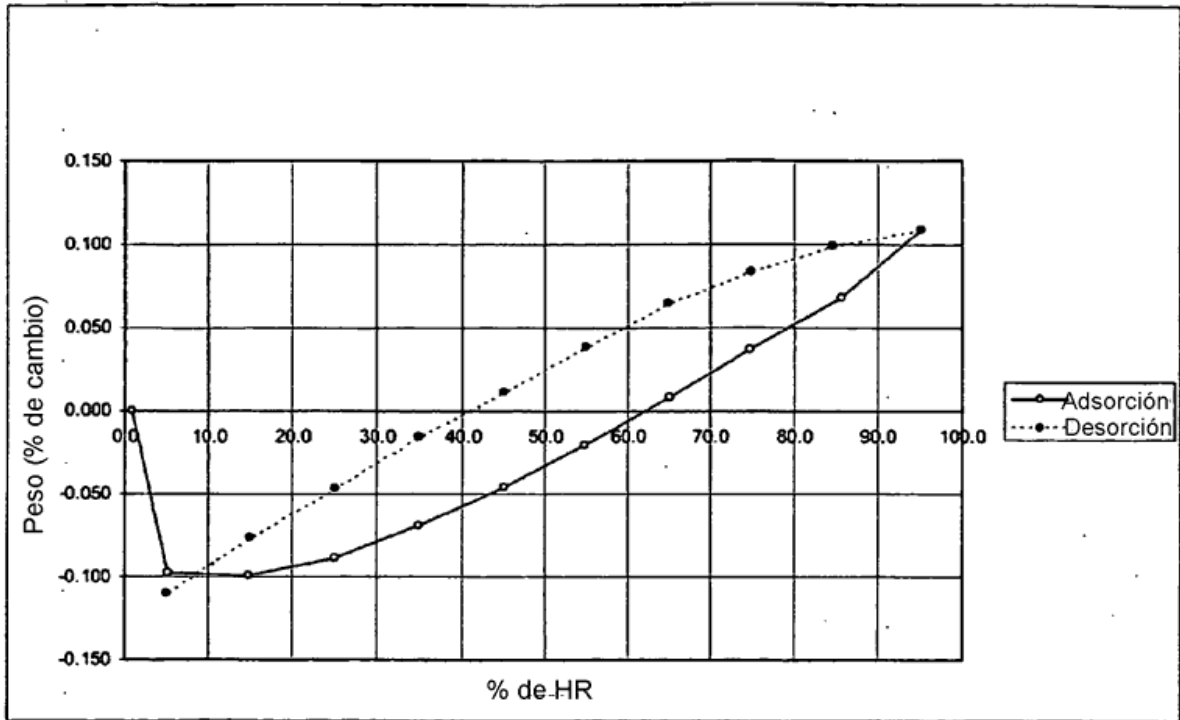


Figura 6 - Imágenes de SEM de la forma A - no micronizada

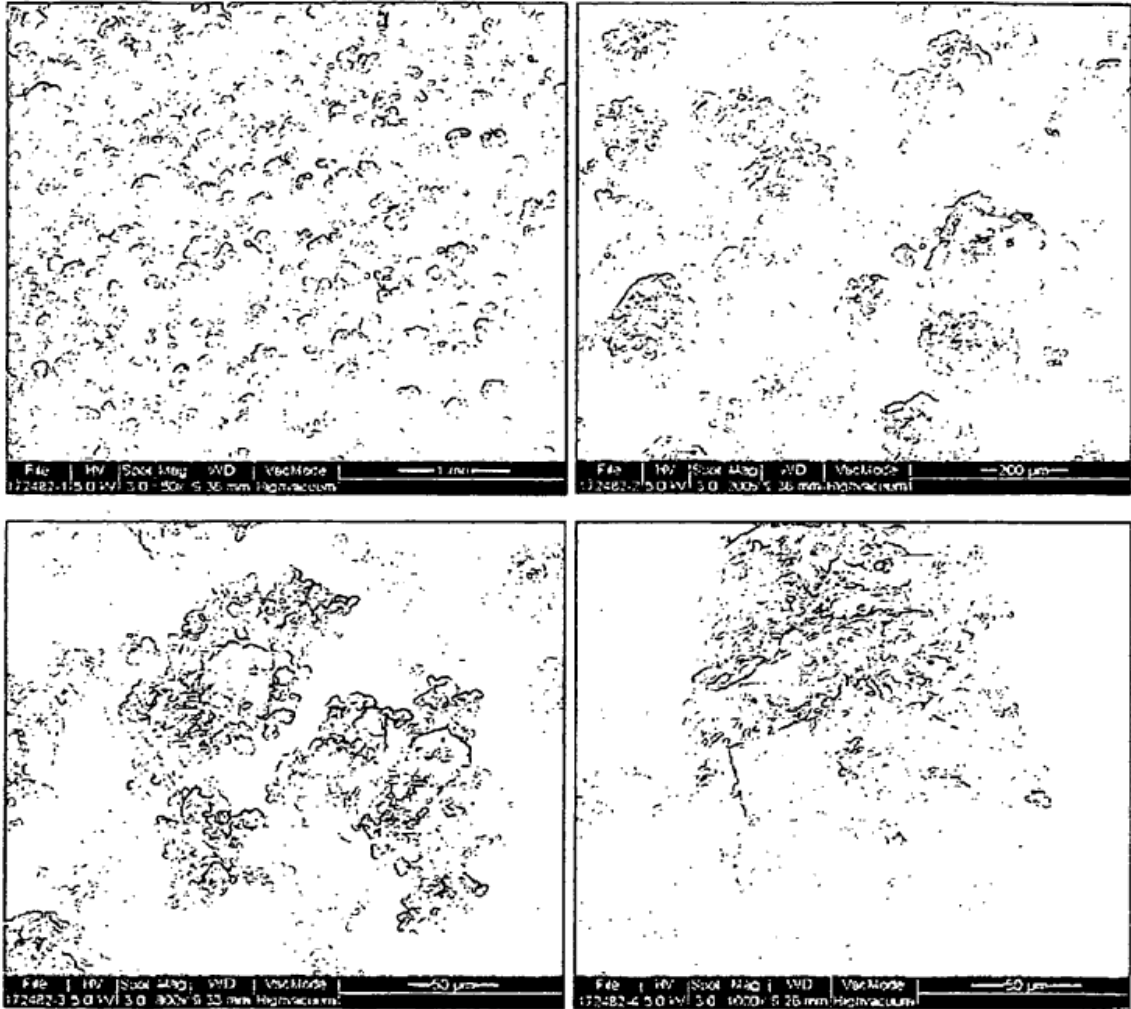


Figura 6 (continuación) - Imágenes de SEM de la forma A - no micronizada

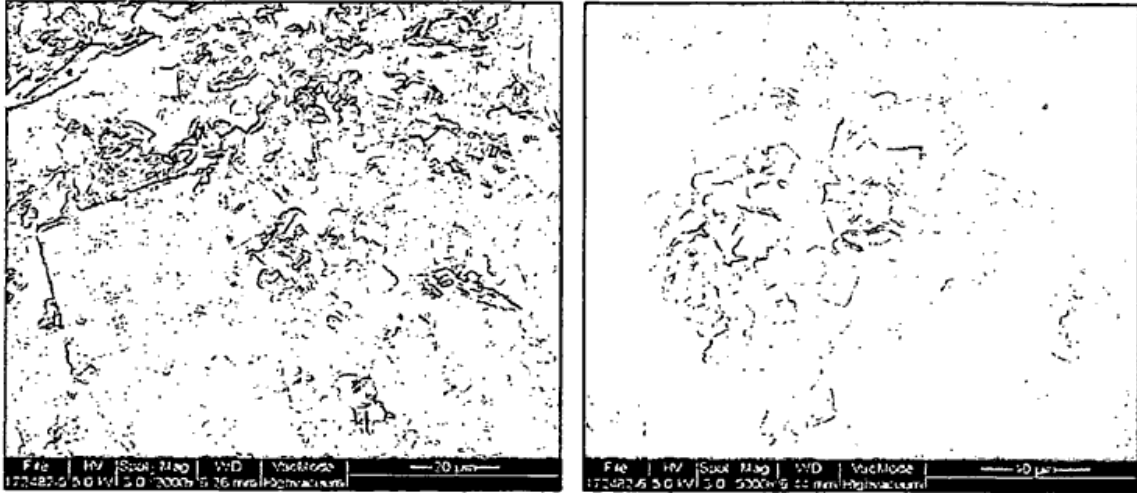


Figura 7 - Forma A antes (parte superior) y después (parte inferior) de estrés a 195°C.

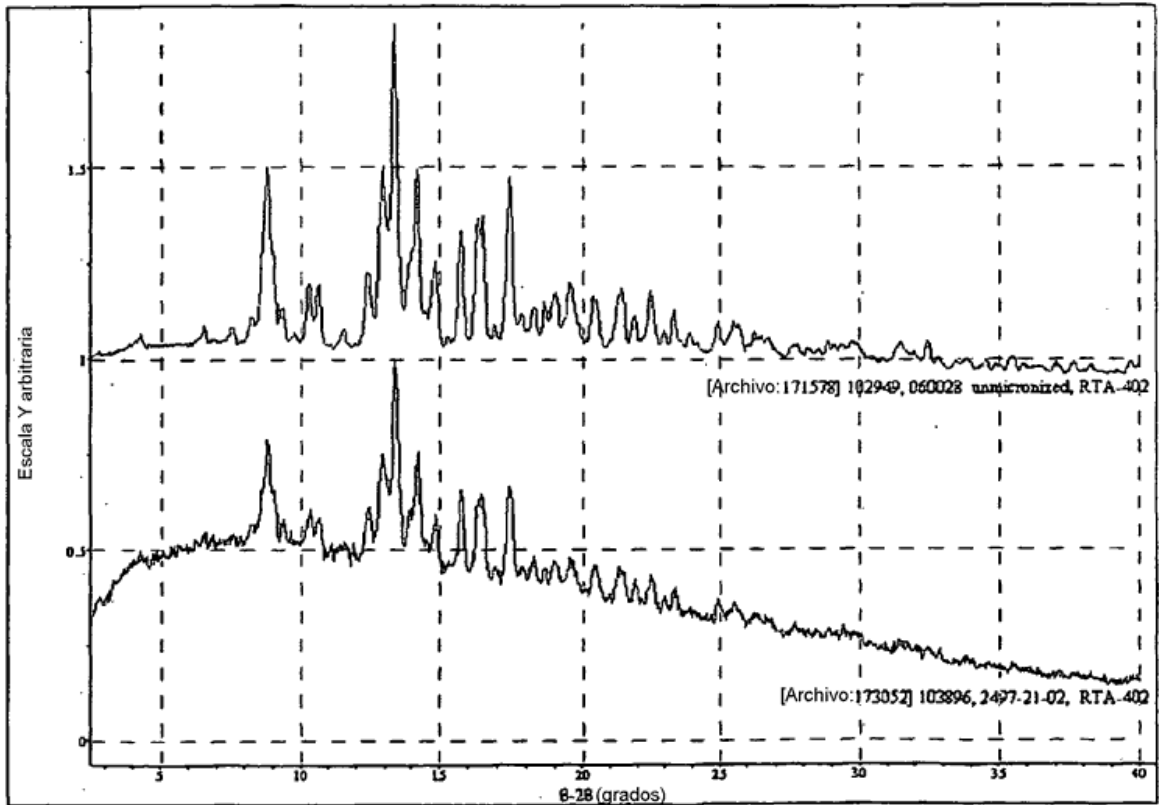


Figura 8 - Espectro de RMN de la forma A - no micronizada

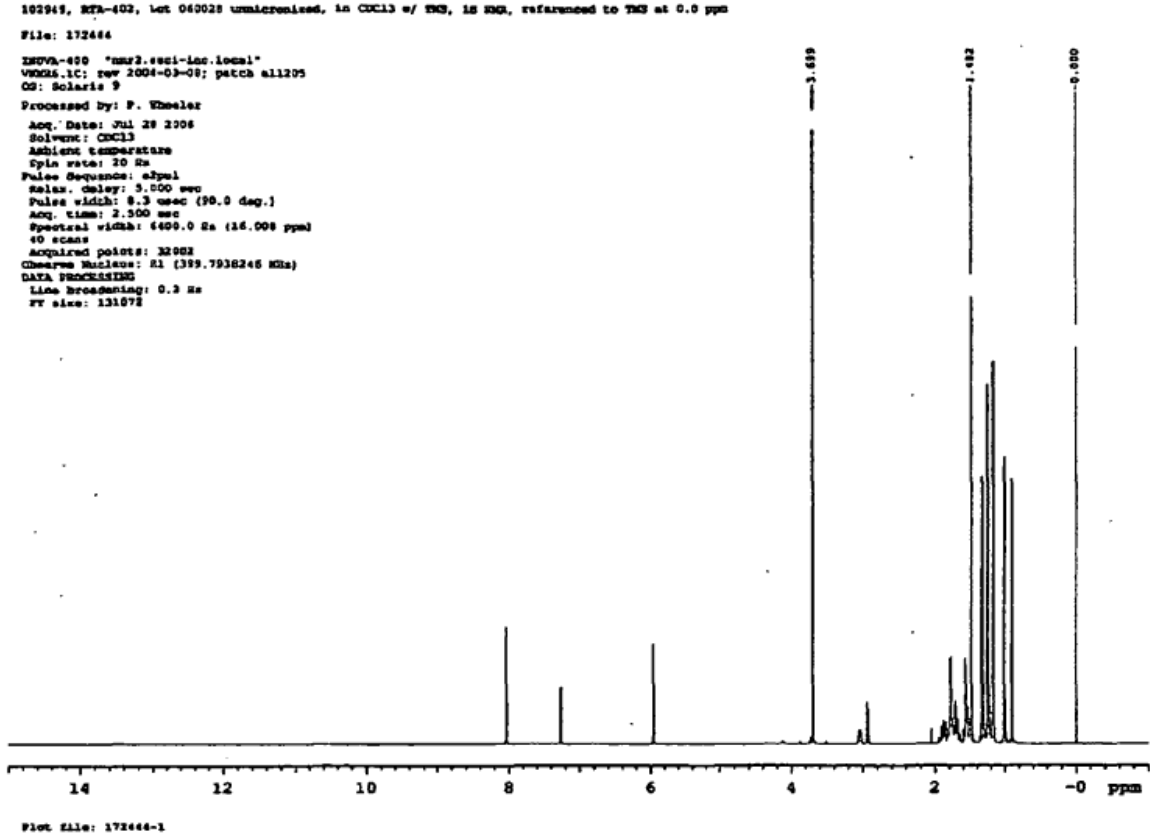


Figura 9 - Curva de MDSC de la forma B de éster metílico de CDDO.

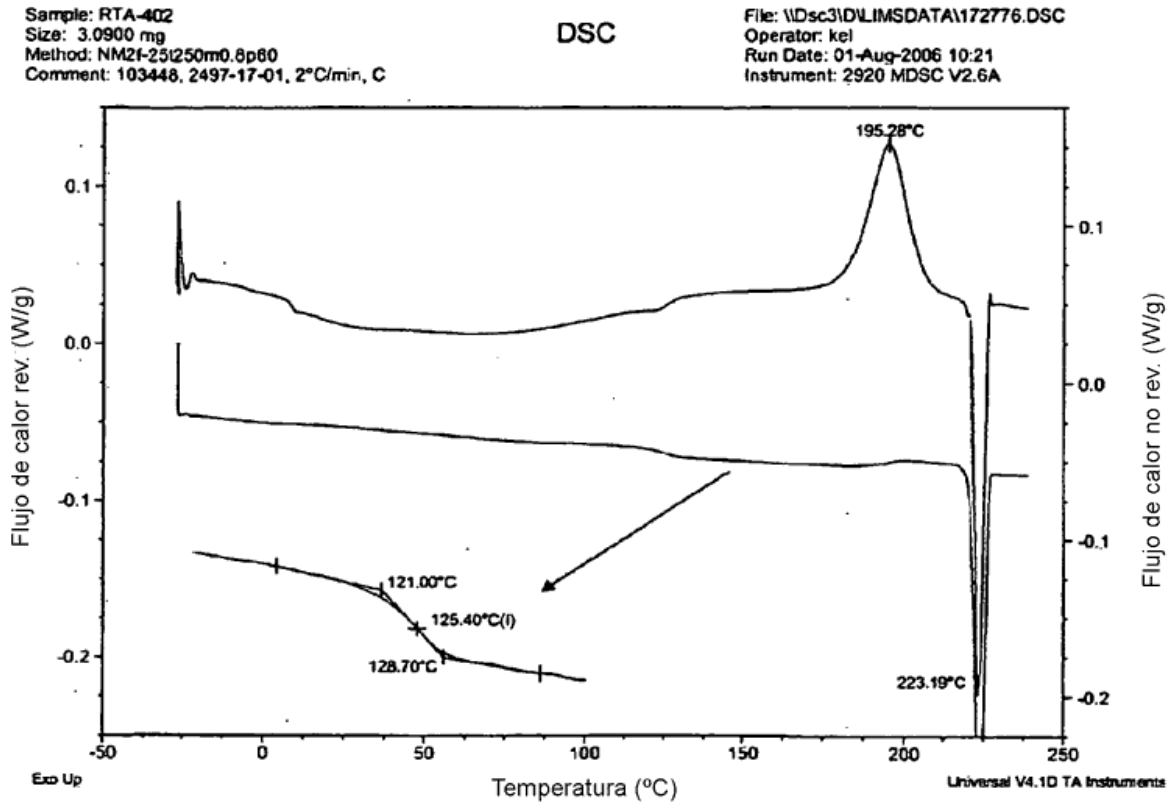


Figura 10 - Forma B de éster metílico de CDDO antes (parte superior) y después (parte inferior) de estrés

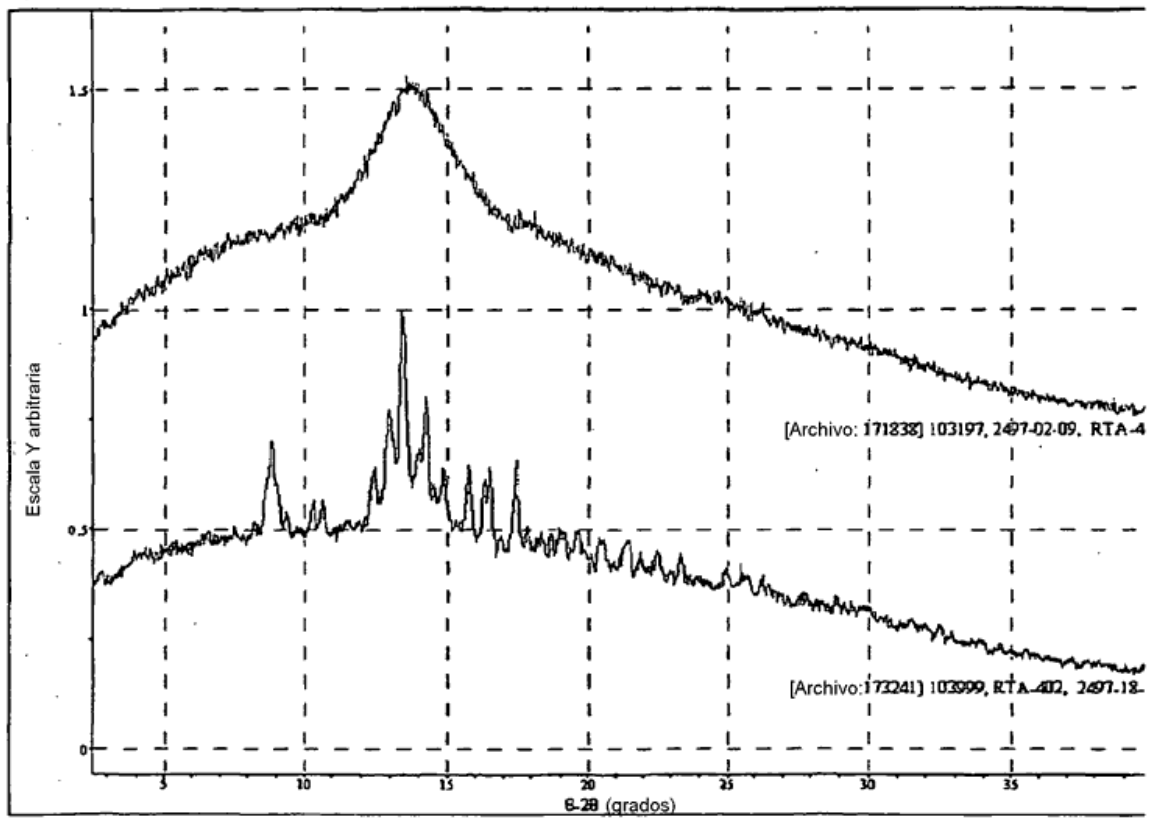


Figura 11 - Espectro de RMN de la forma B de éster metílico de CDDO.

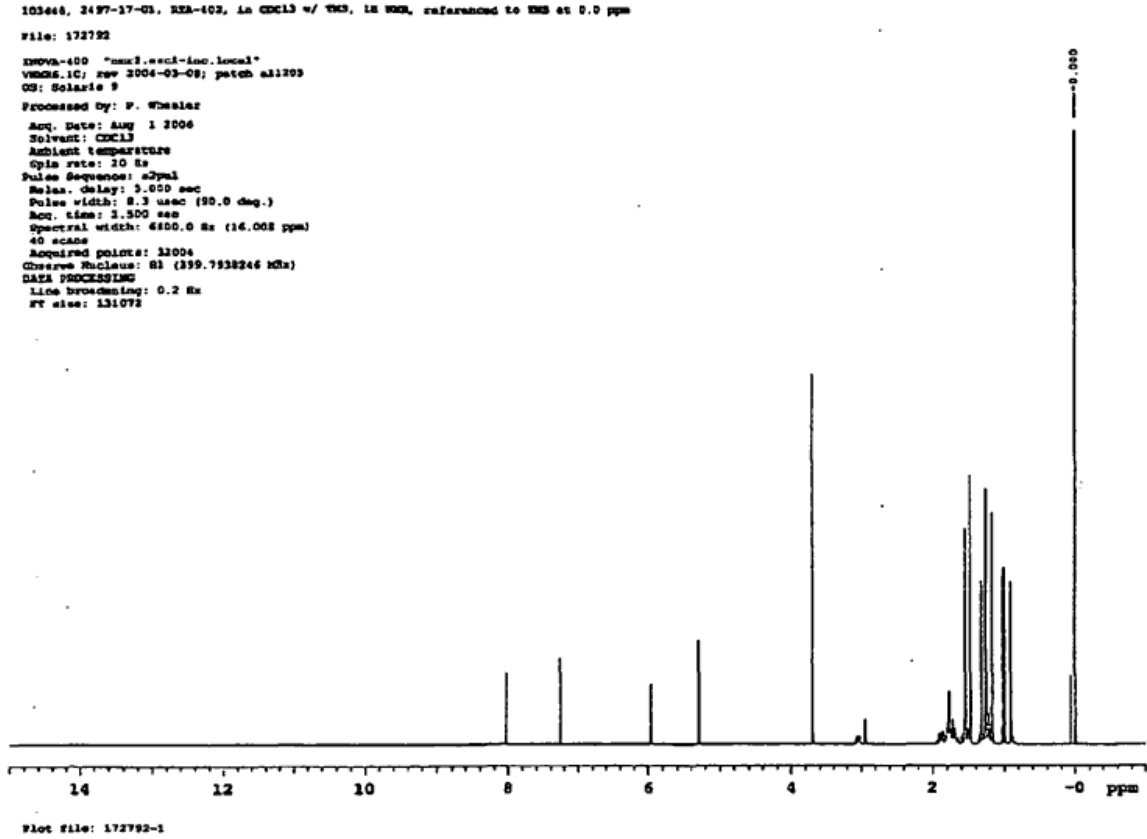


Figura 12 - Dibujo de ORTEP de una molécula individual de la forma A con marcaje. Se representan los átomos mediante elipsoides térmicos anisotrópicos de una probabilidad del 50%.

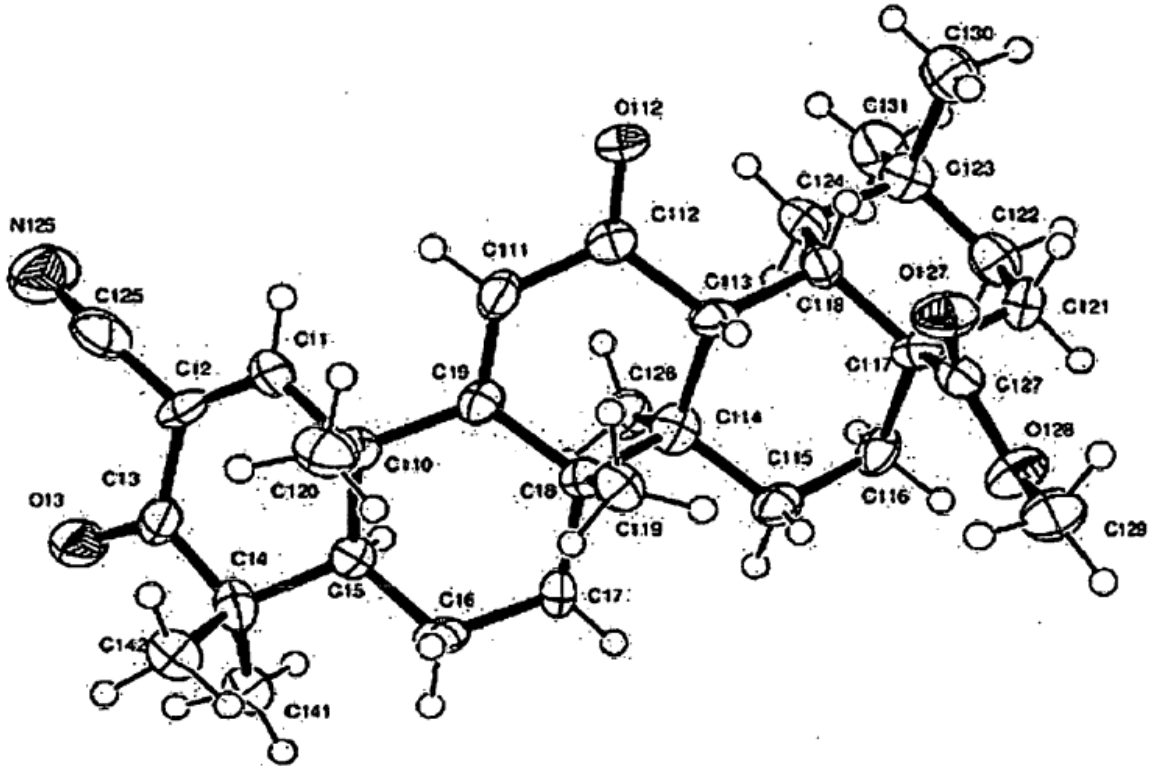


Figura 13 - Dibujo de ORTEP del contenido de la unidad asimétrica de los cristales de la forma A. Se representan los átomos mediante elipsoides térmicos anisotrópicos de una probabilidad del 50%.

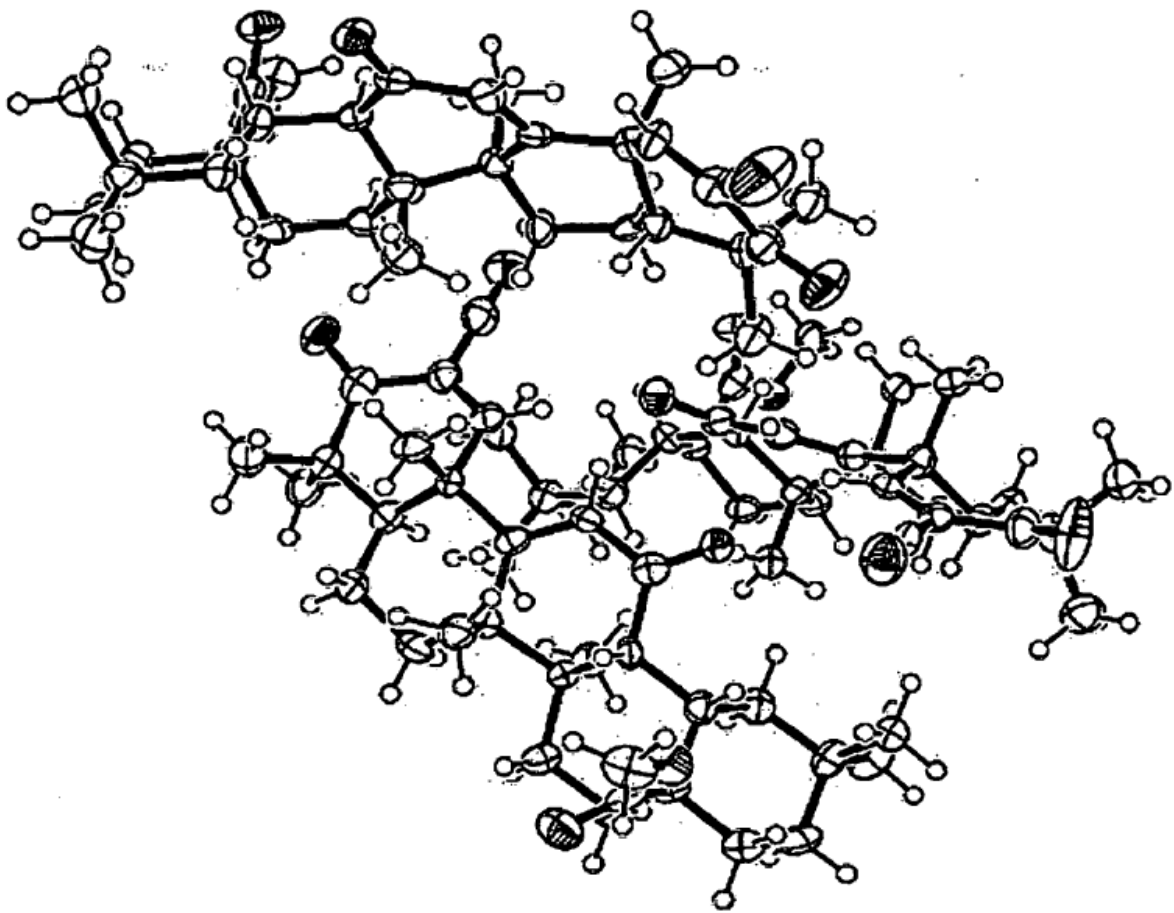


Figura 14 - Diagrama de empaquetamiento de los cristales de la forma A observados a lo largo del eje a cristalográfico.



Figura 15 - Diagrama de empaquetamiento de los cristales de la forma A observados a lo largo del eje b cristalográfico.

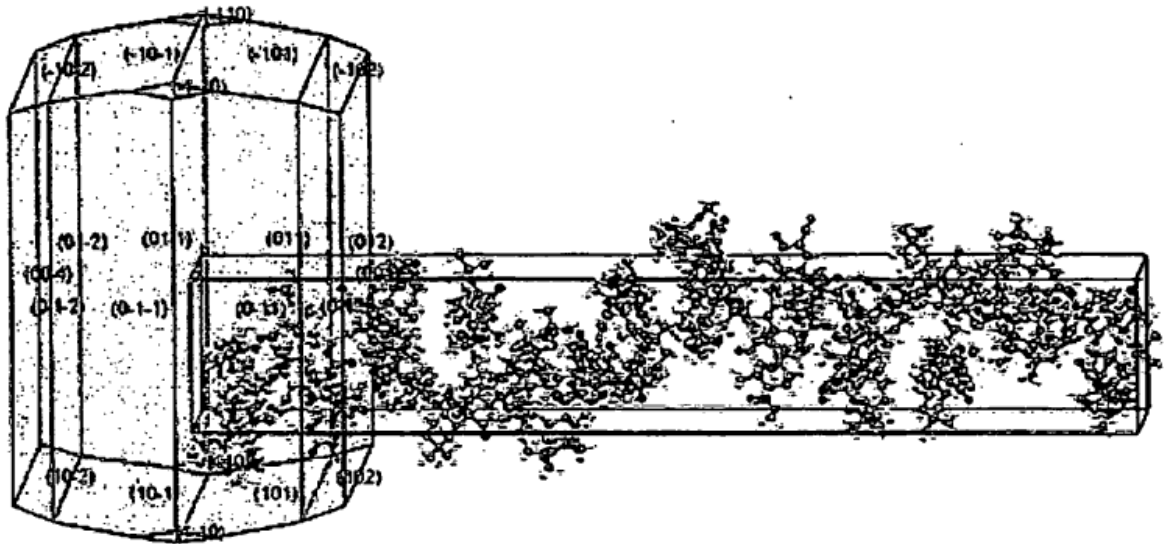


Figura 16 - Diagrama de empaquetamiento de los cristales de la forma A observados a lo largo del eje c cristalográfico.

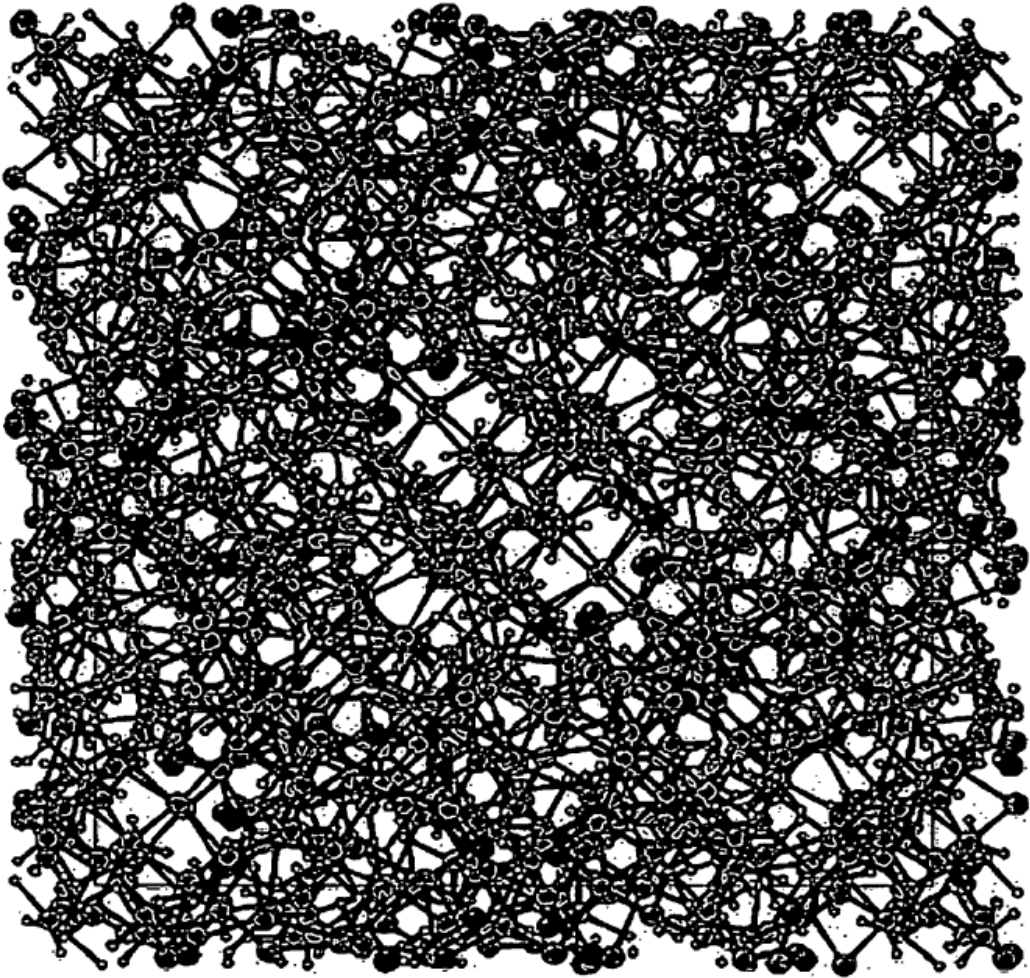


Figura 17 - Espectro de rayos X de polvo calculado de la forma A

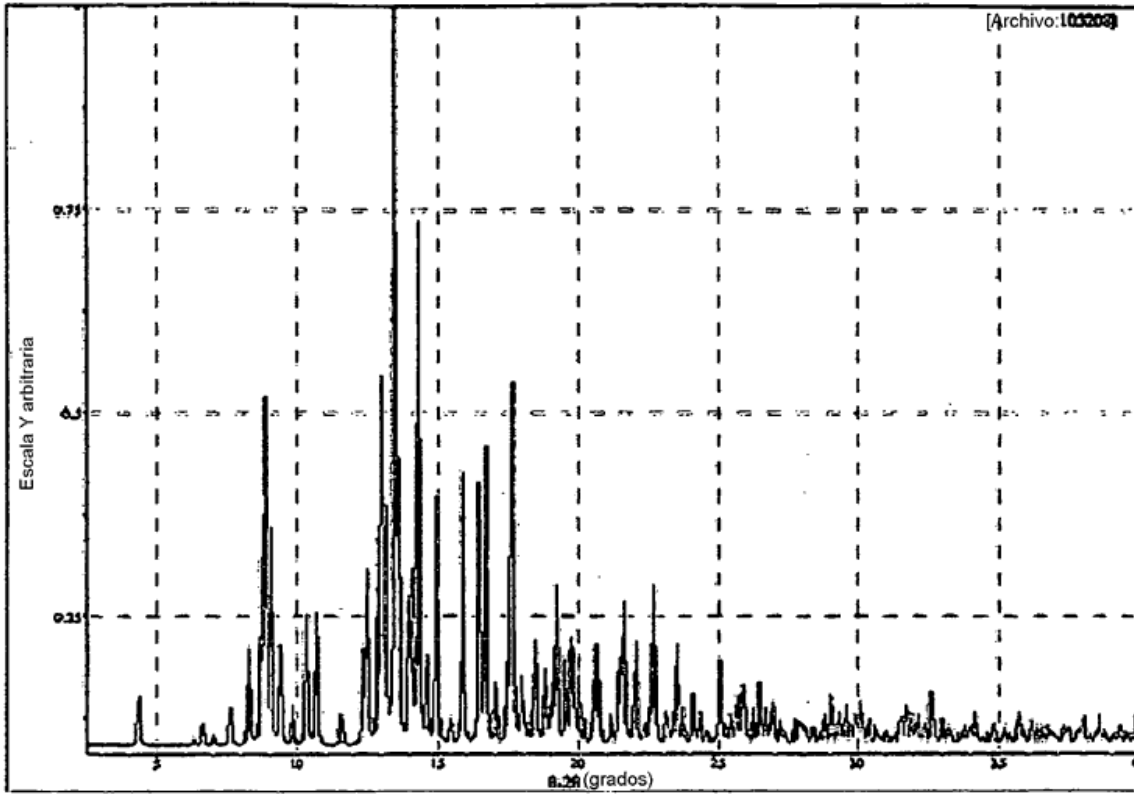


Figura 18 - XRPD experimental de la forma A.

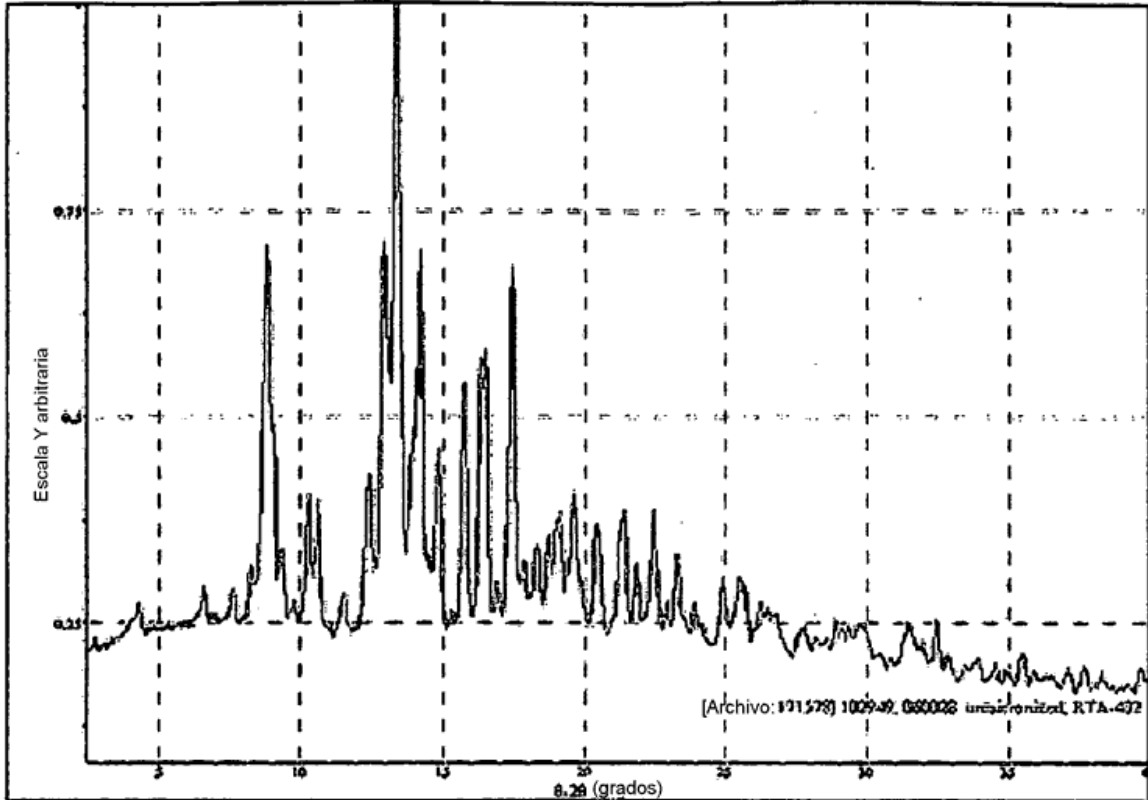


Figura 19 - Comparación de los espectros de XRPD calculado y experimental de éster metílico de CDDO con respecto al espectro de XRPD de éster metílico de CDDO.

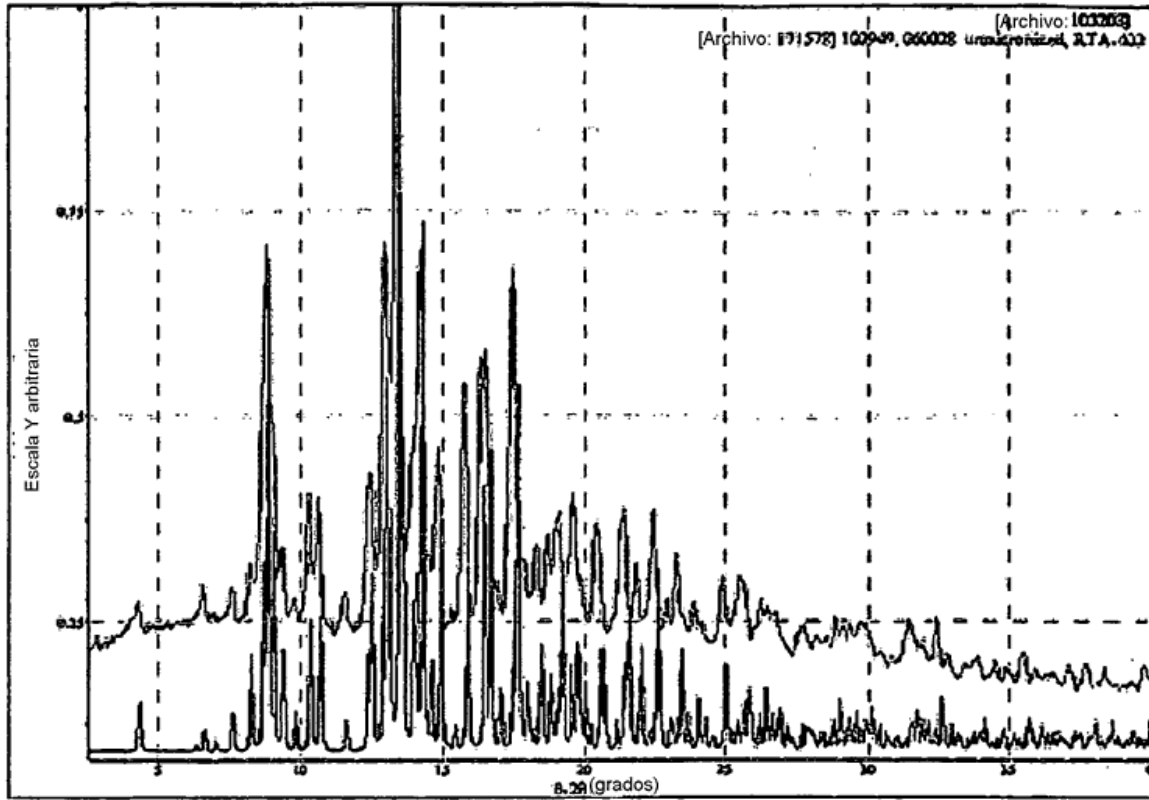


Figura 20. Gráfico representativo del área bajo la curva para la forma A y la forma B (amorfa), tras una administración oral de 4,1 mg/kg. Cada punto de dato representa la concentración en plasma media de éster metílico de CDDO en 8 animales. Las barras de error representan la desviación estándar dentro de la población de la que se tomaron muestras.

Forma A frente a la amorfa en monos macacos tras una dosis oral de 4,1 mg/kg

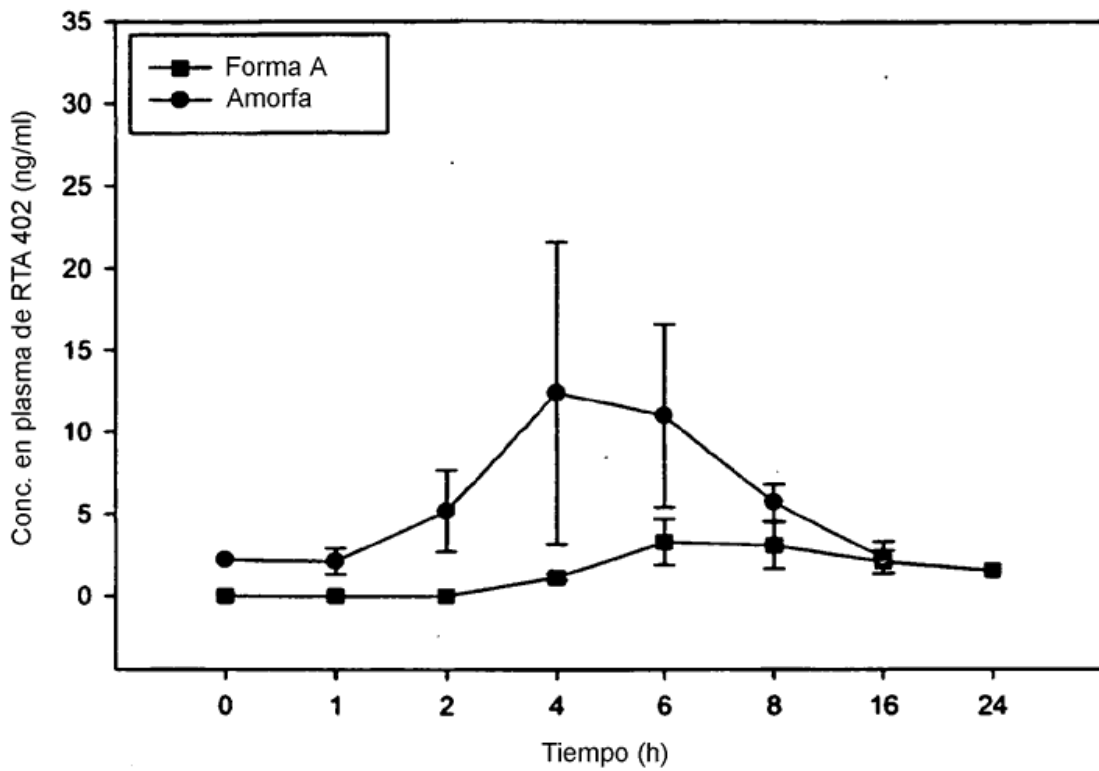


Figura 21. Animal n.º 505M (panel superior) y animal n.º 507F (panel inferior).

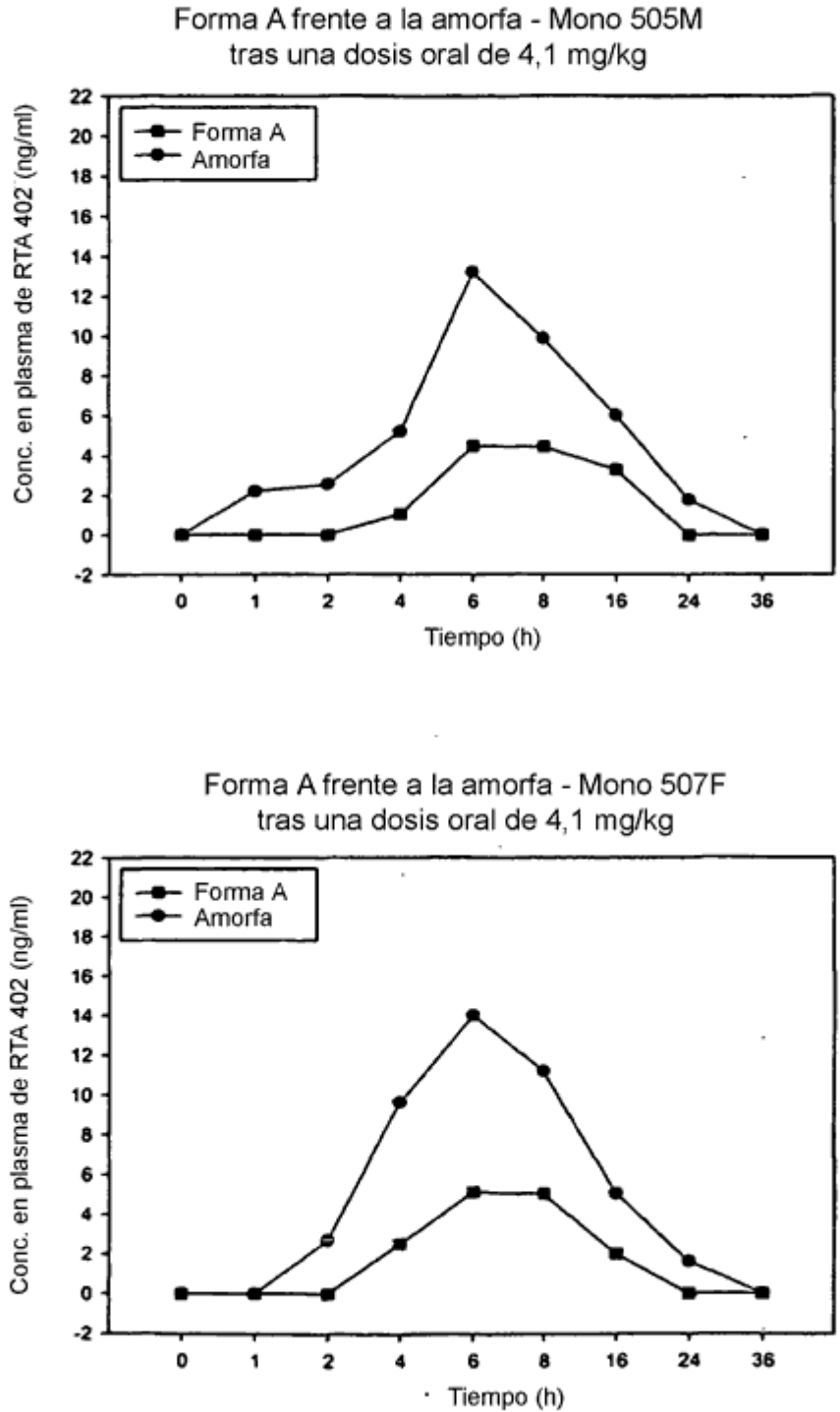


Figura 22. Animal n.º 508F (panel superior) y animal n.º 502M (panel inferior).

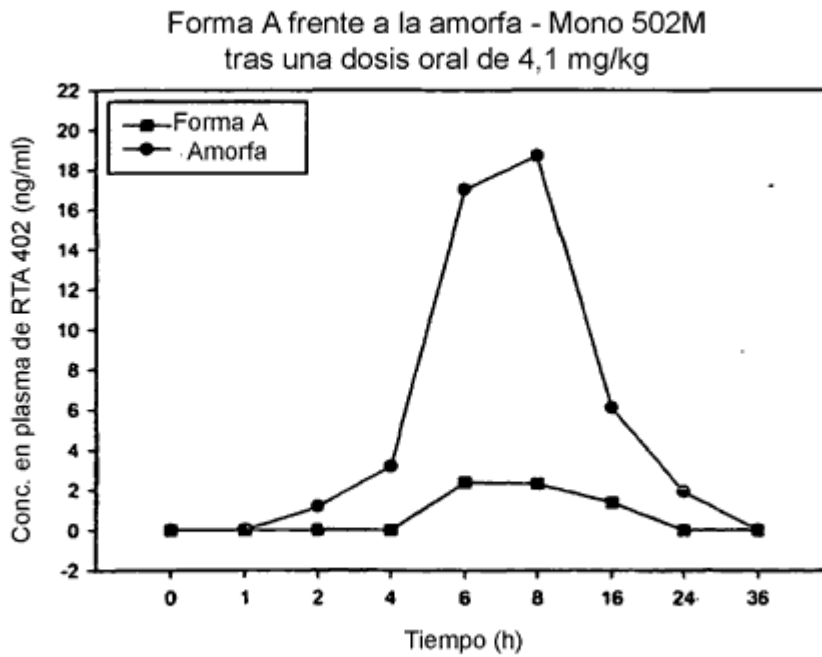
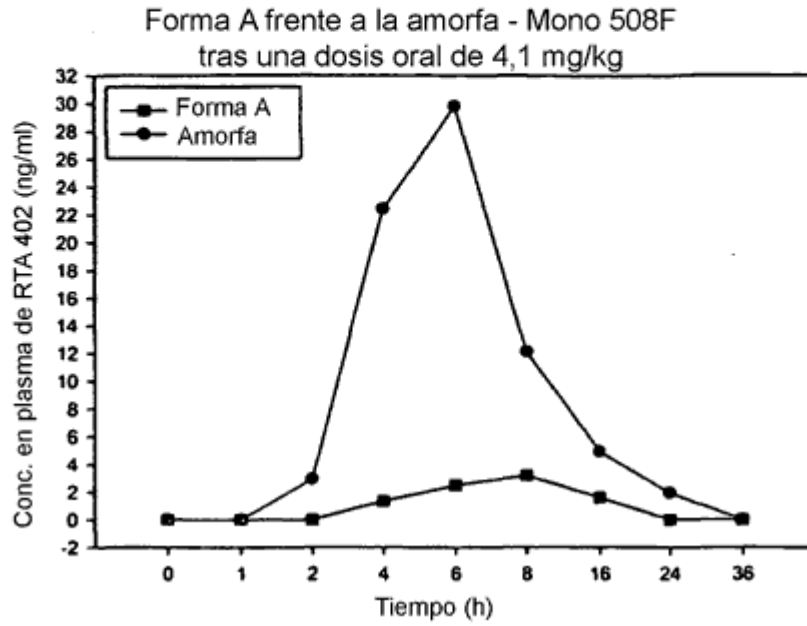


Figura 23. Termogramas de solvato de hemibenceno de éster metílico de CDDO.

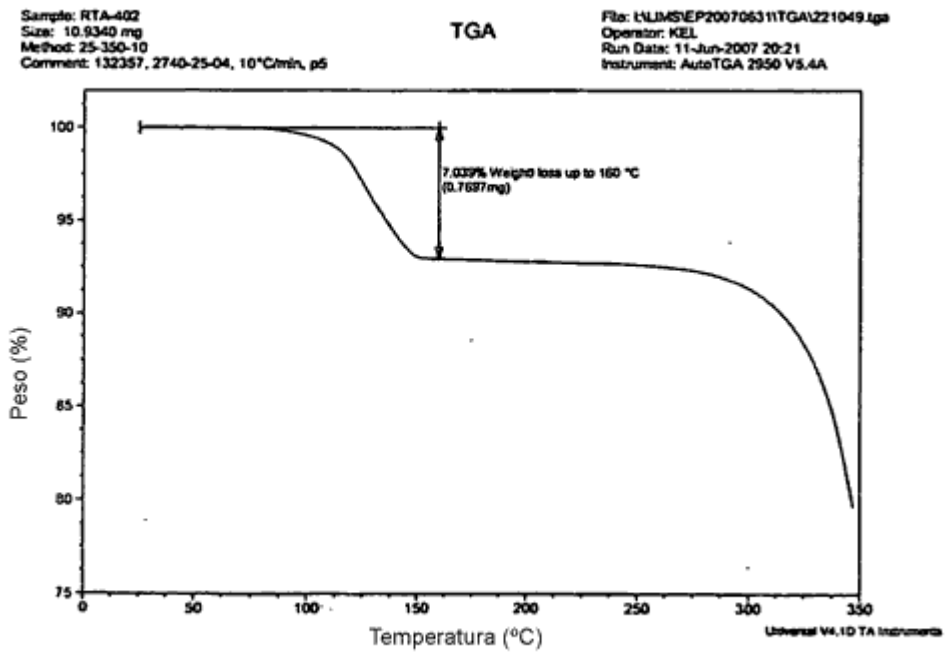
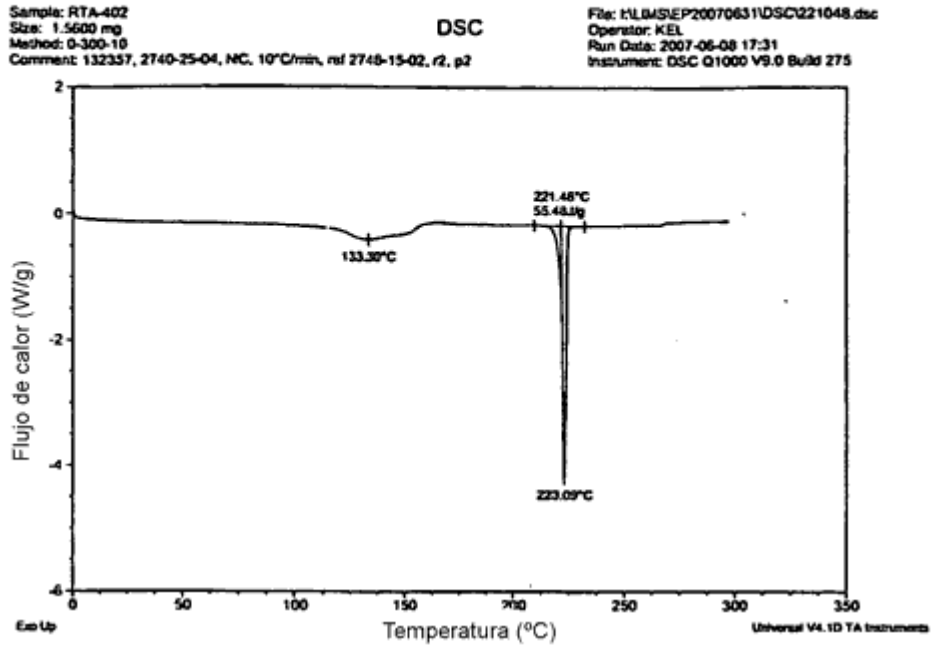


Figura 24. Termogramas de solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO.

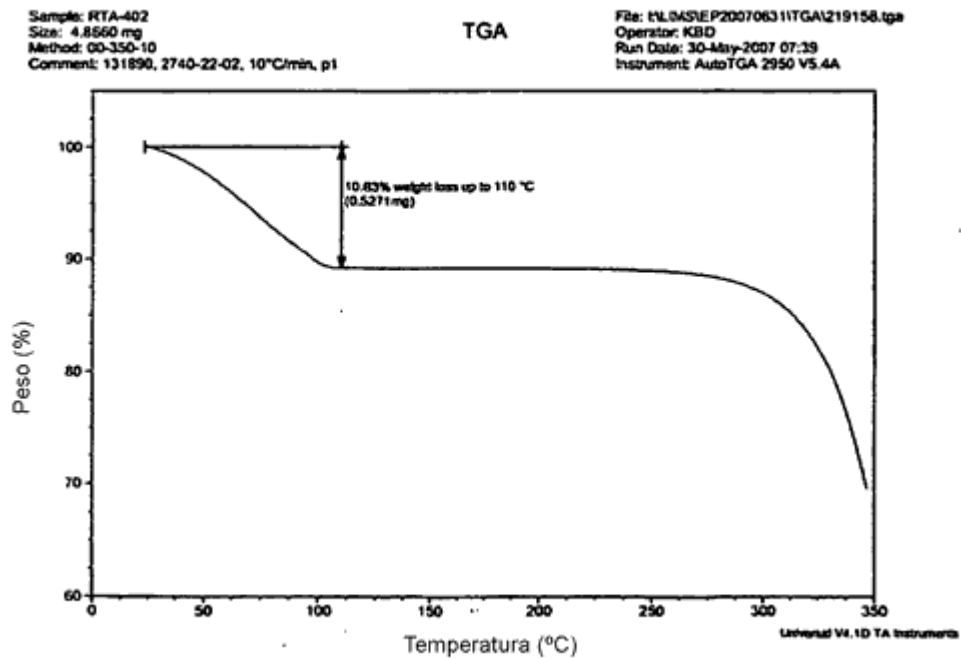
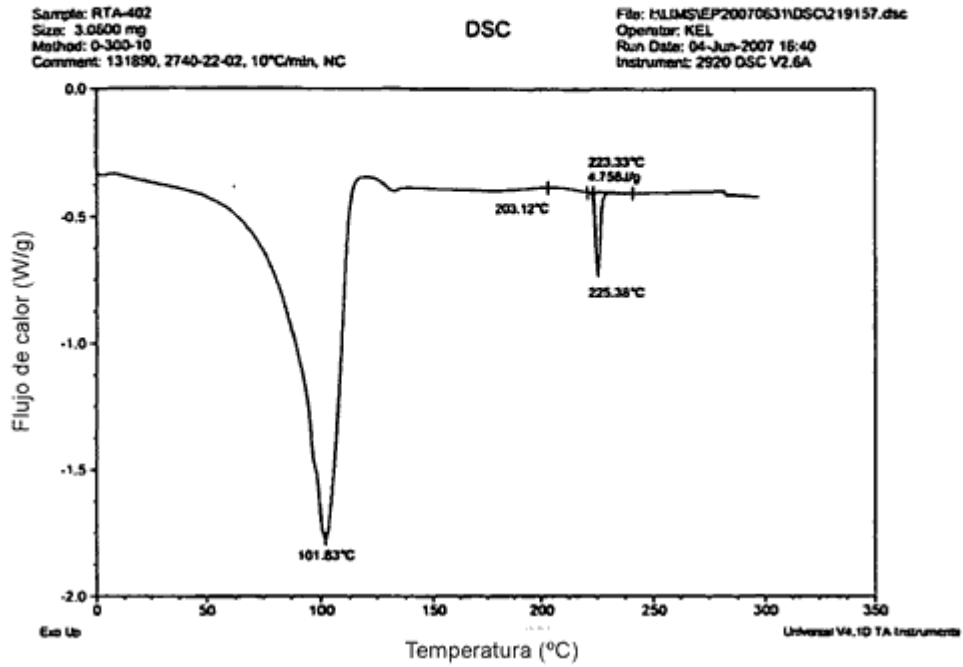


Figura 25. Datos de TGIR de solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO.

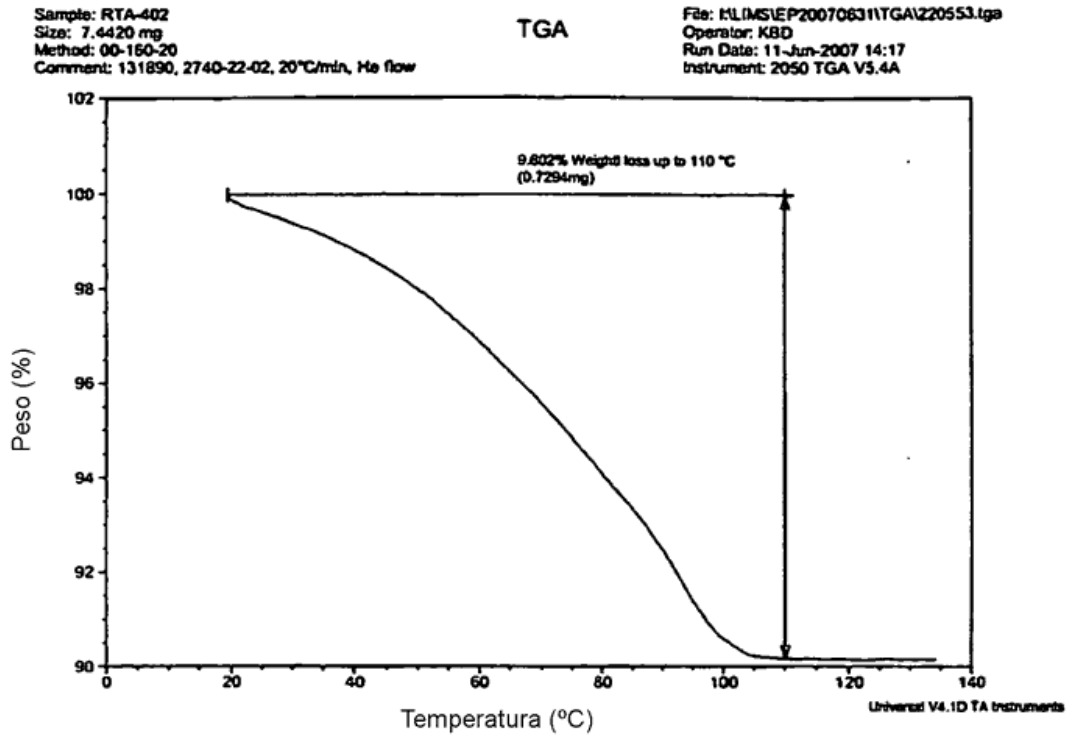


Figura 26 - Espectros de XRPD de solvato de dimetanol de éster metílico de CDDO, antes (parte superior) y después (parte inferior) de análisis TGIR (hasta 140°C).

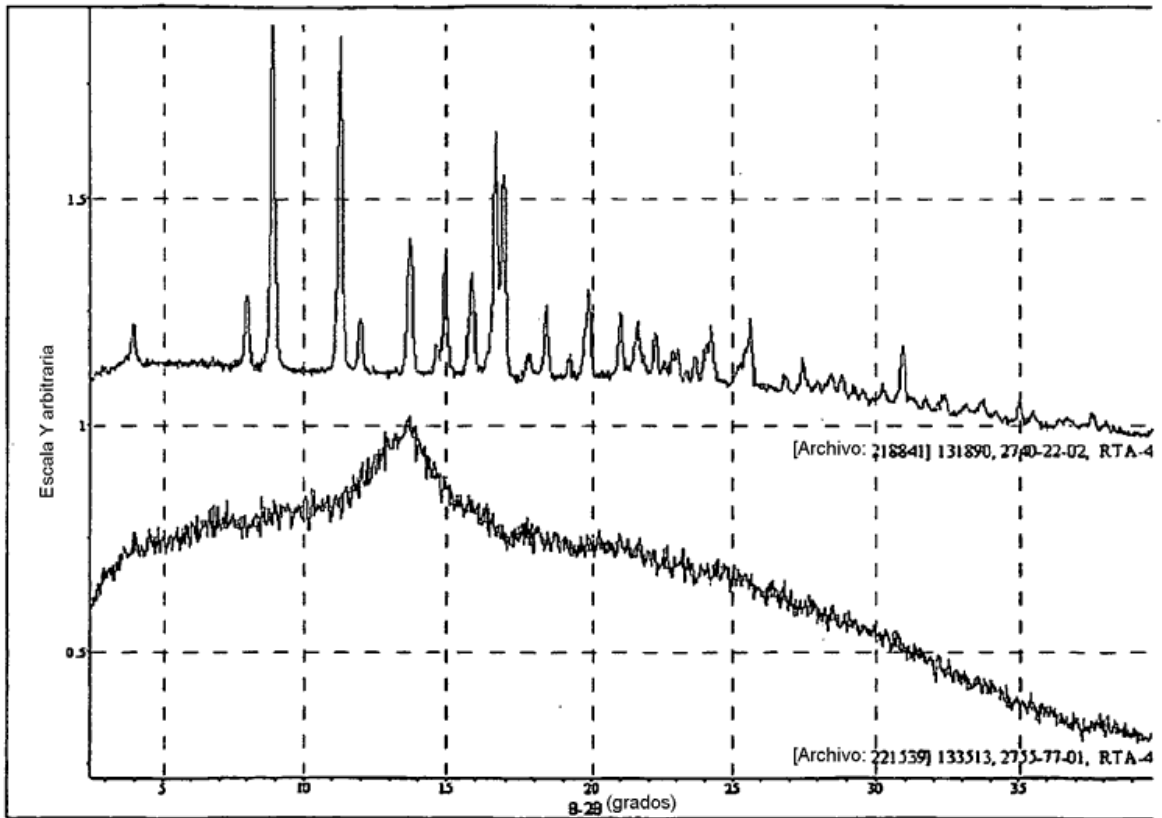


Figura 27 PDF de superposición, forma A frente a forma B. Orden local similar desde aproximadamente 5 Å hasta aproximadamente 20 Å.

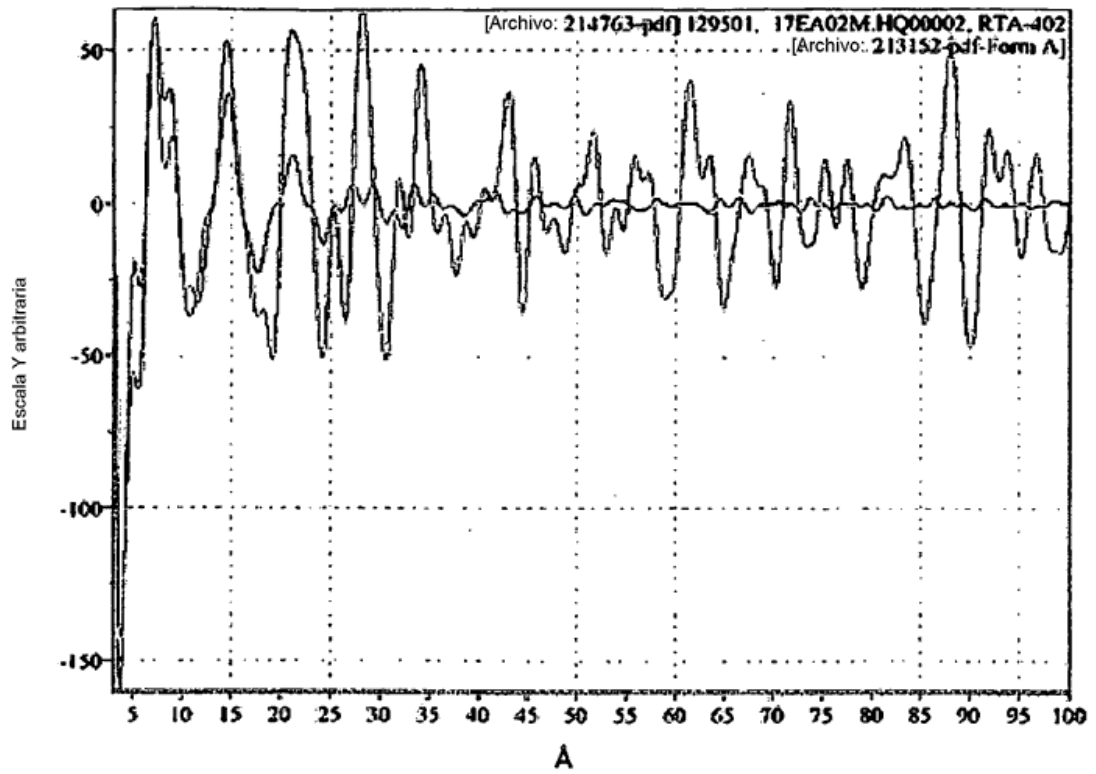


Figura 28 Una superposición de PDF de espectros amorfos de rayos X para preparaciones de forma B.

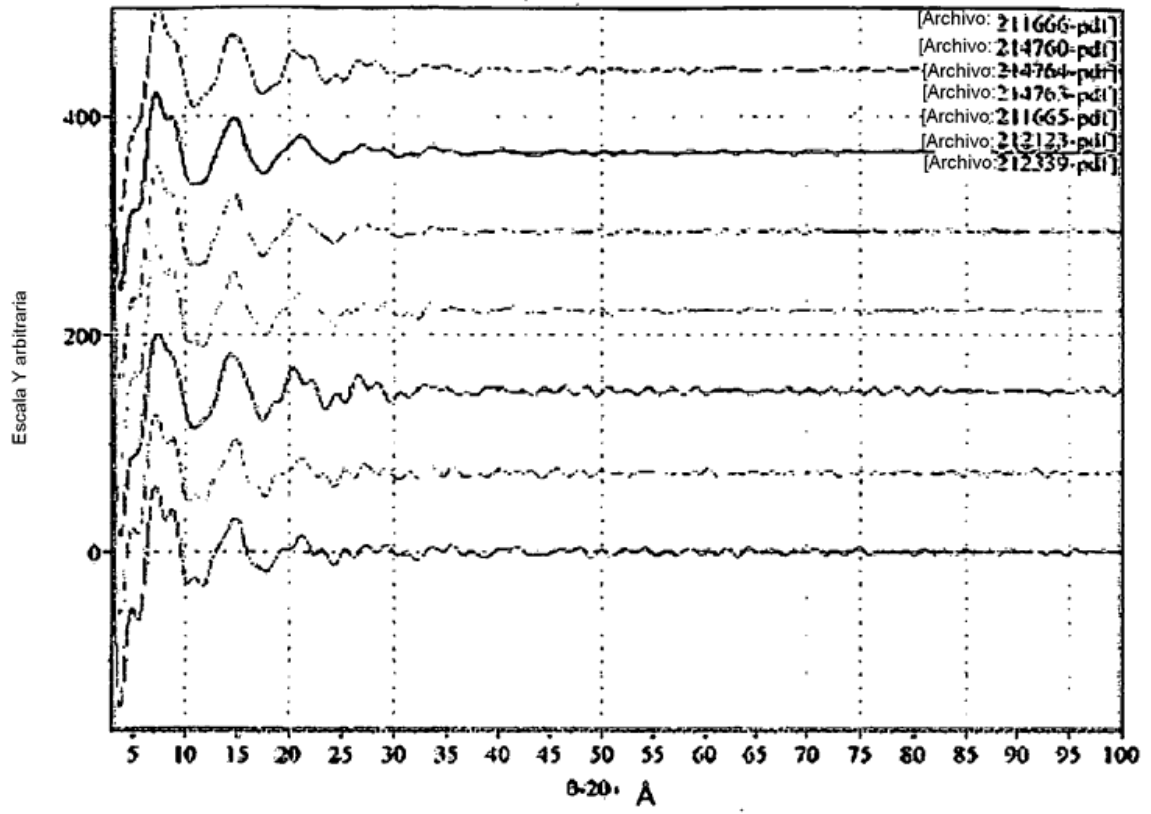


Figura 29 - Una representación esquemática del grupo espacial $P4_32_12$ (n.º 96)

$P4_32_12$ (n.º 96)

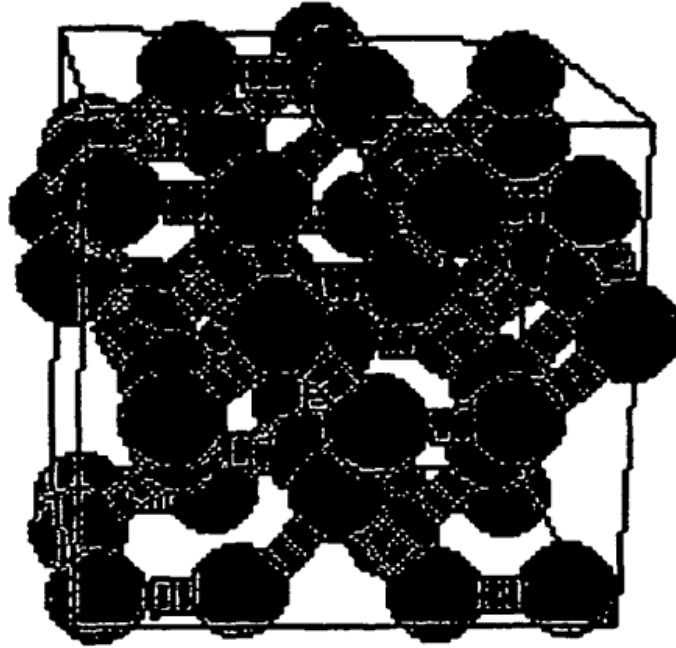
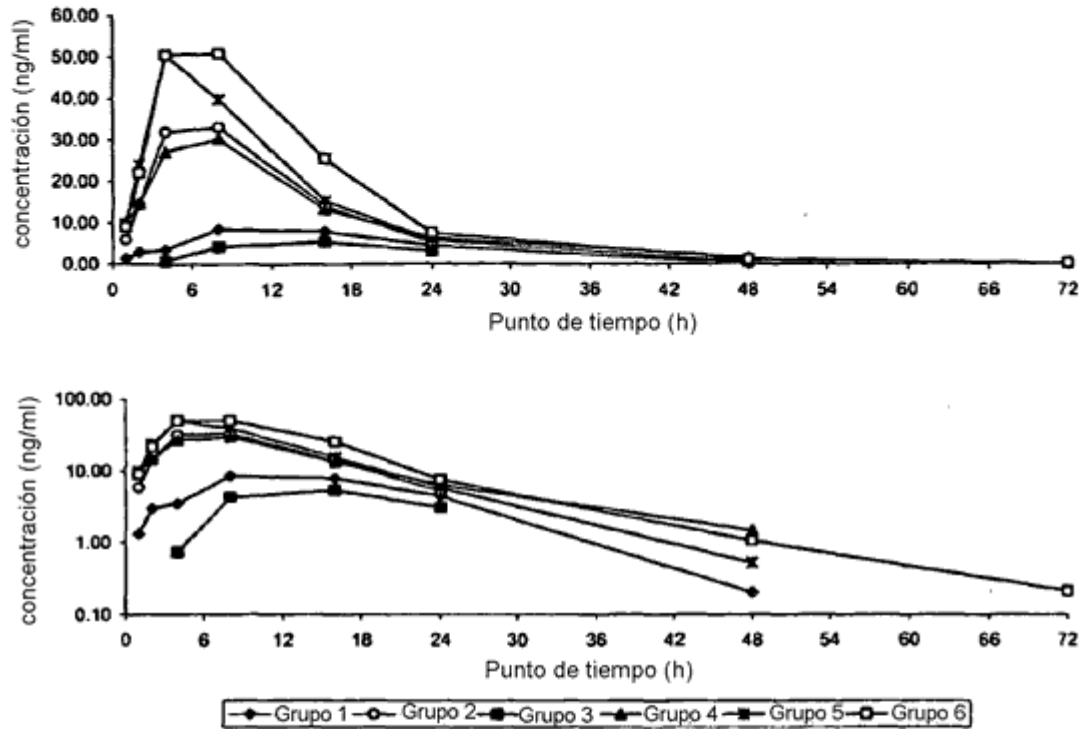


Figura 30 Concentraciones en sangre medias de éster metílico de CDDO tras administraciones orales únicas de cápsulas de éster metílico de CDDO a monos macacos macho (fases 2 y 3)



Grupo 1 (fase 2), los animales recibieron una cápsula que contenía 30 mg de la forma A nanocristalina

Grupo 2 (fase 2), los animales recibieron una cápsula que contenía 30 mg de la forma B micronizada

Grupo 3 (fase 2), los animales recibieron una cápsula que contenía 30 mg de la forma A micronizada cristalina

Grupo 4 (fase 3), los animales recibieron una cápsula que contenía 30 mg de la forma B - matriz polimérica de PVP/VA

Grupo 5 (fase 3), los animales recibieron una cápsula que contenía 30 mg de la forma B matriz polimérica de HPMCP (ftalato de hipromelosa)

Grupo 6 (fase 3), los animales recibieron una cápsula que contenía 30 mg de la forma B matriz polimérica de Eudragit (copolímero de ácido metacrílico de tipo C)