

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Oktober 2011 (13.10.2011)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/124667 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 9/16 (2006.01) A61K 9/19 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/055476

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. April 2011 (08.04.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10159453.9 9. April 2010 (09.04.2010) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **QIAGEN GMBH** [DE/DE]; Qiagen Straße 1, 40724 Hilden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WENDE, Andy** [DE/DE]; Benninghausen 17a, 51399 Bursheld (DE). **JES-ZIORSKI, Markus** [DE/DE]; Seidenweberstraße 5, 40764 Langenfeld (DE).

(74) Anwalt: **GILLE HRABAL STRUCK NEIDLEIN PROP ROOS**; Brucknerstr. 20, 40593 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

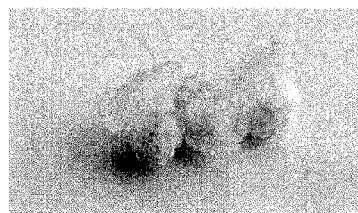
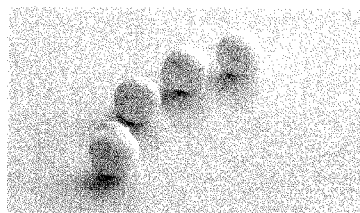
Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)

(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF ESSENTIALLY SPHERICAL LYOPHILISATES

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON IM WESENTLICHEN KUGELFÖRMIGEN LYOPHILISATEN

Figur 1:



(57) Abstract: There is described a process for the preparation of an essentially spherical solid body by means of freeze-drying.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung von einem im Wesentlichen kugelförmigen Festkörper durch Gefriertrocknung.



WO 2011/124667 A2

Verfahren zur Herstellung von im Wesentlichen kugelförmigen Lyophilisaten

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von einem im Wesentlichen kugelförmigen Lyophilisat. Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind entsprechende durch das erfindungsgemäße Verfahren bereitgestellte Lyophilisate sowie deren spezifische Verwendung.

10 Des Weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die kombinierte Verwendung von hydrophilen und hydrophoben Phasen zur Erzeugung von im Wesentlichen kugelförmigen Flüssigkeitsvolumina im Rahmen der Gefriertrocknung.

15 Die Gefriertrocknung, auch als Lyophilisation oder Sublimationstrocknung bezeichnet, ist ein Verfahren zur schonenden Trocknung hochwertiger Produkte. Bei der Gefriertrocknung verdampfen die Eiskristalle direkt ohne den Übergang in den flüssigen Zustand. Das Endprodukt der Gefriertrocknung wird als Lyophilisat bezeichnet.

20 In der Biotechnologie und Pharmaindustrie dient die Gefriertrocknung der Stabilisierung und Haltbarmachung von flüssigen Reagenzienformulierungen, wie Pharmaka und Enzymlösungen. Mit dieser Methode ist es beispielsweise möglich, die Aktivität von empfindlichen Enzymen bei Raumtemperatur für lange Zeit aufrecht zu erhalten. Um den Inhalt der getrockneten Probe einzusetzen (als Pharmakum oder für biologische Reaktionen, wie beispielsweise der PCR (*Polymerase Chain Reaction* (PCR, Polymerase Kettenreaktion))) wird das Lyophilisat mit einem adäquaten Lösungsmittel, bei welchem es sich in der Regel um Wasser handelt, versetzt. Dies führt zu einer sofortigen Rücklösung der getrockneten Inhaltsstoffe, welche dann in Lösung wieder ihre ursprüngliche Wirkung entfalten.

30

In der Pharmaindustrie überwiegen pulverförmige Formulierungen bzw. poröse Gefriertrocknungskuchen, die üblicherweise in einem mit einem Septum bestückten Glasgefäß getrocknet und anschließend verschlossen werden.

35 Daneben ist es aber auch möglich, lyophilisierte Proben in Kugelform herzu-

stellen, welche mehrere Vorteile im Vergleich zu Lyophilisaten mit anderen geometrischen Formen aufweisen:

5 So ermöglicht bzw. erleichtert die Kugelform von entsprechenden Lyophilisaten das spätere Konfektionieren der Proben durch ihre kompakte und wohldefinierte Geometrie sowie ihre Rieselfähigkeit.

10 Darüber hinaus sind kugelförmige Lyophilisate dahingehend inhärent, als dass eine unspezifische Adsorption von Reagenzien an beispielsweise Oberflächen des Behälters, in dem die Probe gefriergetrocknet wird, nahezu ausgeschlossen oder deutlich reduziert ist.

15 Die Anwendung der Gefriertrocknung als Kryogranulierung ist beispielsweise in WO 03/020959 A, WO 2005/058474 A und aus dem Artikel „Cryogranulation: A Potential New Final Process for Bulk Drug Substances“, D. J. Schmidt et al. Biopharm. 1997 (Seiten 28 ff.) bekannt, wobei die hierin beschriebenen Verfahren dahingehend nachteilig sind, dass sie zu einer sehr schnellen Abkühlung der zu gefriertrocknenden Reagenzien führen.

20 Verfahren zur Herstellung von kugelförmigen Lyophilisaten sind an sich bekannt.

25 So offenbart beispielsweise die US 2005/0069898 A die Herstellung von lyophilisierten Kugeln durch ein Verfahren, in welchem zunächst eine wässrige Lösung der zu gefriertrocknenden Substanz hergestellt wird. Eine kugelförmige Ausbildung der Lösung ergibt sich durch das Auftragen der Emulsion auf einem Träger, wie einem Glas oder einem beschichteten Aluminiummaterial, auf einer kryogenen Flüssigkeit oder einer durch eine kryogene Flüssigkeit gekühlten Oberfläche. Ferner kann die Lösung auch in flüssigem Stickstoff eingetragen werden. Hierdurch wird die Emulsion schockgefroren und kann anschließend einer Gefriertrocknung unterworfen werden. Weitere Trocknungsverfahren, die in der US 2005/0069898 A erwähnt werden, sind einfache Vakuumtrocknung und Verdampfung.

30

Um während der Trocknung eine Agglomerisation von den kugelförmigen Volumina zu vermeiden, werden diese durch geeignete Vorrichtungen auf Abstand gehalten.

- 5 Nachteilig an diesem Verfahren ist, dass es nur batchweise durchgeführt werden kann. Ein weiterer Nachteil besteht in dem für das Verfahren unerlässlichen Umgang mit flüssigem Stickstoff, durch welchen es bei der Durchführung des Einfrierens zu einer hohen Abkühlrate der Probe kommt, die darüber hinaus nicht beeinflussbar ist. Hohe Abkühlraten können dabei zu
10 einer Belastung der zu lyophilisierenden Probe führen.

Ein ähnliches Verfahren zur Herstellung von kugelförmigen Lyophilisaten wird in der WO 2008/144063 A offenbart, in welcher die Gefriertrocknung einer Sucralose-Lösung beschrieben wird. Zu diesem Zweck wird die Sucralose-Lösung mit einer kalten Oberfläche oder einem kalten Fluid in Kontakt ge-
15 bracht, um die Lösung einzufrieren. Anschließend wird die eingefrorene Lösung gefriergetrocknet. Vor dem eigentlichen Schockfrieren wird jedoch zunächst eine Tröpfchenform der zu gefriertrocknenden Lösung erzeugt. In den Beispielen der WO 2008/144063 A erfolgt diese Bildung der Tropfenform
20 spontan durch Einbringen der zu gefriertrocknenden Lösung in flüssigen Stickstoff. Auch bei diesem Verfahren kommt es durch die Verwendung von flüssigem Stickstoff zu hohen Abkühlraten und damit zu einer Belastung der zu lyophilisierenden Probe.

- 25 Ferner können die zu gefriertrocknenden Lösungen auch in Tropfenform in einen Gasträger gesprüht werden, wobei das Gas kalt genug ist, die Tröpfchen einzufrieren. Anschließend erfolgt dann die Gefriertrocknung der eingefrorenen Tröpfchen. Auch diese Lyophilisate weisen eine kugelförmige Struktur auf.

30

Eine weitere Vorgehensweise zur Herstellung von gefriergetrockneten kugelförmigen Formkörpern besteht darin, eine Flüssigkeit auf eine kryogen gekühlte hydrophobe Oberfläche, beispielsweise aus Diamant, Siliziumdioxid oder PTFE, zu dispensieren. Die Dispensiergeschwindigkeit ist für verschiedene Probenvolumina empirisch zu bestimmen. Das maximal herstellbare
35

Kugelvolumen ist jedoch auf 35 μ l begrenzt. Ein entsprechendes Verfahren ist beispielsweise in der US 2007/0259348 A beschrieben.

5 Diese aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Herstellung von gefriergetrockneten kugelförmigen Formkörpern sind dahingehend nachteilig, als dass das herstellbare Kugelvolumen begrenzt ist. Zur Herstellung der entsprechenden gefriergetrockneten Formkörper ist ferner der Umgang mit kryogenen Substanzen, wie beispielsweise Flüssigstickstoff, zwingend erforderlich, was die jeweiligen Verfahren umständlich macht und darüber kostenintensiv ist. Ferner kann es durch die Verwendung entsprechender kryogener Substanzen zu Belastungen der zu lyophilisierenden Substanzen aufgrund hoher Abkühlraten kommen.

15 Darüber hinaus ist es bei den vorbeschriebenen Verfahren erforderlich, dass die lyophilisierten Kugeln nach ihrer jeweiligen Herstellung immer in einem zweiten Arbeitsgang in das final benutzte Transport-, Lager- bzw. Reaktionsgefäß umgefüllt werden, was ebenfalls umständlich ist und insbesondere bei empfindlichen Reagenzien zu einer Zersetzung oder Verschlechterung des Reagenz führen kann.

20 Ferner sind Verfahren zur Aliquotierung von Reagenzien bekannt, wie aus EP 2 168 557 A und CA 2,016,285, die jedoch keine Anwendung in der Gefrier-trocknung umfassen.

25 Die vorliegende Erfindung stellt sich nunmehr die Aufgabe, die bekannten Verfahren zur Herstellung von kugelförmigen Lyophilisate durch Gefriertrocknung insbesondere im Hinblick auf die vorstehend genannten Nachteile zu verbessern.

30 Insbesondere ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von kugelförmigen Lyophilisaten durch Gefriertrocknung bereitzustellen, bei welchem das herstellbare Kugelvolumen im Wesentlichen keiner Begrenzung unterliegt.

35 Des Weiteren stellt sich die vorliegende Erfindung vorzugsweise die Aufgabe, ein Verfahren zur Herstellung von kugelförmigen Lyophilisaten durch Gefrier-

trocknung bereitzustellen, mit welchem eine kontinuierliche Herstellung von gefriergetrockneten Formkörpern möglich ist.

Eine weitere Aufgabe, welche von der vorliegenden Erfindung vorzugsweise gelöst wird, ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von gefriergetrockneten Lyophilisaten, bei welchem ein Umgang mit kryogenen Substanzen, wie beispielsweise Flüssigstickstoff, nicht erforderlich ist. Hierdurch soll das entsprechende Verfahren einfach und kostengünstig durchführbar sein.

Ferner soll die vorliegende Erfindung insbesondere die Aufgabe lösen, ein Verfahren zur Herstellung von gefriergetrockneten Lyophilisaten bereitzustellen, bei welchem die lyophilisierenden Formkörper nach ihrer jeweiligen Herstellung nicht mehr in das endgültig benutzte Transport-, Lager- bzw. Reaktionsgefäß umgefüllt werden müssen. Gemäß dieser Aufgabe wird somit vorzugsweise ein Verfahren nachgesucht, welches bereits in geeigneten Transport- bzw. Lagergefäßen durchgeführt werden kann. Bei diesen Gefäßen soll es sich insbesondere auch um Reaktionsgefäße handeln können, in welchen die Lyophilisate später wieder erneut umgesetzt werden.

Schließlich stellt sich die vorliegende Erfindung insbesondere auch die Aufgabe, ein Verfahren zur Herstellung von gefriergetrockneten Formkörpern bereitzustellen, bei welchem hohe Abkühlraten, wie beispielsweise von ca. 50 bis 100 °C pro Sekunde, die bei empfindlichen Substanzen zu Schäden führen können, vermieden werden.

Die vorstehenden Aufgaben werden durch das im Folgenden beschriebene erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von gefriergetrockneten Lyophilisaten gelöst, wobei einzelne der vorstehenden Aufgaben insbesondere durch bevorzugte Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens gelöst werden.

Die Lösung der der vorliegenden Erfindung zugrundeliegenden Aufgabe geht aus von einem Verfahren zur Herstellung von einem festen Formkörper, enthaltend mindestens ein Reagenz, durch Gefriertrocknung einer flüssigen

Phase, welche das mindestens eine Reagenz umfasst, gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte:

- (1) Bereitstellung einer ersten Phase, welche mindestens ein zu gefrier-trocknendes Reagenz enthält;
- 5 (2) Inkontaktbringen der ersten Phase mit einer zweiten Phase, wobei eine der beiden Phasen hydrophob ist und die andere Phase hydrophil ist;
- (3) Einfrieren der ersten Phase in dem aus Verfahrensschritt (2) resultierenden System aus zwei Phasen und Entfernen der zweiten Phase aus dem System; und
- 10 (4) Gefriertrocknen der aus Verfahrensschritt (3) verbleibenden ersten Phase unter Erhalt eines im Wesentlichen kugelförmigen Lyophilisats.

Erfindungsgemäß ist also vorgesehen, dass eine flüssige Phase, welche das zu gefriertrocknende Reagenz umfasst, zunächst in einzelne diskrete vorbe-

15 stimmte Volumina aliquotiert, d.h. aufgeteilt, wird. Diese Aliquotierung der flüssigen Phase ist vorzugsweise so ausgebildet, dass beliebige, jedoch vorbestimmbare bzw. vorbestimmte Volumina einzelner Aliquots erhalten werden. Verfahrenswesen zur Erzeugung entsprechender Volumina werden später näher beschrieben.

20

Anschließend werden die aliquotierten Volumina der flüssigen Phase abgekühlt und gefriergetrocknet, wobei entsprechende Lyophilisate erhalten werden. Je nach Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens können unterschiedliche Volumina des Lyophilisats erreicht werden:

25

In einer ersten Ausgestaltung weisen die Lyophilisate ein Volumen auf, welches dem Volumen der ersten Phase entspricht.

Auch ist es in einer zweiten Ausgestaltung möglich, dass das Volumen des

30 Lyophilisats kleiner ist als das Flüssigkeitsvolumen der ersten Phase, da durch die Gefriertrocknung die flüssige Phase, in welcher das Reagenz zunächst gelöst oder emulsiert war, entfernt wird.

Schließlich können in einer dritten Ausgestaltung die Volumina der Lyophili-

35 sate auch größer sein als die Volumina der ersten Phase. Dieses ist im All-

gemeinen dann der Fall, wenn man Gefriertrocknungsadditive verwendet, mit welchen die für das Lyophilisat erforderliche Stabilität erreicht werden kann. Geeignete Gefriertrocknungsadditive sind zum Beispiel Zuckerverbindungen, wie Zuckeralkohole. Da sich das Lyophilisat beim Einfrieren gegebenenfalls geringfügig ausdehnen kann und die Gefriertrocknungsadditive somit ein Additivgerüst aufbauen können, welches auch geringfügig größer sein kann als die ursprüngliche flüssige Phase, kann auch das Lyophilisat etwas größer sein als das Volumen der ersten flüssigen Phase, in welcher das Reagenz vorliegt.

Das zu gefriertrocknende Reagenz kann dabei in der flüssigen Phase gelöst oder suspendiert vorliegen. Wenn das zu gefriertrocknende Reagenz in einer Suspension vorliegt, ist es bevorzugt, wenn die Emulsion bis zum Zeitpunkt des vollständigen Einfrierens durch die Abkühlung homogen bleibt und sich nicht entmischt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird die erste Phase vorzugsweise aliquotiert; d.h. das Volumen der ersten Phase wird auf kleinere einzelne, insbesondere vordefinierte Volumina aufgeteilt.

In der vorliegenden Erfindung erfolgt die in dem ersten Verfahrensschritt erforderliche Aliquotierung der flüssigen Phase, welche mindestens ein Reagenz umfasst, durch die kombinierte Verwendung von einer hydrophilen und einer hydrophoben Phase. Unter einer hydrophilen und einer hydrophoben Phase werden insbesondere Phasen verstanden, welche im Wesentlichen nicht miteinander mischbar sind.

Dem erfindungsgemäßen Verfahren liegt die Erkenntnis zugrunde, dass Flüssigkeiten, die in eine nicht mischbare, zweite Flüssigkeit eingebracht werden, spontan eine Kugelform ausbilden. Wenn nun eine flüssige Phase, welche ein zu gefriertrocknendes Reagenz umfasst, in eine nicht mit dieser flüssigen Phase mischbare Flüssigkeit eingebracht wird, bildet sich spontan eine Kugelform der flüssigen Phase, enthaltend das Reagenz, aus. Bei der Gefriertrocknung wird diese Kugelform aufrecht gehalten.

Die erste und die zweite Phase sind so ausgebildet, dass bei einer Temperatur von im Allgemeinen mindestens 5 °C, bevorzugt mindestens 10 °C, weiter bevorzugt mindestens 15 °C, noch weiter bevorzugt mindestens 20 °C, unterhalb des Gefrierpunkts der ersten Phase, welche das zu gefriertrocknende Reagenz enthält, beide Phasen nicht miteinander mischbar sind und es bei dem Inkontaktbringen der ersten und der zweiten Phase zu einer Phasentrennung kommt. Unter nicht miteinander mischbar wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass die erste Phase sich mit der zweiten Phase zu weniger als 10 Vol-%, bevorzugter zu weniger als 5 Vol-%, am bevorzugtesten zu weniger als 1 Vol-%, mischt.

Im Folgenden werden zwei Ausführungsformen beschrieben, in welchen es unter Verwendung von einer hydrophilen und einer hydrophoben Phase zu einer Aliquotierung des Volumens der einen Phase, enthaltend das mindestens eine Reagenz, in der anderen Phase kommt.

In einer ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt das Reagenz, welches als gefriergetrockneter Lyophilisat erhalten werden soll, in der hydrophilen Phase vor.

20

Diese hydrophile Phase wird in die hydrophobe Phase eingetragen. Durch die Auswahl entsprechender hydrophiler und hydrophober Phasen können durch das Einbringen der hydrophilen Phase in die hydrophobe Phase diskrete spezifische Volumina an hydrophiler Phase, vorzugsweise in Kugelform, in der hydrophoben Phase erhalten werden. In diesen spezifischen einzelnen kugelförmigen Volumina der hydrophilen Phase liegt das mindestens eine Reagenz vor.

25

Der Schmelzpunkt der hydrophoben Phase liegt in dieser ersten Ausführungsform vorzugsweise um mindestens 10 °C, besonders bevorzugt 15 °C, insbesondere 20 °C, niedriger als der Schmelzpunkt der hydrophilen Phase, so dass durch Einfrieren der Mischung aus hydrophiler und hydrophober Phase die hydrophobe Phase vorzugsweise rückstandsfrei entfernt werden kann. Dieses kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass die hydrophile und hydrophobe Phase auf eine Temperatur abgekühlt wird, welche niedriger ist als

30

35

der Schmelzpunkt der hydrophilen Phase, die damit einfriert, und höher ist als der Schmelzpunkt der hydrophoben Phase, die damit flüssig bleibt. Wenn diese entsprechende Temperatur erreicht wurde, können die beiden Phasen durch übliche Fest-Flüssig-Abtrennungungsverfahren getrennt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren wird dabei vorzugsweise auf einer Glasfritte durchgeführt, so dass die im flüssigen Zustand verbleibende hydrophobe Phase durch den Frittenboden abgesaugt werden kann. Auch alternative Abtrennverfahren für die flüssige hydrophobe Phase von der hydrophilen Phase, wie beispielsweise ein Abdekantieren der flüssigen hydrophoben Phase von der festen eingefrorenen hydrophilen Phase, können angewendet werden.

Im Allgemeinen werden in dieser ersten Ausführungsform die Dichten der hydrophilen und hydrophoben Phase so aufeinander abgestimmt, dass die Dichte der hydrophilen Phase ungefähr gleich oder größer ist als die der hydrophoben Phase. In der ersten Ausführungsform führt das dazu, dass bei einem Eintragen der hydrophilen Phase in die hydrophobe Phase die hydrophile Phase auf den Boden des Gefäßes, in welchem das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt wird, sinkt. Um eine Bodenberührung der hydrophilen Phase in dem Gefäß zu vermeiden, kann bei Verwendung einer Glasfritte beispielsweise der Frittenboden mit der hydrophoben Phase getränkt werden. Wenn die hydrophile Phase den Boden berührt, kann es zu einer Auflösung der kugelförmigen Struktur der hydrophilen Phase kommen.

In einer bevorzugten Ausgestaltung der ersten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren durch folgende Verfahrensschritte charakterisiert:

(1.1) Bereitstellung einer hydrophilen Phase, welche mindestens ein zu gefriertrocknendes Reagenz enthält;

(1.2) Inkontaktbringen der hydrophilen Phase mit einer hydrophoben Phase, so dass sich eine Flüssigkeitskugel der hydrophilen Phase in der hydrophoben Phase ausbildet;

(1.3) Einfrieren der hydrophilen Phase in dem aus Verfahrensschritt (1.2) resultierenden System aus hydrophiler und hydrophober Phase und Entfernen der flüssigen hydrophoben Phase aus dem System; und

- 5 (1.4) Gefriertrocknen der aus Verfahrensschritt (1.3) resultierenden hydrophilen Phase unter Erhalt eines im Wesentlichen kugelförmigen Lyophilisats.

10 Im Verfahrensschritt (1.3) wird die Mischung aus hydrophiler und hydrophober Phase eingefroren, so dass die hydrophile Phase fest wird und die hydrophobe Phase flüssig bleibt. Die Geschwindigkeit des Einfrierens kann dabei in weiten Bereichen variieren und in dem Fall von empfindlichen zu lyophilisierenden Reagenzien kann das Einfrieren mit einer möglichst langsamen Einfriergeschwindigkeit durchgeführt werden. Dieses unterscheidet das erfindungsgemäße Verfahren von den üblichen aus dem Stand der Technik be-
15 kannten und zuvor referierten Verfahren der Kryogranulierung, bei welchen die flüssige Phase, enthaltend das zu gefriertrocknende Reagenz, unmittelbar mit dem kryogenen Kühlmittel, beispielsweise flüssigem Stickstoff, in Kontakt gebracht wird. Hierbei wird das Reagenz sozusagen schockgefroren,
20 was bei empfindlichen Reagenzien ein Nachteil sein kann.

Bei der hydrophilen Phase, in welcher das zumindest eine Reagenz, das einer Gefriertrocknung unterworfen werden soll, vorliegt, handelt es sich vorzugsweise um eine wässrige Phase, in welcher das Reagenz gelöst oder sus-
25 pendiert ist.

Als hydrophobe Phasen sind alle Flüssigkeiten denkbar, die in einem geeigneten Temperaturbereich (kleiner gleich $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ und größer gleich $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$) flüssig sind und zu keiner Durchmischung mit der hydrophilen, vorzugsweise
30 wässrigen Phase führen. Darüber hinaus weist die hydrophobe Phase vorzugsweise den zuvor bezeichneten Schmelzpunkt (im Verhältnis zur hydrophilen Phase) auf.

Geeignete hydrophobe Phasen sind insbesondere Silikonöle, Paraffinöle und
35 Mineralöle, wie Alkane im Kettenlängenbereich von C_7 (Heptan) bis C_{12} (Dodekan), da diese eine Schmelztemperatur von $-92\text{ }^{\circ}\text{C}$ (C_7) bzw. $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (C_{12})

und eine Siedetemperatur von 98 °C (C₇) bzw. 216 °C (C₁₂) besitzen. Weitere geeignete hydrophobe Phasen sind organische Öle auf Basis von Pflanzen oder Tieren, wie beispielsweise Algen und Hefen, soweit ihre Schmelztemperatur unter -10 °C liegt. Besondere Beispiele sind ungesättigte Ölsäuren.

5

Von den vorstehend genannten hydrophoben Phasen sind insbesondere Silikonöle bevorzugt. Des Weiteren ist insbesondere die Verwendung von Silikonölen als hydrophobe Phase und von wässrigen Lösungen bzw. Suspensionen als hydrophile Phase bevorzugt. Der Vorteil von Silikonölen als hydrophobe Phase liegt darin, dass sie in einem sehr breiten Temperaturbereich flüssig sind. Außerdem sind sie sehr reaktionsträge und häufig biokompatibel.

10

Besonders bevorzugt als Silikonöl ist das Silikonöl DC200 von Dow Chemical.

15

In einer zweiten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt das zu lyophilisierende Reagenz in der hydrophoben Phase vor. Diese hydrophobe Phase wird dann in die hydrophile Phase eingetragen. Durch die Auswahl entsprechender hydrophiler und hydrophober Phasen können – analog zur ersten Ausführungsform – bei dem Einbringen der hydrophoben Phase in die hydrophile Phase spezifische Volumina an hydrophober Phase erhalten werden. In diesen spezifischen Volumina der hydrophoben Phase, welche insbesondere in Kugelform ausgebildet sind, liegt das mindestens eine zu lyophilisierende Reagenz vor.

20

25

In dieser zweiten Ausführungsform werden vorzugsweise hydrophobe Phasen verwendet, welche einen Schmelzpunkt aufweisen, der um mindestens 10 °C, besonders bevorzugt 15 °C, insbesondere 20 °C, höher liegt als der Schmelzpunkt der hydrophilen Phase, so dass es bei dem Abkühlen der resultierenden Mischung zunächst nur zu einem Einfrieren der hydrophoben Phase kommt. Die hydrophile Phase kann dann – auf identische oder ähnliche Weise wie in der ersten Ausführungsform für die hydrophobe Phase – aus der Mischung entfernt werden. Die verbleibende eingefrorene hydrophobe Phase wird dann abschließend einer Gefriertrocknung zugeführt.

30

35

In einer bevorzugten Ausgestaltung der zweiten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren – in Analogie zu der ersten Ausführungsform – durch folgende Verfahrensschritte charakterisiert:

- 5 (2.1) Bereitstellung einer hydrophoben Phase, welche mindestens ein zu gefriertrocknendes Reagenz enthält;
- (2.2) Inkontaktbringen der hydrophoben Phase mit einer hydrophilen Phase, so dass sich die Flüssigkeitskugel der hydrophoben Phase in der hydrophilen Phase ausbildet;
- 10 (2.3) Einfrieren der hydrophoben Phase in dem aus Verfahrensschritt (2.2) resultierenden System aus hydrophiler und hydrophober Phase und Entfernen der hydrophilen Phase aus dem System; und
- 15 (2.4) Gefriertrocknen der aus Verfahrensschritt (2.3) resultierenden hydrophoben Phase unter Erhalt eines im Wesentlichen kugelförmigen Lyophilisats.
- 20 Das Einstellen des Volumens derjenigen Phase, welche das zu gefriertrocknende Reagenz enthält, in der anderen Phase erfolgt in beiden Ausführungsformen durch Auswahl geeigneter Mengen an hydrophiler und hydrophober Phase.
- 25 Beispiele geeigneter Phasen für diese zweite Ausführungsform sind Wasser, Methanol und Formamid als hydrophile Phase und Silikonöle; Öle; Fette; ätherische Öle von Pflanzen, Tieren und Einzellern; langkettige Alkane mit C11-Kettenlängen oder längere Kohlenstoffketten und Benzol als hydrophobe Phase.

30

In einer besonderen Ausgestaltung der ersten und der zweiten Ausführungsform der vorliegenden Erfindungen sind die hydrophile und die hydrophobe Phase vorzugsweise PCR-tolerant und tolerant gegenüber enzymatischen Reaktionen. Unter PCR-tolerant wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung
35 verstanden, wenn die hydrophobe und die hydrophile Phase, welche zur Herstellung der festen kugelförmigen Reagenzien verwendet werden, nicht

zu Veränderungen der Produktqualität oder -quantität in einer anschließenden PCR führen, im Vergleich zur Verwendung der entsprechenden Reagenzien, welche keiner Gefriertrocknung bzw. einer Gefriertrocknung ohne Verwendung der hydrophoben und hydrophilen Phasen unterworfen wurden.

5 Unter tolerant gegenüber enzymatischen Reaktionen wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, wenn die hydrophobe und die hydrophile Phase, welche zur Herstellung der festen kugelförmigen Reagenzien verwendet werden, nicht zu Veränderungen der Produktqualität oder -quantität bzw. der verwendeten Enzyme in einer anschließenden enzymatischen Reaktion
10 führen, im Vergleich zur Verwendung der entsprechenden Reagenzien, welche keiner Gefriertrocknung bzw. einer Gefriertrocknung ohne Verwendung der hydrophoben und hydrophilen Phasen unterworfen wurden.

Um die nahezu perfekt kugelförmige Geometrie und glatte Oberfläche der
15 gefrorenen Kügelchen während der Gefriertrocknung zu erhalten, ist es vorteilhaft darauf zu achten, dass die zur Ausformung der Kugeln verwendete hydrophobe (erste Ausführungsform) bzw. hydrophile (zweite Ausführungsform) Phase vor Beginn der Gefriertrocknung möglichst vollständig entfernt wird. Anderenfalls können die getrockneten Kugeln eine ungleichmäßige
20 Oberfläche und eine grobporige innere Struktur erhalten. Entsprechende gefriergetrocknete Formkörper, welche erhalten wurden unter vollständiger Entfernung der Phase zur Ausbildung der kugelförmigen Geometrie, sind in Figur 1a) dargestellt. Demgegenüber ergeben sich die in Figur 1b) dargestellten kugelförmigen Strukturen, wenn die zur Ausbildung der kugelförmigen Geometrie erhaltene hydrophobe bzw. hydrophile Phase nicht vollständig entfernt wird.
25

Das Eintragen der flüssigen Phase, enthaltend das mindestens eine Reagenz, in die hydrophobe Phase (erste Ausführungsform) oder die hydrophile
30 Phase (zweite Ausführungsform) kann bei Raumtemperatur oder aber bei leicht erniedrigter Temperatur, beispielsweise bei Temperaturen von bis zu -30 °C, durchgeführt werden. Dabei ist vorteilhaft, wenn das Gefäß, in dem die Kugel hergestellt werden soll, möglichst keine glatten Wände und keinen glatten Boden aufweist, da sich die zunächst kugelförmige Lösung während
35 des Einfrierens an die Oberflächengeometrie des Behälters anpassen und dadurch seine Kugelform verlieren kann.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die erste Ausführungsform insbesondere bevorzugt.

Durch die Gefriertrocknung werden die kugelförmigen Strukturen, welche durch Eintragen der hydrophilen Phase in die hydrophobe Phase (erste Ausführungsform) bzw. durch das Eintragen der hydrophoben Phase in die hydrophile Phase (zweite Ausführungsform) gebildet wurden, aufrechterhalten und die gefriergetrockneten Formkörper erhalten ebenfalls eine kugelförmige Struktur.

Eine entsprechende kugelförmige feste Form des Lyophilisats ist insbesondere bevorzugt, da diese das spätere Konfektionieren vereinfacht und unspezifische Adsorptionseffekte während des Gefriertrocknungsprozesses an dem verwendeten Gefäß verringert.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff einer kugelförmigen Struktur verstanden, dass der Formkörper bzw. das Lyophilisat die Beziehung

$$L1 = 1 \text{ bis } 1,5 \times L2$$

erfüllt, wenn L1 der größte Durchmesser und L2 der kleinste Durchmesser eines entsprechenden Formkörpers darstellt. Eine entsprechende Darstellung eines erfindungsgemäßen Formkörpers einschließlich der Darstellung von zwei entsprechenden Durchmessern L1 und L2 ist in der Figur 2 dargestellt.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Herstellung von gefriergetrockneten Formkörpern, welche biologisch aktive Bestandteile umfassen. Beispiele für biologisch aktive Bestandteile sind Blut bzw. dessen Bestandteile, Proteine, insbesondere Enzyme, Hormone, Antibiotika, Fettsäuren, Lipide, Kohlenhydrate mit beliebiger Kettenlänge, Polysaccharide, Impfstoffe, niedermolekulare chemische Verbindungen, deren Salze, Organika, Nukleinsäuren, Peptide, Mikroorganismen, wie Viren, Bakterien, Hefen, Pilzen, Parasiten und Protozoen, Zellen und Vektoren.

In einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung kann die flüssige Phase auch mehrere Reagenzien, beispielsweise Mischungen der zuvor genannten biologisch aktiven Bestandteile, umfassen.

5 Auch ist es möglich, mehrere, beispielsweise zwei oder drei Reagenzien, die gefriergetrocknet werden sollen, separat in mehreren ersten Phasen aufzulösen oder zu emulgieren und diese aufgelösten oder emulgierten ersten Phasen dann jeweils vorzugsweise separat in eine zweite Phase einzubringen. In dieser zweiten Phase wird dann aus den einzelnen diskreten ersten Phasen,
10 enthaltend jeweils ein Reagenz, eine gemeinsame erste Phase, in der dann jeweils alle Reagenzien vorliegen. Durch diese Verfahrensweise kann darauf verzichtet werden, die einzelnen Reagenzien vor dem Einbringen in die zweite Phase zu mischen.

15 In einer bevorzugten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung erfolgt der Gefriertrocknungsschritt in einem Plastik- oder Glasröhrchen. Auch die Verwendung von Glasfritten, wie vorstehend erläutert, kommt in Frage. Die aus diesem Verfahrensschritt resultierenden gefriergetrockneten Teilchen können in diesen Gefäßen unmittelbar aufbewahrt werden, bis es zu einer weiteren
20 Anwendung kommt. Ein umständliches Umfüllen der gefriergetrockneten Formkörper aus dem Reaktionsgefäß in eine Vorrichtung zur Lagerung ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung nicht erforderlich. Vorzugsweise wird in jedem Gefäß nur ein Lyophilisat, d. h. ein gefriergetrockneter Formkörper, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugt.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren kann sowohl batchweise als auch kontinuierlich durchgeführt werden.

In dem Fall, in welchem eine kontinuierliche Verfahrensweise Anwendung
30 finden soll, kann das erfindungsgemäße Verfahren auch parallelisiert durchgeführt werden. Eine entsprechende Vorrichtung ist in der Figur 3 dargestellt.

In dieser Vorrichtung wird beispielsweise eine hydrophobe Phase, umfassend
35 ein Silikonöl, im Kreis gefahren und an einer vorbestimmten Stelle wird in diese hydrophobe Phase das zu gefriertrocknende Reagenz in der Form ei-

ner wässrigen Phase eingespritzt. An dieser Einspritzstelle beträgt die Temperatur des Fluids aus Silikonöl und wässriger Phase ungefähr 20 °C. Es kommt zu der Ausbildung einzelner spezifischer kugelförmiger Volumina der wässrigen Phase in der hydrophoben Silikonölphase. Das Fluid aus Silikonöl und wässriger Phase wird in eine Kältezone, welche bei beispielsweise -50 °C betrieben wird, überführt. In dieser Kältezone kommt es zu einer Verfestigung der wässrigen Phase in Kugelform, während das Silikonöl flüssig bleibt. Die verfestigten Kugeln der wässrigen Phase sinken auf den Boden. Im Anschluss wird das Gefäß mit den verfestigten Kugeln entfernt und eine abschließende Gefriertrocknung unter Anwendung von Vakuum führt zu einem Sublimieren der verbleibenden hydrophilen wässrigen Phase und den Erhalt von gefriergetrocknetem Formkörper am Boden des Reservoirs.

Diese kontinuierliche Verfahrensweise kann selbstverständlich auch im Rahmen der zweiten Ausführungsform realisiert werden, nämlich dann, wenn die hydrophile Phase im Kreislauf gefahren wird und in die hydrophile Phase eine hydrophobe Phase eingespeist wird, welche mindestens ein zu hydrophilisierendes Reagenz umfasst.

Ein wesentlicher Vorteil der Lehre der vorliegenden Erfindung liegt darin, dass das Aliquotieren des Kugelvolumens vom Einfrieren der Flüssigkeit getrennt erfolgt. Diese Trennung der Verfahrensschritte erlaubt variable Abkühlraten, was insbesondere sensible Reagenzienformulierungen schont. Darüber hinaus beeinflusst die Abkühlrate auch die Größe der entstehenden Lyophilisate (z.B. Kristalle), welche wiederum Einfluss hat auf die Effektivität, mit der das gefrorene Lösungsmittel sublimiert werden kann. Weiterhin ist das erfindungsgemäße Verfahren mit erheblich geringerem technischem Aufwand durchführbar und ermöglicht die Verarbeitung größerer Probenvolumina.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet sich insbesondere zur Herstellung von Lyophilisaten für Lab-on-Chip Anwendungen an, da die getrockneten Reagenzienkugeln direkt in den Behältern hergestellt werden können, die später zum Transport und zum Rücklösen der getrockneten Reagenzien dienen.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert, wobei die einzelnen Beispiele die vorliegende Erfindung nicht beschränken:

5 1. Ausformung von Kugeln in Silikonöl und deren Gefriertrocknung

Es wurde Silikonöl DC 200 von Dow Corning mit einer Viskosität von 10 mPa · s in Wells einer Mikrotiterplatte gegeben und im Tiefkühlschrank auf -30 °C abgekühlt. Dann wurden 5 µl Aliquots Qiagen Multiplex PCR Mastermix (im
10 Folgenden als QMM bezeichnet) in das Öl pipettiert, welche sich zu Kugeln formten und innerhalb weniger Sekunden durchfroren. Anschließend wurden die befüllte Mikrotiterplatte auf -80 °C abgekühlt. Es ist nicht möglich, den PCR Mastermix direkt in -80 °C kaltes Öl pipettieren, da dieser bei Eintauchen der Pipettenspitze sofort in selbiger einfriert. Nach mehreren Stunden
15 Lagerung bei -80 °C wurden die QMM-Kugeln aus dem Silikonöl entfernt und mit einer Pinzette in PCR-Reagiergefäße überführt, in welchen auch die Gefriertrocknung erfolgte. Dazu wurden die PCR-Tubes in -80 °C kalten Aluminiumblöcken in eine Gefriertrocknungsanlage der Firma Christ (Christ Alpha 2-4) überführt und über Nacht bei ca. 0.02 mbar getrocknet. Am nächsten
20 Tag erfolgte eine Nach Trocknung bei 30 °C und demselben Vakuum. Die auf diese Weise präparierten QMM-Lyophilisate wiesen noch immer eine Kugelform auf.

25 2. Kompatibilität der Silikonöl-Methode mit nachfolgenden enzymatischen Reaktionen

Für die Anwendbarkeit der hier beschriebenen Methode zur Herstellung kugelförmiger Lyophilisate ist es von Vorteil, dass sie kompatibel mit nachfolgenden enzymatischen Reaktionen ist; insbesondere, da für bestimmte Silikonöle inhibitorische Eigenschaften auf PCR-Reaktionen bekannt sind.
30

In diesem Versuch wurde untersucht, wie sich unterschiedliche Probenvorbereitungen auf die Qualität des fertigen Lyophilisats auswirken. Dazu wurde QMM mit 0.2 Volumen 50 % (w/v) Trehalose-Lösung versetzt, sodass die finale Trehalosekonzentration bei 10 % (w/v) lag. Diese Lösung wurde auf 4
35

verschiedene Weisen für die Gefriertrocknung vorbereitet: Die Mischung wurde

a) in flüssigen Stickstoff getropft,

5

b) in Silikonöl DC200 (erhältlich von Dow Chemical) aliquotiert, eingefroren und anschließend vom Silikonöl getrennt,

c) in Silikonöl AP100 (erhältlich von Wacker) aliquotiert, eingefroren und
10 anschließend vom Silikonöl getrennt,

oder

d) in ein 200 µl PCR-Tube pipettiert, welches in einen -80 °C kalten Aluminiumblock gestellt und dadurch eingefroren wurde.
15

Die Proben wurden in gefrorenem Zustand (-80 °C) in die Lyophilie überführt und bei ca. 0.02 mbar getrocknet. Danach erfolgte eine Nach Trocknung bei 30 °C. Die so erhaltenen wasserfreien QMM-Produkte wurden einem Qualitätskontrolltest unterzogen und mit einem nicht lyophilisierten [QMM + 10% Trehalose]-Gemisch verglichen. In dieser Multiplex-PCR werden 10 Amplikons von Maus-gDNA erzeugt. Schwächung oder Wegfall einzelner Banden zeigt eine verschlechterte PCR-Effizienz des betreffenden Mixes an.

20

Die Ergebnisse des Qualitätskontroll (QC)-Testes sind in der Figur 4 dargestellt. Die Abbildung zeigt folgende Proben (von links): Bahn 1, DNA-Größenmarker; Bahnen 2 und 3, nicht lyophilisierte Reagenzien; Bahnen 4 und 5, nach Methode d) behandelte und lyophilisierte Reagenzien; Bahn 6, nach Methode a) behandelte und lyophilisierte Reagenzien; Bahn 7, nach Methode b) behandelte und lyophilisierte Reagenzien; Bahn 8, nach Methode c) behandelte und lyophilisierte Reagenzien.
30

Der QC-Test zeigte dabei, dass die Trocknung nach den Methoden b) und d) ein Produkt erzeugt, dass noch alle 10 PCR-Produkte amplifizieren kann. Das nach Methode a) erzeugte Produkt zeigt eine Schwächung der beiden größten Banden. Die nach Methode c) hergestellten Lyophilisate zeigten, dass das verwendete Silikonöl AP100 eine stark inhibierende Wirkung auf die PCR-
35

Reaktion hat und somit als Medium zur Kugelformung ungeeignet ist. Im Gegensatz dazu bestand das Silikonöl DC200 der Firma Dow Chemical diesen PCR-QC-Test sehr gut.

5 3. Herstellung von kugelförmigen Produkten in einem großen Volumenbereich

Die hier beschriebene Methode zur Herstellung kugelförmiger Lyophilisate hat das Potenzial, das verarbeitbare Flüssigkeitsvolumen erheblich über die
10 technische Machbarkeit gemäß der Patentanmeldung US 2007/0259348 A1 zu erweitern. In der US 2007/0259348 A1 wird die Herstellung von entsprechenden Volumina bis 35 µl beschrieben.

Die erfindungsgemäße Vorgehensweise hingegen erlaubt, wie nachfolgendes Experiment zeigt, mindestens bis zu 100 µl Puffervolumen zu einem kugeligen Produkt zu verarbeiten.
15

In dem nachfolgenden Versuch wurde von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, die zu trocknende Lösung in nicht vorgekühltes Silikonöl zu pipettieren und dieses erst nachfolgend abzukühlen.
20

Zu diesem Zweck wurde die untere Öffnung eines TurboFilter 8 Strip (Fa. QIAGEN) mit Klebefolie verschlossen. Die einzelnen Säulchen wurden mit 300 µl Silikonöl DC200 (Viskosität: 10mPa · s) befüllt und ungekühlt mit 3, 5, 10, 20, 35, 75 bzw. 100 µl QMM inklusive 5 % Trehalose beladen. Daraufhin
25 formte sich die wässrige Lösung zu einer Kugel und sank auf Grund der höheren Dichte an den Boden des verwendeten Gefäßes. Danach wurde die QMM-Lösung durch Inkubation auf -30 °C gefroren.

30 Die einzelnen Proben sind in Figur 5 dargestellt.

Das Silikonöl wurde durch Verwendung einer Vakuumstation entfernt, die gefrorenen Kugeln auf -80 °C gebracht und abschließend in dem TurboFilter 8 Strip lyophilisiert.

Figur 5 zeigt die lyophilisierten Kugeln. Die leichte Deformation insbesondere der großvolumigen Lyophilisate rührt daher, dass diese in zunächst flüssiger Form auf den Frittenboden des Gefäßes absanken und auf Grund des eigenen spezifischen Gewichts teilweise dessen Form annahmen.

5

4. Entfernen des Silikonöls

Im folgenden Experiment wird eine bevorzugte Möglichkeit beschrieben, dass Silikonöl von der gefrorenen Pufferkugel zu trennen. Diese Trennmethode eignet sich durch die Möglichkeit der Parallelisierung des Prozesses auch zur Herstellung größerer Stückzahlen an Lyophilisaten.

Um das zur Ausformung der Reagenzienkugel verwendete Silikonöl vor der Gefriertrocknung zu entfernen, wird folgendes Vorgehen durchgeführt: Das Öl wurde in ein oben und unten offenes Gefäß (TurboFilter 8 Strip bzw. TurboFilter 96 Plate; beide Fa. QIAGEN) gefüllt, dessen untere Öffnung zuvor verschlossen wurde (entweder mit Klebefolie oder durch Anpressen einer Schaumstoffmatte). Anschließend wurde die zu lyophilisierende Lösung in das vorgekühlte Silikonöl gegeben. Daraufhin formte sich die wässrige Lösung zu einer Kugel und sank auf Grund der höheren Dichte an den Boden des verwendeten Gefäßes und fror bei der nachfolgenden Inkubation bei -30 °C durch. Der Umstand, dass der Boden der einzelnen Filter-Säulchen aus einem grobporigen Frittenmaterial besteht, verhindert, dass sich die Pufferkugeln während des Einfrierprozesses an die Bodenfläche anschmiegen und dadurch ihre Form verändern. Da beide Produkte (Strip sowie Plate) mit einer Vakuumstation mittels Unterdruck durch die am Boden befindliche Öffnung entleert werden können, wurde das Silikonöl auf diesem Wege von der gefrorenen Pufferkugel entfernt. Anschließend wurden die Kugeln auf -80 °C abgekühlt und danach lyophilisiert. Im hier beschriebenen Experiment wurden die gefrorenen Kugeln aus der 96er-Platte entfernt und in ein mit einem Septum verschließbaren Glas-Glasröhrchen überführt und darin gefriergetrocknet.

Durch die Verwendung von „TurboFilter 96 Plates“ und einer Mehrkanalpipette (hier 8-Kanal, aber auch 96-Kanal Pipettierkopf verwendbar) ist es

35

möglich, ohne großen Aufwand mehrere hundert Pufferkugeln pro Tag zu formen und zu trocknen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung lässt sich feststellen, ob Lyophilisate
5 durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten werden:

So weisen die in dem vorliegenden Beispiel hergestellten Lyophilisate noch einen Restgehalt an Silikonöl auf, der zumindest per NMR-Spektroskopie (vgl. US 6,436,715) oder GC/MS-Kopplung (An epidemic of sticky silicone oil at
10 the Rotterdam Eye Hospital. Patient review and chemical analyses, Marc A. Veckeneer, Simone de Voogd, Eric W. Lindstedt, Dirk-Henning Menz and Jan C. van Meurs (2008) Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, Vol 246(6):917-22) nachweisbar ist.

Patentansprüche

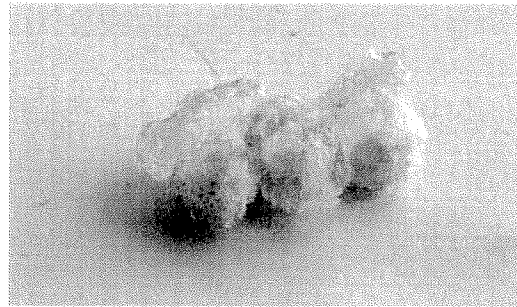
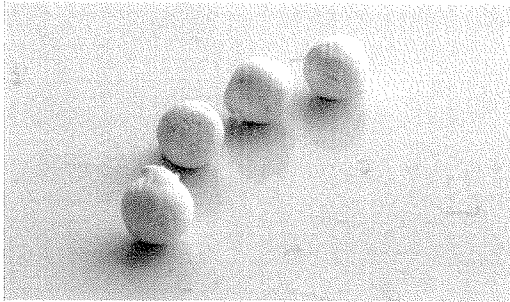
1. Verfahren zur Herstellung von einem festen Formkörper, enthaltend
mindestens ein Reagenz, durch Gefriertrocknung einer flüssigen Pha-
se, welche das mindestens eine Reagenz umfasst, gekennzeichnet
5 durch die folgenden Verfahrensschritte:
 - (1) Bereitstellung einer ersten Phase, welche mindestens ein zu ge-
frietrocknendes Reagenz enthält;
 - (2) Inkontaktbringen der ersten Phase mit einer zweiten Phase, wo-
10 bei eine der beiden Phasen hydrophob ist und die andere Phase
hydrophil ist;
 - (3) Einfrieren der ersten Phase in dem aus Verfahrensschritt (2) resul-
tierenden System aus zwei Phasen und Entfernen der zweiten
Phase aus dem System; und
 - 15 (4) Gefriertrocknen der aus Verfahrensschritt (3) verbleibenden ers-
ten Phase unter Erhalt eines im Wesentlichen kugelförmigen
Lyophilisats.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erste
20 Phase, welche das mindestens eine Reagenz umfasst, eine hyd-
rophobe Phase ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die erste
Phase dadurch aliquotiert wird, dass sie in Kontakt gebracht wird mit
25 einer zweiten hydrophilen Phase.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erste
Phase, welche das mindestens eine Reagenz umfasst, eine hydrophile
Phase ist.
- 30 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die erste
Phase dadurch aliquotiert wird, dass sie in Kontakt gebracht wird mit
einer zweiten hydrophoben Phase.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophile Phase eine alkoholische oder wässrige Phase ist.
- 5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophobe Phase einen Bestandteil aufweist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Silikonöl, Paraffinöl, organischen Ölen auf tierischer oder pflanzlicher Basis sowie auf Basis von Einzellern.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Phase einen Schmelzpunkt aufweist, welcher um mindestens 10 °C, vorzugsweise 15 °C, besonders bevorzugt 20 °C, niedriger ist als der Schmelzpunkt der ersten Phase.
- 15 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophile und die hydrophobe Phase PCR-tolerant und/oder tolerant gegenüber enzymatischen Reaktionen sind.
- 20 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Reagenz ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Blut bzw. dessen Bestandteile, Proteine, insbesondere Enzyme, Hormone, Antibiotika, Fettsäuren, Lipide, Kohlenhydrate mit beliebiger Kettenlänge, Polysaccharide, Impfstoffe, niedermolekulare chemische Verbindungen, deren Salze, Organika, Nukleinsäuren, Peptide, Mikroorganismen, wie Viren, Bakterien, Hefen, Pilzen, Parasiten und Protozoen, Zellen und Vektoren.
- 25 11. Formkörper, erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10.
- 30 12. Verwendung von Formkörpern gemäß Anspruch 11 zur Aliquotierung, Lagerung und Bereitstellung von Reagenzien, umfassend Salze, niedermolekulare Stoffe wie pH-Puffersubstanzen, Hormone, weiterhin Proteine, insbesondere Enzyme wie hydrolytische Enzyme, DNA-Polymerasen, Restriktionsendonukleasen, Ligasen, weiterhin Nukleinsäuren, ins-
- 35

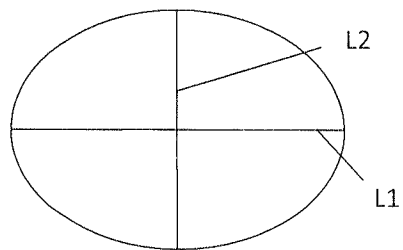
besondere Oligonukleotide wie Primer und fluoreszenzmarkierte Sonden, weiterhin Antibiotika, Fettsäuren, Lipiden oder Impfstoffen.

- 5 13. Kombinierte Verwendung von hydrophilen und hydrophoben Phasen zur Erzeugung von im Wesentlichen kugelförmigen Flüssigkeitsvolumina im Rahmen der Gefriertrocknung.

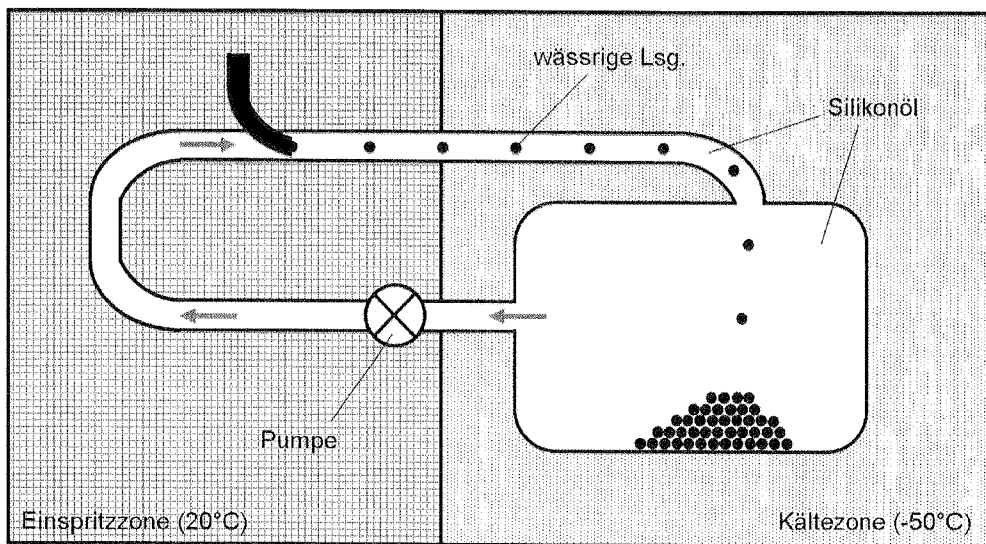
Figur 1:



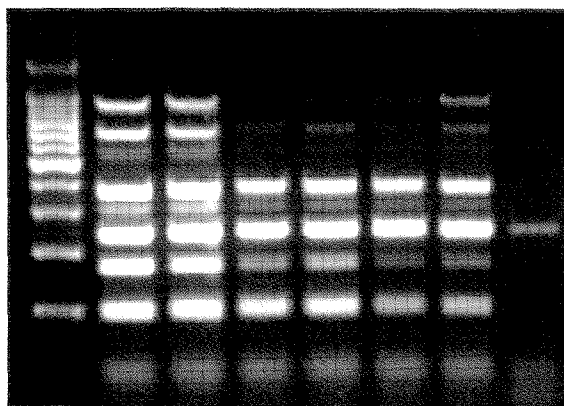
Figur 2:



Figur 3:

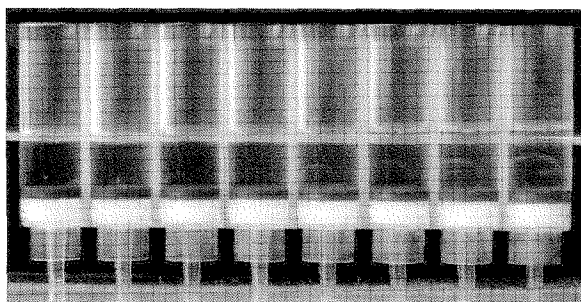


Figur 4:

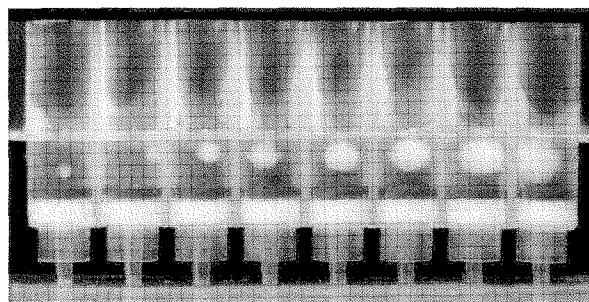


5

Figur 5:



10



Figur 6:

