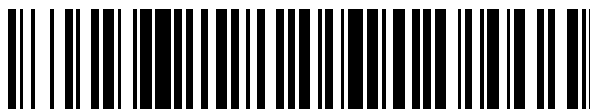


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 251**

51 Int. Cl.:

C07J 41/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07J 31/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2006 PCT/US2006/015468**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2006 WO06116309**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2006 E 06751251 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 1877419**

54 Título: **Dilactato de escualamina cristalino**

30 Prioridad:

25.04.2005 US 674531 P

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

21.11.2019

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;
ARMBRUSTER, KYLE y
LEVITT, ROY, C.**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 732 251 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

Dilactato de escualamina cristalino

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Esta solicitud tiene como objetivo una forma cristalina de la sal dilactato de la escualamina y esta forma cristalina para su uso en la inhibición de la neovascularización y la proliferación de células endoteliales.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

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

[0005] En particular, el lactato de escualamina se describe en Clínica Canc. Res. Vol 9 (11) pp 4108-4115 (2003), Clínica Canc. Res. Vol 7 (12) pp 3912-3919 (2001), J. Pharm. Biomed. Anal. Vol 32 (1) pp 85-96 (2003) y WO-A-03/080027. Estos documentos también indican la actividad anticancerígena y antiangiogénica del lactato de escualamina sin indicar su estequiometría.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] La presente invención se refiere a una forma cristalina de dilactato de escualamina, que es un compuesto que inhibe la proliferación de células endoteliales y, por lo tanto, regula y/o modula la angiogénesis. La invención también se refiere a una forma cristalina de este tipo para su uso en métodos para tratar enfermedades y afecciones dependientes de la angiogénesis, tales como, por ejemplo, cáncer, crecimiento tumoral, aterosclerosis, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, isquemia retiniana, edema macular y enfermedades inflamatorias en los mamíferos, particularmente en los humanos.

[0007] Escualamina: (3 β -(N-[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina)-7 α ,24R-dihidroxi-5 α -colestano-24-sulfato).

[0008] En una forma de realización de la invención, la forma cristalina de la sal de dilactato existe como un solvato. En otra forma de realización, la forma cristalina existe como un hidrato y en una forma de realización adicional, la sal de dilactato existe como un solvato y un hidrato.

[0009] Otro aspecto de la invención es la forma cristalina de dilactato de escualamina para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero que necesite tal tratamiento, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma cristalina de la sal de dilactato.

[0010] Otro aspecto de la invención es la forma cristalina de la escualamina para su uso en un método para tratar o prevenir la neovascularización en un mamífero que necesite tal tratamiento, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma cristalina de la sal de dilactato.

[0011] En algunas formas de realización, la neovascularización se produce en el ojo, en el intestino o en el sistema cardiovascular.

[0012] En formas de realización preferidas, la neovascularización en el ojo resulta de la degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, tumor ocular, oclusión de la vena central de la retina, edema macular diabético (EMD) o miopía patológica.

[0013] En una forma de realización preferida, el mamífero es un humano.

[0014] 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.

[0015] En una forma de realización, la forma cristalina de la sal de dilactato se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo con grandes ángulos de difracción.

[0016] Otro aspecto de la invención es un proceso para la preparación de una forma cristalina de dilactato de escualamina a partir de una forma no cristalina que comprende disolver el dilactato de escualamina no cristalino en un sistema disolvente que contiene al menos dos disolventes, seguido de sobresaturación del sistema disolvente hasta que el dilactato de escualamina se cristaliza a partir del sistema disolvente. En formas de realización diferentes, la sobresaturación puede producirse al enfriar el sistema disolvente, al reducir el volumen del sistema disolvente, al agregar una cantidad adicional de al menos uno de los disolventes de los al menos dos disolventes o una combinación de los mismos.

[0017] En una forma de realización preferida, al menos un disolvente de al menos dos disolventes es 2-propanol, etanol, agua o 2-butanol.

[0018] Otra forma de realización de la invención comprende un nuevo método para la producción de dilactato de escualamina cristalizado como parte del proceso de fabricación que elimina la necesidad de una etapa de purificación por HPLC.

Breve descripción de las figuras

[0019]

La figura 1 muestra la estructura de la escualamina.

La Figura 2 muestra el patrón de difracción de rayos X en 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 calorimetría diferencial de barrido para el dilactato de escualamina liofilizado.

La Figura 5 muestra la estructura cristalina del dilactato de escualamina cristalizado en 2-propanol.

La Figura 6 muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo para el dilactato de escualamina cristalizado en 2-propanol.

La Figura 7 muestra un análisis termogravimétrico del dilactato de escualamina cristalizado en 2-propanol.

La figura 8 muestra un perfil de calorimetría diferencial de barrido para el dilactato de escualamina cristalizado en 2-propanol.

La Figura 9 muestra el patrón del polvo de difracción de rayos X para el dilactato de escualamina cristalizado en etanol.

La Figura 10 muestra un análisis termogravimétrico del dilactato de escualamina cristalizado en etanol.

La Figura 11 muestra un perfil de calorimetría diferencial de barrido para el dilactato de escualamina cristalizado a partir de etanol.

La Figura 12 muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo para el dilactato de escualamina cristalizado en 2-butanol.

La Figura 13 muestra un análisis termogravimétrico del dilactato de escualamina cristalizado en 2-butanol.

La Figura 14 muestra un perfil de calorimetría diferencial de barrido para el dilactato de escualamina cristalizado en 2-butanol.

La Figura 15 muestra un esquema que representa un nuevo método para la producción de escualamina.

La Figura 16 muestra un esquema que representa un nuevo método para la producción de dilactato de escualamina.

La Figura 17 muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo para el dilactato de escualamina recristalizado producido por la síntesis anteriormente descrita de dilactato de escualamina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

[0020] Como se usa en el presente documento, el término "amorfo" se refiere a una forma de un compuesto que carece de una estructura cristalina definida.

[0021] Como se usa en el presente documento, 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.

5 [0022] Como se usa en el presente documento, el término "alcohol orgánico" se refiere a un compuesto orgánico con uno o más grupos hidroxilo unidos.

10 [0023] Como se usa en el presente documento, el término "solvato" se refiere a una forma cristalina de una escualamina que contiene moléculas de disolvente como parte de la estructura cristalina. En este caso el disolvente no es agua.

[0024] Como se usa en este documento, el término "hidrato" se refiere a una forma cristalina de una escualamina que contiene moléculas de agua como parte de la estructura cristalina.

15 [0025] Como se usa en el presente documento, el término "escualamina" incluye el compuesto que se muestra en la Figura 1 con el nombre químico 3β -(N-[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina)-7 α , 24R-dihidroxi-5 α -colestano-24-sulfato.

20 [0026] Como se usa en el presente documento, el término "aminosterol" se refiere a un compuesto con al menos un grupo hidroxilo y un grupo amino unido directa o indirectamente a un núcleo esteroide. La escualamina es un ejemplo de un aminosterol.

25 [0027] Tal como se usa en el presente documento, el término "angiogénesis" se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos, y un angiogénico es un compuesto que promueve esta actividad.

[0028] Como se usa en el presente documento, el término "antiangiogénico" se refiere a la prevención de la formación de nuevos vasos sanguíneos o a la destrucción de vasos sanguíneos recién formados, e incluye un agente que muestra una o ambas de estas propiedades.

30 [0029] Como se usa en este documento, 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).

35 [0030] Tal como se usa en el presente documento, el término "degeneración macular" pretende abarcar todas las formas de degeneración macular e incluye una pérdida gradual de la visión central que generalmente afecta a ambos ojos y que ocurre especialmente en los ancianos. Una forma de degeneración macular que progresa lentamente, generalmente conocida como seca, se caracteriza especialmente por la acumulación de depósitos amarillos en la mácula lútea y el adelgazamiento de la mácula lútea. Una forma de degeneración macular que progresa rápidamente, generalmente llamada húmeda, está marcada por la cicatrización producida por el sangrado y la fuga de líquido procedente de nuevos vasos sanguíneos formados debajo de la mácula lútea. La degeneración macular puede existir como la forma húmeda o la forma seca.

40 [0031] Como se usa en el presente documento, el término "retinopatía diabética" incluye cambios retinianos que se producen en la diabetes de larga evolución y se caracteriza por hemorragias puntiformes de vasos sanguíneos recién formados en la retina, microaneurismas y exudados cerosos bien definidos.

45 [0032] Como se usa en este documento, 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 también puede ser una cantidad que sea profilácticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz dependerá del tamaño y el sexo del paciente, la afección que se vaya a tratar, la gravedad de la afección y el resultado buscado. Para un paciente dado, una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

55 General

60 [0033] Se ha demostrado que la escualamina tiene propiedades antiangiogénicas y antimicrobianas y es útil para el tratamiento de enfermedades asociadas con el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos como el crecimiento de tumores sólidos y metástasis, aterosclerosis, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, isquemia retiniana, edema macular, enfermedades inflamatorias y similares en un animal, preferiblemente en un mamífero y más preferiblemente en un humano.

65 [0034] Los tres átomos de nitrógeno básicos presentes en la cadena lateral de espermidina de la escualamina forman sales cuando se tratan con varios ácidos. Un átomo de nitrógeno en la cadena lateral es neutralizado por el ácido sulfónico en C24, mientras que los otros dos átomos de nitrógeno están libres para formar sales con un ácido agregado. Tales sales de escualamina incluyen, pero no se limitan a, dihidrocloruro, diacetato,

ditrifluoroacetato, digluconato y dilactato. Una comparación de varias sales de escualamina en función de su toxicidad y estabilidad muestra que la sal de dilactato es una sal preferida. Como se describe a continuación, la sal de dilactato se puede preparar en forma amorfa mediante cromatografía de intercambio iónico seguida de liofilización o en diversas formas cristalinas por precipitación de diferentes disolventes alcohólicos. Otro aspecto de la invención se refiere a métodos para la preparación de las formas cristalinas de dilactato de escualamina. Se ha determinado la estructura completa de rayos X de la sal de dilactato cristalizada a partir de 2-propanol, lo que confirma la estereoquímica en los centros asimétricos de la molécula de escualamina como 3 β , 5 α , 7 α y 24 R.

[0035] Otra forma de realización de la invención se refiere a las diversas formas cristalinas de dilactato de escualamina. Una forma de realización particular es la forma cristalina de dilactato de escualamina precipitada a partir de 2-propanol que se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos de difracción principales a 12,5, 16,6 y 18,8 grados. Otra forma de realización particular se refiere a la forma cristalina de dilactato de escualamina precipitada a partir de etanol que se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos de difracción principales a 10,2, 13,0 y 16,6 grados. Otra forma de realización particular se refiere a la forma cristalina precipitada a partir de 2-butanol que se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos de difracción principales a 13,1, 17,7 y 18,3 grados. Otra forma de realización particular se refiere a la forma cristalina precipitada a partir de etanol-agua que se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene ángulos de difracción principales de 12,6, 15,7 y 18,8 grados. Las formas cristalinas del dilactato de escualamina pueden existir como solvatos, donde las moléculas de disolvente se incorporan dentro de la estructura cristalina. Como ejemplo, cuando el disolvente contiene etanol, el cristal puede contener moléculas de etanol. En otra forma de realización, el solvato puede contener un agua, y el cristal puede ser un hidrato que contiene agua en la estructura cristalina. En otra forma de realización, el cristal puede ser tanto un solvato como un hidrato.

[0036] Otra forma de realización de la invención comprende un nuevo método para la producción de dilactato de escualamina recristalizado. Este nuevo método utiliza el método descrito en la patente de EE. UU. 6,262,283 para producir un cetosterol protegido con hidroxilo 1 (por ejemplo, el compuesto 36 donde el grupo protector (GP) es -OC(O)-Ph); que luego reacciona con azidospermidina para producir la imina 2 correspondiente; seguido de reducción con, por ejemplo, NaBH₄, para producir los azidoaminosteroides 3 como una mezcla de alcoholes 7 protegidos y no protegidos; seguido de un tratamiento directo con hidróxido de potasio metanólico, seguido de hidrogenación en presencia de níquel Raney, para producir escualamina sin purificar. En lugar de purificación por HPLC y conversión en la sal de dilactato por cromatografía de intercambio iónico, la escualamina sin purificar se disuelve en etanol y se agrega un exceso de ácido láctico doble. El dilactato de escualamina cristalino 4 luego se precipita de la solución mediante la adición de agua y, opcionalmente, cristales simiente de dilactato de escualamina. La purificación final se logra luego mediante una o más recristalizaciones de etanol acuoso, preferiblemente que contiene al menos 4% de agua. Este nuevo proceso produce un mejor rendimiento y un producto más limpio que los métodos más antiguos y da como resultado un ahorro de costos considerable debido a la eliminación de la etapa de purificación por HPLC.

[0037] El dilactato de escualamina en cualquiera de sus formas cristalinas se puede administrar solo o como parte de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas para su uso *in vitro* o *in vivo* de acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos para obtener preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Los ejemplos de vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

[0038] Un ejemplo de un vehículo farmacéutico para la sal de dilactato de escualamina cristalina 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 pueden variar considerablemente sin afectar adversamente a las características de solubilidad y toxicidad de la composición. Además, la identidad de los componentes del cosolvente puede variar: por ejemplo, se pueden usar otros surfactantes no polares de baja toxicidad en lugar de polisorbato 80; el tamaño de la fracción de polietilenglicol puede variar; y/u otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar al polietilenglicol, por ejemplo, la polivinilpirrolidona y los azúcares o los polisacáridos, por ejemplo, la dextrosa.

[0039] Además de los vehículos, las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden incluir opcionalmente estabilizantes, conservantes y/o adyuvantes. Para ejemplos de vehículos, estabilizantes y adyuvantes típicos conocidos por los expertos en la técnica, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins (2000)).

[0040] Opcionalmente, otras terapias conocidas por los expertos en la técnica pueden combinarse con la administración de la sal de dilactato de escualamina cristalina de la invención. Más de un aminosterol puede estar presente en una sola composición.

[0041] La administración *in vivo* de la sal de dilactato de escualamina cristalina de la invención se puede efectuar en una dosis, dosis múltiples, de forma continua o intermitente a lo largo del tratamiento. Las dosis oscilan entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, y de la manera más preferible 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 dosis de administración más eficaces son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica y variarán con la composición utilizada para el tratamiento, el propósito del tratamiento, la célula a la que se dirige el tratamiento y el sujeto que recibe el tratamiento. Se pueden realizar administraciones únicas o múltiples con el nivel de dosis y el patrón seleccionado por el médico que controla el tratamiento.

[0042] Las composiciones farmacéuticas que contienen la sal de dilactato de escualamina cristalina de la invención pueden administrarse por cualquier vía adecuada, incluyendo oral, rectal, intranasal, tópica (incluyendo transdérmica, aerosol, ocular, bucal y sublingual), parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa), intraperitoneal y pulmonar. Se apreciará que la vía preferida variará con el estado 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 tópicas, subcutáneas, intramusculares y/o intravenosas.

[0043] Para la administración oral, la sal de dilactato de escualamina cristalina de la invención se puede formular fácilmente combinándola con vehículos farmacéuticamente aceptables ampliamente conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que los compuestos de la invención se formen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, diluciones, suspensiones y similares, para la ingestión oral por parte de un paciente que vaya a recibir el tratamiento.

[0044] Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener combinando el compuesto activo con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos después de agregar auxiliares adecuados, si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, como la polivinilpirrolidona reticulada, el agar, el ácido algínico o una de sus sales, como el alginato de sodio.

[0045] Las composiciones farmacéuticas para la administración tópica de la sal de dilactato de escualamina cristalina de la invención se pueden formular en vehículos convencionales oftalmológicamente compatibles, tales como, por ejemplo, una pomada, crema, suspensión, loción, polvo, solución, pasta, gel, espray, aerosol o aceite. Estos vehículos pueden contener conservantes compatibles como el cloruro de benzalconio, surfactantes como el polisorbato 80, liposomas o polímeros como la metilcelulosa, el alcohol polivinílico, la polivinilpirrolidona y el ácido hialurónico, que pueden usarse para aumentar la viscosidad. Para enfermedades oculares, las formulaciones tópicas preferidas son pomadas, geles, cremas o gotas para los ojos que contienen la sal de dilactato de escualamina cristalina de la invención.

[0046] Para la administración por inhalación, la sal de dilactato de escualamina cristalina de la presente invención se administra convenientemente en forma de una presentación de aerosol en espray a partir de envases presurizados o de un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Es posible formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insufador que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

[0047] La sal de dilactato de escualamina cristalina se puede formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo inyección intravenosa rápida o en infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante agregado. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como tampones, bacteriostáticos, agentes de suspensión, agentes estabilizantes, agentes espesantes, agentes dispersantes o mezclas de estos.

[0048] Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen suspensiones de los compuestos activos, que pueden prepararse como suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como la carboximetilcelulosa sódica, el sorbitol o el dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de 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 dextrosa, antes de administrarse por vía parenteral.

[0049] Para la inyección, la sal de dilactato de escualamina cristalina de la invención puede formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración por vía transmucosa, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados para permear la barrera. Dichos penetrantes son ampliamente conocidos en la técnica.

[0050] La sal de dilactato de escualamina cristalina también puede formularse en composiciones rectales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

[0051] La sal de dilactato de escualamina cristalina también se puede combinar con al menos un agente terapéutico adicional. Los agentes ejemplares incluyen, por ejemplo, anticancerígenos, antibióticos, antivirales, antiangiogénicos u otro tratamiento para la neovascularización ocular.

EJEMPLOS

Comparativa

Ejemplo 1 - Preparación de dilactato de escualamina amorfa

[0052] Se preparó escualamina sin purificar de acuerdo con 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 sin purificar se disolvió en agua, se acidificó con ácido trifluoroacético (TFA) y luego se purificó por HPLC de fase inversa utilizando una columna YMC ODS-AQ C₁₈ o equivalente y un sistema disolvente binario. La cromatografía HPLC se realizó para recolectar fracciones de producto que cumplen con las especificaciones de la sustancia farmacéutica. Las fracciones de sal de TFA de escualamina pura se concentraron antes de la conversión de la sal.

[0053] La conversión de la sal de TFA de escualamina en sal de dilactato de escualamina se realizó mediante la adsorción de la sal de TFA en resina de Amberchrom o su equivalente. La resina se lavó luego extensivamente con acetonitrilo al 1% en agua, bicarbonato de sodio 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 en el porcentaje de acetonitrilo en el agua. Las fracciones que contenían dilactato de escualamina se seleccionaron, 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 en polvo

[0054] Se realizaron análisis de difracción de rayos X en polvo en una muestra de dilactato de escualamina liofilizado de 4,0 a 45,0 grados (2 θ de acuerdo con el 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

[0055] 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 liofilizada se prepararon en una atmósfera de nitrógeno en una caja de guantes con control de humedad. Los análisis se completaron utilizando un Perkin Elmer TGA7 con el controlador de instrumento TAC 7/DX y el software Pyris versión 4.01. Se utilizó nitrógeno, NF a una velocidad de flujo 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 de 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 un inicio de degradación a una temperatura de 136,9 °C.

Preparación de dilactato de escualamina	Velocidad (°C/min)	Pérdida de masa primaria	Pico de 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

[0056] Se analizaron muestras mediante calorimetría diferencial de barrido a alta temperatura y se realizaron a 2 °C y 10 °C por minuto. Las transiciones térmicas adquiridas durante una velocidad de análisis de 2 °C por minuto se consideran más precisas y son los cálculos se reflejan en la conclusión. Todos los eventos enumerados son temperaturas máximas endotérmicas, a menos que se indique lo contrario. Los ejemplos de eventos adicionales incluyen un "Exo" que indica un evento exotérmico o "Tg" que indica una transición de fase. La falta de un evento térmico notable en un análisis en particular se indica con "ninguno". Durante el análisis del dilactato de escualamina liofilizada, se detectó un evento exotérmico a una temperatura de inicio de 52,7 °C durante un análisis a 2 °C por minuto. Un evento de transición de fase (Tg) a una temperatura de 62,0 °C durante un análisis a 10 °C por minuto no tuvo un evento térmico correspondiente cuando se escaneó a 2 °C por minuto. Una transición de fase es indicativa del ablandamiento y cambio de estructura de una parte del material seco. Se observaron dos eventos endotérmicos a temperaturas máximas de 127,7 °C y 157,7 °C durante el análisis a 2 °C por minuto. El mayor cambio en el calor específico asociado con un evento endotérmico para el dilactato de escualamina liofilizada fue un cambio en el calor específico de 8,15 J/g que se observó durante el análisis de 10 °C por minuto a una temperatura de 166,51 °C. El cambio en el calor específico asociado con un evento endotérmico está correlacionado con la cantidad de energía requerida para fundir ese material. Los resultados del análisis de 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 - Estudio de irritación local de inyecciones intravenosas repetidas en 5 días de diferentes formas de sales (Ditrifluoroacetato, Dilactato, Digluconato, Diacetato) de MSI-1256 (Escualamina) en ratones

[0057] Resumen: Las inyecciones repetidas durante cinco días de varias formas de sal de escualamina (2,5 mg/kg/día) causaron hinchazón, hematomas 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 observó hinchazón, hematomas e irritación con todas las formas de sal inyectadas de escualamina administrada repetidamente a una dosis de 2,5 mg/kg/día utilizando soluciones de 0,25 mg/ml.

[0058] Objetivo: determinar la irritación local de las dosis intravenosas diarias repetidas de 5 días de las formas de sal de escualamina en colas de ratones CD-1®BR.

[0059] Material y métodos: (Animales): Cuarenta y ocho ratones machos CD-1®BR (Charles River Lab). El peso corporal medio al inicio del estudio fue de 20,6 g. (Entorno de alojamiento): los ratones se alojaron como grupos (con un máximo de 10 ratones/caja) en cajas de plástico para ratones con lecho de astillas de madera y tapas de rejilla. Tenían acceso a alimentos (Purina Mouse Chow) y agua en botellas ad libitum. Las cajas se colocaron en armarios aisladores suministrados con aire ambiente filtrado una vez. La sala en la que se alojaron los animales estaba en un ciclo de 12 horas con luz encendida/12 horas con luz apagada y tenía temperatura controlada (rango: 67-76 ° F) y humedad (rango: 40-70% de humedad relativa).

[0060] Elementos de prueba:

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, fracción activa del 58,0%
 mMagainin-2-amida, control positivo

Vehículo: Dextrosa en agua al 5% (D5W) (bolsa Bagster, solución estéril)

[0061] 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 magainin-2-amida (control positivo) en D5W.

[0062] Protocolo: los ratones se asignaron al azar a seis grupos (8 ratones/grupo) y recibieron inyecciones intravenosas (iv) diarias de soluciones de D5W o sales de escualamina en la vena de la cola durante cinco días (días de estudio 0, 1, 2, 3 y 4). Los volúmenes inyectados de 10 ml/kg de peso corporal con D5W o una solución de 0,25 mg/ml de sales de escualamina dieron como resultado 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 elemento de prueba magainin-2-amida (10 mg/kg/día; 10 ml/kg/día de una solución de 1 mg/ml), que se determinó previamente como irritante venoso local, como control positivo. A los ratones no se les inyectó un elemento de prueba si la gravedad de los hematomas o la hinchazón (edema) justificaba la omisión de la inyección. Se vigiló la supervivencia y se observaron signos clínicos diarios durante cinco días de la administración de sales de escualamina y cuatro días después de la última dosis (estudio, día 8). Los signos clínicos de irritación, edema y hematomas se produjeron 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 elementos de prueba, excepto la magainina-2-amida, se verificaron en el día de estudio 3. (Las mismas soluciones se usaron en todo el estudio, por lo que se puede suponer un pH similar en todos los días de estudio).

[0063] Resultados: Los animales a los que se les administraron dosis intravenosas (IV) repetidas de varias formas de sal de escualamina en la vena de la cola presentaron irritación, hinchazón (edema) y/o colas con hematomas en el día 2 del estudio, y la gravedad de los hematomas y el edema estaba relacionada directamente con el número de inyecciones. Para evaluar la recuperación, se observaron las colas en el día 8 del estudio, que fue cuatro días después de la última inyección. En el día 8, las colas de los ratones de los grupos 3 y 4 (que recibieron las formas de sal de dilactato y digluconato, respectivamente) estaban ligeramente irritadas y con hematomas. Las colas de los ratones de los grupos 5 y 6 (que recibieron las formas de diacetato y sal de ditrifluoroacetato, respectivamente) tenían una irritación y hematomas similares. La cola de un ratón (1/8) del grupo 5 presentó necrosis. En el grupo 6, la cola de un ratón (1/8) se desprendió, y la cola de otro ratón (1/8) también presentó necrosis. Los ratones del grupo 2 (control positivo) mostraron un edema leve o moderado en las colas durante la dosis (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 formas de sal de escualamina fueron aproximadamente 6.

[0064] Conclusiones: Las inyecciones repetidas de todas las formas de sal de escualamina causaron hinchazón (edema), hematomas e irritación de las colas de los ratones. Los síntomas clínicos sugieren que el tratamiento con dilactato de escualamina y digluconato de escualamina fue mejor que el tratamiento con diacetato de escualamina y ditrifluoroacetato de escualamina. Por lo tanto, una ventaja inesperada de las sales de dilactato de escualamina y digluconato de escualamina sobre otras sales de escualamina probadas es un menor irritación venosa, es decir, una menor toxicidad experimentada por el receptor, especialmente en el sitio de administración intravenosa.

Ejemplo 3 - Estudio de estabilidad acelerada de cuatro formas de sal de escualamina

[0065] Se realizó un estudio de estabilidad acelerada (basado en la temperatura) que duró 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 siguiente tabla resume los resultados del % de pureza del pico principal, escualamina, según el área total integrada. El análisis se realizó utilizando HPLC de fase reversa de muestras derivatizadas con o-ftalaldehído.

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

[0066] La Tabla 1 muestra cómo cada forma de sal se ha degradado con el tiempo a temperaturas elevadas. Los resultados de este estudio de estabilidad indican que el dilactato de escualamina es sorprendentemente estable en condiciones cada vez más graves, 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), fue un factor importante en la selección de la forma de sal de dilactato de escualamina para su posterior desarrollo.

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

[0067] Se produjo una solución sobresaturada de dilactato de escualamina amorfa 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 retiró por filtración 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. Se observó que el material cristalino resultante no era higroscópico, ya que no ganó peso cuando se dejó a temperatura ambiente sin tapar durante una hora.

Determinación del patrón de difracción de rayos X de cristal único

[0068] Los cristales individuales adecuados para el estudio de rayos X se obtuvieron a partir de una solución de 2-propanol y agua como se ha descrito anteriormente. El cristal más grande, con unas dimensiones de 0,025, 0,10 y 1,10 mm, fue el elegido para el estudio. El cristal se montó en un instrumento Nonius Kappa CCD con radiación de molibdeno y detector de área CCD. El cristal se enfrió a 173 °K utilizando 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 recopilaban en un sistema de cristal inferior (es decir, triclínico). Los datos se recopilaron exponiendo el cristal durante 500 segundos por grado de rotación del cristal. La recopilación de datos total tomó 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.

[0069] El análisis del grupo espacial mostró que no hubo 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, lo que sugiere que puede pertenecer al grupo espacial P2. Todo esto concuerda con lo que se espera para una molécula quiral, que no puede pertenecer al grupo espacial céntrico y no puede tener simetrías de espejo o deslizaza. El análisis de intensidad mostró que los datos se debilitaban en los ángulos más altos de theta. La intensidad media en el rango theta de 21-22 grados fue solo 1,9 veces la media del fondo. Sin embargo, hubo suficientes datos sólidos para proporcionar la estructura molecular con la configuración absoluta adecuada (quiralidad).

[0070] La estructura se resolvió fácilmente mediante métodos directos en el grupo espacial P2 sugerido por los análisis de datos. El refinamiento de la estructura por mínimos cuadrados seguido de Fourier diferencial mostró la presencia de moléculas de disolventes. Se detectaron muchas moléculas de agua y una molécula desordenada de 2-propanol. Las ocupaciones de las moléculas se verificaron mediante refinamiento y se descubrió que una molécula de agua tenía solo la mitad (50%) de ocupación. Todos los átomos que no eran de hidrógeno se refinaron con parámetros de desplazamiento anisotrópico (ADP). Los átomos de hidrógeno conectados a átomos de carbono y nitrógeno se incluyeron en posiciones calculadas. En cuanto a los grupos hidroxilo y las moléculas de agua, solo se incluyeron cuando se encontraron átomos razonables en Fourier diferencial. En cuanto a la molécula desordenada de 2-propanol y para el oxígeno para el que no se pudo localizar un átomo razonable en Fourier diferencial, no se incluyeron en el cálculo. El refinamiento utilizó 6119 datos de intensidad y refinó 612 parámetros. El factor residual final (factor R) fue de 0,087, lo que demuestra inequívocamente la estructura de la molécula.

[0071] Hay varios hidrógenos polares (deficientes en electrones) en los nitrógenos catiónicos y los oxígenos de hidroxilo. También hay varios oxígenos ricos en electrones en los centros aniónicos. Esto conduce 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 H	Aceptor 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

Donador H	Aceptor H	Distancia (Å)	Simetría
N3 (H3A)	O1W	2,804	x-1, y-1, z + 1
N3 (H3B)	O1S o 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 o O1S'	O3W	2,730 o 2,857	1-x, y, 1-z

[0072] Las distancias se dan entre los átomos que no son hidrógeno y, cuando están disponibles, los hidrógenos a través de los cuales se forma el enlace se muestran entre paréntesis. La estructura cristalina del dilactato de escualamina se muestra en la Figura 5.

[0073] Se determinó una celda unidad a partir de los datos de rayos X de cristal único de la forma hidratada. Fue monoclinica con simetría P2, Z = 2 y las siguientes dimensiones: a = 19,3999Å, b = 6.,5443Å, c = 20,9854Å, alfa = gamma = 90 °, beta = 92,182 ° y V = 2662,3Å³.

Patrón de difracción de rayos X en polvo

[0074] Los análisis de difracción de rayos X en polvo en una muestra de dilactato de escualamina cristalizado a partir de 2-propanol se realizaron de 4,0 a 45,0 grados (2θ, de acuerdo con el Método USP <941>) mientras que la muestra estaba cubierta con una película de policarbonato. Los datos pertinentes, que consisten en picos cristalinos distintos, se muestran en la Figura 6 e indican 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

[0075] 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 humedad controlada. Los análisis se completaron utilizando un Perkin Elmer TGA7 con el controlador de instrumentos TAC 7/DX y el software Pyris versión 4.01. Se utilizó nitrógeno, NF a una velocidad de flujo 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 tuvo 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 promedio del 1,54% con un evento máximo observado a una temperatura de 103,6 °C cuando se probó a 2 °C por minuto. La pérdida de peso total sufrida por la muestra fue de 2,92%. Los dos eventos distintos de pérdida de peso sugieren que existía una forma de agua unida dentro de la matriz de la muestra. La pérdida inicial es más probable debido a la expulsión de los componentes volátiles adsorbidos a la superficie del material. El segundo evento de pérdida de peso ocurrió debido a la liberación de agua absorbida asociada con la matriz de la muestra, que probablemente era un hidrato cristalino, a una temperatura máxima de 103,6 °C. La segunda liberación distinta de humedad de la muestra a una temperatura específica sugiere una descomposición de una gran parte del material cristalino. Los resultados para el análisis de 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 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

[0076] Las muestras se analizaron mediante calorimetría de barrido diferencial a alta temperatura y se realizaron a 2 ° y 10 °C por minuto. Las transiciones térmicas adquiridas durante una velocidad de análisis de 2 °C por minuto se consideran más precisas y los cálculos se reflejan en la conclusión. Todos los eventos enumerados son temperaturas pico endotérmicas, a menos que se indique lo contrario. Los ejemplos de eventos adicionales incluyen un "Exo" que indica un evento exotérmico o "Tg" que indica una transición de fase. La falta de un evento térmico destacable en un análisis en particular se indica con "ninguno". El primer evento térmico caracterizado por CDB 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 máxima de pérdida de peso de 103,6 °C durante el análisis TGA de este material en particular. Otros tres eventos exotérmicos ocurrieron a temperaturas de 126,6 °, 157,3 ° y 164,1 °C. Los resultados del análisis de 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

Ejemplo 5 - Preparación de dilactato de escualamina cristalina a partir de etanol

[0077] Se produjo una solución sobresaturada de dilactato de escualamina amorfa 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 retiró por filtración 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 en polvo

[0078] Los análisis de difracción de rayos X en polvo en una muestra de dilactato de escualamina cristalizado a partir de etanol se realizaron de 4,0 a 45,0 grados (2θ .. en conformidad con el Método USP <941>) mientras que la muestra estaba cubierta con 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 indican 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

[0079] 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 humedad controlada. Los análisis se completaron utilizando un Perkin Elmer TGA7 con controlador de instrumento TAC 7/DX y el software Pyris versión 4.01. Se utilizó nitrógeno, NF a una velocidad de flujo 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 tuvo dos eventos distintos de pérdida de peso volátil. El evento inicial produjo una pérdida de peso de 2,99%. El segundo evento produjo una pérdida de peso promedio de 1,49% con un evento máximo observado a una temperatura de 106,7 °C cuando se probó a 2 °C por minuto. La pérdida de peso total incurrida por la muestra fue de 4,48%. Los dos eventos distintos de pérdida de peso sugieren que existía una forma de agua unida dentro de la matriz de la muestra. La pérdida inicial es más probable debido a la expulsión de los componentes volátiles adsorbidos a la superficie del material. El segundo evento de pérdida de peso se produjo debido a la liberación de agua absorbida asociada con la matriz de la muestra, que probablemente era un hidrato cristalino, a una temperatura máxima de 106,7 °C. La segunda liberación distinta de humedad de la muestra a una temperatura específica sugiere una descomposición de una gran parte del material cristalino. Las temperaturas relacionadas

con el inicio de la degradación también se determinaron utilizando TGA. El inicio promedio hasta la temperatura de degradación para este material de muestra fue de 152,3 °C. Los resultados para el análisis de 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 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

[0080] Las muestras se analizaron mediante calorimetría de barrido diferencial a alta temperatura y se realizaron a 2 °C y 10 °C por minuto. Las transiciones térmicas adquiridas durante una velocidad de análisis de 2 °C por minuto se consideran más precisas y los cálculos se reflejan en la conclusión. Todos los eventos enumerados son temperaturas pico endotérmicas, a menos que se indique lo contrario. Los ejemplos de eventos adicionales incluyen un "Exo" que indica un evento exotérmico o "Tg" que indica una transición de fase. La falta de un evento térmico destacable en un análisis en particular se indica con "ninguno". El primer y más importante evento térmico caracterizado por CDB 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 máxima de pérdida de peso de 106,7 °C durante el análisis TGA de este material en particular. Se detectaron dos eventos exotérmicos adicionales a temperaturas de 144,7 °C y 175,4 °C. Los eventos endotérmicos, que ocurrieron a las temperaturas de 141,1 °C y 151,6 °C durante un análisis a 10 °C por minuto, no tuvieron un evento térmico correspondiente cuando se analizaron a 2 °C por minuto. Los eventos térmicos observados durante el análisis del material indican la fusión del material cristalino. El evento endotérmico más significativo observado durante el análisis de 2 °C por minuto del material, que se produjo a una temperatura máxima de 112,4 °C, resultó en un cambio en el calor específico de 18,16 J/g. El cambio en el calor específico asociado con un evento endotérmico se correlaciona con la cantidad de energía requerida para fundir ese material. Por lo tanto, se considera que el evento endotérmico, que ocurre a una temperatura de 112,4 °C, representa el material cristalino más estable presente. Los resultados del análisis de 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

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

[0081] Las muestras de dilactato de escualamina amorfa y dilactato de escualamina con recristalización 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 porción de cada muestra sometida a estrés térmico se analizó mediante HPLC con detección ELSD y los resultados se compararon con el análisis de HPLC de material sin tensión. El resultado del análisis de HPLC se muestra en la tabla siguiente.

Material	Isómero 24S	Escualamina	Lactilamida	Desconocido	Desconocido
Escualamina amorfa sin estrés	0,833%	98,978%	<u>0,115%</u>	0,054%	0,020%
Escualamina amorfa sometida a estrés térmico	0,864%	98,530%	<u>0,519%</u>	0,052%	0,034%
Escualamina cristalizada sin estrés	0,715%	99,187%	<u>0,070%</u>	0,032%	<0,02%
Escualamina cristalizada sometida a estrés térmico	0,714%	99,168%	<u>0,087%</u>	0,031%	<0,02%

[0082] El resultado demuestra un aumento significativo en el porcentaje de la impureza de lactilamida cuando la escualamina amorfa sufre estrés térmico, pero no un aumento significativo en el material cristalizado. Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que la recristalización del dilactato de escualamina es un método para mejorar la estabilidad del material. Esta estabilidad mejorada es ventajosa en la preparación y almacenamiento de la sal de dilactato de escualamina cristalina y sus diversas formulaciones.

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

[0083] Se produjo una solución sobresaturada de dilactato de escualamina amorfa 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 retiró por filtración 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 en polvo

[0084] Los análisis de difracción de rayos X en polvo en una muestra de dilactato de escualamina cristalizado a partir de 2-butanol se realizaron de 4,0 a 45,0 grados (2θ en conformidad con el método USP <941>) mientras que la muestra estaba cubierta con una película de policarbonato. Los datos pertinentes, que consisten en picos cristalinos distintos, se muestran en la Figura 12 y se resumen en la tabla siguiente e indican 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

[0085] 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 humedad controlada. Los análisis se completaron utilizando un Perkin Elmer TGA7 con el controlador de instrumento TAC 7/DX y el software Pyris versión 4.01. Se utilizó nitrógeno, NF a una velocidad de flujo 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 tuvo dos eventos distintos de pérdida de peso volátil. El evento inicial produjo una pérdida de peso del 2,69%. El segundo evento produjo una pérdida de peso promedio de 3,34% con un evento máximo observado a una temperatura de 101,8 °C cuando se analizó a 2 °C por minuto. La pérdida de peso total incurrida por la muestra fue de 6,03%. Los dos eventos distintos de pérdida de peso sugieren que existía una forma unida de disolvente dentro de la matriz de la muestra. La pérdida inicial es más probable debido a la expulsión de los componentes volátiles adsorbidos a la superficie del material. El segundo evento de pérdida de peso ocurrió debido a la liberación de agua absorbida asociada con la matriz de la muestra, que probablemente fue un hidrato cristalino, a una temperatura máxima de 101,8 °C. La segunda liberación distinta de humedad de la muestra a una temperatura específica sugiere una descomposición de una gran parte del material cristalino. Las temperaturas relacionadas con el inicio de la degradación también se determinaron utilizando TGA. La temperatura promedio de inicio a degradación para este material de muestra fue de 145,0 °C. Los resultados para el análisis de 2 °C por minuto se muestran en la Figura 13 y los datos se resumen en la tabla a continuación.

Preparación de dilactato de escualamina	Velocidad (°C/min)	Pérdida de masa primaria	Pico de 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

[0086] Las muestras se analizaron mediante calorimetría de barrido diferencial a alta temperatura y se realizaron a 2 °C y 10 °C por minuto. Las transiciones térmicas adquiridas durante una velocidad de análisis de 2 °C por minuto se consideran más precisas y los cálculos se reflejan en la conclusión. Todos los eventos enumerados son temperaturas pico endotérmicas, a menos que se indique lo contrario. Los ejemplos de eventos adicionales incluyen un "Exo" que indica un evento exotérmico o "Tg" que indica una transición de fase. La falta de un evento térmico notable en un análisis en particular se indica con "ninguno". El primer evento térmico caracterizado por CDB 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 a menudo se atribuye a cierta cantidad de material amorfo. Se detectó un evento endotérmico a una temperatura de 100,2 °C, lo que resultó en 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 con un evento endotérmico se correlaciona con la cantidad de energía requerida para fundir ese material. Este evento endotérmico coincide con la temperatura máxima de pérdida de peso de 101,8 °C durante el análisis TGA de este material en particular. Por lo tanto, se considera que el evento endotérmico, que ocurre a

una temperatura de 100,2 °C, representa el material cristalino más estable presente. Se detectaron dos eventos exotérmicos adicionales a temperaturas de 146,4 ° y 177,1 °C. El evento endotérmico, que ocurre a las temperaturas de 153,8 °C durante un análisis a 10 °C por minuto, no tuvo un evento térmico correspondiente cuando se analizó a 2 °C por minuto. Los resultados del análisis de 2 °C por minuto se muestran en la Figura 14 y se resumen en la tabla a continuación.

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)

Ejemplo 8 - Método mejorado para la fabricación de dilactato de escualamina cristalino

[0087] El compuesto 36 se preparó de acuerdo con 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 azidospermidina se disolvieron en 22,5 l de piridina a temperatura ambiente. Se añadieron aproximadamente 8,0 l (4,0 moles) de una solución de 0,5 M de solución de metóxido sódico-metanol y la mezcla se agitó durante aproximadamente 0,5 horas. Se añadieron aproximadamente 641,0 g (1,0 mol) del compuesto 36 y la mezcla de reacción se agitó durante dos horas adicionales. La mezcla de reacción se concentró hasta la deshidratación *in vacuo* (máx. 43 °C/171 mbar) para eliminar el agua, se agregaron aproximadamente 11l28 l de piridina y el disolvente se destiló nuevamente *in vacuo* (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 según se analizó por HPLC. La mezcla se calentó 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 de menos de 65 °C hasta un volumen final de aproximadamente 26,8 l. Se agregaron aproximadamente 13,4 l de 2-butanol y la mezcla se agitó antes de permitir que las capas se separaran. La capa acuosa inferior se retiró para su eliminación al finalizar el lote. (Si no hay separación, se agrega 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 lavó nuevamente con 17,2 l de 2-butanol y las dos fases 2-butanol combinadas. La parte orgánica, compuesto crudo 40, se concentró hasta la deshidratación *in vacuo* para utilizarse para la preparación de escualamina sin purificación adicional. Aproximadamente 796,18 g (1,0 Moles) del compuesto crudo 40 se disolvieron 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 a reflujo (aproximadamente 64 °C) hasta que se consumió todo el compuesto 40. Se añadieron aproximadamente 198 g de catalizador de níquel Raney y la mezcla de reacción se hidrogenó a una temperatura de 15-25 °C a 2-3 bares de presión de hidrógeno hasta que el compuesto 38 se consumió según se analizó por TLC. 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 combinado y los lavados se concentraron *in vacuo* a una temperatura de menos de aproximadamente 60 °C a un volumen de 6,7 l. Se agregaron aproximadamente 18,8 l de 2-Butanol a la solución concentrada y la solución se concentró bajo presión reducida a menos de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 5,36 l. Se añadieron aproximadamente 13,4 l de metil t-butil éter y la solución se enfrió a menos de aproximadamente -5 °C. El producto precipitado se recogió, la torta de filtración se lavó dos veces con 1,3 l de metil t-butil éter y el producto se secó al vacío a aproximadamente 25 a aproximadamente 35°C. Se obtuvo un total de 490 g de escualamina sin purificar, lo que representa un rendimiento del 75,5%. El esquema de síntesis para la escualamina sin purificar se muestra en la Figura 15.

[0088] Recristalización: Aproximadamente 650 g (1,0 moles) de escualamina sin purificar se mezclaron con 11,05 l de etanol para formar una solución turbia. La solución se filtró a través de un filtro recubierto con auxiliar de filtración y la torta de filtración se lavó con 650 ml de etanol. Aproximadamente 494 ml de agua y aproximadamente 360,3 g (4,0 moles) de ácido láctico L -(+) se añadió 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 aproximadamente 0 a aproximadamente 5°C durante al menos 12 horas sin agitación y luego se agregaron aproximadamente 100 mg de cristales semente de dilactato de escualamina recristalizado. La solución se mantuvo a aproximadamente 0 a aproximadamente 5°C sin agitar durante al menos 48 horas más y luego la precipitación resultante se agitó a menos de aproximadamente 5°C para formar una suspensión homogénea. Los sólidos se recogieron y la torta de filtración se lavó con 650 ml de etanol frío (de 0 a 5 °C). El producto se secó *in vacuo* a aproximadamente 40 °C (± 2 °C) para producir un total de 614 g (76,0% de rendimiento) de dilactato de escualamina cristalizado. El esquema de síntesis para el dilactato de escualamina sin purificar se muestra en la figura 16.

[0089] Aproximadamente 1 kg de dilactato de escualamina cristalizado o recristalizado se combinó con 18 l de etanol y 760 ml. de agua. La suspensión se calentó a 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 agregaron aproximadamente 100 mg de cristales simiente de dilactato de escualamina recristalizado, la solución se mantuvo a aproximadamente 20 °C (± 2 °C) sin agitación durante al menos 48 horas más. El precipitado 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 (0 a 5 °C) y el producto se secó *in vacuo* a aproximadamente 40 °C (± 2 °C) para producir un total de 900 g (rendimiento del 90%) de dilactato de escualamina recristalizado.

[0090] El análisis del dilactato de escualamina cristalino producido por este proceso se muestra en la siguiente tabla.

Prueba	Especificación	Resultados
Pureza HPLC	> 95,00 %	99,0 %
24-S	$\leq 1,7$ %	0,74 %
3- α	$\leq 0,1$ %	< 0,1 %
Lactil Amida	<1,5 %	0,17 %
Des-sulfato	$\leq 0,1$ %	< 0,1 %
Ácido láctico	< 30%	22,89 %
Agua de Karl Fischer	<10 %	2,18 %
HPLC MS	628 $\pm$ 1amu	Se ajusta
RMN	Se ajusta a la ref.	Se ajusta
FTIR	Se ajusta a la ref.	Se ajusta
XRD	Sin especificación	Completado
CDB	Sin especificación	Pf 143,9 ° Pureza 99,99%
Disolventes residuales (etanol)	5000 ppm	<200 ppm
Sodio	Sin especificación	80,5 mg/kg
Potasio	Sin especificación	520 mg/kg

[0091] El patrón de difracción de rayos X en 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 fabricación de escualamina	977	891	1333

[0092] El patrón de polvo indica que, aunque el dilactato de escualamina se recristalizó en etanol/agua como en el Ejemplo 5, se ha producido una forma polimórfica diferente (compárese las Figuras 9 y 17). Esto se debe probablemente al uso de un 4% de agua en el proceso de fabricación en lugar de un 1% de agua en el Ejemplo 5 y al hecho de que el material se cristalizó a 20 °C en lugar de a -20 °C. También hay evidencia de la valoración de Karl Fisher de que el material recristalizado del proceso de fabricación es un monohidrato. Este nuevo proceso de fabricación también produce un mejor rendimiento y un producto más puro que el proceso descrito en la patente de EE. UU. 6,262,283.

REIVINDICACIONES

1. Forma cristalina de la sal de dilactato de 3β-(N-[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina)-7α,24R-dihidroxi-5α-colestano-24-sulfato.
2. Forma cristalina de la sal de dilactato según la reivindicación 1, en la que la forma cristalina está **caracterizada por** un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene ángulos de difracción principales de:

12,5°, 16,6 ° y 18,8 °;
10,2°, 13,0 ° y 16,6 °;
13,1°, 17,7 ° y 18,3 °;
12,6°, 15,7 ° y 18,8 °.
3. Forma cristalina de la sal de dilactato según la reivindicación 1 o 2 para su uso como medicamento para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero que necesite dicho tratamiento, comprendiendo dicho uso administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma cristalina de la sal de dilactato.
4. Forma cristalina de la sal de dilactato según la reivindicación 1 o 2 para su uso como medicamento para tratar o prevenir la neovascularización en un mamífero que necesite tal tratamiento, comprendiendo dicho uso la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma cristalina de la sal de dilactato.
5. Forma cristalina de la sal de dilactato según la reivindicación 4, en la que la neovascularización es en el ojo, el intestino o el sistema cardiovascular.
6. Forma cristalina de la sal de dilactato según la reivindicación 5, en la que la neovascularización en el ojo resulta de una degeneración macular relacionada con la edad, un tumor ocular, retinopatía diabética, oclusión de la vena central de la retina, edema macular diabético (EMD) o miopía patológica.
7. Forma cristalina de la sal de dilactato según las reivindicaciones 3 o 4 en la que el mamífero es un ser humano.

Figura 1

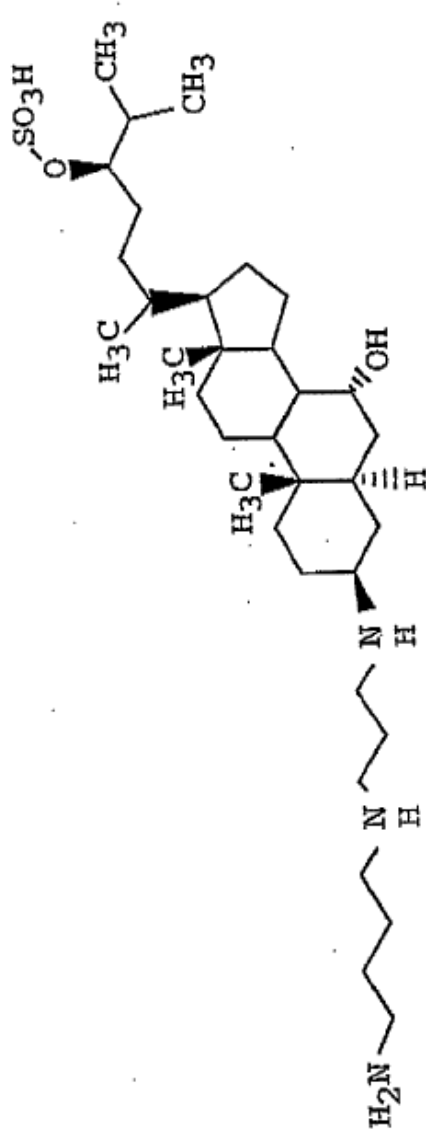


Figura 2

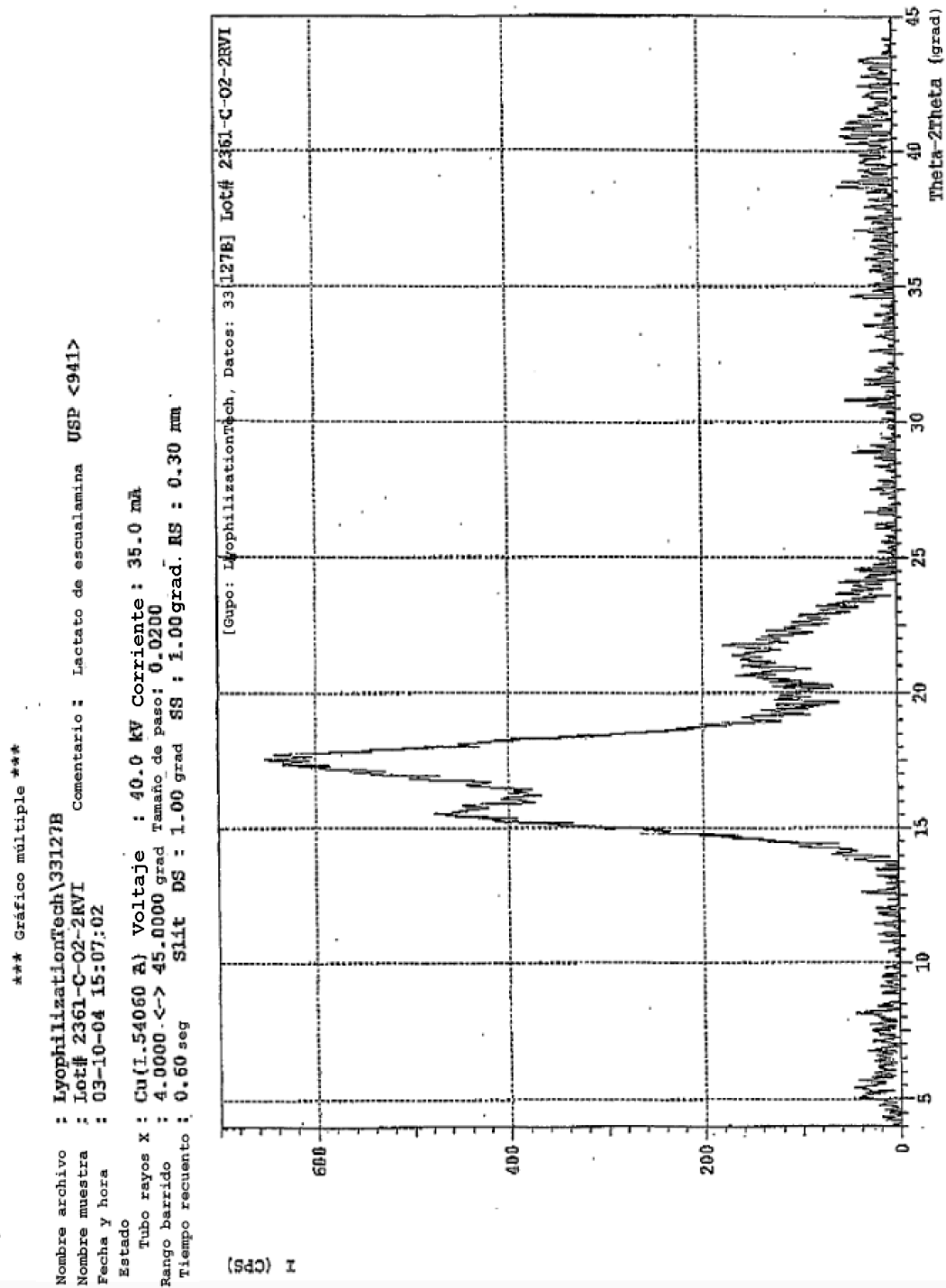


Figura 3

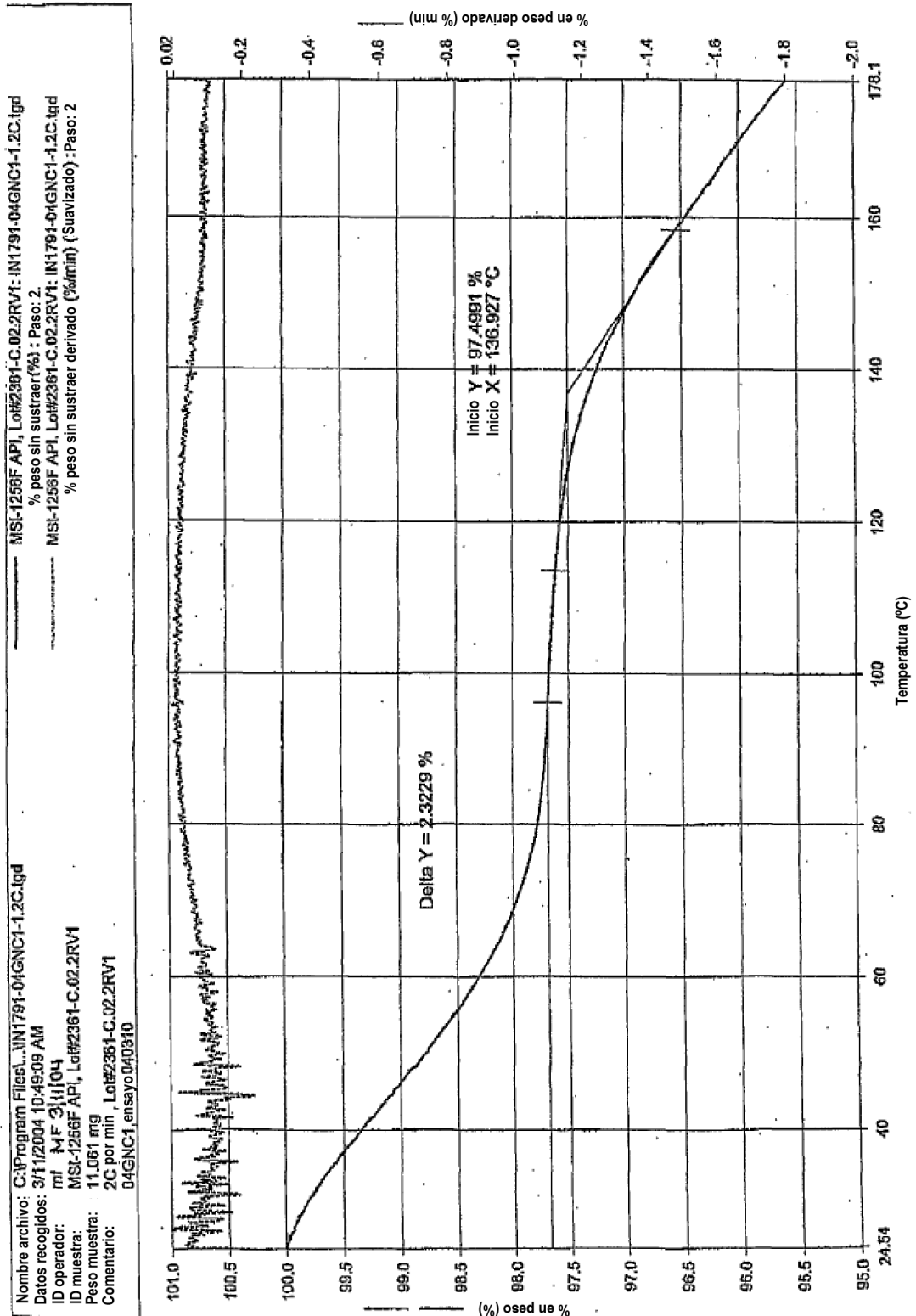


Figura 4

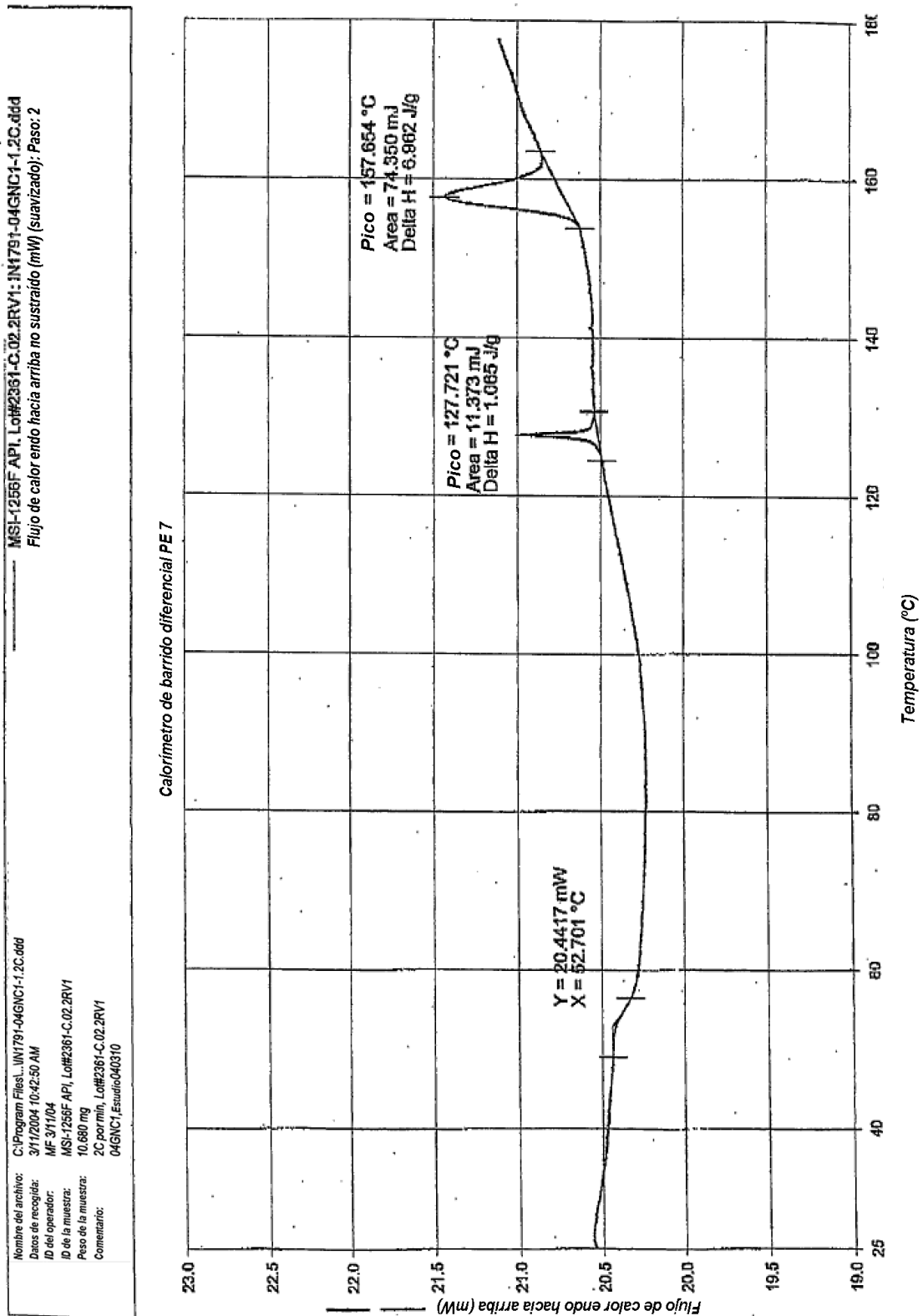


Figura 5

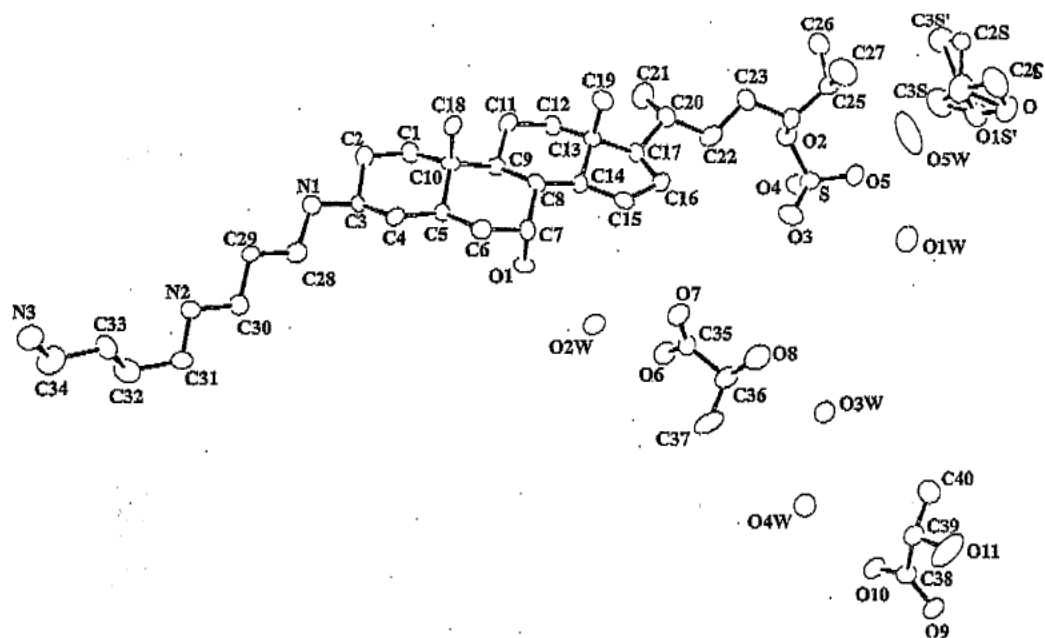


Figura 6

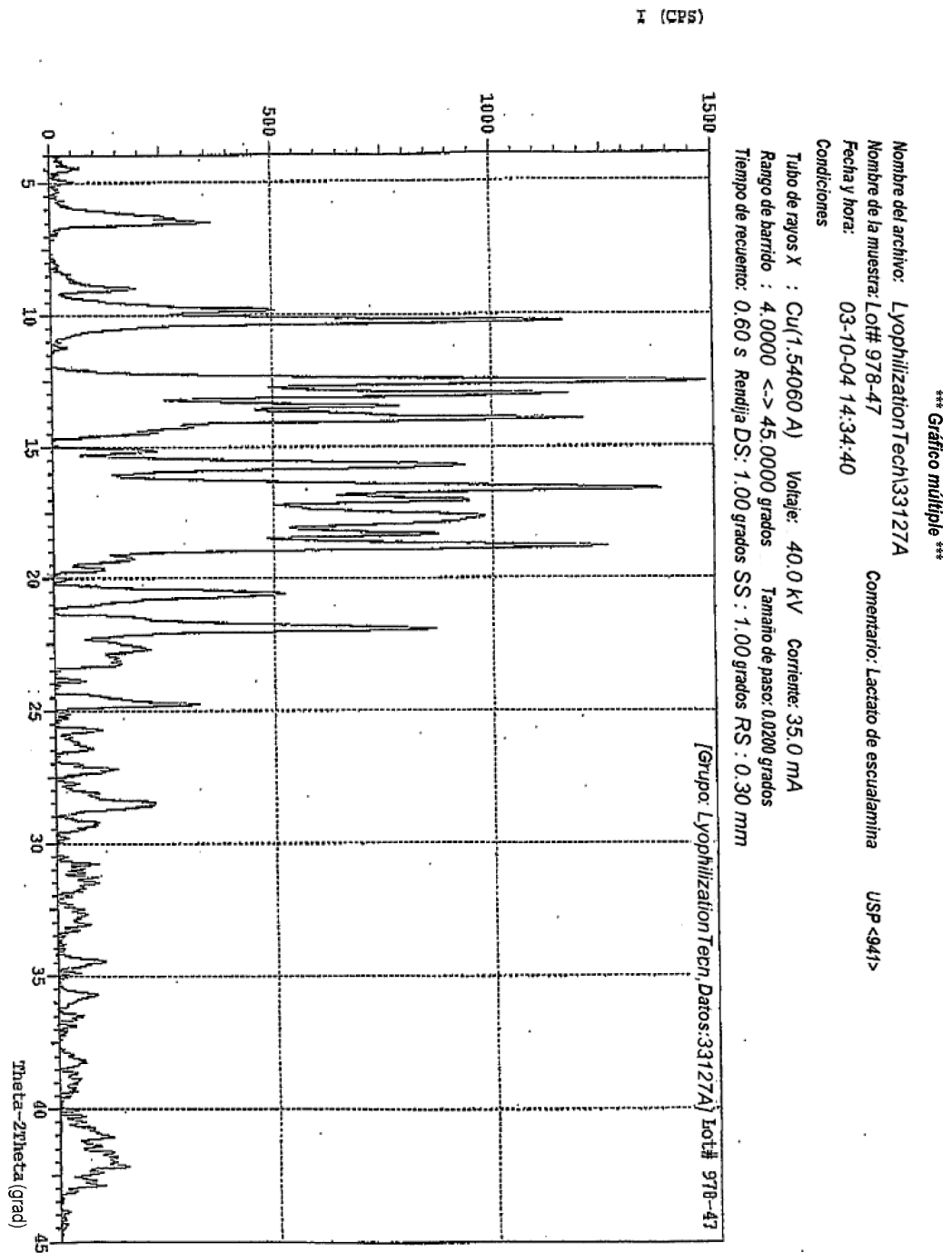


Figura 7

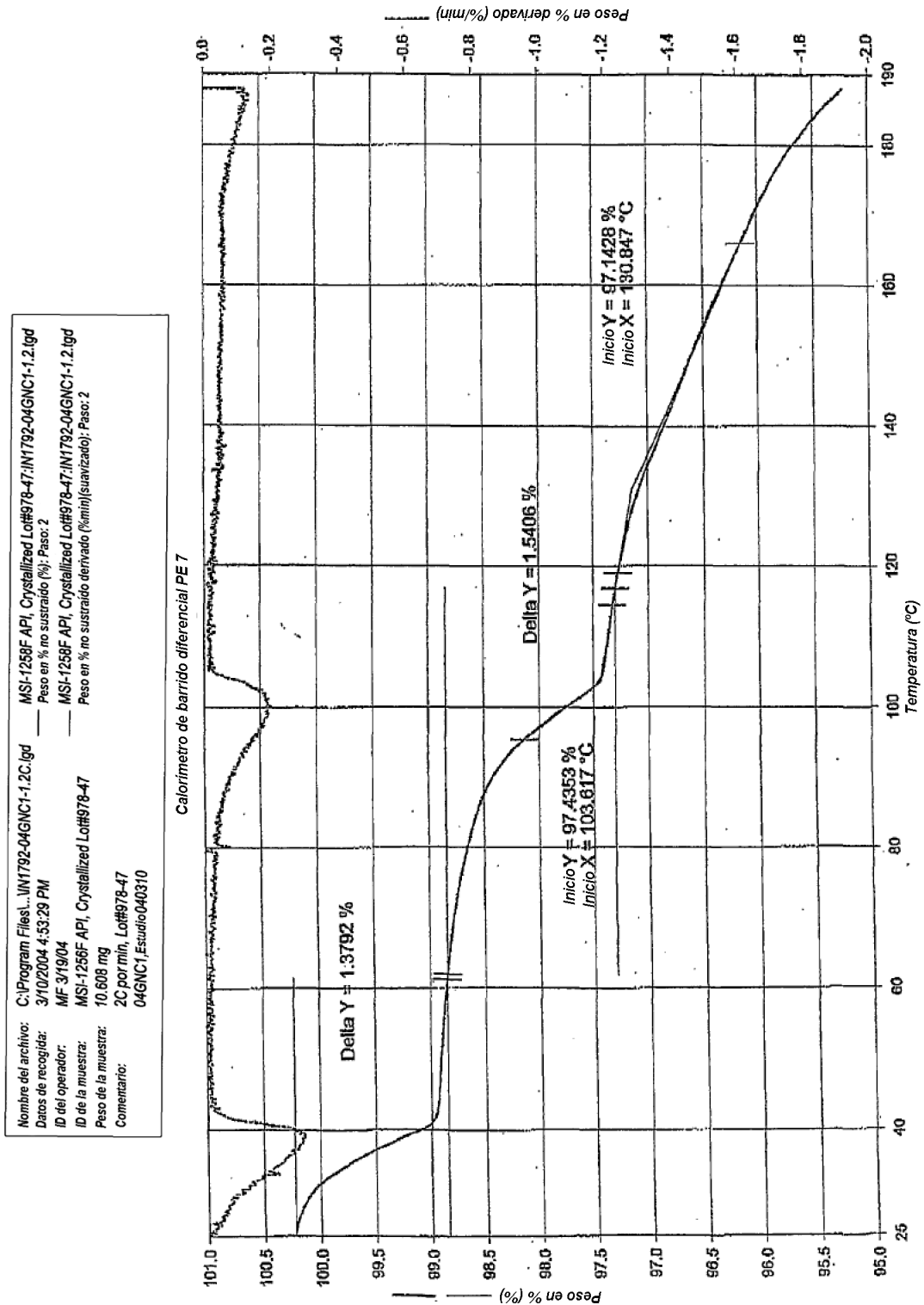


Figura 8

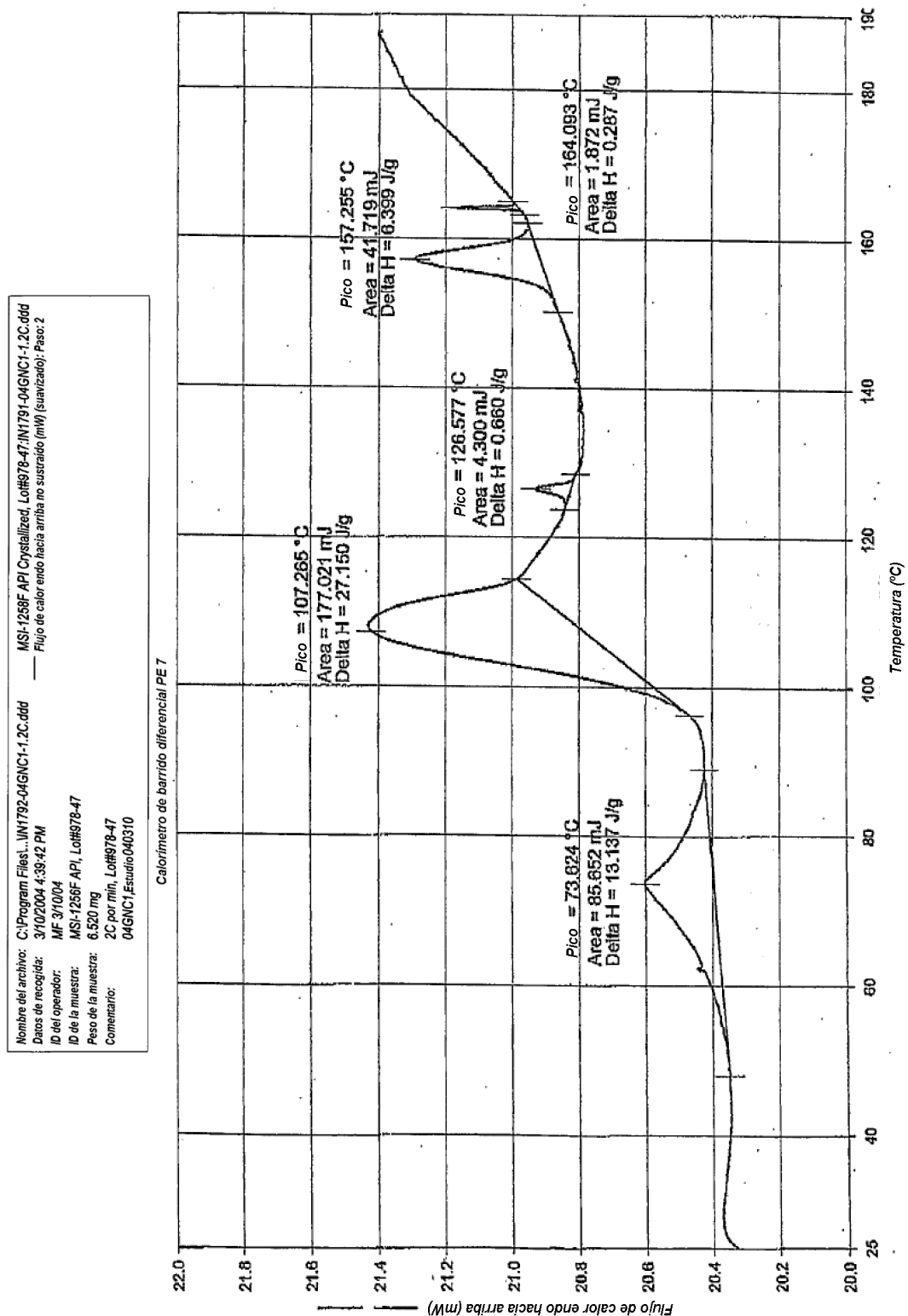


Figura 9

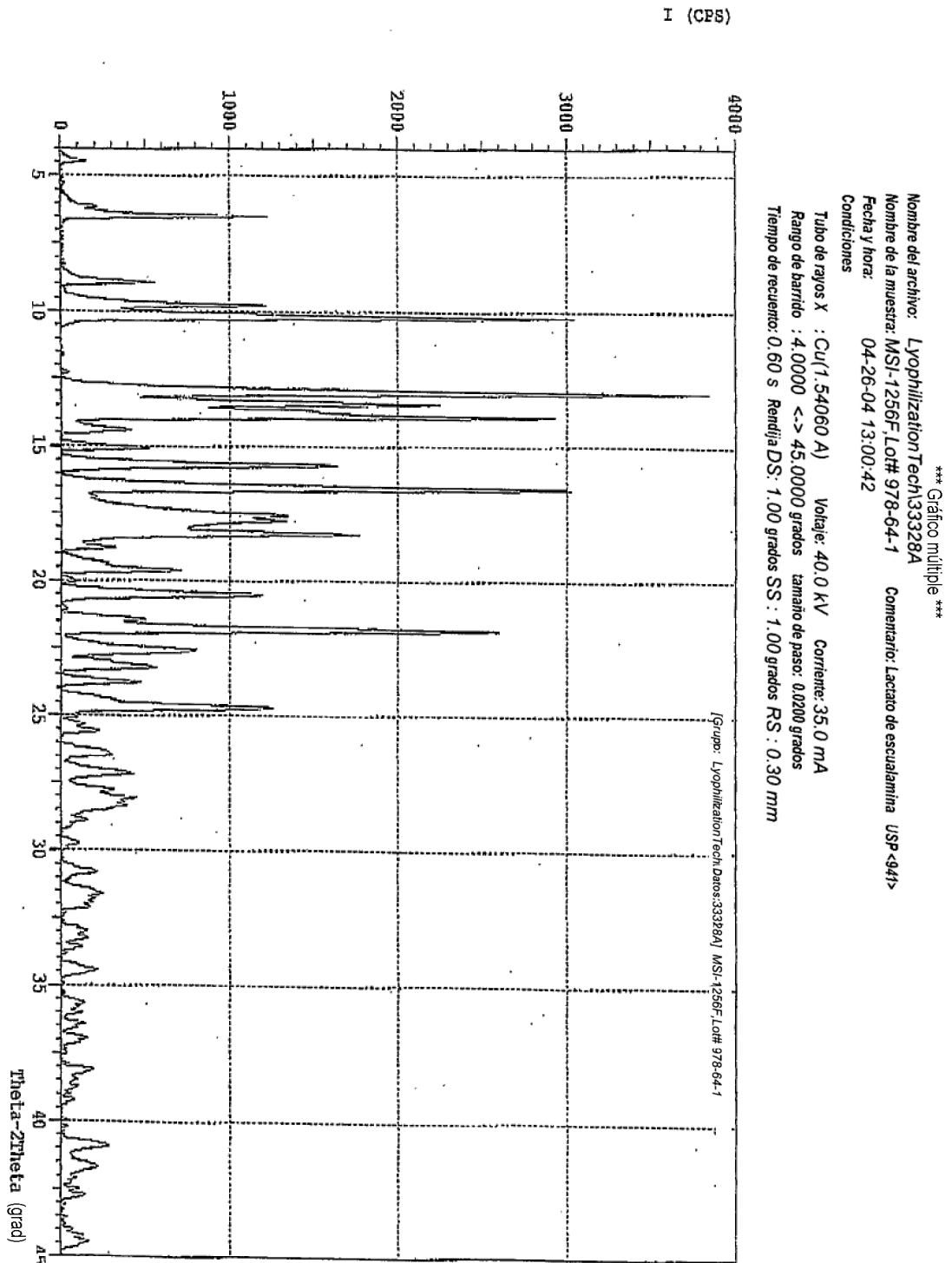


Figura 10

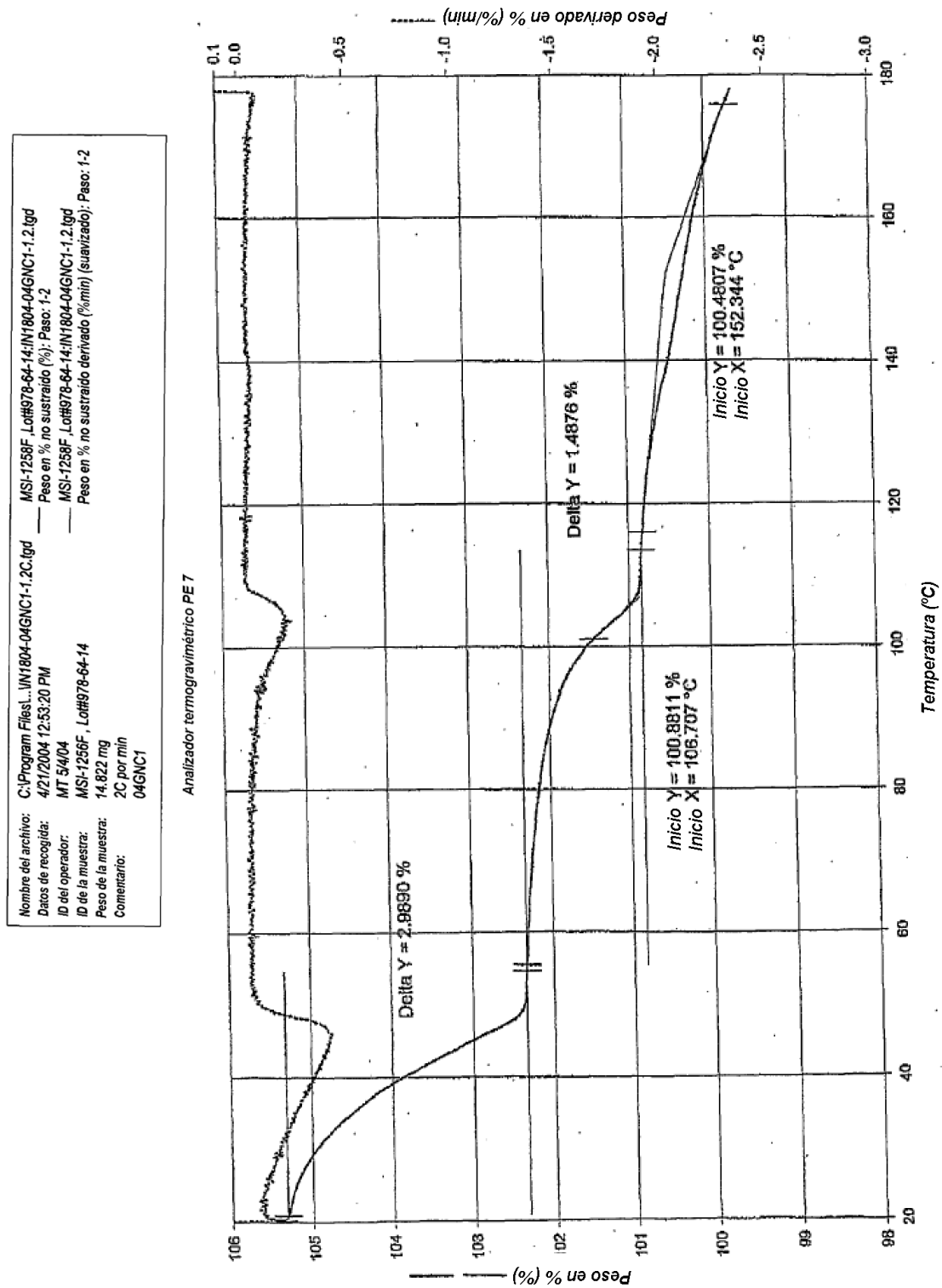


Figura 11

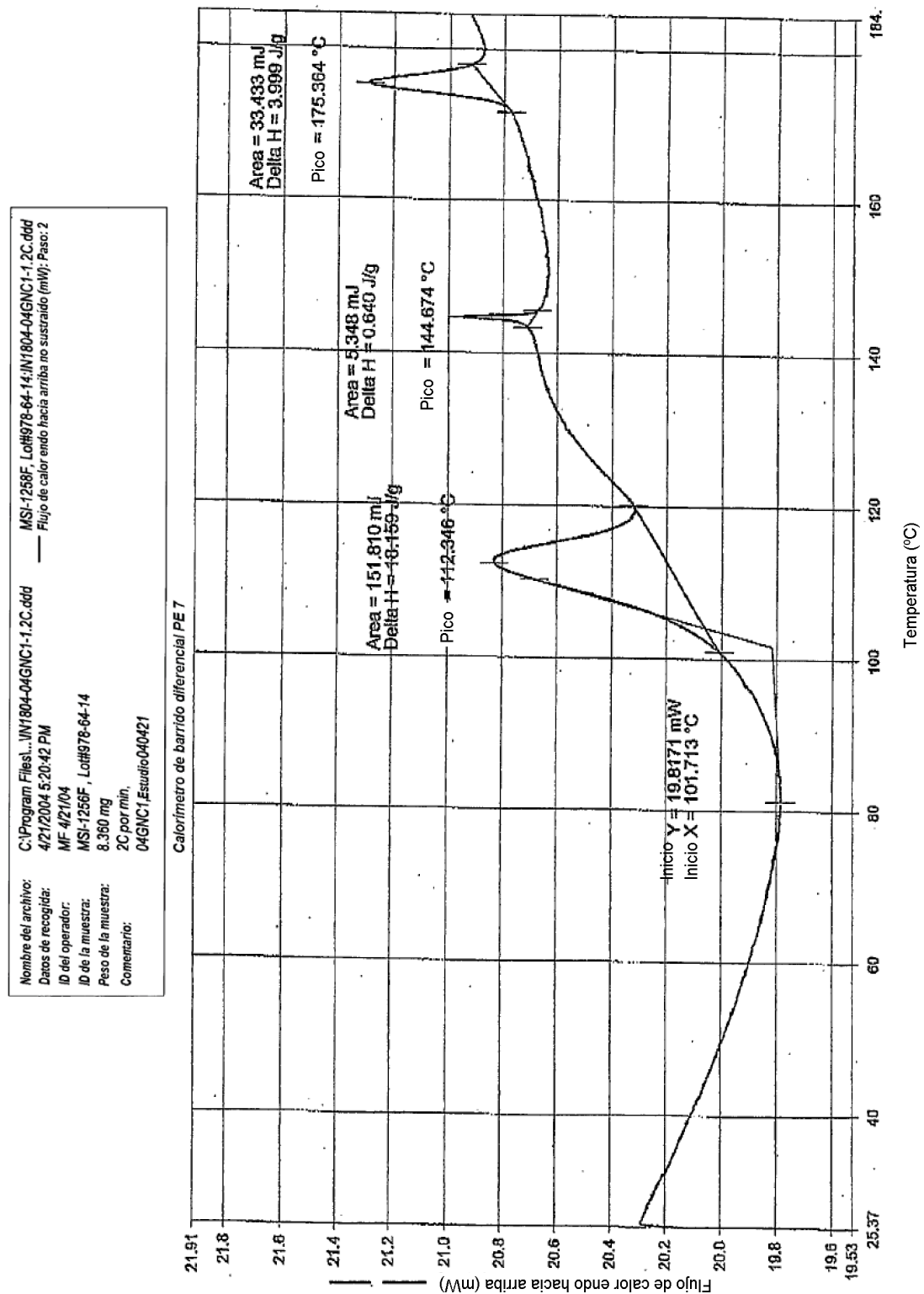


Figura 12

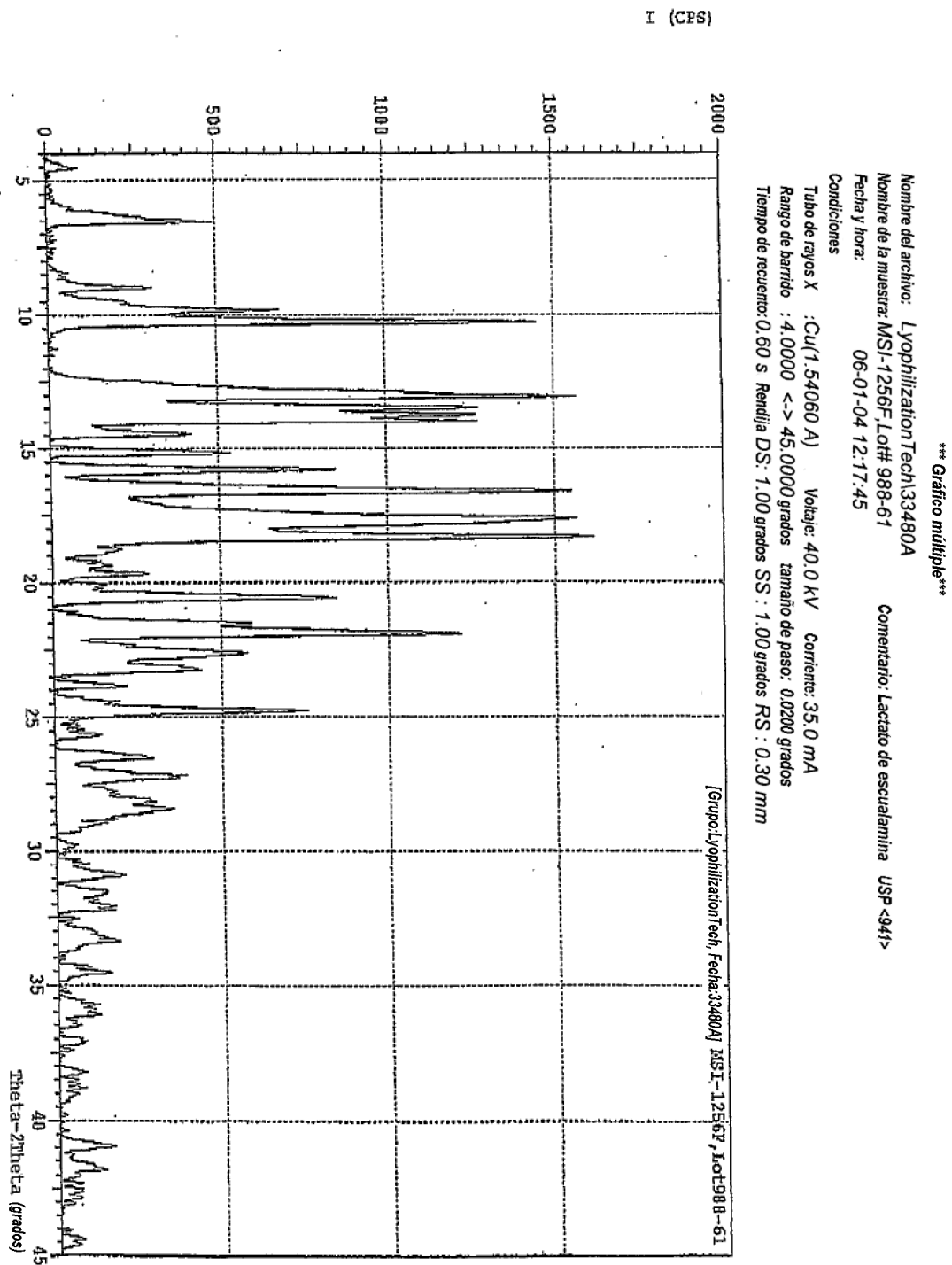


Figura 13

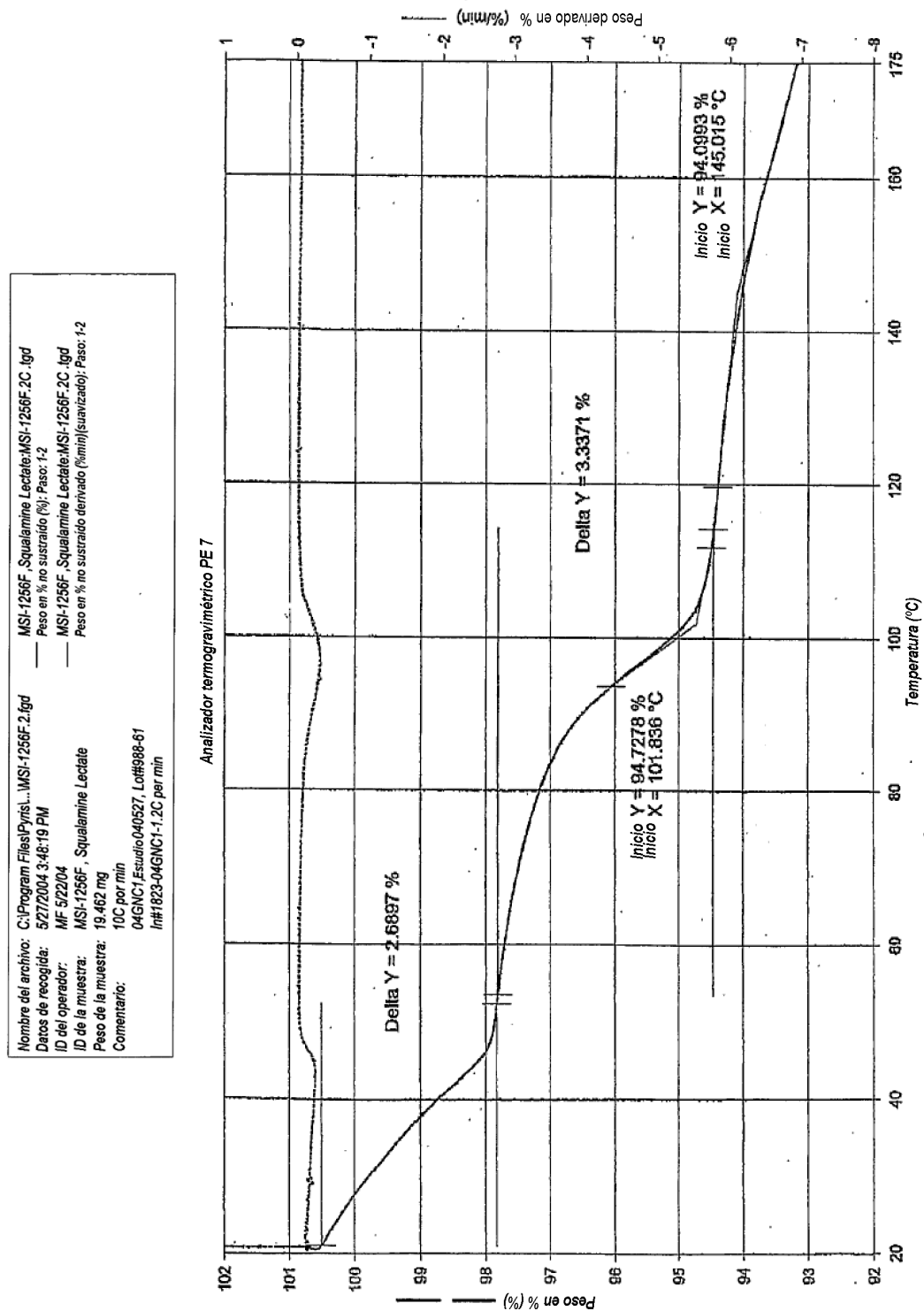


Figura 14

Nombre del archivo:	C:\Program Files\p\msl\...MSI-1256F.2C.ddd	MSI-1256F Lactato de escualamina:MSI-1256F.2C .ddd
Datos de recogida:	5/28/2004 11:08:59 AM	Flujo de calor endo hacia arriba (mW) (suavizado): Paso: 2
ID del operador:	MF 5/28/04	
ID de la muestra:	MSI-1256F, Lactato de escualamina	
Peso de la muestra:	13.880 mg	
Comentario:	10C por min	
	2C por min	
	04GNC1, Estudio 040527	
	Lot#988-61, In#1823-04GNC1-1	

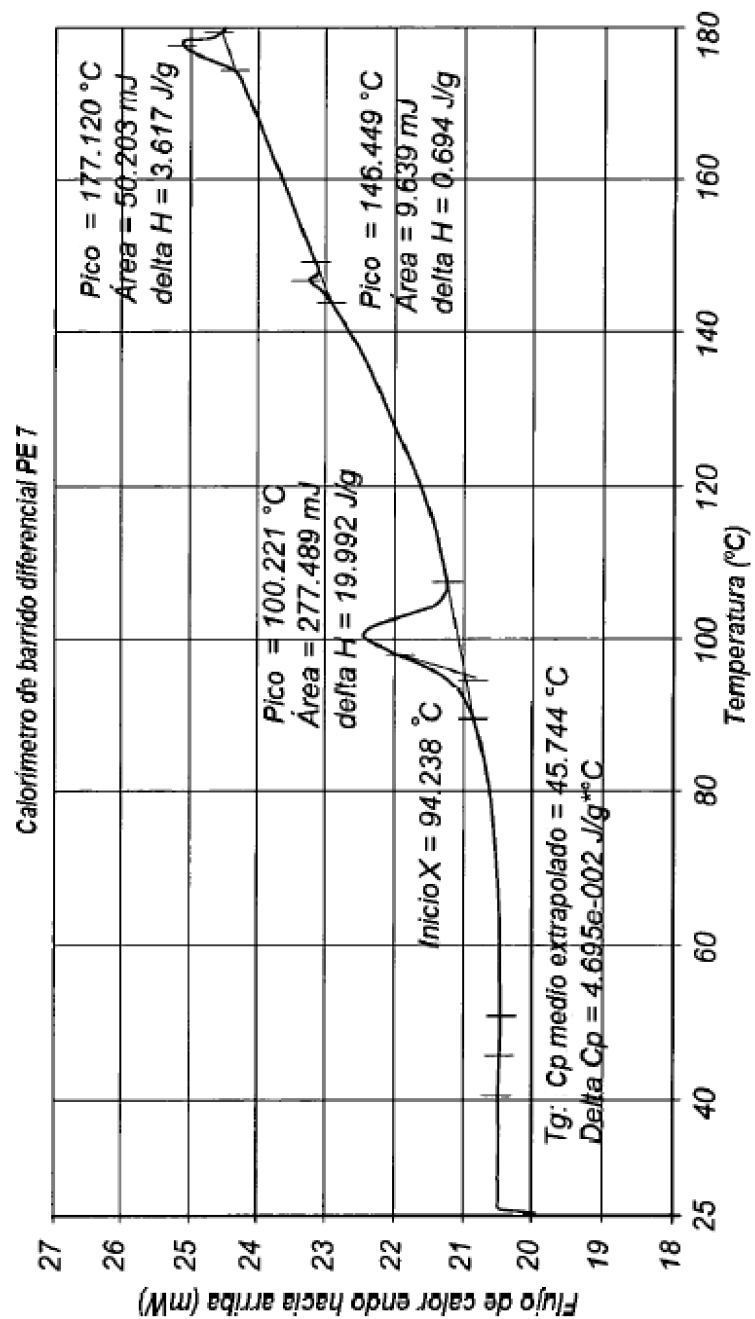


Figura 15

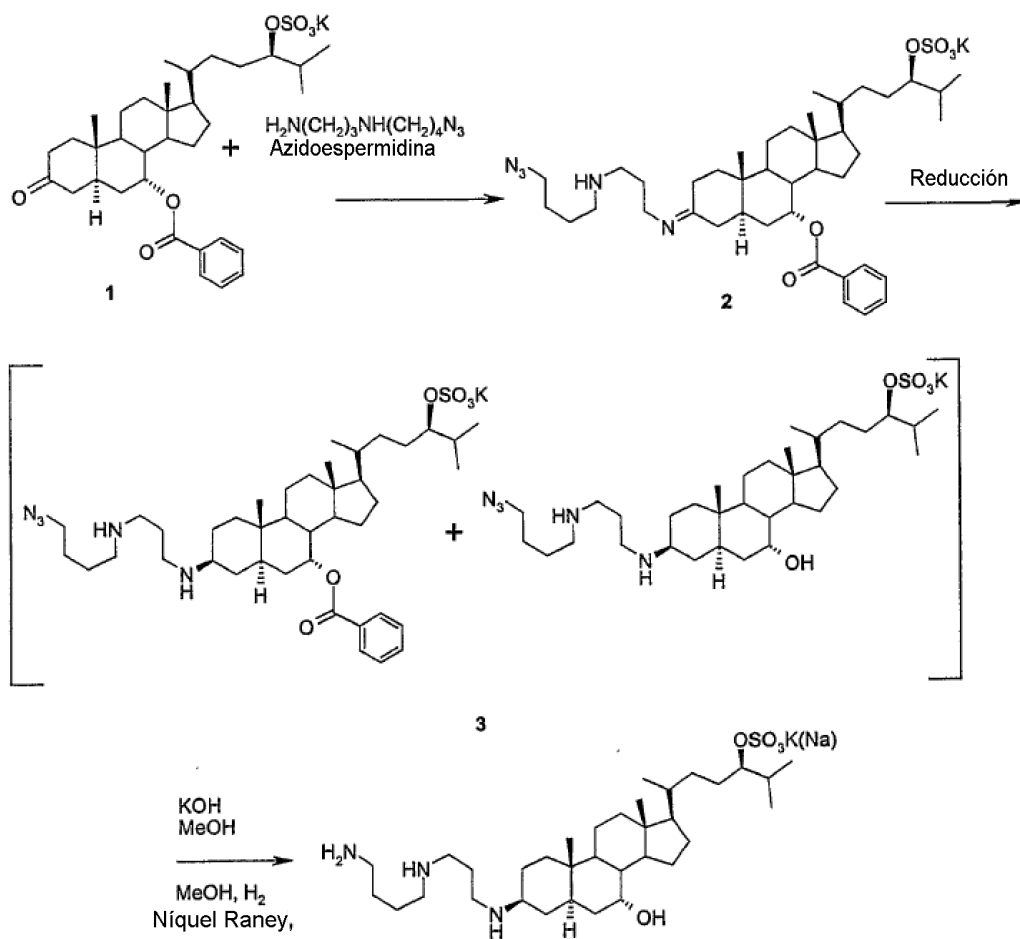


Figura 16

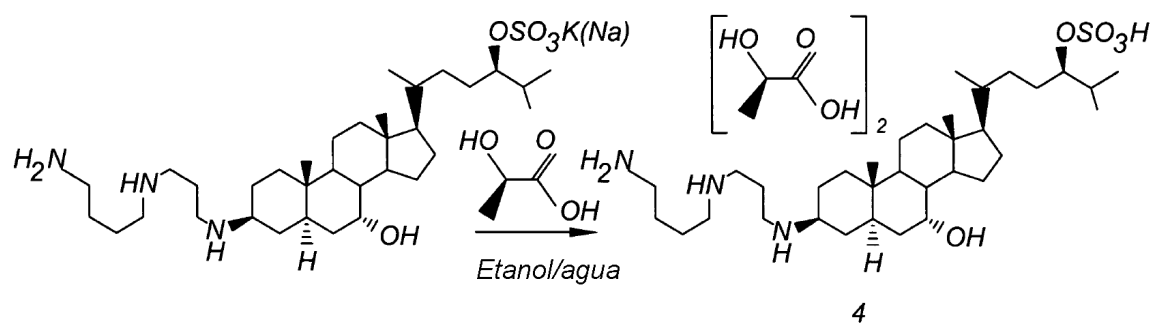


Figura 17

