

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 301**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2009 E 19181153 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023 EP 3572073**

54 Título: **Liofilización por encima del colapso**

30 Prioridad:

**05.08.2008 US 86426 P**

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

**08.05.2024**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)  
66 Hudson Boulevard East  
New York, NY 10001-2192, US**

72 Inventor/es:

**TCHESALOV, SERGUEI;  
DIXON, DAN y  
WARNE, NICHOLAS**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 968 301 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

Liofilización por encima del colapso

**Solicitudes relacionadas**

5 Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos número de serie 61/086,426, presentada el 5 de agosto de 2008.

**Antecedentes de la invención**

10 Liofilización, o desecación por congelación, es un procedimiento ampliamente utilizado en la industria farmacéutica para la preservación de materiales biológicos y farmacéuticos. En la liofilización, el agua presente en un material se convierte en hielo durante una etapa de congelación y luego se elimina del material por sublimación directa en condiciones de baja presión durante una etapa de desecación primaria. Durante la congelación, sin embargo, no toda el agua se transforma en hielo. Una parte del agua queda atrapada en una matriz de sólidos que contiene, por ejemplo, componentes de formulación y/o el principio activo. El exceso de agua unida dentro de la matriz se puede reducir a un nivel deseado de humedad residual durante una etapa de desecación secundaria. Todas las etapas de liofilización, congelación, desecación primaria y desecación secundaria, son determinantes de las propiedades del producto final.

15 Sin embargo, la desecación primaria es típicamente la etapa más larga en un procedimiento de liofilización. Por tanto, la optimización de esta parte del procedimiento tiene un efecto económico significativo (Pikal y col. "Freeze-drying of proteins. Part 2: formulation selection", *BioPharm* 3:26-30 (1990); Pikal y col. "The collapse temperature in freeze-drying: dependence of measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase", *International Journal of Pharmaceutics*, 62 (1990), 165-186). Durante muchos años, la optimización del ciclo y la formulación se realizó para asegurar que la temperatura del producto durante el desecación primaria nunca excedería la temperatura de colapso. La temperatura de colapso es la temperatura del producto durante la liofilización por encima de la cual la torta del producto comienza a perder su estructura original. En la literatura se ha indicado que, por encima de la temperatura de colapso, el producto podría experimentar un burbujeo esporádico lento, hinchazón, formación de espuma, cavitación, fenestración, colapso bruto, retracción y rebordeado que pueden tener consecuencias en el aspecto del producto (MacKenzie, "Collapse during freeze-drying-Qualitative and quantitative aspects" In *Freeze-Drying and Advanced Food Technology*; Goldblith, S.A., Rey, L, Rothmayr, WW, Eds.; Academic Press, Nueva York, 1974, 277-307). Como resultado, se cree que el colapso da como resultado una mala estabilidad del producto, tiempos de desecación largos (debido al colapso de los poros), desecación desigual y pérdida de textura (R. Bellows, y col. "Freeze-drying of aqueous solutions: maximum allowable operating temperature", *Cryobiology*, 9, 559-561 (1972). Para las proteínas, se ha informado que el colapso durante la liofilización conduce a una humedad elevada, aumento de la velocidad de degradación y del tiempo de reconstitución (Carpenter, J. F. y col. "Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice", *Pharmaceutical Research* (1997), 14(8):969-975; Adams y col. "Optimizing the lyophilization cycle and the consequences of collapse on the pharmaceutical acceptability of Erwinia L-Asparaginase", *J. of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 8606, No. 12, December (1996); S. Passot y col. "Effect of product temperature during primary drying on the long-term stability of lyophilized proteins", *Pharm. Dev. and Tech.*, 12:543-553, 2007). Por tanto, durante muchos años, se consideró crítico liofilizar por debajo de la temperatura de colapso. Se desarrollaron alternativas al desecado por congelación con tiempos de secado más cortos, como se muestra en el documento WO2005/117962 A1.

**Sumario de la invención**

40 La presente invención abarca el descubrimiento de que la liofilización se puede llevar a cabo por encima de la temperatura de colapso al tiempo que conserva la estabilidad del producto, la actividad biológica y otras características importantes del producto. Por tanto, la presente invención proporciona, entre otras cosas, procedimientos de liofilización mejorados con una etapa de desecación primaria significativamente más corta.

45 En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para liofilizar una formulación líquida que incluye una etapa de desecación primaria realizada a una temperatura del producto igual o superior a la temperatura de colapso como se define por las reivindicaciones. Dichos procedimientos de la invención incluyen una etapa de desecación primaria ejecutada sin evitar el colapso (por ejemplo, microcolapso, visualmente detectable, o macrocolapso) en los productos liofilizados. En algunas realizaciones, la formulación líquida contiene una sustancia farmacéutica (por ejemplo, proteína) a una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos aproximadamente 100 mg/ml, al menos aproximadamente 150 mg/ml, al menos aproximadamente 200 mg/ml, al menos aproximadamente 250 mg/ml, al menos aproximadamente 300 mg/ml o al menos aproximadamente 400 mg/ml).

En algunas realizaciones, la formulación líquida es una formulación a base de sacarosa.

55 En algunas realizaciones, la formulación líquida está formulada de tal manera que la temperatura de colapso es al menos 1 °C más alta que el punto medio de la temperatura de transición vítrea (Tv'). En algunas realizaciones, la formulación líquida está formulada de tal manera que la temperatura de colapso es al menos 2 °C más alta que el punto medio de la temperatura de transición vítrea (Tv'). En algunas realizaciones, la formulación líquida está

formulada de tal manera que la temperatura de colapso es al menos 5 °C más alta que el punto medio de la temperatura de transición vítrea (T<sub>v</sub>). En algunas realizaciones, la formulación líquida está formulada de tal manera que la temperatura de colapso es al menos 10 °C más alta que el punto medio de la temperatura de transición vítrea (T<sub>v</sub>).

- 5 La desecación primaria se realiza a la temperatura de colapso o a una temperatura superior al colapso pero inferior a la temperatura de fusión eutéctica (por ejemplo, al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C por encima del colapso).

- 10 En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para liofilizar una formulación líquida que incluye una etapa de desecación primaria a una temperatura del producto igual o superior a la temperatura de colapso, en el que la formulación líquida incluye una sustancia farmacéutica (por ejemplo, proteína) y un agente estabilizante. En algunas realizaciones, la proporción de la cantidad en masa del agente estabilizante y la sustancia farmacéutica no es mayor que 1.000 (por ejemplo, no mayor que 500, no mayor que 100, no mayor que 50, no mayor que 10, no mayor que 1, no mayor que 0,5, no mayor que 0,1).

- 15 En algunas realizaciones, la sustancia farmacéutica está en una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos aproximadamente 50 mg/ml, al menos aproximadamente 100 mg/ml, al menos aproximadamente 150 mg/ml, al menos aproximadamente 200 mg/ml, al menos aproximadamente 250 mg/ml, al menos aproximadamente 300 mg/ml o al menos aproximadamente 400 mg/ml).

- 20 En algunas realizaciones, el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en manosa, sorbitol, rafinosa, trehalosa, glicina, manitol, cloruro de sodio, arginina, lactosa, hidroxietil almidón, dextrano y polivinilpirrolidona, y combinaciones de los mismos.

- 25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona procedimientos para almacenar una sustancia farmacéutica (por ejemplo, proteína) que incluyen etapas de: (a) liofilizar la sustancia farmacéutica en una formulación líquida que comprende una etapa de desecación primaria ejecutada a una temperatura del producto igual o superior a la temperatura de colapso; (b) almacenar la sustancia farmacéutica liofilizada durante un período superior a 3 meses (por ejemplo, superior a 8 meses, superior a 12 meses, superior a 18 meses, superior a 24 meses).

- 30 En algunas realizaciones, la sustancia farmacéutica está en una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos aproximadamente 50 mg/ml, al menos aproximadamente 100 mg/ml, al menos aproximadamente 150 mg/ml, al menos aproximadamente 200 mg/ml, al menos aproximadamente 250 mg/ml, al menos aproximadamente 300 mg/ml o al menos aproximadamente 400 mg/ml).

- 35 En algunas realizaciones, la formulación líquida contiene además un agente estabilizante. En algunas realizaciones, el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, manosa, sorbitol, rafinosa, trehalosa, glicina, manitol, cloruro de sodio, arginina, lactosa, hidroxietil almidón, dextrano y polivinilpirrolidona, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el producto liofilizado de acuerdo con la presente invención puede contener materiales amorfos (por ejemplo, materiales completamente amorfos). En algunas realizaciones, el producto liofilizado de acuerdo con la presente invención puede contener materiales parcialmente cristalinos/parcialmente amorfos.

- 40 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para mejorar la estabilidad de una sustancia farmacéutica liofilizada (por ejemplo, proteína) o la eficiencia del ciclo de liofilización liofilizando la sustancia farmacéutica (por ejemplo, proteína) en una formulación líquida a una temperatura del producto igual o superior a la temperatura de colapso.

- 45 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para evaluar un lote de producto liofilizado que incluye las etapas de (a) evaluar una o más muestras del lote del producto liofilizado, en los que al menos una muestra se caracteriza por colapso de la torta (por ejemplo, microcolapso, visualmente detectable o macrocolapso); y (b) liberar el lote del producto liofilizado basado en el resultado de la evaluación de la etapa (a).

- 50 En algunas realizaciones, la etapa (a) incluye una etapa para medir la humedad residual de una o más muestras. En algunas realizaciones, la etapa (a) incluye una etapa para determinar el perfil de estabilidad de una o más muestras. En algunas realizaciones, la etapa de determinar el perfil de estabilidad incluye determinar una velocidad de degradación. En algunas realizaciones, la velocidad de degradación se determina mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en SE-HPLC, RP-HPLC CEX-HPLC, MALS, fluorescencia, absorción ultravioleta, nefelometría, CE y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la etapa (a) incluye una etapa para determinar una actividad del producto liofilizado. En algunas realizaciones, la actividad puede determinarse mediante varios ensayos de actividad (por ejemplo, celulares, ELISA, enzimáticos).

- 55 En algunas realizaciones, el producto liofilizado contiene un polisacárido y la etapa (a) incluye una etapa para medir la eficiencia de conjugación del polisacárido a una proteína transportadora.

En algunas realizaciones, la etapa (a) incluye una etapa para determinar el tiempo de reconstitución.

En algunas realizaciones, la etapa (a) no incluye una etapa para evaluar el aspecto de la torta de la una o más muestras.

5 La presente invención proporciona procedimientos para preparar una sustancia farmacéutica (por ejemplo, proteína) que incluyen etapas de: (a) proporcionar una sustancia farmacéutica liofilizada (por ejemplo, proteína) caracterizada por colapso de la torta (por ejemplo, microcolapso, visualmente detectable o macrocolapso); (b) reconstituir la sustancia farmacéutica liofilizada, en el que la sustancia farmacéutica reconstituida es biológica o farmacéuticamente activa.

10 Los procedimientos inventivos de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse para liofilizar, almacenar, evaluar y/o preparar sustancias farmacéuticas, incluyendo, pero sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN, ADN o híbridos de ARN/ADN, aptámeros), compuestos químicos, polisacáridos, moléculas pequeñas, sustancias farmacológicas, productos naturales, inmunógenos, vacunas, carbohidratos y combinaciones de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término "proteína" se refiere a un polipéptido (es decir, una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos) o combinaciones de polipéptidos. Las proteínas pueden incluir restos distintos de aminoácidos (por ejemplo, pueden ser glicoproteínas, proteoglicanos, etc.) y/o pueden, por otro lado, procesarse o modificarse. Los expertos en la materia apreciarán que una "proteína" puede ser una cadena polipeptídica completa producida por una célula (con o sin una secuencia señal), polipéptidos sintéticos o puede ser una porción característica de los mismos. Los expertos en la materia apreciarán que una proteína a veces puede incluir más de una cadena de polipéptidos, por ejemplo unidos por uno o más enlaces disulfuro o asociados por otros medios. Los polipéptidos pueden contener L-aminoácidos, D-aminoácidos o ambos y pueden contener cualquiera de diversas modificaciones de aminoácidos o análogos conocidos en la técnica. Las modificaciones útiles incluyen, por ejemplo, acetilación terminal, amidación, glucosilación, etc. En algunas realizaciones, las proteínas pueden comprender aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, aminoácidos sintéticos y combinaciones de los mismos. Las proteínas de ejemplo incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) o fragmentos de los mismos, factores de crecimiento, factores de coagulación, citoquinas, proteínas de fusión, antígenos que contienen polisacáridos, sustancias farmacológicas farmacéuticas, vacunas (por ejemplo, vacunas de virus muertos, vacunas de virus atenuados, vacunas de toxoides, vacunas de subunidades, vacunas multivalentes, vacunas conjugadas, vacunas de virus vivos y sus componentes individuales, etc.), enzimas, Small Modular ImmunoPharmaceuticals (SMIP™). Como se usa en el presente documento, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos incluyen, aunque no de forma limitativa, IgG intacta, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, ScFv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos de dominio único de tiburón (por ejemplo, IgNAR o fragmentos de los mismos)), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos.

20

25

30

35 La presente invención proporciona además proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN, ADN o híbridos de ARN/ADN, aptámeros), compuestos químicos, moléculas pequeñas, sustancias farmacológicas, productos naturales, polisacáridos, moléculas pequeñas, sustancias farmacológicas, productos naturales inmunógenos, vacunas, hidratos de carbono y/u otros productos liofilizados, almacenados y/o preparados usando procedimientos de la invención de acuerdo con la presente invención u otros procedimientos divulgados.

40 Tal y como se usa en la presente solicitud, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se usan como equivalentes. Todos los números utilizados en esta solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente están destinados a cubrir cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la técnica relevante. Por ejemplo, las fluctuaciones normales de un valor de interés pueden incluir un intervalo de valores que caen dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia establecido a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto (excepto donde dicho número excedería el 100 % de un valor posible).

45 Otras características, objetos y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada que sigue.

### **Breve descripción de los dibujos**

Los dibujos son solo para fines ilustrativos, no por limitación.

50 La figura 1 ilustra un ejemplo de gráfico de ciclo de liofilización de 50 mg/ml de molécula G a una temperatura superior a la temperatura de colapso: ciclo agresivo. La formulación también contiene 5 % de sacarosa, histidina 10 mM, metionina 10 mM y polisorbato-80 al 0,01 %.

La figura 2 ilustra un aspecto de torta de ejemplo de la molécula G después de la liofilización. El vial izquierdo representa la desecación por encima de la temperatura de colapso (Figura 1), mientras que el vial derecho se liofilizó muy por debajo de la T<sub>v</sub>'.

La figura 3 ilustra un ciclo de control de ejemplo de la molécula G.

55 La figura 4 ilustra un ejemplo de gráfico de ciclo de liofilización de la molécula G por encima de la temperatura de colapso pero por debajo de la temperatura eutéctica: ciclo superagresivo.

La figura 5 ilustra un aspecto de torta de ejemplo de la molécula G liofilizada usando un ciclo superagresivo de la Figura 3. El vial derecho representa la muestra del ciclo superagresivo, el vial izquierdo es la forma de muestra del ciclo de control.

5 La figura 6 ilustra imágenes ejemplares de microscopia de liofilización de ejemplo de 10 mg/ml de la proteína J en tampón TMS (Tris 10 mM, 4 % de manitol, 1 % de sacarosa).

La figura 7 ilustra un ciclo de liofilización de ejemplo para 10 mg/ml de proteína J en tampón TMS realizado por debajo del inicio de la temperatura de colapso de -18 °C: ciclo de trabajo 1.

La figura 8 ilustra el aspecto de la torta de ejemplo de 10 mg/ml de proteína J en TMS después del ciclo de trabajo 1. La humedad residual es 0,1 %.

10 La figura 9 ilustra la proteína J a 10 mg/ml en TMS: liofilización muy por encima de la temperatura de colapso pero por debajo del punto de fusión del manitol

La figura 10 ilustra el aspecto de torta ejemplar de 10 mg/ml de proteína J en TMS liofilizado muy por encima de la temperatura de colapso de la fase amorfa. La humedad residual es 0,14 %.

15 La figura 11 ilustra la formación de ejemplo de las áreas vacías durante la retención isotérmica a -34 °C (imagen superior) que indica el comienzo del colapso en el frente de sublimación. El colapso total de la estructura tras la liofilización ocurrió durante la retención isotérmica a -33° durante 30 minutos (imagen inferior).

La figura 12 ilustra la liofilización de ejemplo de la formulación de Serotipo X en viales de tubos Schott de 50 ml. La altura de la torta fue de aproximadamente 0,5 cm. El ciclo de liofilización se realizó en el liofilizador Benchmark 1000 (SP Industries).

20 La figura 13 ilustra el aspecto de torta de ejemplo del Serotipo X liofilizado por debajo de la temperatura de colapso.

La figura 14 ilustra un ejemplo de ciclo de liofilización de ejemplo utilizado para liofilizar polisacáridos de Serotipo X que mantuvo la temperatura del producto ligeramente por encima de la temperatura de colapso (estudio de colapso 1).

25 La figura 15 ilustra el aspecto de la torta de ejemplo de polisacáridos de Serotipo X liofilizados ligeramente por encima de la temperatura de colapso (estudio de colapso 1, vial izquierdo) y muy por encima de la temperatura de colapso (estudio de colapso 2, vial derecho).

La figura 16 ilustra un ciclo de liofilización de ejemplo utilizado para liofilizar polisacáridos de Serotipo X por encima de la temperatura de colapso (estudio de colapso 2).

30 La figura 17 ilustra un ciclo de liofilización de ejemplo utilizado para liofilizar la vacuna de pollo por debajo de la temperatura de colapso.

La figura 18 ilustra el aspecto de la torta de ejemplo de la vacuna de pollo liofilizada. El vial izquierdo contiene una torta liofilizada por debajo de la temperatura de colapso. El vial derecho contiene una torta liofilizada por encima de la temperatura de colapso (la pérdida de estructura podría verse en el fondo de la torta).

35 La figura 19 ilustra un ciclo de liofilización de ejemplo utilizado para liofilizar la vacuna de pollo por encima de la temperatura de colapso.

La figura 20 ilustra resultados de análisis de estabilidad ejemplares de la vacuna de pollo durante el almacenamiento a 37 °C. Los cuadrados rellenos representan materiales liofilizados por encima de la temperatura de colapso, los triángulos abiertos representan materiales liofilizados por debajo de la temperatura de colapso.

### **Descripción detallada de la invención**

40 La presente invención proporciona procedimientos de liofilización altamente eficientes y rentables. En la que dichos procedimientos de liofilización de formulaciones líquidas incluyen una etapa de desecación primaria a una temperatura del producto igual o superior a la temperatura de colapso, como se define por las reivindicaciones. Los procedimientos de la invención de acuerdo con la presente invención son particularmente útiles para formulaciones líquidas de liofilización que contienen altas concentraciones de proteínas u otras sustancias farmacéuticas. En algunas  
45 realizaciones, los procedimientos de invención de acuerdo con la presente invención mejoran la estabilidad de los productos liofilizados.

Liofilización, también conocida como desecación por congelación, a menudo se usa para almacenar productos farmacéuticos porque las tasas de degradación física y química de los productos farmacéuticos pueden reducirse significativamente en el estado seco, lo que permite una mayor vida útil del producto. Sin embargo, la liofilización  
50 generalmente aumenta significativamente el coste de fabricación de medicamentos. Este coste puede minimizarse desarrollando un ciclo que consuma la menor cantidad de tiempo sin comprometer la calidad o la estabilidad del

producto. Por ejemplo, el aumento de la temperatura del producto en 1 °C durante la liofilización podría dar como resultado una disminución del 13 % del tiempo de desecación primaria. Véase, Pikal y col. "The collapse temperature in freeze-drying: dependence of measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase", *International Journal of Pharmaceutics*, 62 (1990), 165-186.

- 5 La liofilización incluye varias etapas, tales como congelación, desecación primaria y desecación secundaria. Véase, Tang X., y col. (2004) "Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice", *Pharm. Res.*, 21:191-200; Nail S. L., y col. "Fundamentals of freeze-drying", en: *Development and manufacture of protein pharmaceuticals*. Nail S. L., ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, págs. 281-353; Wang, y col. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals", *Int. J. Pharm.*, 203:1-60; Williams N. A., y col. "The lyophilization of pharmaceuticals; A literature review". *J. Parenteral Sci. Technol.*, 38:48-59. La primera etapa de desecación, que implica la sublimación de agua congelada o no unida, es la etapa que requiere más tiempo del ciclo de liofilización. Tradicionalmente, se consideró crítico mantener la temperatura del producto por debajo de su temperatura de colapso durante el desecación primaria para mantener intacta la estructura microscópica de los materiales sólidos presentes en la solución congelada. Se pensó que es esta estructura la que conforma el pastel liofilizado con un área de superficie relativamente alta, lo que permite baja humedad residual y rápida reconstitución después de la liofilización.

20 Como se trata en la sección de Ejemplos, los presentes inventores han descubierto que la liofilización, en particular, desecación primaria, puede ejecutarse a una temperatura del producto superior a la temperatura de colapso mientras se mantiene la estabilidad de la proteína y otros atributos de calidad deseables (por ejemplo, humedad residual, tiempo de reconstitución, etc.). Incluso las muestras con colapso aparente (por ejemplo, colapso visualmente detectable en viales), que normalmente serían rechazadas, exhibieron un perfil de estabilidad similar a las muestras liofilizadas por debajo de la temperatura de colapso. Adicionalmente, en algunos casos, se mejoró la estabilidad de los productos liofilizados mediante liofilización por encima de la temperatura de colapso. Por ejemplo, como un ejemplo no limitativo descrito en el Ejemplo 2, los materiales parcialmente cristalinos/parcialmente amorfos liofilizados muy por encima de la temperatura de colapso pero ligeramente por debajo del punto de fusión del manitol mostraron una mejor estabilidad que las muestras liofilizadas por debajo de la temperatura de colapso. Por tanto, en comparación con los ciclos tradicionales de liofilización, la presente invención proporciona ventajas económicas significativas al proporcionar ciclos de liofilización agresivos y/o rápidos con un tiempo de desecación primaria más corto sin poner en peligro la calidad y la estabilidad de la proteína. En algunos casos, la presente invención proporciona una estabilidad mejorada del producto.

30 Otra ventaja de la presente invención es una aplicación para la evaluación de desviaciones durante la fabricación comercial. Si la desviación de los parámetros del procedimiento durante el ciclo comercial existente (normalmente realizado por debajo de la temperatura de colapso) da como resultado un colapso del producto visualmente detectable, los presentes inventores contemplan que el perfil de estabilidad del producto colapsado puede ser comparable al ciclo normal si la humedad residual está dentro de las especificaciones. Por tanto, este lote particular que contiene muestras con colapso de torta visualmente detectable podría ser liberado. Por tanto, la fabricación de lotes comerciales con tasas de rechazo cero o sustancialmente reducidas es posible si el producto en particular pudiera soportar el colapso. Se puede realizar un estudio de robustez de desarrollo antes de la fabricación comercial para confirmar si la estabilidad de los materiales colapsados es comparable a la de los materiales de control para cada producto en particular.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "temperatura de colapso (Tc)" se refiere a una temperatura (por ejemplo, temperatura del producto) durante la liofilización a la que se produce el colapso o por encima de ella. Como se usa en el presente documento, el término "colapso" se refiere a la pérdida de una estructura intacta o al cambio de la estructura original de la torta liofilizada. En algunas realizaciones, el colapso incluye la pérdida de una estructura microscópica (también conocida como microcolapso). En algunas realizaciones, el microcolapso es visualmente indetectable. En algunas realizaciones, microcolapso se refiere a una pérdida de menos de aproximadamente 1 % (por ejemplo, menos de aproximadamente 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 % o 0,01 %) de la estructura intacta original (por ejemplo, una estructura de torta liofilizada). En algunas realizaciones, la temperatura igual o superior a la que ocurre el microcolapso se denomina temperatura de microcolapso. En algunas realizaciones, el colapso incluye la pérdida de estructuras macroscópicas (también denominado colapso macroscópico o macrocolapso). En algunas realizaciones, la temperatura a la que se produce el colapso bruto o superior se denomina temperatura de colapso bruto (o temperatura de macrocolapso). Típicamente, el colapso bruto o macrocolapso dan como resultado un colapso visualmente detectable en el producto liofilizado. Como se usa en el presente documento, los términos "colapso bruto", "macrocolapso", y "colapso visualmente detectable" se usan indistintamente. En algunas realizaciones, colapso bruto, macrocolapso o colapso visualmente detectable se refiere a la pérdida de al menos 0,1 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %) de la estructura intacta original (por ejemplo, una estructura de torta liofilizada).

60 En algunas realizaciones, la temperatura a la cual ocurre el colapso puede no ser discreta. En cambio, el colapso puede ser un procedimiento gradual que tiene lugar en un rango de temperatura con la estructura de la torta intacta que desaparece progresivamente en el intervalo de temperatura. Típicamente, el cambio inicial o la pérdida de la estructura intacta durante el procedimiento de liofilización se considera el inicio del colapso. La temperatura a la que se observó este cambio inicial se denomina típicamente temperatura de colapso de inicio. La temperatura a la que la pérdida de la estructura o el cambio de estructura parecía completarse en toda la torta se denomina temperatura de

colapso completo.

El colapso en el producto durante la liofilización puede ser detectado por varios instrumentos que incluyen, aunque no de forma limitativa, dispositivos de medición de temperatura del producto, microscopia de liofilización o instrumentos que detectan resistencia eléctrica. El colapso del producto liofilizado (por ejemplo, torta) puede detectarse manualmente mediante inspección visual, humedad residual, Calorimetría diferencial de barrido (DSC), área de superficie BET.

El fenómeno de colapso es sensible a la naturaleza de los materiales implicados. Por ejemplo, las formulaciones dominadas por sacarosa son muy sensibles al colapso, especialmente si también contienen especies moleculares pequeñas como sales y tampones (Shalaev y col. "Thermophysical properties of pharmaceutically compatible buffers at sub-rezo temperaturas: implications for freeze-drying", Pharmaceutical Research (2002), 19(2): 195-201). En estas formulaciones, el colapso generalmente se produce a una temperatura cercana al punto medio de la transición vítrea. La viscosidad de los sistemas amorfos de sacarosa-sal-tampón es muy baja, lo que resulta en un colapso masivo de la estructura cuando la temperatura del producto excede esta temperatura crítica durante la desecación primaria. Por tanto, tradicionalmente, la liofilización se lleva a cabo por debajo de la  $T_v'$  siempre que sea posible.

Cuando la concentración del producto aumenta, cambia la resistencia estructural de la torta al colapso.

La presente invención puede utilizarse para liofilizar formulaciones líquidas que contienen diversas concentraciones de producto. En algunas realizaciones, la presente invención es particularmente útil para liofilizar formulaciones líquidas que contienen sustancia farmacéutica a altas concentraciones. Por ejemplo, las formulaciones líquidas adecuadas para la presente invención pueden contener un producto (por ejemplo, proteína) de interés a una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml, al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos aproximadamente 20 mg/ml, al menos aproximadamente 30 mg/ml, al menos aproximadamente 40 mg/ml, al menos aproximadamente 50 mg/ml, al menos aproximadamente 75 mg/ml, al menos aproximadamente 100 mg/ml, al menos aproximadamente 150 mg/ml, al menos aproximadamente 200 mg/ml, al menos aproximadamente 250 mg/ml, al menos aproximadamente 300 mg/ml, al menos aproximadamente 400 mg/ml. En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas para la presente invención pueden contener un producto (por ejemplo, proteína) de interés a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 mg/ml a 400 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente de 1 mg/ml a 50 mg/ml, de 1 mg/ml a 60 mg/ml, de 1 mg/ml a 70 mg/ml, de 1 mg/ml a 80 mg/ml, de 1 mg/ml a 90 mg/ml, de 1 mg/ml a 100 mg/ml, de 100 mg/ml a 150 mg/ml, de 100 mg/ml a 200 mg/ml, de 100 mg/ml a 250 mg/ml, o de 100 mg/ml a 300 mg/ml o de 100 mg/ml a 400 mg/ml).

En algunas realizaciones, una formulación adecuada contiene uno o más agentes estabilizantes (por ejemplo, sacarosa, manosa, sorbitol, rafinosa, trehalosa, glicina, manitol, cloruro de sodio, arginina, lactosa, hidroxietil almidón, dextrano o polivinilpirrolidona). En algunas realizaciones, la proporción de la cantidad en masa del agente estabilizante y la sustancia farmacéutica (por ejemplo, proteína) no es mayor que 1.000 (por ejemplo, no mayor que 500, no mayor que 250, no mayor que 100, no mayor que 50, no mayor que 10, no mayor que 1, no mayor que 0,5, no mayor que 0,1). En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas incluyen además uno o más agentes de carga, tales como cloruro de sodio, lactosa, manitol, glicina, sacarosa, trehalosa e hidroxietilalmidón. En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas contienen agentes tamponantes, tales como tris, histidina, citrato, acetato, fosfato y succinato.

En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas para la presente invención contienen materiales amorfos. En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas para la presente invención contienen una cantidad sustancial de materiales amorfos (por ejemplo, formulaciones basadas en sacarosa). En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas adecuadas para la presente invención contienen materiales parcialmente cristalinos/parcialmente amorfos.

Contrariamente a los procedimientos tradicionales, la presente invención permite temperaturas de liofilización muy superiores a la  $T_v'$ . Por ejemplo, en formulaciones con concentraciones de proteínas superiores a 50 mg/ml, se observó que el colapso durante la liofilización medido por microscopia de liofilización es aproximadamente 5-7 °C más alto que el punto medio de la temperatura de transición vítrea ( $T_v'$ ). Por tanto, la presente invención permite la liofilización a temperaturas de al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C o 10 °C por encima del punto medio de  $T_v'$ .

El producto liofilizado de acuerdo con la presente invención puede evaluarse según el análisis de calidad del producto, el tiempo de reconstitución, la calidad de la reconstitución, el alto peso molecular, la humedad, la temperatura de transición vítrea y la actividad biológica o bioquímica. Típicamente, el análisis de calidad del producto incluye el análisis de la tasa de degradación del producto utilizando procedimientos que incluyen, aunque no de forma limitativa, HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC), HPLC de intercambio catiónico (CEX-HPLC), difracción de rayos X (DRX), calorimetría diferencial de barrido modulada (mDSC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC), detector de dispersión de luz multiángulo (MALS), fluorescencia, absorción ultravioleta, nefelometría, electroforesis capilar (CE), SDS-PAGE y sus combinaciones. En algunas realizaciones, la evaluación del producto liofilizado de acuerdo con la presente invención no incluye una etapa de evaluar el aspecto de la torta. Adicionalmente, el producto liofilizado puede evaluarse en función de las actividades biológicas o bioquímicas del producto, de forma típica, después de la reconstitución.

Los procedimientos inventivos de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse para liofilizar cualquier material, en particular, sustancias farmacéuticas. Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancias farmacéuticas" se refiere a cualquier compuesto o entidad que altere, inhiba, active o afecte de otra manera eventos biológicos o químicos *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, las sustancias farmacéuticas pueden incluir, aunque no de forma limitativa, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN, ADN o híbridos de ARN/ADN, aptámeros), compuestos químicos, polisacáridos, moléculas pequeñas, sustancias farmacológicas, productos naturales, inmunógenos, vacunas, carbohidratos y/u otros productos. En algunas realizaciones, la presente invención se utiliza para liofilizar proteínas que incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) o fragmentos de los mismos, factores de crecimiento, factores de coagulación, citoquinas, proteínas de fusión, antígenos de polisacárido, sustancias farmacológicas farmacéuticas, vacunas, enzimas, Small Modular ImmunoPharmaceuticals™ (SMIP™). En algunas realizaciones, la presente invención se utiliza para liofilizar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que incluyen, aunque no de forma limitativa, IgG intacta, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, ScFv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos de dominio único de tiburón (por ejemplo, IgNAR o fragmentos de los mismos)), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos.

En algunas realizaciones, la presente invención se usa para liofilizar vacunas o componentes de vacunas. Las vacunas adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, vacunas de virus muertos, vacunas de virus atenuados, vacunas de toxoides, vacunas de subunidades, vacunas multivalentes, vacunas conjugadas, vacunas de virus vivos. Los componentes de vacuna adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, polisacáridos y proteínas transportadoras. "Polisacáridos", como se usa en el presente documento, incluyen, sin limitación, sacáridos que comprenden una pluralidad de unidades repetitivas, incluyendo, aunque no de forma limitativa, polisacáridos que tienen 50 o más unidades repetidas, y oligosacáridos que tienen 50 o menos unidades repetidas. Típicamente, los polisacáridos tienen desde aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 unidades repetidas hasta aproximadamente 2.000 o más unidades repetidas, y preferentemente desde aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 unidades repetidas a aproximadamente, 100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800 o 1900 unidades repetitivas. Los oligosacáridos tienen típicamente de aproximadamente 6, 7, 8, 9 o 10 unidades repetitivas a aproximadamente 15, 20, 25, 30 o 35 a aproximadamente 40 o 45 unidades repetitivas. Las proteínas transportadoras adecuadas incluyen típicamente toxinas bacterianas que son transportadoras inmunológicamente eficaces que se han vuelto seguras por medios químicos o genéticos para la administración a un sujeto. Los ejemplos incluyen toxinas bacterianas inactivadas, tales como el toxoide diftérico, CRM<sub>197</sub>, toxoide tetánico, toxoide pertussis, LT de *E. coli*, ST de *E. coli* y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden usarse las proteínas bacterianas de la membrana externa como, el complejo de membrana externa c (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumólisis, proteína A de la superficie neumocócica (PspA), proteína de adhesión neumocócica (PsaA) o proteínas de superficie neumocócica BVH-3 y BVH-11. También pueden usarse otras proteínas transportadoras, tales como el antígeno protector (PA) de *Bacillus anthracis* y el factor de edema desintoxicado (EF) y el factor letal (LF) de *Bacillus anthracis*, ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina humana, albúmina de suero bovino (BSA) y el derivado de proteína purificada de la tuberculina (PPD).

La calidad de los componentes de la vacuna liofilizada se puede evaluar y determinar por su capacidad para formar una vacuna conjugada. Por ejemplo, la calidad de los polisacáridos liofilizados puede determinarse por su capacidad para acoplarse o conjugarse con una proteína transportadora. De forma similar, la calidad de las proteínas transportadoras liofilizadas puede determinarse por su capacidad para acoplarse o conjugarse con un polisacárido. Se conocen varios procedimientos en la técnica para conjugar un polisacárido con una proteína transportadora y la eficacia de la conjugación se puede determinar mediante varios procedimientos analíticos que incluyen, aunque no de forma limitativa, el porcentaje de proteína libre, el porcentaje de polisacárido libre, la distribución de tamaño molecular, la relación sacárido a proteína ("SPR") y la tasa de rendimiento. Los procedimientos de ejemplo para determinar la eficacia de la conjugación se describen en los Ejemplos.

Las sustancias farmacéuticas adicionales pueden incluir, aunque no de forma limitativa, sustancias anti-SIDA, sustancias anticancerosas, antibióticos, inmunosupresores, sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistamínicos, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivos, relajantes musculares y sustancias antiparkinsonianas, antiespasmódicos y contractantes musculares, incluidos los bloqueadores de canales, mióticos y anticolinérgicos, compuestos anti-glaucoma, compuestos antiparasitarios y/o antiprotozoarios, moduladores de las interacciones entre la célula y la matriz extracelular, incluidos los inhibidores del crecimiento celular y las moléculas antiadhesivas, agentes vasodilatadores, inhibidores del ADN, ARN o síntesis de proteínas, antihipertensores, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, factores antiangiogénicos, factores antiseoretos, anticoagulantes y/o agentes antitrombóticos, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, antieméticos y agentes de imagen.

Se puede encontrar una lista más completa de sustancias farmacéuticas y fármacos específicos adecuados para su uso en la presente invención en "Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications" de Axel Kleemann and Jurgen Engel, Thieme Medical Publishers, 1999; el "Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", Editado por Susan Budavari y col., CRC Press, 1996 y la Farmacopea de los Estados Unidos-25/Formulario Nacional-20, publicado por la Convención de Farmacopea de los Estados Unidos, Inc., Rockville Md., 2001.

La liofilización se puede realizar en un recipiente, tal como un tubo, una bolsa, una botella, una bandeja, un vial (por

ejemplo, un vial de vidrio), jeringa o cualquier otro recipiente adecuado. Los envases pueden ser desechables. La congelación y/o descongelación controlada también se puede realizar a pequeña o gran escala.

5 Los procedimientos inventivos de acuerdo con la presente invención pueden llevarse a cabo usando diversos liofilizadores, tal como, liofilizadores a escala comercial, liofilizadores a escala piloto o liofilizadores a escala de laboratorio.

Los procedimientos de liofilización de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a cualquier molécula (por ejemplo, proteínas) en general. Por ejemplo, las moléculas A-J utilizadas en los siguientes ejemplos pueden ser proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos, compuestos químicos, vacunas, enzimas, polisacáridos, productos naturales, moléculas pequeñas o cualquier otro tipo de moléculas.

## 10 Ejemplos

### **Ejemplo 1: La desecación por congelación a una temperatura de colapso o superior para materiales completamente amorfos**

15 En este ejemplo, la molécula G se liofilizó a la temperatura de colapso durante la etapa de desecación primaria. La formulación contenía 50 mg/ml de molécula G, 5 % de sacarosa, histidina 10 mM, metionina 10 mM y 0,01 % de polisorbato 80 (13). Un ejemplo de ciclo de liofilización a temperatura de colapso se muestra en la Figura 1.

Como se ilustra en la Figura 1, la temperatura del producto ( $T_{\text{producto}}$ , Figura 1), de hecho, superó la temperatura de colapso ( $T_{\text{colapso}}$ , Figura 1). Un análisis visual exhaustivo de la apariencia de la torta mostró que el fondo de la torta sufrió cierto colapso (vial izquierdo, Figura 2).

20 Sin embargo, a pesar del colapso obvio, la humedad residual del material de la torta colapsada (vial izquierdo) fue similar a la de la torta normal o de control (0,36 % en la torta colapsada frente a 0,37 % en el material de control). El tiempo de reconstitución también fue similar. es importante notar que el ciclo de liofilización por encima de la temperatura de colapso (Figura 1) fue más corto que el ciclo de control (Figura 3). La temperatura del producto en el ciclo de control no excedió la temperatura de colapso (Figura 3) hasta el final del desecación primaria cuando el termopar comenzó a perder contacto con el hielo y la lectura del sensor Pirani se acercó a la lectura del manómetro de capacitancia.

25 Para probar el concepto de que la liofilización a la temperatura de colapso no es tan dramática como se anticipó para los materiales amorfos, ocho moléculas más en la misma formulación se liofilizaron usando el mismo ciclo que se muestra en la Figura 1. Los datos de ejemplo de 9 moléculas (incluida la Molécula G) se resumen en la Tabla 1. Los datos en la Tabla 1 muestran que a pesar del estrés que experimentaron las moléculas durante el ciclo agresivo (Figura 1), la humedad residual y las temperaturas de transición vítrea fueron similares al ciclo que se realizó por debajo de la  $T_v$  (ciclo de control). Más importante, la tasa de degradación (mostrada como un aumento en el porcentaje de HMW) de las muestras colapsadas también fue similar a la del material de control. No se observó diferencia en el tiempo de reconstitución entre el control y los materiales colapsados para las 9 moléculas. Por tanto, es posible liofilizar a temperatura de colapso, especialmente a altas concentraciones de proteínas como 50 mg/ml o más, incluso para 35 formulaciones que también contienen tampones y sacarosa, que normalmente tienen temperaturas de transición vítrea bajas.

Debería mencionarse, que todos los materiales examinados en este ejemplo eran amorfos, que se confirmó con la difracción de rayos X en polvo.

Tabla 1. Humedades residuales, temperaturas de transición vítrea y aumento de especies de alto peso molecular (HMW, SE-HPLC) para 9 moléculas liofilizadas usando el ciclo en la Figura 1.

Molécula	Humedad inicial (%)		Tv (°C)		delta % HMW (4 semanas/50 °C)	
	control	agresivo	control	agresivo	control	agresivo
A	0,5 %	0,5 %	86	85	0,17 %	0,16 %
B	0,7 %	0,7 %	87	86	0,7 %	0,7 %
C	0,4 %	0,7 %	85	85	0,7 %	0,7 %
D						-0,3 %
E	0,4 %	0,2 %	91	95	1,2 %	1,2 %
			64	59		
F	0,7 %	0,5 %	84	86	0,8 %	1,2 %
G	0,37 %	0,36 %	89	88	0,5 %	0,5 %
			Por encima y por debajo de 3 meses, 40 °C			
H	0,31 %	0,33 %	94	73	0,7 %	0,7 %
			48	45		
I	0,76 %	0,18 %	86	80	0,33 %	0,59 %

Con el fin de investigar más a fondo el efecto del colapso sobre materiales amorfos a alta concentración de proteínas, la molécula G se liofilizó en condiciones en las que casi todo el desecación primaria se realizó por encima de la temperatura de colapso (denominado ciclo superagresivo) (Figura 4). En este ciclo, la temperatura del producto estaba por encima del colapso (-15 °C) pero por debajo del punto de fusión de la proteína eutéctica de sacarosa-hielo (-3 °C). Como se puede ver (Figura 5), casi la mitad de la torta se colapsó durante la liofilización. La humedad residual fue de 0,76 %, que es 2 veces mayor que la humedad residual de las muestras del ciclo de control (Figura 3) o incluso del ciclo agresivo (Figura 1). A pesar del colapso visual, el tiempo de reconstitución de una muestra del ciclo superagresivo (Figura 4) fue similar a una muestra del ciclo de control (Figura 3). Más importante, no hubo un aumento aparente en las especies de HMW durante el almacenamiento a 4 °C y 25 °C durante al menos 8 meses en comparación con el de las muestras del ciclo de control (Tabla 2). Por tanto, las muestras del ciclo superagresivo (liofilizadas muy por encima de la temperatura de colapso) son tan estables como las muestras del ciclo de control (liofilizadas por debajo de la temperatura de colapso). Adicionalmente, la humedad residual de las muestras del ciclo superagresivo fue inferior al 1 %.

Tabla 2. Comparación del perfil de estabilidad entre muestras de molécula G liofilizadas usando un ciclo superagresivo (Figura 4) y un ciclo de control (Figura 3)

Ciclo	Temperatura de almacenamiento, °C	Especies de alto peso molecular medidas por SE-HPLC (%)				
		A	3 meses	6 meses	8 meses	9 meses
Ciclo de control (RM = 0,37 ± 0,01 %)	4	2,8	2,5	3,3	-	2,8
	25		2,7	3,6	-	3,2
	40		3,3	4,4	-	4,4
Ciclo superagresivo (RM = 0,76 ± 0,02 %)	4	3,2	-	-	2,8	-
	25		-	-	2,9	-
	40		-	-	4,5	-

Nota: La variabilidad en HMW se debe a la variación de vial a vial y a la variabilidad del ensayo. RM es la humedad residual de las muestras liofilizadas.

### Ejemplo 2: Desecación por congelación a una temperatura de colapso o superior para materiales cristalinos/amorfos

Se formuló una proteína farmacéutica J a una concentración de 10 mg/ml en un tampón TMS que contenía Tris 10 mM, 4 % de manitol, 1 % de sacarosa, pH 7,4 (TMS). La Tv' para esta formulación fue -22,6 °C. Las muestras se liofilizaron a una temperatura del producto muy por debajo de la temperatura de transición vítrea, así como también por encima de Tv'. La Figura 6 muestra imágenes de ejemplo de microscopia de liofilización de 10 mg/ml de proteína J en TMS liofilizado por debajo de la temperatura de transición vítrea (-25 °C) y muy por encima de la Tv' (es decir, -18 °C, -12 °C y -6 °C).

A pesar de la ausencia de un colapso bruto durante la liofilización a temperaturas muy superiores a la Tv', se observó un cambio estructural (visto como un aumento en el tamaño de los poros) a partir de -18 °C (comienzo del colapso) y

se hizo muy obvio a -6 °C. Por lo tanto, -18 °C se considera la temperatura de colapso de 10 mg/ml de proteína J en TMS.

5 Se realizaron dos ciclos de liofilización: un ciclo que incluye una etapa de desecación primaria por debajo de la temperatura de colapso de -18 °C (inicio del colapso) y el otro que incluye una etapa de desecación primaria muy por encima del colapso pero por debajo del punto de fusión del manitol. El primer ciclo (ciclo de trabajo 1, Figura 7), produce una buena torta con un pequeño grado de contracción (Figura 8). El segundo ciclo (Figura 9) se realizó en condiciones muy agresivas, lo que resultó en una temperatura del producto superior a la temperatura de colapso de -18 °C durante casi todo el paso de desecación primaria. Sin embargo, el aspecto de la torta (Figura 10) fue aceptable.

10 La humedad residual de las muestras liofilizadas por debajo de la temperatura de colapso es comparable a la de las muestras liofilizadas por encima del colapso. Por ejemplo, la humedad residual de las muestras liofilizadas por debajo de la temperatura de colapso fue de aproximadamente 0,1 % y la humedad residual de las muestras liofilizadas por encima de la temperatura de colapso fue de aproximadamente 0,14 %. Además, el tiempo de reconstitución e incluso la apariencia de la torta de las muestras liofilizadas por encima de la temperatura de colapso fueron similares a las de las muestras liofilizadas por debajo de la temperatura de colapso.

15 Es importante destacar que la estabilidad de los materiales liofilizados muy por encima de la temperatura de colapso fue notablemente mejor en comparación con la del material de control (liofilizado por debajo de la temperatura de colapso). Por ejemplo, La tabla 3 muestra que, cuando se almacena a 40 °C, el material colapsado era mucho más estable en comparación con el material de control (liofilizado debajo del colapso). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, una hipótesis es que la proteína sufre un replegamiento o "hibridación" cuando se liofiliza por encima de la temperatura de colapso, que da como resultado una mejor estabilidad.

Tabla 3. Estabilidad del fármaco proteico farmacéutico J liofilizado a 10 mg/ml en TMS durante el almacenamiento a temperaturas elevadas.

	Temperatura de almacenamiento, °C	% HMW a T <sub>0</sub>	% HMW a los 6 meses	% HMW a los 12 meses
Ciclo de trabajo 1 (por debajo del colapso)	4	1,7	1,8	2,2
	25		2,1	2,7
	40		3,0	4,3
Ciclo de robustez (por encima del colapso)	4	0,9	0,9	0,7
	25		1,1	0,9
	40		2,0	2,4

25 Para resumir los datos anteriores, se contempla que, para proteínas altamente concentradas, la liofilización por encima de la temperatura de colapso de la fase amorfa (que produce un micro colapso, pero no un colapso de la torta detectado visualmente) puede mejorar la estabilidad del producto, en particular, si la humedad residual está dentro de las especificaciones.

### Ejemplo 3: Liofilización de polisacáridos de vacuna multivalente a la temperatura de colapso

30 En este ejemplo, un polisacárido no conjugado de uno de los serotipos de la vacuna neumocócica 13-Valent (Serotipo X) se liofilizó a tres temperaturas diferentes durante el desecación primaria. La primera temperatura estaba por debajo de la temperatura de colapso, el segundo estaba ligeramente por encima de la temperatura de colapso y el tercero estaba aproximadamente 10 °C por encima de la temperatura de colapso. La formulación de liofilización contenía el polisacárido, sacarosa y proteína CRM<sub>197</sub> de difteria, con un contenido total de sólidos secos del 6,5 %. La liofilización se realizó en viales de tubos Schott de 50 ml rellenos con 5 ml de solución. La humedad residual, la temperatura de transición vítrea, baja, el tiempo de reconstitución y la eficacia de conjugación del material reconstituido fueron los atributos de calidad utilizados para evaluar el producto liofilizado desecado por congelación en las condiciones que se muestran a continuación. Los valores objetivo para estos atributos son: una humedad residual de ≤5 %, una temperatura de transición vítrea de ≥20 °C y un tiempo de reconstitución de ≤ 1 minuto.

40 Antes de la liofilización, Se realizó un análisis térmico para medir la transición vítrea y las temperaturas de colapso de la solución de Serotipo X. La temperatura de transición vítrea, medido como un punto medio de la transición mediante calorimetría diferencial de barrido modulada ("DSC") (Q1000, TA Instruments, New Castle, DE), fue -34,7 °C. La microscopía de desecación por congelación ("FDM"), realizada con el escenario Linkam FDSC-196 (Surrey, Reino Unido) conectado al microscopio Nikon Eclipse E600 (Melville, NY), mostró que pequeñas áreas vacías en una estructura de matriz liofilizada comenzaron a formarse cuando la temperatura se elevó a -34 °C (Imagen superior, Figura 11). Cuando la temperatura del producto se aumentó a -33 °C, la estructura del producto seco en la superficie de sublimación comenzó a colapsar. Por tanto, la temperatura de colapso microscópica para esta formulación particular fue de -33 °C, menos de 2 °C por encima de la temperatura de transición vítrea. Tanto la DSC como la FDM mostraron que el inicio de la endotermia de fusión fue de aproximadamente -2,7 °C.

*Ciclo de liofilización de referencia: por debajo de la temperatura de colapso*

El ciclo inicial de desecación por congelación se realizó a una temperatura del producto cercana a  $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 12), muy por debajo de la temperatura de colapso. La congelación se realizó en baño de hielo seco con etanol; los viales con material congelado se cargaron en estantes preenfriados ( $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) de liofilizador Benchmark 1000 (SP Industries, Gardiner, Nueva York). La desecación primaria se completó antes de la rampa de desecación secundaria. La humedad residual del material liofilizado fue baja,  $0,08\pm 0,01\%$ . Se detectaron dos temperaturas de transición vítrea: uno más pequeño a  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$  y uno más grande a  $84\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A pesar de la contracción, el aspecto de la torta fue aceptable (Figura 13). La reconstitución del material liofilizado fue rápida (menos de 1 minuto, incluido el tiempo para que la solución se aclare después de la reconstitución). La eficiencia de conjugación del material liofilizado estuvo dentro del intervalo aceptable (Tabla 4). Sin embargo, el ciclo de liofilización fue muy largo (aproximadamente 52 horas) considerando que la altura de la torta fue de solo 0,5 cm.

#### *Desecación por congelación ligeramente por encima de la temperatura de colapso (Estudio de colapso 1)*

Cuando el mismo material se liofilizó ligeramente por encima de la temperatura de colapso (manteniendo la temperatura del producto durante la desecación primaria a aproximadamente  $-31\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), el tiempo del ciclo se redujo a 20 horas (Figura 14). La humedad residual del material liofilizado fue  $3,69 \pm 0,13\%$  y tenía una temperatura de transición vítrea baja de  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La combinación del fenómeno de colapso y la disminución de la temperatura de desecación secundaria, desde  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (véase la Figura 12) a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (véase la Figura 14) contribuyó a la mayor humedad residual, en comparación con el ciclo basal. En una comparación adicional con el ciclo inicial de liofilización (véase el Estudio de colapso 1 anterior), el aspecto de la torta fue ligeramente alterado por el fenómeno de colapso (Figura 15, vial izquierdo), mientras que el tiempo de reconstitución no se vio afectado. Las características bioquímicas con respecto a la eficiencia de conjugación del material fabricado ligeramente por encima de la temperatura de colapso estaban dentro de las especificaciones (Tabla 4).

#### *Desecación por congelación aproximadamente $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por encima de la temperatura de colapso (Estudio de colapso 2)*

Para evaluar el efecto del colapso bruto en la calidad del material liofilizado, La solución de serotipo X se liofilizó en el mismo liofilizador en el mismo recipiente (con el mismo volumen de llenado), pero a una temperatura del producto casi  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  más alta que la temperatura de colapso (el ejemplo del ciclo se muestra en la Figura 16). La desecación primaria se completó en 8 horas, mucho menos tiempo en comparación con las 35 horas para el ciclo de referencia (Figura 12) y aún menos de las 10 horas para el estudio de colapso 1 (Figura 14). Para impartir más estrés al producto, el sistema de refrigeración se apagó al final del desecación primaria mientras se dejaba la bomba de vacío encendida (Figura 16). Esta combinación de tensiones dio como resultado una humedad residual muy alta de  $6,12 \pm 0,15\%$  y una apariencia pobre de la torta en comparación con los otros materiales liofilizados divulgados en el presente documento (Figura 15, vial derecho). La temperatura de transición vítrea del material liofilizado después del colapso del estudio 2 (Figura 16) fue de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bajo en comparación con los otros ciclos de liofilización. A pesar de la elevada humedad y el mal aspecto de la torta, la reconstitución fue aún menos de 1 minuto. Más importante, las características bioquímicas del material reconstituido fabricado muy por encima de la temperatura de colapso cumplieron con casi todos los criterios de aceptación con respecto a la eficiencia de conjugación (Tabla 4). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se contempla que algunos materiales biológicos liofilizados se puedan reconstituir fácilmente incluso después de liofilizar en condiciones extremas (por ejemplo, aproximadamente  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  por encima de la temperatura de colapso) mientras se mantienen sus propiedades importantes. La temperatura del producto durante este tratamiento permaneció por debajo del punto de fusión del eutéctico concentrado congelado con hielo. Por tanto, la liofilización por encima de la temperatura de colapso pero por debajo del punto de fusión puede ser muy beneficiosa desde una perspectiva económica, debido a la reducción significativa en el tiempo de procedimiento, si la calidad del material liofilizado sigue siendo aceptable.

#### *Evaluación de la eficiencia de conjugación*

La calidad de los polisacáridos liofilizados se evaluó por la capacidad de los polisacáridos para conjugarse con una proteína transportadora (por ejemplo, eficiencia de conjugación) utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica. En este ejemplo, los polisacáridos liofilizados se reconstituyen y se conjugan con una proteína transportadora CRM<sub>197</sub>. La eficacia de la conjugación se determinó utilizando los siguientes criterios:

- (1) Relación sacárido a proteína ("SPR"): un indicador de la reproducibilidad y eficiencia de la reacción de conjugación, y se obtiene dividiendo el contenido de sacárido por el contenido de proteína;
- (2) porcentaje (%) de sacárido  $\leq 0,3\text{ Kd}$  (" $0,3\text{ Kd}$ "): distribución de tamaño molecular establecida por cromatografía de exclusión de tamaño determinada por el contenido de polisacárido;
- (3) porcentaje de sacárido libre ("% FS"): la porción de sacárido total que se une de forma no covalente a la proteína transportadora;
- (4) porcentaje de proteína libre - Electroforesis capilar ("% FP-CE"): la porción de proteína transportadora (CRM<sub>197</sub>) que no está conjugada con un sacárido, probada a través de electroforesis capilar.
- (5) Rendimiento ajustable: Rendimiento ajustado basado en el % estimado de FS.

Las propiedades de ejemplo de polisacáridos liofilizados y reconstituidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades del polisacárido liofilizado y reconstituido X

Parámetro	Intervalo aceptable	Material liofilizado		
		Por debajo de la temperatura de colapso (Figura 12)	2 °C por encima de la temperatura de colapso (Figura 14)	10 °C por encima de la temperatura de colapso (Figura 16)
Propiedades del polvo liofilizado				
Humedad residual, %	<5 %	0,08 %	3,69 %	6,12 %
Temperatura de transición vítrea, °C	>20 °C	63/84 °C	44 °C	20 °C
Tiempo de reconstitución	<1 minuto	<1 minuto	<1 minuto	<1 minuto
Propiedades del material reconstituido				
SPR	1,2-2,0	1,5	1,5	1,4
0,3 Kd	45-70 %	56 %	58 %	40 %*
% FS	13-28 %	21 %	22 %	22 %
% FP-CE	<6,6 %	1,7 %	1,6 %	1,7 %
Rendimiento ady.	32-54 %	43 %	40 %	35 %
*El valor de Kd bajo probablemente se debió a una recuperación insuficiente durante la reconstitución, pero no a la calidad del material en sí (confirmado por 4 procedimientos diferentes).				

5 En resumen, este ejemplo ha establecido que los componentes de la vacuna multivalente (por ejemplo, polisacáridos) pueden liofilizarse con una temperatura del producto igual o superior a la temperatura de colapso. Las producciones liofilizadas de este procedimiento tienen una calidad comparable en comparación con el material liofilizado con una temperatura del producto por debajo de la temperatura de colapso. Adicionalmente, el procedimiento general de liofilización lleva menos tiempo cuando la temperatura del producto durante el desecación primaria es igual o superior a la temperatura de colapso.

10 **Ejemplo 4: Vacuna contra virus vivos liofilizados por encima de la temperatura de colapso (no es parte de la invención)**

15 En este ejemplo, se liofilizó una vacuna de pollo joven con virus vivos tanto por encima como por debajo de la temperatura de colapso, y se compararon los resultados. La calidad de la vacuna se evaluó por el aspecto de la torta, humedad residual y estabilidad del título después del almacenamiento a 37 °C durante 3 meses. La temperatura de transición vítrea fue de -26,8 °C medida por DSC modulada. La temperatura de colapso de -18 °C se midió con un microscopio de liofilización (etapa de Linkam). Un ejemplo de ciclo de liofilización realizado por debajo de la temperatura de colapso se muestra en la Figura 17. El aspecto de la torta del material liofilizado fue aceptable (Figura 18, vial izquierdo). La humedad residual fue de 0,5 ± 0,05 %. Cuando el producto se liofilizó por encima de la temperatura de colapso (Figura 19), se observó un colapso visible de la torta liofilizada. La pérdida de estructura era visible en el fondo de la torta (Figura 18, vial derecho). Dado que el ciclo fue largo, la humedad residual del material colapsado fue baja, 0,24 %. El tiempo de reconstitución para ambos materiales fue comparable. Adicionalmente, la estabilidad del material liofilizado por encima de la temperatura de colapso fue mejor que la estabilidad del material producido por debajo de la temperatura de colapso. Como ejemplos, los datos de título mostrados en la Figura 20 después de 3 meses de almacenamiento muestran una estabilidad mejorada para el material liofilizado a una temperatura del producto durante el desecación primaria por encima de la temperatura de colapso. Además, el tiempo de desecación primaria en el ciclo realizado por encima de la temperatura de colapso fue más corto en comparación con el ciclo por debajo de la temperatura de colapso. Por tanto, los experimentos en este ejemplo han establecido una vez más que el colapso durante la congelación parece tener un efecto mínimo sobre los atributos de calidad importantes de los materiales biológicos. En algunos casos, la liofilización por encima del colapso puede mejorar ciertas propiedades de los productos liofilizados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para liofilizar una sustancia farmacéutica en una formulación líquida, que comprende una etapa de congelación, en el que el agua en la formulación líquida se convierte en hielo, seguido de una etapa de desecación primaria, **caracterizado porque** la etapa de desecación primaria elimina el agua en la sustancia farmacéutica por sublimación directa, y se ejecuta a una temperatura del producto igual o superior a la temperatura de colapso pero por debajo de la temperatura de fusión eutéctica sin evitar el colapso de la torta, en el que la temperatura de colapso es la temperatura a la cual la torta liofilizada pierde o cambia su estructura original, de modo que la sustancia farmacéutica liofilizada sea adecuada para su posterior reconstitución en una sustancia activa biológica o farmacéuticamente.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la sustancia farmacéutica está en una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml, al menos 50 mg/ml o al menos 100 mg/ml.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto liofilizado comprende materiales amorfos.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto liofilizado comprende materiales parcialmente cristalinos/parcialmente amorfos.
- 15 5. El procedimiento como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la formulación líquida es una formulación a base de sacarosa.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la formulación líquida se formula de tal manera que la temperatura de colapso es:
  - 20 al menos 1 °C más alto que el punto medio de la temperatura de transición vítrea (Tv),
  - al menos 2 °C más alto que el punto medio de la temperatura de transición vítrea (Tv),
  - al menos 5 °C más alto que el punto medio de la temperatura de transición vítrea (Tv), o
  - al menos 10 °C más alto que el punto medio de la temperatura de transición vítrea (Tv).
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la formulación líquida comprende un agente estabilizante, y en el que la proporción de la cantidad en masa del agente estabilizante y la proteína no es mayor que 1000.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la proporción de la cantidad en masa del agente estabilizante y la sustancia farmacéutica no es mayor que 500, no mayor que 100, no mayor que 50, no mayor que 10, no mayor que 1, no mayor que 0,5 o no mayor que 0,1.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la formulación líquida comprende además un agente estabilizante, y el agente estabilizador se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, manosa, sorbitol, rafinosa, trehalosa, manitol, cloruro de sodio, arginina, lactosa, hidroxietil almidón, dextrano, polivinilpirrolidona, glicina y una combinación de los mismos.
- 30 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia farmacéutica está en una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml, al menos 10 mg/ml o al menos 50 mg/ml.
- 35 11. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el producto es una proteína en una concentración de al menos 50 mg/ml, y en el que el desecado primario se ejecuta a una temperatura de 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C o 10°C por encima del punto medio de la temperatura de transición vítrea (Tv).
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia farmacéutica es una proteína.
- 40 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la proteína se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o un fragmento del mismo, un factor de crecimiento, un factor de coagulación, una citoquina, una proteína de fusión, una enzima, una proteína portadora o un Inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP™), o una combinación de los mismos.
- 45 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la sustancia farmacéutica es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo de dominio único.
15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que la formulación líquida incluye Tris 10 mM, 4% de manitol, 1% de sacarosa y la proteína en una concentración de 10 mg/ml.
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la formulación líquida tiene un pH de 7,4.
- 50 17. El procedimiento como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la sustancia farmacéutica es un polisacárido no conjugado de uno de los serotipos de la vacuna antineumocócica 13-Valent (serotipo X) y la formulación líquida incluye el polisacárido, sacarosa y la proteína de difteria CRM<sub>197</sub>.

18. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la formulación líquida comprende 5% de sacarosa, histidina 10 mM, metionina 10 mM y polisorbato 80 al 0,01% y en el que la sustancia farmacéutica está en una concentración de 50 mg/ml en la formulación líquida.

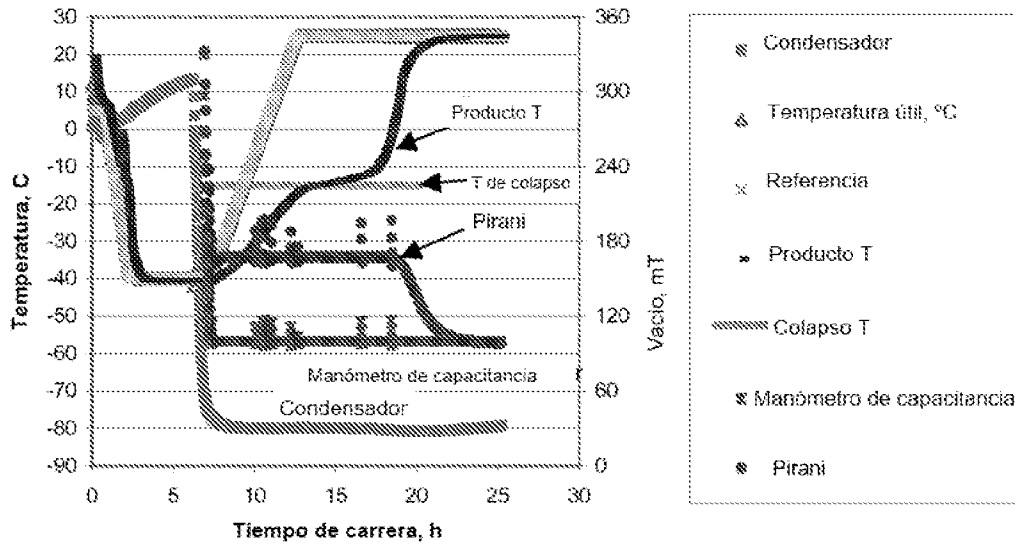


Figura 1

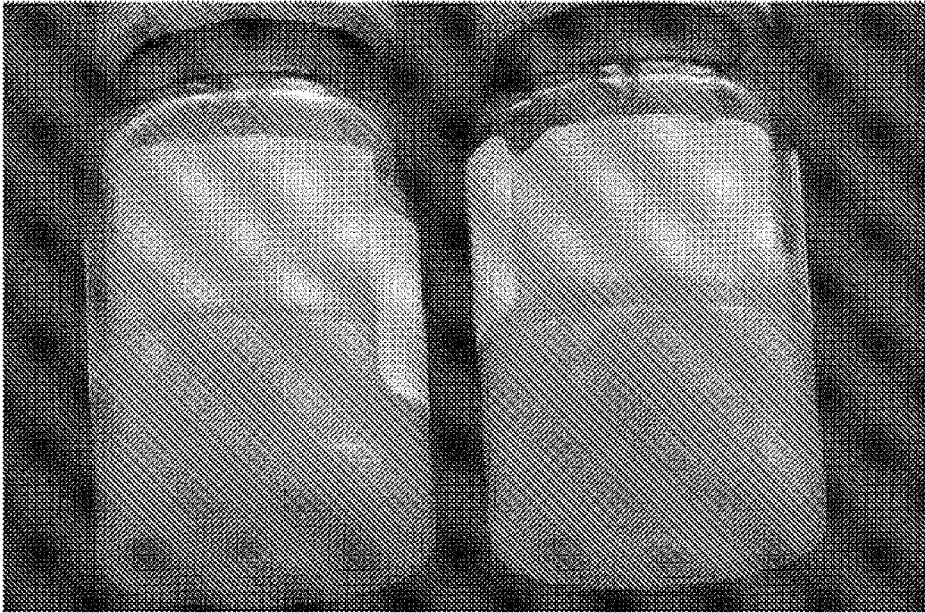


Figura 2

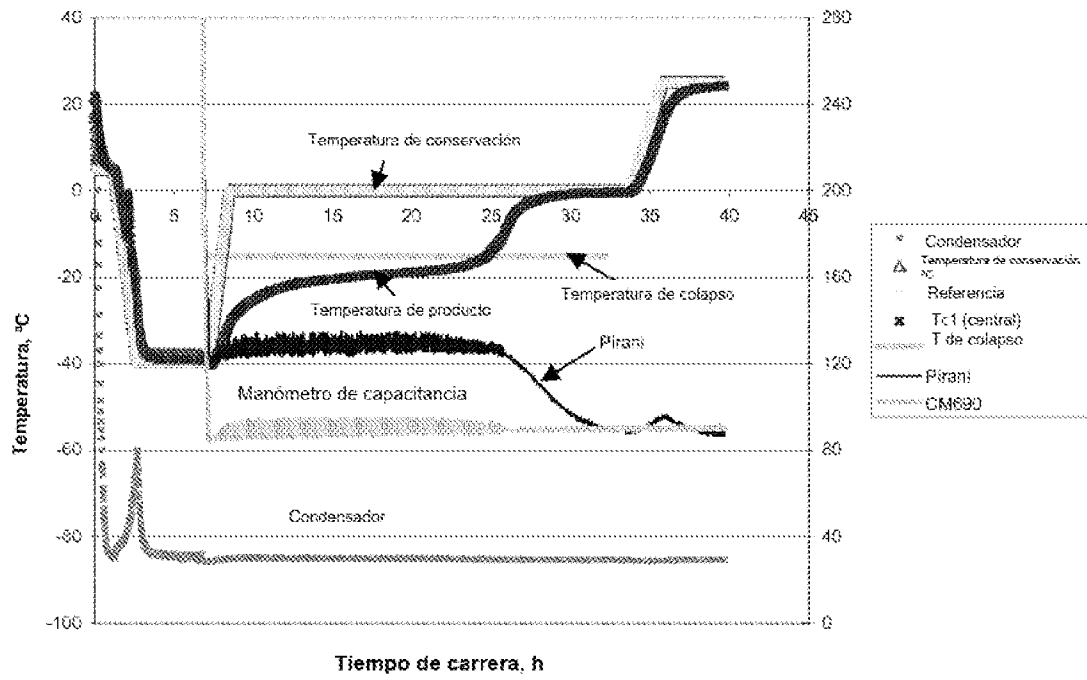


Figura 3

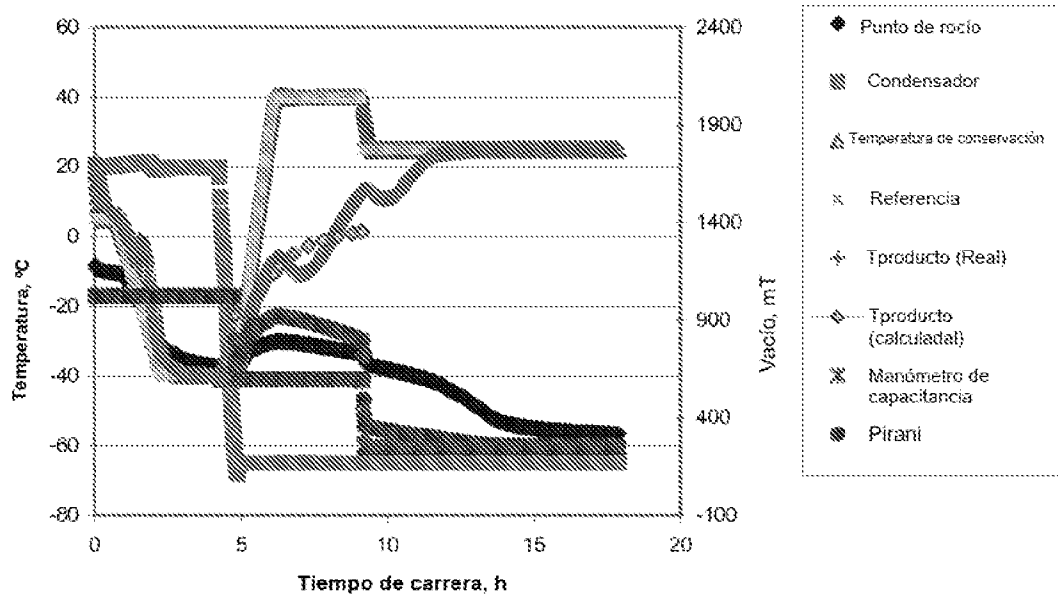


Figura 4

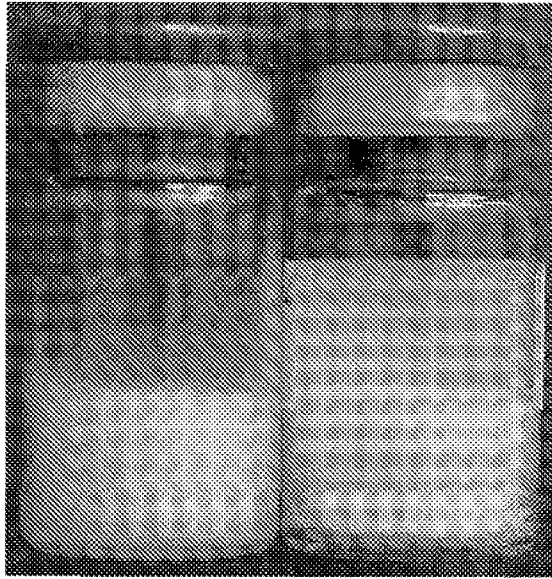


Figura 5

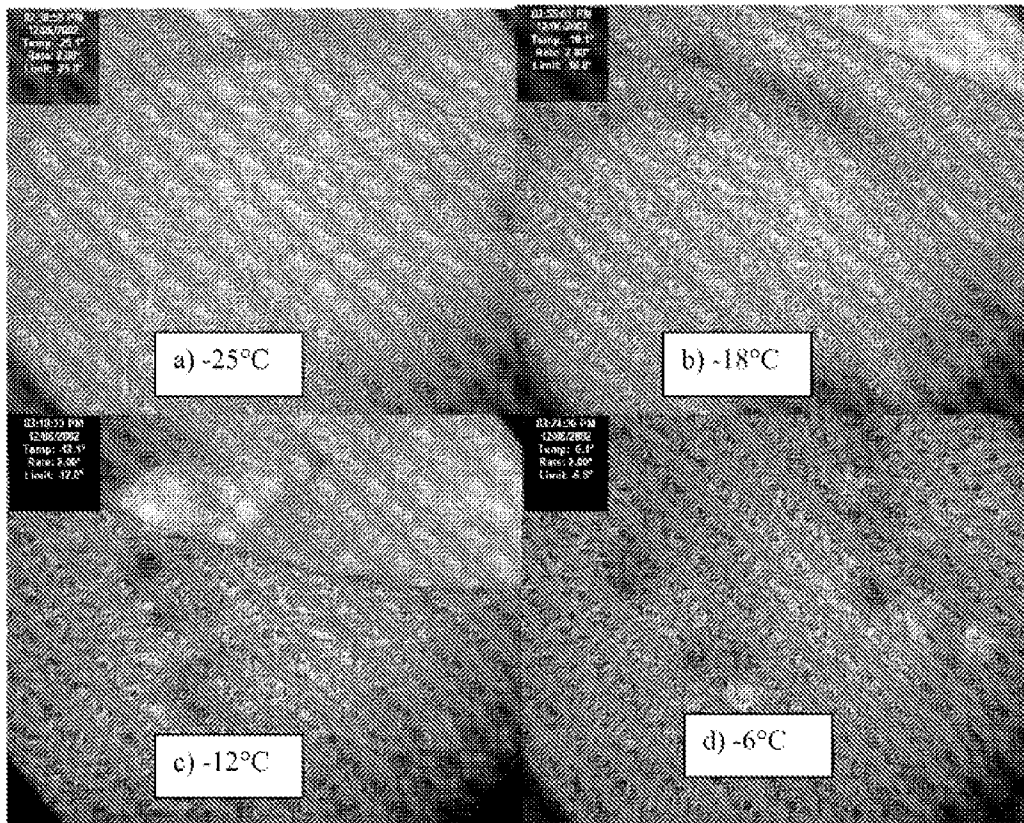


Figura 6

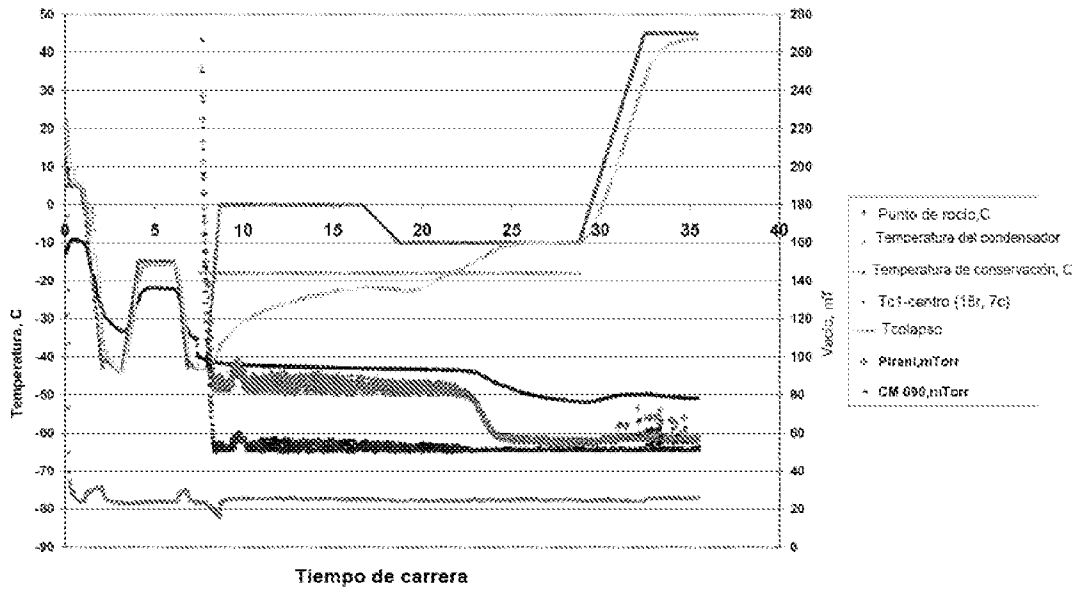


Figura 7

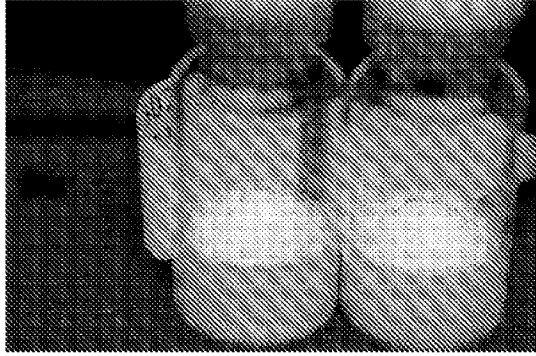


Figura 8

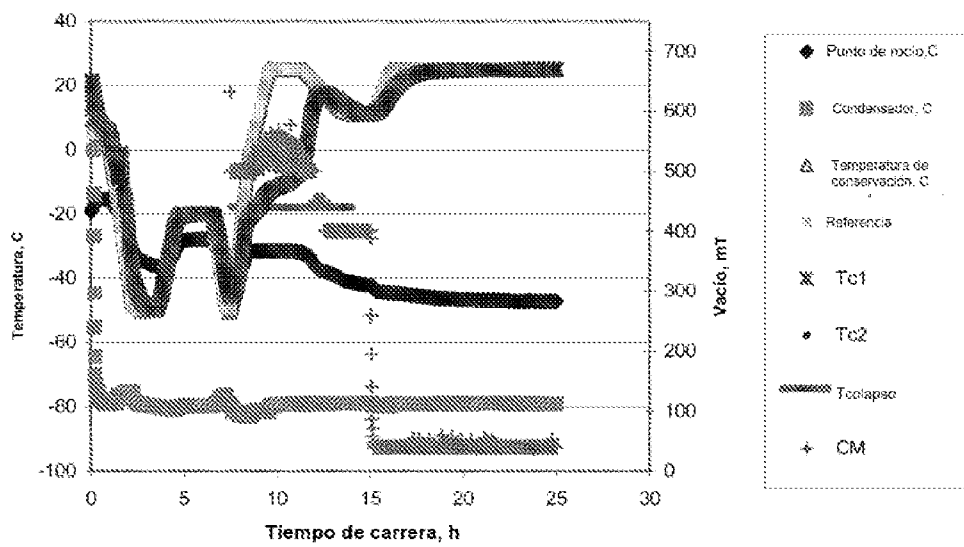


Figura 9

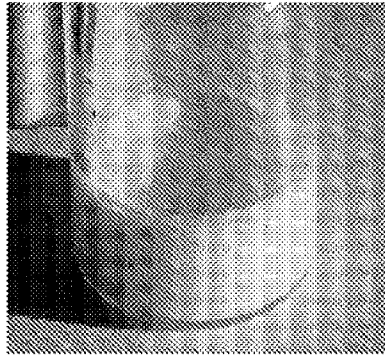


Figura 10

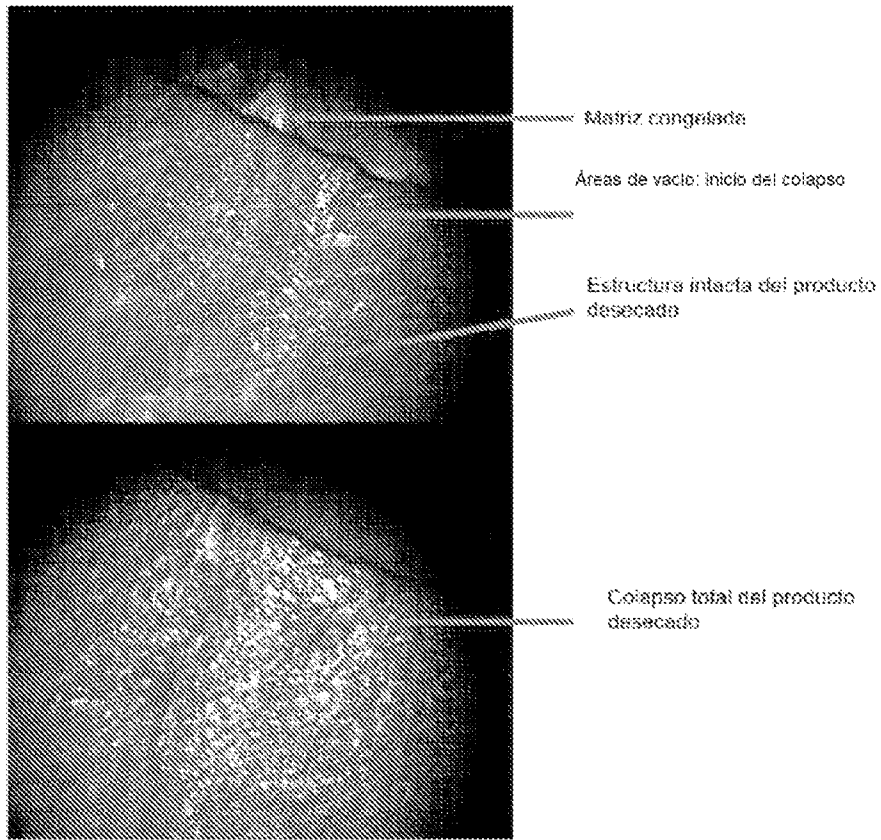


Figura 11

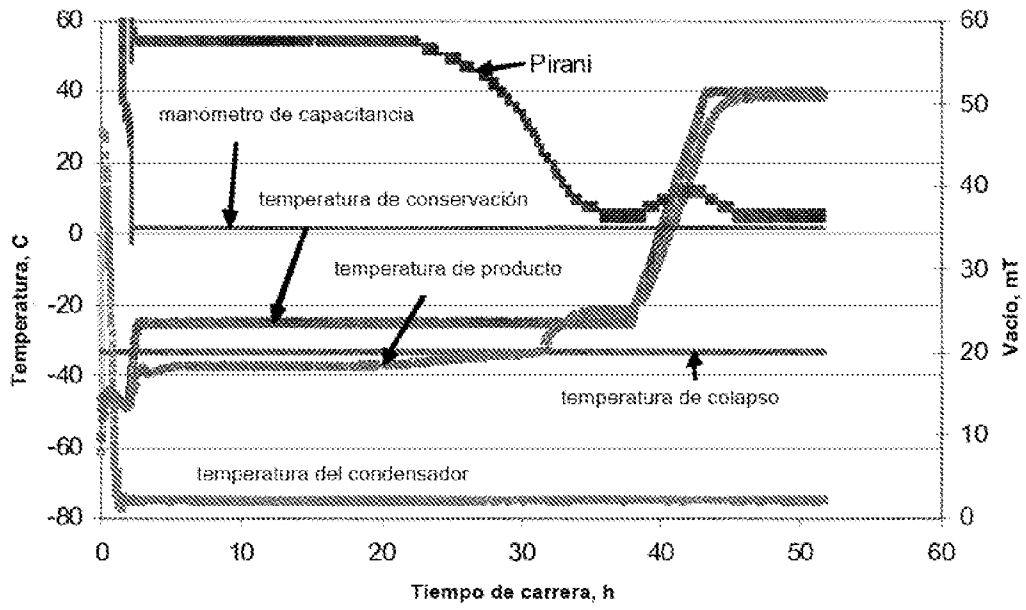


Figura 12



Figura 13

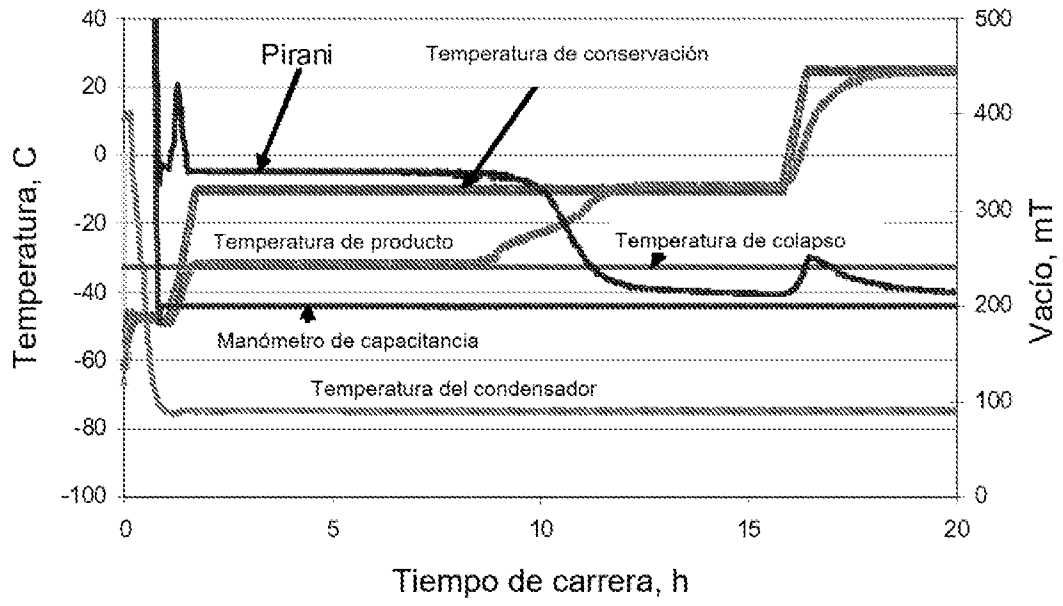


Figura 14

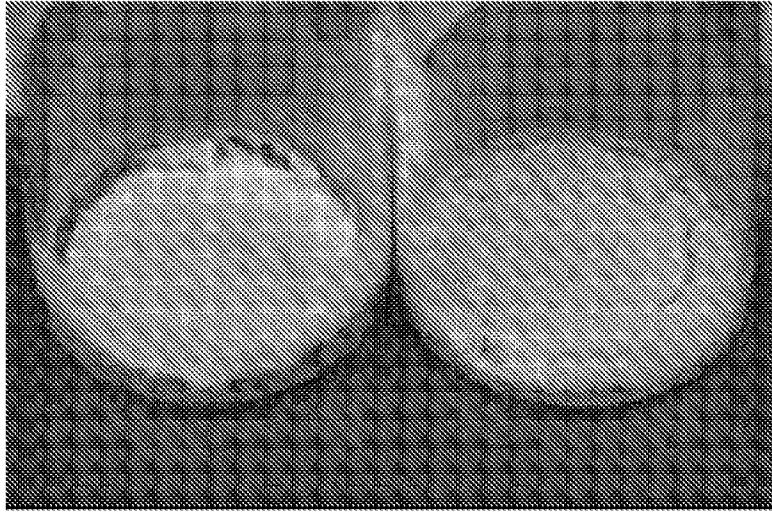


Figura 15

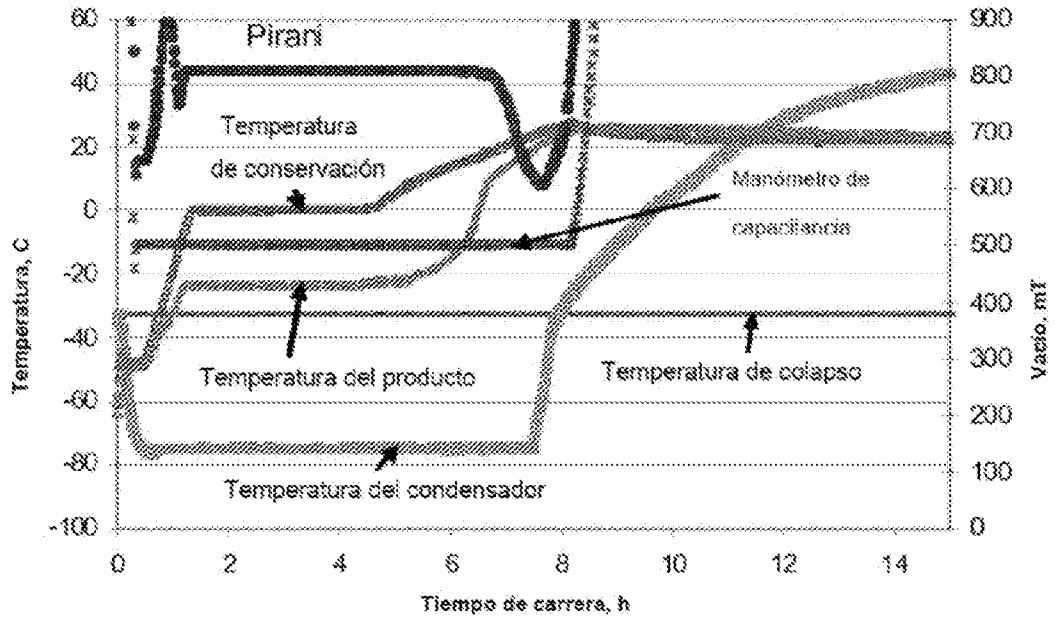


Figura 16

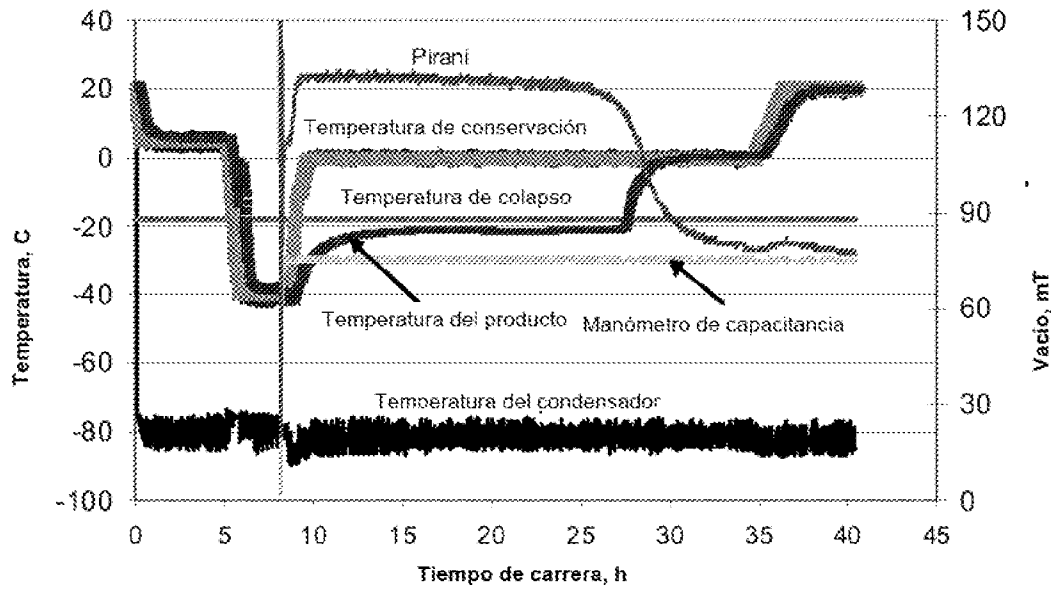


Figura 17

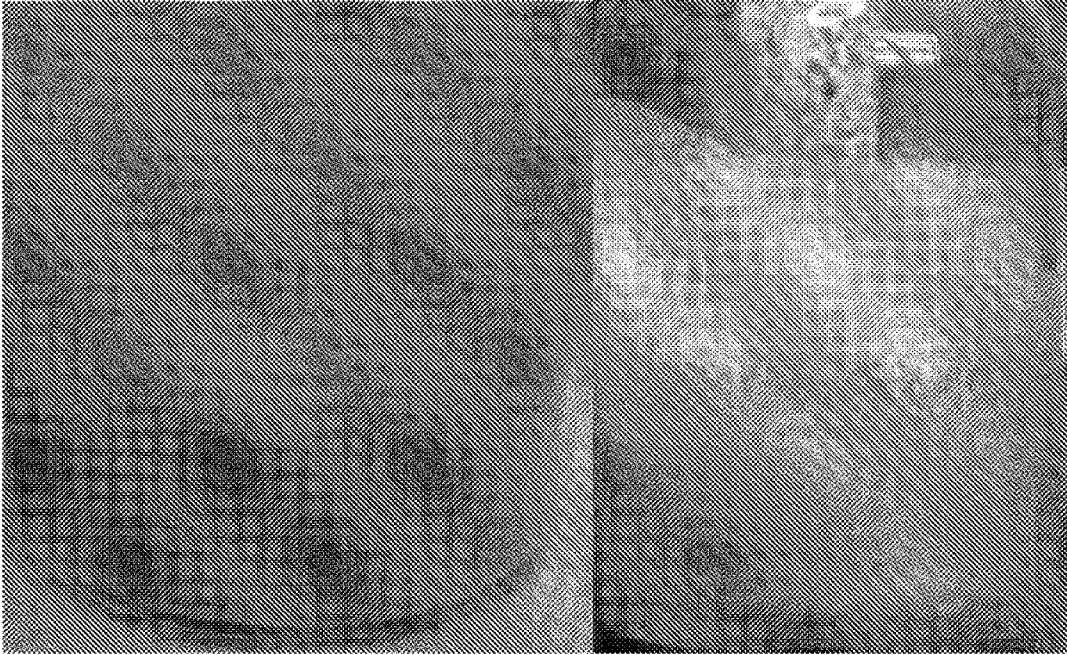


Figura 18

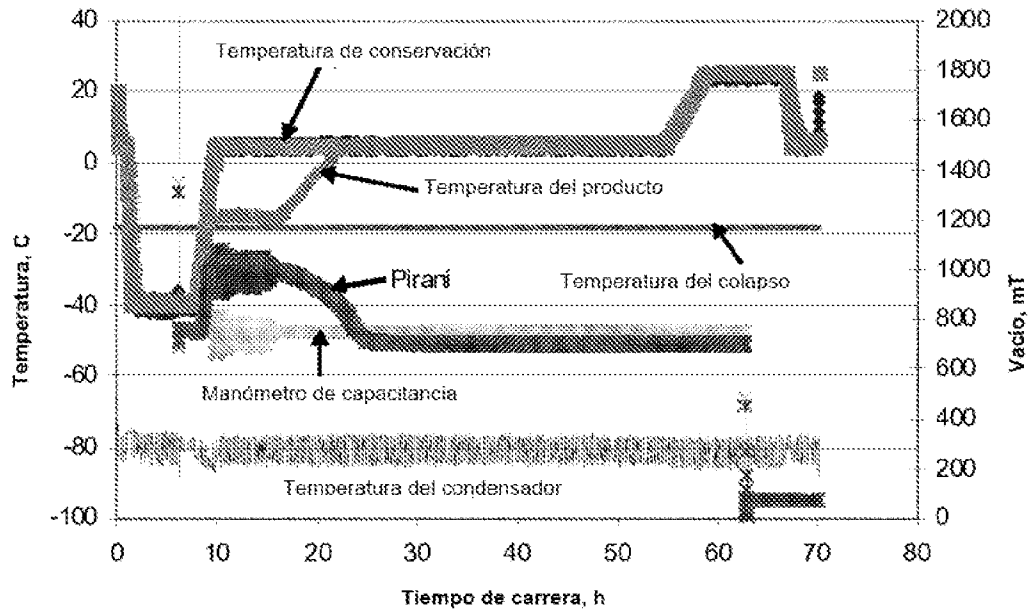


Figura 19

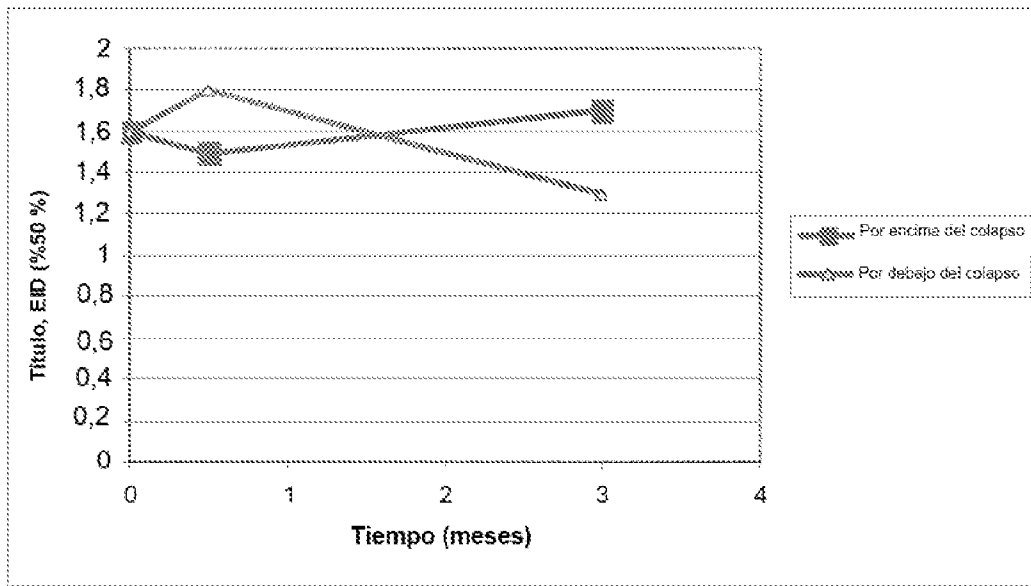


Figura 20