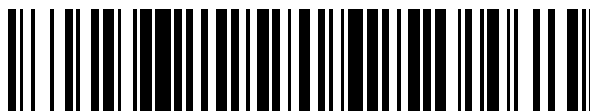


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 284**

51 Int. Cl.:

<b>C07J 41/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/575</b>	(2006.01)
<b>C07J 31/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 27/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2006 E 12152631 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2527355**

54 Título: **Formas de sales polimórficas y amorfas de dilactato de escualamina**

30 Prioridad:

**25.04.2005 US 674531 P**

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

**15.10.2019**

73 Titular/es:

**ENTERIN, INC. (100.0%)  
274 Linden Lane  
Merion, PA 19066, US**

72 Inventor/es:

**CHELLQUIST, ERIC;  
DOUBLEDAY, MARY;  
GILBERT, CHARLES;  
ZHANG, XUEHAI;  
MCLANE, MICHAEL;  
AMBRUSTER, KYLE y  
LEVITT, ROY**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 727 284 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 de sales polimórficas y amorfas de dilactato de escualamina

### CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] Esta solicitud se refiere a la forma amorfa de la sal de dilactato de escualamina y su utilidad para inhibir la neovascularización y la proliferación celular endotelial.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0002] Se han aislado varias composiciones de aminosterol del hígado de la mielga, *Squalus acanthias*. Un tal aminosterol es la escualamina (3 $\beta$ -(N-[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina)-7 $\alpha$ ,24R-dihidroxi-5 $\alpha$ -colestano-24-sulfato), la estructura química de la cual se muestra en la figura 1. Este aminosterol, que incluye un grupo sulfato en la posición C-24, es el objeto de la patente de EE.UU. 5,192,756 de Zasloff et al., que describe las propiedades antibióticas de la escualamina. Desde su descubrimiento, sin embargo, se han revelado varias otras propiedades interesantes de la escualamina. En particular, como se describe en las patentes de EE.UU. 5,792,635 (expedida el 11 de agosto de 1998) y 5,721,226 (expedida el 24 de febrero de 1998), que se incorporan en su integridad por referencia, la escualamina puede inhibir el crecimiento de células endoteliales y funcionar por lo tanto como un agente antiangiogénico. El uso de escualamina como un agente antiangiogénico para el tratamiento de la neovascularización en el ojo y para el tratamiento de cánceres se describe en la solicitud de la patente de EE.UU. 09/985,417 (solicitada el 24 de noviembre de 1998) y las patentes de EE.UU. 6,147,060 (expedida el 14 de noviembre de 2000) y 6,596,712 (expedida el 22 de julio de 2003), que se incorporan también en su integridad por referencia.

20 [0003] Se han descrito métodos para sintetizar escualamina en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6,262,283 (expedida el 17 de julio de 2001), 6,610,866 (expedida el 26 de agosto de 2003), 5,792,635 (expedida el 11 de agosto de 1998) y en la solicitud de la patente de EE.UU. 10/268,660. Estas patentes de EE.UU. y solicitudes de patente se incorporan en su integridad por referencia.

25 [0004] Aunque se ha informado previamente de que la escualamina inhibe la proliferación de células endoteliales y, por lo tanto, se ha descubierto que es útil como inhibidor de la angiogénesis, existe todavía una necesidad de formas de escualamina que se puedan administrar fácilmente a los pacientes, especialmente en forma de sales solubles terapéuticamente activas que muestren termoestabilidad durante el almacenamiento y una toxicidad mínima y de métodos económicos para la producción de estas sales. Por consiguiente, la identificación de sales de escualamina que satisfagan estos requisitos y que inhiban específicamente la angiogénesis, es un objeto de esta invención.

30 [0005] Clin. Cancer Res. Vol 9(11), págs. 4108-4115 (2003); Clin. Cancer Res. Vol 7(12), págs. 3912-3919 (2001); J. Pharm. & Biomed. Analysis Vol. 32(1), págs. 85-96 (2003) y WO-A-03/080027 describen todos el lactato de escualamina sin especificar explícitamente su estequiometría.

### RESUMEN DE LA INVENCION

35 [0006] La presente invención se refiere a la forma amorfa de la sal de dilactato de escualamina que inhibe la proliferación celular endotelial y por lo tanto regula y/o modula la angiogénesis. La invención también se refiere a composiciones que contienen este producto, así como este producto para usar en el tratamiento de enfermedades y afecciones dependientes de la angiogénesis, tales como, por ejemplo, el cáncer, el crecimiento tumoral, la aterosclerosis, la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la isquemia retiniana, el edema macular y las enfermedades inflamatorias en mamíferos, en particular seres humanos. La presente invención se refiere a una forma amorfa de la sal de dilactato de escualamina (3 $\beta$ -(N-[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina)-7 $\alpha$ ,24R-dihidroxi-5 $\alpha$ -colestano-24-sulfato).

[0007] Otro aspecto de la invención es la forma amorfa de la sal de dilactato de escualamina para usar en un método de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero necesitado de tal tratamiento, que comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma amorfa de la sal de dilactato.

[0008] Otro aspecto de la invención es la forma amorfa de la sal de dilactato de escualamina para usar en un método de tratamiento o prevención de la neovascularización en un mamífero necesitado de tal tratamiento, que comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma amorfa de la sal de dilactato.

5 [0009] En formas de realización selectas, la neovascularización se halla en el ojo, en el intestino o en el sistema cardiovascular.

[0010] En formas de realización preferidas, la neovascularización en el ojo resulta de la degeneración macular relacionada con la edad, una retinopatía diabética, un tumor ocular, una oclusión de la vena retiniana central, un edema macular diabético (DME) o una miopía patológica.

[0011] En una forma de realización preferida, el mamífero es un ser humano.

10 [0012] En una forma de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, y más preferiblemente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0013]

15 La figura 1 muestra la estructura de la escualamina.  
 La figura 2 muestra el patrón de difracción de rayos X de polvo para el dilactato de escualamina liofilizado.  
 La figura 3 muestra un análisis termogravimétrico del dilactato de escualamina liofilizado.  
 La figura 4 muestra un perfil de un calorímetro diferencial de barrido para el dilactato de escualamina liofilizado.  
 La figura 5 muestra la estructura cristalina del dilactato de escualamina cristalizado a partir de 2-propanol.  
 20 La figura 6 muestra el patrón de difracción de rayos X de polvo de dilactato de escualamina cristalizado a partir de 2-propanol.  
 La figura 7 muestra un análisis termogravimétrico del dilactato de escualamina cristalizado a partir de 2-propanol.  
 La figura 8 muestra un perfil de un calorímetro diferencial de barrido para el dilactato de escualamina cristalizado a partir de 2-propanol.  
 25 La figura 9 muestra el patrón de difracción de rayos X de polvo para el dilactato de escualamina cristalizado a partir de etanol.  
 La figura 10 muestra un análisis termogravimétrico del dilactato de escualamina cristalizado a partir de etanol.  
 La figura 11 muestra un perfil de un calorímetro diferencial de barrido para el dilactato de escualamina cristalizado a partir de etanol.  
 30 La figura 12 muestra el patrón de difracción de rayos X de polvo para el dilactato de escualamina cristalizado a partir de 2-butanol.  
 La figura 13 muestra un análisis termogravimétrico del dilactato de escualamina cristalizado a partir de 2-butanol.  
 La figura 14 muestra un perfil de un calorímetro diferencial de barrido para el dilactato de escualamina cristalizado a partir de 2-butanol.  
 35 La figura 15 muestra un esquema que describe un nuevo método para la producción de escualamina.  
 La figura 16 muestra un esquema que describe un nuevo método para la producción de dilactato de escualamina.  
 La figura 17 muestra el patrón de difracción de rayos X de polvo para el dilactato de escualamina recristalizado producido por la síntesis recién descrita de dilactato de escualamina.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

#### 40 Definiciones

[0014] Como se utiliza en la presente, el término "amorfo/a" se refiere a una forma de un compuesto que carece de una estructura cristalina distinta. Cuando se aplica en el contexto de la presente invención a la sal de dilactato de escualamina, el término "amorfo/a" se refiere a la forma amorfa del dilactato de escualamina donde un patrón de difracción de rayos X de polvo de la sal tiene ángulos de difracción principales de 15,5 a 15,6 grados, de 17,3 a 17,5  
 45 grados y de 21,3 a 21,5 grados con intensidades de pico relativas de 286, 391 y 107, respectivamente.

[0015] Como se utiliza en la presente, el término "polimórfico" se refiere a una de las formas cristalinas de un compuesto o a un compuesto que tiene más de una forma cristalina.

[0016] Como se utiliza en la presente, el término "alcohol orgánico" se refiere a un compuesto orgánico con uno o más grupos hidroxilo unidos.

5 [0017] Como se utiliza en la presente, el término "solvato" se refiere a una forma cristalina de una escualamina que contiene moléculas de solvente como parte de la estructura cristalina. En este caso, el solvente no es agua.

[0018] Como se utiliza en la presente, el término "hidrato" se refiere a una forma cristalina de una escualamina que contiene moléculas de agua como parte de la estructura cristalina.

10 [0019] Como se utiliza en la presente, el término "escualamina" incluye el compuesto mostrado en la figura 1 con el nombre químico  $3\beta$ -(N-[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina)- $7\alpha$ , $24R$ -dihidroxi- $5\alpha$ -colestano-24-sulfato.

[0020] Como se utiliza en la presente, el término "aminosterol" se refiere a un compuesto con al menos un hidroxilo y un grupo amino directa o indirectamente unido a un núcleo esteroide. La escualamina es un ejemplo de un aminosterol.

[0021] Como se utiliza en la presente, el término "angiogénesis" se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos, y un agente angiogénico es un compuesto que promueve esta actividad.

15 [0022] Como se utiliza en la presente, el término "antiangiogénico/as/os" se refiere a la prevención de la formación de nuevos vasos sanguíneos o la destrucción de vasos sanguíneos recién formados, e incluye un agente que muestra una o ambas de estas propiedades.

20 [0023] Como se utiliza en la presente, el término "neovascularización" se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos en tejido anormal (como, por ejemplo, en un tumor) o en posiciones anormales (como, por ejemplo, en algunas afecciones del ojo).

25 [0024] Como se utiliza en la presente, el término "degeneración macular" se destina a abarcar todos los tipos de degeneración macular e incluye una pérdida gradual de la visión central que afecta normalmente a ambos ojos y que ocurre especialmente en las personas mayores. Una forma de progresión lenta de degeneración macular, referida normalmente como la forma seca, está marcada especialmente por la acumulación de depósitos amarillos en la mácula lútea y el adelgazamiento de la mácula lútea. Una forma de progresión rápida de degeneración macular, referida normalmente como la forma húmeda, está marcada por la cicatrización producida por el sangrado y la fuga de fluidos de los nuevos vasos sanguíneos formados por debajo de la mácula lútea. La degeneración macular puede existir como forma húmeda o como forma seca.

30 [0025] Como se utiliza en la presente, el término "retinopatía diabética" incluye cambios retinianos que ocurren en la diabetes a largo plazo y se caracteriza por hemorragias puntiformes de vasos sanguíneos recién formados en la retina, microaneurismas y exudados cerosos bien definidos.

35 [0026] Como se utiliza en la presente, una cantidad "terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un agente o una combinación de dos o más agentes, que inhibe, total o parcialmente, la progresión de la afección o alivia, al menos parcialmente, uno o más síntomas de la afección. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede también ser una cantidad que es profilácticamente eficaz. La cantidad que es terapéuticamente eficaz dependerá del tamaño y el género del paciente, la afección que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad y el resultado buscado. Para un paciente dado, se puede determinar una cantidad terapéuticamente eficaz mediante métodos conocidos por aquellas personas expertas en la técnica.

### General

40 [0027] Se ha demostrado que la escualamina presenta propiedades antiangiogénicas y antimicrobianas y es útil para el tratamiento de enfermedades asociadas al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos tales como el crecimiento y la metástasis de tumores sólidos, la aterosclerosis, la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía

diabética, el glaucoma neovascular, la isquemia retiniana, el edema macular, las enfermedades inflamatorias y similares en un animal, preferiblemente en un mamífero y más preferiblemente, en un ser humano.

5 [0028] Los tres átomos de nitrógeno básicos presentes en la cadena lateral de espermidina de la escualamina forman sales cuando se trata con varios ácidos. Un átomo de nitrógeno en la cadena lateral se neutraliza con el ácido sulfónico en C24, mientras que los otros dos átomos de nitrógeno están libres para formar sales con un ácido añadido. Tales sales de escualamina incluyen, pero de forma no limitativa, dihidrocloruro, diacetato, ditrifluoroacetato, digluconato y dilactato. Una comparación de varias sales de escualamina en función de su toxicidad y su estabilidad muestra que la sal de dilactato es una sal preferida. La invención se refiere a la forma amorfa de la sal de dilactato de escualamina. Como se describe más adelante, la sal de dilactato se puede preparar en una forma amorfa mediante cromatografía de intercambio iónico seguida de liofilización o en varias formas cristalinas por precipitación a partir de distintos solventes alcohólicos. Otro aspecto de la invención se refiere a métodos para la preparación de la forma amorfa de dilactato de escualamina. Se ha determinado la estructura completa de rayos X de la sal de dilactato cristalizado a partir de 2-propanol, confirmando la estereoquímica en los centros asimétricos de la molécula de escualamina como 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 7 $\alpha$  y 24 R.

15 [0029] La sal de dilactato de escualamina de la invención, es decir, el dilactato de escualamina en su forma amorfa, se puede administrar sola o como parte de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas para uso *in vitro* o *in vivo* conforme a la presente invención se pueden formular de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y productos auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida. Ejemplos de vehículos o excipientes incluyen, pero de forma no limitativa, el carbonato cálcico, el fosfato cálcico, varios azúcares, almidones, derivados de la celulosa, la gelatina y polímeros tales como los polietilenglicoles.

25 [0030] Un ejemplo de un vehículo farmacéutico para la sal amorfa de dilactato de escualamina de la invención es un sistema cosolvente que comprende alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa. Las proporciones del sistema cosolvente se pueden variar considerablemente sin afectar negativamente a las características de solubilidad y de toxicidad de la composición. Además, la identidad de los componentes cosolventes puede ser variada: por ejemplo, se pueden usar otros tensioactivos no polares de baja toxicidad en vez de polisorbato 80; puede variarse el tamaño de la fracción de polietilenglicol; y/u otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar al polietilenglicol, por ejemplo, la polivinilpirrolidona y azúcares o polisacáridos, por ejemplo, la dextrosa.

30 [0031] Además de vehículos, las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden incluir opcionalmente estabilizadores, conservantes y/o adyuvantes. Para ejemplos de vehículos, estabilizadores y adyuvantes típicos conocidos por las personas expertas en la técnica, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins (2000).

35 [0032] Opcionalmente, otras terapias conocidas por las personas expertas en la técnica se pueden combinar con la administración de la sal amorfa de dilactato de escualamina de la invención. Más de un aminosterol pueden estar presentes en una única composición.

40 [0033] La administración *in vivo* de la sal amorfa de dilactato de escualamina de la invención se puede efectuar en una dosis, dosis múltiples, continua o intermitentemente a lo largo del curso del tratamiento. Las dosis varían de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg en dosis diarias únicas o divididas. Los métodos para determinar los medios y las dosificaciones de administración más eficaces son conocidos por aquellas personas expertas en la técnica y variarán con la composición usada para la terapia, el propósito de la terapia, la célula diana que se está tratando y la persona que se está tratando. Se pueden realizar administraciones únicas o múltiples seleccionando el nivel y el patrón de dosis por el médico tratante.

45 [0034] Las composiciones farmacéuticas que contienen la sal amorfa de dilactato de escualamina de la invención se pueden administrar por cualquier vía adecuada, incluyendo oral, rectal, intranasal, tópica (incluyendo transdérmica, por aerosol, ocular, bucal y sublingual), parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa), intraperitoneal y pulmonar. Se apreciará que la vía preferida variará con la afección y la edad del receptor, y la enfermedad que se está tratando. Para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad, por ejemplo, las vías de administración preferidas son la tópica, la subcutánea, la intramuscular y/o la intravenosa.

[0035] Para la administración oral, la sal amorfa de dilactato de escualamina de la invención se puede formular fácilmente combinándola con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente que se va a tratar.

5 [0036] Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener combinando el compuesto activo con un excipiente sólido, opcionalmente triturando una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir productos auxiliares adecuados, si se desea, para obtener núcleos de grageas o comprimidos. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, productos de relleno tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, 10 gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, el agar, el ácido alginico o una sal derivada, tal como el alginato de sodio.

[0037] Se pueden formular composiciones farmacéuticas para la administración tópica de la sal amorfa de dilactato de escualamina de la invención en vehículos convencionales compatibles oftalmológicamente, tales como, por ejemplo, 15 una pomada, una crema, una suspensión, una loción, un polvo, una solución, una pasta, un gel, un pulverizador, un aerosol o un aceite. Estos vehículos pueden contener conservantes compatibles tales como el cloruro de benzalconio, tensioactivos tales como el polisorbato 80, liposomas o polímeros tales como la metilcelulosa, el alcohol polivinílico, la polivinilpirrolidona y el ácido hialurónico, que se pueden usar para aumentar la viscosidad. Para las enfermedades del ojo, las formulaciones tópicas preferidas son las pomadas, los geles, las cremas o los colirios que contienen al menos 20 uno de los aminosteroides de la invención.

[0038] Para la administración por inhalación, la sal amorfa de dilactato de escualamina de la presente invención se suministra convenientemente en forma de una presentación de pulverizador de aerosoles de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, el diclorodifluorometano, el triclorofluorometano, el 25 diclorotetrafluoroetano, el dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso del aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad dosificada. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para usar en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como la lactosa o el almidón.

[0039] La sal de dilactato de escualamina amorfa se puede formular para la administración parenteral por inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de 30 dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como tampones, bacteriostáticos, agentes de suspensión, agentes estabilizantes, agentes espesantes, agentes dispersantes o mezclas de los mismos. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones aceitosas apropiadas para 35 inyecciones. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como el aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el etil-oleato o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como la carboximetilcelulosa sódica, el sorbitol o el dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de 40 soluciones altamente concentradas. En una forma de realización preferida, las sales de escualamina de la invención se disuelven en una solución de azúcar al 5%, tal como la dextrosa, antes de administrarse parenteralmente.

[0040] La sal amorfa de dilactato de escualamina de la invención también se puede formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases convencionales de supositorios, tales como la manteca de cacao u otros glicéridos.

45 [0041] La sal amorfa de dilactato de escualamina de la invención también se puede combinar con al menos un agente terapéutico adicional. Los agentes ejemplares incluyen, por ejemplo, anticancerígenos, antibióticos, antivíricos, antiangiogénicos u otro tratamiento para la neovascularización en el ojo.

[0042] Sin una descripción adicional, se cree que una persona experta en la técnica puede, usando la descripción 50 precedente y los ejemplos ilustrativos siguientes, preparar y utilizar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Los ejemplos prácticos siguientes, por lo tanto, señalan específicamente formas de

realización preferidas de la presente invención, y no se deben interpretar como limitantes de ninguna manera del resto de la divulgación.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 - Preparación de dilactato de escualamina amorfo

5 [0043] La escualamina cruda se preparó según los métodos descritos en la patente de EE.UU. 6,262,283, la patente de EE.UU. 6,610,866 y la solicitud de patente de EE.UU. 10/268,660. La escualamina cruda se disolvió en agua, se acidificó con ácido trifluoroacético (TFA) y luego se purificó por HPLC en fase inversa usando una columna C18 YMC ODS-AQ o equivalente y un sistema binario de solventes. La cromatografía de HPLC se realizó para recoger fracciones de producto que cumplen con las especificaciones de la sustancia farmacológica. Las fracciones de sal de TFA de escualamina pura se concentraron antes de la conversión de la sal.

10 [0044] La conversión de la sal de TFA de escualamina en sal de dilactato de escualamina se realizó por adsorción de la sal de TFA en una resina Amberchrom o su equivalente. La resina se lavó luego extensivamente con acetonitrilo al 1% en agua, bicarbonato sódico y acetonitrilo al 1% en agua; y finalmente con un exceso de ácido láctico L-(+) disuelto en agua. La sal de dilactato de escualamina se eluyó con un aumento gradual del porcentaje de acetonitrilo en agua. Las fracciones con dilactato de escualamina se agruparon, se concentraron y se liofilizaron. El análisis del material para el ácido láctico y la escualamina mostró una proporción de dos moles de ácido láctico por mol de escualamina. La caracterización del dilactato de escualamina liofilizado se describe a continuación.

Patrón de difracción de rayos X de polvo

20 [0045] Los barridos de difracción de rayos X de polvo de una muestra de dilactato de escualamina liofilizado se realizaron de 4,0 a 45,0 grados (2 $\theta$  conforme al método USP <941>) mientras una película de policarbonato cubría la muestra. Los datos pertinentes se muestran en la figura 2 y se resumen en la tabla siguiente. Estos datos muestran un halo amorfo con unos pocos picos discretos que indican una cristalinidad baja o parcial.

Preparación de la muestra	Ángulo (° theta-2 theta)		
	15,5 - 15,6	17,3 - 17,5	21,3 - 21,5
Escualamina liofilizada	286	391	107

Análisis termogravimétrico

25 [0046] El análisis termogravimétrico implica la determinación del peso de una muestra en función de la temperatura según USP <891>. Las muestras de dilactato de escualamina liofilizado se prepararon en una atmósfera de nitrógeno en una caja de guantes con la humedad controlada. Los análisis se completaron usando un Perkin Elmer TGA7 con un controlador TAC 7/DX y la versión 4.01 del *software* Pyris. Se usó nitrógeno NF a un caudal de 20 ml/minuto. Las muestras se calentaron a una velocidad controlada de 10°C por minuto para generar una mejor sensibilidad y a 2°C por minuto para adquirir una mejor resolución hasta una temperatura final de 180°C. Los resultados para el análisis a 2°C por minuto se muestran en la figura 3 y los datos se resumen en la tabla siguiente. Los datos muestran una pérdida de peso única de 2,32% y el inicio de la degradación a una temperatura de 136,9°C.

Preparación de dilactato de escualamina	Velocidad (°C/min)	Pérdida de masa primaria	Pico de la pérdida de masa secundaria	Pérdida de masa secundaria	Inicio de la degradación
Escualamina liofilizada	2	2,32 %	N/A	N/A	136,9°C

Calorimetría diferencial de barrido

[0047] Se analizaron las muestras por calorimetría diferencial de barrido a alta temperatura y se corrieron a 2°C y 10°C por minuto. Las transiciones térmicas adquiridas durante una velocidad de barrido de 2°C por minuto se consideran que son más precisas y son los cálculos reflejados en la conclusión. Todos los eventos enumerados son temperaturas de picos endotérmicos a menos que se indique lo contrario. Los ejemplos de eventos adicionales incluyen un "Exo" que indica un evento exotérmico o un "Tg" que indica una transición de fase. La falta de un evento térmico notable en un barrido particular se indica por "ninguno". Durante el análisis del dilactato de escualamina liofilizado, se detectó un evento exotérmico a una temperatura de inicio de 52,7°C durante un barrido a 2°C por minuto. Un evento de transición de fase (Tg), que ocurre a una temperatura de 62,0°C durante un barrido a 10°C por minuto, no presentó un evento térmico correspondiente cuando se barrió a 2°C por minuto. Una transición de fase es indicativa de una parte amorfa de la estructura del material seco que se reblandece y cambia. Se observaron dos eventos endotérmicos a temperaturas de pico de 127,7°C y 157,7°C durante el barrido a 2°C por minuto. El cambio más grande en el calor específico asociado a un evento endotérmico para el dilactato de escualamina liofilizado fue un cambio en el calor específico de 8,15 J/g que se observó durante el barrido a 10°C por minuto a una temperatura de 166,51°C. El cambio en el calor específico asociado a un evento endotérmico está correlacionado con la cantidad de energía requerida para fundir ese material. Los resultados del barrido a 2°C por minuto se muestran en la figura 4 y se resumen en la tabla siguiente.

Preparación de dilactato de escualamina	Velocidad (°C/min)	1	2	3	4	5
Escualamina liofilizada	2	52,7 (Exo)	Ninguno	127,7	157,7	Ninguno
	10	62,0 (Tg)	71,3 (Exo)	98,3 (Exo)	130,1	166,5

*Ejemplo 2 - Un estudio de irritación local de inyecciones intravenosas repetidas durante 5 días de diferentes formas de sal (ditrifluoroacetato, dilactato, digluconato, diacetato) de MSI-1256 (escualamina) en ratones*

[0048] Resumen: las inyecciones repetidas durante cinco días de varias formas de sal de escualamina (2,5 mg/kg/día) causaron inflamación, contusión e irritación de las colas de los ratones. El tratamiento con dilactato de escualamina y digluconato de escualamina fue tolerado ligeramente mejor que el tratamiento con diacetato de escualamina y ditrifluoroacetato de escualamina, aunque se observaron inflamación, contusión e irritación con todas las formas inyectadas de sal de escualamina administradas reiteradamente a una dosis de 2,5 mg/kg/día usando soluciones de 0,25 mg/ml.

[0049] Objetivo: determinar la irritación local de dosis intravenosas diarias repetidas durante 5 días de formas de sal de escualamina en colas de ratones CD-1®BR.

[0050] Material y métodos: (animales): cuarenta y ocho ratones CD-1®BR machos (Charles River Lab). El peso corporal medio al inicio del estudio fue de 20,6 g. (Entorno de alojamiento): los ratones se alojaron en grupos (máximo 10 ratones/caja) en cajas de plástico para ratones con lecho de virutas de madera dura y cubiertas de alambre. Tenían acceso a alimento (Purina Mouse Chow) y agua en botellas *ad libitum*. Las cajas se alojaron en estanterías aislantes que se suministraron con aire ambiente filtrado a través de un paso. La habitación donde se alojaron los animales estaba con un ciclo de luz de 12 horas encendida/12 horas apagada y tenía una temperatura (rango: 67-76°F) y una humedad (rango: humedad relativa al 40-70%) controladas.

[0051] Artículos de prueba:

- 35 ditrifluoroacetato de escualamina, 69,7% de fracción activa
- diacetato de escualamina, 80,0% de fracción activa
- dilactato de escualamina, 76,0% de fracción activa
- digluconato de escualamina, 55,0% de fracción activa
- magainina-2-amida, control positivo

40 [0052] Vehículo: dextrosa al 5% en agua (D5W) (bolsa I.V. de Baxter, estéril)



[0053] Preparación de la solución: se preparó una solución de 0,36 mg/ml de sal de ditrifluoroacetato de escualamina (equivalente a 0,25 mg/ml de fracción activa de ditrifluoroacetato de escualamina) en D5W. Se preparó una solución de 0,31 mg/ml de sal de diacetato de escualamina (equivalente a 0,25 mg/ml de fracción activa de diacetato de escualamina) en D5W. Se preparó una solución de 0,33 mg/ml de sal de dilactato de escualamina (equivalente a 0,25 mg/ml de fracción activa de dilactato de escualamina) en D5W. Se preparó una solución de 0,45 mg/ml de sal de digluconato de escualamina (equivalente a 0,25 mg/ml de fracción activa de digluconato de escualamina) en D5W. Se preparó una solución de 1,0 mg/ml de solución de magainina-2-amida (control positivo) en D5W.

[0054] Protocolo: los ratones se asignaron de forma aleatoria a seis grupos (8 ratones/grupo) y recibieron inyecciones intravenosas (i.v.) diarias de soluciones de D5W o sales de escualamina en la vena caudal durante cinco días (días de estudio 0, 1, 2, 3 y 4). Volúmenes de inyección de 10 ml/kg de peso corporal usando D5W o una solución de 0,25 mg/ml de sales de escualamina resultaron en dosis de 0 mg/kg/día para los ratones en el grupo D5W (grupo 1) y 2,5 mg/kg/día de fracción activa de sal de escualamina para todos los ratones tratados con sal de escualamina. Un grupo de ocho ratones recibió el artículo de prueba magainina-2-amida (10 mg/kg/día; 10 ml/kg/día de una solución de 1 mg/ml), que se había determinado previamente que era irritante de la vena local, como control positivo. Los ratones no fueron inyectados con el artículo de prueba si la gravedad de la contusión o la inflamación (edema) justificaba la omisión de la inyección. Se monitoreó la supervivencia y se observaron las señales clínicas a diario durante los cinco días de administración de las sales de escualamina y cuatro días después de la última dosis (día de estudio 8). Las señales clínicas de irritación, edema y contusión se produjeron en los días 1, 2, 3 y 4 aproximadamente 24 horas después de cada inyección e inmediatamente antes de la inyección de ese día. Los pH de las soluciones de todos los artículos de prueba excepto la magainina-2-amida se comprobaron en el día de estudio 3. (Se usaron las mismas soluciones en todo el estudio para poder asumir un pH similar en todos los días de estudio).

[0055] Resultados: los animales a los que se les administraron dosis intravenosas (i.v.) repetidas de varias formas de sal de escualamina en la vena caudal tenían las colas irritadas, inflamadas (edema) y/o contusionadas en el día de estudio 2. El número de colas de ratón que estaban contusas y edematosas, así como la gravedad de la contusión y el edema, estaba directamente relacionado con el número de inyecciones. Para valorar la recuperación, las colas se observaron el día de estudio 8, que era cuatro días posterior a la última inyección. En el día 8, las colas de los ratones de los grupos 3 y 4 (que habían recibido las formas de sal de dilactato y digluconato, respectivamente) estaban ligeramente irritadas y contusas. Las colas de los ratones de los grupos 5 y 6 (que habían recibido las formas de sal de diacetato y ditrifluoroacetato, respectivamente) estaban irritadas y contusas de forma similar. Una (1/8) cola de ratón estaba necrótica en el grupo 5. En el grupo 6, una (1/8) cola de ratón se cayó y una (1/8) cola de ratón también estaba necrótica. Los ratones del grupo 2 (control positivo) mostraron un edema leve o moderado en las colas durante la dosificación (1/8, 3/8, 5/8 y 5/8 en los días 1, 2, 3 y 4) y se recuperaron el día 8. Los pH de todas las soluciones de las formas de sal de escualamina fueron aproximadamente 6.

[0056] Conclusiones: las inyecciones repetidas de todas las formas de sal de escualamina causaron inflamación (edema), contusión e irritación de las colas de ratón. Los síntomas clínicos sugieren que el tratamiento con dilactato de escualamina y digluconato de escualamina se toleró mejor que el tratamiento con diacetato de escualamina y ditrifluoroacetato de escualamina. Así, una ventaja inesperada del dilactato de escualamina y las sales de digluconato de escualamina sobre otras sales de escualamina evaluadas es una menor irritación venosa, es decir, una menor toxicidad, experimentada por el receptor, especialmente en el sitio de la administración intravenosa.

*Ejemplo 3 - Estudio de estabilidad acelerado de cuatro formas de sal de la escualamina*

[0057] Se realizó un estudio de estabilidad acelerado (en función de la temperatura) con una duración de cuatro semanas con escualamina en cuatro formas de sal diferentes. Las cuatro formas de sal fueron: dihidrocloruro, diacetato, dilactato y D-digluconato. Las muestras se sometieron a temperaturas de 40°C, 60°C y 80°C. La tabla siguiente resume los resultados del % de pureza del pico principal, la escualamina, en función del área total integrada. El análisis se realizó usando una HPLC de fase inversa de muestras derivadas de oftaldialdehído.

Tabla 1

Forma de sal	T=0	4 sem 40°C	4 sem 60°C	4 sem 80°C
Dihidrocloruro	90,7%	84,3%	85,3%	82,4%
Diacetato	94,4%	87,3%	81,5%	62,9%

Dilactato	91,8%	80,9%	80,6%	70,9%
Digluconato	87,8%	72,6%	60,7%	4,9%

[0058] La tabla 1 muestra cómo se ha degradado cada forma de sal a lo largo del tiempo a temperaturas elevadas. Los resultados de este estudio de estabilidad indican que el dilactato de escualamina es sorprendentemente estable bajo condiciones cada vez más extremas, especialmente en comparación con las sales de diacetato y digluconato. Esta estabilidad ventajosa de la sal de dilactato de escualamina junto con su baja toxicidad (como se muestra en el ejemplo 2) fueron factores importantes en la selección de la forma de sal de dilactato de escualamina para el desarrollo posterior.

#### Comparativa

##### *Ejemplo 4 - Preparación de dilactato de escualamina cristalino a partir de 2-propanol*

[0059] Una solución sobresaturada de dilactato de escualamina amorfo se produjo calentando un exceso de dilactato de escualamina a 90°C en una mezcla de 10 ml de 2-propanol más 100 µl de agua. El exceso de dilactato de escualamina se filtró y la solución se enfrió a -20°C. Se formó un precipitado de agujas blancas, el sobrenadante se eliminó y el sólido se secó en un desecador de vacío. Se observó que el material cristalino resultante no era higroscópico ya que no ganó peso cuando se dejó a temperatura ambiente sin cubrir durante una hora.

#### Determinación del patrón de difracción de rayos X de cristal único

[0060] Se obtuvieron cristales únicos adecuados para el estudio de rayos X a partir de una solución de 2-propanol y agua como se ha descrito anteriormente. Para el estudio se eligió el cristal más grande, con las dimensiones de 0,025, 0,10 y 1,10 mm. El cristal se montó en un instrumento Nonius Kappa CCD con radiación de molibdeno y un detector de área CCD. El cristal se enfrió a 173K usando una corriente de nitrógeno enfriada por nitrógeno líquido. Las mediciones preliminares mostraron que la difracción era muy débil a más de 22 grados en theta y que el cristal pertenecía al grupo espacial monoclinico. Para mejorar la diferenciación de los isómeros quirales, se decidió que los datos se recogerían en un sistema cristalino inferior (es decir, triclinico). Los datos se recogieron exponiendo el cristal durante 500 segundos por grado de rotación del cristal. La recogida total de datos llevó 32 horas. Los datos se procesaron para obtener la intensidad final del patrón de difracción y todas las mediciones únicas se mantuvieron separadas sin aplicar la ley de Friedel.

[0061] El análisis de grupo espacial mostró que no hubo ninguna ausencia sistemática. El análisis del patrón de difracción mostró que el cristal pertenecía a un grupo espacial no céntrico y una posible simetría doble a lo largo del eje b, sugiriendo que puede pertenecer al grupo espacial P2. Todos estos fueron consistentes con lo que se espera de una molécula quiral, que no puede pertenecer a un grupo espacial céntrico y no puede tener simetrías ni especular ni de deslizamiento. El análisis de intensidad mostró que los datos se volvían débiles en los ángulos más altos de theta. La intensidad media en el rango de theta de 21-22 grados fue justo 1,9 veces el fondo medio. Sin embargo, había suficientes datos sólidos para proporcionar la estructura molecular con la configuración absoluta apropiada (quiralidad).

[0062] La estructura se resolvió fácilmente por métodos directos en el grupo espacial P2 sugerido por los análisis de datos. El refinamiento de la estructura por mínimos cuadrados seguido de diferencia de Fourier mostró la presencia de moléculas de solvente. Se detectaron muchas moléculas de agua y una molécula de 2-propanol desordenada. Se verificaron las ocupaciones de las moléculas por refinamiento y se descubrió que una molécula de agua tenía solo la mitad (50%) de ocupación. Todos los átomos distintos del hidrógeno se refinaron con parámetros de desplazamiento anisotrópico (ADP). Los átomos de hidrógeno conectados con átomos de carbono y nitrógeno se incluyeron en posiciones calculadas. Para los grupos hidroxilo y las moléculas de agua, solo se incluyeron cuando se encontraron átomos razonables en la diferencia de Fourier. Para la molécula de 2-propanol desordenada y para el oxígeno para los que no se localizó ningún átomo razonable a partir de la diferencia de Fourier, no se incluyeron en el cálculo. El refinamiento usó 6119 datos de intensidad y refinó 612 parámetros. El factor residual final (factor R) fue de 0,087, lo que demuestra sin ambigüedad la estructura de la molécula.

[0063] Hay varios hidrógenos polares (deficientes en electrones) en nitrógenos catiónicos y oxígenos hidroxílicos. Hay también varios oxígenos ricos en electrones en centros aniónicos. Esto lleva a una red de formación de enlaces de hidrógeno. Además, muchas moléculas de agua se unen a la red de enlaces de hidrógeno. Los detalles se describen a continuación.

Donador de H	Aceptor de H	Distancia (Å)	Simetría
O1	O2W	2,692	x,y,z
N1(H1A)	O10	2,835	x-1,y-1,z
N1(H1B)	O9	2,842	x-1,y-2,z
N1(H1B)	O11	2,854	x-1,y-2,z
N2(H2A)	O6	2,734	-x,y,2-z
N2(H2B)	O7	2,876	-x,y-1,2-z
N2(H2B)	O8	2,835	-x,y-1,2-z
N3(H3C)	O3	2,886	-x,y,2-z
N3(H3A)	O1W	2,804	x-1,y-1,z+1
N3(H3B)	O1S u O1S'	2,940 o 2,945	x-1,y-1,z+1
O2W(H3W)	O7	2,811	x,y,z
O2W(H4W)	O9	2,762	1-x,y-1,2-z
O8(H8)	O3W	2,747	x,y,z
O3W	O4W	2,777	x,y,z
O3W	O6	2,665	x,1+y,z
O4W	O10	2,749	x,y,z
O4W	O4W	2,840	1-x,y,2-z
O11	O4W	2,779	x,1+y,z
O1S u O1S'	O3W	2,730 o 2,857	1-x,y,1-z

[0064] Las distancias se dan entre los átomos distintos del hidrógeno y cuando están disponibles se muestran en paréntesis los hidrógenos a través de los cuales se formaron los enlaces. La estructura cristalina del dilactato de escualamina se muestra en la figura 5.

5 [0065] Se determinó una celda unitaria a partir de los datos de rayos X de cristal único de la forma hidratada. Era monoclinica con simetría P2, Z = 2, y las dimensiones siguientes: a = 19,3999 Å, b = 6,5443 Å, c = 20,9854 Å, alfa = gamma = 90°, beta = 92,182° y V = 2662.3Å<sup>3</sup>.

Patrón de difracción de rayos X de polvo

10 [0066] Los barridos de difracción de rayos X de polvo de una muestra de dilactato de escualamina cristalizado a partir de 2-propanol se realizaron de 4,0 a 45,0 grados (2 conforme al método USP <941>) mientras la muestra estaba cubierta por una película de policarbonato. Los datos pertinentes, consistentes en picos cristalinos distintos se muestran en la figura 6 e indica un material cristalino.

Preparación de la muestra	Ángulo (° theta-2 theta)		
	12,5	16,6	18,8
Cristalizado a partir de 2-propanol/agua	890	829	756

#### Análisis termogravimétrico

[0067] El análisis termogravimétrico implica la determinación del peso de una muestra en función de la temperatura según USP <891>. Las muestras se prepararon en una atmósfera de nitrógeno en una caja de guantes con la humedad controlada. Los análisis se completaron usando un Perkin Elmer TGA7 con un controlador TAC 7/DX y la versión 4.01 del *software* Pyris. Se usó nitrógeno NF a un caudal de 20 ml/minuto. Las muestras se calentaron a una velocidad controlada de 10°C por minuto para generar una mejor sensibilidad y a 2°C por minuto para adquirir una mejor resolución hasta una temperatura final de 180°C. Este material cristalizado tenía dos eventos distintos de pérdida de peso volátil. El evento inicial produjo una pérdida de peso del 1,38%. El segundo evento produjo una pérdida de peso media del 1,54% con un evento de pico observado a una temperatura de 103,6°C cuando se evaluó a 2°C por minuto. La pérdida de peso total sufrida por la muestra fue del 2,92%. Los dos eventos distintos de pérdida de peso sugieren que existía una forma unida de agua en la matriz de la muestra. La pérdida inicial se debe muy probablemente a la eliminación de constituyentes volátiles adsorbidos a la superficie del material. El segundo evento de pérdida de peso ocurrió debido a una liberación de agua absorbida asociada a la matriz de la muestra, que fue muy probablemente un hidrato cristalino, a una temperatura de pico de 103,6°C. La segunda liberación distinta de humedad de la muestra a una temperatura específica sugiere la descomposición de una gran parte de material cristalino. Los resultados para el barrido a 2°C por minuto se muestran en la figura 7 y los datos se resumen en la tabla siguiente.

Preparación de dilactato de escualamina	Velocidad (°C/min)	Pérdida de masa primaria	Pico de la pérdida de masa secundaria	Pérdida de masa secundaria	Inicio de la degradación
Cristalizado a partir de 2-propanol/agua	2	1,38 %	103,6°C	1,54 %	130,8°C

#### Calorimetría diferencial de barrido

[0068] Se analizaron las muestras por calorimetría diferencial de barrido a alta temperatura y se corrieron a 2°C y 10°C por minuto. Las transiciones térmicas adquiridas durante una velocidad de barrido de 2°C por minuto se consideran que son más precisas y son los cálculos reflejados en la conclusión. Todos los eventos enumerados son temperaturas de picos endotérmicos a menos que se indique lo contrario. Los ejemplos de eventos adicionales incluyen un "Exo" que indica un evento exotérmico o un "Tg" que indica una transición de fase. La falta de un evento térmico notable en un barrido particular se indica por "ninguno". El primer evento térmico caracterizado por DSC a 2°C por minuto para este material cristalizado fue un evento endotérmico que ocurrió a una temperatura de 73,6°C. Los eventos endotérmicos son atribuibles a la fusión inicial de un material cristalizado. El evento térmico más significativo fue un evento endotérmico adicional que ocurrió a una temperatura de 107,3°C. Este evento endotérmico coincide con la temperatura de la pérdida de peso máxima de 103,6°C durante el barrido TGA de este material particular. Tres eventos exotérmicos adicionales ocurrieron a temperaturas de 126,6°, 157,3° y 164,1°C. Los resultados del barrido a 2°C por minuto se muestran en la figura 8 y se resumen en la tabla siguiente.

Preparación de dilactato de escualamina	Velocidad (°C/min)	1	2	3	4	5
Cristalizado a partir de 2-propanol/agua	2	73,6	107,3	126,6	157,3	164,1
	10	79,8	112,8	130,5	Ninguno	165,6

Comparativa

*Ejemplo 5 - Preparación de dilactato de escualamina cristalino a partir de etanol*

[0069] Una solución sobresaturada de dilactato de escualamina amorfo se produjo calentando un exceso de dilactato de escualamina a 90°C en una mezcla de 10 ml de etanol más 100 µl de agua. El exceso de dilactato de escualamina se filtró y la solución se enfrió a -20°C. Se formó un precipitado de agujas blancas, el sobrenadante se eliminó y el sólido se secó en un desecador de vacío.

Patrón de difracción de rayos X de polvo

[0070] Los barridos de difracción de rayos X de polvo de una muestra de dilactato de escualamina cristalizado a partir de etanol se realizaron de 4,0 a 45,0 grados (2<sup>o</sup> conforme al método USP <941>) mientras la muestra estaba cubierta por una película de policarbonato. Los datos pertinentes, consistentes en picos cristalinos distintos se muestran en la figura 9 y se resumen en la tabla siguiente e indica un material cristalino.

Preparación de la muestra	Ángulo (° theta-2 theta)		
	10,2	13,0	16,6
Cristalizado a partir de etanol/agua	1826	2305	1817

Análisis termogravimétrico

[0071] El análisis termogravimétrico implica la determinación del peso de una muestra en función de la temperatura según USP <891>. Las muestras se prepararon en una atmósfera de nitrógeno en una caja de guantes con la humedad controlada. Los análisis se completaron usando un Perkin Elmer TGA7 con un controlador TAC 7/DX y la versión 4.01 del software Pyris. Se usó nitrógeno NF a un caudal de 20 ml/minuto. Las muestras se calentaron a una velocidad controlada de 10°C por minuto para generar una mejor sensibilidad y a 2°C por minuto para adquirir una mejor resolución hasta una temperatura final de 180°C. Esta muestra de dilactato de escualamina tenía dos eventos distintos de pérdida de peso volátil. El evento inicial produjo un 2,99% de pérdida de peso. El segundo evento produjo una pérdida de peso media del 1,49% con un evento de pico observado a una temperatura de 106,7°C cuando se evaluó a 2°C por minuto. La pérdida de peso total sufrida por la muestra fue del 4,48%. Los dos eventos distintos de pérdida de peso sugieren que existía una forma unida de agua en la matriz de la muestra. La pérdida inicial se debe muy probablemente a la eliminación de constituyentes volátiles adsorbidos a la superficie del material. El segundo evento de pérdida de peso ocurrió debido a una liberación de agua absorbida asociada a la matriz de la muestra, que era muy probablemente un hidrato cristalino, a una temperatura de pico de 106,7°C. La segunda liberación distinta de humedad de la muestra a una temperatura específica sugiere la descomposición de una gran parte de material cristalino. Las temperaturas relacionadas con el inicio de la degradación se determinaron usando también un TGA. La temperatura media de inicio de la degradación para este material de muestra fue 152,3°C. Los resultados para el barrido a 2°C por minuto se muestran en la figura 10 y los datos se resumen en la tabla siguiente.

Preparación de dilactato de escualamina	Velocidad (°C/min)	Pérdida de masa primaria	Pico de la pérdida de masa secundaria	Pérdida de masa secundaria	Inicio de la degradación
Cristalizado a partir de etanol/agua	2	2,99 %	106,7°C	1,49 %	152,3°C

Calorimetría diferencial de barrido

[0072] Las muestras se analizaron por calorimetría diferencial de barrido a alta temperatura y se corrieron a 2°C y 10°C por minuto. Las transiciones térmicas adquiridas durante una velocidad de barrido de 2°C por minuto se consideran que son más precisas y son los cálculos reflejados en la conclusión. Todos los eventos enumerados son temperaturas de picos endotérmicos a menos que se indique lo contrario. Los ejemplos de eventos adicionales incluyen un "Exo" que

indica un evento exotérmico o un "Tg" que indica una transición de fase. La falta de un evento térmico notable en un barrido particular se indica por "ninguno". El primer y más significativo evento térmico caracterizado por la DSC a 2°C por minuto para este material, fue un evento endotérmico que ocurrió a una temperatura de 112,3°C. Los eventos endotérmicos son atribuibles a la fusión inicial de un material cristalizado. Este evento endotérmico coincide con la temperatura del pico de pérdida de peso de 106,7°C durante el barrido TGA de este material particular. Dos eventos exotérmicos adicionales se detectaron a temperaturas de 144,7°C y 175,4°C. Los eventos endotérmicos, que ocurren a las temperaturas de 141,1°C y 151,6°C durante un barrido a 10°C por minuto, no presentaron un evento térmico correspondiente cuando se analizaron a 2°C por minuto. Los eventos térmicos observados durante el barrido del material indican la fusión de material cristalino. El evento endotérmico más significativo observado durante el barrido a 2°C por minuto del material, que ocurre a una temperatura de pico de 112,4°C, resultó en un cambio en el calor específico de 18,16 J/g. El cambio en el calor específico asociado a un evento endotérmico está correlacionado con la cantidad de energía requerida para fundir ese material. Por lo tanto, el evento endotérmico, que ocurre a la temperatura de 112,4°C se considera que representa el material cristalino más estable presente. Los resultados del barrido a 2°C por minuto se muestran en la figura 11 y se resumen en la tabla siguiente.

Preparación de dilactato de escualamina	Velocidad (°C/min)	1	2	3	4	5
Cristalizado a partir de etanol/agua	2	112,3	Ninguno	144,7	Ninguno	175,4
	10	114,6	141,1	147,4	151,6	173,1

15 *Ejemplo 6 - Estabilidad del dilactato de escualamina cristalino precipitado a partir de etanol*

[0073] Las muestras de dilactato de escualamina amorfo y dilactato de escualamina recristalizado a partir de etanol como se describe en el ejemplo 5 se colocaron en viales de centelleo y se calentaron en un horno a 70°C durante tres días. Una parte de cada muestra sometida a estrés por calor se analizó entonces por HPLC con detección ELSD y los resultados se compararon con el análisis de HPLC de material no estresado. El resultado del análisis de HPLC se muestra en la tabla siguiente.

Material	Isómero 24 S	Escualamina	Lactilamida	Desconocido	Desconocido
Escualamina amorfa no sometida a estrés	0,833%	98,978%	<u>0,115%</u>	0,054%	0,020%
Escualamina amorfa sometida a estrés por calor	0,864%	98,530%	<u>0,519%</u>	0,052%	0,034%
Escualamina cristalizada no sometida a estrés	0,715%	99,187%	<u>0,070%</u>	0,032%	<0,02%
Escualamina cristalizada sometida a estrés por calor	0,714%	99,168%	<u>0,087%</u>	0,031%	<0,02%

[0074] El resultado demuestra un aumento significativo del porcentaje de la impureza de lactilamida cuando la escualamina amorfa se somete a estrés por calor, pero no un aumento significativo del material cristalizado. Por lo tanto, concluimos que la recristalización del dilactato de escualamina es un método para mejorar la estabilidad del material. Esta estabilidad mejorada es ventajosa para la preparación y el almacenamiento de la sal de dilactato de escualamina cristalina y sus varias formulaciones.

Comparativa

*Ejemplo 7 - Preparación de dilactato de escualamina cristalino a partir de 2-butanol*

[0075] Una solución sobresaturada de dilactato de escualamina amorfo se produjo calentando un exceso de dilactato de escualamina a 90°C en una mezcla de 10 ml de 2-butanol más 100 µl de agua. El exceso de dilactato de escualamina

se filtró y la solución se enfrió a -20°C. Se formó un precipitado de agujas blancas, se eliminó el sobrenadante y se secó el sólido en un desecador de vacío.

Patrón de difracción de rayos X de polvo

5 [0076] Los barridos de difracción de rayos X de polvo de una muestra de dilactato de escualamina cristalizado a partir de 2-butanol se realizaron de 4,0 a 45,0 grados (2 conforme al método USP <941>) mientras la muestra estaba cubierta por una película de policarbonato. Los datos pertinentes, consistentes en picos cristalinos distintos se muestran en la figura 12 y se resumen en la tabla siguiente e indica un material cristalino.

Preparación de la muestra	Ángulo (° theta-2 theta)		
	13,1	17,7	18,3
Cristalizado a partir de 2-butanol/agua	939	937	967

Análisis termogravimétrico

10 [0077] El análisis termogravimétrico implica la determinación del peso de una muestra en función de la temperatura según USP <891>. Las muestras se prepararon en una atmósfera de nitrógeno en una caja de guantes con la humedad controlada. Los análisis se completaron usando un Perkin Elmer TGA7 con un controlador TAC 7/DX y la versión 4.01 del software Pyris. Se usó nitrógeno NF a un caudal de 20 ml/minuto. Las muestras se calentaron a una velocidad controlada de 10°C por minuto para generar una mejor sensibilidad y a 2°C por minuto para adquirir una mejor resolución hasta una temperatura final de 180°C. Esta muestra de dilactato de escualamina presentó dos eventos distintos de pérdida de peso volátil. El evento inicial produjo un 2,69% de pérdida de peso. El segundo evento produjo una pérdida de peso media del 3,34% con un evento de pico observado a una temperatura de 101,8°C cuando se evaluó a 2°C por minuto. La pérdida de peso total sufrida por la muestra fue del 6,03%. Los dos eventos distintos de pérdida de peso sugieren que existía una forma unida de solvente en la matriz de la muestra. La pérdida inicial se debe muy probablemente a la eliminación de constituyentes volátiles adsorbidos a la superficie del material. El segundo evento de pérdida de peso ocurrió debido a una liberación de agua absorbida asociada a la matriz de la muestra, que fue muy probablemente un hidrato cristalino, a una temperatura de pico de 101,8°C. La segunda liberación distinta de humedad de la muestra a una temperatura específica sugiere la descomposición de una gran parte de material cristalino. Se determinaron las temperaturas relacionadas con el inicio de la degradación usando también un TGA. La temperatura media de inicio de la degradación para este material de muestra fue 145,0°C. Los resultados para el barrido a 2°C por minuto se muestran en la figura 13 y los datos se resumen en la tabla siguiente.

Preparación de dilactato de escualamina	Velocidad (°C/min)	Pérdida de masa primaria	Pico de la pérdida de masa secundaria	Pérdida de masa secundaria	Inicio de la degradación
Cristalizado a partir de 2-butanol/agua	2	2,69 %	101,8°C	3,34 %	145,0°C

Calorimetría diferencial de barrido

30 [0078] Las muestras se analizaron por calorimetría diferencial de barrido a alta temperatura y se corrieron a 2°C y 10°C por minuto. Las transiciones térmicas adquiridas durante una velocidad de barrido de 2°C por minuto se consideran que son más precisas y son los cálculos reflejados en la conclusión. Todos los eventos enumerados son temperaturas de picos endotérmicos a menos que se indique lo contrario. Los ejemplos de eventos adicionales incluyen un "Exo" que indica un evento exotérmico o un "Tg" que indica una transición de fase. La falta de un evento térmico notable en un barrido particular se indica por "ninguno". El primer evento térmico caracterizado por la DSC a 2°C por minuto para este material, fue un evento de transición vítrea (Tg) que ocurrió a una temperatura de 45,7°C. Un evento de transición vítrea se atribuye a menudo a cierta cantidad de material amorfo. Se detectó un evento endotérmico a una temperatura de 35 100,2°C, dando como resultado un cambio en el calor específico de 19,99 J/g. Los eventos endotérmicos son atribuibles a la fusión inicial de un material cristalizado. El cambio en el calor específico asociado a un evento endotérmico está correlacionado con la cantidad de energía requerida para fundir ese material. Este evento endotérmico coincide con la

- temperatura del pico de pérdida de peso de 101,8°C durante el barrido TGA de este material particular. Por lo tanto, el evento endotérmico, que ocurre a la temperatura de 100,2°C se considera que representa el material cristalino más estable presente. Dos eventos exotérmicos adicionales se detectaron a temperaturas de 146,4°C y 177,1°C. El evento endotérmico, que ocurre a la temperatura de 153,8°C durante un barrido a 10°C por minuto, no presentó un evento térmico correspondiente cuando se analizó a 2°C por minuto. Los resultados del barrido a 2°C por minuto se muestran en la figura 14 y se resumen en la tabla siguiente.

Preparación de dilactato de escualamina	Velocidad (°C/min)	1	2	3	4	5
Cristalizado a partir de 2-butanol/agua	2	45,7(Tg)	100,2	146,4	Ninguno	177,1
	10	42,2(Tg)	103,2	146,1	153,8	179,8 (inicio)

#### Comparativa

#### *Ejemplo 8 - Método mejorado para la producción de dilactato de escualamina cristalino*

- [0079] El compuesto 36 se preparó según los métodos descritos en las patentes de EE.UU. 6,262,283 y 6,610,866 y la solicitud de patente de EE.UU. 10/268,660. Aproximadamente 490,0 g (2,0 moles) de dihidrocloruro de azidoespermidina se disolvieron en 22,5 L de piridina a temperatura ambiente. Aproximadamente se añadieron 8,0 L (4,0 moles) de una solución de 0,5 M de solución de metóxido de sodio-metanol y la mezcla se agitó durante aproximadamente 0,5 horas. Se añadieron aproximadamente 641,0 g (1,0 mol) de compuesto 36 y la mezcla de reacción se agitó durante un tiempo adicional de dos horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad al vacío (máx. 43°C /171 mbar) para eliminar agua, se añadieron aproximadamente 11,28 L de piridina y el solvente se destiló de nuevo al vacío (máx. 43°C /171 mbar). Se añadieron aproximadamente 22,5 L de metanol y la suspensión obtenida se enfrió a menos de aproximadamente -75°C. Se añadieron aproximadamente 114 g (3,0 moles) de borohidruro de sodio y la mezcla de reacción se agitó a menos de aproximadamente -75°C hasta que el compuesto 36 se transformó como se ha analizado por HPLC. La mezcla se calentó a de aproximadamente 15 a aproximadamente 25°C y luego se añadieron 2,7 L de agua destilada a la solución. La solución se concentró a presión reducida y una temperatura inferior a 65°C hasta un volumen final de aproximadamente 26,8 L. Se añadieron aproximadamente 13,4 L de 2-butanol y la mezcla se agitó antes de permitir que se separen las capas. La capa acuosa inferior se retiró para eliminarla al finalizar el lote. (Si no hay separación, añadir MTBE (hasta 5 L) a la mezcla para ayudar a separar las capas). La fase orgánica se lavó con 2,7 L de agua destilada, la fase acuosa se retrolavó con 17,2 L de 2-butanol y se combinaron las dos fases de 2-butanol. La parte orgánica, el compuesto 40 crudo, se concentró a sequedad al vacío para usarse para la preparación de escualamina sin una purificación adicional. Se disolvieron aproximadamente 796,18 g (1,0 mol) de compuesto 40 crudo en 5,7 L de metanol y se añadieron aproximadamente 280 g (5,0 moles) de hidróxido de potasio. La mezcla de reacción se calentó en reflujo (aproximadamente 64°C) hasta que se consumió todo el compuesto 40. Aproximadamente se añadieron 198 g de catalizador de níquel Raney y se hidrogenó la mezcla de reacción a una temperatura de 15-25°C bajo 2-3 bares de presión de hidrógeno hasta que el compuesto 38 se consumió como se ha analizado por CCF. La mezcla de reacción se filtró para eliminar el catalizador usando Celite 545 como coadyuvante de filtración. La torta de filtración se lavó dos veces con 800 ml de metanol y el filtrado y los lavados combinados se concentraron al vacío a una temperatura inferior a aproximadamente 60°C hasta un volumen de 6,7 L. Se añadieron aproximadamente 18,8 L de 2-butanol a la solución concentrada y la solución se concentró bajo una presión reducida a menos de aproximadamente 60°C hasta aproximadamente 5,36 L. Se añadieron aproximadamente 13,4 L de metil tert-butil éter y la solución se enfrió a menos de aproximadamente -5°C. Se recogió el producto precipitado, la torta de filtración se lavó dos veces con 1,3 L de metil tert-butil éter y el producto se secó bajo vacío a de aproximadamente 25 a aproximadamente 35°C. Se obtuvo un total de 490 g de escualamina cruda que representa un rendimiento del 75,5 %. El esquema de la síntesis para la escualamina cruda se muestra en la figura 15.
- [0080] Recristalización: se mezclaron aproximadamente 650 g (1,0 mol) de escualamina cruda con 11,05 L de etanol para formar una solución turbia. La solución se filtró a través de un filtro recubierto con el coadyuvante de filtración y la torta de filtración se lavó con 650 ml de etanol. Se añadieron aproximadamente 494 ml de agua y aproximadamente 360,3 g (4,0 moles) de ácido láctico L-(+) a la solución filtrada con agitación. La solución resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y el recipiente y el filtro se lavaron con 650 ml de etanol. El filtrado se enfrió a de aproximadamente 0 a aproximadamente 5°C durante al menos 12 horas sin agitación y luego se añadieron aproximadamente 100 mg de gérmenes cristalinos de dilactato de escualamina recristalizado. La solución se mantuvo a de aproximadamente 0 a



aproximadamente 5°C sin agitación durante al menos 48 horas más y luego la precipitación resultante se agitó a menos de aproximadamente 5°C para formar una suspensión homogénea. Se recogieron los sólidos y la torta de filtración se lavó con 650 ml de etanol frío (de 0 a 5°C). El producto se secó al vacío a aproximadamente 40°C (±2 °C) para producir un total de 614 g (rendimiento del 76,0 %) de dilactato de escualamina cristalizado. El esquema de la síntesis para el dilactato de escualamina crudo se muestra en la figura 16.

5

[0081] Se combinó aproximadamente 1 kg de dilactato de escualamina cristalizado o recristalizado con 18 L de etanol y 760 ml de agua. La suspensión se calentó a de aproximadamente 40 a aproximadamente 50°C con agitación para formar una solución y luego se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. El recipiente y el filtro se lavaron con 1 L de etanol y el filtrado total se enfrió a 20°C (± 2°C) durante al menos aproximadamente doce horas. Se añadieron aproximadamente 100 mg de gérmenes cristalinos de dilactato de escualamina recristalizado y la solución se mantuvo a aproximadamente 20°C (± 2°C) sin agitación durante al menos 48 horas más. La precipitación resultante se agitó para formar una suspensión homogénea y se recogieron los sólidos. La torta de filtración se lavó con 1,0 L de etanol frío (de 0 a 5 °C) y el producto se secó al vacío a aproximadamente 40°C (± 2°C) para producir un total de 900 g (rendimiento del 90,0 %) de dilactato de escualamina recristalizado.

10

15 [0082] El análisis del dilactato de escualamina cristalino producido por este proceso se muestra en la tabla siguiente.

Prueba	Especificación	Resultados
Pureza HPLC	> 95,00 %	99,0 %
24-S	≤ 1,7 %	0,74 %
3-α	≤ 0,1 %	< 0,1 %
Lactilamida	<1,5 %	0,17 %
Des-sulfato	≤ 0,1 %	< 0,1 %
Ácido láctico	< 30 %	22,89 %
Agua por Karl Fischer	<10 %	2,18 %
HPLC MS	628 ± 1 u	Se ajusta
RMN	Se ajusta a la ref,	Se ajusta
FTIR	Se ajusta a la ref,	Se ajusta
DRX	Sin especificación	Completada
DSC	Sin especificación	PF 143,9° Pureza 99,99 %
Solventes residuales (etanol)	5000 ppm	< 200 ppm
Sodio	Sin especificación	80,5 mg / kg
Potasio	Sin especificación	520 mg / kg

[0083] El patrón de difracción de rayos X de polvo, que se determinó como se describe en el ejemplo 1 anterior, se muestra en la figura 17 y la intensidad de los picos principales se muestra en la tabla siguiente.

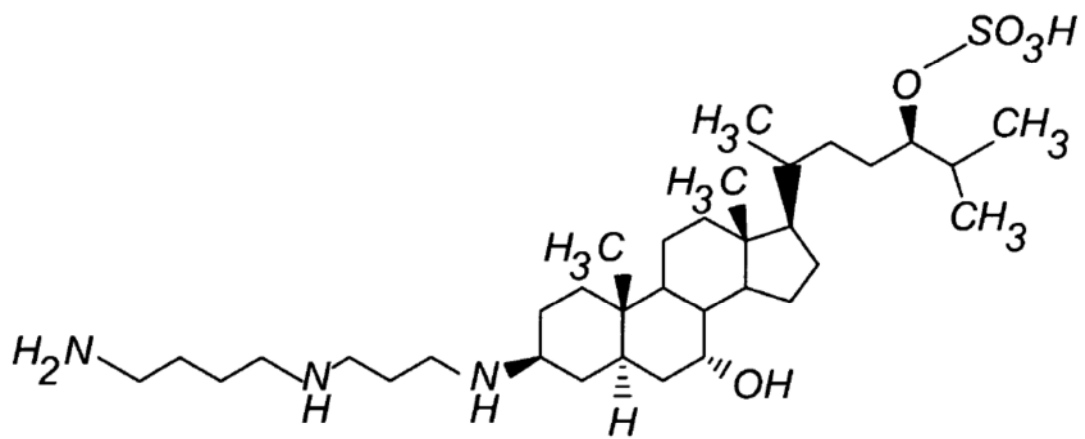
Preparación de la muestra	Ángulo (° theta-2 theta)		
	12,6	15,7	18,8
Cristalizado a partir de etanol/agua en el proceso de producción de la escualamina	977	891	1333

5 [0084] El patrón de polvo indica que, aunque el dilactato de escualamina se recristalizó a partir de etanol/agua como en el ejemplo 5, se produjo una forma polimórfica diferente (compárense las figuras 9 y 17). Esto probablemente se debe al uso de un 4% de agua en el proceso de producción a diferencia del 1% de agua del ejemplo 5 y al hecho de que el material se cristalizó a 20°C en vez de -20°C. También hay evidencias a partir de la titulación Karl Fisher de que el material recristalizado del proceso de producción es un monohidrato. Este nuevo proceso de producción produce también un mejor rendimiento y un producto más puro que el proceso descrito en la patente de EE.UU. 6,262,283.

10 [0085] Aunque la invención se ha descrito e ilustrado en la presente por referencia a varios materiales, procedimientos y ejemplos específicos, se entiende que la invención no se restringe a las combinaciones de material y procedimientos particulares seleccionados para ese fin. Pueden implicarse numerosas variaciones de tales detalles como apreciarán aquellas personas expertas en la técnica.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Forma amorfa de la sal de dilactato de 3 $\beta$ -(N-[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina)-7 $\alpha$ ,24R-dihidroxi-5 $\alpha$ -colestano-24-sulfato, donde un patrón de difracción del polvo de rayos X de la sal tiene ángulos de difracción principales de 15,5 a 15,6 grados, de 17,3 a 17,5 grados y de 21,3 a 21,5 grados con intensidades de pico relativas de 286, 391 y 107, respectivamente.
2. Forma amorfa de la sal de dilactato según la reivindicación 1 que tiene un patrón de difracción del polvo de rayos X como se muestra en la figura 2.
3. Composición farmacéutica que comprende la forma amorfa de la sal de dilactato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 4. Forma amorfa de la sal de dilactato según la reivindicación 1 para el uso como medicamento para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero necesitado de tal tratamiento, comprendiendo dicho uso la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma amorfa de la sal de dilactato.
- 15 5. Forma amorfa de la sal de dilactato según la reivindicación 1 para el uso como medicamento para tratar o prevenir la neovascularización en un mamífero necesitado de tal tratamiento, comprendiendo dicho uso la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma amorfa de la sal de dilactato.
6. Forma amorfa de la sal de dilactato para el uso según la reivindicación 5, donde la neovascularización se halla en el ojo, el intestino o el sistema cardiovascular.
- 20 7. Forma amorfa de la sal de dilactato para el uso según la reivindicación 6 donde la neovascularización en el ojo resulta de la degeneración macular relacionada con la edad, un tumor ocular, una retinopatía diabética, una oclusión de la vena retiniana central, un edema macular diabético (DME) o una miopía patológica.
8. Forma amorfa de la sal de dilactato para el uso según la reivindicación 4 o 5 donde el mamífero es un ser humano.

*Fig. 1*

\*\*\* Multi plot \*\*\*  
Nombre del archivo: Lyophilization Tech\33127B  
Nombre de la muestra: Lot# 2361-C-02-2RVI Comentario: Lactato de escualamina USP <941>  
Fecha y hora: 03-10-04 15:07:02  
Condiciones  
Tubo de rayos X : Cu(1.54060 A) Voltaje: 40.0 kV Corriente: 35.0 mA  
Rango de barrido : 4.0000 <-> 45.0000 grados Tamaño de paso: 0.0200 grados  
Tiempo de recuento: 0.60 s Rendija DS: 1.00 grados SS: 1.00 grados RS: 0.30 mm

Fig. 2

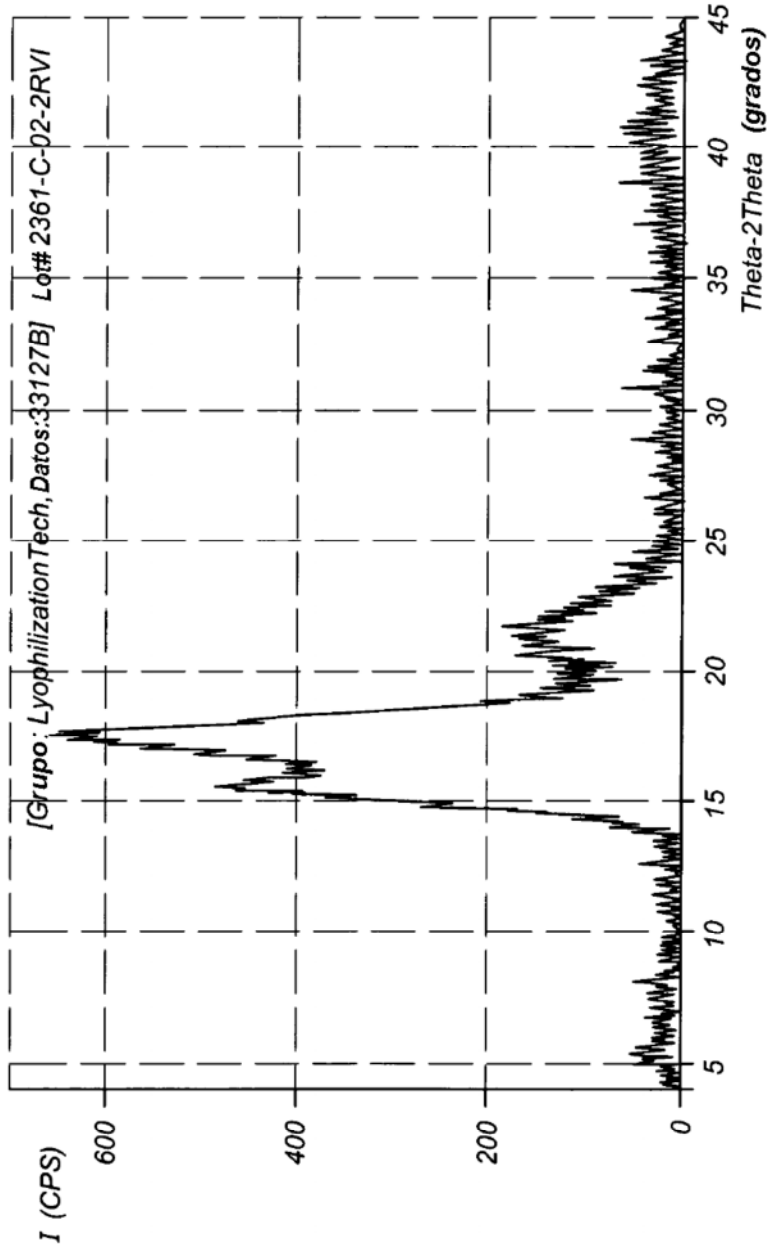
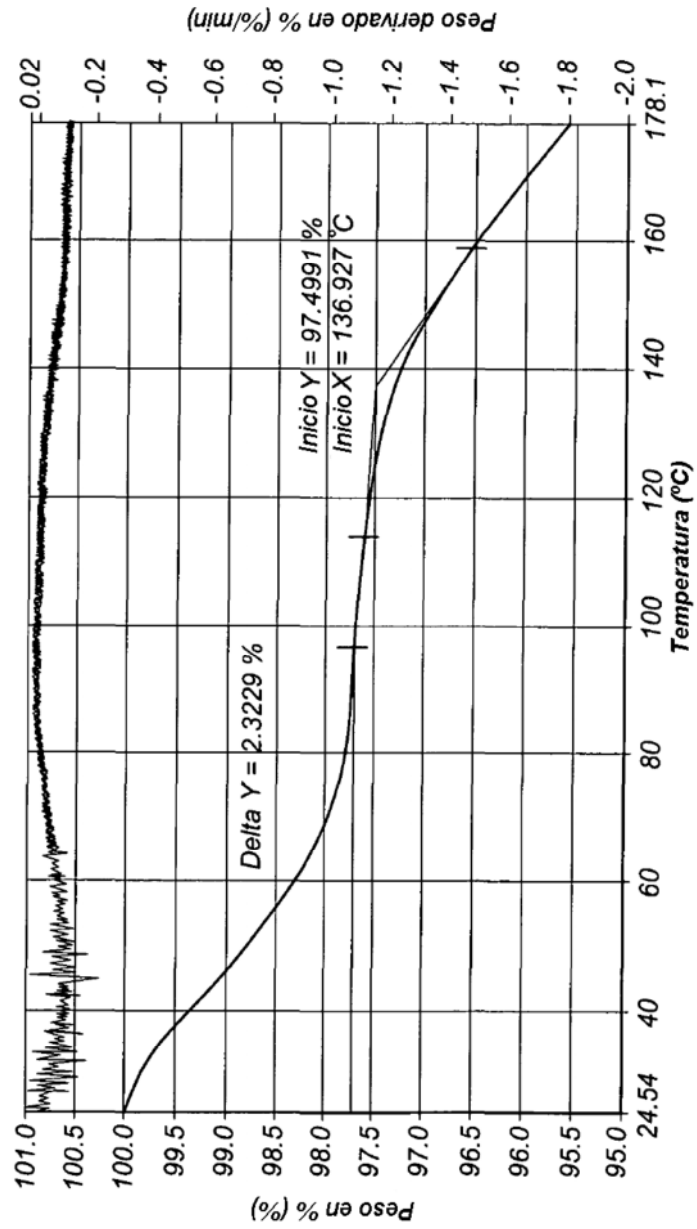


Fig. 3

Nombre del archivo: C:\Program Files...\IN1791-04GNC1-1.2.lgd      MSI-1258F API, Lot#2361-C.02.2RV1:IN1791-04GNC1-1.2.lgd  
 Datos de recogida: 3/11/2004 10:49:09 AM      Peso en % no sustraído (%): Paso: 2  
 ID del operador: MF 3/11/04  
 ID de la muestra: MSI-1256F API, Lot#2361-C.02.2RV1      MSI-1258F API, Lot#2361-C.02.2RV1:IN1791-04GNC1-1.2.lgd  
 Peso de la muestra: 11.061 mg      Peso en % no sustraído derivado (%/min) (suavizado): Paso: 2  
 Comentario: 2C por min, Lot#2361-C.02.2RV1  
 04GNC1, Estudio 040310

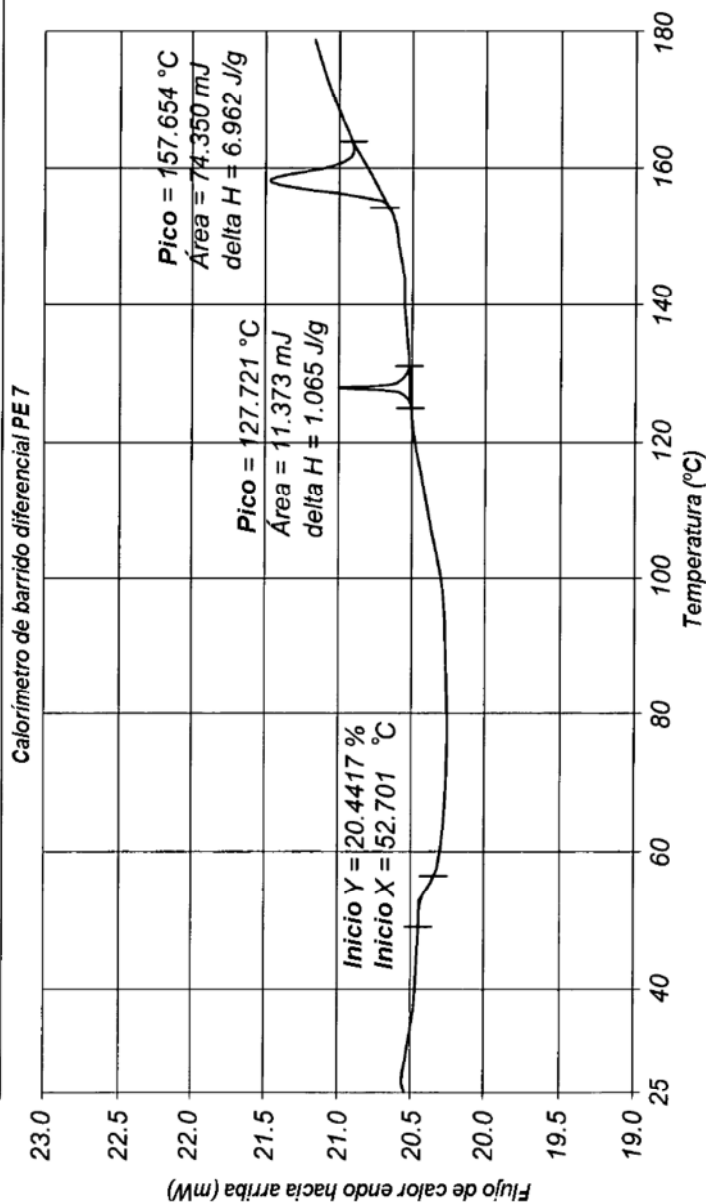


1) Mantener durante 1.0 min a 25.00 °C      2) Calentar de 25.00 °C a 180.00 °C a 2.00 °C/min

Fig. 4

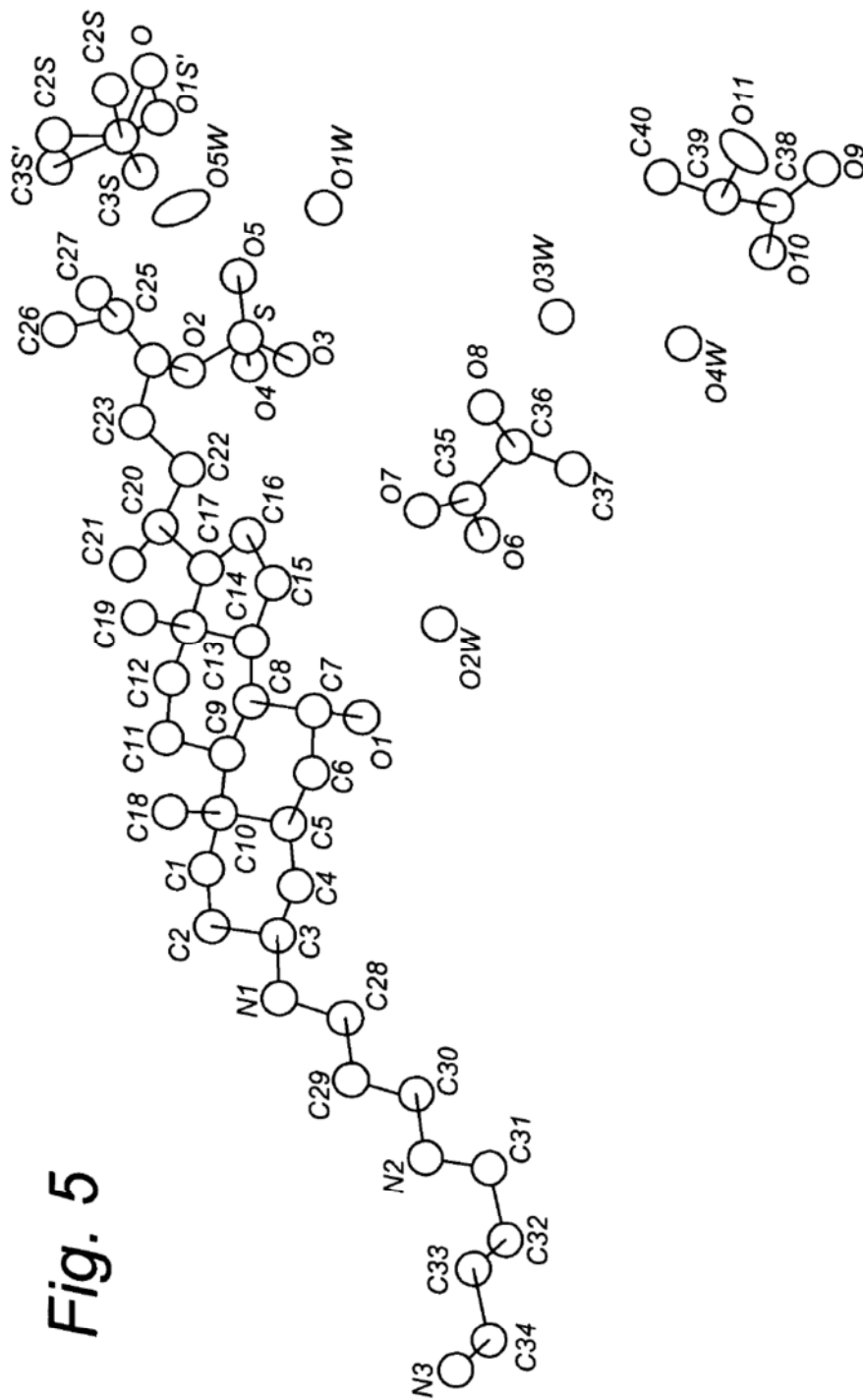
Nombre del archivo: C:\Program Files...\IN1791-04GNC1-1.2C.ddd  
 Datos de recogida: 3/11/2004 10:42:50 AM  
 ID del operador: MF 3/11/04  
 ID de la muestra: MSI-1256F API, Lot#2361-C.02.2RV1  
 Peso de la muestra: 10.680 mg  
 Comentario: 2C por min, Lot#2361-C.02.2RV1  
 04GNC1, Estudio040310

MSI-1256F API, Lot#2361-C.02.2RV1:IN1791-04GNC1-1.2C.ddd  
 Flujo de calor endo hacia arriba no sustraído (mW) (suavizado): Paso: 2



1) Mantener durante 1.0 min a 25.00 °C      2) Calentar de 25.00 °C a 180.00 °C a 2.00 °C/min

Fig. 5





\*\*\* Multi plot \*\*\*  
Nombre del archivo: Lyophilization Tech\33127A  
Nombre de la muestra: Lot# 978-47      Comentario: Lactato de escualamina      USP <941>  
Fecha y hora: 03-10-04 14:34:40  
Condiciones  
Tubo de rayos X : Cu(1.54060 A)    Voltaje: 40.0 kV    Corriente: 35.0 mA  
Rango de barrido : 4.0000 <-> 45.0000 grados    Tamaño de paso: 0.0200 grados  
Tiempo de recuento: 0.60 s    Rendija DS: 1.00 grados    SS : 1.00 grados    RS : 0.30 mm

Fig. 6

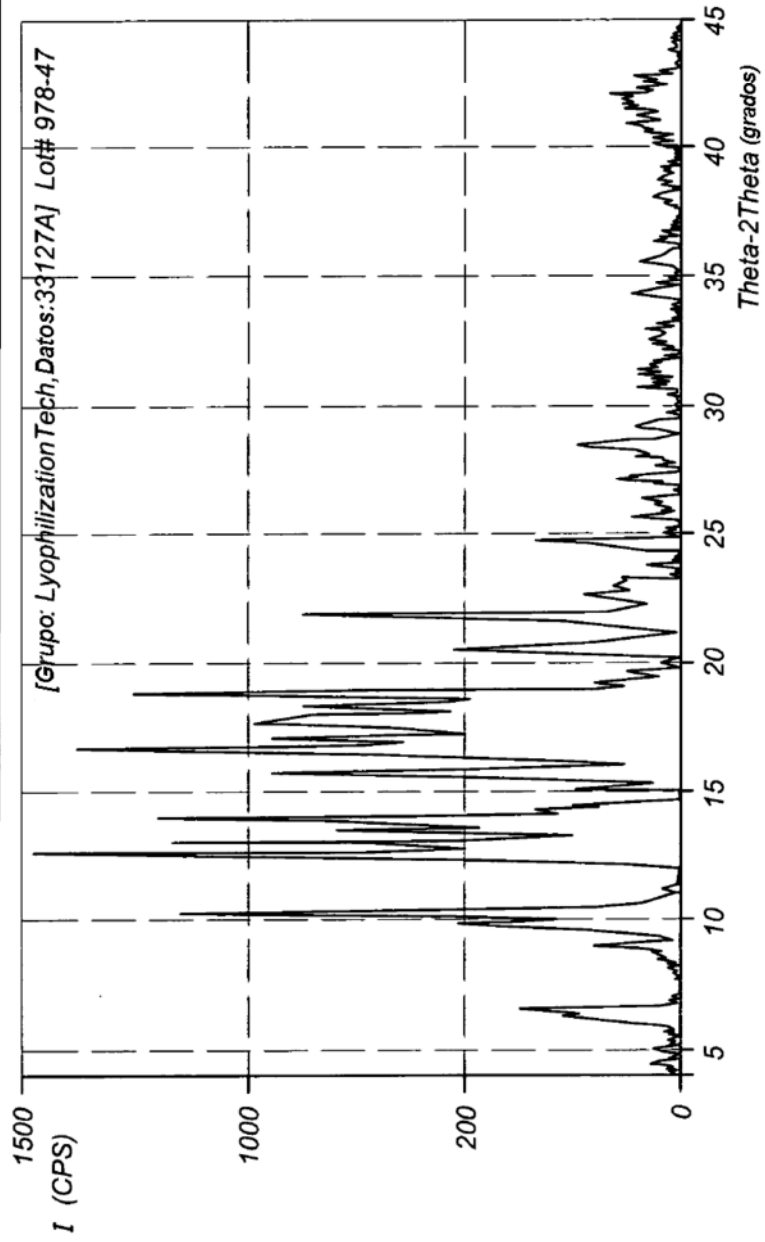
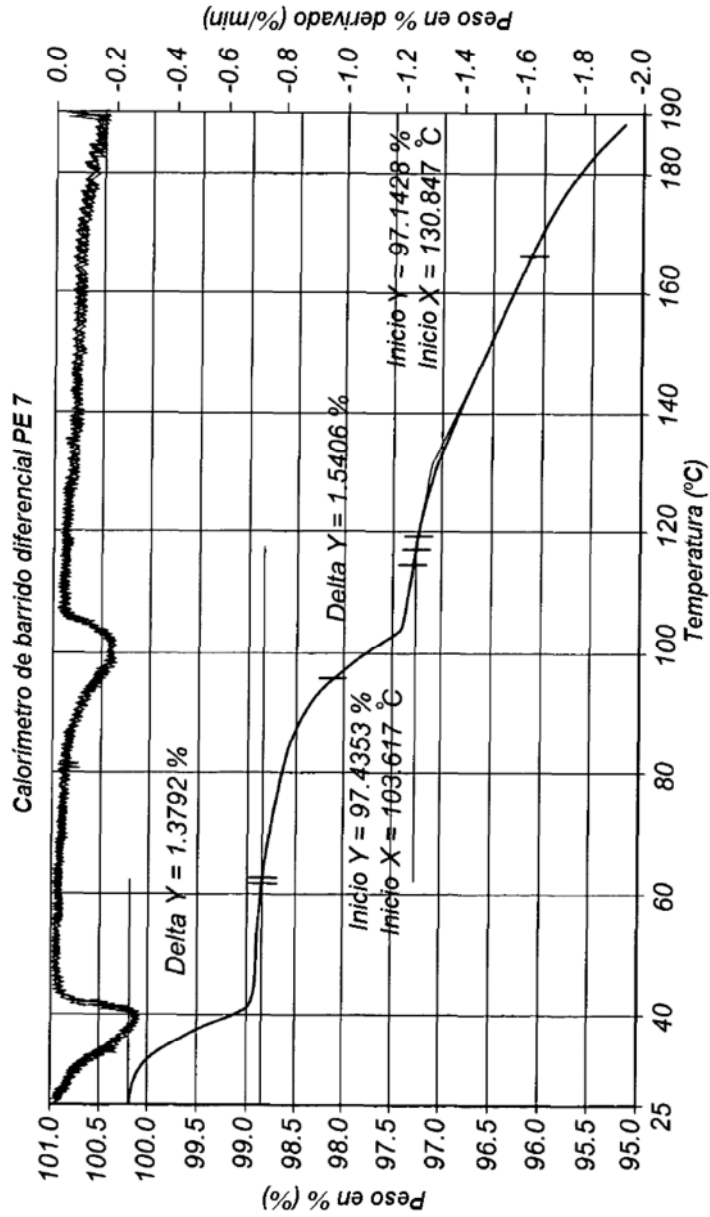


Fig. 7

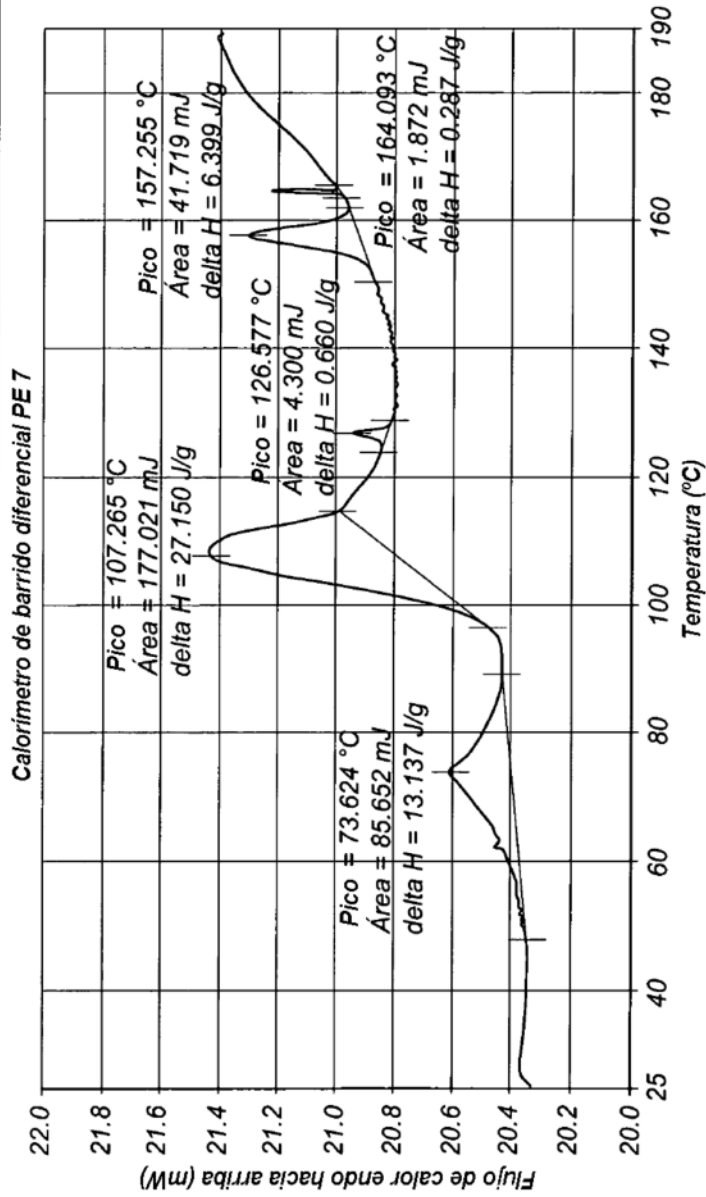
Nombre del archivo: C:\Program Files\...UN1792-04GNC1-1.2C.lgd      MSI-1258F API, Crystallized Lot#978-47:IN1792-04GNC1-1.2.tgd  
 Datos de recogida: 3/10/2004 4:53:29 PM      Peso en % no sustraído (%): Paso: 2  
 ID del operador: MF 3/19/04  
 ID de la muestra: MSI-1256F API, Crystallized Lot#978-47      MSI-1258F API, Crystallized Lot#978-47:IN1792-04GNC1-1.2.tgd  
 Peso de la muestra: 10.608 mg      Peso en % no sustraído derivado (%/min)(suavizado): Paso: 2  
 Comentario: 2C por min, Lot#978-47  
 04GNC1, Estudio 040310



1) Mantener durante 1,0 min a 25.00 °C      2) Calentar de 25.00 °C a 190.00 °C a 2.00 °C/min

Fig. 8

Nombre del archivo: C:\Program Files\... \IN1792-04GNC1-1.2C.ddd      MSI-1256F API Crystallized, Lot#978-47:IN1791-04GNC1-1.2C.ddd  
 Datos de recogida: 3/10/2004 4:39:42 PM      — Flujo de calor endo hacia arriba no sustraído (mW) (suavizado); Paso: 2  
 ID del operador: MF 3/10/04  
 ID de la muestra: MSI-1256F API, Lot#978-47  
 Peso de la muestra: 6.520 mg  
 Comentario: 2C por min, Lot#978-47  
 04GNC1\_Estudio040310



1) Mantener durante 1.0 min a 25.00 °C      2) Calentar de 25.00 °C a 190.00 °C a 2.00 °C/min

\*\*\* Multi plot \*\*\*  
Nombre del archivo: LyophilizationTech\33328A  
Nombre de la muestra: MSI-1256F, Lot# 978-64-1      Comentario: Lactato de escualamina USP <941>  
Fecha y hora: 04-26-04 13:00:42  
Condiciones  
Tubo de rayos X : Cu(1.54060 Å)    Voltaje: 40.0 kV    Corriente: 35.0 mA  
Rango de barrido : 4.0000 <-> 45.0000 grados    tamaño de paso: 0.0200 grados  
Tiempo de recuento: 0.60 s    Rendija DS: 1.00 grados SS : 1.00 grados RS : 0.30 mm

Fig. 9

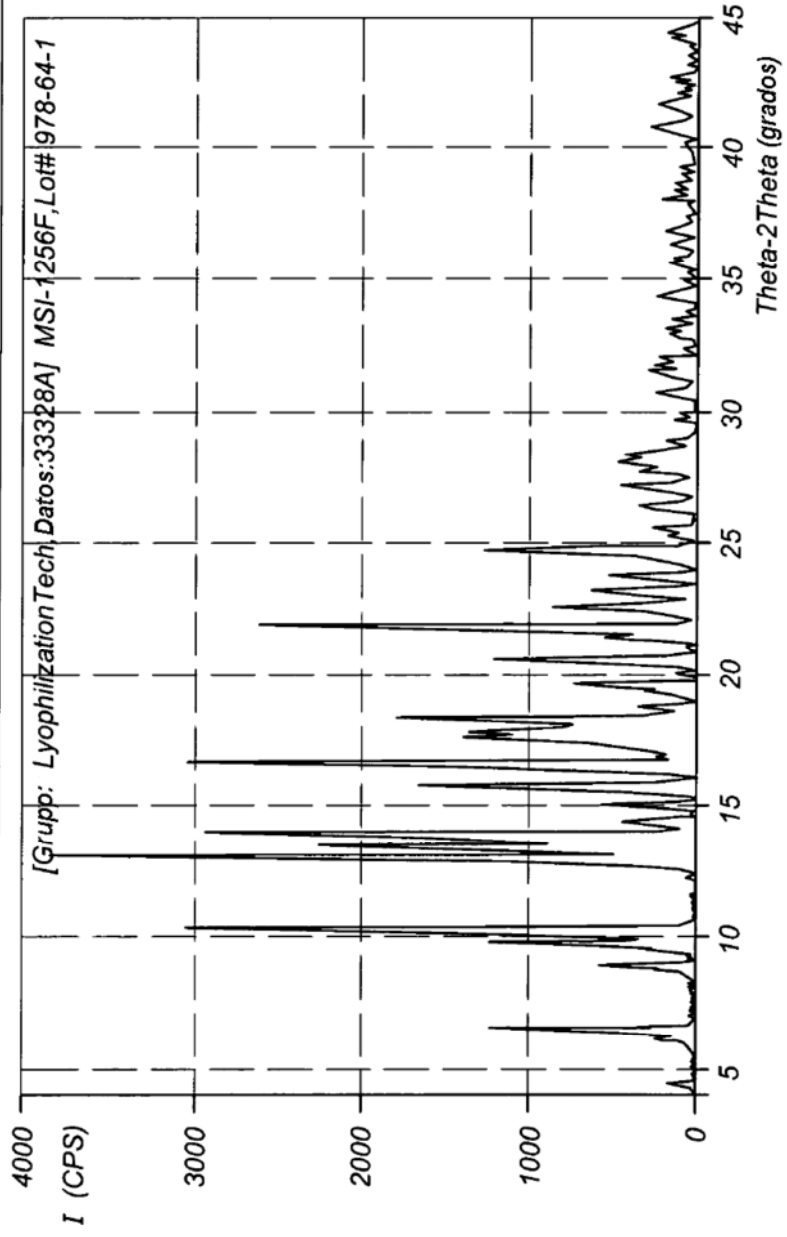
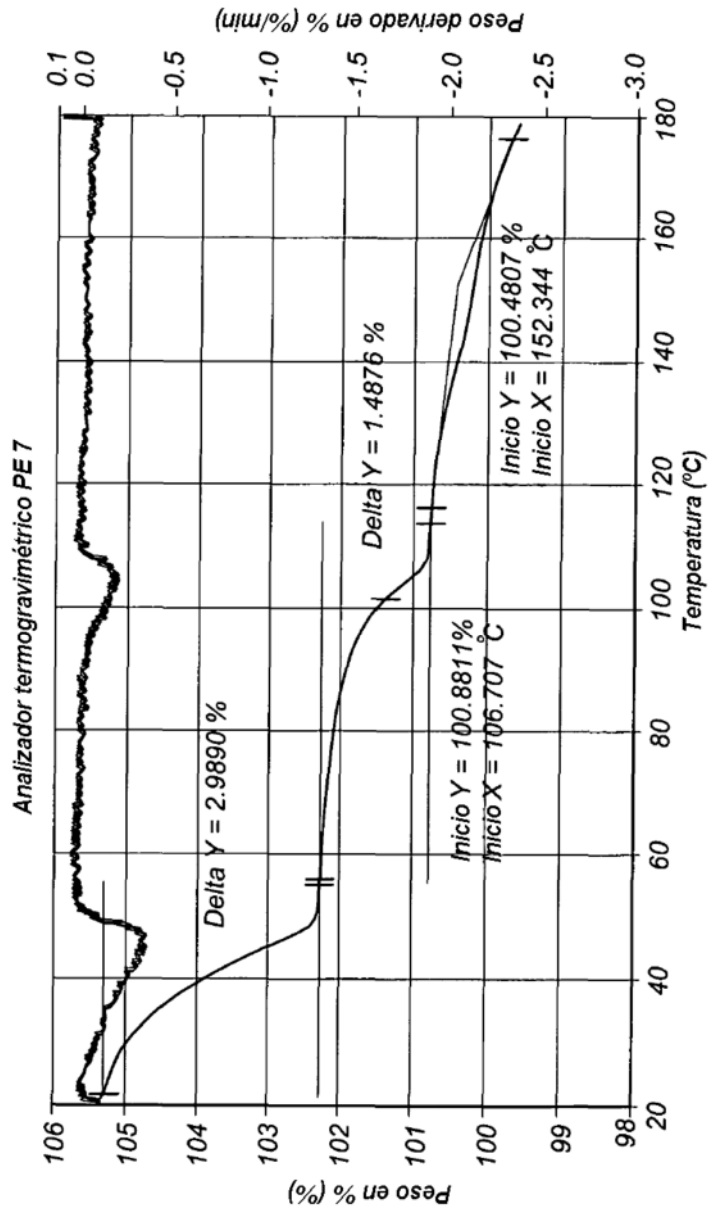


Fig. 10

Nombre del archivo: C:\Program Files\... \IN1804-04GNC1-1.2C.tgd      MSI-1258F, Lot#978-64-14; IN1804-04GNC1-1.2.tgd  
 Datos de recogida: 4/21/2004 12:53:20 PM      — Peso en % no sustraído (%): Paso: 1-2  
 ID del operador: MT 5/4/04      — MSI-1258F, Lot#978-64-14; IN1804-04GNC1-1.2.tgd  
 ID de la muestra: MSI-1256F, Lot#978-64-14      — Peso en % no sustraído derivado (%/min) (suavizado): Paso: 1-2  
 Peso de la muestra: 14.822 mg  
 Comentario: 2C por min  
 04GNC1

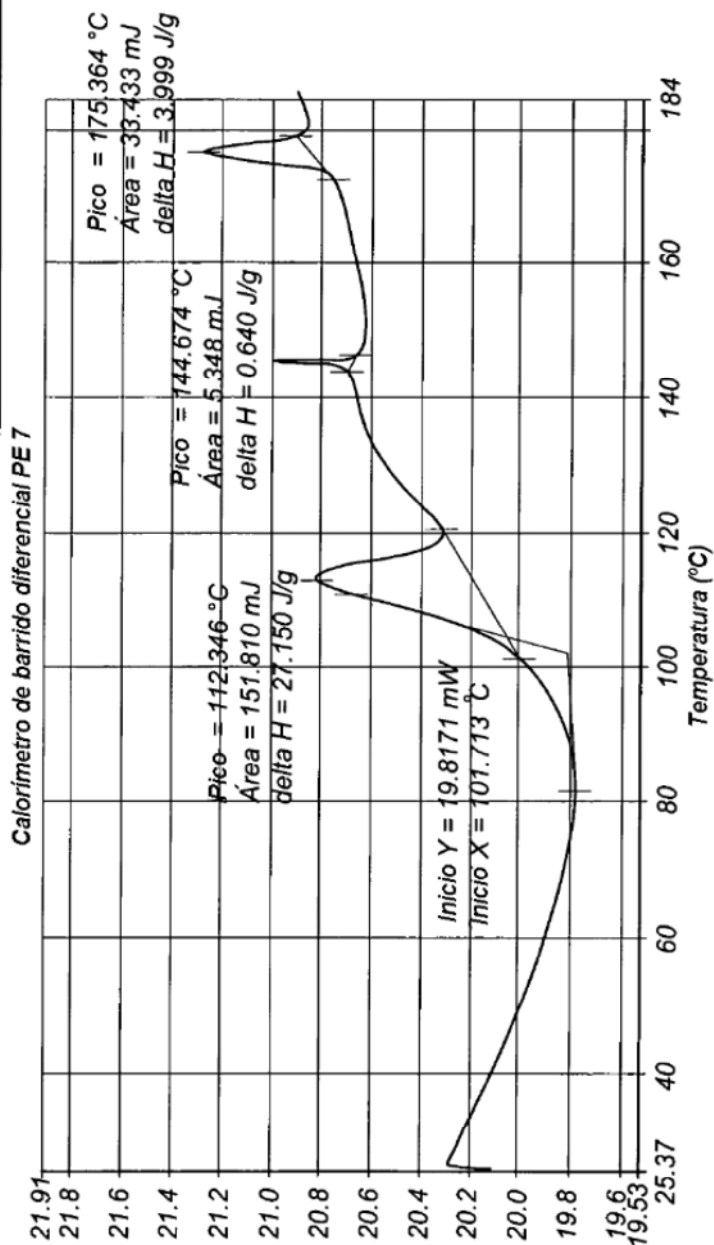


1) Mantener durante 1.0 min a 20.00 °C      2) Calentar de 20.00 °C a 180.00 °C a 2.00 °C/min

Fig. 11

Nombre del archivo: C:\Program Files\... \VN1804-04GNC1-1.2C.ddd  
 Datos de recogida: 4/21/2004 5:20:42 PM  
 ID del operador: MF 4/21/04  
 ID de la muestra: MSI-1256F, Lot#978-64-14  
 Peso de la muestra: 8.360 mg  
 Comentario: 2C por min.  
 04GNC1.Estudio040421

MSI-1258F, Lot#978-64-14; VN1804-04GNC1-1.2C.ddd  
 — Flujo de calor endo hacia arriba no sustraído (mW): Paso: 2



1) Mantener durante 20.0 min a 20.00 °C      2) Calentar de 20.00 °C a 180.00 °C a 2.00 °C/min

\*\*\* Multi plot \*\*\*  
Nombre del archivo: LyophilizationTech\33480A  
Nombre de la muestra: MSI-1256F, Lot# 988-61 Comentario: Lactato de escualamina USP <941>  
Fecha y hora: 06-01-04 12:17:45  
Condiciones  
Tubo de rayos X : Cu(1.54060 Å) Voltaje: 40.0 kV Corriente: 35.0 mA  
Rango de barrido : 4.0000 <-> 45.0000 grados tamaño de paso: 0.0200 grados  
Tiempo de recuento: 0.60 s Rendija DS: 1.00 grados SS : 1.00 grados RS : 0.30 mm

Fig. 12

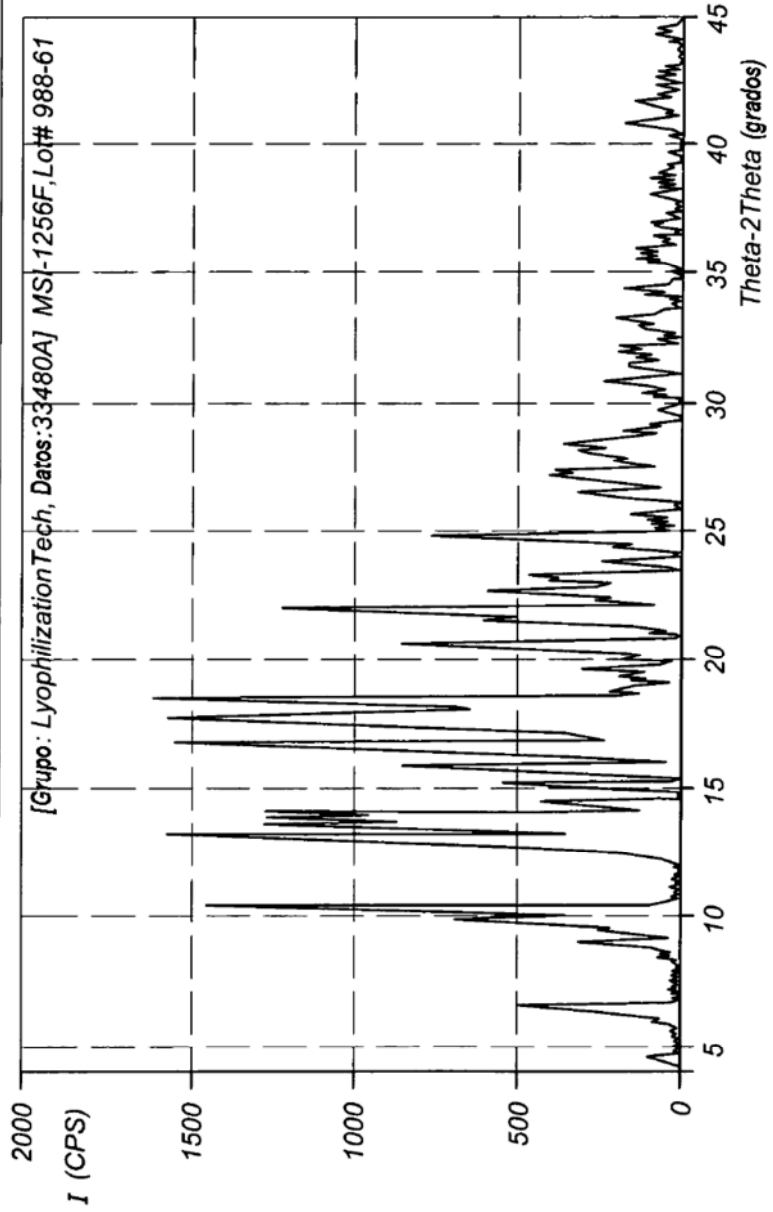
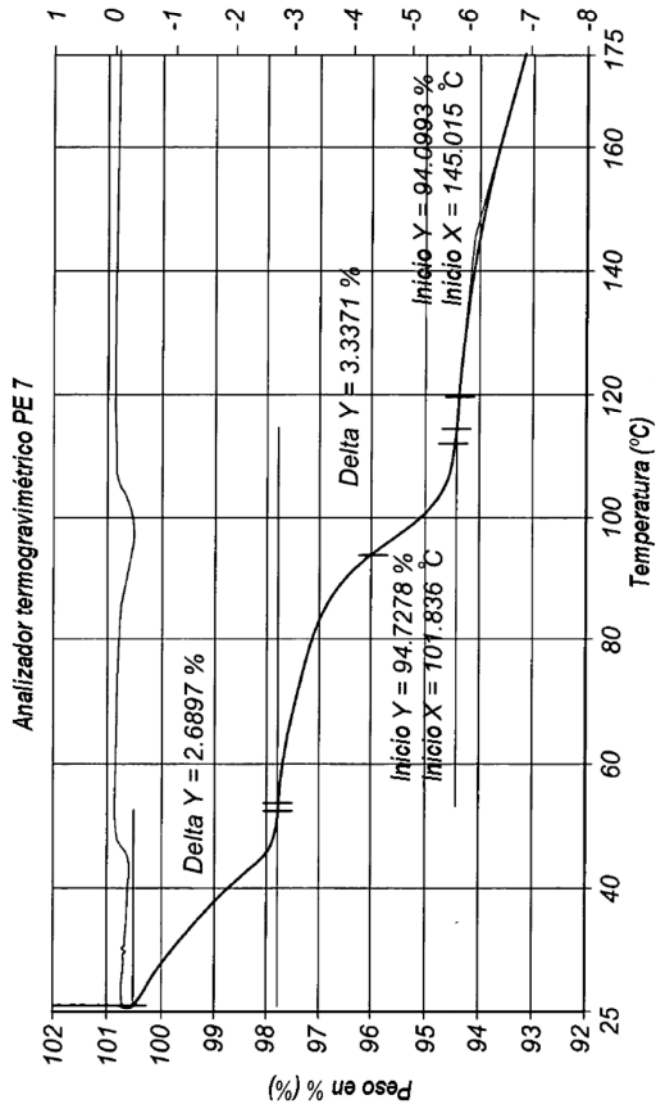


Fig. 13

Nombre del archivo: C:\Program Files\Pyrisi...\MSI-1256F.2.fgd      MSI-1256F , Squalamine Lactate-MSI-1256F.2C.fgd  
 Datos de recogida: 5/27/2004 3:48:19 PM      Peso en % no sustraído (%): Paso: 1-2  
 ID del operador: MF 5/22/04      MSI-1256F , Squalamine Lactate-MSI-1256F.2C.fgd  
 ID de la muestra: MSI-1256F , Squalamine Lactate      Peso en % no sustraído derivado (%min)(suavizado): Paso: 1-2  
 Peso de la muestra: 19.462 mg  
 Comentario: 10C por min  
 04GNC1.Estudio040527, Lot#988-61  
 In#1823-04GNC1-1.2C per min



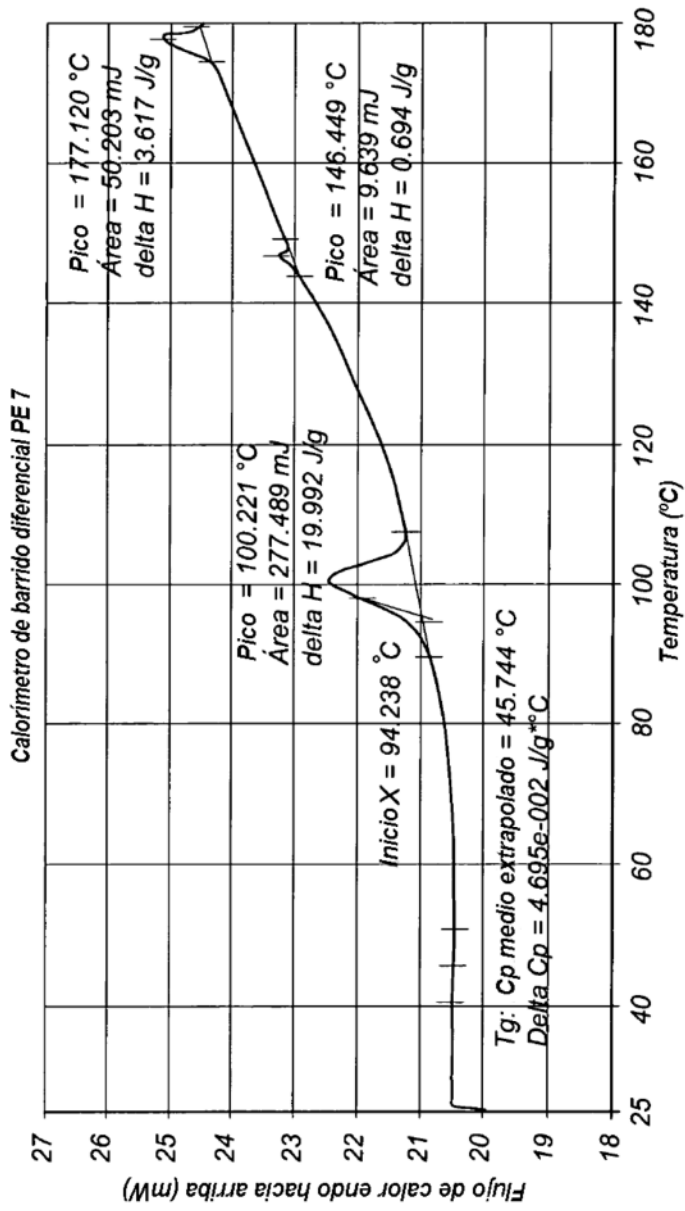
1) Mantener durante 1.0 min a 20.00 °C      2) Calentar de 20.00 °C a 180.00 °C a 2.00 °C/min



Fig. 14

Nombre del archivo: C:\Program Files\Pyriss\...MSI-1256F.2C.ddd  
 Datos de recogida: 5/28/2004 11:08:59 AM  
 ID del operador: MF 5/28/04  
 ID de la muestra: MSI-1256F, Squalamine Lactate  
 Peso de la muestra: 13.880 mg  
 Comentario: 10C por min 04GNC1, Estudio040527  
 2C por min Lot#988-61, In#1823-04GNC1-1

MSI-1256F, Squalamine Lactate:MSI-1256F.2C.ddd  
 Flujo de calor endo hacia arriba (mW) (suavizado): Paso: 2



1) Mantener durante 1.0 min a 20.00 °C      2) Calentar de 20.00 °C a 180.00 °C a 2.00 °C/min

Fig. 15

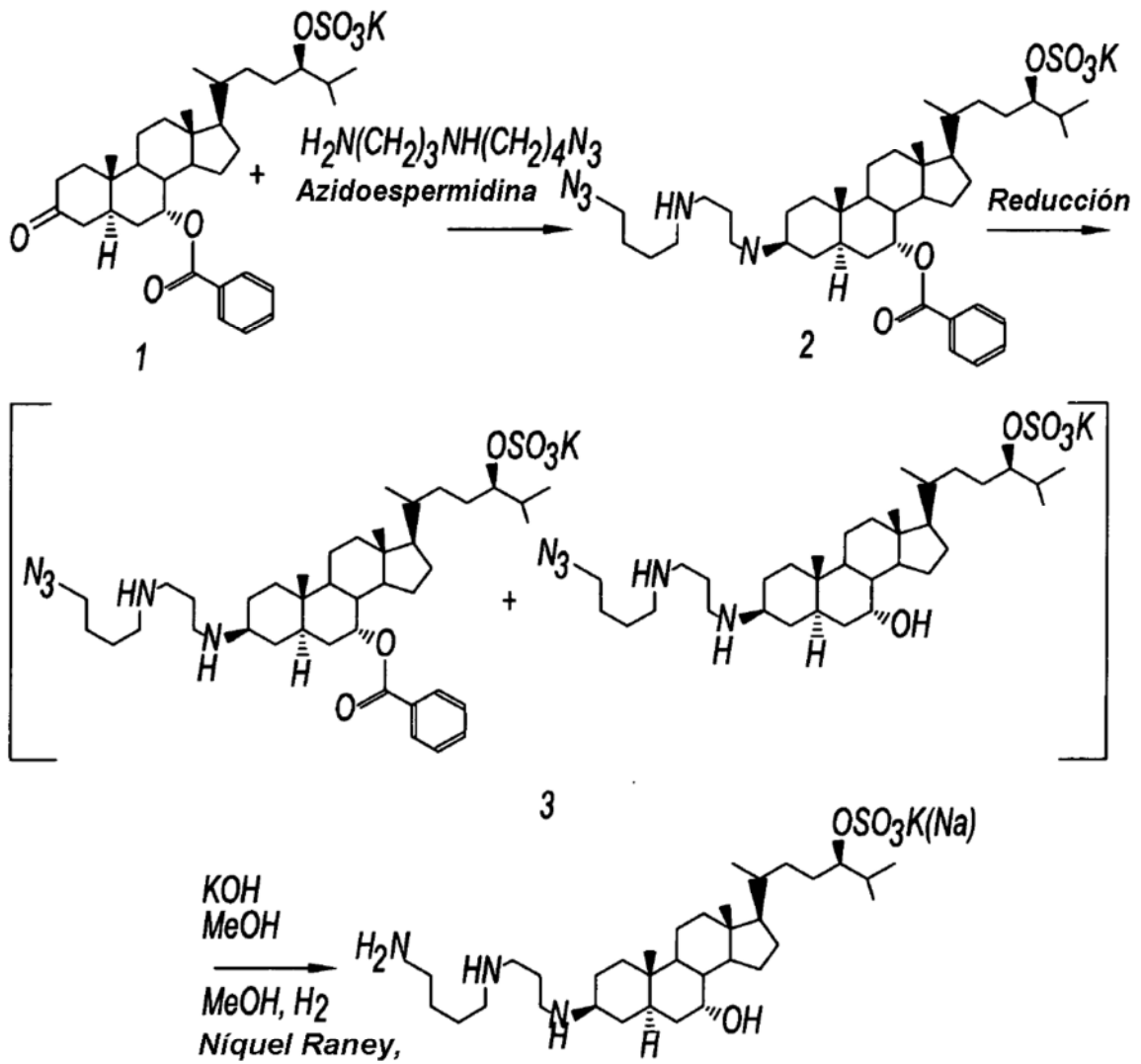


Fig. 16

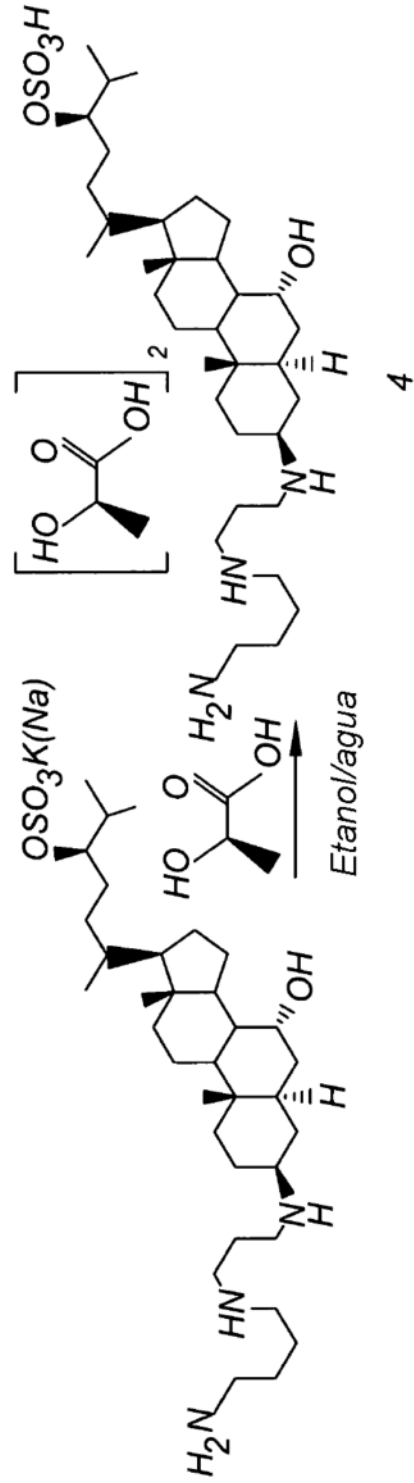


Fig. 17

