

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 228**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00	(2006.01) A61P 9/10	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01) A61K 9/19	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01) A61K 38/16	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01) C07K 14/005	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)	
A61P 9/00	(2006.01)	
A61K 47/26	(2006.01)	
A61K 47/18	(2007.01)	
A61K 47/12	(2006.01)	
C07K 14/16	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2015 E 20152821 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024 EP 3757134**

54 Título: **Sal de cloruro de Tat-NR2B9c**

30 Prioridad:

28.05.2014 US 201462004142 P

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

26.06.2024

73 Titular/es:

**NONO INC. (100.0%)
479A Wellington St. W
Toronto, ON M5V 1E7, CA**

72 Inventor/es:

GARMAN, JONATHAN DAVID

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 974 228 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

Sal de cloruro de Tat-NR2B9c

5 Referencia al listado de secuencias

Se hace referencia a un listado de secuencias designado 446849SEQLIST.txt de 16,618 bytes creado el 28 de mayo de 2014.

10 Antecedentes

Tat-NR2B9c (también conocido como NA-1) es un agente que inhibe la PSD-95, disrumpiendo así la unión a los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR) y las sintasas de óxido nítrico neuronal (nNOS) y reduciendo la excitotoxicidad inducida por isquemia cerebral. El tratamiento reduce el tamaño del infarto y los déficits funcionales. TAT-NR2B9c ha se ha experimentado en un exitoso ensayo de fase II (véase WO 2010144721 y Aarts y otros, Science 298, 846-850 (2002), Hill y otros, Lancet Neurol., 11: 942 – 950 (2012)).

Debido a que TAT-NR2B9c carece de efectos secundarios graves, puede administrarse cuando se sospecha un accidente cerebrovascular u otras afecciones isquémicas o afecciones hemorrágicas sin que se haya hecho un diagnóstico según criterios reconocidos en la técnica para confirmar que no hay hemorragia presente. Por ejemplo, TAT-NR2B9c puede administrarse en el lugar donde ha ocurrido el accidente cerebrovascular o el neurotrauma (por ejemplo, en el domicilio los pacientes) o en una ambulancia que transporta a un sujeto a un hospital.

TAT-NR2B9c se ha descrito anteriormente como una composición líquida de solución salina normal o solución salina tamponada con fosfato o una composición liofilizada de solución salina normal (WO2010144721). El documento WO-A-2012/156308 describe los inhibidores del complejo de proteína ternaria de nNOS, PSD-95 y el receptor de NMDA y las composiciones farmacéuticas que comprenden los inhibidores para la profilaxis y/o el tratamiento de la enfermedad relacionada con la excitotoxicidad y afecciones de dolor crónicas en un sujeto. Los inhibidores descritos se comparan con TAT-NR2B9c.

30 Resumen de la invención reivindicada

La invención se define mediante las reivindicaciones.

35 La invención proporciona una sal de cloruro de un péptido que es TAT-NR2B9c (SEQ ID NO:6) o difiere de TAT-NR2B9c en hasta 5 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos, en donde más del 95 % de los aniones en la sal son cloruro. La sal de cloruro puede prepararse mediante el intercambio de trifluoroacetato por cloruro en una sal de trifluoroacetato de TAT-NR2B9c. La sal de cloruro también puede prepararse mediante el intercambio de trifluoroacetato por acetato y después acetato por cloruro a partir de una sal de trifluoroacetato de TAT-NR2B9c. Opcionalmente, más del 99% de los aniones en la sal son cloruro.

45 La invención proporciona, además, una formulación preliofilizada que comprende una sal de cloruro como se describió anteriormente, un tampón y un azúcar. Opcionalmente, la sal de cloruro es una sal de cloruro de TAT-NR2B9c. Opcionalmente el tampón es histidina y el azúcar es trehalosa y el pH es 6-7. Opcionalmente, el acetato y el trifluoroacetato comprenden cada uno menos de 1 % de aniones en peso en la formulación. Opcionalmente, acetato y trifluoroacetato comprende cada uno menos de 0,1 % en peso de aniones en la formulación. Opcionalmente la sal de cloruro del péptido está en una concentración de 70-120 mg/ml, la histidina está en una concentración de 15-100 mM, y la trehalosa está en una concentración de 80-160 mM. Opcionalmente, la sal de cloruro del péptido está en una concentración de 70-120 mg/ml, la histidina está en una concentración de 20-100 mM, y la trehalosa está en una concentración de 100-140 mM. Opcionalmente, el Tat-NR2B9c está en una concentración de 70-120 mg/ml, la concentración de histidina 20-50 mM, y la concentración de trehalosa es de 100-140 mM. Opcionalmente, la concentración de histidina es 20 mM y la concentración de trehalosa es 100-200 mM, preferiblemente 120 mM y la concentración de TAT-NR2B9c es 90 mg/ml.

55 La invención proporciona además una formulación liofilizada preparada liofilizando cualquiera de las formulaciones preliofilizadas descritas anteriormente. Opcionalmente, el acetato y el trifluoroacetato comprende cada uno menos de 1 % de aniones en peso en la formulación. Opcionalmente, el acetato y el trifluoroacetato comprende cada uno menos de 0,1 % en peso de aniones en la formulación.

60 La invención proporciona además una formulación reconstituida preparada combinando cualquiera de las formulaciones liofilizadas descritas anteriormente con una disolución acuosa. Opcionalmente, la disolución acuosa es agua o disolución salina normal. Opcionalmente, el volumen de la formulación reconstituida es de 3 a 6 veces el volumen de la formulación preliofilizada.

65 La invención proporciona además una formulación reconstituida que comprende TAT-NR2B9c u otro agente activo de la invención a una concentración de 15-25 mg/ml, un tampón y un azúcar. Opcionalmente el tampón es histidina

a una concentración de 4-20 mM y el azúcar es trehalosa a una concentración de 20-30 mM y el pH es 6-7. Opcionalmente, en la formulación reconstituida el acetato y el trifluoroacetato comprende cada uno menos de 1 % de aniones en peso en la formulación. Opcionalmente, el acetato y el trifluoroacetato comprenden cada uno menos de 0,1 % en peso de aniones en la formulación.

5 La invención proporciona además un método para preparar una formulación, que comprende almacenar una muestra de una formulación liofilizada como se describe anteriormente durante al menos una semana a una temperatura de al menos 20 °C; y reconstituir la formulación liofilizada. Opcionalmente la formulación liofilizada se reconstituye en agua o solución salina. Opcionalmente, el método también incluye administrar la formulación reconstituida, opcionalmente después de una dilución adicional en disolución salina normal, a un paciente. Opcionalmente, la formulación es almacenada durante al menos un año. Opcionalmente, el almacenamiento es a temperatura ambiente. Opcionalmente, el almacenamiento incluye periodos en los que la temperatura excede los 37 °C. En algunos métodos, el paciente tiene un accidente cerebrovascular o lesión traumática en el SNC. En algunos métodos, la muestra liofilizada se almacena en una ambulancia. En algunos métodos, el paciente tiene una hemorragia subaracnoidea. En algunos métodos, el paciente está siendo sometido a reparación endovascular por un aneurisma.

Breves descripciones de las figuras

20 Figura 1: gráfico muestra el área de infarto del cerebro de rata de accidente cerebrovascular 3PVO después del tratamiento con diferentes formulaciones de TAT-NR2B9c.

Figuras 2A, B: A) gráfico de barras que demuestra la estabilidad de diferentes formulaciones de TAT-NR2B9c a -20 °C y 40 °C. El eje Y representa la pureza del TAT-NR2B9c después de 1 semana a la temperatura de almacenamiento, medida por % de área total usando RP-HPLC. B) los mismos datos de A, pero ordenados por tampón y pH.

Figura 3: gráfico de barras que demuestra la estabilidad (por HPLC) de 20 mg/ml de TAT-NR2B9c en tampón de histidina, pH 6,5, en presencia de diferentes agentes de carga y sal a -20 °C y 40 °C.

Figuras 4A, B: gráficos de calorimetría de barrido diferencial de 20 mg/ml de TAT-NR2B9c en tampón de histidina pH 6,5 en presencia de manitol (A) o manitol y NaCl (B).

Figuras 5A, B: gráficos de calorimetría de barrido diferencial de 20 mg/ml de TAT-NR2B9c en tampón de histidina pH 6,5 en presencia de trehalosa (A) o trehalosa y NaCl (B).

Figuras 6A, B: gráfico de calorimetría de barrido diferencial de 20 mg/ml de TAT-NR2B9c en tampón de histidina pH 6,5 en presencia de Dextrano-40 (A) o Dextrano-40 y NaCl (B).

Figuras 7A, B: A) apariencia de la torta después de la liofilización de 3 ml de 90 mg/ml de TAT-NR2B9c en histidina 100 mM, pH 6,5 con trehalosa 120 mM. B) apariencia de la torta de las formulaciones de TAT-NR2B9c alternativas con diferentes cantidades de histidina y trehalosa.

Definiciones

Además de los ingredientes activos, las formulaciones liofilizadas pueden incluir una o más de las siguientes clases de componentes. Las clases no son mutuamente excluyentes; en otras palabras, el mismo agente puede formar parte de múltiples clases.

50 Un "agente de carga" proporciona estructura a un péptido liofilizado. Los agentes de carga incluyen manitol, trehalosa, dextrano-40, glicina, lactosa, sorbitol y sacarosa, entre otros. Además de proporcionar una torta farmacéuticamente elegante, los agentes de carga también pueden impartir cualidades útiles con respecto a la modificación de la temperatura de colapso, proporcionando protección contra la congelación, temperatura de transición vítrea y mejorando la estabilidad de la proteína durante el almacenamiento a largo plazo. Estos agentes también pueden servir como modificadores de la tonicidad.

Un tampón es un agente que mantiene el pH de la disolución en un rango aceptable antes de la liofilización. Un tampón preferido es la histidina. Otros tampones incluyen succinato (sodio o potasio), histidina, citrato (sodio), gluconato, acetato, fosfato, Tris y similares. Los tampones preferidos son efectivos en un rango de pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7 o de aproximadamente 6 a aproximadamente 7,7; preferiblemente un pH de aproximadamente 6,5. Los ejemplos de tampones que controlan el pH en este rango incluyen succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros tampones de ácido orgánico.

Un "crioprotector" proporciona estabilidad a un péptido frente a las tensiones inducidas por la congelación, presumiblemente al ser excluido preferentemente de la superficie de la proteína. También puede ofrecer protección durante el secado primario y secundario, y el almacenamiento de productos a largo plazo. Los ejemplos son

polímeros tales como dextrano y polietilenglicol; azúcares (incluidos alcoholes de azúcar) tales como sacarosa, glucosa, trehalosa y lactosa; y tensioactivos tales como polisorbatos; y aminoácidos tales como glicina, arginina y serina.

5 Un lioprotector proporciona estabilidad al péptido durante el proceso de secado o "deshidratación" (ciclos de secado primario y secundario), presumiblemente al proporcionar una matriz vítrea amorfa y al unirse a la proteína mediante enlaces de hidrógeno, reemplazando a las moléculas de agua que se eliminan durante el proceso de secado. Esto ayuda a mantener la conformación del péptido, minimiza la degradación del péptido durante el ciclo de liofilización y mejora la estabilidad del producto a largo plazo. Los ejemplos incluyen polioles o azúcares tales como sacarosa y trehalosa.

10 En la medida en la que no se ha mencionado, otros estabilizadores o inhibidores de degradaciones pueden incluir inhibidores de la desamidación, tensioactivos, algunos comunes son ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitán (por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80), poloxámero 188 y detergentes.

15 Los términos "liofilización", "liofilizado" y "secado por congelación" se refieren a un proceso mediante el cual el material que se va a secar se congela en primer lugar y entonces el hielo o el disolvente congelado se eliminan por sublimación en un ambiente de vacío.

20 Una "formulación farmacéutica" o composición es una preparación que permite que un agente activo sea efectivo y carece de componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a los que se administraría la formulación.

El "tiempo de reconstitución" es el tiempo requerido para rehidratar una formulación liofilizada con una disolución a disolución que carece de partículas a simple vista.

25 Una formulación peptídica liofilizada "estable" es aquella sin cambios significativos observados a 20 °C durante al menos una semana, mes, o más preferiblemente al menos tres meses, al menos seis meses o un año. Los cambios se consideran insignificantes si no más del 10 %, preferiblemente el 5 %, del péptido se degrada según lo medido por SEC-HPLC. La disolución rehidratada es incolora o clara a ligeramente opalescente, mediante análisis visual. La concentración, el pH y la osmolalidad de la formulación no tienen cambio mayor del +/- 10 % después del almacenamiento. La potencia está dentro del 70-130 %, preferiblemente 80-120 % o a veces 80-100 % de una muestra control recién preparada. No se observa más del 10 %, preferiblemente del 5 % de recorte. No se forma más del 10 %, preferiblemente del 5 % de agregación. La estabilidad puede medirse mediante varios métodos revisados en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993).

30 El término "isotónico" significa que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de aproximadamente 270-328 mOsm. La presión ligeramente hipotónica es de 250-269 y la presión ligeramente hipertónica es de 328-350 mOsm. La presión osmótica se puede medir, por ejemplo, usando un osmómetro de tipo de presión de vapor o de punto de congelación.

40 Modificadores de la tonicidad: se pueden usar sales (NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂) como modificadores de la tonicidad para controlar la presión osmótica. Además, los crioprotectores/lioprotectores y/o agentes de carga tales como sacarosa, manitol o glicina pueden servir como modificadores de la tonicidad.

45 Los valores numéricos, tales como las concentraciones o los pH, se proporcionan dentro de una tolerancia que refleja la exactitud con la que se puede medir el valor. A menos que el contexto requiera otra cosa, los valores fraccionarios se redondean al número entero más cercano. A menos que el contexto requiera otra cosa, la recitación de un rango de valores significa que se puede usar cualquier número entero o subrango dentro del rango.

50 Los términos "enfermedad" y "afección" se usan como sinónimos para indicar cualquier alteración o interrupción de la estructura o función normal en un sujeto.

55 Descripción detallada

I. General

60 Los péptidos sintetizados mediante métodos en estado sólido se producen típicamente como sales de trifluoroacetato porque el ácido trifluoroacético (TFA) se usa para la desprotección de péptidos y/o la eliminación de péptidos de la resina. Para el uso farmacéutico, el trifluoroacetato se reemplaza generalmente con acetato como un contraión porque el acetato no es tóxico y el reemplazo de trifluoroacetato por acetato es sencillo. Tal ha sido el caso del péptido TAT-NR2B9c sintetizado hasta la fecha como se describe en el documento WO2010144721 o el documento WO-A-2014/085349 y en cualquier otro.

Frecuentemente, el acetato es un contraión preferido para péptidos farmacéuticos porque el trifluoroacetato puede intercambiarse por acetato con un cambio menor en el proceso de purificación típico de un péptido que resulta de la síntesis en fase sólida en la que el lavado final se realiza con ácido acético en lugar de ácido trifluoroacético seguido de la elución con acetonitrilo. Ocasionalmente en su lugar se usan otras contraiones. Por ejemplo, el cloruro a veces se usa para péptidos poco solubles porque este mejora su solubilidad. Sin embargo, la conversión de acetato de trifluoruro o acetato a cloruro da como resultado la pérdida de algún péptido. Además, se ha informado que la presencia de HCl que resulta del intercambio de cloruro modifica la estructura y reduce la estabilidad térmica de algunos péptidos (Biochemistry, 5ta edición, Berg y otros eds, Freeman; 2002); J Pept Sci. enero de 2007;13(1):37-43). TAT-NR2B9c es ya un péptido altamente soluble como una sal de acetato. En consecuencia, podría aparecer que el reemplazo de la sal de trifluoroacetato o acetato con cloruro tenga la desventaja de rendimiento disminuido y posible estabilidad reducida sin ningún beneficio de compensación.

Sorprendentemente se ha encontrado que una sal de cloruro de TAT-NR2B9c confiere significativamente mayor estabilidad en la forma liofilizada que una sal de acetato de TAT-NR2B9c en la misma formulación, o una sal de acetato de TAT-NR2B9c liofilizado a partir de solución salina. La sal de cloruro puede permanecer lo suficientemente estable para el uso clínico incluso con almacenamiento a temperaturas ambientes de verano que alcanzan e incluso exceden los 37 °C durante varios años. La mayor estabilidad de la sal de cloruro sobre la de acetato compensa con creces cualquier esfuerzo mayor o rendimiento reducido requerido en el reemplazo de trifluoroacetato como una sal. La presente invención proporciona formulaciones liofilizadas de agentes activos, particularmente de TAT-NR2B9c, como una sal de cloruro. Dichas formulaciones son estables a temperatura ambiente (por ejemplo, al menos 20 °C) lo que facilita el mantenimiento de suministros de dicha formulación en ambulancias o similares o con personal de emergencia para la administración en la escena de la enfermedad o el accidente o entre dicha escena y una instalación médica.

Las formulaciones liofilizadas se preparan a partir de una formulación preliofilizada que comprende un agente activo, un tampón, un agente de carga y agua. Otros componentes, tales como crioprotectores o lioconservantes, un agente de tonicidad, vehículos farmacéuticamente aceptables y similares pueden estar o no presentes. Un agente activo preferido es una sal de cloruro de TAT-NR2B9c. Un tampón preferido es la histidina. Un agente de carga preferido es la trehalosa. La trehalosa también sirve como crioprotector y lioconservante. Una formulación preliofilizada ejemplar comprende el agente activo (por ejemplo, sal de cloruro de TAT-NR2B9c), histidina (10-100 mM, 15-100 mM, 15-80 mM, 40-60 mM o 15-60 mM, por ejemplo, 20 mM u opcionalmente 50 mM, o 20-50 mM)) y trehalosa (50-200 mM, preferiblemente 80-160 mM, 100-140 mM, más preferiblemente 120 mM). El pH es de 5,5 a 7,5, más preferiblemente, 6-7, más preferiblemente de 6,5. La concentración de agente activo (por ejemplo, sal de cloruro de TAT-NR2B9c) es 20-200 mg/ml, preferiblemente 50-150 mg/ml, más preferiblemente 70-120 mg/ml o 90 mg/ml. Por lo tanto, una formulación preliofilizada ejemplar es histidina 20 mM, trehalosa 120 mM y 90 mg/ml de sal de cloruro de TAT-NR2B9c. Opcionalmente puede incluirse un depurador de acetilación, tal como lisina, como se describe en la solicitud copendiente 057769-446850, para reducir adicionalmente cualquier acetato o trifluoroacetato adicional en la formulación.

Después de la liofilización, las formulaciones liofilizadas tienen un bajo contenido de agua, preferiblemente de aproximadamente 0 % a 5 % de agua, más preferiblemente por debajo de 2,5 % de agua en peso. Las formulaciones liofilizadas se pueden almacenar en un congelador (por ejemplo, -20 o -70 °C), en un refrigerador (0-4 °C) o a temperatura ambiente (20-25 °C).

Los agentes activos se reconstituyen en una disolución acuosa, preferiblemente agua para inyección u opcionalmente disolución salina normal (disolución salina al 0,8-1,0 % y preferiblemente disolución salina al 0,9 %). La reconstitución puede tener el mismo volumen o un volumen mayor o menor que el de la formulación preliofilizada. Preferiblemente, el volumen es mayor después de la reconstitución que antes (por ejemplo, 3-6 veces mayor). Por ejemplo, un volumen de preliofilización de 3-5 ml se puede reconstituir como un volumen de 10 ml, 12 ml, 13,5 ml, 15 ml o 20 ml o 10-20 ml entre otros. Después de la reconstitución, la concentración de histidina es preferiblemente 2-20 mM, por ejemplo, 2-7 mM o 4,0-6,5 mM, 4,5 mM o 6 mM; la concentración de trehalosa es preferiblemente 15-45 mM o 20-40 mM o 25-27 mM o 35-37 mM. La concentración de lisina es preferiblemente 100-300 mM, por ejemplo, 150-250 mM, 150-170 mM o 210-220 mM. El agente activo está preferiblemente en una concentración de 10-30 mg/ml, por ejemplo, 15-30, 18-20, 20 mg/ml de agente activo (por ejemplo, TAT-NR2B9c) o 25-30, 26-28 o 27 mg/ml de agente activo. Una formulación ejemplar después de la reconstitución tiene histidina 4-5 mM, trehalosa 26-27 mM, lisina 150-170 mM y 20 mg/ml de TAT-NR2B9c (con concentraciones redondeadas al número entero más cercano). Una segunda formulación ejemplar después de la reconstitución tiene histidina 5-7 mM, trehalosa 35-37 mM, lisina 210-220 mM y 26-28 mg/ml de TAT-NR2B9c (con concentraciones redondeadas al número entero más cercano). La formulación reconstituida se puede diluir más antes de la administración, tal como añadiéndola a una bolsa de fluido que contiene disolución salina normal para infusión intravenosa.

Cualquier descripción de una formulación como que comprende o incluye (o terminología similar) componentes específicos podría entenderse como que describe alternativamente o adicionalmente una formulación que consiste en o que consiste esencialmente en los componentes especificados.

Los métodos de secado por congelación se exponen, por ejemplo, en Methods in Enzymology, vol. 22, páginas

33-39, Academic Press, Nueva York (1971); y en Freeze-Drying, EW Flosdorf, Rheinhold, Nueva York (1949). TAT-NR2B9c se liofiliza preferiblemente en el mismo vial en el que se reconstituirá para su uso. Una disolución acuosa de TAT-NR2B9c se añade al vial, opcionalmente después de filtrar a través de un sistema de filtración de esterilización, tal como un filtro de 0,22 micrómetros que se usa de manera estándar para los péptidos. Las formulaciones se pueden liofilizar en un ciclo controlado, tal como se describe en los Ejemplos. Una formulación preliofilizada puede ponerse en un vial y liofilizarse a temperatura y presión reducidas. Después de la liofilización, los viales se pueden sellar. Para su uso, el liofilizado se reconstituye con agua para inyección, disolución salina normal u otro vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5

10

Para la liofilización, son adecuados varios contenedores. Un contenedor debe poder soportar la presión exterior cuando el contenedor se sella y se almacena bajo vacío parcial. El contenedor debe estar hecho de un material que permita una transferencia razonable de calor del exterior al interior. El tamaño del contenedor debe ser tal que la disolución que se va a liofilizar no ocupe más del 20 % del volumen útil o se pueda sobrellenar con un exceso, según las recomendaciones de USP vigentes en ese momento para el volumen en un contenedor. Por ejemplo, una disolución de 0,5 ml se puede utilizar para llenar en un vial de 3 ml. Los viales pueden estar hechos de vidrio, por ejemplo, borosilicato o plástico, por ejemplo, polipropileno.

15

20

Se pueden usar botellas de vidrio usadas comúnmente para liofilizar materiales biológicos. Otro contenedor adecuado es una jeringa de dos compartimentos en donde un compartimiento contiene la torta de péptido TAT-NR2B9c liofilizada y el otro compartimiento contiene el diluyente acuoso. Una vez que se completa la liofilización, el vacío dentro de los viales o ampollas se puede liberar al llenar el sistema con un gas inerte, se tapan en su lugar usando un equipo estándar y luego se sella por engastado. Dicho método asegurará un producto final estéril. También se pueden usar otras soluciones de dos partes, tales como una bolsa con un sello rompible entre el compartimiento del fármaco liofilizado y el diluyente.

25

II. Agentes activos

30

Aunque mucho de la descripción se refiere al agente activo TAT-NR2B9c para fines de ejemplificación, otros agentes activos descritos más adelante pueden prepararse como sales de cloruro o formularse de acuerdo con los principios descritos para TAT-NR2B9c. Las concentraciones específicas dadas para TAT-NR2B9c pueden usarse como para otros agentes o convertirse a concentraciones equimolares dadas del otro agente y TAT-NR2B9c.

35

Los agentes activos inhiben la interacción entre PSD-95 y uno o más NMDAR (por ejemplo, 2A, 2B, 2C o 2D) o nNOS (por ejemplo, Swiss-Prot P29475) mediante unión a PSD-95. Dichos agentes son útiles para reducir uno o más efectos dañinos del accidente cerebrovascular y otras afecciones neurológicas mediadas, al menos en parte, por la excitotoxicidad de NMDAR. Dichos agentes incluyen péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que incluye o se basa en el resto PL de un receptor de NMDA o dominio PDZ de PSD-95. Dichos péptidos también pueden inhibir las interacciones entre PSD-95 y nNOS y otros receptores de glutamato (por ejemplo, receptores de kainito o receptores de AMPA), tales como KV1-4 y GluR6. Los péptidos preferidos inhiben la interacción entre los dominios PDZ 1 y 2 de la proteína de la densidad postsináptica 95 (PSD-95) (secuencia de aminoácidos humana proporcionada por Stathakism, Genomics 44 (1): 71-82 (1997)) y la secuencia C terminal PL de una o más subunidades del receptor de NMDA 2, incluida la subunidad NR2B del receptor neuronal de N-metil-D-aspartato (Mandich y otros, Genomics 22, 216-8 (1994)). NMDAR2B tiene GenBank ID 4099612, un resto C terminal de 20 aminoácidos FNGSSNGHVYEKLSSIESDV (SEQ ID NO: 11) y un resto PL ESDV (SEQ ID NO: 12). Los péptidos preferidos inhiben las formas humanas de PSD-95 y los receptores NMDAR humanos. Sin embargo, la inhibición también se puede mostrar a partir de variantes de especies de las proteínas. A continuación, se muestra una lista de los receptores de NMDA y de glutamato que se pueden usar:

40

45

50 Receptores de NMDA Con Secuencias PL

Nombre	No. de GI o Acc	Secuencia C-terminal de 20mer	Secuencia C-terminal de 4mer	PL?	ID de PL interno
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLSDPVSTVV (SEQ ID NO: 13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLSDPVSTVV (SEQ ID NO: 13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-4	472845	HPTDITGPLNLSDPVSTVV (SEQ ID NO: 13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216

ES 2 974 228 T3

NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID NO: 13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID NO: 13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-2	11038634	RRAIEREEGQLQLCSRHRES (SEQ ID NO: 14)	HRES (SEQ ID NO: 28)		
NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRHRES (SEQ ID NO: 14)	HRES (SEQ ID NO: 28)		
NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISSESEV (SEQ ID NO: 15)	ESEV (SEQ ID NO: 29)	X	AA180
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV (SEQ ID NO: 11)	ESDV (SEQ ID NO: 12)	X	AA34.1
NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEYQRTSRTCES (SEQ ID NO: 16)	TCES (SEQ ID NO: 30)		
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV (SEQ ID NO: 11)	ESDV (SEQ ID NO: 12)	X	
NMDAR2A	558748	LNSCSNRRVYKMPESIEVD (SEQ ID NO: 17)	ESDV (SEQ ID NO: 12)	X	AA34.2
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGSASFSSSESEV (SEQ ID NO: 18)	ESEV (SEQ ID NO: 29)	X	
Receptor de glutamato delta 2	AF009014	QPTPTLGLNLGNDPDRGTSI (SEQ ID NO: 19)	GTSI (SEQ ID NO: 31)	X	
Receptor de glutamato 1	I28953	MQSIPCMSSHSGMPLGATGL (SEQ ID NO: 20)	ATGL (SEQ ID NO: 32)	X	
Receptor de glutamato 2	L20814	QNFATYKEGYNVYGIESVKI (SEQ ID NO: 21)	SVKI (SEQ ID NO: 33)	X	
Receptor de glutamato 3	AF167332	QNYATYREGYNVYGTESVKI (SEQ ID NO: 22)	SVKI (SEQ ID NO: 33)	X	
Receptor de glutamato 4	U16129	HTGTAIRQSSGLAVIASDLP (SEQ ID NO: 23)	SDLP (SEQ ID NO: 34)		
Receptor de glutamato 5	U16125	SFTSILTCHQRRTRQKETVA (SEQ ID NO: 24)	ETVA (SEQ ID NO: 35)	X	
Receptor de glutamato 6	U16126	EVINMHTFNDRRPLPGKETMA (SEQ ID NO: 25)	ETMA (SEQ ID NO: 36)	X	

Los péptidos pueden incluir o estar basados en un resto PL del extremo C de cualquiera de las subunidades anteriores y tener una secuencia de aminoácidos que comprende [S/T]-X-[V/L]. Esta secuencia aparece preferiblemente en el extremo C de los péptidos de la invención. Los péptidos preferidos tienen una secuencia de aminoácidos que comprende [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] (SEQ ID NO: 38) en su extremo C. Los péptidos ejemplares comprenden: ESDV (SEQ ID NO: 12), ESEV (SEQ ID NO: 29), ETDV (SEQ ID NO: 39), ETEV (SEQ ID NO: 40), DTDV (SEQ ID NO: 41) y DTEV (SEQ ID NO: 42) como los aminoácidos C-terminales. Dos péptidos particularmente preferidos son KLSSIESDV (SEQ ID NO: 5) y KLSSIEDV (SEQ ID NO: 43). Dichos péptidos

5

tienen habitualmente 3-25 aminoácidos (sin un péptido de internalización), se prefieren longitudes de péptido de 5-10 aminoácidos, y particularmente 9 aminoácidos (también sin un péptido de internalización). En algunos de dichos péptidos, todos los aminoácidos son del extremo C de un receptor de NMDA (sin incluir los aminoácidos de un péptido de internalización).

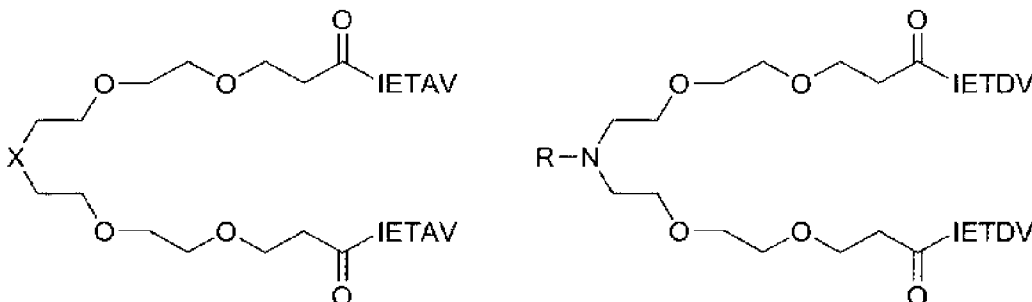
5 Los péptidos y peptidomiméticos de la invención pueden contener residuos de aminoácidos modificados, por ejemplo, residuos que están alquilados en N. Las modificaciones de alquilo N-terminal pueden incluir, por ejemplo, N-metilo, N-etilo, N-propilo, N-butilo, N-ciclohexilmetilo, N-ciclohexiletilo, N-bencilo, N-feniletilo, N-fenilpropilo, N-(3,4-diclorofenil)propilo, N-(3,4-difluoropenil)propilo y N-(naftalen-2-il)etilo).

10 Bach, J. Med. Chem. 51, 6450-6459 (2008) y WO 2010/004003 han descrito una serie de análogos de NR2B9c (SEQ ID NO: 6). La actividad de unión a PDZ es exhibida por péptidos que tienen solamente tres aminoácidos C-terminales (SDV). Bach también informa de análogos que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en X₁tSX₂V (SEQ ID NO: 68), en donde t y S son aminoácidos alternativos, X₁ se selecciona entre E, Q y A, o análogo de los mismos, X₂ se selecciona entre A, Q, D, N, N-Me-A, N-Me-Q, N-Me-D y N-Me-N o un análogo de los mismos. Opcionalmente, el péptido se alquila en N en la posición P3 (tercer aminoácido desde el extremo C, es decir, la posición ocupada por tS). El péptido puede estar alquilado en N con un ciclohexano o sustituyente aromático, y comprende además un grupo espaciador entre el sustituyente y el grupo amino terminal del péptido o análogo de péptido, en donde el espaciador es un grupo alquilo, preferiblemente seleccionado entre metileno, etileno, propileno y butileno. El sustituyente aromático puede ser un resto naftalen-2-ilo o un anillo aromático sustituido con uno o dos grupos halógeno y/o alquilo.

25 También se pueden incorporar otras modificaciones sin afectar adversamente la actividad y estas incluyen la sustitución de uno o más de los aminoácidos en la forma isomérica L natural con aminoácidos en la forma isomérica D. Por lo tanto, cualquier aminoácido que aparezca naturalmente en la configuración L (que también puede referirse como R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) puede reemplazarse con el aminoácido del mismo tipo estructural químico o un peptidomimético, pero de la quiralidad opuesta, generalmente referido como el D-aminoácido, pero que adicionalmente se puede referir como la forma R o S. Por lo tanto, un peptidomimético puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, al menos el 50 %, o todos los residuos de D-aminoácidos. Un peptidomimético que contiene algunos o todos los residuos D se refiere a veces como un péptido "inverso".

30 Los peptidomiméticos también incluyen retro péptidos. Un retro péptido tiene una secuencia de aminoácidos inversa. Los peptidomiméticos también incluyen péptidos retro inversos en los que se invierte el orden de los aminoácidos, de modo que el aminoácido C-terminal originalmente aparece en el extremo N y se usan los D-aminoácidos en lugar de los L-aminoácidos. El documento WO 2008/014917 describe un análogo retro inverso de Tat-NR2B9c que tiene la secuencia de aminoácidos vdseisslk-rrrqrkkrgyin (SEQ ID NO: 69) (indicando las letras minúsculas D aminoácidos), e informa que es un inhibidor efectivo de la isquemia cerebral. Otro péptido efectivo descrito en la presente memoria es Rv-Tat-NR2B9c (RRRQRKKRGYKLLSIESDV; SEQ ID NO: 70).

40 Se puede usar un enlazador, por ejemplo, un enlazador de polietilenglicol, para dimerizar el resto activo del péptido o del peptidomimético para aumentar su afinidad y selectividad hacia proteínas que contienen dominios PDZ en tándem. Véase, por ejemplo, Bach y otros, (2009) Angew. Chem. Int. Ed. 48: 9685-9689 y WO 2010/004003. Un péptido que contiene un resto PL se dimeriza preferiblemente mediante la unión del extremo N de dos de dichas moléculas, dejando el extremo C libre. Bach informa además que un péptido pentámero IESDV (SEQ ID NO: 71) del extremo C de NMDAR 2B fue efectivo para inhibir la unión de NMDAR 2B a PSD-95. IETDV (SEQ ID NO: 73) también se puede usar en lugar de IESDV. Opcionalmente, aproximadamente 2-10 copias de un PEG se pueden unir en tándem como un enlazador. Opcionalmente, el enlazador también puede unirse a un péptido de internalización o lipidado para aumentar la captación celular. A continuación, se muestran ejemplos de inhibidores diméricos ilustrativos (véase Bach y otros, PNAS 109 (2012) 3317-3322). Se puede usar cualquiera de los inhibidores de PSD-95 descritos en la presente memoria en lugar de IETDV, y se puede usar cualquier péptido de internalización o resto lipidante en lugar de tat. También se pueden usar otros enlazadores aparte de los mostrados.



ES 2 974 228 T3

Dímero O (X = O)

Dímero Tat-N (R = YGRKKRRQRRR)

Dímero N (X = N)

Dímero ReTat-N (R = rrrqrkr)

A IETAV se le asigna SEQ ID NO: 26, YGRKKRRQRRR SEQ ID NO: 2, y rrrqrkr, SEQ ID NO: 10, las letras minúsculas indican D-aminoácidos.

5 La actividad farmacológica apropiada de los péptidos, peptidomiméticos u otro agente puede confirmarse, si se desea, usando modelos de accidente cerebrovascular en ratas previamente descritos antes del ensayo en primates y ensayos clínicos descritos en la presente solicitud. Los péptidos o peptidomiméticos también pueden cribarse para determinar su capacidad para inhibir las interacciones entre PSD-95 y NMDAR 2B usando los ensayos descritos, por ejemplo, en US 20050059597. Los péptidos útiles tienen típicamente valores de CI50 de menos de 10 50 µM, 25 µM, 10 µM, 0,1 µM o 0,01 µM en dicho ensayo. Los péptidos preferidos tienen típicamente un valor de CI50 de entre 0,001-1 µM, y más preferiblemente 0,001-0,05, 0,05-0,5 o 0,05 a 0,1 µM. Cuando un péptido u otro agente se caracteriza como que inhibe la unión de una interacción, por ejemplo, la interacción de PSD-95 con NMDAR2B, dicha descripción no excluye que el péptido o el agente también inhiba otra interacción, por ejemplo, la inhibición de la unión de PSD-95 a nNOS.

15 Los péptidos tales como los que se acaban de describir pueden derivatizarse opcionalmente (por ejemplo, acetilarse, fosforilarse, miristoilarse, geranilarse, pegilarse y/o glicosilarse) para mejorar la afinidad de unión del inhibidor, para mejorar la capacidad del inhibidor para ser transportado a través de una membrana celular o para mejorar la estabilidad. Como un ejemplo específico, para los inhibidores en los que el tercer residuo desde el extremo C es S o T, este residuo puede ser fosforilado antes del uso del péptido.

Un agente farmacológico puede estar ligado a un péptido de internalización para facilitar la captación en las células y/o a través de la barrera hematoencefálica. Los péptidos de internalización son una clase muy conocida de péptidos relativamente cortos que permiten que muchas proteínas celulares o virales atraviesen las membranas. 25 Los péptidos de internalización, también conocidos como péptidos de transducción de membrana celular o péptidos que penetran en la célula, pueden tener, por ejemplo, 5-30 aminoácidos. Dichos péptidos tienen típicamente una carga catiónica de una representación normal anterior (relativa a las proteínas en general) de residuos de arginina y/o lisina que se cree que facilita su paso a través de las membranas. Algunos de dichos péptidos tienen al menos 5, 6, 7 u 8 residuos de arginina y/o lisina. Los ejemplos incluyen la proteína antenapedia (Bonfanti, Cancer Res. 57, 1442-6 (1997)) (y variantes de la misma), la proteína tat del virus de la inmunodeficiencia humana, la proteína VP22, el producto del gen UL49 del virus del herpes simple tipo 1, Penetratina, SynBI y 3, Transportano, Anfipático, gp41NLS, poliArg, y varias toxinas proteicas bacterianas y de plantas, como la ricina, abrina, modecina, toxina de la difteria, toxina del cólera, toxina del ántrax, toxinas lábiles al calor y exotoxina A de Pseudomonas aeruginosa (ETA). Otros ejemplos se describen en las siguientes referencias (Temsamani, Drug 35 Discovery Today, 9 (23): 1012-1019, 2004; De Coupade, Biochem J., 390: 407-418, 2005; Saalik Bioconjugate Chem. 15: 1246-1253, 2004; Zhao, Medicinal Research Reviews 24 (1): 1-12, 2004; Deshayes, Cellular and Molecular Life Sciences 62: 1839-49, 2005); Gao, ACS Chem. Biol. 2011, 6, 484-491, SG3 (RLSGMNEVLSFRWL (SEQ ID NO: 9)), Stalmans PLoS ONE 2013, 8(8) e71752, 1-11 y suplemento; Figueiredo y otros, IUBMB Life 66, 182-194 (2014); Copolovici y otros, ACS Nano, 8, 1972-94 (2014); Lukanowski Biotech J. 8, 918-930 (2013); 40 Stockwell, Chem. Biol. Drug Des. 83, 507-520 (2014); Stanzl y otros Accounts. Chem. Res/ 46, 2944-2954 (2013).

Un péptido de internalización preferido es tat del virus del VIH. Un péptido tat informado en un trabajo previo comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos estándar YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2) encontrada en la proteína Tat del VIH. Si están presentes residuos adicionales que flanquean dicho resto tat (además del agente 45 farmacológico), los residuos pueden ser, por ejemplo, aminoácidos naturales que flanquean este segmento de una proteína tat, aminoácidos espaciadores o enlazadores de un tipo usado típicamente para unir dos dominios peptídicos, por ejemplo, gly (ser)₄ (SEQ ID NO: 44), TGEKP (SEQ ID NO: 45), GRRGGGS (SEQ ID NO: 46), o LRQRDGERP (SEQ ID NO: 47) (véase, por ejemplo, Tang et (1996), J. Biol. Chem. 271, 15682-15686; Hennecke y otros (1998), Protein Eng. 11, 405-410)), o puede ser cualquier otro aminoácido que no reduzca 50 significativamente la capacidad para conferir la captación de la variante sin los residuos flanqueantes. Preferiblemente, el número de aminoácidos flanqueantes distintos de un péptido activo no excede de diez a cada lado de YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2). Un péptido tat adecuado que comprende residuos de aminoácidos adicionales que flanquean el extremo C de YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2) es YGRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO: 48). Sin embargo, preferiblemente, no están presentes aminoácidos flanqueantes. Otros péptidos tat que se 55 pueden usar incluyen GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO: 4) y GRKKRRQRRP (SEQ ID NO: 72).

Las variantes del péptido tat anterior que tienen una capacidad reducida para unirse a los canales de calcio de tipo N se describen por el documento WO/2008/109010. Dichas variantes pueden comprender o consistir en una 60 secuencia de aminoácidos XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 49), en la que X es un aminoácido distinto de Y o nada (en cuyo caso G es un residuo N-terminal libre). Un péptido tat preferido tiene el residuo Y N-terminal sustituido con F. Por lo tanto, se prefiere un péptido tat que comprende o que consiste en FGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 3). Otra variante preferida del péptido tat consiste en GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1). Otro péptido tat preferido comprende o consiste en RRRQRRKKRG o RRRQRRKKRGY (aminoácidos 1-10 o 1-11 de la SEQ ID NO: 70).

Otros péptidos derivados de tat que facilitan la captación de un agente farmacológico sin inhibir los canales de calcio de tipo N incluyen los que se presentan a continuación.

X-FGRKKRRQRRR (F-Tat) (SEQ ID NO: 8)
X-GKKKKKQKKK (SEQ ID NO: 50)
X-RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 51)
X-GAKRRQRRR (SEQ ID NO: 52)
X-AKKRRQRRR (SEQ ID NO: 53)
X-GRKARRQRRR (SEQ ID NO: 54)
X-RKARRQRRR (SEQ ID NO: 55)
X-GRKKARQRRR (SEQ ID NO: 56)
X-RKKARQRRR (SEQ ID NO: 57)
X-GRKKRRQARR (SEQ ID NO: 58)
X-RKKRRQARR (SEQ ID NO: 59)
X-GRKKRRQRAR (SEQ ID NO: 60)
X-RKKRRQRAR (SEQ ID NO: 61)
X-RRPRRRPRR (SEQ ID NO: 62)
X-RRARRARRR (SEQ ID NO: 63)
X-RRRARRARR (SEQ ID NO: 64)
X-RRRPRRRPRR (SEQ ID NO: 65)
X-RRPRRRPRR (SEQ ID NO: 66)
X-RRARRARR (SEQ ID NO: 67)

- 5 X puede representar un extremo amino libre, uno o más aminoácidos, o un resto conjugado. Los péptidos de internalización pueden usarse en forma inversa o retro o retro inversa con o sin el péptido unido o el peptidomimético en dicha forma. Por ejemplo, un péptido quimérico preferido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en YGRKKRRQRRR-KLSSIESDV (SEQ ID NO: 6, también conocido como TAT-NR2B9c o Tat-NR2B9c), o YGRKKRRQRRR-KLSSIEDV (SEQ ID NO: 7). Otros péptidos quiméricos preferidos difieren de la SEQ ID NO:6 o NO:7 en hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos (internas o en los extremos). Otros péptidos preferidos incluyen RRRQRKRGY-KLSSIESDV (SEQ ID NO: 70), también conocido como RvTat-NR2B9c o que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en RRRQRKRGY-KLSSIEDV (SEQ ID NO: 37).

- 15 Los péptidos de internalización pueden unirse a agentes farmacológicos por métodos convencionales. Por ejemplo, los agentes pueden unirse a péptidos de internalización por enlace químico, por ejemplo, a través de un agente de acoplamiento o conjugación. Numerosos de dichos agentes están disponibles comercialmente y están revisados por S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991). Algunos ejemplos de reactivos de reticulación incluyen 3-(2-piridilditio) propionato de J-succinimidilo (SPDP) o N,N'- (1,3-fenileno) bismaleimida; N,N'-etilen-bis-(yodoacetamida) u otro reactivo de este tipo que tenga puentes de metileno de 6 a 11 carbonos (lo que es relativamente específico para los grupos sulfhidrilo); y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (que forma enlaces irreversibles con grupos amino y tirosina). Otros reactivos de reticulación incluyen p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona (que forma enlaces cruzados irreversibles con grupos amino y fenólicos); adipimidato de dimetilo (que es específico para grupos amino); cloruro de fenol-1,4-disulfonilo (que reacciona principalmente con grupos amino); hexametilendiisocianato o diisotiocianato, o azofenil-p-diisocianato (que reacciona principalmente con grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con varias cadenas laterales diferentes) y disdiazobencidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

- 30 Para agentes farmacológicos que son péptidos, la unión a un péptido de internalización se puede lograr generando una proteína de fusión que comprende la secuencia peptídica fusionada, preferiblemente en su extremo N, a un péptido de internalización.

- 35 En lugar de, o así como, la unión de un péptido (u otro agente) que inhibe PSD-95 a un péptido de internalización, dicho péptido se puede unir a un lípido (lipidación) para incrementar la hidrofobicidad del conjugado en relación con el péptido solo y así facilitar el paso del péptido unido a través de las membranas celulares y/o a través de la barrera cerebral. La lipidación se realiza preferiblemente en el aminoácido N-terminal, pero también puede realizarse en aminoácidos internos, siempre que la capacidad del péptido para inhibir la interacción entre PSD-95 y NMDAR 2B no se reduzca en más del 50 %. Preferiblemente, la lipidación se realiza en un aminoácido distinto de uno de los cuatro aminoácidos más C-terminales. Los lípidos son moléculas orgánicas más solubles en éter que en agua e incluyen ácidos grasos, glicéridos y esteroides. Las formas adecuadas de lipidación incluyen miristoilación, palmitoilación o unión de otros ácidos grasos, preferiblemente con una cadena con una longitud de 10 a 20 carbonos, tales como ácido láurico y ácido esteárico, así como geranilación, geranilgeranilación e isoprenilación. Se prefieren las lipidaciones de un tipo que se producen en la modificación posterior a la traducción de proteínas naturales. También se prefiere la lipidación con un ácido graso a través de la formación de un enlace amida con el grupo alfa-amino del aminoácido N-terminal del péptido. La lipidación puede ser por síntesis peptídica que incluye un aminoácido prelipidado, puede realizarse enzimáticamente *in vitro* o por expresión recombinante,

por reticulación química o derivación química del péptido. Los aminoácidos modificados por miristoilación y otras modificaciones lipídicas están disponibles comercialmente.

5 La lipidación facilita preferiblemente el paso de un péptido unido (por ejemplo, KLSSIESDV (SEQ ID NO: 5) o KLSSIEDV (SEQ ID NO: 43)) a través de una membrana celular y/o la barrera hematoencefálica sin causar una reducción transitoria de la presión sanguínea como se ha encontrado cuando un péptido tat estándar se administra a una dosis alta (por ejemplo, a 3 mg/kg o más), o al menos con una reducción menor que la del mismo péptido unido a un péptido tat estándar.

10 Los péptidos farmacológicos, opcionalmente fusionados con los péptidos tat, pueden sintetizarse mediante síntesis en fase sólida o métodos recombinantes. Los peptidomiméticos pueden sintetizarse usando una variedad de procedimientos y metodologías descritas en la bibliografía científica y de patentes, por ejemplo, Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman y otros (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY, al-Obeidi (1998) Mol. Biotechnol. 9: 205-223; Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 114-119; Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3: 17-27; Ostresh (1996) Métodos Enzymol. 267: 220-234.

III. Sales

20 Los péptidos del tipo descrito anteriormente se preparan típicamente mediante síntesis en estado sólido, debido a que la síntesis en estado sólido usa trifluoroacetato (TFA) para eliminar los grupos protectores o eliminar péptidos de una resina, típicamente los péptidos se producen inicialmente como sales de trifluoroacetato. El trifluoroacetato puede reemplazarse por otro anión, por ejemplo, uniendo el péptido a un soporte sólido, tal como una columna, lavando la columna para eliminar el contraión existente, equilibrando la columna con una solución que contiene el nuevo contraión y después eluyendo el péptido, por ejemplo, al introducir un disolvente hidrófobo tal como acetoneitrilo en la columna. El reemplazo de trifluoroacetato con acetato puede hacerse con un lavado de acetato como la última etapa antes de que el péptido se eluya una síntesis en estado sólido de otra manera convencional. El reemplazo de trifluoroacetato o acetato con cloruro puede hacerse con un lavado con cloruro de amonio seguido de elución. El uso de un soporte hidrófobo se prefiere y la HPLC en fase inversa preparativa se prefiere particularmente para el intercambio de iones. El trifluoroacetato puede reemplazarse con cloruro directamente o puede reemplazarse primero por acetato y después reemplazarse el acetato por cloruro.

30 Los contraiones, ya sea trifluoroacetato, acetato o cloruro, se unen a átomos cargados positivamente en TAT-NR2B9c, particularmente el grupo amino N-terminal y los residuos de arginina y lisina de las cadenas laterales amino. Aunque la práctica de la invención, no depende de la comprensión de la estequiometría exacta del péptido al anión en una sal de TAT-NR2B9c, se considera que están presentes hasta aproximadamente 9 moléculas de contraión por molécula de sal.

40 Aunque el reemplazo descrito de un contraión por otro tiene lugar de manera eficiente, la pureza del contraión final puede ser inferior al 100 %. Por lo tanto, la referencia a una sal de cloruro de TAT-NR2B9c u otro agente activo significa que en una preparación de la sal, el cloruro es el anión predominante en peso (o moles) sobre todos los demás aniones presentes en el agregado en la sal. En otras palabras, el cloruro constituye más del 50 % y preferiblemente más del 75 %, 95 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % en peso o moles de todos los aniones presentes en la sal. En tal sal o formulación preparada a partir de la sal, el acetato y el trifluoroacetato en combinación e individualmente constituyen menos del 50 %, 25 %, 5 %, 1 % o 0,1 % de los aniones en la sal o formulación.

45 La invención reivindicada requiere que más del 95 % de los aniones en la sal sean cloruro.

IV. Enfermedades

50 Las formulaciones liofilizadas son útiles para tratar una variedad de enfermedades, particularmente enfermedades neurológicas, y especialmente enfermedades mediadas en parte por la excitotoxicidad. Dichas enfermedades y afecciones incluyen accidente cerebrovascular, epilepsia, hipoxia, hemorragia subaracnoidea, lesión traumática en el SNC no asociada con accidente cerebrovascular, tal como lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal, otra isquemia cerebral, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Otras enfermedades neurológicas tratables por agentes de la invención que no se sabe que están asociadas con la excitotoxicidad incluyen la ansiedad y el dolor.

60 Un accidente cerebrovascular es una afección que resulta de un flujo sanguíneo deficiente en el SNC, independientemente de la causa. Las posibles causas incluyen embolia, hemorragia y trombosis. Algunas células neuronales mueren inmediatamente como resultado del flujo sanguíneo alterado. Estas células liberan sus moléculas componentes, incluido el glutamato, que a su vez activa los receptores de NMDA, que elevan los niveles de calcio intracelular, y los niveles de enzimas intracelulares que dan lugar a una muerte de células neuronales adicional (la cascada de excitotoxicidad). La muerte del tejido del SNC se conoce como infarto. El volumen de infarto (es decir, el volumen de células neuronales muertas a causa de un accidente cerebrovascular en el cerebro) se puede usar como un indicador de la extensión del daño patológico resultante de un accidente cerebrovascular. El efecto sintomático depende tanto del volumen de un infarto como del lugar donde se encuentra en el cerebro.

El índice de discapacidad se puede usar como una medida del daño sintomático, tal como la Escala de Resultados de Accidente Cerebrovascular de Rankin (Rankin, Scott Med J; 2: 200-15 (1957)) y el Índice de Barthel. La escala de Rankin se basa en evaluar directamente las condiciones globales de un paciente de la siguiente manera.

5 0: Sin síntomas en absoluto

1: No hay discapacidad significativa a pesar de los síntomas; capaz de realizar todos los deberes y actividades habituales.

10 2: Discapacidad leve; incapaz de llevar a cabo todas las actividades anteriores pero capaz de cuidar de sus propios asuntos sin ayuda.

3: Discapacidad moderada que requiere ayuda, pero que puede caminar sin ayuda

15 4: Discapacidad moderada a severa; incapaz de caminar sin ayuda e incapaz de atender sus propias necesidades corporales sin ayuda.

5: Discapacidad severa; postrado en cama, incontinente, y que requieren atención y cuidados de enfermería constantes.

20 El Índice de Barthel se basa en una serie de preguntas sobre la capacidad del paciente para realizar 10 actividades básicas de la vida diaria que dan como resultado una puntuación entre 0 y 100, indicando una calificación más baja más discapacidad (Mahoney et al, Maryland State Medical Journal 14:56 -61 (1965)).

25 Alternativamente, la gravedad/resultados de los accidentes cerebrovasculares se pueden medir usando la escala de accidentes cerebrovasculares del NIH, disponible en el sitio web mundial [ninds.nih.gov/doctors/NIH Stroke ScaleJBooklet.pdf](http://ninds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_ScaleJBooklet.pdf).

30 La escala se basa en la capacidad de un paciente para llevar a cabo 11 grupos de funciones que incluyen evaluaciones del nivel de conciencia del paciente, funciones motoras, sensoriales y del lenguaje.

Un accidente cerebrovascular isquémico se refiere más específicamente a un tipo de accidente cerebrovascular causado por un bloqueo del flujo sanguíneo al cerebro. La afección subyacente para este tipo de bloqueo es lo más comúnmente el desarrollo de depósitos de grasa que revisten las paredes de los vasos. Esta afección se llama aterosclerosis. Estos depósitos grasos pueden causar dos tipos de obstrucción. La trombosis cerebral se refiere a un trombo (coágulo de sangre) que se desarrolla en la parte obstruida del vaso. "Embolia cerebral" se refiere generalmente a un coágulo de sangre que se forma en otra ubicación en el sistema circulatorio, habitualmente en el corazón y las arterias grandes del tórax superior y cuello. Una porción del coágulo de sangre se suelta, entra en el torrente sanguíneo y viaja a través de los vasos sanguíneos del cerebro hasta que llega a vasos demasiado pequeños que no lo dejan pasar. Una segunda causa importante de embolia es un latido irregular, conocido como fibrilación arterial. Crea afecciones en las que los coágulos pueden formarse en el corazón, desplazarse y viajar al cerebro. Las causas potenciales adicionales del accidente cerebrovascular isquémico son hemorragia, trombosis, disección de una arteria o vena, un paro cardíaco, choque de cualquier causa, incluida hemorragia y causas iatrogénicas, tales como lesión quirúrgica directa en vasos sanguíneos del cerebro o vasos que conducen al cerebro o cirugía cardíaca. El accidente cerebrovascular isquémico representa aproximadamente el 83 por ciento de todos los casos de accidente cerebrovascular.

50 Los ataques isquémicos transitorios (AIT) son accidentes cerebrovasculares menores o de advertencia. En un AIT, existen condiciones indicativas de un accidente cerebrovascular isquémico y se desarrollan los signos típicos de advertencia de accidente cerebrovascular. Sin embargo, la obstrucción (coágulo de sangre) se produce durante un corto tiempo y tiende a resolverse a través de mecanismos normales. Los pacientes sometidos a cirugía cardíaca tienen un riesgo particular de ataque isquémico cerebral transitorio.

55 El accidente cerebrovascular hemorrágico representa aproximadamente el 17 por ciento de los casos de accidente cerebrovascular. Es el resultado de un vaso debilitado que se rompe y sangra en el cerebro circundante. La sangre se acumula y comprime el tejido cerebral circundante. Los dos tipos generales de accidentes cerebrovasculares hemorrágicos son la hemorragia intracerebral y la hemorragia subaracnoidea. El accidente cerebrovascular hemorrágico es el resultado de la ruptura de una ruptura de vasos sanguíneos debilitados. Las posibles causas de ruptura de un vaso sanguíneo debilitado incluyen una hemorragia hipertensiva, en la que la presión sanguínea alta causa la ruptura de un vaso sanguíneo, u otra causa subyacente de vasos sanguíneos debilitados, tal como una malformación vascular cerebral dañada, incluido un aneurisma cerebral, una malformación arteriovenosa (AVM) o malformación cavernosa. Los accidentes cerebrovasculares hemorrágicos también pueden surgir de una transformación hemorrágica de un accidente cerebrovascular isquémico que debilita los vasos sanguíneos en el infarto, o de una hemorragia de tumores primarios o metastásicos en el SNC que contienen vasos sanguíneos anormalmente débiles. El accidente cerebrovascular hemorrágico también puede surgir de causas iatrogénicas, tales como la lesión quirúrgica directa en un vaso sanguíneo cerebral. Un aneurisma es una dilatación de una

región debilitada de un vaso sanguíneo. Si no se trata, el aneurisma continúa debilitándose hasta que se rompe y sangra en el cerebro. Una malformación arteriovenosa (AVM) es una agrupación de vasos sanguíneos anormalmente formados. Una malformación cavernosa es una anomalía venosa que puede causar una hemorragia por estructuras venosas debilitadas. Cualquiera de estos vasos puede romperse, lo que también causa sangrado en el cerebro. El accidente cerebrovascular hemorrágico también puede resultar de un trauma físico. El accidente cerebrovascular hemorrágico en una parte del cerebro puede dar lugar a un accidente cerebrovascular isquémico en otra, por la escasez de sangre perdida en el accidente cerebrovascular hemorrágico.

Una clase de pacientes susceptibles de tratamiento son los pacientes que se someten a un procedimiento quirúrgico que implica o puede implicar un vaso sanguíneo que abastece al cerebro, o de otra manera en el cerebro o el SNC. Algunos ejemplos son pacientes sometidos a baipás cardiopulmonar, colocación de stent carotídeo, angiografía diagnóstica del cerebro o arterias coronarias del arco aórtico, procedimientos quirúrgicos vasculares y procedimientos neuroquirúrgicos. Los ejemplos adicionales de dichos pacientes se discuten en la sección IV anterior. Los pacientes con un aneurisma cerebral son particularmente adecuados. Dichos pacientes pueden tratarse mediante una variedad de procedimientos quirúrgicos, incluyendo pinzar el aneurisma para interrumpir la sangre o realizar una cirugía endovascular para bloquear el aneurisma con pequeñas bobinas o introducir un stent en un vaso sanguíneo desde el que emerge un aneurisma, o insertar un microcatéter. Los procedimientos endovasculares son menos invasivos que el pinzamiento de un aneurisma y se asocian con un mejor resultado para el paciente, pero el resultado aún incluye una alta incidencia de pequeños infartos. Dichos pacientes pueden tratarse con un inhibidor de la interacción de PSD95 con NMDAR 2B y, en particular, los agentes descritos anteriormente, incluyendo el péptido YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 6, también conocido como Tat-NR2B9c). La cronología de la administración en relación con la realización de la cirugía puede ser como se ha descrito anteriormente para el ensayo clínico.

Otra clase de pacientes susceptibles de tratamiento son los pacientes que tienen una hemorragia subaracnoidea con o sin un aneurisma (véase el documento WO2013088382).

V. Regímenes efectivos de administración

Después de la reconstitución, una formulación liofilizada, es útil para administrarse de tal manera que el agente activo (por ejemplo, NR2B9c) se administra en una cantidad, frecuencia y ruta de administración efectiva para curar, reducir o inhibir un deterioro adicional de al menos un signo o síntoma de una enfermedad en un paciente que tiene la enfermedad que se está tratando. Una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de agente activo suficiente para curar, reducir o inhibir un deterioro adicional de al menos un signo o síntoma de la enfermedad o afección que se va a tratar en una población de pacientes (o modelos animales) que padece la enfermedad tratada con un agente de la invención en relación con el daño en una población de control de pacientes (o modelos animales) que padecen esa enfermedad o afección que no se tratan con el agente. La cantidad también se considera terapéuticamente efectiva si un paciente tratado individual logra un resultado más favorable que el resultado medio en una población control de pacientes comparables no tratados por los métodos de la invención. Un régimen terapéuticamente efectivo implica la administración de una dosis terapéuticamente efectiva a una frecuencia y ruta de administración necesarias para lograr el propósito pretendido.

Para un paciente que padece un accidente cerebrovascular u otra afección isquémica, el agente activo se administra en un régimen que comprende una cantidad frecuencia y ruta de administración efectivas para reducir los efectos dañinos del accidente cerebrovascular u otra afección isquémica. Cuando la afección que requiere tratamiento es un accidente cerebrovascular, el resultado puede determinarse por el volumen de infarto o el índice de discapacidad, y una dosificación se considera terapéuticamente efectiva si un paciente tratado individual muestra una discapacidad de dos o menos en la escala de Rankin y 75 o más en la escala de Barthel, o si una población de pacientes tratados muestra una distribución de puntuaciones significativamente mejorada (es decir, menos discapacitada) en una escala de discapacidad que una población no tratada comparable, véase Lees et al L, N Engl J Med 2006; 354: 588-600. Una dosis única de agente es habitualmente suficiente para el tratamiento del accidente cerebrovascular.

La descripción también proporciona métodos y formulaciones para la profilaxis de un trastorno en un sujeto con riesgo de ese trastorno. Habitualmente, dicho sujeto tiene una mayor probabilidad de desarrollar el trastorno (por ejemplo, una afección, dolencia, trastorno o enfermedad) en relación con una población control. La población control, por ejemplo, puede comprender uno o más individuos seleccionados al azar de la población general (por ejemplo, con concordancia de edad, sexo, raza y/o etnicidad) que no hayan sido diagnosticados o tengan un historial familiar del trastorno. Un sujeto puede ser considerado en riesgo para un trastorno si se encuentra que un "factor de riesgo" asociado con ese trastorno está asociado con ese sujeto. Un factor de riesgo puede incluir cualquier actividad, rasgo, evento o propiedad asociada con un trastorno dado, por ejemplo, a través de estudios estadísticos o epidemiológicos en una población de sujetos. Por lo tanto, un sujeto puede clasificarse como en riesgo de padecer un trastorno, incluso si los estudios que identifican los factores de riesgo subyacentes no incluyeron específicamente al sujeto. Por ejemplo, un sujeto sometido a cirugía cardíaca está en riesgo de ataque isquémico cerebral transitorio debido a que la frecuencia del ataque isquémico cerebral transitorio aumenta en una población de sujetos que se han sometido a una cirugía cardíaca en comparación con una población de sujetos

que no lo han hecho.

Otros factores de riesgo comunes para el accidente cerebrovascular incluyen la edad, el historial familiar, el sexo, la incidencia previa del accidente cerebrovascular, el ataque isquémico transitorio o el ataque cardíaco, la presión sanguínea alta, el tabaquismo, la diabetes, la enfermedad arterial carótida u otra enfermedad arterial, la fibrilación auricular y otras enfermedades cardíacas como la enfermedad cardíaca, insuficiencia cardíaca, miocardiopatía dilatada, enfermedad de las válvulas cardíacas y/o defectos cardíacos congénitos; colesterol alto en sangre y dietas altas en grasas saturadas, grasas trans o colesterol.

En la profilaxis, una formulación liofilizada después de la reconstitución se administra a un paciente con riesgo de una enfermedad pero que aún no tiene la enfermedad en una cantidad, frecuencia y ruta suficiente para prevenir, retrasar o inhibir el desarrollo de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. Una cantidad profilácticamente efectiva significa una cantidad de agente suficiente para prevenir, inhibir o retrasar significativamente al menos un signo o síntoma de la enfermedad en una población de pacientes (o modelos animales) en riesgo de la enfermedad en relación con el agente en comparación con una población control de pacientes (o modelos animales) con riesgo de enfermedad no tratada con un agente quimérico de la invención. La cantidad también se considera profilácticamente efectiva si un paciente individual tratado logra un resultado más favorable que el resultado medio en una población control de pacientes comparables no tratados por los métodos de la invención. Un régimen profilácticamente efectivo implica la administración de una dosis profilácticamente efectiva a una frecuencia y ruta de administración necesarias para lograr el propósito pretendido. Para la profilaxis del accidente cerebrovascular en un paciente con riesgo inminente de accidente cerebrovascular (por ejemplo, un paciente sometido a cirugía cardíaca), habitualmente es suficiente una dosis única de agente.

Dependiendo del agente, la administración puede ser parenteral, intravenosa, nasal, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. Se prefiere la administración intravenosa para agentes peptídicos.

Para la administración a seres humanos, una dosis preferida de agente activo (por ejemplo, Tat-NR2B9c) es 2-3mg/kg y más preferiblemente 2,6 mg/kg. Debe entenderse que las dosificaciones indicadas incluyen el margen de error inherente a la exactitud con la que se pueden medir las dosificaciones en un entorno hospitalario típico. Dichas cantidades son para la administración de dosis únicas, es decir, una dosis por episodio de enfermedad.

Los agentes activos, tales como Tat-NR2B9c, se administran preferiblemente por infusión en un vaso sanguíneo, más preferiblemente por infusión intravenosa. El momento de la infusión puede afectar tanto a los efectos secundarios (debido, por ejemplo, a la desgranulación de los mastocitos y a la liberación de histamina) como a la eficacia. En general, para un nivel de dosificación dado, es más probable que un tiempo de infusión más corto conduzca a la liberación de histamina. Sin embargo, un tiempo de infusión más corto también puede dar lugar a una eficacia mejorada. Aunque la práctica de la invención no depende de la comprensión del mecanismo, este último resultado puede explicarse debido a que el retraso es significativo en relación con el desarrollo de la patología en el paciente y debido al hecho de que el retraso es significativo en relación con la semivida plasmática del agente quimérico, como resultado de lo cual el agente quimérico no alcanza un nivel terapéutico óptimo. Para el agente quimérico Tat-NR2B9c, un tiempo de infusión preferido que proporciona un equilibrio entre estas consideraciones es 5-15 minutos y más preferiblemente 10 minutos. Se debe entender que los tiempos indicados incluyen una marca de error de +/- 10 %. Los tiempos de infusión no incluyen ningún tiempo adicional para que una difusión de lavado elimine las gotas remanentes de una difusión inicial que, de otro modo, ha transcurrido hasta la compleción. Los tiempos de infusión para Tat-NR2B9c también pueden servir como una guía para otros agentes activos.

Aunque la invención se ha descrito en detalle para propósitos de claridad de comprensión, ciertas modificaciones pueden ponerse en práctica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En la medida en que más de una secuencia esté asociada con un número de acceso en diferentes momentos, se entienden las secuencias asociadas con el número de acceso a partir de la fecha de presentación efectiva de esta solicitud. La fecha de presentación efectiva es la fecha de la primera solicitud de prioridad que revela el número de acceso en cuestión. A no ser que sea evidente otra cosa a partir del contexto, cualquier elemento, realización, etapa, característica o apariencia de la invención se puede realizar en combinación con cualquier otro.

Ejemplos

Los ejemplos 1-7 muestran que una sal de acetato de TAT-NR2B9c puede formularse en forma liofilizada con histidina y trehalosa. El ejemplo 9 muestra que la sal de cloruro de TAT-NR2B9c ofrece una estabilidad significativamente mayor que la sal de acetato en una formulación liofilizada de cualquier manera idéntica. El ejemplo 8 muestra que la sal de cloruro de TAT-NR2B9c formulada en histidina y trehalosa también proporciona una estabilidad mejorada en relación con una formulación liofilizada previamente descrita de TAT-NR2B9c a partir de solución salina normal.

Ejemplo 1: Demostración de que los tampones y los excipientes estándar no interfieren con la eficacia de TAT-

NR2B9c in vivo.

Se formularon cinco formulaciones de toxicología líquida dirigidas a una concentración de 20 mg/ml de TAT-NR2B9c. La Tabla 1 incluye la composición del vehículo, el número de lote y el contenido, pureza y pH en el momento de la formulación. Aproximadamente 5 ml de cada formulación se pusieron en viales para el ensayo. Los viales se congelaron a -20 para simular las condiciones del transporte o del almacenamiento de líquidos.

Tabla 1: composición de formulaciones de TAT-NR2B9c para ensayos de eficacia in vivo

No. Formulación	Composición del vehículo	PTek No. de lote	Contenido ¹ (mg/ml)	Pureza ¹ (% de área del pico de NA-1)	pH ³
1	Fosfato de sodio 50 mM, NaCl 76,9 mM, pH 7,0	1205-1-17-1	20,5	97,87	6,7
2	Fosfato de sodio 50 mM, manitol 154 mM, pH 7,0	1205-1-17-2	20,0	96,34 ²	6,5
3	Histidina 50 mM, manitol 154 mM, pH 6,5	1205-1-17-3	19,9	98,38	6,4
4	Histidina 50 mM, trehalosa 154 mM, pH 6,5	1205-1-17-4	20,8	99,16	6,4
5	Histidina 50 mM, dextrano-40 al 5 %, pH 6,5	1205-1-18-1	19,4	98,81	6,4

¹El contenido y la pureza se evaluaron mediante análisis por RP-HPLC usando un método TFA

²La pureza de la formulación no. 2 es notablemente más baja que las otras formulaciones.

³El pH de las formulaciones tamponadas con fosfato se desvió notablemente del pH del tampón inicial de 7,0.

10

Se observó que la formulación tamponada con fosfato no mantenía el pH tan bien como lo hicieron los tampones de histidina entre la formulación y el ensayo, lo que indica que la histidina puede ser un tampón superior para la formulación.

15

Las formulaciones 1-5 se ensayaron en el modelo de rata de accidente cerebrovascular por oclusión de 3 vasos piales (3PVO). A las ratas sometidas a accidente cerebrovascular se les administró una de las formulaciones mediante administración intravenosa en la vena femoral, y luego los animales se sacrificaron 24 horas después del accidente cerebrovascular. Los cerebros se recogieron, se fijaron y se tiñeron con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) para visualizar las porciones isquémicas del cerebro. Todas las formulaciones ensayadas fueron capaces de proporcionar una neuroprotección significativa en los animales en relación con el control de disolución salina solamente (Fig. 1).

20

Métodos

25

Modelo de isquemia por oclusión de tres vasos piales

30

Los experimentos se realizaron en ratas. Para la oclusión permanente de tres vasos piales (3PVO) se realizó como se ha descrito anteriormente [Angiogenic protection from focal ischemia with angiotensin II type 1 receptor blockade in the rat. Forder y otros, Am J Physiol Heart Circ Physiol. abril de 2005; 288 (4): H1989-96]. Brevemente, se anestesiaron ratas de 250 g a 350 g con una inyección intramuscular de 0,5 ml/kg de ketamina (100 mg/kg), acepromazina (2 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg), suplementada con un tercio de la dosis inicial según se requiera. Se insertó una sonda de temperatura anal y el animal se puso sobre una almohadilla térmica mantenida a aproximadamente 37 °C. El cráneo se expuso a través de una incisión en la línea media y el tejido se eliminó por raspado. Usando un microscopio de disección y un taladro dental neumático, se hizo una ventana craneal de 6 a 8 mm sobre la corteza somatosensorial derecha (2 mm caudal y 5 mm lateral a bregma) al perforar un rectángulo a través del cráneo y levantar la pieza de cráneo mientras se mantenía la duramadre intacta. Las 3 ramas de arterias cerebrales medias arteriolares piales fueron cauterizadas alrededor de la corteza del barril y se seleccionaron y cauterizaron eléctricamente a través de la duramadre. Después de las cauterizaciones, se suturó el cuero cabelludo. Cada rata fue devuelta a su jaula individual bajo una lámpara de calentamiento para mantener la temperatura corporal hasta que la rata se recuperó completamente. Se suministró comida y agua. Una hora después de la isquemia 3PVO, se inyectaron a las ratas formulaciones de NA1 a 3 nmoles/g en ~ 0,45 ml de disolución salina sobre la base del peso de la rata. Las dosis se administraron durante 5 minutos.

35

40

45

Veinticuatro horas después de la cirugía, el cerebro se recogió rápidamente. Se tomaron cortes coronales (2 mm) a través del cerebro y se incubaron en cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 2 % (*Sigma-Aldrich* St. Louis MO) durante 15 min a 37 °C. Las imágenes se escanearon (CanoScan 4200F Canon) y se cuantificaron.

Ejemplo 2: Determinación de la estabilidad de TAT-NR2B9c en diferentes tampones y en diferentes valores de pH

Cribado de tampones

- 5 Se formularon diez tampones a 1 mg/ml de TAT-NR2B9c para el cribado de excipientes. Las muestras se almacenaron a 25 °C/60 % de humedad relativa (HR) y 40 °C/75 % HR. Las muestras se ensayaron para determinar la estabilidad (pureza) en t = 0 y t = 1 semana para la pureza por RP-HPLC (métodos de TFA y MSA), y los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3.
- 10 Los resultados indican una estabilidad mejorada para TAT-NR2B9c en medios líquidos tamponados entre pH 6,0 y pH 6,5. La degradación parece incrementarse fuera de este rango en cualquier dirección. Los datos generados con el método de MSA mostraron patrones claros de degradación que dependían tanto del pH como de las especies tamponadoras, y proporcionaron una valiosa información sobre el desarrollo de futuras formulaciones. Los resultados para la pureza del pico principal por % de área de HPLC usando el método de MSA se proporcionan en la Tabla 2, mientras que los resultados para la pureza del pico principal por % de área de HPLC usando el método de TFA se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 2. % Del área del pico principal por el método de MSA, TAT-NR2B9c

Muestra	t= 0	t= 1 semana 25 °C	t= 1 semana 40 °C
His, 6,0	98,5	98,5	98,0
His, 6,5	98,5	98,6	97,3
His, 7,0	98,5	98,4	97,0
Fos, 6,0	98,5	98,2	97,0
Fos, 6,5	98,5	97,9	97,3
Fos, 7,0	98,5	97,9	96,0
Fos, 7,5	98,5	97,6	95,2
Citr, 5,5	98,5	98,3	94,4
Citr, 6,0	98,5	98,4	97,4
Citr, 6,5	98,5	98,7	97,7

20

Tabla 3. % Del área del pico principal por el método de TFA, TAT-NR2B9c

Muestra	t= 0	t= 1 semana 25 °C	t= 1 semana 40 °C
His, pH 6,0	99,5	98,8	99,2
His, pH 6,5	99,5	98,4	99,4
His, pH 7,0	99,5	98,3	96,7
Fos, 6,0	99,5	99,8	97,9
Fos, 6,5	99,5	99,5	98,6
Fos, 7,0	99,5	98,6	98,3
Fos, 7,5	99,5	98,0	93,2
Citr, 5,5	99,5	98,0	95,1
Citr, 6,0	99,5	99,0	98,2
Citr, 6,5	99,5	99,5	99,1

25

Los resultados indican que la estabilidad de la disolución de TAT-NR2B9c se mantiene mejor en medios tamponados de pH 6,0 a 6,5 y el vehículo aún es bien tolerado para la administración por IV. En general, los sistemas de tamponamiento de histidina y citrato fueron capaces de mantener el TAT-NR2B9c en una forma intacta, incluso cuando se mantuvieron en condiciones de estabilidad acelerada de 25 °C o 40 °C durante 1 semana.

Hay varios factores que se deben considerar al seleccionar una especie de tamponamiento: los patrones de degradación específicos que se producen en cada medio, y cualquier dato sobre preocupaciones sobre sustancias o toxicología relacionadas identificadas puede agilizar el proceso de decisión si se deben evitar las sustancias relacionadas especificadas. Durante el período ensayado, los tampones de histidina y citrato entre pH 6 y 6,5 mostraron pocos productos de degradación. El tampón de histidina solo usado en este estudio contenía un contaminante que estaba presente en el tampón de histidina en ausencia de TAT-NR2B9c añadido. Por lo tanto, la identificación de un proveedor de histidina sin dicho contaminante simplificaría el análisis. La Tabla 4 proporciona un resumen de las especies de tampón desde el punto de vista de la estabilidad de TAT-NR2B9c.

10 Tabla 4. Selección de especies tamponadoras

Especie	pH	Pro	Con
Histidina	6,0	Excelente estabilidad, uso histórico en aplicaciones de liofilización, dentro del rango de tamponamiento	Interferencia cromatográfica, pero la cromatografía podría ser mejorada posiblemente por un nuevo proveedor de histidina
Citrato	6,0	Estabilidad mejorada, uso histórico en aplicaciones de liofilización, dentro del rango de tamponamiento	
Histidina	6,5	Estabilidad mejorada, uso histórico en aplicaciones de liofilización, dentro del rango de tamponamiento	Interferencia cromatográfica, pero la cromatografía podría ser mejorada posiblemente por un nuevo proveedor de histidina
Citrato	6,5	Excelente estabilidad, uso histórico en aplicaciones de liofilización, dentro del rango de tamponamiento	El pH diana de 6,5 puede estar en el límite del rango de tamponamiento ideal para la especie de citrato
Fosfato	6,5	Estabilidad mejorada, uso histórico de especies de fosfato en formulaciones de NA-1	Las especies de fosfato se han evitado históricamente para las formulaciones de liofilización

Ejemplo 3: Determinación de la estabilidad de TAT-NR2B9c en tampones de histidina y citrato y a diferentes valores de pH con cantidades variables de cloruro de sodio.

15 El objetivo de este estudio fue demostrar los efectos del cloruro de sodio (NaCl) sobre el pH y la estabilidad de TAT-NR2B9c en formulaciones líquidas. Las formulaciones de tampón con 1 mg/ml de TAT-NR2B9c se listan en la Tabla 5, y los resultados para el pH se proporcionan en la Tabla 6. Los datos muestran resultados bastante consistentes durante la duración del estudio. Sin embargo, se produjeron desplazamientos notables en el citrato con la adición de NaCl, donde la capacidad de tamponamiento se vio afectada y el pH disminuyó en ~ 0,2 unidades. 20 Los pH seleccionados de 6,0 y 6,5 están en el límite exterior del rango ideal de tamponamiento del citrato (pH 2,5-5,6), por lo que esto puede causar dificultades con varios aditivos durante el proceso de formulación y debe considerarse cuando se evalúa la solidez de la formulación.

25 Tabla 5: Formulaciones de tampón para examinar el efecto de la sal en el pH

Vehículo no.	Tampón	pH diana	NaCl
1	Citrato 50 mM	6,0	NA
2	Citrato 50 mM	6,0	200 mM
3	Citrato 50 mM	6,5	NA
4	Citrato 50 mM	6,5	200 mM
5	Histidina 50 mM	6,0	NA
6	Histidina 50 mM	6,0	200 mM
7	Histidina 50 mM	6,5	NA
8	Histidina 50 mM	6,5	200 mM

Tabla 6: Estabilidad del pH de las formulaciones de TAT-NR2B9c en condiciones de temperatura de congelación y acelerada

Vehículo no.	Tampón	pH Diana	pH medido t= 0 Vehículo	pH medido t= 0 Vehículo + NA-1	pH medido t= 1 semana Vehículo + NA-1	
					-20 °C	40 °C/75 % HR
1	Citr	6,0	6,1	6,0	6,1	6,0
2		6,5	6,6	6,5	6,6	6,6
3	His	6,0	6,0	5,9	6,2	6,0
4		6,5	6,5	6,5	6,6	6,7
5	Citr + NaCl	6,0	5,8	5,8	5,9	5,8
6		6,5	6,3	6,2	6,3	6,3
7	His + NaCl	6,0	6,1	6,0	6,2	6,0
8		6,5	6,6	6,6	6,7	6,7

Los resultados indican que la adición de NaCl 200 mM a las disoluciones de TAT-NR2B9c tamponadas con histidina y citrato no afecta significativamente el pH de las disoluciones si se almacenan durante una semana congeladas o a la temperatura acelerada de 40 °C.

A continuación, examinamos la estabilidad de TAT-NR2B9c en estas formulaciones cuando se almacenan 1 semana a temperaturas de congelación y aceleradas. La Tabla 7 muestra los resultados del ensayo usando el método de RP-HPLC con un gradiente de MSA. Los datos también se presentan en las Figuras 2A y 2B. La Figura 2A presenta la estabilidad acelerada de las formulaciones clasificadas de izquierda a derecha (estabilidad baja a alta). La Figura 2B muestra la estabilidad relativa acelerada por el agente de tamponamiento.

Tabla 7. Pureza (Método de MSA), TAT-NR2B9c

Vehículo	pH 6,0		pH 6,5	
	-20 °C	40 °C	-20 °C	40 °C
His	98,1	92,8	98,5	96,9
His + NaCl	98,4	95,0	98,4	97,7
Citr	97,5	96,0	99,0	97,5
Citr + NaCl	98,4	96,7	98,7	98,4

Estos resultados indican que la estabilidad de la disolución de TAT-NR2B9c se mantiene mejor a pH 6,5, y que la adición de NaCl puede ofrecer una ligera mejora en la estabilidad (Figuras 2A y 2B). Debido a la capacidad mejorada de tamponamiento y a la estabilidad comparable del tampón de histidina, especialmente cuando se excluye el contaminante que migra con un tiempo de retención relativo (RRT) de 0,28 (área del contaminante incluida en la tabla anterior, lo que resulta en un valor de estabilidad más bajo para el área del pico de TAT-NR2B9c), la especie de tamponamiento de histidina a pH 6,5 es la mejor formulación para pasar a los estudios de liofilización.

Los vehículos a pH 6,5 son bien tolerados para su administración por IV.

Ejemplo 4: Selección de agentes de carga para TAT-NR2B9c para formar una torta liofilizada estable

Para identificar los agentes de carga que generarían una buena torta después de la liofilización y mejorar la estabilidad, formulamos varias disoluciones de 20 mg/ml de TAT-NR2B9c en tampón de histidina 50 mM, agente de carga y NaCl como se describe en la Tabla 8. Para simular el tiempo y las temperaturas de manejo a las que se pueden exponer las formulaciones de TAT-NR2B9c durante el proceso de liofilización, estas muestras se almacenaron a -20 °C (control) y 40 °C / 75 % HR (ensayo), y se analizaron después de una semana de almacenamiento por determinar la pureza por HPLC (método de MSA) y pH. Los resultados para la estabilidad del

pH se resumen en la Tabla 9, y los resultados para la estabilidad de TAT-NR2B9c en las diferentes formulaciones líquidas se muestran en la Tabla 10 y la Figura 3.

Tabla 8. Matriz de muestra del agente de carga

5

Vehículo no.	Tampón	Agente de carga	NaCl
1	Histidina 50 mM, pH 6,5	Manitol 120 mM	
2	Histidina 50 mM, pH 6,5	Manitol 120 mM	75 mM
3	Histidina 50 mM, pH 6,5	Trehalosa 120 mM	
4	Histidina 50 mM, pH 6,5	Trehalosa 120 mM	75 mM
5	Histidina 50 mM, pH 6,5	Dextrano-40 al 5 %	
6	Histidina 50 mM, pH 6,5	Dextrano-40 al 5 %	75 mM

Tabla 9. pH, muestras de agente de carga

Vehículo	pH diana	pH, -20 °C	pH, 40 °C
Manitol	6,5	6,5	6,5
Manitol + NaCl	6,5	6,5	6,5
Trehalosa	6,5	6,5	6,4
Trehalosa + NaCl	6,5	6,5	6,4
Dextrano-40	6,5	6,5	6,3
Dextrano-40 + NaCl	6,5	6,5	6,4

10 Tabla 10. Pureza por % de área del pico de TAT-NR2B9c, método de MSA

Vehículo no.	Vehículo	% del área del pico de NA-1	
		-20 °C	40 °C
1	Manitol	99,2	98,5
2	Manitol + NaCl	99,4	98,6
3	Trehalosa	99,1	98,5
4	Trehalosa + NaCl	99,3	98,3
5	Dextrano-40	99,2	97,6
6	Dextrano-40 + NaCl	99,0	97,7

Resultados de las formulaciones líquidas de agentes de carga sobre la estabilidad de TAT-NR2B9c

15 El manitol, la trehalosa y el dextrano-40 mantienen el pH en 6,5 bien (Tabla 9) y hay una disminución de la pureza de aproximadamente el 1 % (Tabla 10) durante 1 semana como una formación de líquido cuando se almacena a alta temperatura. En términos de la estabilidad química de la disolución de llenado de liofilización de TAT-NR2B9c, el manitol y la trehalosa son agentes de carga preferidos ya que confieren mejor estabilidad a TAT-NR2B9c que las disoluciones de dextrano-40 (Figura 3).

20

Ejemplo 5: Análisis térmico de agentes de carga para facilitar el diseño de ciclos de liofilización

25 Como parte del desarrollo del ciclo de liofilización para el producto farmacológico liofilizado TAT-NR2B9c, las disoluciones de llenado propuestas a partir de la matriz de muestra del agente de carga (Tabla 8) se evaluaron mediante Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC) para las características térmicas, incluyendo la transición vítrea (Tg) en la formulación. Los resultados se listan en la Tabla 11 y las trazas de DSC se incluyen en las Figuras 4A-6B.

Tabla 11. Transiciones vítreas de disoluciones de llenado de liofilización de TAT-NR2B9c

Vehículo	T _g
Histidina 50 mM, pH 6,5, manitol 120 mM	-37,25 °C
Histidina 50 mM, pH 6,5, manitol 120 mM, NaCl 75 mM	-42,51 °C
Histidina 50 mM, pH 6,5, trehalosa 120 mM	-28,25 °C
Histidina 50 mM, pH 6,5, trehalosa 120 mM, NaCl 75 mM	-35,74 °C
Histidina 50 mM, pH 6,5, Dextrano-40 al 5 %	-17,09 °C
Histidina 50 mM, pH 6,5, Dextrano-40 al 5 %, NaCl 75 mM	-22,49 °C

- 5 A una concentración de TAT-NR2B9c de 20 mg/ml, las formulaciones de TAT-NR2B9c ensayadas mostraron un perfil térmico caracterizado por un amplio evento de fusión con un inicio a baja temperatura. Este fundido extendido enmascaró el evento de cristalización que se observa típicamente en las formulaciones de manitol, y puede indicar que se debe realizar un ciclo de liofilización robusto donde el producto nunca supera la temperatura de transición vítreo. En este caso, sobre la base de las transiciones vítreas observadas de la disolución de llenado del producto farmacéutico TAT-NR2B9c, el uso de manitol como un agente de carga requeriría una temperatura de secado
- 10 primario inferior a -40 °C, el límite típico de factibilidad para un ciclo escalable. En términos de perfiles térmicos, la trehalosa y el dextrano-40 son superiores para su uso como un agente de carga. Sin embargo, dado que la estabilidad de TAT-NR2B9c en las formulaciones líquidas que contienen trehalosa fue superior a las que contenían dextrano, la trehalosa sería el agente de carga preferido de los ensayados.
- 15 Debido a las temperaturas relativamente bajas de T_g que probablemente requerirían un ciclo de liofilización más largo para secarse, observamos un rango más amplio de agentes de carga estándar y tratamos de reducir el volumen de llenado en el sistema de cierre del contenedor para que hubiera un volumen reducido de líquido para liofilizar. En un esfuerzo por disminuir el volumen de llenado y mantener 270 mg/vial, se realizó un estudio de solubilidad de TAT-NR2B9c en histidina, pH 6,5 y en histidina + trehalosa, pH 6,5. Las muestras se analizaron
- 20 visualmente a 35, 50, 75 y 100 mg/ml. Todas las disoluciones fueron claras a t= 0 y t= 24 horas. Sobre la base de estos datos, podríamos utilizar un volumen de llenado inferior a 3 ml, que al usar una formulación de TAT-NR2B9c de 90 mg/ml proporcionaría 270 mg en un vial diana. Se puede requerir un amplio rango de cantidades en un vial, pero 270 mg proporcionarían una dosis de 2,6 mg/kg para un paciente de 100 kg. Asumiendo que la concentración de reconstitución diana para la administración al paciente aún sea de 20 mg/ml (pero puede ser de 1 mg/ml a 100
- 25 mg/ml), entonces se puede usar un vial de liofilización de 20 ml que contiene 270 mg de TAT-NR2B9c con un volumen de reconstitución de 13,5 ml. Por lo tanto, los volúmenes óptimos de líquido para la liofilización de TAT-NR2B9c en el vial serían entre 2,5 ml y 10 ml.
- 30 Se ensayó un rango más amplio de agentes de carga antes de avanzar hacia el desarrollo de la liofilización, y las T_g se muestran en la Tabla 12. Los 100 mg/ml de TAT-NR2B9c en histidina, pH 6,5 también se evaluaron mediante DSC y los datos se incluyen en la Tabla 12.

Tabla 12. Datos de DSC, Formulaciones

Formulación	Agente de carga	Vehículo		Disolución de llenado
		T _g	Temp de cristalización	DP
1	Sorbitol	-41,03 °C		
2	Dextrosa	-38,78 °C		
3	Sacarosa	-31,09 °C		
4	Manitol	-37,38 °C	-22,91 °C	-35,49 °C
5	Trehalosa	-29,93 °C		-28,25 °C
6	Lactosa	-27,93 °C		
7	75:25 Trehalosa:Dextrano-40	-25,07 °C		-25,07 °C
8	50:50 Trehalosa:Dextrano-40	-22,60 °C		-22,60 °C
9	25:75 Trehalosa:Dextrano-40	-18,55 °C		-18,55 °C
10	Dextrano-40			-17,09 °C
11	100 mg/ml de NA-1 en histidina, pH 6,5			-21,67 °C

Sobre la base de los datos de DSC en la Tabla 12, hay varias opciones de formulación para productos farmacéuticos tanto activos como placebo. En general, las formulaciones 5 y 11 son las más prometedoras para el producto activo con respecto a la T_g. Cualquier agente de carga puede ser adecuado para su uso en un producto placebo, pero la Formulación 4 (Manitol) tendrá la duración del ciclo más corto si se recuece, y puede ser la más deseable si la apariencia coincide con el activo.

A medida que determinamos una formulación activa óptima, es importante considerar la estabilidad de la disolución, la solidez del ciclo de liofilización y la estabilidad química. La Formulación 5 de la Tabla 12 (Trehalosa) demostró una buena estabilidad de la disolución y estabilidad química del líofilo en condiciones aceleradas (datos mostrados posteriormente), pero requiere un ciclo de liofilización más largo con una configuración de llenado de 13,5 ml. Esta mayor duración del ciclo puede no ser ideal para la fabricación comercial en el futuro, donde es deseable un ciclo más corto. La Formulación 11 de la Tabla 12 (sin un agente de carga, a 100 mg/ml de TAT-NR2B9c) tiene una temperatura de transición vítrea más alta que la Formulación 5, lo que permite un ciclo más cálido y más corto. Además, una disminución del volumen de llenado acortará significativamente el tiempo de operación, ya que habrá menos hielo para sublimar de cada vial.

Ejemplo 6: Estabilidad de TAT-NR2B9c con diversos agentes de carga, escalas y condiciones de liofilización

Estabilidad acelerada del agente de carga

Se liofilizó un pequeño lote de producto farmacéutico TAT-NR2B9c para evaluar la estabilidad del estado sólido después de 1 semana a 25 °C, 40 °C y 60 °C. TAT-NR2B9c se formuló a una concentración activa de 20 mg/ml en tres vehículos diferentes. Las muestras se evaluaron para determinar su apariencia, reconstitución, pH, cantidad y pureza por HPLC (método de MSA) en t= 0 y t= 1 semana. El contenido de agua se evaluó en t= 0 solamente.

Todos los productos farmacéuticos TAT-NR2B9c aparecieron como tortas blancas liofilizadas y se reconstituyeron en menos de 10 segundos a t= 0 y t= 1 semana.

Los vehículos del producto farmacéutico se describen en la Tabla 13 y se listan con los resultados correspondientes de temperatura de transición vítrea y contenido de agua. Los resultados de pH, cantidad de TAT-NR2B9c pureza

de TAT-NR2B9cse describen en las Tablas 14-16.

Tabla 13. Matriz de muestra de agente de carga: Tg y % de contenido de agua

Vehículo no.	Vehículo	T _g	t= 0 % de contenido de agua
1	His 50 mM, pH 6,5+ Trehalosa 120 mM	-29,93 °C -28,25 °C con NA-1	0,29 %
2	His 50 mM, pH 6,5+ Dextrano-40 al 5 %	-22,60 °C	0,05 %
3	His 50 mM, pH 6,5 + 1: 1120 mM Trehalosa:Dextrano-40 al 5 %	-17,09 °C con NA-1	0,10 %

5

Tabla 14. pH, agente de carga escala pequeña de liofilización no. 1

Agente de carga	pH teórico	pH medido			
		t= 0	t= 1 semana 25 °C	t= 1 semana 40 °C	t= 1 semana 60 °C
Trehalosa	6,5	6,4	6,4	6,4	6,4
Dextrano-40	6,5	6,4	6,3	6,3	6,3
1:1 Trehalosa:Dextrano	6,5	6,4	6,3	6,4	6,4

10

Tabla 15. Cantidad (mg/vial), agente de carga escala pequeña de liofilización no. 1

Agente de carga	t= 0	t= 1 semana 25 °C	t= 1 semana 40 °C	t= 1 semana 60 °C
Trehalosa	20,6	20,3	20,7	20,7
Dextrano-40	19,4	19,8	19,5	19,1
1:1 Trehalosa:Dextrano-40	20,3	20,8	20,2	20,2

Tabla 16. Pureza (% de área por HPLC), agente de carga escala pequeña de liofilización no. 1

Agente de carga	t= 0	t= 1 semana 25 °C	t= 1 semana 40 °C	t= 1 semana 60 °C
Trehalosa	98,8	98,8	98,8	98,4
Dextrano-40	98,9	98,9	98,6	96,5
1:1 Trehalosa:Dextrano-40	98,9	98,8	98,6	97,5

15 Los tres agentes de carga, trehalosa, dextrano-40 y trehalosa:dextrano-40, mantienen el pH en 6,5 (Tabla 14) y hay un rango de disminución de la pureza del 0,5-2,5 % a 60 °C después de 1 semana (Tabla 15). Ambos productos farmacéuticos que contienen dextrano-40 y almacenados a 60 °C mostraron un crecimiento en sustancias relacionadas a un tiempo de retención (RT) ~ 6,0. Estas sustancias relacionadas no estaban presentes

en las muestras de trehalosa, lo que sugiere que la trehalosa tiene un efecto estabilizador en el producto farmacéutico liofilizado y el dextrano-40 puede causar un producto de degradación específico.

5 La inclusión de dextrano-40 en el agente de carga permite una temperatura de secado primario más cálida, pero el dextrano-40 como un agente de carga demostró la peor estabilidad. La combinación de trehalosa y dextrano-40 (1:1) da lugar a una temperatura de transición vítrea que es aproximadamente 10 °C más cálida que la trehalosa sola. Sin embargo, parece que la estabilidad a 60 °C es intermedia a las muestras de trehalosa y dextrano solo, de modo que la trehalosa es un agente de carga preferido.

10 Desarrollo de la formulación de TAT-NR2B9cliofilizada: Experimento a pequeña escala no. 2

Se liofilizó un pequeño lote de producto farmacéutico TAT-NR2B9c para evaluar el ajuste de la temperatura de almacenamiento a 5 °C durante el secado primario. TAT-NR2B9c se formuló a una concentración activa de 27 mg/ml en histidina 50 mM, pH 6,5 y trehalosa 120 mM. Los parámetros del ciclo se resumen en la Tabla 17. Cuatro viales de liofilización de vidrio de 20 ml se llenaron con 10 ml. Se probaron dos viales con sondas de temperatura.

Tabla 17. Pequeña escala 2, desarrollo de la formulación de TAT-NR2B9c

Función	Temperatura (°C)	Retención/Tasa	Tasa (°C/minuto)	Tiempo (minutos)	Presión (mTorr)
carga	5	Retención	-	0	Ambiente
Equilibrado	5	Retención	-	120	Ambiente
Congelación	-40	Tasa	0,5	90	Ambiente
Congelación	-40	Retención	-	240	Ambiente
Secado primario ¹	5	Tasa	0,25	180	225
Secado primario ¹	5	Retención	-	2.050	50
Secado secundario	25	Tasa	0,1	200	50
Secado secundario	25	Retención	-	1.440	50
Tapón	20	Retención	-	-	Nitrógeno/Ambiente
Descargar	20	Retención	-	-	Ambiente

¹Temperatura de secado primario basada en el tamaño del vial grande y el volumen de llenado, no relacionado directamente con la temperatura de transición vítrea.

20 Debido al gran volumen de llenado, es necesario ajustar la temperatura del estante considerablemente más caliente que la temperatura de transición vítrea con el fin de compensar el enfriamiento por evaporación. La temperatura de la disolución durante el secado primario fue a -29 °C, que está cerca de la temperatura de transición vítrea de -28 °C a partir del análisis térmico de DSC.

25 Estabilidad acelerada del liófilo de 90 mg/ml de TAT-NR2B9c (Pequeña Escala 3)

30 Antes de formular la disolución de llenado 3 a pequeña escala, se evaluó el pH de un TAT-NR2B9c de 90 mg/ml en un tampón (histidina 50 mM, pH 6,5). El pH de la disolución fue de 6,04. Se determinó que con el aumento de la concentración de TAT-NR2B9c, la fuerza de tamponamiento también debía aumentar. Las disoluciones se prepararon a 150 mM, 100 mM, 75 mM y agua y se evaluaron para determinar el pH. Los pH se listan en la Tabla 18. La pequeña escala 3 se formuló en un tampón de histidina 100 mM a pH 6,5, y el pH se reajustó a 6,5 después de la adición de TAT-NR2B9c.

Tabla 18. pH, 90 mg/ml de TAT-NR2B9c en tampones de histidina, pH 6,5

35

Tampón	pH
Agua	5,39
50 mM	6,04
75 mM	6,04
100 mM	6,29
150 mM	6,14

Se liofilizó un pequeño lote de producto farmacéutico TAT-NR2B9c para evaluar la estabilidad del estado sólido después de 1 semana de almacenamiento a 25 °C y 60 °C. Se formularon dos formulaciones de 90 mg/ml de TAT-NR2B9c (tampón y tampón con trehalosa). Las muestras se evaluaron para determinar su apariencia, reconstitución, contenido de agua y pureza por HPLC (método de MSA) en t= 0 y t = 1 semana.

5 Todos los productos farmacéuticos TAT-NR2B9c aparecían como tortas blancas liofilizadas. Algunas tortas estaban agrietadas. Las formulaciones de placebo fueron visualmente similares a las formulaciones activas.

10 El tiempo de reconstitución fue de aproximadamente 1,5 minutos en comparación con menos de 10 segundos en las formulaciones anteriores. El tiempo de reconstitución incrementado se debe lo más probablemente a las concentraciones incrementadas de TAT-NR2B9c e histidina. Los ensayos adicionales mostraron una buena estabilidad de TAT-NR2B9c con concentraciones de tampón de histidina de 50 y 75 mM, con tiempos de resuspensión más cortos. Además, debido al tamaño del vial de 2 ml usado para este estudio, solo se añadió 1 ml de agua al liófilo. El volumen de reconstitución real es de 4,5 ml en esta configuración a pequeña escala. El tiempo de reconstitución probablemente mejorará cuando se use un mayor volumen de diluyente.

15 Los viales se pusieron en estabilidad a 25 °C y 60 °C y se ensayaron después de 1 semana de almacenamiento.

20 Sobre la base de los datos de la apariencia visual, la muestra de trehalosa proporcionó una torta más elegante. El ciclo de liofilización se realizó de forma conservadora durante 5 días, con una temperatura de secado primario de - 32°. Sobre la base de los datos de la sonda de temperatura, el ciclo se puede acortar, lo que demuestra que con la mayor concentración y el menor volumen de llenado, el ciclo optimizado será más corto.

25 Los resultados de pureza se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19. Pureza (% de área por HPLC), pequeña escala 3

Formulación	Composición	Disolución de llenado	t= 0	t= 1 semana. 25 °C/ 60 % HR	t= 1 semana, 60 °C
1	His 100 mM, pH 6,5	99,2	99,3	99,3	97,8
2	His 100 mM, pH 6,5 + trehalosa 120 mM	99,2	99,3	99,2	98,7

30 Sobre la base de estos datos de estabilidad acelerada, la trehalosa demuestra un efecto estabilizador en la formulación de TAT-NR2B9c que mejora la estabilidad química del liófilo. Es sorprendente que la trehalosa sea capaz de conferir este efecto estabilizador, mientras que otros agentes de carga estándar, tales como el dextrano y el manitol usados para otros péptidos, no lo hacen.

35 El volumen de llenado reducido minimiza el enfriamiento por evaporación competitivo de los viales circundantes y minimiza la resistencia al agua de sublimación.

Desarrollo del ciclo de liofilización - Pequeña escala 4 (Placebo y activo)

40 Se inició la pequeña escala 4 del desarrollo del ciclo de liofilización para ensayar la apariencia de la torta y las condiciones de liofilización para un llenado de 3 ml. Las muestras ensayadas fueron His 100 mM, pH 6,5 con trehalosa 120 mM y 90 mg/kg de TAT-NR2B9c o una muestra idéntica eliminando la trehalosa. Se realizó un ciclo conservador de 4 días como se describe en la Tabla 20. Los viales de placebo y activos se incluyeron con una configuración de llenado de 3 ml en un vial de liofilización de vidrio de 20 ml en lugar de los pequeños viales usados para los experimentos anteriores. Se usó una sonda de temperatura activa para confirmar la temperatura durante el ciclo de liofilización. Los viales activos resultantes se muestran en la Figura 7A.

Tabla 20. Parámetros de liofilización para la pequeña escala 4

Función	Temperatura (°C)	Retención/Tasa	Tasa (°C/minuto)	Tiempo (minutos)	Presión (mTorr)
Carga	5	Retención	-	0	Ambiente
Equilibrado	5	Retención	-	120	Ambiente
Congelación	-40	Tasa	0,5	90	Ambiente

ES 2 974 228 T3

Congelación	-40	Retención	-	120	Ambiente
Secado primario	-30	Tasa	0,25	40	225
Secado primario	-30	Retención	-	3.400	50
Secado Secundario	25	Tasa	0,1	550	50
Secado Secundario	25	Retención	-	1.440	50
Tapón	20	Retención	-	-	Nitrógeno/Ambiente
Descargar	20	Retención	-	-	Ambiente

La formulación a 90 mg/ml en un vial de 20 ml formó una torta elegante en un ciclo de 4 días, y los datos de la sonda de temperatura sugirieron que el ciclo podría acortarse a 3 días.

- 5 El contenido de agua para el placebo y activo fue el 0,01 % y 0,00 %.

Desarrollo del ciclo de liofilización - Pequeña escala 5 (Placebo y activo)

- 10 Se realizó una pequeña escala 5 para observar el desarrollo de un vial de placebo concordante para los ensayos clínicos y para observar los tiempos de resuspensión para formulaciones a una escala comercial potencial (270 mg/vial). Se evaluaron 10 formulaciones de placebo y 1 formulación activa para determinar la apariencia y el tiempo de reconstitución. Las tortas activas eran elegantes, tortas blancas con una contracción menor que dieron lugar a una grieta alrededor de la superficie de la pared del vial. Las tortas de placebo eran blancas con más grietas en las tortas que contenían cantidades crecientes de trehalosa.

- 15 Los viales fueron reconstituídos con 13,5 ml de agua. El tiempo para la disolución se lista en la Tabla 21. El liófilo activo se resuspendió inmediatamente, pero estuvo turbio durante 17,6 segundos antes de convertirse en una disolución clara e incolora. Todos los placebos eran una disolución clara e incolora.

- 20 Tabla 21. Reconstitución de placebo y activo (SS5)

Formulación de placebo no.	Formulaciones			Tiempo de reconstitución (min)	
	Trehalosa, mM	Histidina, mM	Total, mg/vial	Vial no. 1	Vial no. 2
1 (Control)	120	100	170	< 10 seg	< 10 seg
2	200	100	252	<10 seg	<10 seg
3	300	100	355	<10 seg	<10 seg
4	400	100	457	<10 seg	<10 seg
5	500	100	560	<10 seg	<10 seg
6	120	20	133	<10 seg	<10 seg
7	200	20	215	<10 seg	<10 seg
8	300	20	317	<10 seg	<10 seg
9	400	20	420	<10 seg	<10 seg
10	500	20	523	<10 seg	<10 seg
Formulación activa no.	Trehalosa, mM	Histidina, mM	NA-1, mg	Vial no. 1	Vial no. 2
1 (Control)	120	100	90	17,6 seg	NA

- 25 Sobre la base de la estabilidad, los tiempos de resuspensión y los tiempos de liofilización, una formulación comercial preferida para TAT-NR2B9c, la preliofilización, sería histidina 20-100 mM, trehalosa 120 mM, pH 6,5. Las concentraciones de trehalosa se pueden aumentar sin perder la estabilidad o la elegancia de la torta, pero sí los tiempos de resuspensión.

- 30 Examen del aumento de la trehalosa en la formación de la torta y concordancia con placebo por la apariencia visual y el tiempo de resuspensión.

Para concordar mejor con un placebo, se ensayaron concentraciones variadas de trehalosa con y sin TAT-NR2B9c, y en volúmenes de llenado de 3 o 5 ml.

ES 2 974 228 T3

En primer lugar, se resumirán las formulaciones activas y las formulaciones de placebo. Después, se destacarán las concordancias visuales principales para el llenado de 3 ml y el llenado de 5 ml. Actualmente se están analizando muestras analíticas (disolución de llenado y una muestra de potencia). Las Tablas 22 y 23 muestran un subconjunto de las formulaciones ensayadas.

5

Tabla 22. Formulaciones activas

Formulación	Volumen de llenado	Composición
1	3 ml	270 mg/vial en trehalosa 120 mM + histidina 100 mM, pH 6,5
2	3 ml	270 mg/vial en trehalosa 500 mM + histidina 20 mM, pH 6,5
3	5 ml	270 mg/vial en trehalosa 120 mM + histidina 50 mM, pH 6,5

10 La Figura 7B muestra la apariencia de las formulaciones activas listadas anteriormente.

Tabla 23. Formulaciones de placebo

Formulaciones de placebo	Formulaciones activas (~ 270 mg/vial)
Trehalosa 500 mM + Histidina 20 mM (n= 7)	Trehalosa 500 mM + Histidina 20 mM (n= 2)
Trehalosa 400 mM + Histidina 20 mM (n= 3)	Trehalosa 400 mM + Histidina 20 mM (n= 1)
Trehalosa 300 mM + Histidina 20 mM (n= 3)	Trehalosa 300 mM + Histidina 20 mM (n= 1)

15 La Tabla 24 muestra las condiciones del ciclo de liofilización para las muestras anteriores

Tabla 24. Parámetros del ciclo

Función	Temperatura (°C)	Retención/Tasa	Tasa (°C/minuto)	Tiempo (minutos)	Presión (mTorr)
Carga	5	Retención	-	0	Ambiente
Equilibrado	5	Retención	-	120	Ambiente
Congelación	-40	Tasa	0,25	180	Ambiente
Congelación	-40	Retención	-	120	Ambiente
Recocer	-27	Tasa	0,25	52	Ambiente
Recocer	-27	Retención	-	120	Ambiente
Congelar	-40	Tasa	0,25	52	Ambiente
Congelar	-40	Retención	-	120	Ambiente
Secado primario	-30	Tasa	0,25	40	225
Secado primario	-30	Retención	-	4406	50
Secado Secundario	25	Tasa	0,1	550	50
Secado Secundario	25	Retención	-	1.440	50
Tapón	20	Retención	-	-	Nitrógeno/Ambiente
Descargar	20	Retención	-	-	Ambiente

20 Tabla 25. Resumen de las concordancias principales

ES 2 974 228 T3

Nombre de la muestra	Color y Acabado: (Brillo o Mate)	Topografía Ej. exterior, bultos, grietas, pico, virutas	Estructura: densa o porosa	Contracción	Friabilidad	Tiempo de Reconstitución
SS6 - Llenados de 3 ml						
Activo no. 2 Trehalosa 500 mM Histidina 50 mM	mate blanquecino	grietas finas	denso	mínimo	véase la foto	2 min 30 seg
Placebo P2 Trehalosa 500 mM Histidina 20 mM	mate blanquecino	agrietado	denso	mínimo		1 min
SS7 - Llenados de 5 ml						
Activo Trehalosa 500 mM Histidina 20 mM	mate blanquecino con motas brillantes	fondo picado agrietado	semidenso, en capas	sí, base de la torta	NT	1 min
Placebo Trehalosa 300 mM Histidina 20 mM	mate blanquecino con motas brillantes	fondo picado agrietado	semidenso, más poroso que activo	mínimo		20 seg sin recocer. 38 seg

NT= no ensayado

Ejemplo 7: Estabilidad de 270 mg de TAT-NR2B9c liofilizados en tampón de histidina 20 mM, pH 6,5 y trehalosa 120 mM

5 Preparación del producto farmacéutico liofilizado

Se formuló un pequeño lote de producto farmacéutico TAT-NR2B9c a 90 mg/ml en histidina 20 mM, pH 6,5 y trehalosa 120 mM, y se liofilizó para evaluar la estabilidad del estado sólido después de 4 semanas a -20 °C, 40 °C y 60 °C. La Tabla 25 muestra las condiciones de liofilización.

10

Tabla 25: Condiciones del ciclo de liofilización para el Ejemplo 7

Función	Temperatura (°C)	Retención/Tasa	Tasa (°C/minuto)	Tiempo (minutos)	Presión (mTorr)
Carga	5	Retención	-	0	Ambiente
Equilibrado	5	Retención	-	120	Ambiente
Congelación	-40	Tasa	0,5	90	Ambiente
Congelación	-40	Retención	-	120	Ambiente
Secado primario	-28	Tasa	0,25	48	225
Secado primario	-28	Retención	-	3.412	50
Secado secundario	25	Tasa	0,1	530	50
Secado secundario	25	Retención	-	1.440	50
Tapón	20	Retención	-	-	Nitrógeno/Ambiente
Descargar	20	Retención	-	-	Ambiente

15 Las muestras se almacenaron en hornos a temperatura constante y la pureza, la potencia y el tiempo de reconstitución en 13,2 ml (para un volumen final de 13,5) se evaluaron a 0, 1, 2 y 4 semanas. Los datos para cada temperatura y tiempo de almacenamiento se presentan en las Tablas 26A-C.

Tabla 26A: Estabilidad a -20 °C

Parámetro	t= 0	t= 4 semanas
Apariencia	Torta blanca densa	Torta blanca densa

ES 2 974 228 T3

Tiempo de reconstitución	~ 60 seg		~ 60 seg	
pH	6,32		TBD	
Contenido de agua	0,02 %		NT	
% de contenido declarado, método de TFA	99,0 %		101,3 %	
Pureza total, método de MSA (% de área)	99,2 %		99,2 %	
Impurezas individuales	RRT	% de Área	RRT	% de Área
	0,59	0,02 %	0,59	0,02 %
	ND	ND	0,95	0,01 %
	0,97	0,26 %	0,98	0,21 %
	1,04	0,26 %	1,05	0,32 %
	1,07	0,09 %	1,09	0,04 %
	1,10	0,13 %	1,11	0,12 %
	ND	ND	1,14	0,03 %
1,15	0,02 %	1,16	0,02 %	
NA-1 desamidado, método de SCX (% de área)	<0,05 %		TBD	

Tabla 26B: Estabilidad a 40 °C

Parámetro	t= 0		t= 1 semana		t= 2 semanas		t= 4 semanas	
Apariencia	Torta blanca densa		Torta blanca densa		Torta blanca densa		Torta blanca densa	
Tiempo de reconstitución	~ 60 seg		~ 60 seg		~ 60 seg		~ 60 seg	
pH	6,32		6,55		6,21		TBD	
Contenido de agua	0,02 %		NT		NT		NT	
% de contenido declarado, método de TFA	99,0 %		97,0 %		100,6 %		100,6 %	
Pureza total, método de MSA (% de área)	99,2 %		99,1 %		98,9 %		99,0 %	
Impurezas individuales	RRT	% de Área	RRT	% de Área	RRT	% de Área	RRT	% de Área
	0,59	0,02 %	0,59	0,02 %	0,62	0,02 %	0,59	0,02 %
	0,97	0,26 %	0,97	0,26 %	0,95	0,02 %	0,95	0,01 %
	1,04	0,26 %	1,04	0,25 %	0,98	0,21 %	0,97	0,17 %
	1,07	0,09 %	1,07	0,13 %	1,05	0,33 %	1,05	0,27 %
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,08	0,19 %
	1,10	0,13 %	1,10	0,15 %	1,10	0,17 %	1,10	0,19 %
	ND	ND	1,13	0,04 %	1,13	0,16 %	1,13	0,05 %
	1,15	0,02 %	1,15	0,02 %	1,15	0,05 %	1,15	ND
	ND	ND	ND	ND	1,17	0,05 %	1,16	0,02 %
	1,26	0,01 %	1,26	0,01 %	1,29	0,01 %	1,28	0,01 %
1,29	0,01 %	1,29	0,02 %	1,31	0,04 %	1,30	0,07 %	
NA-1 desamidado, Método de SCX (% de área)	<0,05 %		NT		NT		TBD	

Tabla 26C: Estabilidad a 60 °C

Parámetro	t= 0	t= 1 semana	t= 2 semanas	t= 4 semanas				
Apariencia	Torta blanca densa	Torta blanca densa	Torta blanca densa	Torta blanca densa				
Tiempo de reconstitución	~ 60 seg	~ 60 seg	~ 60 seg	~ 60 seg				
pH	6,32	6,43	6,29	6,29				
Contenido de agua	0,02 %	NT	NT	NT				
% de Contenido declarado, método de TFA	99,0 %	97,3 %	101,5 %	101,5 %				
Pureza total, método de MSA (% de área)	99,2 %	98,8 %	98,3 %	98,0 %				
Impurezas individuales	RRT	% de Área	RRT	% de Área	RRT	% de Área	RRT	% de Área
	ND	ND	0,53	0,01 %	0,53	0,01 %	0,51	0,02 %
	0,59	0,02 %	0,59	0,03 %	0,62	0,02 %	0,59	0,02 %
	ND	ND	0,91	0,01 %	0,91	0,02 %	0,92	0,01 %
	ND	ND	0,95	0,02 %	0,95	0,02 %	0,95	0,03 %
	0,97	0,26 %	0,97	0,26 %	0,98	0,25 %	0,97	0,20 %
	1,04	0,26 %	1,04	0,23 %	1,05	0,33 %	1,05	0,28 %
	1,07	0,09 %	1,07	0,24 %	1,07	ND ¹	1,08	0,59 %
	1,10	0,13 %	1,10	0,23 %	1,09	0,37 %	1,10	0,44 %
	ND	ND	1,12	0,05 %	1,12	0,30 %	1,13	0,09 %
	1,15	0,02 %	1,15	0,02 %	1,15	0,10 %	1,15	0,05 %
	ND	ND	ND	ND	1,17	0,07 %	1,17	ND
	1,26	0,01 %	1,26	0,01 %	1,26	<0,01 %	1,27	0,01 %
1,29	0,01 %	1,29	0,08 %	1,30	0,17 %	1,30	0,29 %	
NA-1 desamidado, Método de SCX (% de área)	<0,05 %	NT	NT	TBD				

¹Pérdida de resolución en torno al pico principal.

- 5 Esta formulación de TAT-NR2B9c es estable a -20 °C. Para temperaturas de almacenamiento de 40 °C y 60 °C, las impurezas potenciales con tiempos de retención relativos (RRT) de 1,07, 1,1 y 1,29 aumentaron lentamente usando el ensayo de HPLC MSA, con el mayor crecimiento apareciendo en 1,07 RRT. Para la temperatura de almacenamiento de 40 °C, la impureza aumenta de 0,09 % a 0,27 % durante 1 mes, y para la temperatura de almacenamiento de 60 °C la impureza aumenta de 0,09 % a 0,59 %. No se observaron impurezas a -20 °C.
- 10 Las impurezas interpoladas usando la ecuación de Arrhenius son menores del 0,5 % después de 16 meses a 25 °C o 123 meses a 5 °C, y menores del 2 % durante > 60 meses a temperatura ambiente y muchos años a 5 °C. Por lo tanto, esta y las formulaciones relacionadas son adecuadas para el almacenamiento a temperatura ambiente de un producto farmacéutico liofilizado.
- 15 Se permitió que este estudio de degradación continuara otro mes para confirmar que los productos de degradación observados a 60 °C también eran evidentes a 40 °C. Estas tres impurezas parecían ocurrir a la temperatura más baja, lo que indica que es probable que sean productos de degradación que no son específicos de temperaturas muy elevadas. Las identidades de estas especies se determinaron mediante estudios de LC/MS/MS y se descubrió que todas comprenden acetilación del compuesto TAT-NR2B9c de longitud completa. Estos eventos de acetilación
- 20 ocurrieron tanto en el extremo N-terminal del péptido como en las cadenas laterales de lisina. Por lo tanto, la estabilidad de TAT-NR2B9c podría aumentarse añadiendo un depurador u otros excipientes para reducir la acetilación de TAT-NR2B9c en el estado liofilizado o reduciendo o eliminando el acetato para que haya una posibilidad reducida de acetilación.
- 25 Conclusiones generales
- Sobre la base de la estabilidad, los tiempos de resuspensión y los tiempos de liofilización, una formulación comercial preferida para TAT-NR2B9c es histidina 20-100 mM, trehalosa 120 mM, pH 6,5. Las concentraciones de trehalosa pueden aumentarse sin pérdida de estabilidad o elegancia de la torta, pero los tiempos de resuspensión aumentan con la concentración incrementada de trehalosa.
- 30

Ejemplo 8: Desarrollo y estabilidad de una sal de cloruro de TAT-NR2B9c (TAT-NR2B9c-Cl)

Preparación del producto farmacéutico liofilizado

5 Debido a la inestabilidad de las formulaciones en solución salina de TAT-NR2B9c desarrolladas anteriormente, y la observación de que puede producirse la acetilación de la sal de acetato de TAT-NR2B9c en formulaciones liofilizadas, la sal de acetato se cambió a una sal de cloruro. Esto se realice mediante RP-HPLC preparativa mediante el uso de cloruro de amonio. El objetivo de este método es identificar una nueva composición de materia y una nueva formulación que mejorará la estabilidad de TAT-NR2B9c, preferiblemente con estabilidad mejorada a temperatura ambiente y 37 °C. Debido a que TAT-NR2B9c es eficaz cuando se administra a víctimas potenciales de accidente cerebrovascular y otros trastornos neurológicos, y existe un gran valor para el tratamiento temprano de estos trastornos, una formulación que es estable fuera de las condiciones de hospital podría ser de valor en la ayuda de millones de personas afectadas por estos trastornos cada año. Por ejemplo, tal fármaco podría almacenarse en ambulancias, clínicas pequeñas, consultorios o incluso estar disponibles para individuos, y proporcionarse a sujetos que tienen trastornos neurológicos tales como accidente cerebrovascular u otras enfermedades susceptibles a agentes neuroprotectores mucho antes de lo que pudieran administrarse si tuvieran que viajar a un hospital para tratamiento.

Protocolo del proceso general:

Tampón A: Agua
 Tampón B: Acetonitrilo
 Columna: Daisogel ODS C-18 (1 Kg), 120 Å, 15 µm, 10 cm (Volumen de lecho: ~ 1L)
 Caudal: 250 mL/min.
 Longitud de onda: 230 nm
 Gradiente: Expulsar con B al 20 %

- 20 (1) La columna se lavó con 2 Volúmenes de lecho (BV) de CH₃OH al 80 %
 (2) Se pasó 2 BV de HCl 0,025 % en agua o TFA al 0,1 % TFA, que fue superior
 25 (3) Se cargo la muestra: 30 g de acetato de TAT-NR2B9c (PPL-NA11301) se disolvió en 1,5 L de agua USP (20 g/L) condiciones bajo las cuales, TAT-NR2B9c se une a la columna;
 (4) Se enjuagó con 200 mL de agua USP (también cargada a la columna) eliminando el contraión de acetato existente
 30 (5) Se pasaron 3 BV de cloruro de amonio (NH₄Cl) 0,1M para suministrar el nuevo contraión de cloruro;
 (6) Se pasaron 2 BV 2 %
 35 (7) Se pasaron B (acetonitrilo) al 20 % para eluir el producto
 (8) Se recolectaron las fracciones cuando el pico del producto eluyó
 (9) Las fracciones se analizaron mediante HPLC analítica
 40 (10) La columna se volvió a lavar con 3 BV de CH₃OH al 80 %

Sistema de HPLC analítico:

45 Columna YMC ODS-A C18, 5 µm, 120Å; Caudal: 1,5 mL/min.; Longitud de onda: 210 nm; Temperatura: 50 °C; Gradiente: B al 20 % a 35 % en 15 min.; Tampón A = NaClO₄ 0,1M pH 3,1, Tampón B = ACN al 100 %

Resultados y análisis de síntesis:

50 Dos grupos principales recolectados de las corridas se mezclaron y liofilizaron (~5L). Se recolectaron 23,4 g del producto final, con una pureza del 99,01 %. El acetato residual fue inferior al 1 %. Los refinamientos estándar del protocolo deberían poder aumentar el rendimiento del 78 % a >95 %. Este procedimiento puede usarse de manera similar para intercambiar una sal de TFA de TAT-NR2B9c a una sal de cloruro, ya que la sal de TFA se unirá a la columna en la etapa 3 de manera similar

55 Formulación de una forma liofilizada de TAT-NR2B9c-Cl y prueba de estabilidad

TAT-NR2B9c-Cl estaba compuesto de histidina 20 mM y trehalosa 120 mM, pH 6,5, para la comparación directa con una formulación liofilizada preferida previa en las mismas condiciones de liofilización a 270 mg/vial (peso

5 activo). La estabilidad de esta formulación también se comparó con la formulación previamente descrita de TAT-NR2B9c-Ac resuspendida en solución salina y liofilizada. Para este último, se formuló un pequeño lote de producto farmacológico de acetato de TAT-NR2B9c a 90 mg/ml en solución salina (sin otros excipientes) y se liofilizó a 270 mg/vial. La estabilidad de las formulaciones en estado liofilizado se evaluó después de 4 semanas a -20 °C (control), 40 °C y 60 °C.

Tabla 27: Estabilidad de TAT-NR2B9c-Cl (histidina 20 mM, trehalosa 120 mM) frente a TAT-NR2B9c-Ac (solución salina)

Datos de la estabilidad de sal de cloruro de NA-1				Datos de estabilidad de NA-1-Ac en solución salina				
RP-HPLC-TFA	0,899			0,11	0,899			0,11
	0,95				0,95			0,09
	0,97			0,07	0,97			0,08
	0,98				0,98			0,19
	0,99	0,17	0,29	0,43	0,99	0,18	0,23	94,84
	1	98	97,78	96,64	1	97,93	97,42	2,07
	1,02	1,27	1,22	1,36	1,02	1,22	1,39	0,12
	1,03	0,11	0,11	0,16	1,03	0,1	0,1	0,61
	1,05	0,08	0,07	0,09	1,05	0,05	0,16	0,1
	1,06				1,06			0,28
	1,07	0,22	0,24	0,46	1,07	0,2	0,19	0,1
	1,08				1,08			0,07
	1,09			0,06	1,09			0,12
	1,1		0,11	0,09	1,1			0,14
	1,11	0,16		0,09	1,11	0,05	0,06	0,31
	1,12		0,11		1,12	0,17	0,17	0,72
	1,13		0,06		1,13	0,05	0,28	
	1,14			0,09	1,14	0,06		
	1,18				1,18			
	1,19				1,19			
1,26				1,26				
1,34				1,34				
1,36				1,36				
1,4				1,4				
1,48				1,48				
RP-HPLC-MSA	0,94			0,07	0,94			0,05
	0,98	0,11	0,11	0,15	0,98	0,06	0,07	0,08
	1	99,3	99,14	98,68	1	99,13	98,89	96,38
	1,02				1,02			
	1,03	0,27	0,31	0,3	1,03	0,41	0,32	0,42
	1,04	0,07	0,06	0,09	1,04	0,09	0,09	
	1,06	0,25	0,26	0,55	1,06	0,23	0,21	0,22
	1,07		0,12	0,09	1,07	0,08	0,21	1,17
	1,08				1,08			
	1,1			0,07	1,1		0,1	0,59
	1,12				1,12			0,07
	1,14				1,14			0,1
	1,16				1,16			0,06
	1,2				1,2		0,06	0,31
	1,23				1,23			
	1,24				1,24			
1,27				1,27				
1,3				1,3		0,06	0,54	

10 Tabla 28: Estabilidad de TAT-NR2B9c-Cl (histidina 20 mM, trehalosa 120 mM) frente a TAT-NR2B9c-Ac (solución salina) a los 11 meses

	Pico (RRT)	Sal de cloruro de NA-1			NA-1-Ac en solución salina		
		T=11 meses			T=11 meses		
		-20C	40C	60C	-20C	40C	60C
RP-HPLC-TFA	0,899			0,1			
	0,93			0,18			
	0,95			0,16			0,27
	0,97			0,1			0,17
	0,99		0,29	0,38			0,22
	1	98,57	98,14	95,49	98,57	96,48	81,27
	1,02	1,18	1,09	1,42	1,14	1,8	6,51
	1,03	0,07	0,09	0,34	0,09		
	1,05		0,05	0,17		0,51	3
	1,06			0,15		0,06	0,27
	1,07	0,18	0,36	1,05	0,2	0,27	0,62
	1,08					0,08	0,3
	1,09						0,16
	1,1					0,06	0,28
	1,11						0,29
	1,12			0,12		0,33	
	1,13					0,41	3,49
	1,15						0,42
	1,16						0,16
	1,17						0,26
1,18						0,1	
1,19						0,23	
1,2						0,26	
1,22						0,19	
1,23						0,3	
1,24						0,25	
1,26						0,34	
1,261						0,34	
1,34						0,14	
RP-HPLC-MSA		Sal de cloruro de NA-1			NA-1Ac en solución salina		
	0,52						0,13
	0,87			0,13			
	0,91		0,05	0,2			0,23
	0,94		0,09	0,34			0,29
	0,98	0,1	0,12	0,21	0,1	0,12	0,1
	1	99,3	98,71	95,34	99,32	97,08	82,12
	1,02	0,29	0,24	0,61	0,24	0,28	0,82
	1,04	0,07	0,12		0,08	0,11	
	1,06	0,25	0,48	1,48			
	1,07		0,06	0,25	0,25	1,03	6,36
	1,09		0,08	0,26		0,45	3,02
	1,1						0,27
	1,12					0,05	0,23
	1,14			0,17			0,31
	1,15						0,53
	1,16			0,11		0,26	
	1,19						0,33
	1,2						0,1
	1,23		0,05	0,24		0,1	0,59
1,24					0,06	0,59	
1,25			0,18			0,35	
1,26					0,05	0,44	
1,27					0,41	3,18	
1,33						0,26	
1,35						0,15	

La Tabla 27 muestra el área relativa de cada pico observado en cada ensayo de HPLC a cada temperatura después de 1 mes de almacenamiento y en cada tiempo de retención relativo (identidad del pico) para comparación directa. Tanto para las formulaciones como para los métodos, las purzas iniciales son muy similares (98 % para TAT-NR2B9c-CI vs 97,93 % para TAT-NR2B9c-Ac por el método de TFA, y 99,3 % vs 99,13 % para el método de ácido

metanosulfónico (MSA). En cuanto a los datos de 60 °C, la composición de TAT-NR2B9c-CI en histidina y trehalosa es sustancialmente más estable que la formulación de TAT-NR2B9c en solución salina por ambos métodos. Para el método de TFA después de 1 mes de almacenamiento a 60 °C, la sal de TAT-NR2B9c-CI retiene el 98,6 % del pico principal, mientras que la formulación de TAT-NR2B9c-Ac en solución salina solo retiene el 96,8 % del material de partida. Para el método de MSA, la diferencia es aún más sorprendente, donde la sal de TAT-NR2B9c-CI retiene el 99,4 % de su material de partida, mientras que la formación de TAT-NR2B9c-Ac en solución salina solo retiene el 97,2 % de su material de partida.

La Tabla 28 muestra el área relativa de cada pico observado en cada ensayo de HPLC en las mismas muestras después de 11 meses a las diferentes temperaturas de almacenamiento. Estos datos apoyan la estabilidad mejorada de la formulación de sal de NA-1 CI frente a la formulación de NA-1-Ac en cloruro. Comparando el área de los principales picos de NA-1 en el ensayo de TFA a 40 °C, que es la condición acelerada por la guía de ICH para apoyar el almacenamiento a temperatura ambiente de un fármaco liofilizado, el NA-1 - CI retiene el 98,14 % de pureza desde una pureza inicial de 98,58, mientras que el NA-1-Ac en solución salina ha caído de 98,57 puro a 96,48, que está por debajo de la especificación de pureza del 97 % y no se consideraría estable después de aproximadamente un año. La misma tendencia se observa para el ensayo de MSA de 99,3 % puro a 98,71 puro para NA-1-CI y 97,08 para NA-1-Ac en solución salina. Examinando los resultados de pureza de 60 °C después de 11 meses (Tabla 28), las diferencias son significativamente más profundas, siendo NA-1-CI significativamente más estable que NA-1-Ac.

Desde un punto de vista clínico, los límites de pureza de ejemplo para un fármaco para humanos pueden ser del 97 % de pureza sin impurezas no caracterizadas superiores al 0,5 % en la condición de almacenamiento nominal. Usando la ecuación de Arrhenius, pueden usarse los datos de estabilidad a 40 °C y 60 °C para predecir la caída en la pureza del pico principal o el crecimiento de las impurezas observadas a diferentes temperaturas de almacenamiento (por ejemplo, 25 °C o 37 °C frente a los datos observados de 40 °C o 60 °C). Suponiendo que el fármaco se almacenaría a temperatura ambiente, sería útil demostrar estabilidad a 37 °C porque habría muchos entornos sin refrigeración donde la temperatura ambiente en el verano podría estar en este rango. Suponiendo un requisito de pureza del 97,0 % a 37 °C, y con el uso de los datos de estabilidad representativos del ensayo de TFA para la pureza máxima del pico porque es el más sensible (es decir, muestra la mayor disminución de la pureza a 40 °C y 60 °C), se pronostica que la formulación salina tendrá una vida útil de 29,8 meses (o un poco más de 2 años), mientras que la formulación de TAT-NR2B9c-CI tendrá una vida útil de ~500 meses, o aproximadamente 41 años. Esta es una mejora significativa en la estabilidad.

Desde el punto de vista del crecimiento de la impureza más grande (aparte de la impureza en el tiempo de retención relativo (RTT) 1,02 por el método de TFA que es una impureza identificada), el mayor crecimiento de impurezas después de 1 mes para la formulación de TAT-NR2B9c-CI es 0,17 a 0,43 (RRT 0,99 por el método de TFA), mientras que el mayor crecimiento de impurezas para la formulación de TAT-NR2B9c-Ac en solución salina es 0,05-0,72 (1,13 RRT por el método de TFA). Suponiendo que el límite de impurezas anterior sea 0,5 % a 37 °C, y con el uso de la ecuación de Arrhenius junto con los datos de 40 C y 60 C de cada una de estas impurezas, se predice que la formulación en solución salina tendrá una vida útil de ~4,8 meses a 37 °C mientras que se predice que la vida útil de la composición de TAT-NR2B9c-CI será > 10 años. Por lo tanto, desde el punto de vista del nivel total de TAT-NR2B9c o el crecimiento de la impureza más grande, la composición de TAT-NR2B9c-CI es una mejora significativa sobre la formulación en solución salina.

Ejemplo 9: TAT-NR2B9c-CI es más estable que TAT-NR2B9c-Ac en formulaciones en Histidina y Trehalosa

TAT-NR2B9c-CI y TAT-NR2B9c-Ac se formularon a 90 mg/ml en histidina 20 mM, trehalosa 120 mM, pH 6,5. Se liofilizaron alícuotas de tres mililitros (270 mg) de cada una bajo el mismo programa presentado más arriba, y al finalizar se colocaron en incubadoras de temperatura y humedad constantes a -20 °C (control), 40 °C y 60 °C. Después de 4 semanas, se probó la estabilidad de cada formulación con el uso de dos métodos de HPLC ortogonales: uno con TFA como el portador y otro con MSA como el portador.

La Tabla 29 muestra el área relativa de cada pico observado en cada uno de los dos ensayos de HPLC a cada temperatura después de 1 mes de almacenamiento y en cada tiempo de retención relativo (RRT; identidad de pico) para comparación directa. El panel izquierdo representa la formulación de TAT-NR2B9c-Ac y el panel derecho muestra los resultados de la formulación de sal TAT-NR2B9c-CI. El pico en un RRT de 1 corresponde al péptido TAT-NR2B9c intacto en cada ensayo y columna. Tanto para las formulaciones como para los métodos, las puridades iniciales son muy similares (98 % para TAT-NR2B9c-CI vs 98,3 % para TAT-NR2B9c-Ac por el método de TFA, y 99,3 % vs 99,2 % respectivamente para el método de MSA). En cuanto a los datos de 60 °C, la composición de TAT-NR2B9c-CI es sustancialmente más estable que la formulación de TAT-NR2B9c-Ac por ambos métodos. Para el método de TFA después de 1 mes de almacenamiento a 60 °C, la sal TAT-NR2B9c-CI retiene el 98,6 % del pico principal (96,64 % dividido por el 98 % de inicio) mientras que la formulación de TAT-NR2B9c-Ac en solución salina solo retiene el 96 % del material de partida (94,44 % dividido por 98,3 % de pureza de partida). Del método de MSA, la diferencia es aún más sorprendente, donde la sal TAT-NR2B9c-CI retiene el 99,4 % de su material de partida (98,68 %/99,3 %) mientras que la formulación de TAT-NR2B9c-Ac en solución salina solo retiene el 95,6 % de su material partida (94,81 %/99,2 %). Cuando se observan las impurezas más grandes para cualquiera de

ES 2 974 228 T3

las composiciones, está claro que tanto para las condiciones de estabilidad acelerada a 40 °C como a 60 °C, la sal de acetato de TAT-NR2B9c tiene impurezas más grandes y, por lo tanto, es menos estable. La sal de cloruro de TAT-NR2B9c es sorprendentemente más estable que la sal de acetato en condiciones idénticas.

- 5 La Tabla 30 muestra el área relativa de cada pico observado en cada ensayo de HPLC en las mismas muestras después de 11 meses a las diferentes temperaturas de almacenamiento. Estos datos apoyan la estabilidad mejorada de la formulación de sal de NA-1 Cl frente a la sal de NA-1-Ac cuando se formula exactamente en el mismo tampón (histidina 20 mM/trehalosa 120 mM pH 6,5). Comparando el área de los principales picos de NA-1 en el ensayo de TFA a 40 °C, que es la condición acelerada por la guía de ICH para apoyar el almacenamiento a temperatura ambiente de un fármaco liofilizado, el NA-1-Cl retiene el 98,14 % de pureza desde una pureza inicial de 98,58, mientras que el NA-1-Ac en solución salina ha caído de 98,57 puro a 95,91, que está por debajo de la especificación de pureza de 97 % y no se consideraría estable. La misma tendencia se observa para el ensayo de MSA de 99,3 % puro a 98,71 puro para NA-1-Cl y 96,85 % para NA-1-Ac en solución salina. Examinando los resultados de pureza a 60 °C después de 11 meses (Tabla 30), las diferencias son significativamente más profundas, siendo NA-1-Cl significativamente más estable que NA-1-Ac (-95 % puro para ambos ensayos para la sal de cloruro vs -83 % puro para la sal de acetato). Por lo tanto, se predice que la sal de cloruro de NA-1 es sorprendente y significativamente más estable que la sal de acetato en el mismo tampón.

20 Tabla 29: Estabilidad de TAT-NR2B9c-Ac frente a TAT-NR2B9c-Cl liofilizada en histidina 20 mM y trehalosa 120 mM pH 6,5 a las 4 semanas

	RRT	T=4 semanas					RRT	T=4 semanas		
		-20C	40C	60C				-20C	40C	60C
RP-HPLC-TFA	0,86					0,86				
	0,88					0,88				
	0,9					0,9			0,11	
	0,93					0,93				
	0,95					0,95				
	0,97		0,06			0,97			0,07	
	0,98					0,98				
	0,99		0,58	0,56		0,99	0,17	0,29	0,43	
	1		97,19	94,44		1	98	97,78	96,64	
	1,02		1,52	2,18		1,02	1,37	1,25	1,38	
	1,03		0,12	0,13		1,03	0,11	0,11	0,16	
	1,04		0,15	0,71		1,04				
	1,05					1,05	0,08	0,07	0,09	
	1,06		0,07	0,17		1,06				
	1,07		0,23	0,38		1,07	0,22	0,24	0,48	
	1,08			0,16		1,08				
	1,09			0,15		1,09			0,08	
	1,1			0,18		1,1		0,11	0,09	
	1,11			0,21		1,11	0,16		0,09	
	1,12					1,12		0,11		
1,13		0,09	0,75		1,13		0,06			
1,14					1,14			0,08		
1,26					1,26					
1,34					1,34					
1,36					1,36					
1,4					1,4					
1,48					1,48					
	RRT	T=4 semanas					RRT	T=4 semanas		
		-20C	40C	60C				-20C	40C	60C
RP-HPLC-MSA	0,77					0,77				
	0,84			0,09		0,84			0,07	
	0,86		0,12	0,19		0,86	0,11	0,11	0,15	
	0,89		0,7	0,6		0,89				
	1		98,11	94,81		1	99,3	98,14	98,68	
	1,02		0,34	0,38		1,02				
	1,03		0,1	0,17		1,03	0,27	0,31	0,3	
	1,04					1,04	0,07	0,06	0,09	
	1,05		0,4	1,46		1,05	0,25	0,26	0,55	
	1,07					1,07		0,12	0,08	
	1,08		0,14	0,64		1,08				
	1,1			0,17		1,1			0,07	
	1,12			0,14		1,12				
	1,13			0,06		1,13				
	1,14					1,14				
	1,15			0,19		1,15				
	1,16					1,16				
	1,17			0,06		1,17				
	1,18			0,07		1,18				
	1,2					1,2				
1,23			0,17		1,23					
1,24			0,18		1,24					
1,27		0,08	0,59		1,27					
1,3					1,3					

Tabla 30: Estabilidad de TAT-NR2B9c-Ac frente a TAT-NR2B9c-Cl liofilizado en Histidina 20 mM y Trehalosa 120 mM pH 6,5 después de 11 meses

5

RP-HPLC-TFA	Pico (RRT)	NA-1 His 250 mM, Trehalosa 120 mM pH 6,5			Datos de estabilidad de la sal de cloruro de NA-1		
		T=11 meses			T=11 meses		
		-20C	40C	60C	-20C	40C	60C
	0,86		0,12	0,52			
	0,88			0,17			
	0,899			0,15			0,1
	0,93						0,18
	0,95			0,14			0,16
	0,97			0,19			0,1
	0,99		0,37	0,63		0,29	0,38
	1	98,47	95,91	83,08	98,57	98,14	95,49

ES 2 974 228 T3

	1,02	1,21	1,93	5,77	1,18	1,09	1,42
	1,03	0,08			0,07	0,09	0,34
	1,05	0,05	0,57	3,45		0,05	0,17
	1,06		0,07	0,19			0,15
	1,07	0,19	0,31	0,75	0,18	0,36	1,05
	1,08		0,11	0,39			
	1,09		0,07	0,27			
	1,1		0,07	0,31			
	1,12		0,06	0,29			0,12
	1,13		0,41	2,5			
	1,15			0,19			
	1,17			0,2			
	1,2			0,11			
	1,22			0,12			
	1,23			0,12			
	1,25			0,12			
		NA-1 His 250 mM, Trehalosa 120 mM pH 6,5			Sal de cloruro de NA-1		
	0,77		0,08	0,48			
	0,8			0,14			
	0,87						0,13
	0,91			0,15		0,05	0,2
	0,94		0,05	0,14		0,09	0,34
	0,945			0,22			
	0,98	0,11	0,23	0,85	0,1	0,12	0,21
	1	99,23	96,85	82,73	99,3	98,71	95,34
	1,02	0,32	0,35	0,77	0,29	0,24	0,61
	1,04	0,08	0,11	0,77	0,07	0,12	
	1,06	0,26	1,07	5,05	0,25	0,48	1,48
	1,07					0,06	0,25
	1,09		0,56	3,42		0,08	0,26
	1,1		0,08	0,41			
	1,12		0,07	0,32			
	1,14			0,28			0,17
	1,15		0,09	0,32			
	1,16						0,11
	1,19			0,27			
	1,23		0,07	0,37		0,05	0,24
	1,24			0,22			
	1,25						0,18
	1,26			0,19			
	1,27		0,38	2,47			
	1,35			0,12			
RP-HPLC:MSA							

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una sal de cloruro de un péptido que es TAT-NR2B9c (SEQ ID NO:6) o difiere de TAT-NR2B9c en hasta 5 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos, en donde más del 95 % en moles de todos los aniones en la sal son cloruro.
2. La sal de cloruro de la reivindicación 1, en donde el péptido es TAT-NR2B9c.
- 10 3. La sal de cloruro de la reivindicación 1, preparada mediante el intercambio de trifluoroacetato por acetato de TAT-NR2B9c, o preparada mediante el intercambio de trifluoroacetato por acetato y después el acetato por cloruro comenzando de una sal de trifluoroacetato de TAT-NR2B9c.
- 15 4. La sal de cloruro de la reivindicación 1, en donde más del 99,9 % en moles de todos los aniones en la sal son cloruro.
- 20 5. Una formulación preliofilizada que comprende la sal de cloruro como se define en cualquier reivindicación anterior, un tampón y un azúcar, en donde acetato y trifluoroacetato comprenden cadauno menos de 1 % o menos de 0,1 % de aniones en peso en la formación.
- 25 6. La formulación preliofilizada de la reivindicación 5, en donde el tampón es histidina y el azúcar es trehalosa y el pH es 6-7, opcionalmente
en donde la sal de cloruro del péptido está a una concentración de 70-120 mg/ml, la histidina está a una concentración de 15-100 mM, y la trehalosa está a una concentración de 80-160 mM, o
en donde la sal de cloruro del péptido está a una concentración de 70-120 mg/ml, la histidina está a una concentración de 20-100 mM, y la trehalosa está a una concentración de 100-140 mM, o
30 en donde el Tat-NR2B9c está a una concentración de 70-120 mg/ml, la concentración de histidina 20-50 mM, y la concentración de trehalosa es 100-140 mM, o
la concentración de histidina es 20 mM y la concentración de trehalosa es 100-200 mM, opcionalmente 120 mM, y la concentración de TAT-NR2B9c es 90 mg/ml.
- 35 7. Una formulación liofilizada preparada mediante liofilización de la formulación preliofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 40 8. Un método para preparar una formulación que comprende
almacenar una formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 7 durante al menos una semana a una temperatura de al menos 20 °C; y
reconstituir la formulación liofilizada.
- 45 9. El método de la reivindicación 8, en donde la formulación liofilizada se reconstituye en agua o salino, opcionalmente en donde la formulación se almacena durante al menos un año, opcionalmente en donde el almacenamiento incluye periodos en los cuales la temperatura excede los 37 °C.
- 50 10. La sal de cloruro de la reivindicación 1, para uso en un método para reducir los efectos dañinos del accidente cerebrovascular u otra condición isquémica.
11. Una formulación preparada a partir de la sal cloruro de la reivindicación 1, en donde el acetato y el trifluoroacetato en combinación e individualmente constituyen menos del 5 % en moles de aniones en la formulación.

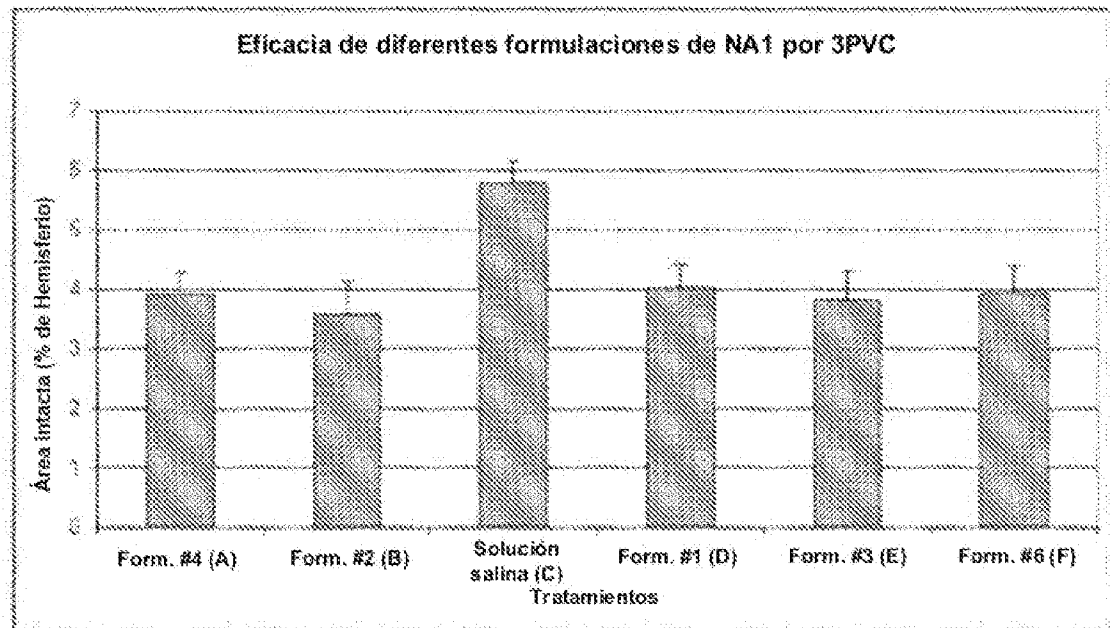


FIG. 1

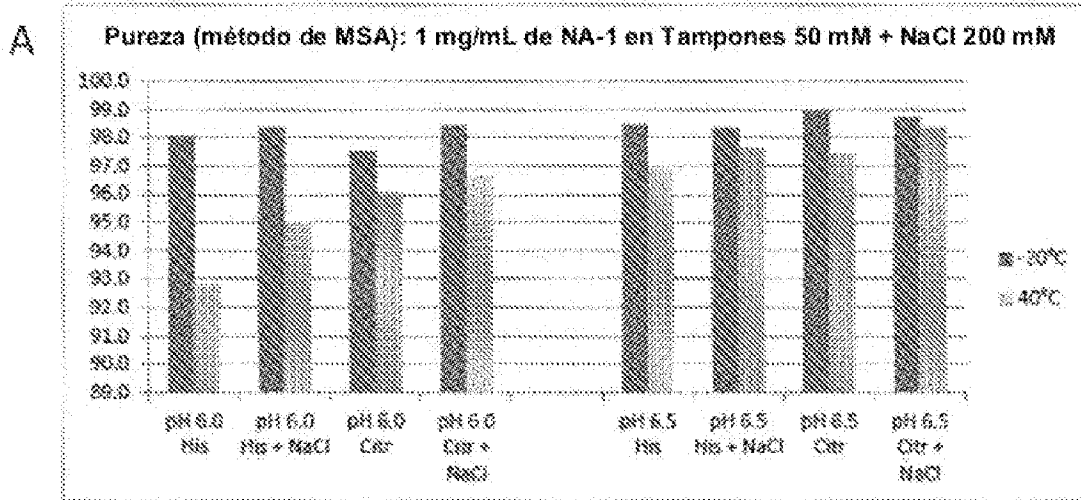


Figura II. Gráfico de resultados de pureza, Método de MSA (ordenado por pH)

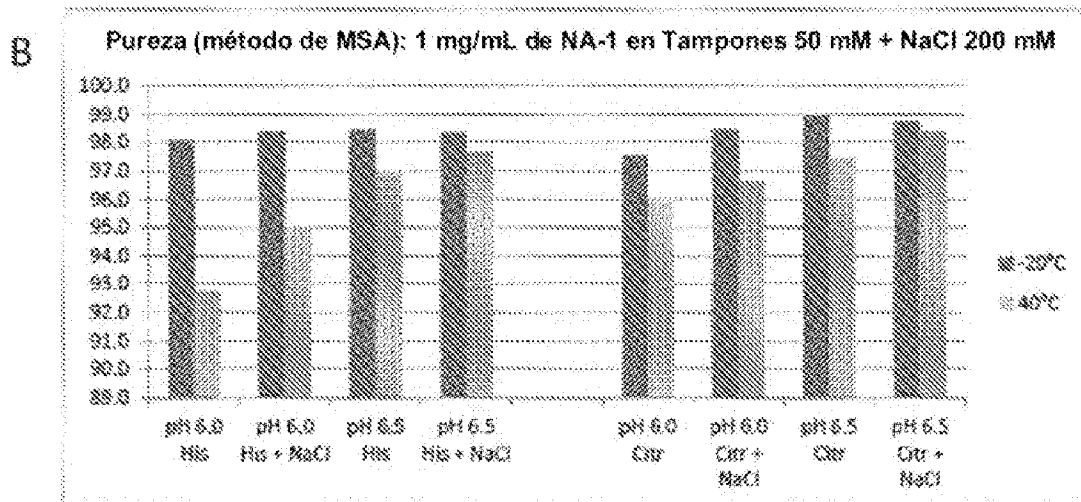


FIG. 2A, B

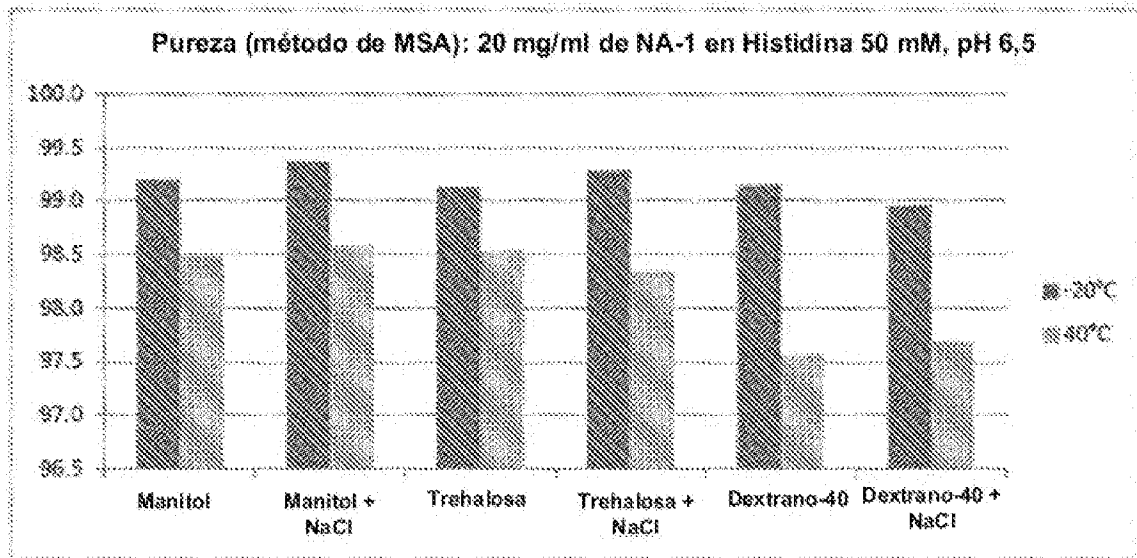


FIG. 3

FIG. 4A, B

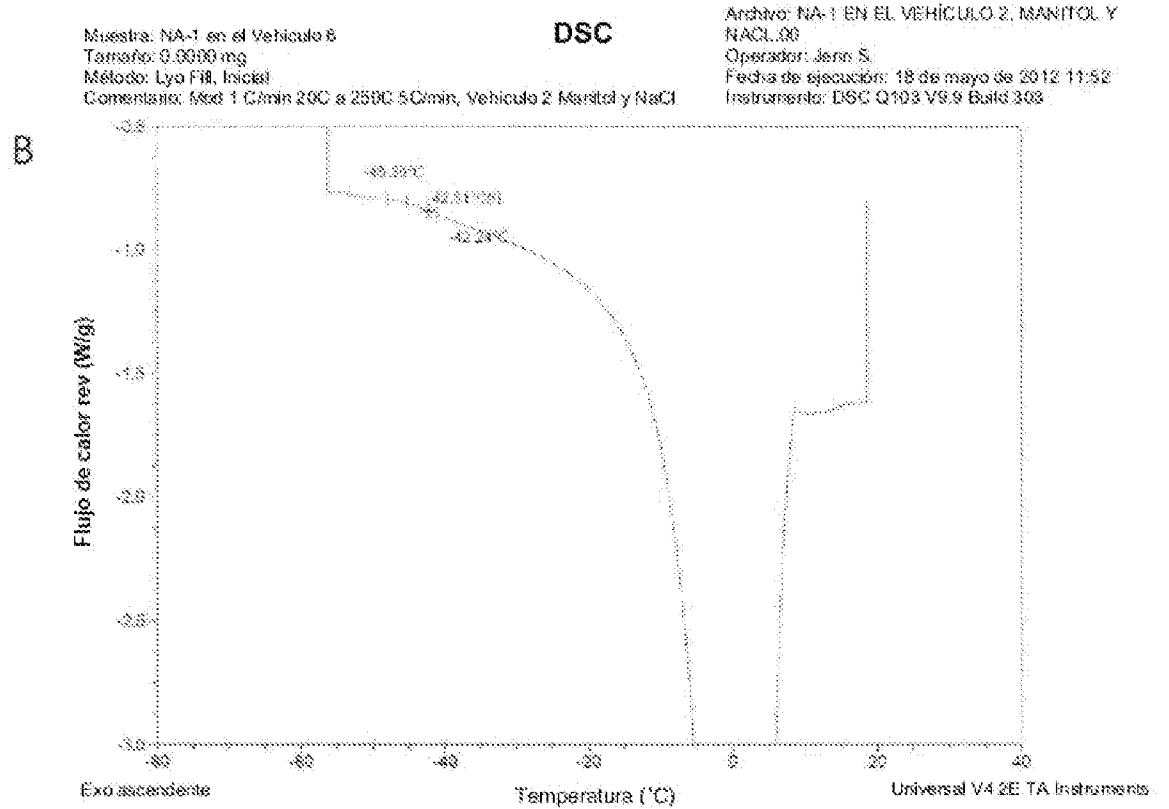
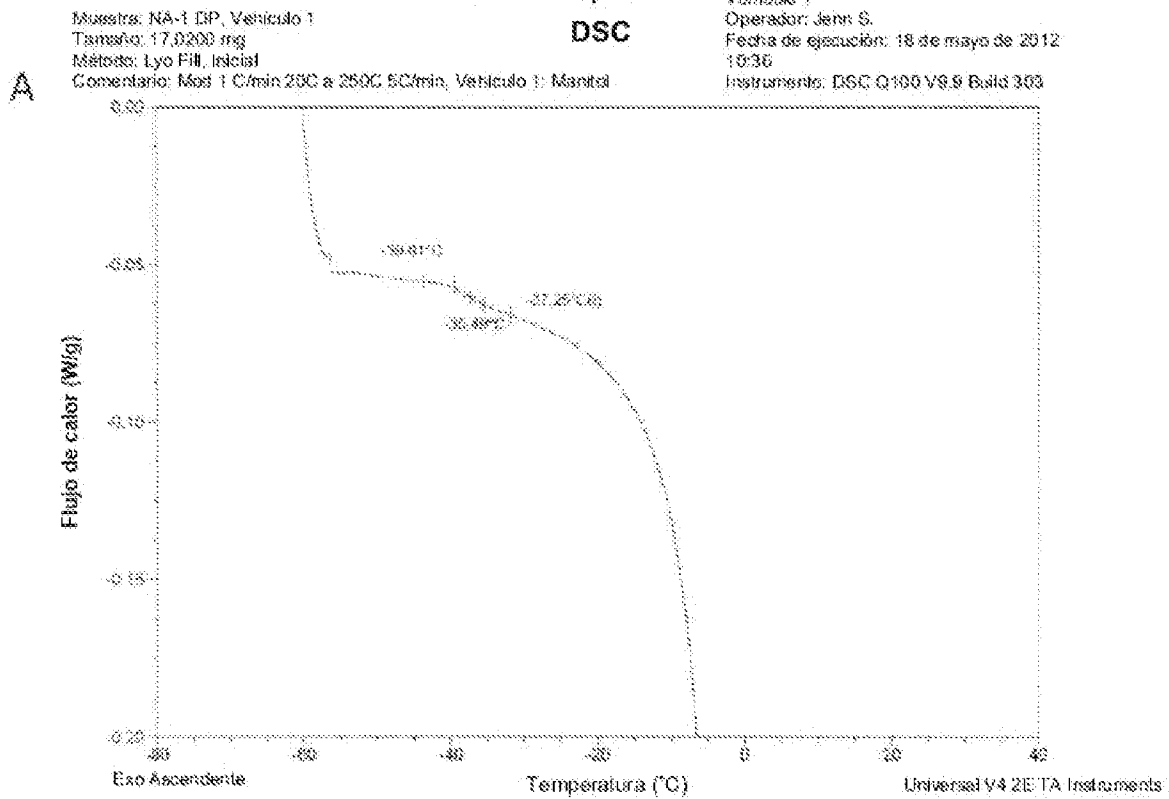
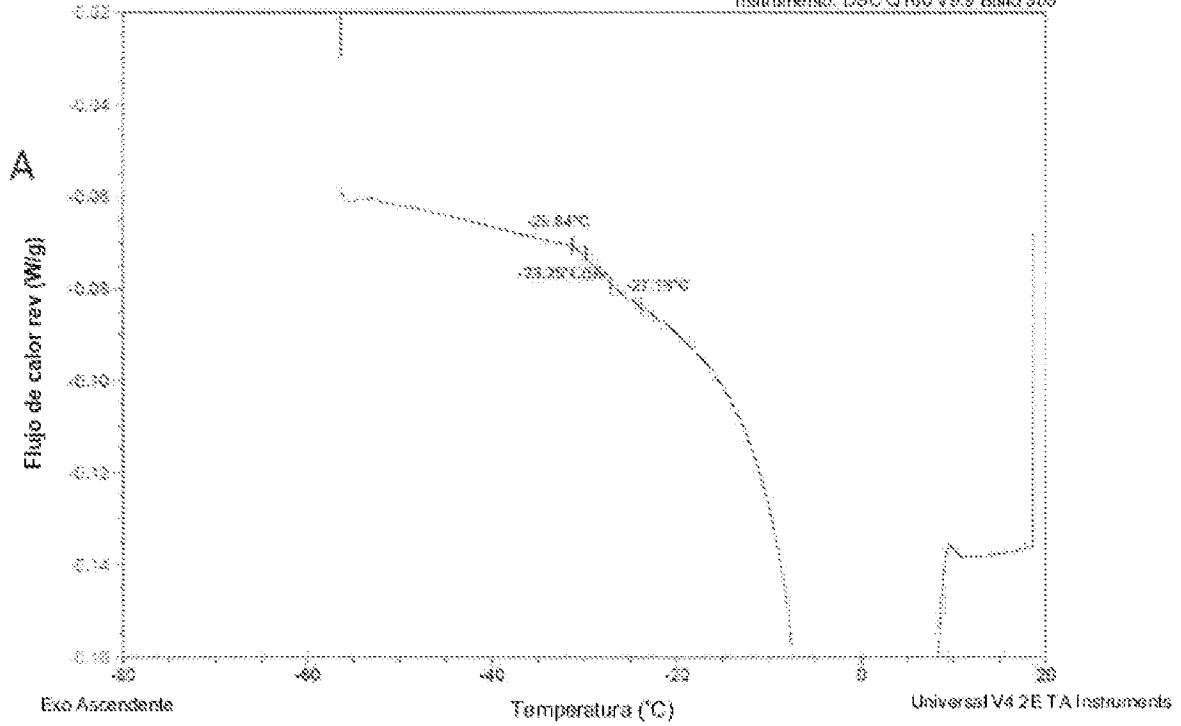


FIG. 5A, B

Muestra: NA-1 en el Vehículo 3
 Size: 13.9783 mg
 Método: Lyo Fil, Inicial
 Comentario: Mod 1 C/min 20C a 250C 5C/min, Vehículo 3 Trehalosa

DSC

Archivo: G:\...1205\NA-1 en el Vehículo 3.002
 Operador: Jenn S.
 Fecha de ejecución: 16 de mayo de 2012
 13:01
 Instrumento: DSC Q100 V9.9 Build 303



Muestra: NA-1 en el Vehículo 4
 Tamaño: 14.4460 mg
 Método: Lyo Fil, Inicial
 Comentario: Mod 1 C/min 20C a 250C 5C/min, Vehículo 4 Trehalosa + NaCl

DSC

Archivo: G:\...Projects\1205\NA-1 en el Vehículo 4
 Operador: Jenn S.
 Fecha de ejecución: 16 de mayo de 2012
 13:52
 Instrumento: DSC Q100 V9.9 Build 303

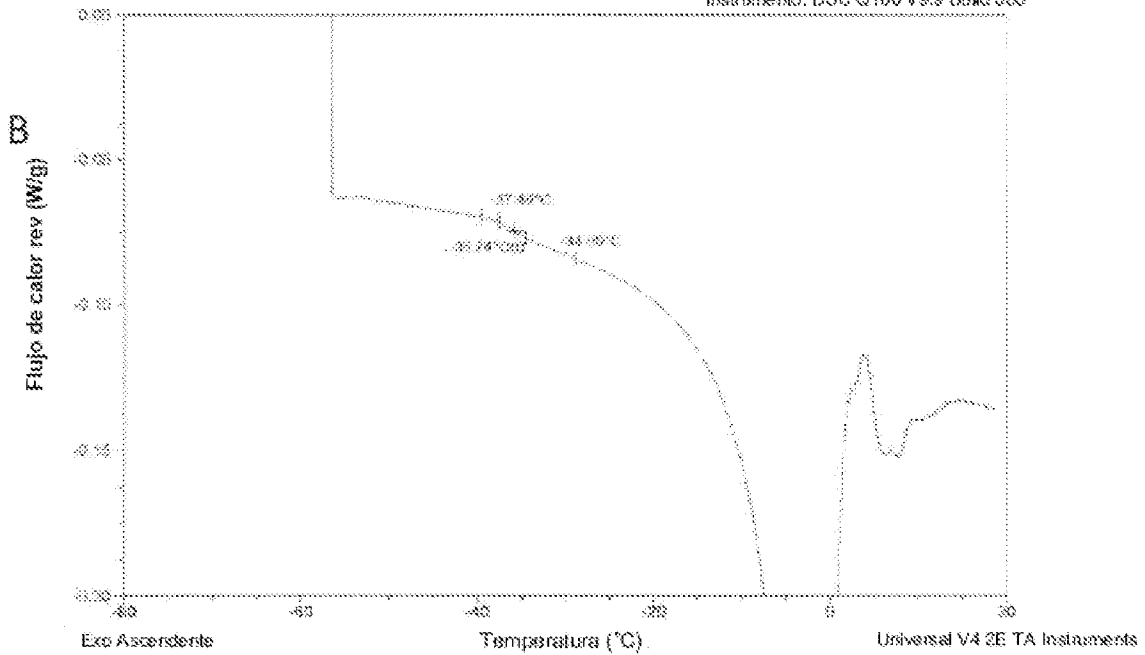
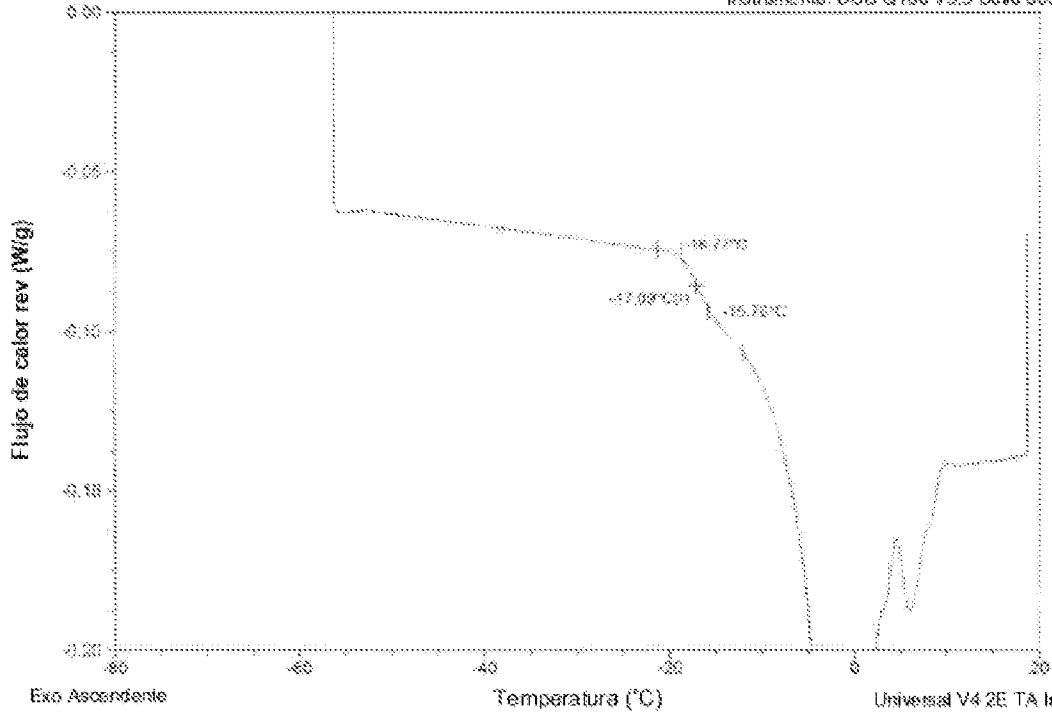


FIG. 6A, B

Muestra: NA-1 en el Vehículo 5
 Tamaño: 11,4540 mg
 Método: Lys Fill, Inicial
 Comentario: Mod 1 C/min 20C a 250C 5C/min, Vehículo 5 Dextrano

Archivo: G:\Projects\1205NA-1 en el Vehículo 5
 Operador: Jenn S.
 Fecha de ejecución: 18 de mayo de 2012 14:51
 Instrumento: DSC Q100 V9.9 Build 303

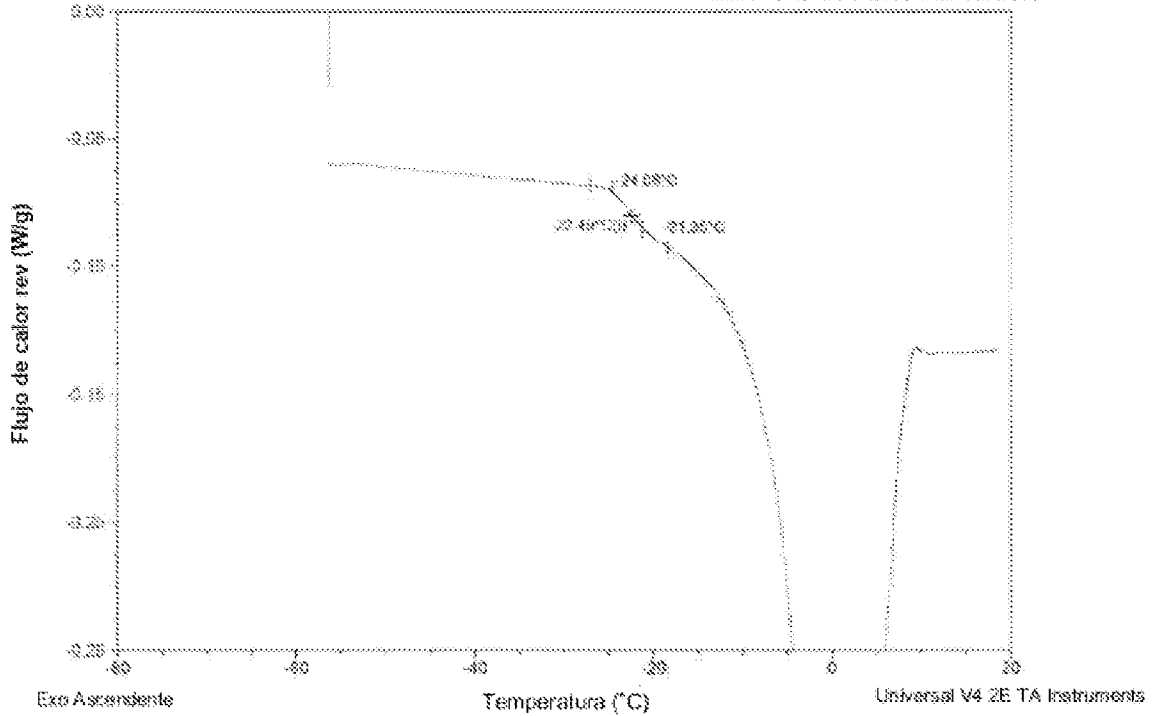
A

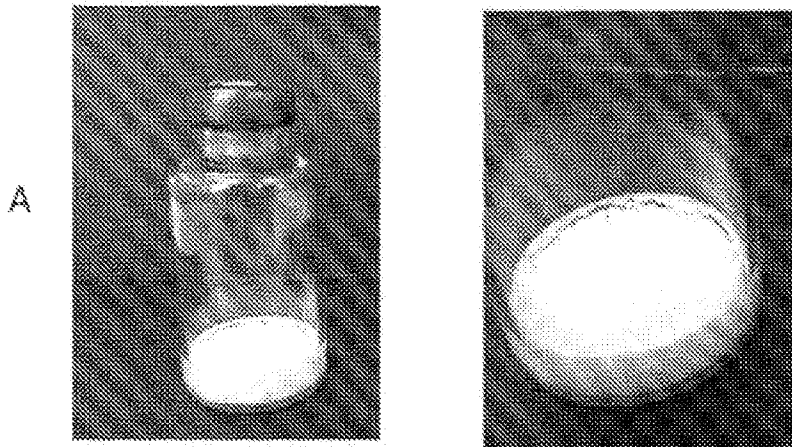


Muestra: NA-1 en el Vehículo 6
 Tamaño: 14,4110 mg
 Método: Lys Fill, Inicial
 Comentario: Mod 1 C/min 20C a 250C 5C/min, Vehículo 6 Trishalosa + NaCl

Archivo: G:\Projects\1205NA-1 en el Vehículo 6
 Operador: Jenn S.
 Fecha de ejecución: 18 de mayo de 2012 15:36
 Instrumento: DSC Q100 V9.9 Build 303

B





Pequeña escala 4 NA-1



Formulaciones 1-3 de pequeña escala 6

FIG. 7A, B