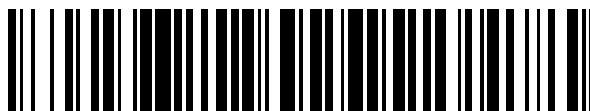


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 160**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08767620 .1**

96 Fecha de presentación: **06.05.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2148923**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.02.2010**

54

Título: **Conservación de materiales bioactivos con espuma liofilizada**

30

Prioridad:

18.05.2007 US 930746 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

19.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

19.12.2012

73

Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
ONE MEDIMMUNE WAY
GAITHERSBURG, MD 20878, US**

72

Inventor/es:

**VEHRING, REINHARD y
AO, YI**

74

Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 393 160 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

Conservación de materiales bioactivos con espuma liofilizada

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de y prioridad para la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos 60/930,746, "Conservación de materiales bioactivos con espuma liofilizada" por Reinhard Vehring, y otros, presentada el 18 de mayo de 2007. Esta solicitud se relaciona con la anterior solicitud de utilidad de los Estados Unidos 10/412,630 (ahora patente de los Estados Unidos 7,135,180), "Conservación de materiales bioactivos con espuma liofilizada" de Vu Truong-Le, presentada el 10 de abril de 2003, y a una anterior solicitud provisional de los Estados Unidos número 60/372,236, "Formulaciones y métodos de preparado" por Vu Truong-Le, presentado el 11 de abril de 2002.

15 Campo de la invención

La presente invención compete al campo de la conservación de materiales biológicos en almacenamiento. En particular, la invención se refiere a, por ejemplo, la conservación de moléculas bioactivas y productos biológicos viables mediante la cristalización en una matriz de espuma seca protectora. Los procesos y sistemas proporcionan alta recuperación de la viabilidad de virus y bacteria.

20 Antecedentes de la invención

Los materiales biológicos, tales como proteínas, células eucariotas, bacteria y virus, generalmente son inestables cuando se almacenan en medios u otras soluciones líquidas. Por ejemplo, los virus con envoltura tal como virus *influenza* vivo preparado a partir de líquido alantoideo de huevo libera un log de potencia, definido como dosis infecciosa en cultivo de tejidos (TCID₅₀), en menos de dos a tres semanas cuando almacenados en temperatura de refrigeración, es decir aproximadamente 4°C. En condiciones de temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) y en temperaturas cálidas tal como 37°C, los virus pierden dicha potencia en cuestión de días a horas, respectivamente. Los procesos de liofilización, donde las fórmulas acuosas se congelan y después secan por sublimación, son usados comúnmente para estabilizar estos materiales biológicos. La eliminación de agua y sustitución de las moléculas de protección, tales como carbohidratos, puede aumentar la estabilidad previniendo la degradación química, desnaturalización, y el crecimiento de contaminantes microbianos.

En la liofilización (deshidratación por congelación), el material biológico se mezcla comúnmente como una solución o suspensión con agentes de protección, congela, y después deshidrata por sublimación y secado secundario. Las temperaturas bajas de congelación y secado mediante sublimación pueden retardar la cinética de las reacciones de degradación. Sin embargo, las bajas temperaturas y corta superficie involucradas en las relaciones de volumen pueden requerir largos periodos de tiempo de secado. Daños significativos frecuentemente estructurales resultan de los procesos convencionales de liofilización, debido a la lenta velocidad de congelación y la duración en la que el material bioactivo se mantiene en un estado congelado. Este daño puede involucrar desnaturalización, agregación, y otras tensiones físicas adversas a partir de las estructuras de cristal de hielo que se forman durante la nucleación del hielo y etapas de propagación. Por esta razón, los biomateriales que poseen una pared celular o membrana lipídica representan un reto significativo para preservar la bioactividad de mayor y más complejas entidades, tales como virus, bacterias, y células.

Además, aún bajo condiciones óptimas de liofilización, el daño se puede producir durante la etapa de secado secundario. Un estudio reciente sugirió que el daño inducido por la liofilización se produce principalmente durante la etapa de deshidratación secundaria cuando se elimina la última cantidad restante de agua (Webb, S.D. Effects of annealing lyophilized and spraylyophilized formulations of recombinant human interferon-gamma. J Pharm Sci 2003 Abr;92(4):715-29). Por lo tanto, no hay pruebas suficientes para demostrar que la liofilización y los procesos de secado secundarios pueden forzar a una proteína o célula, por ejemplo, a experimentar cambios químicos y físicos significativos. Dichos cambios pueden resultar en la pérdida de actividad de la proteína debido a la concentración de sales, precipitación/cristalización, esfuerzo de cizalla, pH extremos, y humedad residual restante a través de la liofilización.

Los agentes de protección son productos químicos que se añaden a una formulación para proteger a las células y las moléculas durante la congelación y mejorar la estabilidad durante el almacenamiento. Por ejemplo, los estabilizantes para vacunas de virus vivos incluyen generalmente altas concentraciones de azúcares tales como sacarosa, manitol, o sorbitol para mejorar la estabilidad del virus durante la liofilización y almacenamiento. Sin embargo, los virus con envoltura, y otros productos biológicos, los agentes de protección no pueden penetrar adecuadamente para proteger las moléculas activas

dentro del volumen de la membrana. Por lo tanto, un reto significativo sigue siendo desarrollar un proceso de secado óptimo y la formulación para lograr una estabilidad adecuada en los productos biológicos lábiles.

Algunos de los problemas con la liofilización se superan por determinados procesos de conservación en espuma seca. En la patente de los Estados Unidos 5,766,520, Conservación por formación de espuma, de Bronshtein, por ejemplo, las soluciones biológicas o suspensiones en un disolvente se espesan por el primer secado bajo un vacío moderado antes de la aplicación de un vacío fuerte que causa ebullición espumosa del disolvente restante para formar una espuma seca estable. Normalmente, dicha ebullición se evita en el procesamiento de materiales biológicos debido a la oxidación y desnaturalización que se puede producir en las superficies de burbuja. Además, la ebullición, aún bajo vacío, requiere la entrada de calor, que puede poner en peligro la estabilidad del material bioactivo. Estos problemas se reducen en Bronshtein incluyendo agentes de protección, tales como carbohidratos y agentes surfactantes, en la solución o suspensión. Los procesos de conservación en espuma seca de este tipo tienen la ventaja de un secado más rápido debido a la convección del líquido durante la ebullición y el área superficial aumentada que se presenta por las superficies de burbujas de espuma. Sin embargo, el secado secundario caliente a niveles inferiores de humedad puede reducir la viabilidad celular y del virus en 90% o más. La reconstitución de dicha espuma seca puede ser rápida debido a la presencia de los agentes de protección hidrófilos y el área superficial grande de la espuma. La espuma seca se puede moler a un polvo fino para mejorar más los tiempos de reconstitución o para la administración del material biológico por inhalación.

Los procesos de conservación en espuma seca descritos anteriormente están limitados en su flexibilidad para proteger una diversidad de materiales biológicos. Por ejemplo, el proceso excluye una etapa de congelación (por ejemplo, ver Bronshtein en la columna 1, línea 41 -"[c]ongelación y otras etapas del proceso de liofilización son muy perjudiciales para muchos materiales biológicos sensibles.") y posterior sublimación del hielo como medio para eliminar agua a partir de la espuma. Debido a que la congelación se evita en Bronshtein, la formulación se debe espesar antes de la espumosis y secado tal que grandes cantidades de agua no se pierden, junto con el calor latente, para congelar la espuma. La evasión de la congelación requiere del proceso que se lleva a cabo a un nivel de vacío inferior (7-24 torr) que en los ciclos de los procesos convencionales de liofilización o pulverización. La ebullición en Bronshtein, requiere la entrada de cantidades significativas, y posiblemente desestabilizantes de calor para proporcionar la erupción necesaria de la espuma.

El proceso de espuma seca de Bronshtein particularmente no se adapta bien a la conservación de materiales biológicos que tienen membranas lipídicas. Por ejemplo, el proceso no se adapta bien a la conservación de productos biológicos, tales como liposomas, virus o células viables. Las membranas lipídicas previenen frecuentemente la penetración de los agentes de protección en volúmenes cerrados o previenen la eliminación adecuada de agua a partir del volumen cerrado. Sin la adecuada penetración de agentes de protección, los procesos enzimáticos, tales como proteólisis, y procesos químicos, tales como la oxidación y ataques de radicales libres, pueden destruir la actividad o la viabilidad del material biológico. Los fluidos hipoosmóticos restantes dentro de volúmenes cerrados de la membrana pueden promover la inestabilidad del material biológico. El secado secundario caliente puede matar las células.

Se mantiene una necesidad de métodos para conservar materiales biológicos, tales como las proteínas, los viriones y las células de almacenamiento, particularmente a temperaturas por encima a la de congelación. Los métodos para preparar matrices de conservación de espuma seca, se pueden desear a través de los procesos que proporcionan un secado adecuado sin la exposición a temperaturas cálidas. Las composiciones que pueden proteger a dichos productos biológicos en almacenamiento pueden proporcionar beneficios en la medicina y la investigación científica. La presente invención proporciona éstas y otras características que serán evidentes después de la revisión de la siguiente descripción.

Sumario de la invención

La presente invención incluye un método y sistema para preservar materiales, tales como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, vacunas, bacterias, virus, liposomas, plaquetas, y/o suspensiones celulares, en almacenamiento. La invención proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 1 en la presente descripción.

El método puede incluir diversas formas, por ejemplo, congelar la espuma antes de secar, incluir agentes espumantes en la formulación, conservar la formulación en la temperatura de transición de fase de membrana lipídica para mejorar la penetración de los agentes de protección, expansión de la formulación a presiones entre aproximadamente 200 torr y 25 mtorr, secado secundario de la espuma en forma de una capa delgada, y/o secar la espuma a una temperatura relativamente baja, tal como temperatura ambiente o menor.

El material bioactivo puede ser, por ejemplo, un péptido, proteína, ácido nucleico, anticuerpos, vacunas, bacteria, virus, liposomas, plaquetas, y/o suspensiones celulares.

Para los materiales bioactivos que comprenden volúmenes encerrados en una membrana lipídica, puede preferirse mantener la formulación o espuma a una temperatura dentro de 2°C de una temperatura de transición de membrana del material bioactivo durante 2 o más minutos antes de expandir la espuma.

5 En modalidades preferidas de los métodos de secado a baja temperatura, el material bioactivo comprende péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, vacunas, bacterias, virus, liposomas, plaquetas, y/o suspensiones celulares. En una modalidad, el material bioactivo comprende un virus o bacteria, por ejemplo, una bacteria de *Listeria* o cepa de *Influenza*. En una modalidad, la *Listeria* es *Listeria monocytogenes*. En otra modalidad, se usa una cepa atenuada de *Listeria monocytogenes*. En aún otra modalidad, se usa una cepa de *Listeria monocytogenes* diseñada por ingeniería recombinante como una vacuna para expresar un péptido antigénico. La construcción de vacunas basadas en *Listeria*, incluyendo secuencias de accesorio, se proporcionan en detalle en la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos núms. 60/532,696, 60/602,588, 60/615,548, y 60/617,564, tituladas "Vacunas EphA2," presentada el 24 de diciembre de 2003, 18 de agosto de 2004, 1 de octubre de 2004, y 7 de octubre de 2004, respectivamente, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos núms. 60/556,631, 60/615,470, y 60/617,544, tituladas "Vacunas EphA2 basadas en *Listeria*," presentadas el 26 de marzo de 2004, 1 de octubre de 2004, y 7 de octubre de 2004, y la Publicación Internacional núms. documento WO 2005/067460 y documento WO 2005/037233.

En aún otra modalidad, las cepas de *Influenza* son virus *Influenza* A y B. En otra modalidad, las cepas de *Influenza* se atenúan para el uso como una vacuna viva.

20 En métodos preferidos, la espuma comprende un espesor de 2 mm o menos, por ejemplo, para acelerar el secado secundario a bajas temperaturas de, por ejemplo, 25°C o menos, 20°C o menos, 15°C o menos. Se prefiere para la estabilidad del producto final que la espuma se seque durante un tiempo suficiente para reducir la espuma hasta una humedad residual de 10 por ciento o menos, 5 por ciento o menos, 3 por ciento o menos, o 1 por ciento o menos. Se prefiere frecuentemente que la temperatura de secado secundario se mantiene por debajo de la temperatura de transición vítrea de la matriz poliol de espuma. Se prefiere frecuentemente que el secado primario y/o secado secundario comprendan la eliminación de disolventes a una presión de 100 torr o menos, 50 torr o menos, 10 torr o menos, 1 torr 100 mtorr, 10 mtorr, o menos, por ejemplo, para acelerar la eliminación de la humedad de la espuma a bajas temperaturas.

30 La espuma seca puede estar en forma de hojas o grandes partículas. Opcionalmente, la espuma seca se pueden moler en un polvo con un tamaño de partícula promedio a partir de, por ejemplo, aproximadamente de 0,1 μ m a aproximadamente 100 μ m, para el almacenamiento o para la administración por inhalación. Opcionalmente, la espuma se puede administrar a un mamífero como un líquido reconstituido, por ejemplo, mediante inyección.

35 La presente invención incluye sistemas para practicar de manera eficaz los métodos para preparar las composiciones estables de espuma seca. Por ejemplo, los sistemas que permiten el rápido secado secundario a temperaturas relativamente bajas, tales como 20°C o menos, abier tamente pueden exponer la espuma a un fuerte vacío en la forma de una hoja delgada. Un sistema para preparar una composición estable de espuma seca de material bioactivo puede incluir una cámara de control de ambiente que proporciona el control de las temperaturas internas y presiones internas; y, una espuma dentro de la cámara que comprende un material bioactivo , y un poliol o polímero, en un disolvente. El secado se puede acelerar proporcionando la espuma con un espesor de 2 mm o menos y/o una relación de aspecto (anchura o longitud a espesor) de 10 o más; o un espesor de 1 mm o menos y/o una relación de aspecto de 100 o más. La espuma preferentemente se seca hasta un 10 por ciento de humedad residual o menos, a una temperatura de 25°C o menos, durante un período de tiempo de 2 días o menos.

45 Al igual que con los métodos, el material bioactivo de los sistemas pueden ser de cualquier material bioactivo. Sin embargo, los sistemas presentan beneficios conocidos particularmente para la viabilidad de virus o bacteria, por ejemplo, *bacteria Listeria* o cepas de *Influenza*. En una modalidad, la *Listeria* es *Listeria monocytogenes*. En otra modalidad, se usa una cepa atenuada de *Listeria monocytogenes*. En aún otra modalidad, se usa una cepa de *Listeria monocytogenes* diseñada por ingeniería recombinante como una vacuna para expresar un péptido antigénico. En aún otra modalidad, las cepas de *Influenza* son virus de *Influenza* A y B. En otra modalidad, las cepas de *Influenza* se atenúan para usar como una vacuna viva.

55 La presente invención incluye composiciones estables de espuma seca. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir: péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, vacunas, bacterias, virus, liposomas, plaquetas, y/o suspensiones celulares, en una matriz de espuma seca que comprende un 10 por ciento de humedad residual o menos, en donde la matriz comprende un poliol y/o polímero, y en donde la espuma seca se preparó a partir de una formulación líquida del material bioactivo con menos de un 0,5 log₁₀ de pérdida de viabilidad. Dichas viabilidades conservadas se pueden obtener

fácilmente como se describe en la presente invención, incluso con el secado de la espuma a un 5 por ciento de humedad residual o menos. En una modalidad, los materiales bioactivos de virus o la bacteria pueden incluir, por ejemplo, una bacteria *Listeria* o cepa de *Influenza*. En una modalidad, la *Listeria* es *Listeria monocytogenes*. En otra modalidad, se usa una cepa atenuada de *Listeria monocytogenes*. En aún otra modalidad, se usa una cepa de *Listeria monocytogenes* diseñada por ingeniería recombinante como una vacuna para expresar un péptido antigénico, por ejemplo, cuyo péptido no es un péptido nativo de *Listeria*. En aún otra modalidad, las cepas de *Influenza* son virus de *Influenza* A y B. En otra modalidad, las cepas de *Influenza* se atenúan para usar como una vacuna viva. El virus o bacteria pueden incluir, por ejemplo, una bacteria *Listeria* o cepa de *Influenza*. En modalidades preferidas el proceso de pérdida de viabilidad que se lleva a cabo es menos de un 0,5 log₁₀ de pérdida, menos de un 0,3 log₁₀ de pérdida, menos de un 0,1 log₁₀ de pérdida, por ejemplo, usando los métodos y/o sistemas de la presente invención.

Definiciones

Se debe entender que esta invención no se limita a métodos o sistemas particulares, los cuales, por supuesto, pueden variar. Se debe también entender que la terminología usada en la presente descripción es para propósitos de describir las modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitativa. Como se usa en esta descripción y las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un," "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos de el contenido del texto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una superficie" incluye una combinación de dos o más superficies; la referencia a "bacterias" incluye mezclas de bacterias, y similares.

A menos de se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la que se dirige la invención. Si bien los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente se pueden usar en la práctica de la presente invención sin una experimentación excesiva, los materiales y métodos preferidos se describen en la presente. Al describir y reivindicar la presente invención, la siguiente terminología se usará de acuerdo con las definiciones establecidas a continuación.

Las temperaturas o condiciones "**ambientales**" son aquellas en cualquier momento dado en un medio ambiente dado. Típicamente, la temperatura ambiente es de 22°C, la presión atmosférica ambiente, y humedad ambiental se miden fácilmente y variarán en dependencia de la época del año, condiciones atmosféricas, altitud, etc.

"**Ebullir**" se refiere, por ejemplo, a la rápida transición de la fase líquida a gas que tiene lugar cuando la temperatura de un líquido está por encima de su temperatura de ebullición. La temperatura de ebullición, como se conoce bien por aquellos con experiencia en la técnica, es la temperatura en que la presión de vapor de un líquido es igual a la presión aplicada. La ebullición puede ser particularmente vigorosa cuando se añade calor a un líquido que está en su punto de ebullición.

"**Tampón**" se refiere a una solución tamponada que resiste los cambios de pH por la acción de sus componentes ácido-base conjugados. El pH del tampón se seleccionará generalmente para estabilizar el material activo de selección, y se determinará por los expertos en la técnica. En general, estará en el intervalo de pH fisiológico, aunque algunas proteínas, pueden ser estables en un intervalo más amplio de valores de pH, por ejemplo pH ácido. Así, los intervalos preferidos de pH se encuentran de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, siendo particularmente preferido de aproximadamente 3 a aproximadamente 8; con mayor preferencia, de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0; aún con mayor preferencia, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,4; y con la máxima preferencia, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,2. Los tampones adecuados incluyen un tampón fosfato pH 7,2 y un tampón citrato pH 7,0. Como se apreciará por los expertos en la técnica, hay un gran número de tampones adecuados que se pueden usar. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfato de potasio, fosfato de sodio, acetato de sodio, histidina, imidazol, citrato de sodio, succinato de sodio, bicarbonato y carbonato de amonio. En general, los tampones se usan en molaridades de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 M, siendo preferido de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 1 M, y siendo especialmente preferido de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 05 M y siendo particularmente preferido de 25 a 50 mM.

"**Desgasificar**" se refiere a la liberación de un gas a partir de la solución en un líquido cuando la presión parcial del gas es mayor que la presión aplicada. Si el agua se expone al gas nitrógeno a una atmósfera (aproximadamente 760 torr), y la presión parcial de nitrógeno en el agua equilibra a la presión de la fase gaseosa, el nitrógeno puede burbujear desde el agua si la presión del gas se reduce. Esto no es ebullición, y, puede ocurrir con frecuencia a presiones por encima de una presión en la que puede ebullicir un disolvente. . Por ejemplo, las bebidas gaseosas embotelladas, con una alta presión parcial de gas CO₂, rápidamente burbujea (pero no ebulle) cuando la presión se reduce extrayendo la tapa del frasco.

"**Dispersabilidad** " significa el grado en que se puede dispersar una composición en polvo (es decir, suspender) en una

corriente de aire tal que las partículas dispersas se pueden respirar o inhalar en los pulmones de un individuo. Así, un polvo que sea sólo 20% dispersable significa que sólo el 20% de la masa de las partículas se puede suspender por inhalación en los pulmones.

5 "Seco", en el contexto de las composiciones de espuma seca, se refiere al contenido de humedad residual menos de aproximadamente 10%. Las composiciones de espuma seca se secan comúnmente a humedades residuales de 5% o menos, o aproximadamente entre 3% y 0,1%. A "espuma seca" puede ser una espuma estabilizada con menos de 10% del contenido de humedad residual, una espuma después del secado primario, y/o una espuma después del secado secundario.

10 "Seco" en el contexto de las partículas para la inhalación significa que la composición tiene un contenido de humedad tal que las partículas son fácilmente dispersables en un dispositivo de inhalación para formar un aerosol. El secado primario, con respecto a los procesos descritos en la presente, se refiere al secado que tiene lugar desde el momento de la congelación inicial de la espuma hasta el punto donde comienza el secado secundario. Típicamente, el volumen de secado primario se lleva a cabo por sublimación a temperaturas de congelación. El secado secundario, con respecto a los procesos descritos en la presente, se refiere al secado que tiene lugar a temperaturas por encima de las temperaturas de congelación

15 (por ejemplo, 0°C o el punto de congelación de la formulación congelada). En un proceso típico de secado de espuma por congelación, una etapa de secado secundario lleva la espuma desde un valor de humedad residual de aproximadamente el 25 por ciento hasta un 10 por ciento de humedad residual o menos.

"Excipientes" o "de protección" (que incluyen, crioprotectores y liopectores) generalmente se refieren a los compuestos o materiales que se añaden para asegurar o aumentar la estabilidad del agente terapéutico durante el proceso de pulverización y después, para la estabilidad a largo plazo y autodispersibilidad del producto en polvo. Los excipientes adecuados son en general sólidos particulados de flujo relativamente libre, que no se espesan o polimerizan al contacto con agua, son básicamente inocuos cuando inhalados por un paciente y no interaccionan de forma significativa con el agente terapéutico tal que altere su actividad biológica. Los excipientes adecuados se describen a continuación e incluyen, pero no

25 se limitan a, proteínas tales como albúmina sérica bovina y humana, gelatina, inmunoglobulinas, carbohidratos que incluyen monosacáridos (galactosa, D-manosa, sorbosa, etc), disacáridos (lactosa, trehalosa, sacarosa, etc), ciclodextrinas, y polisacáridos (rafinosa, maltodextrinas, dextranos, etc); un aminoácido tal como glutamato monosódico, glicina, alanina, arginina o histidina, así como aminoácidos hidrófobos (triptófano, tirosina, leucina, fenilalanina, etc); una metilamina tal como betaína; una sal de excipiente tal como sulfato de magnesio, un poliol tal como alcoholes trihídricos de azúcares o superiores, por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, sorbitol xilitol, y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; pluronics; tensioactivos; y combinaciones de éstos.

"Cristal" o "estado cristalino" o "matriz cristalina," se refiere a un líquido que perdió su capacidad de flujo, es decir, es un líquido con una viscosidad muy alta, en donde la viscosidad varía de 10^{10} a 10^{14} pascal-segundos. Se puede ver como un sistema amorfo metaestable en el que las moléculas tienen movimiento vibracional pero tienen componentes de rotación y de traslación muy lentos (casi inapreciables). Como un sistema metaestable, es estable durante largos períodos de tiempo cuando se almacena muy por debajo de la temperatura de transición cristalina. Debido a que los vidrios no se encuentran en un estado de equilibrio termodinámico, los vidrios almacenados a temperaturas en o cerca de la temperatura de transición cristalina se relajan en el equilibrio y pierden su alta viscosidad. El líquido de flujo elástico o espeso resultante, químicamente y estructuralmente se desestabiliza con frecuencia. Mientras que un vidrio se puede obtener por muchas vías diferentes, físicamente y estructuralmente parece ser el mismo material, en un nivel micro, por cualquier vía que se tomó. Es notable, sin embargo, que las espumas de congelación de la invención incluyen, por ejemplo, una macro estructura en espuma de celda abierta y/o célula cerrada que no se encuentra en los materiales liofilizados de la técnica anterior. El proceso usado para obtener una matriz cristalina para los propósitos de esta invención es generalmente una técnica de sublimación y/o evaporación del disolvente.

La "temperatura de transición vítrea" se representa por el símbolo T_g y es la temperatura a la que una composición cambia de un estado cristalino o vítreo a un estado espeso o elástico. Generalmente T_g se determina usando calorimetría diferencial de barrido (DSC) y se toma de forma estándar como la temperatura en la que se produce el inicio del cambio de la capacidad calorífica (C_p) de la composición después de la detección a través de la transición. La definición de T_g siempre es arbitraria y no hay convención internacional presente. La T_g se puede definir como el inicio, punto medio o punto final de la transición.; para los propósitos de esta invención, usaremos el inicio de los cambios en C_p cuando se usa DSC. Ver al artículo titulado "Formation of Glasses from Liquids and Biopolymers" de C. A. Angell: Science, 267, 1924-1935 (Mar. 31, 1995) y al artículo titulado "Differential Scanning Calorimetry Analysis of Glass Transitions" de Jan P. Wolanczyk: Cryo-Letters, 10, 73-76 (1989). Para el tratamiento matemático detallado ver "Nature of the Glass Transition and the Glassy State" por Gibbs y DiMarzio: Journal of Chemical Physics, 28, núm. 3, 373-383 (Marzo, 1958).

Los "potenciadores de penetración" son compuestos de superficie activa que promueven la penetración de una droga a

través de una membrana o revestimiento de mucosa y puede usarse generalmente donde sea deseable esta característica, por ejemplo, vía intranasal, intrarrectal, e intravaginal.

Los excipientes "**farmacéuticamente aceptables**" (vehículos, aditivos) son aquellos que se pueden administrar razonablemente a un individuo mamífero para proporcionar una dosis eficaz del ingrediente activo empleado. Preferentemente, estos son excipientes que Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) tiene hasta la fecha designados como "Reconocidos generalmente como seguros" (GRAS).

"**Composición farmacéutica**" se refiere a las preparaciones que están en una forma tal como para permitir que la actividad biológica de los ingredientes activos sea inequívocamente eficaz, y que no contengan componentes adicionales que sean tóxicos para los individuos a los que se le administra la composición.

Un "**poliol**" es una sustancia orgánica con múltiples grupos hidroxilo, e incluye, por ejemplo, azúcares (azúcares reductoras y no reductoras), alcoholes de azúcar y ácidos de azúcar. Los polioles preferidos en la presente tienen un peso molecular que es menos de aproximadamente 600 kDa (por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 120 a aproximadamente 400 kDa). Un "**azúcar reductor**" es un poliol que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir los iones metálicos o reaccionar covalentemente con los grupos amino de lisina y otros en las proteínas. Un "**azúcar no reductor**" es un azúcar que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor. Los ejemplos de azúcares reductores son fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melezitosa y rafinosa. Manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerina son ejemplos de alcoholes de azúcar. En cuanto a los ácidos de azúcar, estos incluyen L-gluconato y las sales metálicas de éste.

Un "**polvo**" es una composición que consiste en partículas sólidas finamente dispersadas que son relativamente de flujo libre y capaces de ser fácilmente dispersadas en un dispositivo de inhalación y posteriormente inhaladas por un paciente tal que las partículas son adecuadas para administración intranasal o pulmonar a través del tracto respiratorio superior, incluyendo la mucosa nasal.

La "**temperatura de almacenamiento recomendada**" para una composición es la temperatura (T_s) en la que composición de fármaco en polvo se puede almacenar para mantener la estabilidad del producto farmacológico sobre la vida en estante de la composición para asegurar una dosis consistentemente administrada. Esta temperatura se determina inicialmente por el fabricante de la composición y aprueba por la agencia gubernamental responsable de aprobar la composición para la comercialización (por ejemplo, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos). Esta temperatura variará para cada producto farmacológico aprobado dependiendo de la sensibilidad térmica del fármaco activo y otros materiales en el producto. La temperatura de almacenamiento recomendada variará de aproximadamente 0° a aproximadamente 40°C, pero generalmente será la temperatura ambiente, es decir, aproximadamente 25°C. Por lo general, un producto farmacológico se mantendrá a una temperatura que está en o por debajo de la temperatura de almacenamiento recomendada.

Un material biológicamente activo "**conserva su actividad biológica**" en una composición farmacéutica, si la actividad biológica del material biológicamente activo, tal como una enzima, en un momento dado está dentro de aproximadamente 10% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica que se exhibe en el momento en que se preparó la composición farmacéutica según se determina, por ejemplo, en un ensayo de unión. En el caso de los virus o bacterias vivos, la actividad biológica se puede considerar conservada cuando el título viral o conteo de colonias de la composición está dentro de un log del título o conteo inicial. Para células vivas, se considera conservada la actividad biológica cuando el conteo de células vivas de la composición está dentro de 50% del conteo inicial. El ensayo que se usa para determinar el título de virus Influenza vivo es el ensayo de enfoque fluorescente (ensayo FFA). El título de este ensayo se reporta como log de Unidad de Enfoque Fluorescente por mililitro (log FFU/ml). Un log FFU/ml es aproximadamente igual a un log de dosis infecciosa de cultivo de tejido por ml (log TCID₅₀/ml). Otros ensayos de "actividad biológica" se elaboran a continuación.

Un material biológicamente activo "**conserva su estabilidad química**" en una composición farmacéutica, si la estabilidad química en un momento dado es tal que el material biológicamente activo se considera que conserva su actividad biológica como se definió en la presente descripción. La estabilidad química se puede evaluar detectando y cuantificando las formas químicamente alteradas del material biológicamente activo. La alteración química puede implicar la modificación de tamaño (por ejemplo recorte de proteínas), que se pueden evaluar usando por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o espectrometría de masa de ionización/desorción mediante láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS). Otros tipos de alteración química incluyan la alteración de carga (por ejemplo que se produce como resultado de la deamidación), que se puede evaluar por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico.

Un material biológicamente activo "**conserva su estabilidad física**" en una composición farmacéutica si no muestra aumento significativo en la agregación, precipitación y/o desnaturalización después del examen visual de color y/o claridad, o según mida por dispersión de luz UV o por cromatografía de exclusión por tamaño.

- 5 Una formulación o composición "**estable**" es una en la que el material biológicamente activo prácticamente conserva en ella su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica después del almacenamiento. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad están disponibles en la técnica y se revisan, por ejemplo, en, por ejemplo, en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Editor Vincent Lee, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Publicaciones. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. El análisis de tendencia se puede usar para estimar una vida en estante esperada antes de que un material haya estado realmente almacenado durante ese periodo de tiempo. Para los virus *Influenza* vivos, la estabilidad se define como el tiempo que necesita para perder 1 log de FFU/ml ó 1 log de TCID₅₀/ml. Preferentemente, la composición es estable a temperatura ambiente (~ 25°C) durante al menos tres meses, o a 40°C durante al menos 1 mes y/o estable aproximadamente a 2-8°C durante al menos 1 año. Además, la composición es estable preferentemente después de la congelación (a, por ejemplo, -70°C) y descongelación de la composición.

En significado farmacológico, una "**cantidad terapéuticamente eficaz**" de un material biológicamente activo se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o tratamiento de un trastorno en donde un "trastorno" es cualquier afección que puede beneficiar a partir del tratamiento con el material biológicamente activo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión.

"**Tratamiento**" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos con necesidad de tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como aquellos en los cuales se debe prevenir el trastorno.

"**Dosis unitaria**" se refiere a un receptáculo que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención.

La "**viabilidad**" con respecto a las bacterias, se refiere a la capacidad de formar una colonia en un medio nutriente apropiado para el crecimiento de la bacteria. La viabilidad, con respecto a los virus, se refiere a la capacidad para infectar y reproducirse en una célula huésped adecuada, por ejemplo, resultando en la formación de una placa en un leno de células huéspedes.

35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de temperatura y presión en función del tiempo durante un proceso ilustrativo de secado de espuma.

La Figura 2A a 2D son imágenes fotográficas de una formulación de espuma liofilizándose en viales de vidrio.

La Figura 3 muestra las transiciones de fase de FluMist™ de la vacuna del virus Influenza A/Sydney usando espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR).

La Figura 4 muestra la pérdida de actividad (título viral) del proceso (título viral) de la vacuna del virus Influenza B/Harbin después del proceso de liofilización de la espumabilidad donde el secado se realizó a 10°C, 15°C, y 20° C.

La Figura 5 muestra la tendencia de estabilidad de la vacuna del virus Influenza B/Harbin que se sometió al proceso de liofilización de la espumabilidad donde el secado primario se llevó a cabo a 10°C, 15°C, ó 20°C.

La Figura 6 muestra la tendencia de estabilidad de la potencia del virus Influenza B/Ann Arbor en espuma desecada en almacenamiento a 37°C y 50°C.

La Figura 7 muestra las tendencias de estabilidad para tres cepas diferentes de vacuna del virus Influenza en espuma desecada en la formulación AVS53.

La Figura 8 muestra los datos de difracción de rayos X y una micrografía electrónica que demuestra la naturaleza amorfa de una composición de espuma de la invención.

La Figura 9 muestra un diagrama de temperaturas de proceso y pérdida acumulativa de viabilidad para un proceso de congelación-espuma que finaliza con una etapa de secado secundario a 33°C.

La Figura 10 muestra un diagrama de viabilidad de *Listeria* cuando se elimina el agua en un proceso de congelación de espuma. El secado secundario a una temperatura más baja proporciona 10-veces mejor viabilidad en una espuma seca que tiene menos de 5 por ciento de humedad residual que para el mismo material secado subordinado a una temperatura más alta.

La Figura 11 es un diagrama esquemático de un sistema ilustrativo para la liofilización de la espuma a baja temperatura.

Las Figuras 12A y B presentan diagramas mostrando los beneficios para la viabilidad del microbio con el secado secundario a baja temperatura en comparación con el secado a temperatura moderada.

La Figura 13 presenta un diagrama que muestra cómo las temperaturas graduales de secado secundario pueden reducir los niveles finales de humedad mientras tiempo que aumentan la viabilidad en comparación con los procesos no-graduales.

La Figura 14 presenta un diagrama que muestra la evidencia de que la viabilidad en el secado del microbio por congelación de espuma no está sustancialmente afectada al no ser por la matriz de la espuma que experimenta una condición de no-cristalina.

Descripción detallada de la invención

El método de la presente invención puede proporcionar un almacenamiento prolongado de materiales bioactivos, tales como, por ejemplo, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, vacunas, bacterias, virus, liposomas, plaquetas, y/o suspensiones celulares, en una matriz cristalina de una espuma seca. Los métodos de la invención proporcionan una composición conservante de espuma seca por el método de acuerdo con la reivindicación 1 en la presente descripción.

En los métodos, por ejemplo, particularmente bien adecuados para la conservación de materiales bioactivos que comprenden membranas lipídicas, el material bioactivo puede formularse en una suspensión con agentes de protección, previamente enfriada, mantenida a una temperatura cercana a la temperatura de transición de fase de membrana para dejar penetrar en la membrana a los agentes de protección antes de expandir la formulación dentro de una espuma, secada en una capa fina de espuma, secada a presiones muy bajas, y secada a una baja temperatura de secado secundario, por ejemplo, cercano a la temperatura ambiente.

La pérdida de viabilidad del microorganismo en los procesos de secado de la espuma se puede atribuir a una combinación de fuerzas de alto cizallamiento, cavitación de la ebullición, estrés oxidativo y otras tensiones superficiales micro-ambientales de la espumabilidad, congelación y tensiones de congelación-descongelación, temperatura y estrés de la desecación. En un resultado sorprendente, para algunos virus y bacterias en particular, encontramos que el estrés de temperatura, particularmente en la etapa de secado secundario, puede ser una causa importante de muerte log. Esto, aún considerando que las mismas temperaturas de secado no son tan perjudicial en el contexto de las liofilizaciones estándares que no forman espuma. Por lo tanto, hemos diseñado sistemas y métodos únicos para retener viabilidad a través de los procesos de liofilización por congelación de espuma.

Métodos para preparar espumas secas estables

Los métodos para preparar espumas secas estables para la conservación de materiales bioactivos incluyen, en general, por ejemplo, preparación de una formulación que combina el material bioactivo con un poliol y/o polímero en una solución o suspensión, reducción la presión aplicada a la formulación para iniciar la espumabilidad, congelación la espuma, secado primario de la espuma por liofilización y secado secundario de la espuma a 10 por ciento de humedad residual o menos a una temperatura de aproximadamente 25°C o menos.

En modalidades preferidas para la conservación de virus y/o microorganismos viables, tales como bacterias, el proceso de secado de la espuma incluye, por ejemplo, mantener una formulación de microorganismo y un poliol a una temperatura de aproximadamente la temperatura de transición de fase de membranas de microorganismos. La formulación se enfría hasta 10°C dentro de la congelación antes de expandir la formulación en una espuma por reducción o la presión atmosférica por debajo de las condiciones de presión ambiente. La pérdida del calor latente y/o enfriamiento ambiental congela la espuma. Las espumas experimentan el secado previamente por liofilización de aproximadamente 60% ó 75% de sólidos, o más. El secado secundario se realiza en un ambiente con una temperatura por encima de la congelación. Durante la totalidad o

mayor parte de la fase de secado secundario, se puede preferir que la espuma se mantenga congelada y/o por debajo de la temperatura de transición cristalina (T_g) de la espuma. El secado secundario típicamente se completa cuando la humedad residual se redujo a aproximadamente de 10 por ciento o menos; preferiblemente, de aproximadamente 5 por ciento de humedad.

5 En una modalidad, por ejemplo, una formulación de material bioactivo, poliol y/o polímero, en un disolvente, se expandió a una espuma a una presión de aproximadamente entre 200 torr y aproximadamente 25 torr antes de estabilizar y secar la espuma. Esta forma de modalidad se distingue de la técnica anterior discutida anteriormente, por ejemplo, en que no requieren un fuerte vacío (presión de 24 torr o menos) para obtener una adecuada expansión de la espuma. En esta
10 modalidad, la espumabilidad adecuada se puede obtener a presiones más altas debido a que los métodos de la invención proporcionan expansión de la espuma, por ejemplo, a partir de la desgasificación de los gases saturados de la formulación, ebullición de los disolventes de alta presión de vapor de la formulación, químicas que forman gases, y/o el agrandamiento de las burbujas inyectadas o atrapadas en la formulación. Las formulaciones de esta modalidad se pueden, por ejemplo, enfriar previamente y/o perder el calor latente de manera sustancial durante la expansión de la espuma o el secado que, por
15 ejemplo, resulta opcionalmente de la congelación y/o liofilización de la espuma. Después de que se completa la etapa de secado primario, la espuma seca estabilizada se puede mantener, por ejemplo, en temperaturas de secado secundario a presiones inferiores a 50 mtorr, para completar el secado de la formulación.

20 En otra modalidad, un agente espumante está presente en la formulación, por ejemplo, para proporcionar una expansión de la espuma y/o control con o sin ebullición. Por ejemplo, una formulación que contiene un agente espumante, un material bioactivo, y un poliol y/o polímero, se puede someter a una presión reducida en la que se expande la formulación en una espuma (por acción del agente espumante), estabiliza y seca. El agente espumante puede ser, por ejemplo, gas en solución en la formulación, un disolvente de alta presión de vapor (volátil), un carbonato, un metal activo, una corriente eléctrica continua, una suspensión de finas burbujas de gas, y/o similares, como se describe a continuación en la sección de
25 Espumabilidad de la Formulación.

Una temperatura de la fase de transición de membrana es la temperatura a la que la membrana lipídica transita entre una fase fluida (alta movilidad) a una fase más rígida fase gel-cristalina. Se postula que debido a que las membranas lipídicas tienden a ser permeables a la difusión pasiva del medio ambiente externo a la temperatura característica de la fase de transición de la bicapa lipídica, una vía para cargar agentes estabilizantes/de protección a las células, bacterias, o virus es preincubando en dicha fase de transición.) La presión puede reducirse entonces, por ejemplo, para ebullicir la formulación y producir una espuma. El agua se puede perder rápidamente de la formulación, junto con el calor latente, lo que resulta, por ejemplo, en la congelación de espuma. El agua continúa perdiéndose, por ejemplo, por sublimación en el transcurso de varios minutos para proporcionar una composición de espuma sustancialmente seca. La temperatura se puede calentar, por
30 ejemplo, para ahuyentar la humedad residual adicional y agua de hidratación para mejorar la estabilidad física y/o química de la espuma seca.

La Figura 1 muestra un proceso ilustrativo de secado por congelación de espuma de la invención. Superpuestas en un diagrama de la cámara de vacío las temperaturas y presiones en función del tiempo son imágenes fotográficas de formulaciones que contienen un virus con envoltura en varias etapas de secado. La temperatura de la cámara línea 11 indica la temperatura de la cámara de vacío durante el proceso de congelación de la espumabilidad. La temperatura de la cámara se mantiene aproximadamente a la temperatura de transición de fase del virus, o aproximadamente a 15°C, a través de la etapa de penetración 12, etapa de espumabilidad 13, y de secado inicial (primario) 14. La temperatura de la cámara se elevó hasta las temperaturas de secado de aproximadamente 33°C durante la fase de secado secundario 15. La línea de presión 16 de la cámara permanece en o por encima de la presión atmosférica durante la etapa de penetración, se reduce a aproximadamente 2500 mtorr durante la etapa de formación de espumabilidad, aproximadamente 250 mtorr durante la etapa de secado inicial, y aproximadamente 50 mtorr durante la etapa de secado secundario. Las líneas de temperatura del frasco 17 representan las temperaturas medidas durante el proceso a partir de termopares ubicados dentro de las formulaciones en viales representativos. Los viales mantienen la temperatura de transición de fase de membrana durante la etapa de penetración, pero de repente se enfrían cuando la presión desciende durante la etapa de espumabilidad debido a la pérdida de calor latente a partir de la evaporación y sublimación del agua de la formulación. Las temperaturas del frasco se elevan gradualmente a la cámara cerca de la temperatura de secado como la tasa de pérdida de humedad residual se estrecha en la etapa de secado secundario.

55 Las Figuras 2A a 2D muestran imágenes fotográficas de viales representativos de formulación durante las etapas de secado por congelación de espuma. En la Figura 2A, la formulación líquida en el fondo del frasco está comenzando a ebullicir cuando la presión en la cámara comienza a descender. En la Figura 2B, una matriz espumosa comenzó a estabilizarse cuando se espesa con pérdida de agua y temperaturas más bajas. En la Figura 2C, la espuma se congela y ha perdido la mayor parte

del agua en la etapa de secado inicial. La Figura 2D muestra la matriz cristalina de espuma seca bien dentro de la etapa de secado secundario.

Una formulación puede incluir un material bioactivo del virus influenza atenuado en una solución del 40% de sacarosa, 5% de gelatina, 0,02% de Pluronic F68, y un tampón fosfato pH 7.2. La formulación se divide en alícuotas en viales de vidrio estériles de 10 ml siliconizados y se enfrían previamente a 15 °C (aproximadamente la temperatura de transición de fase de la envoltura del virus, ver la Figura 3) durante aproximadamente 30 minutos. La presión se reduce rápidamente a aproximadamente 50 mtorr durante aproximadamente una media hora para generar la espuma con la nucleación de hielo y propagación de hielo a lo largo. Después de la espumabilidad y congelación inicial, la sublimación y evaporación del hielo produce una espuma físicamente estable. (Dicha espuma se puede generar en vacíos entre aproximadamente 400 torr y 7,7 torr o menos, o 2.5 torr a aproximadamente 50 mtorr, cuando la formulación contiene agentes espumantes). La temperatura se aumenta hasta aproximadamente 33°C durante aproximadamente 2 días en una etapa de secado secundario para reducir la humedad residual de la composición a un nivel deseado. Los viales se sellan asépticamente para impedir la entrada de contaminantes y humedad durante la estabilidad en el almacenamiento.

Preparación de una formulación

Las formulaciones de la invención pueden incluir, por ejemplo, un material bioactivo formulado en una solución o suspensión que contiene un poliol, polímero, agente espumante, agente surfactante, y/o un tampón. Los ingredientes de la formulación pueden combinarse en una secuencia usando técnicas apropiadas para los componentes, como se apreciará por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los polímeros y/o altas concentraciones de polioles se pueden disolver en una solución acuosa calentada con agitación antes de enfriar y mezclar con el material bioactivo. El material bioactivo, tales como un virus o bacteria, se pueden, por ejemplo, concentrar y separar de los medios de cultivo por centrifugación o filtración antes de la resuspensión en la formulación.

El material bioactivo puede ser, por ejemplo, un material de interés que proporciona cualquier bioactividad, tales como, por ejemplo, actividad enzimática, almacenamiento de la información genética, una interacción de afinidad, inducción de respuestas inmunes, multiplicación celular, infección, inhibición del crecimiento celular, estimulación de crecimiento celular, efectos terapéuticos, efectos farmacológicos, efectos antimicrobianos y/o similares. Por ejemplo, los materiales bioactivos pueden ser, enzimas, anticuerpos, hormonas, ácidos nucleicos, bacterias, virus, liposomas, plaquetas, otras células, y/o similares. El material bioactivo puede ser, por ejemplo, células vivas y/o virus viables. El material bioactivo puede ser, por ejemplo, células no vivas o liposomas útiles como vacunas o vehículos de administración para agentes terapéuticos. Los materiales bioactivos virales de la invención pueden ser, por ejemplo, virus vivos y virus vivos atenuados tales como, virus influenza, virus parainfluenza, AAV, adenovirus, virus sincitial respiratorio, virus de herpes simple, citomegalovirus, virus SARS, miembros de la familia del virus corona, metapneumovirus humano, virus de Epstein-Barr, y/o similares.

Los agentes de protección de los métodos pueden incluir, por ejemplo, cualquier variedad de polioles. Por ejemplo, el poliol, tal como sacarosa, puede físicamente rodear el material bioactivo para promover la retención de la estructura molecular durante el proceso de secado e impartir rigidez estructural a la matriz cristalina en estado seco. Otras funciones del poliol pueden incluir, por ejemplo, proteger el material bioactivo de la exposición a luz dañina, oxígeno, humedad y/o similares. Por ejemplo, la poliol, tal como sacarosa, puede físicamente rodear y proteger el material bioactivo de la exposición a luz dañina, oxígeno, humedad y/o similares. Los polioles pueden, por ejemplo, reemplazar el agua de la pérdida de hidratación durante el secado, para evitar la desnaturalización de las biomoléculas del material. En los métodos de la invención, los polioles pueden proporcionar, por ejemplo, un espesante con tenacidad para fomentar la formación y estabilización de las burbujas que forman la estructura de espuma seca de las composiciones conservantes. Aunque la invención no se limita a cualquiera de los polioles en particular, la formulación y composiciones de espuma puede incluir, por ejemplo, sacarosa, trehalosa, sorbosa, melezitosa, sorbitol, estaquiosa, rafinosa, fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa, glucosa, manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol, glicerol, L-gluconato, y/o similares. La mayoría de los polioles pueden disolverse fácilmente por mezcla en la formulación en cantidades en el intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 1 por ciento en peso a aproximadamente 45 por ciento en peso, aproximadamente 2 por ciento en peso a aproximadamente 40 por ciento en peso, o aproximadamente 5 por ciento en peso a aproximadamente 20 por ciento en peso.

Los polímeros se pueden incluir en las formulaciones del método, por ejemplo, para proporcionar beneficios de protección y/o estabilidad estructural de espuma. Al igual que con polioles, los polímeros pueden proporcionar, por ejemplo, protección física y química a los materiales bioactivos. Los polímeros pueden proporcionar frecuentemente, por ejemplo, más viscosidad de espesamiento en peso a la formulación de polioles simples. Las cadenas lineales o ramificadas de los polímeros pueden proporcionar, por ejemplo, resistencia estructural aumentada a las composiciones de espuma seca de la invención. Muchos polímeros son, por ejemplo, altamente solubles en agua, por lo que no impiden significativamente la

reconstitución de espumas secas. Los agentes de protección de polímeros, en los métodos de la invención pueden incluir, por ejemplo, gelatina hidrolizada, gelatina no hidrolizada, polímeros solubles en agua tales como polivinil pirrolidona, ovoalbúmina, colágeno, sulfato de condroitina, un polisacárido siálico, actina, miosina, microtúbulos, dineína, quinetina, albúmina sérica humana, y/o similares.

Los agentes espumantes pueden ser, por ejemplo, componentes de la formulación capaces de causar la expansión de la formulación en una espuma en la aplicación de presión reducida. Los agentes espumantes pueden ser, por ejemplo, pequeñas burbujas suspendidas en la formulación, que se pueden expandir en la aplicación de presión reducida y/o componentes capaces de generar burbujas de gas en la formulación. Los agentes espumantes pueden ser, por ejemplo, gases en solución, productos químicos que forman gas, disolventes de fácil ebullición, burbujas atrapadas o suspendidas, burbujas inyectadas, y/o similares.

Los surfactantes se pueden incluir en las formulaciones de los métodos para proporcionar, por ejemplo, solubilidad aumentada a otros componentes de la formulación, protección contra la tensión superficial inducida por la desnaturalización de determinadas biomoléculas durante la espumabilidad, estabilización de la burbuja, reconstitución más rápida, y/o similares. Los surfactantes pueden ser, por ejemplo, detergentes iónicos o no iónicos adecuados, surfactantes de Tween, surfactantes plurónicos, y/o similares.

Los tampones se pueden añadir a las formulaciones del método, por ejemplo, para proporcionar un pH estable adecuado para las formulaciones del método y composiciones de la invención. Los tampones típicos de la invención incluyen, por ejemplo, fosfato de potasio, fosfato de sodio, acetato de sodio, histidina, imidazol, citrato de sodio, succinato de sodio, bicarbonato de amonio, y/o un carbonato. Los tampones se pueden ajustar con el ácido y formas de sal apropiados para proporcionar, por ejemplo, estabilidad de pH en el intervalo de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10. Un pH cerca al neutral, tal como, por ejemplo, pH 7.2, es el preferido para muchas composiciones.

Otros excipientes se pueden incluir en la formulación. Por ejemplo, aminoácidos, tales como arginina y metionina pueden ser componentes de la formulación y composiciones. Los aminoácidos pueden, por ejemplo, actuar como los anfotéricos que bloquean grupos cargados en superficies de procesamiento y contenedores de almacenamiento evitando la unión no específica de materiales bioactivos. Los aminoácidos pueden aumentar la estabilidad de las composiciones mediante, por ejemplo, agentes eliminadores de oxidación, agentes eliminadores de desamidación, y estabilización de las conformaciones de las proteínas. En otro ejemplo, se puede incluir el glicerol en las formulaciones de la invención, por ejemplo, para actuar como un poliol y/o plastificante en la composición de espuma seca. El EDTA se puede incluir en la composición, por ejemplo, para eliminar los iones metálicos que pueden iniciar químicas destructivas de radicales libres.

Enfriado de la formulación

Las formulaciones de la invención se pueden enfriar antes de expansión de la espuma, estabilización de la espuma, congelación y/o secado, para proporcionar beneficios, tales como, por ejemplo, estabilización de la bioactividad, espesamiento de la formulación, penetración mejorada de los componentes de la formulación a través de las membranas, y/o congelación de la formulación antes de la liofilización.

El enfriamiento puede realizarse mediante cualquier técnica apropiada conocida en la técnica. Por ejemplo, el enfriamiento puede ser por contacto y conducción con el hardware de refrigerado, contacto con corrientes de fluidos fríos, pérdida de calor latente, y/o similares. Típicamente, las formulaciones se mantienen en recipientes de vidrio sobre estantes de metal dentro de una cámara de temperatura de proceso controlada donde se equilibran con la temperatura controlada. La cámara puede incluir, por ejemplo, las capacidades de control de presión tal que el enfriamiento se puede impulsar por la pérdida de calor latente de la evaporación o sublimación de disolventes de la formulación.

Las formulaciones de la invención se pueden, por ejemplo, enfriar previamente a la temperatura de transición de fase de del material biológico asociado a las membranas lipídicas para mejorar la penetración de los agentes de protección. Las bicapas lipídicas de las membranas biológicas, y las monocapas de algunos liposomas, pueden existir en una fase fluida a temperaturas superiores a la temperatura de transición de fase principal (T_m) y como una fase cristalina a temperaturas inferiores a la T_m . Las membranas de fase fluida y membranas de fase cristalina pueden presentar una barrera hidrófoba continua para la penetración por moléculas hidrófilas. Sin estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que a temperaturas cercanas de la T_m , pueden existir los defectos transmembranas en los límites entre las regiones de las fases líquida y cristalina en una membrana lipídica. Dichos defectos de transmembrana pueden proporcionar permeabilidad aumentada a moléculas hidrófilas, tales como muchos agentes de protección de la invención. Además, debido a que la formulación tiene un alto contenido de sólidos, se produce un gradiente químico que impulsa además los solutos en la

membrana, tales como agentes de protección. Cuando la humedad se elimina después a partir de la formulación, los agentes de protección se pueden retener dentro del volumen cerrado de la membrana a niveles estabilizantes. La estabilidad mejorada de proceso y estabilidad de almacenamiento para el virus expuesto a agentes de protección a la temperatura de transición de fase de membrana (ver Figura 3) se muestran en las figuras 4 y 5, respectivamente.

La T_m de muchas membranas lipídicas está por encima de la temperatura de congelación y temperaturas de transición cristalina (T_g) de las formulaciones. Esto permite la pronta difusión de los agentes de protección en solución líquida a través de las membranas lipídicas a aproximadamente su T_m . Por ejemplo, una solución de 40% de sacarosa permanece líquida para la penetración efectiva de una célula en una membrana típica con T_m de 15°C. La permeabilidad aumentada de los agentes de protección en la solución líquida a través de las membranas en la transición de fase puede proteger las moléculas biológicas dentro de volúmenes cerrados de membrana.

La T_m de una membrana se puede determinar, por ejemplo, mediante microscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR), métodos de flexión y rigidez, estudios de permeabilidad iónica, y similares. Las formulaciones de los materiales bioactivos con membranas lipídicas se pueden mantener, por ejemplo, a temperaturas entre aproximadamente 0°C a aproximadamente 70°C, aproximadamente 2°C a aproximadamente 45°C, aproximadamente 12°C a 16°C, o aproximadamente 15°C. La espuma seca del virus influenza vivo a la temperatura de transición de fase potencial de 15°C (ver Figura 3) se encontró que era más resistente a la pérdida de potencia relacionada con el proceso (ver, Figura 4) y presentó significativamente mejor estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente que la espuma se seca a 10°C y 20°C (ver Figura 5). Las formulaciones se pueden mantener a la T_m que permite adecuada penetración de los agentes de protección. Por ejemplo las formulaciones se pueden mantener en T_m de membrana lipídica durante aproximadamente 10 a aproximadamente 60 minutos, o aproximadamente 30 minutos.

Espumado de la formulación

La espumabilidad puede resultar, por ejemplo, del atrapamiento de gases liberados a partir de la formulación y/o expansión de burbujas preexistentes en suspensión. Por ejemplo, como la presión de gas sobre la formulación se reduce, el punto de ebullición de los componentes del disolvente puede descender por debajo de la temperatura de la formulación, dando como resultado la rápida evaporación o ebullición del disolvente. El burbujeo significativo se puede producir también en la formulación, por ejemplo, cuando la presión se reduce por debajo de la presión parcial de los gases disueltos en el disolvente, dando lugar a burbujas a partir de la desgasificación. La formación de burbujas puede químicamente inducirse. Como alternativa, el burbujeo puede ser físicamente inducido introduciendo un gas a través del fondo del recipiente, por ejemplo, tal como a través de vidrio poroso.

Se puede prolongar la formulación en una espuma mediante, por ejemplo, expansión de burbujas dentro de la formulación por reducción de la presión aplicada. Las burbujas pueden ser, por ejemplo, preexistentes, inyectadas, y/o generadas in situ. Las burbujas se pueden, por ejemplo, suspender dentro de la formulación antes de la expansión, inyectar en la formulación antes o durante la expansión, o generar por ebullición, desgasificación, o química que forma gas. Los compuestos de la formulación, por ejemplo, incluidos para promover la expansión de la formulación en una espuma pueden ser agentes espumantes de la invención.

La expansión de la formulación puede dar lugar, por ejemplo, a partir de la ebullición de la formulación. La ebullición se produce, por ejemplo, en el punto de ebullición de un disolvente, o cuando la presión de vapor de una formulación de disolvente excede la presión circundante. La ebullición se puede controlar, por ejemplo, ajustando de la temperatura de la formulación (temperaturas más altas resultan en las presiones de vapor más altas) y/o ajustando la presión aplicada. Típicamente, las formulaciones de la invención se pueden hervir a presión reducida (vacío, o menos presión que la atmosférica) para proporcionar una temperatura de ebullición inferior a la estabilidad de los materiales bioactivos. Las formulaciones que comprenden un disolvente con un bajo punto de ebullición (o alta presión de vapor) pueden ebullicir a temperaturas inferiores. Por ejemplo, la inclusión de determinados alcoholes, éteres, fluorocarbonos, y/o similares, pueden proporcionar puntos de ebullición inferiores a las formulaciones de la invención.

La desgasificación puede, por ejemplo, proporcionar expansión de la formulación dentro de una espuma. Los gases se pueden difundir y disolver en disolventes líquidos hasta que se establece un equilibrio entre las presiones parciales de los gases en el líquido y la atmósfera circundante. Si la presión de la atmósfera circundante se cae, por ejemplo, de repente, los gases pueden escapar rápidamente en el líquido como burbujas. Por ejemplo, cuando una solución acuosa, que se equilibró con un gas a presión atmosférica, se expone a una presión inferior, se pueden formar las burbujas de gas en las paredes del recipiente o pueden brotar a partir de la solución como un "burbujeo". Esto no es ebullición, sino es la liberación de gases disueltos de la solución, o desgasificación. Si la presión se reduce más aún, los gases se pueden eliminar

sustancialmente de la solución. Eventualmente, en función del disolvente, temperatura, y presión, el disolvente de la solución puede empezar a ebullición. Las formulaciones de la invención se pueden expandir dentro de las espumas bajo presión reducida por desgasificación. Las formulaciones se pueden exponer a los gases en presiones adecuadas, tales como aproximadamente una atmósfera (aproximadamente 760 torr a nivel del mar) a aproximadamente 500 atmósferas, para impulsar los gases en la formulación. Cuando el gas se equilibró con la formulación a altas presiones (mayores que 1 atmósfera) la presión reducida proporcionando expansión no tiene que ser un vacío (menos de 1 atmósfera). Cuando el gas se equilibró con la formulación a presiones ambiente, o menos, la presión reducida iniciando la expansión de las burbujas puede ser, por ejemplo, un vacío. Los gases que pueden actuar como agentes espumantes de la invención pueden ser cualquiera de los conocidos en la técnica, tales como, aire, óxido nítrico, nitrógeno, oxígeno, hidrocarburos de bajo peso molecular, gases inertes, dióxido de carbono, y/o similares.

Las reacciones químicas, por ejemplo, que generan un gas puede proporcionar una expansión de la formulación dentro de una espuma. Los agentes espumantes de la invención pueden ser, por ejemplo, los productos químicos involucrados en las reacciones químicas que generan gas, como se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica. Por ejemplo, un carbonato en la formulación puede reaccionar con un ácido para producir gas CO₂. En otras reacciones, por ejemplo los metales, activos, tales como sodio o litio, en la presencia de agua pueden reaccionar para proporcionar gas de hidrógeno. Las reacciones electrolíticas usando corrientes eléctricas continuas se pueden usar, por ejemplo, para proporcionar gases de hidrógeno y/o oxígeno en los electrodos. Los gases generados dentro de la formulación pueden, por ejemplo, expandirse adiabáticamente o bajo presión constante para expandir la formulación dentro de una espuma. Opcionalmente, los gases químicamente generados dentro de la formulación se pueden expandir por la reducción de la presión aplicada para expandir la formulación dentro de una espuma.

Las burbujas se pueden incorporar en las formulaciones, por ejemplo, a través de los procesos mecánicos. Las formulaciones se pueden expandir dentro de la espuma, por ejemplo, mediante la incorporación forzosa de burbujas de gas en la formulación y/o por la expansión de pequeñas burbujas inyectadas en una presión reducida. Por ejemplo, las burbujas se pueden remover, batir, homogenizar, soplar, propulsar, agitar, sonicar, agitar con vórtice mezclar y/o similar, en la formulación. Después de la introducción, por ejemplo, en formulaciones viscosas de la invención las burbujas pueden permanecer suspendidas en una estructura de matriz durante períodos de tiempo prolongados. Las burbujas en suspensión se pueden, por ejemplo, expandir mediante la aplicación de presión reducida y/o estabilizar por secado o enfriamiento de la formulación. En una modalidad, las burbujas pequeñas (por ejemplo, 0,01 a 0,1 a 1 mm de diámetro) se pueden introducir en una formulación mediante la fuerza de un gas a presión a través de un filtro de membrana.

La espumabilidad se puede iniciar o expandir reduciendo la presión sobre la formulación. La espumabilidad puede ser el resultado, por ejemplo, de la desgasificación de los gases a partir de la formulación, expansión de pequeñas burbujas incorporadas y/o ebullición del disolvente. Los gases que escapan se pueden atrapar, por ejemplo, por los agentes viscosos de protección y/o surfactantes de la formulación. La etapa de espumabilidad puede resultar en, por ejemplo, secado inicial de la formulación, espesamiento y estabilización estructural, y/o de congelación de la espuma.

Los procesos para la conservación de materiales bioactivos que comprenden membranas de lípidos incluye, por ejemplo, una combinación de pre-enfriamiento a una temperatura de transición de fase y condiciones de vacío que pueden resultar en la congelación de la formulación. Debido a que la congelación puede ser una causa importante de daño de la proteína (y membrana) durante la liofilización, la técnica anterior enseña el uso de presiones más altas (por ejemplo, -100 torr o más), soluciones concentradas y/o temperaturas iniciales más altas para evitar la congelación. El uso de formulaciones que contienen diversos agentes crioconservadores y parámetros del proceso de la invención puede crioconservar las proteínas bioactivas y/o membranas que deben congelarse durante la expansión de la espuma, estabilización de la espuma, o etapas de secado del proceso.

La evaporación del disolvente a partir de la formulación puede proporcionar el secado inicial acelerado de la formulación bajo vacío. El punto de ebullición del disolvente acelera el secado inicial de la formulación, por ejemplo, mediante transferencia rápida de disolvente fuera de la formulación, viraje convectivo de la formulación, y aumentando el área de superficie. En muchos casos, es deseable que no hierva la formulación debido a que las burbujas pueden ser demasiado grandes o la formulación puede derramarse de la contención.

A medida que avanza la evaporación, la estructura de espuma se puede estabilizar. Como el disolvente es impulsado desde la formulación, los agentes protectores en solución se pueden concentrar y espesar. La evaporación del disolvente y la pérdida de calor latente pueden enfriar la formulación. En algún momento, los agentes de protección fríos y concentrados pueden alcanzar su temperatura de transición cristalina y dejar de fluir como un líquido. La pérdida de calor latente puede resultar en la congelación de la formulación. Típicamente, la congelación puede resultar de la eliminación del calor a través

del contacto con superficies frías y/o atmósfera refrigerada. La formulación cristalina y/o congelada puede preservar una estructura de espuma estable. Una estructura de espuma de celda abierta se puede proporcionar a través de, por ejemplo, proporcionando al recipiente de contención fondo de vidrio grabado para promover la formación de burbujas en el fondo del recipiente. Las burbujas que viajan a través de la formulación de espesamiento pueden formar espacios interconectados de una espuma de celda abierta. La espuma de celda abierta se puede promover también mediante el secado y espesamiento rápido que evitan la sedimentación de formulación libre de burbujas o formación de una piel que sella sobre la formulación. La espuma de celda abierta puede acortar los tiempos de secado secundario y los tiempos de reconstitución.

La espumabilidad puede verse afectada por las condiciones, tales como, por ejemplo, los tipos y concentraciones de los componentes de la formulación, temperaturas de formulación, niveles de presión aplicados, velocidad de los cambios de presión, y/o similares. Por ejemplo, la presencia de agentes surfactantes o espesantes pueden estabilizar las burbujas para una espuma menos densa. En otro ejemplo, el reemplazo de calor latente perdido, por ejemplo, calentando la cámara de proceso, puede prolongar la ebullición del disolvente. En otro ejemplo, presiones inferiores pueden proporcionar ebullición y/o expansión más vigorosa o continua. La presión se puede reducir, por ejemplo, a menos de aproximadamente 400 torr, aproximadamente 200 torr o menos, entre aproximadamente 100 torr y aproximadamente 25 torr o menos, entre 25 torr y 7,7 torr o menos, o entre 2500 mtorr y 50 mtorr, o aproximadamente 25 mtorr o menos, para producir la espumabilidad deseada y/o congelación en los métodos de la invención. El vacío se puede mantener durante aproximadamente 1 hora o aproximadamente 2 horas, por ejemplo, para completar la espumabilidad, estabilización de la espuma, y secado inicial de la espuma.

El secado inicial (por ejemplo, primario) en los métodos de la invención pueden incluir, por ejemplo, liofilización. Cuando el calor latente se pierde sin reemplazo o el calor se conduce lejos, por ejemplo, se puede alcanzar la temperatura de congelación de la formulación. Como el calor adicional se pierde debido a la evaporación, transferencia de contactos, y/o sublimación, la formulación puede congelarse, por ejemplo, estabilizando una estructura de espuma. El secado inicial puede continuar, por ejemplo, cuando se elimina el disolvente adicional por sublimación al vacío. La sublimación y/o evaporación se pueden impulsar, por ejemplo, mediante la eliminación del disolvente (humedad) del ambiente gaseoso alrededor de la espuma por condensación o desecación.

Secado secundario

El secado secundario de la espuma estructuralmente estabilizada e inicialmente seca puede, por ejemplo, eliminar el disolvente atrapado, o agua de hidratación molecular, para proporcionar una composición que es estable en el almacenamiento, por ejemplo, durante períodos prolongados a temperaturas del ambiente. El secado secundario puede involucrar, por ejemplo, la aplicación de temperaturas frías a cálidas en un fuerte vacío durante varias horas hasta días. En modalidades preferidas para la protección de materiales bioactivos que comprenden un organismo viviente, se encontró que la viabilidad depende excesivamente de la moderación de temperatura, por ejemplo, a o por debajo de la temperatura ambiente durante la etapa de secado secundario.

Por ejemplo, el calor se puede añadir a la espuma seca inicialmente para eliminar el disolvente residual. Para moderar el calentamiento de la espuma, el calor se puede añadir con moderación, por ejemplo, para reemplazar el calor latente de la evaporación o sublimación, sin añadir cantidades sustanciales de calor adicional, o elevando la temperatura de la espuma. El calor se puede aplicar, por ejemplo, a través de calentamiento de la atmósfera de presión reducida, como la luz IR, y/o el calor se puede conducir a la espuma a través de los accesorios asociados, tales como estantes, bandejas, y viales de vidrio. La temperatura de secado puede ser, por ejemplo, menor que la temperatura de transición cristalina de la composición remanente para evitar el colapso de la estructura de la espuma. Los métodos de la invención resultan en una matriz cristalina farmacéuticamente matriz aceptable, que comprende al menos un material biológicamente activo dentro de la matriz cristalina amorfa. La matriz cristalina puede ser un material sólido que forma a gran escala la matriz de la espuma con estructura de paredes alrededor de las células huecas de las burbujas de espuma. Preferentemente, la composición se seca casi completamente. Un poco de agua u otro disolvente acuoso pueden permanecer en la composición pero típicamente, no más que 10% de humedad permanece por peso.

En modalidades preferidas para la conservación de microorganismos y virus la temperatura de secado secundario es menor que 25°C, 20°C o menos. En una modalidad preferida de secado secundario de microorganismos, la temperatura de secado se eleva lentamente a partir de las condiciones de secado primario de una forma lenta y continua (por ejemplo, con un perfil de gradiente de temperatura) o en una serie de pequeñas etapas. Como se usa en la presente descripción, "seco", "secos" y "sustancialmente seco" abarcan aquellas composiciones con de aproximadamente 0% a aproximadamente 5% de agua.

Preferentemente, la matriz cristalina tendrá un contenido de humedad de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 3% como se midió usando el método de Karl Fisher.

Un vacío se puede proporcionar en el proceso de secado secundario para impulsar la velocidad de eliminación de agua y/o para ayudar a la eliminación de los niveles inferiores de humedad residual. El vacío durante el secado secundario puede ser, por ejemplo, menos de 400 torr, menos de 100 torr, menos de 2,5 torr, menos de 500 mtorr, menos de 100 mtorr, menos de 50 mtorr, o preferentemente aproximadamente 25 mtorr. En modalidades preferidas para proteger los microorganismos, se emplean presiones relativamente bajas en el secado secundario, por ejemplo, menos de 10 torr, menos de 1 torr, menos de 500 torr, menos de 100 mtorr, menos de 50 mtorr, acelerando así el secado en las temperaturas inferiores empleadas. Para la conservación de los organismos vivos, se prefiere impulsar el secado secundario con presiones absolutas muy bajas y evitar las altas temperaturas del secado secundario durante cualquier período prolongado.

El producto resultante del proceso de secado por congelación de espuma es generalmente un sólido amorfo (ver, Figura 8), en donde el material excipiente cristalino, por ejemplo, sacarosa, está en un estado cristalino amorfo y contiene el material biológicamente activo, evitando de ese modo el despliegue de la proteína y desacelerando significativamente las interacciones moleculares o la reactividad cruzada, debido a la movilidad en gran medida reducida del compuesto y otras moléculas dentro de la composición cristalina. Este proceso se postuló para ocurrir ya sea a través de la inmovilización mecánica de la proteína por el vidrio amorfo o a través de puentes de hidrógeno con grupos polares y cargados en la proteína, es decir, a través del reemplazo del agua, evitando de ese modo el secado inducido por la desnaturalización e inhibiendo además las interacciones de degradación. Mientras que el sólido cristalino está a una temperatura por debajo de su temperatura de transición cristalina y la humedad residual que permanece en los excipientes es relativamente baja, las proteínas lábiles y/o material bioactivo que contienen las membranas lipídicas pueden permanecer relativamente estables. Se debe señalar que alcanzar un estado cristalino no es necesariamente un pre-requisito para la estabilidad a largo plazo, ya que algunos ingredientes activos pueden ir mejor en un estado más cristalino. Si bien se reconoce en general que los biomateriales son generalmente más fáciles de estabilizar cuando se secan hasta un estado cristalino amorfo, existen ejemplos donde dichos estados cristalinos no son ni necesarios ni suficientes para la conservación a largo plazo. Es importante señalar que los mecanismos que se atribuyen a la estabilización de sustancias biológicas pueden ser multifactoriales y no se limitan a la naturaleza amorfa de la matriz de polvo en la que se contiene el ingrediente activo. La estabilización en el proceso descrito en la presente puede involucrar un número de factores incluyendo, pero no se limita a la reducción de la movilidad conformacional y flexibilidad de las cadenas laterales de proteínas y/o reducción en el volumen libre como resultado de la contención, mejoría en la rigidez estructural de la matriz, penetración física de agentes estabilizantes, reducción en la separación de fases del excipiente a partir del ingrediente activo, mejoría en el grado de desplazamiento de agua seleccionando el donante óptimo de enlace de hidrógeno. El último es una función de la afinidad y avidez del excipiente por la superficie de la proteína, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos que se estabiliza. En general, mientras que el sólido está a una temperatura por debajo de su temperatura de transición cristalina y la humedad residual restante en los excipientes sea relativamente baja, las proteínas lábiles y/o material bioactivo que contienen las membranas lipídicas pueden permanecer relativamente estables.

Llenado y Administración

Las formulaciones se pueden, por ejemplo, llenar en recipientes antes de la espumación y secado, o en alícuotas en recipientes individuales para uso, según se desee. Las formulaciones se pueden llenar, por ejemplo, en viales estándares de vidrio para liofilización para procesar en espumas estabilizadas. Los viales de vidrio pueden ser estériles con un fondo grabado y un tapón herméticamente sellado. Los materiales bioactivos de la invención se pueden administrar, por ejemplo, por inyección de las soluciones o suspensiones reconstituidas, o inhalación de partículas de espuma molida en polvo.

Las composiciones descritas en la presente pueden ser estables, es decir, conservan la actividad biológica del material biológicamente activo que contienen y son químicamente y/o físicamente estables. Las composiciones se probaron para la estabilidad, sometiéndolas al envejecimiento a temperatura elevada (por ejemplo, 37°C) y midiendo la actividad biológica, estabilidad química y/o física de las formulaciones. Según un ejemplo de vacuna viva atenuada del virus influenza (FluMist™), los resultados de estos estudios demuestran que los virus formulados en estas formulaciones fueron estables durante al menos un mes a 50°C y durante más de tres meses a 37 °C (ver, Figura 6). La estabilidad se define como el tiempo para la pérdida de potencia de un log de unidad de foco fluorescente/ml (UFF/ml). A 25°C, los virus de influenza vivo fueron estables durante más de un año (ver, Figura 7). Dichas formulaciones son estables aún cuando se usan altas concentraciones del material biológicamente activo. Así, estas formulaciones son ventajosas en que se pueden enviar y almacenar a temperaturas en o por encima de la temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo.

La composición estable de material bioactivo en una matriz cristalina amorfa (ver, Figura 8) proporcionada después del

secado se puede procesar además usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la matriz de vidrio es fácilmente divisible por corte, molienda, u otras técnicas de división. Los procesos para moler o pulverizar fármacos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar un molino triturador, un molino de impacto conocido como molino de Entoletter, un molino de chorro, un molino de espigas, un molino Wiley, o dispositivo de molienda similar. El tamaño de partícula preferido es menor que aproximadamente 100 μm a aproximadamente 0,1 μm , y preferentemente menor que 50 μm . Las partículas menores que aproximadamente 10 μm de tamaño son adecuadas, por ejemplo, para la administración pulmonar por inhalación, mientras que las partículas más grandes pueden ser adecuadas para la administración al tracto respiratorio superior y regiones nasales. El tamaño de partícula se puede elegir para obtener una dispersión variable y características de fluidez. Por ejemplo, polvos de flujo libre pueden ser especialmente deseables para el suministro intranasal o pulmonar. Las composiciones en polvo de la invención pueden ser fácilmente rehidratadas con agua, solución salina, u otros fluidos.

Las composiciones de espuma seca se pueden reconstituir con un tampón acuoso adecuado para administración por inyección o inhalación. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse a un mamífero entregando el material bioactivo a través de la vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica, intranasal o pulmonar. El área superficial grande de la espuma y la alta solubilidad de muchos agentes de protección permiten que las espumas secas de la invención se reconstituyan a concentraciones menores o mayores que la formulación original. En algunos ejemplos, por ejemplo, el material bioactivo se puede reconstituir en altas concentraciones, tales como por ejemplo hasta aproximadamente 400 mg/ml, para la entrega de la dosis adecuada en un pequeño volumen de inyección subcutánea. Las soluciones reconstituidas menos concentradas se pueden, por ejemplo, administrar como un aerosol por inhalación. La elección de la vía de administración puede depender de, por ejemplo, el sitio de acción, consideraciones farmacológicas, y similares. Una dosis típica de un material bioactivo en los métodos de la invención es de aproximadamente 0,01 ng/kg a aproximadamente 15 mg/kg.

La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") del material biológicamente activo dependerá, por ejemplo, de la afección que se trata, la gravedad y curso de la afección, si el material biológicamente activo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, terapia anterior, historia clínica del paciente y respuesta al material biológicamente activo, el tipo de material biológicamente activo usado, y la discreción del médico tratante. El material biológicamente activo puede administrarse adecuadamente al paciente de una sola vez, o durante una serie de tratamientos, y se puede administrar al paciente en cualquier momento a partir del diagnóstico. El material biológicamente activo se puede administrar como único tratamiento o en conjunción con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento de la afección en cuestión.

Como proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz del material biológicamente activo administrado será en el intervalo de aproximadamente 0,01 ng/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente ya sea por una o más administraciones, con el intervalo típico de proteína usada siendo aproximadamente 0,05 ng/kg a aproximadamente 20 mg/kg, con mayor preferencia de aproximadamente 0,1 ng/kg a aproximadamente 15 mg/kg, administrada por ejemplo, diariamente. Sin embargo otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se puede monitorear mediante técnicas convencionales.

COMPOSICIONES

Las composiciones incluyen composiciones de espuma seca de un material bioactivo y un poliol y/o un polímero. Debido a que las composiciones se prepararon mediante congelación antes del secado, son intrínsecamente diferentes en estructura y función de las espumas que se secaron sin congelación primero. Por ejemplo, tenga en cuenta las diferencias entre meramente secar una formulación y liofilizar una formulación, aún a nivel macroscópico. Las composiciones se pueden preparar, por ejemplo, mediante los métodos de la invención.

Las composiciones incluyen, por ejemplo, espuma seca reconstituida en un tampón acuoso.

Una composición puede ser una vacuna de virus *Influenza* vivo atenuado. La composición se prepara, por ejemplo, de acuerdo con los métodos de la invención.

Dicha composición puede permanecer estable en el almacenamiento a aproximadamente 25°C durante 1 año o más. La viabilidad inicial a través del proceso puede mejorarse sustancialmente manteniendo el virus en la formulación a una temperatura cerca de la temperatura de transición de fase de la membrana (por ejemplo, aproximadamente 15°C; ver la Figura 4) y/o el secado secundario a una temperatura relativamente baja (por ejemplo, 22°C).

Con respecto a los materiales bioactivos viables, los procesos específicos de la invención demostraron una capacidad para retener la viabilidad más allá del secado de espuma de la técnica anterior. Los microorganismos de célula única y virus

mostraron beneficiarse especialmente de una combinación de pretratamiento del material con polioles a aproximadamente la temperatura de transición de fase de las membranas, inicio de la espumabilidad a una baja temperatura, secado primario por sublimación, permanencia por debajo de temperaturas de transición cristalina durante el secado secundario, permanencia por debajo de aproximadamente 30°C durante el secado secundario, secado acelerado empleando vacíos más fuertes, y/o secado secundario de espumas relativamente delgadas. Usando dichos métodos, las composiciones se pueden preparar de un material bioactivo en una espuma con menos de 10 por ciento de humedad residual, mientras que retiene altos niveles de viabilidad. Por ejemplo, una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* se puede formular con un poliol y/o polímero, exponer a un vacío para generar una espuma, congelar y liofilizar, secar secundariamente a una temperatura elevada hasta aproximadamente 25°C (o menos) en el transcurso de horas o días, para producir una composición que retiene 25 por ciento, 50 por ciento, 75 por ciento, 90 por ciento o más de conteos viables de colonias que se encuentran en la formulación líquida inicial.

Las Figuras 5 y 6 muestran diagramas de los datos de estabilidad para un virus de envoltura conservado en la espuma seca de la invención y almacenado a 25°C, 37°C, y 50°C. Los diagramas de potencia (unidades de foco fluorescente por ml - FFU/ml) en función del tiempo con los datos individuales de los intervalos de tiempo como puntos o cuadrados. Las líneas de tendencia 51 e intervalos de confianza de 95% 52 indican una estabilidad predicha (no más de 1 log de pérdida de potencia) de aproximadamente 40 meses para los virus almacenados en la composición de la invención a 25°C.

Las composiciones incluyen, por ejemplo, plaquetas de sangre conservadas en almacenamiento estable como material bioactivo en una espuma seca. Las plaquetas de sangre son fragmentos citoplasmáticos a partir de megacariocitos que pueden agregarse en el sitio de las lesiones de los vasos sanguíneos para evitar el sangrado e iniciar las reparaciones. Las infusiones de plaquetas en pacientes se usan para corregir las deficiencias o disfunciones de las plaquetas circulantes como resultado de trauma, enfermedad o disfunción inducida por fármaco. Por ejemplo, los pacientes que padecen de trombocitopenia idiopática, anemia drepanocítica, y aquellos que reciben quimioterapia ablativa se pueden tratar con infusiones de plaquetas. El uso creciente de la quimioterapia ablativa para una amplia variedad de tumores malignos se ha traducido en una necesidad aumentada del reemplazo de la terapia con plaquetas. Una dificultad importante en el uso de plaquetas aisladas es su corta vida en estante. Las plaquetas sólo están aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el almacenamiento en estado líquido hasta por cinco días a temperatura ambiente, durante cuyo tiempo las propiedades funcionales se deterioran rápidamente. Esto causa muchos problemas de logística, tanto en la medicina civil como militar.

Las composiciones para la conservación de plaquetas se pueden preparar recogiendo sangre en un anticoagulante adecuado seguido de la obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) mediante cualquier método conocido en la técnica. Las plaquetas se pueden procesar de acuerdo con los métodos de la invención para producir una espuma seca estable que comprende las plaquetas. Debido a que las plaquetas son grandes y de estructura más compleja que un virus, el secado en su transición de fase característica es particularmente importante. Las plaquetas secas se pueden reconstituir mediante la resuspensión en un tampón fisiológicamente aceptable antes de la infusión. Para el uso terapéutico, el tampón es estéril. El tampón puede ser cualquier tampón de pH adecuado. Preferentemente, el tampón de reconstitución puede contener una sustancia o sustancias que presentan una alta presión osmótica coloidal, incluyendo, pero no se limitan a polietilenglicol (PEG) y almidón de hidroxietilo (HES). Preferentemente, el tampón es 1-5% de albúmina sérica humana (HSA) en solución salina. En modalidades preferidas, las plaquetas, liposomas, células animales y células vegetales se trataron con cuidado como se recomienda para otros microbios, por ejemplo, usando la temperatura de transición de fase de membrana para la infusión de agentes de protección y usando secado secundario a baja temperatura/alto vacío.

Formulaciones para la preparación de composiciones de espuma seca

Las formulaciones para la preparación de composiciones de espuma seca pueden incluir, por ejemplo, polímeros, polioles, agentes espumantes, agentes surfactantes, y/o tampones. Dichas formulaciones se pueden procesar de acuerdo con los métodos de la invención para proporcionar composiciones estables para el almacenamiento y administración de los materiales bioactivos.

Los materiales bioactivos incluyen, por ejemplo, materiales con bioactividad detectable en los sistemas vivos, células y moléculas biológicas usadas en el análisis, células biológicas y moléculas usadas en medicina, células biológicas y moléculas usadas en la investigación, y/o similares. Por ejemplo, los materiales bioactivos de las composiciones de la invención incluyen péptidos, proteínas, hormonas, ácidos nucleicos, anticuerpos, vacunas, bacterias, virus, liposomas, plaquetas, suspensiones celulares, y/o similares.

Los materiales bioactivos que comprenden membranas lipídicas en las composiciones son generalmente células, virus,

microorganismos vivos y/o atenuados, biológicamente activos, viables o no vivos, (tales como, por ejemplo, bacterias), y/o liposomas. Por ejemplo los agentes bioactivos pueden incluir vacunas, virus, liposomas, bacterias, plaquetas y/o células. Los agentes virales bioactivos pueden incluir, por ejemplo, virus influenza, virus parainfluenza, AAV, adenovirus, virus sincitial respiratorio, virus de herpes simple, virus SARS, metapneumovirus humano, miembros de la familia del virus corona, citomegalovirus, y/o virus de Epstein-Barr que pueden estar presentes en las formulaciones de la invención en cantidades que varían de aproximadamente 10^1 TCID₅₀/ml o más, de aproximadamente 10^3 TCID₅₀/ml hasta aproximadamente 10^{12} TCID₅₀/ml, o de aproximadamente 10^6 TCID₅₀/ml a aproximadamente 10^9 TCID₅₀/ml. El material bioactivo generalmente estará presente en cantidades de menos de aproximadamente 1%; con mayor preferencia, menos de aproximadamente 0,001%; y con la máxima preferencia, menos de aproximadamente 0,0001% en peso.

Las formulaciones para la preparación de composiciones de espuma seca pueden incluir, por ejemplo, sólidos totales sustanciales (componentes menos el disolvente, tal como agua). Una gran parte de los sólidos totales puede comprender el material bioactivo, un poliol, y/o un polímero. Por ejemplo, el poliol puede estar presente en la formulación en una concentración en el intervalo de aproximadamente 2 por ciento en peso a aproximadamente 50 por ciento en peso, de aproximadamente 5 por ciento en peso a aproximadamente 45 por ciento en peso, o de aproximadamente 20 por ciento en peso a aproximadamente 40 por ciento en peso. En otro ejemplo, el polímero puede estar presente en la formulación en una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 por ciento en peso a aproximadamente 10 por ciento en peso, o aproximadamente 5 por ciento en peso. Preferentemente, la formulación debe tener un alto contenido de sólidos antes de iniciar la espumabilidad; típicamente entre aproximadamente 5% y 70%, o entre aproximadamente 30% a 50%. La viscosidad de las formulaciones de la invención son típicamente mayores de 5 centipoises (cP); con mayor preferencia, mayor que 10 cP. Una formulación preferida presenta ~ 12 cP.

Los polioles pueden incluir, por ejemplo, varios azúcares, carbohidratos, y alcoholes. Por ejemplo, los polioles pueden incluir azúcares no reductores, sacarosa, trehalosa, melezitosa, sorbosa, y/o rafinosa. Los polioles pueden incluir, por ejemplo, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa, manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol, glicerina, o L-gluconato. Cuando se desea que la formulación se congele-descongele de forma estable, el poliol es preferentemente uno que no cristaliza a temperaturas de congelación (por ejemplo -20°C) tal que desestabiliza el material biológicamente activo en la formulación. Puede ser beneficioso incluir dos o más polioles diferentes para inhibir la formación de cristales.

Los polímeros pueden incluir, por ejemplo, varios carbohidratos, polipéptidos, moléculas hidrofílicas de cadena lineal y ramificada. Por ejemplo, los polímeros de la formulación pueden incluir gelatina, gelatina hidrolizada, ovoalbúmina, polivinilpirrolidona, colágeno, sulfato de condroitina, un polisacárido siálico, actina, miosina, microtúbulos, dineína, quinetina, o albúmina sérica humana. Estos aditivos no necesariamente estabilizan sólo el material biológicamente activo contra la inactivación; también pueden ayudar a evitar el colapso físico del material liofilizado durante la liofilización y posterior almacenamiento en estado sólido. Otros sustitutos de gelatina que pueden funcionar también como estabilizantes incluyen colágeno nativo y alginato.

Preferentemente, se usa gelatina, y con mayor preferencia, gelatina hidrolizada. La "gelatina hidrolizada" se refiere a la gelatina que se sometió a una hidrólisis parcial para producir una gelatina parcialmente hidrolizada que tiene un peso molecular entre aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 50 kDa, o aproximadamente 3 kDa. Este producto de la hidrólisis de gelatina tiene aproximadamente la misma composición de aminoácidos que la gelatina. La composición de aminoácidos típica de la gelatina hidrolizada se conoce. La gelatina parcialmente hidrolizada se puede obtener a partir de cualquier número de fuentes comerciales. La gelatina parcialmente hidrolizada se puede obtener también por hidrólisis enzimática de la gelatina por medio de una enzima proteolítica, tal como, por ejemplo, papaína, quimopapaína, bromelina, aunque otros medios de hidrólisis conocidos se puede emplear, por ejemplo, hidrólisis ácida. Preferentemente, se usa una gelatina que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1 kDa y 50 kDa. La gelatina hidrolizada de aproximadamente 3 kDa o menos pueden ser menos alergénica que la gelatina completa. La gelatina se puede derivar de una variedad de fuentes, incluyendo porcina y bovina. El colágeno humanizado así como el colágeno altamente procesado, por ejemplo, FreAlagin, una gelatina farmacéutica con alergenicidad reducida, disponible de Miyagi Chemical Industrial Co, Ltd., se pueden usar. De nuevo, la cantidad de gelatina usada en la formulación variará en función de la composición completa de la formulación y su uso previsto. Generalmente, la concentración de gelatina será de aproximadamente 1 a aproximadamente 7%; con mayor preferencia, entre aproximadamente 1 y 5%. Una formulación preferida comprende aproximadamente 5% gelatina.

Las formulaciones para la preparación de las composiciones pueden incluir, por ejemplo, uno o más surfactantes para ayudar en la solubilidad y estabilidad de los componentes de la formulación; y para ayudar a formar y estabilizar la espuma. Los surfactantes pueden incluir, por ejemplo, detergentes no iónicos, tales como monolaurato de polietilenglicol sorbitán

(Tween 20), monooleato de polioxietilenosorbitano (Tween 80), copolímeros en bloques de polietileno y polipropilenglicol (Pluronic), y/o similares. Las formulaciones pueden incluir detergentes iónicos. Las formulaciones y composiciones pueden incluir surfactantes, tales como, por ejemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, copolímeros en bloque polietileno glicol/polipropileno glicol, éteres de alquilo de polietileno glicol, éteres de alquilo de polipropileno glicol, copolímeros en bloque de éteres de polietileno glicol/polipropileno glicol, alquilarylsulfonatos, fenilsulfonatos, sulfatos de alquilo, sulfonatos de alquilo, sulfatos de éteres de alquilo, sulfato de éteres de aril alquilo, fosfatos de éteres de poliglicol alquilo, fosfatos de éteres de poliarilo fenilo, alquilsulfosuccinatos, sulfonatos de olefina, sulfonatos de parafina, sulfonatos de petróleo, tauridas, sarcósidos, ácidos grasos, ácidos alquilnaftalenosulfónico, ácidos naftalenosulfónicos, ácidos lignosulfónicos, o condensados de naftalenos sulfonados con formaldehído y fenol, licor de desecho de lignina-sulfito, fosfatos de alquilo, compuestos de amonio cuaternario, óxidos de amina, betainas, y/o similares. Los surfactantes pueden estar presentes en la formulación en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,001 por ciento en peso a aproximadamente 2 por ciento en peso, o aproximadamente 0,01 por ciento en peso a aproximadamente 1 por ciento en peso.

Los tampones se pueden presentar, por ejemplo, para controlar pH, aumentar la estabilidad, afectar la solubilidad componente, proporcionar comodidad en la administración, y similares, en formulaciones para la preparación de composiciones de espuma seca. El pH de la formulación puede controlarse en el intervalo de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10, de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 8, o aproximadamente pH 7,2. Los tampones preferidos se aparean frecuentemente con formas de ácido y sal de un tampón aniónico generalmente reconocido como seguro para la vía particular de administración del material bioactivo. Los tampones típicos para uso en las formulaciones y composiciones incluyen, por ejemplo, fosfato de potasio, fosfato de sodio, acetato de sodio, citrato de sodio, histidina, imidazol, sodio, succinato, bicarbonato de amonio, carbonatos, y similares.

En una modalidad, la formulación contiene los agentes anteriormente identificados (es decir, material biológicamente activo, poliol, agente surfactante, y gelatina) y está esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenólico, m-cresol, clorobutanol, y cloruro benetonio). En otra modalidad, un conservante se puede incluir en la formulación, particularmente cuando la formulación es una formulación multidosis.

Uno o más vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ta Edición, Osol, A. Editor (1980) se pueden incluir en la formulación, proporcionando que no afecten negativamente las características deseadas de la formulación. Los vehículos aceptables, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos a los receptores de las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen; agentes tamponantes adicionales; co-solventes; contraiones formadores de sales tales como potasio y sodio; antioxidantes, tales como metionina, N-acetil cisteína, o ácido ascórbico; agentes quelantes, tales como EDTA o EGTA. Los aminoácidos, tales como, por ejemplo, arginina y metionina pueden incluirse en las formulaciones. La arginina puede estar presente en las formulaciones en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,1 por ciento en peso a aproximadamente 5 por ciento en peso. La metionina puede estar presente en la formulación en una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM o aproximadamente 10 mM. El glicerol puede estar presente en la formulación en una concentración en el intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 por ciento en peso a aproximadamente 5 por ciento en peso, o aproximadamente 1 por ciento en peso. EDTA puede estar presente en la formulación en una concentración en el intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, o aproximadamente 5 mM.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar pero no limitan la invención reivindicada.

EJEMPLO 1

Conservación de virus vivo atenuado

Este ejemplo describe una composición que mantiene la integridad y estabilidad de la proteína después del almacenamiento a 37°C durante 125 días.

El virus influenza monovalente atenuado vivo B/Harbin (lote CAZ039) se formuló como una solución de título 8,0 log FFU/ml (-10 microgramos/ml de concentración de proteína total de la solución madre viral) que conteniendo 40% de sacarosa, 5% de gelatina, 0,02% de Pluronic F68, 25 mM de tampón KPO₄ pH 7,2. Las alícuotas de un ml de esta solución se dispensaron después en viales de vidrio de liofilización de 10 ml, parcialmente cubiertos con tapones de liofilización, y se liofilizaron usando un liofilizador VirTis Genesis 25EL (disponible de VirTis, Gardiner, Nueva York) de acuerdo con las siguientes condiciones de ciclo:

- 1) Pre-enfriar los estantes a 15°C (con desecante en el estante del liofilizador con el condensador ajustado a -60°C);
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar por 30 minutos;
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener durante 60 minutos;
- 5) Elevar a 33°C a aproximadamente 0,7°C/minuto;
- 6) Mantener durante 48 horas; y
- 7) Taponear los viales.

La espuma resultante tenía un contenido de humedad de aproximadamente 2,2% (p/p) y una Tg de aproximadamente 43°C.

EJEMPLO 2

Formulaciones

Las siguientes formulaciones se prepararon de acuerdo con los métodos de esta invención usando virus influenza B/Harbin o placebo. Los pH de las formulaciones se ajustaron con hidróxido de sodio o hidróxido de potasio.

ID	Glutamato	Poliol	Aditivo de polímero	Surfactante	Otro
AVS1	20%	10% sacarosa	5% gelatina	0,1% Pluronic F68	2% arginina, 5 mM EDTA, 10 mM metionina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS2	20%	10% sacarosa	-	0,1% Pluronic F68	5% arginina, 5 mM EDTA, 10 mM metionina, 50 mM tampón KPO4 7,2,
AVS3	25%	15% sacarosa	-	0,1 % Pluronic F68	5% arginina, 5 mM EDTA, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS4	25%	15% sacarosa	--	0,1% Pluronic F68	5% arginina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS5	25%	5% sacarosa	--	0,1% Pluronic F68	5% arginina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS1A	20	10% sacarosa	5% gelatina	0,1% Pluronic F68	2% arginina, 5 mM EDTA, 10 mM metionina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS2A	20	10% sacarosa		0,1% Pluronic F68	5% arginina, 5 mM EDTA, 10 mM metionina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS3A	25	15% sacarosa		0,1% Pluronic F68	5% arginina, 5 mM EDTA, 10 mM metionina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS4A	25	15% sacarosa		0,1% Pluronic F68	5% arginina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS5A	25	5% sacarosa		0,1% Pluronic F68	5% arginina, 50 mM tampón KPO4 7,2
		sacarosa			
AVS6	20	10% sacarosa	5% gelatina	0,1% Pluronic F68	2% arginina, 5 mM EDTA, 10 mM metionina
AVS7	20	10% sacarosa		0,1% Pluronic F68	5% arginina, 5 mM EDTA, 10 mM metionina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS8	25	15% sacarosa		0,1% Pluronic F68	5% arginina, 5 mM EDTA, 10 mM metionina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS9	25	15% sacarosa		0,1% Pluronic F68	5% arginina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS10	25	5% sacarosa		0,1% Pluronic F68	5% arginina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS11	10%	20% sacarosa; 10% rafinosa		0,2% Pluronic F68	1% arginina, 50 mM tampón KPO4 7,2

ES 2 393 160 T3

ID	Glutamato	Poliol	Aditivo de polímero	Surfactante	Otro
AVS12	20	20% rafinosa		0,2% Pluronic F68	1% arginina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS13	25	10% sacarosa; 2% rafinosa		0,2% Pluronic F68	5% arginina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS14	20	10% sacarosa		0,2% Pluronic F68	10 mM metionina, 50 mM tampón KPO4 7,2
AVS15	20	10% sacarosa	1% gelatina	0,2% Pluronic F68	10 mM metionina
AVS16	20	10% sacarosa	1% gelatina	0,2% Pluronic F68	10 mM metionina
AVS17	20	2% rafinosa	1% gelatina	0,2% Pluronic F68	10 mM metionina,
AVS18	20	10% rafinosa		0,2% Pluronic F68	10 mM metionina
AVS19	20	10% sacarosa		0,2% Pluronic F68	10 mM metionina, 100 mM tampón citrato 7,0
AVS20	20	10% sacarosa	1% gelatina	0,2% Pluronic F68	10 mM metionina, 100 mM tampón citrato 7,0
AVS21	20	10% sacarosa, 2% rafinosa	1% gelatina	0,2% Pluronic F68	10 mM metionina, 100 mM tampón citrato 7,0
AVS22	20	2%	1% gelatina	0,2% Pluronic	10 mM metionina,
		rafinosa		F68	100 mM tampón citrato 7,0
AVS23	20	10% rafinosa		0,2% Pluronic F68	10 mM metionina, 100 mM tampón citrato 7,0
AVS24	20	10% sacarosa, 5% rafinosa	5% gelatina	0,1% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS25	20	15% sacarosa	5% gelatina	0,1% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS26	20	15% rafinosa	5% gelatina	0,1% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS27	20	10% sacarosa, 5% rafinosa		0,1% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS28	20	10% sacarosa, 5% rafinosa	5% gelatina	0,1% Pluronic F68	2% ovalbúmina, 10 mM metionina, 5 mM tampón KPO4 7,2
AVS29		40% rafinosa	5% gelatina	0,1% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS30	10	40% sacarosa	5% gelatina	0,1 % Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS31	10	40% sacarosa	5% gelatina	0,1% Pluronic F68	10 mM metionina, 5 mM tampón KPO4 7,2, 1% glicerol
AVS32	20	15% sacarosa	5% gelatina	0,1% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS33	20	15% sacarosa	1% gelatina	0,1% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS34	20	15% sacarosa		0,1% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2

ES 2 393 160 T3

ID	Glutamato	Poliol	Aditivo de polímero	Surfactante	Otro
AVS35	20	20% sacarosa	5% gelatina	0,1% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS36	20	20% sacarosa		0,1% Pluronic F68	2% ovalbúmina, 10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS37	10	20% sacarosa,		0,1 % Pluronic F68	1% arginina, 10 mM metionina, 25 mM
		10% rafinosa			tampón KPO4 7,2
AVS38	20	20% sacarosa	1% gelatina	0,2% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS39	20	20% sacarosa	5% gelatina	0,005 % Tween 20	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS40	20	20% sacarosa		0,005 % Tween 20	2% ovalbúmina, 10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS41	10	40% sacarosa	5% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS42	10	40% sacarosa	5% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 5 mM tampón KPO4 7,2, 1% glicerol
AVS43		40% sacarosa	5% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS44		40% sacarosa	5% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 5 mM tampón KPO4 7,2, 1% glicerol
AVS45	10	40% sacarosa	5% gelatina		10 mM metionina, % glicerol
AVS46		50% sacarosa	1 % Gelatina		10 mM metionina, 5 mM tampón KPO4 7,2, 1% glicerol
AVS47	10	40% sacarosa	5% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2, 1 % glicerol
AVS48		40% sacarosa, 5% trehalosa	5% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 5 mM tampón KPO4 7,2, 1% glicerol
AVS49		40% sacarosa	3% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS50		40% sacarosa	1% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS51		40% sacarosa		0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS52		40% sacarosa	5% gelatina		10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS53		40% sacarosa	5% gelatina	0,02% Pluronic F68	25 mM tampón KPO4 7,2
AVS54		40% sacarosa	5% gelatina		25 mM tampón KPO4 7,2
AVS55		20% sacarosa	5% gelatina	0,02 % Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS56		10% sacarosa	5% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2

ID	Glutamato	Poliol	Aditivo de polímero	Surfactante	Otro
AVS57		40% sacarosa		0,02% Pluronic F68	5% ovalbúmina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS58A		40% sacarosa	5% Gelatina (Sigma AD)	0,02% Pluronic F68	25 mM tampón KPO4 7,2
AVS58B		40% sacarosa	5% Gelatina Sigma (R)	0,02% Pluronic F68	25 mM tampón KPO4 7,2
AVS59		40% sacarosa	5% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS60		40% sacarosa	5% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS61		20% sacarosa	2,5% gelatina	0,01 % Pluronic F68	5 mM metionina, 12,5 mM tampón KPO4 7,2
AVS62		40% sacarosa		0,02% Pluronic F68	5% arginina, 10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS63		40% sacarosa		2,5% PEG 1000, 0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS64		40% sacarosa		2,5% PVP 10,000, 0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS65		40% sacarosa		2,5% Ficoll 400K, 0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS66		20% sacarosa	2% gelatina	0,02% Pluronic F68	10 mM metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS67		40% sacarosa	5% gelatina	0,02% Pluronic F68	1% metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS68		20% sacarosa	2% gelatina	0,02% Pluronic F68	1% metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS69		40% sacarosa		0,02% Pluronic F68	5% arginina, 1% metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2
AVS70		20% sacarosa		0,02% Pluronic F68	5% arginina, 1% metionina, 25 mM tampón KPO4 7,2

La termoestabilidad de las formulaciones anteriores después del almacenamiento posterior a la liofilización se midió a 37°C o 50°C. La termoestabilidad aumentada se puede observar según se muestra como una disminución en la velocidad de pérdida de potencia, medida como el log FFU/ml o TCID₅₀/ml. El tiempo necesario para una pérdida del orden de un log en FFU/ml se proporcionan a continuación para varias formulaciones de la invención:

5

Formulación	Estabilidad a 37°C
AVS43	125 días
AVS41	97 días
AVS44	142 días
AVS30	93 días
AVS31	48 días

Formulación	Estabilidad a 37°C
AVS42	146 días

EJEMPLO 3

Condiciones de secado de la espuma

5

Las formulaciones se prepararon usando las siguientes condiciones de la cámara de liofilización/secado:

Ciclo 1:

10

- 1) Pre-enfriar los estantes a 25°C;
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar;
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener por 30 minutos;
- 5) Elevar a 45°C;
- 15 6) Mantener durante 1 hora;
- 7) Ajustar la temperatura a 37°C y mantener por 1 h ora; y
- 8) Taponear los viales.

Ciclo 2:

20

- 1) Pre-enfriar los estantes a 30°C;
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar;
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener por 2 horas;
- 25 5) Elevar a 37°C;
- 6) Mantener por 16 horas; y
- 7) Taponear los viales.

Ciclo 3:

30

- 1) Pre-enfriar los estantes a 15°C;
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar;
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener por 60 minutos;
- 35 5) Elevar a 37°C;
- 6) Mantener por 20 horas; y
- 7) Taponear los viales.

Ciclo 4:

40

- 1) Pre-enfriar los estantes a 12°C;
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar;
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener por 25 minutos;
- 45 5) Elevar a 33°C;
- 6) Mantener por 24 horas; y
- 7) Taponear los viales.

Ciclo 5:

50

- 1) Pre-enfriar los estantes a 17°C;
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar por 10 minutos;
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener por 60 minutos;
- 55 5) Elevar a 37°C;

- 6) Mantener por 48 horas;
- 7) Elevar a 40°C;
- 8) Mantener por 48 horas; y
- 9) Taponear los viales.

5

Ciclo 6:

- 1) Pre-enfriar los estantes a 20°C;
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar;
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener por 60 minutos;
- 5) Elevar a 33°C;
- 6) Mantener por 72 horas; y
- 7) Taponear los viales.

10

15

Ciclo 7:

- 1) Pre-enfriar los estantes a 15°C;
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar;
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener por 60 minutos;
- 5) Elevar a 25°C;
- 6) Mantener por 72 horas; y
- 7) Taponear los viales.

20

25

Ciclo 8:

- 1) Pre-enfriar los estantes a 7°C;
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar;
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener por 120 minutos;
- 5) Elevar a 20°C;
- 6) Mantener por 72 horas; y
- 7) Taponear los viales.

30

35

Ciclo 9:

- 1) Pre-enfriar los estantes a 15°C;
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar por 30 minutos;
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener por 60 minutos;
- 5) Elevar a 33°C;
- 6) Mantener por 48 horas; y
- 7) Taponear los viales.

40

45

Ciclo 10:

- 1) Pre-enfriar los estantes a 15°C;
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar por 30 minutos;
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener por 18 horas;
- 5) Elevar a 25°C a 0,2°C/min;
- 7) Mantener por 5 horas;
- 8) Elevar a 33°C a 0,2°C/min;
- 9) Mantener por 19 horas; y
- 10) Taponear los viales.

50

55

Ciclo 11:

- 1) Pre-enfriar los estantes a 7°C;
- 2) Cargar los viales y dejarlos equilibrar
- 3) Ajustar el vacío a 50 mtorr;
- 4) Mantener por 3 horas;
- 5) Elevar a 15°C a 0,2°C/min;
- 6) Mantener por 16 horas;
- 7) Elevar a 25°C a 0,2°C/min;
- 8) Mantener por 2 horas;
- 9) Elevar a 33°C a 0,2°C/min;
- 10) Mantener por 27 horas; y
- 11) Taponear los viales.

EJEMPLO 4**Formulaciones**

El ciclo de secado que se muestra en el Ejemplo 1 se empleó para estabilizar el virus vivo influenza B/Harbin. La siguiente tabla resume los perfiles de estabilidad observado de estas formulaciones después del almacenamiento durante diez meses a 25°C:

Formulación	tampón KPO4	Sacarosa	Gelatina	Metionina	Pluronic	Pendiente	Meses	PROCESO
	pH 7,2 (mM)	(%)	(%)	(mm)	F68	a 25°C	a 1 log	pérdida
					(%)		FFU/ml	(Log
							pérdida	FFU/ml)
AVS068	25	10	0	0	0,02	-0,167	6	0,20
AVS071	25	10	0	10	0	-0,245	4,1	0,13
AVS072	25	10	0	66,7	0,2	-0,047	21,4	0,37
AVS073	25	10	2	0	0,2	-0,089	11,2	0,63
AVS074	25	10	2	10	0,02	-0,056	17,8	1,13
AVS075	25	10	2	66,7	0	-0,154	6,5	0,43
AVS076	25	10	5	0	0	-0,145	6,9	0,67
AVS077	25	10	5	10	0,2	-0,008	121,2	0,47
AVS078	25	10	5	66,7	0,02	-0,050	20,0	0,27
AVS079	25	10	5	66,7	0,2	-0,043	23,1	0,83
AVS080	25	20	0	0	0	-0,132	7,6	0,50
AVS081	25	20	0	10	0,02	-0,060	16,8	0,53
AVS082	25	20	0	66,7	0,2	-0,045	22,4	0,07
AVS083	25	20	2	0	0,02	-0,040	24,9	2,27
AVS084	25	20	2	10	0	-0,096	10,4	0,33
AVS085	25	20	2	66,7	0,2	-0,040	25,0	0,43
AVS086	25	20	5	0	0,2	-0,022	44,6	0,30
AVS087	25	20	5	10	0,2	-0,005	200,4	0,40
AVS088	25	20	5	66,7	0	-0,060	16,7	-0,07
AVS089	25	20	5	66,7	0,02	-0,022	44,5	0,67

Formulación	tampón KPO4	Sacarosa	Gelatina	Metionina	Pluronic	Pendiente	Meses	PROCESO
	pH 7,2 (mM)	(%)	(%)	(mm)	F68	a 25°C	a 1 log	pérdida
					(%)		FFU/ml	(Log
							pérdida	FFU/ml)
AVS090	25	40	0	0	0,2	-1,283	0,8	0,63
AVS091	25	40	0	10	0,2	-1.117	0,9	0,77
AVS092	25	40	0	66,7	0	-0,120	8,3	0,50
AVS093	25	40	0	66,7	0,02	-0,033	30,2	0,73
AVS094	25	40	2	0	0	-0,116	8,6	0,83
AVS095	25	40	2	10	0,2	-0,016	63,8	0,47
AVS096	25	40	2	66,7	0,02	-0,030	33,2	0,80
AVS097	25	40	2	66,7	0,2	-0,017	58,1	0,27
AVS053s	25	40	5	0	0,02	-0,022	44,6	0,47
AVS098	25	40	5	0	0,2	-0,023	43,4	0,37
AVS052b	25	40	5	10	0	-0,087	11,6	0,67
AVS043c	25	40	5	10	0,02	-0,037	27,2	0,77
AVS099	25	40	5	66,7	0	-0,067	15,0	0,40

EJEMPLO 5

Procesos que proporcionan alta viabilidad

En experimentos anteriores, se observó que las pérdidas del proceso de viabilidad de virus y bacterias fueron típicamente mayores para el secado por congelación de espuma que para la liofilización estándar con la misma fórmula. Suponemos que la diferencia se deba a las principales diferencias en los procesos: la espumosis y ebullición de las etapas de pre-secado antes de congelar en el proceso de congelación de espuma en comparación con el procedimiento de liofilización estándar. Los experimentos se llevaron a cabo para investigar y caracterizar los procesos de pérdidas de viabilidad con las etapas de procesamiento, tiempo, temperatura y sequedad.

Listeria monocytogenes se procesó en una formulación a base de sacarosa a través de la secuencia de congelación en seco de la espuma con extracción de muestras para su análisis en los puntos clave.

La Figura 9 muestra un diagrama de temperaturas de viales en función de la fracción de masa de sacarosa (nivel de sequedad) durante todo el proceso. Los viales de una formulación de *Listeria* se colocaron en una cámara controlada de presión y temperatura. El proceso comenzó **80** con la *Listeria* en una formulación de aproximadamente 30% de sacarosa a 15°C. La formulación se expandió para producir una espuma en una etapa de espumosis **81**. La espuma se congeló después **82** y eliminó el agua por evaporación y sublimación en una etapa primaria de secado a una temperatura de anaquel de 15 °C **83**. Cuando aproximadamente 25% de humedad se mantuvo, la etapa de secado secundario **84** se aceleró elevando la temperatura de la cámara rápidamente a aproximadamente 33°C, como durante nuestra liofilización estándar sin-espuma. El secado secundario continuó hasta que la humedad residual fue de aproximadamente 3% **85**. Las muestras fueron tomadas en varios puntos durante el proceso de conteo de colonias de *Listeria*.

Para nuestra sorpresa, muy poco de la pérdida de la viabilidad en el proceso de congelación de espuma se debió a las etapas iniciales de espumosis y congelación, únicas en el proceso de congelación de espuma. Así, no fueron inesperadamente una causa sustancial de la diferencia de viabilidad entre los procesos de liofilización con espuma y sin espuma. Debido a que las temperaturas de secado empleadas fueron relativamente bajas en comparación con muchas etapas de secado secundario de la liofilización en la industria, y la misma para la congelación de espuma como para los procesos estándares de liofilización, no esperábamos que el secado fuera un factor importante en las diferencias de

viabilidad entre los procesos. De nuevo, nos sorprendimos debido a que las principales pérdidas de viabilidad durante la congelación de espuma se asociaron con el secado secundario (aproximadamente $-1.5 \log_{10}$). Tenemos la teoría de que las pérdidas se debieron a una combinación del calor y estrés de desecación en el tiempo; aun cuando estas temperaturas no fueron problemáticas en una liofilización estándar.

El experimento se repitió, esta vez con la temperatura de anaquel del secado primario a 15°C que se extiende a través de la etapa de secado secundario durante un tiempo suficiente para reducir la humedad residual por debajo de 10%. Aquí, se tomó aproximadamente de 4 a 5 horas a 15°C para alcanzar 10% de humedad residual. En general, el secado primario y secundario a 15°C continuó durante aproximadamente 16 horas hasta alcanzar una humedad residual de aproximadamente 7%. A continuación, una etapa final de secado incluyó un incremento gradual de temperaturas hasta 33°C. Como se muestra en la Figura 10, las pérdidas de viabilidad asociadas con el secado por congelación de espuma se deben principalmente a la elección de las temperaturas de secado secundario que atraviesa hasta el punto de humedad residual de 10%. El tiempo de procesamiento y niveles finales de desecación se encontraron para tener una influencia relativamente menor sobre la viabilidad en los procesos de secado por congelación de espuma.

Las principales diferencias entre el secado por congelación de espuma y los procesos estándares de liofilización fueron el secado de espumosis y ebullición por convección que se produce antes de la congelación, y el prolongado tiempo de secado secundario en el proceso de congelación-espuma. Estos experimentos proporcionaron un resultado sorprendente de que estos factores no son los principales contribuyentes a las pérdidas de viabilidad observadas en las comparaciones de los procesos de congelación de espuma y liofilización estándar. Este experimento identificó una variable entre muchas, que tiene una influencia predominante sobre el resultado de la viabilidad. Reduciendo las temperaturas del secado secundario durante el secado de congelación de espuma secado, encontramos que se pueden obtener viabilidades comparables como para la liofilización estándar.

EJEMPLO 6

Sistema para el secado secundario rápido a baja temperatura

Como se describió anteriormente, los procesos de conservación por congelación de espuma pueden beneficiar proporcionando temperaturas más bajas durante las etapas de secado secundario. Sin embargo, esto puede conducir a tiempos de procesamiento más largos que pueden afectar a la productividad de fabricación. Los ejemplos siguientes identifican elementos del sistema que pueden acelerar el secado secundario a baja temperatura usado en determinado proceso de secado por congelación de espuma de la invención.

La relación de superficie a volumen de los materiales de espuma liofilizada puede ser relativamente baja en comparación con, por ejemplo, muchos procesos de liofilización o secado por pulverización. Esta desventaja puede ser especialmente problemática cuando una espuma congelada profunda o gruesa se debe secar en un recipiente sustancialmente cerrado, tal como un vial de liofilización. Creemos secado secundario a bajas temperaturas de secado secundario puede realizarse a escalas de tiempo prácticos y resultar en alta viabilidad de virus y microorganismos, por ejemplo, reduciendo la interferencia del recipiente con el secado y/o reduciendo la distancia que el agua tiene que viajar para salir de la espuma.

Los sistemas se pueden diseñar para acelerar el secado a baja temperatura de las espumas congeladas. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 11, los sistemas pueden incluir una cámara de control ambiental **110**, por ejemplo, proporcionando control de las temperaturas y presiones internas. Dentro de la cámara puede estar una formulación de material bioactivo **111** (solución líquida y/o suspensión) para la espumosis y congelación. La formulación se puede disponer sobre una superficie **112**. Aunque la superficie puede ser la superficie interior de un recipiente, no se prefiere una superficie interior de un recipiente para el secado más rápido. La presión interna de la cámara se puede reducir para expandir la formulación dentro de la espuma **113**. La espuma puede congelarse, por ejemplo, por la exposición a una atmósfera interna refrigerada, enfriamiento por evaporación, y/o refrigeración de la superficie **112**. En modalidades preferidas, la espuma congelada tiene un espesor **114** menos de aproximadamente 10 mm, menos de 5 mm, menos de 2 mm, aproximadamente 1 mm o menos. La espuma delgada, directamente expuesta al ambiente interior de la cámara sin la interferencia de un recipiente, puede progresar rápidamente durante el secado secundario a 10% de humedad residual o menos.

En los sistemas de la invención, la espuma congelada se puede liofilizar y secar secundariamente ya sea por lote o modo continuo, por ejemplo, en una superficie de un gran recipiente, una placa, una banda, o un tambor **115**. En el sistema de procesamiento continuo mostrado, la formulación se puede aplicar por pulverización de una capa sobre una superficie del tambor. La capa se puede expandir a una capa de espuma mediante un vacío interno. La espuma se puede congelar en la superficie con el secado primario que puede ser por liofilización. El tambor puede girar y transferir calor dentro o fuera de la

capa según se desee, en diferentes puntos a lo largo de la rotación, por ejemplo, por el contacto con los intercambiadores de calor, corrientes de gas de temperatura controlada, luz infrarroja, dispositivos termoelectrónicos y/o similares. Por ejemplo, en un punto a lo largo de la superficie del tambor, donde se completa la espumabilidad, la superficie del tambor se puede enfriar para congelar la espuma. La superficie se puede calentar entonces ligeramente en otros puntos a lo largo de las posiciones de rotación del tambor para reemplazar la pérdida de calor por sublimación. Además de otros puntos a lo largo de la rotación del tambor, en el secado secundario se puede aplicar calor adicional a la superficie para mantener, por ejemplo, aproximadamente 25°C para eliminar la humedad residual. Finalmente, el producto de material bioactivo seco en espuma congelada se puede cosechar del tambor, por ejemplo, por desguace.

Como alternativa, la aplicación, espumabilidad, congelación, secado primario, secado secundario y cosecha puede producirse en un proceso de secuencia de lotes en la superficie de todo el proceso. Por ejemplo, la formulación se puede verter o rociar sobre una placa o el fondo de un gran recipiente de boca abierta para formar una capa delgada. La lámina se puede colocar en una cámara de control ambiental y la formulación se puede expandir a una espuma fina (por ejemplo, 1 mm a 10 mm) por una reducción de presión. La espuma se puede congelar por una combinación de pérdida de calor latente y conducción del calor fuera de la espuma. El secado primario puede ser por sublimación con el calor latente reemplazado de la atmósfera comprendida de la cámara de temperatura controlada. El secado secundario puede incluir la exposición de la espuma a una atmósfera de 15-25°C durante un tiempo necesario para obtener 5% de humedad relativa. La espuma se puede cosechar rompiendo la hoja de espuma en partículas y vertiendo en recipientes convencionales para el almacenamiento.

EJEMPLO 7

Secado prolongado a baja temperatura

La viabilidad de *Listeria* se aumentó a través del secado al vacío prolongado a baja temperatura bien en, o durante, la etapa secundaria.

Como se muestra en la Figura 12A, la viabilidad de *Listeria monocytogenes* se mantiene relativamente estable durante el secado primario y secundario a una temperatura de cámara de 15°C. Sin embargo, en el final del secado secundario, se aceleraron las pérdidas de viabilidad a 33°C.

Simplemente extendiendo la temperatura de secado de 15°C hasta el final del secado, como se muestra en la Figura 12B, los altos niveles de viabilidad se retuvieron, aún a través de un nivel de humedad residual de aproximadamente 5%.

EJEMPLO 8

Secado secundario escalonado

La viabilidad de *Listeria* se aumentó durante el secado secundario de vacío prolongado a baja temperatura con el secado completo usando aumentos escalonados de temperatura.

Como se muestra en la Figura 13, *Listeria*, se pueden conservar con el secado primario y secundario temprano a aproximadamente 7°C, seguido del secado secundario adicional a 15°C. Este secado por etapas proporcionó una alta viabilidad mediante aproximadamente 7% de humedad residual en un tiempo de procesamiento práctico. El secado secundario adicional a aproximadamente 25°C y, finalmente, aproximadamente 33°C no reducen sustancialmente la viabilidad, por ejemplo, en comparación con el secado de 33°C mostrado en la Figura 12A. De esta forma, el secado de menos del 5% de humedad residual se llevó a cabo reteniendo mientras la alta viabilidad, aún con una etapa de secado final de 33°C.

EJEMPLO 9

Efecto de la matriz no cristalina en la viabilidad

Listeria se preservó en matrices de poliol secadas a continuación y por encima de la Tg de matriz sin cambiar sustancialmente la viabilidad del microbio.

Listeria se secó por congelación de espuma en una formulación de sacarosa (pura Tg 34,5°C) y en una formulación de trehalosa (pura Tg 53,9). Las formulaciones se secaron en viales a temperaturas que pasan por encima de la Tg de la

formulación de sacarosa, pero permanecieron por debajo de la Tg de la formulación de trehalosa, como se muestra en el diagrama de la Figura 14, la viabilidad de la *Listeria* durante los pasos del proceso y en el producto seco final no fue apreciablemente influenciado al no ser por la matriz que se mantuvo en un estado cristalino durante el proceso de secado.

- 5 Se entiende que los ejemplos y modalidades descritas en la presente descripción son para propósitos ilustrativos solamente y que, a la luz de lo anterior, varias modificaciones o cambios serán sugeridos a las personas con experiencia en la técnica y deben incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.
- 10 Aunque la invención anterior se ha descrito con algunos detalles con el propósito de dar claridad y entendimiento, será evidente para una persona con experiencia en la técnica, a partir de la lectura de esta descripción, que se pueden realizar varios cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance verdadero de la invención. Por ejemplo, las formulaciones, técnicas y aparatos descritos anteriormente pueden usarse en varias combinaciones.

15

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparar una composición de espuma seca que comprende un material bioactivo, cuyo método comprende:
5 preparar una formulación que comprende el material bioactivo, y un poliol o polímero, en un disolvente;
expandir la formulación en una espuma;
congelar la espuma;
10 secar primariamente la espuma congelada por sublimación a una temperatura de espuma de 0°C o menos; y,
secar secundariamente la espuma en un ambiente con una temperatura de 25°C o menos durante un tiempo suficiente para reducir la espuma hasta una humedad residual de 10 por ciento o menos.
2. El método de la Reivindicación 1, en donde:
15 el material bioactivo comprende un virus o bacteria; o
el material bioactivo comprende una bacteria Listeria o cepa de Influenza.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el método comprende además mantener la formulación dentro de 2°C de una temperatura de transición de fase de membrana del virus o bacteria.
4. El método de la Reivindicación 1, en donde:
20 la espuma tiene un espesor de 2 mm o menos;
una temperatura de secado secundario se mantiene por debajo de la temperatura de transición cristalina de la espuma;
el secado primario o secado secundario comprende la liofilización a una presión de 100 torr o menos, o
25 la espuma se seca durante un tiempo suficiente para reducir la espuma a una humedad residual del 5 por ciento o menos.
5. El método de la Reivindicación 1, que además comprende:
30 moler la espuma seca a un polvo con un tamaño promedio de partícula de aproximadamente 0,1µm a aproximadamente 100 µm; o
reconstituir la espuma en el líquido o moler la espuma en polvo para la administración a un mamífero.
6. Un método de preparar una composición de espuma seca que comprende un material bioactivo, cuyo método comprende:
35 preparar de una formulación que comprende el material bioactivo, y un poliol o un polímero, en un disolvente;
expandir la formulación en una espuma;
congelar la espuma;
secar primariamente la espuma por sublimación a una temperatura en donde la espuma se congela o mantiene por debajo de la temperatura de transición cristalina de la espuma; y,
40 secar secundariamente la espuma en un ambiente con una temperatura de 25°C o menos durante un tiempo suficiente para reducir la espuma hasta una humedad residual de 10 por ciento o menos.
7. El método de la Reivindicación 6, en donde:
45 el material bioactivo comprende un virus o bacteria; o
el material bioactivo comprende una bacteria Listeria o cepa de Influenza.
8. El método de la reivindicación 7, que comprende además mantener la formulación dentro de 2°C de una temperatura de transición de fase de membrana del material bioactivo durante 2 minutos antes de expandir la espuma.
9. El método de la Reivindicación 6, en donde:
50 la espuma tiene un espesor de 2 mm o menos, o
la espuma se seca durante un tiempo suficiente para reducir la espuma a una humedad residual del 5 por ciento o menos.
10. Un sistema de preparar una composición estable de espuma seca que comprende un material bioactivo, cuyo sistema comprende:
55 una cámara de control de ambiente que comprende el control de la temperatura interna y presión interna, y,

una espuma dentro de la cámara, cuya espuma comprende el material bioactivo, y un poliol o polímero, en un disolvente;

en donde, la espuma tiene un espesor de 2 mm o menos, o una relación de aspecto de 10 o más; y,

en donde el sistema está configurado para secar la espuma a un 10 por ciento de humedad residual o menos, a una temperatura de 25°C o menos, durante un período de tiempo de 2 días o menos. .

5

11. El sistema de la Reivindicación 10, en donde:

el material bioactivo comprende un virus o bacteria; o

el material bioactivo comprende una bacteria *Listeria* o cepa de Influenza.

10

12. El sistema de la reivindicación 10, en donde la espuma tiene un espesor de 1 mm o menos, o una relación de aspecto de 100 o más.

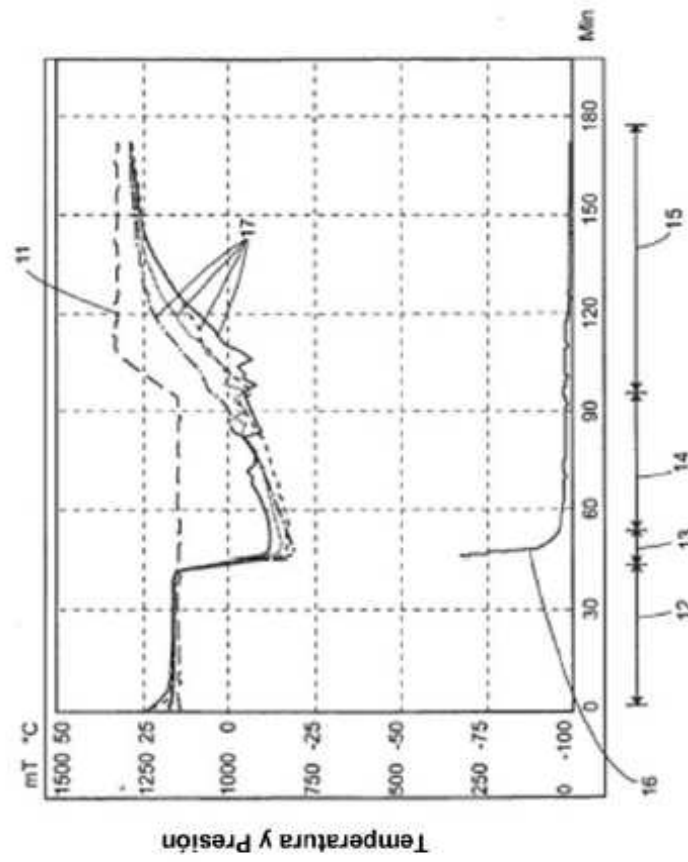


Figura.1



Figura.2A



Figura.2B



Figura.2C



Figura.2D

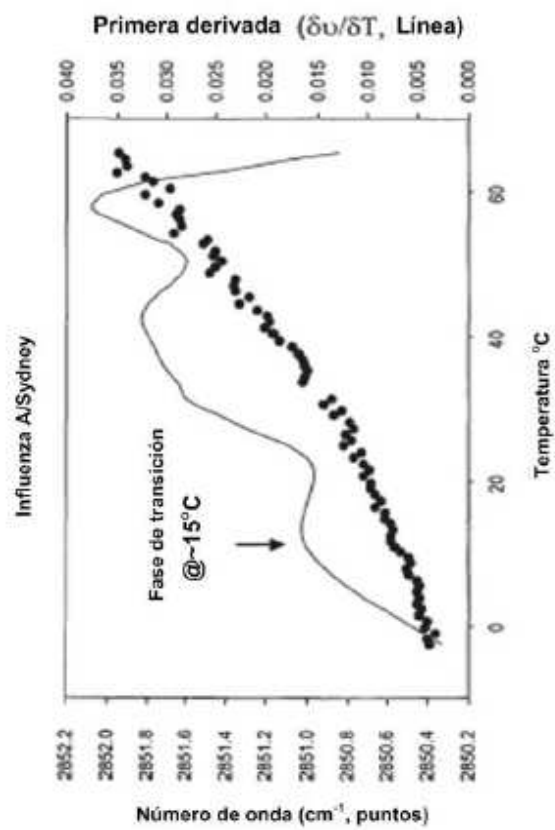


Figura.3

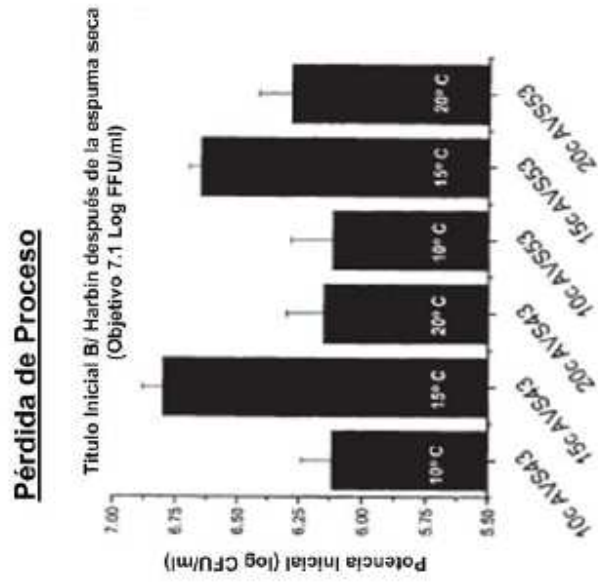


Figura.4

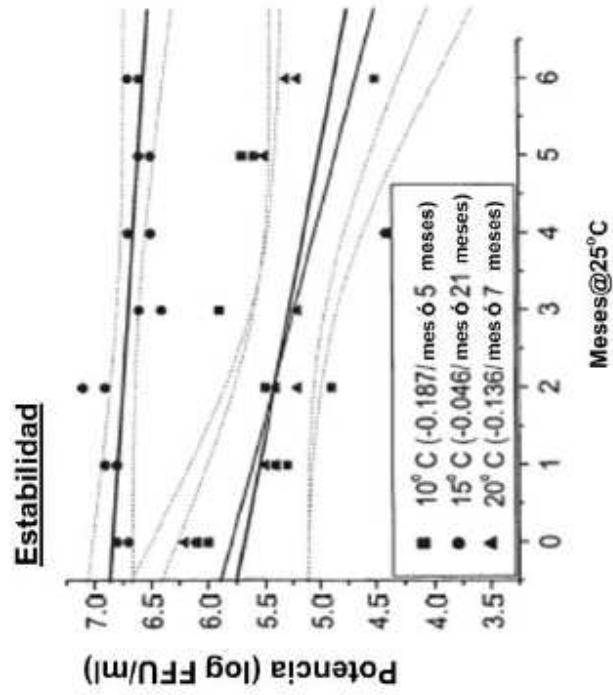


Figura.5

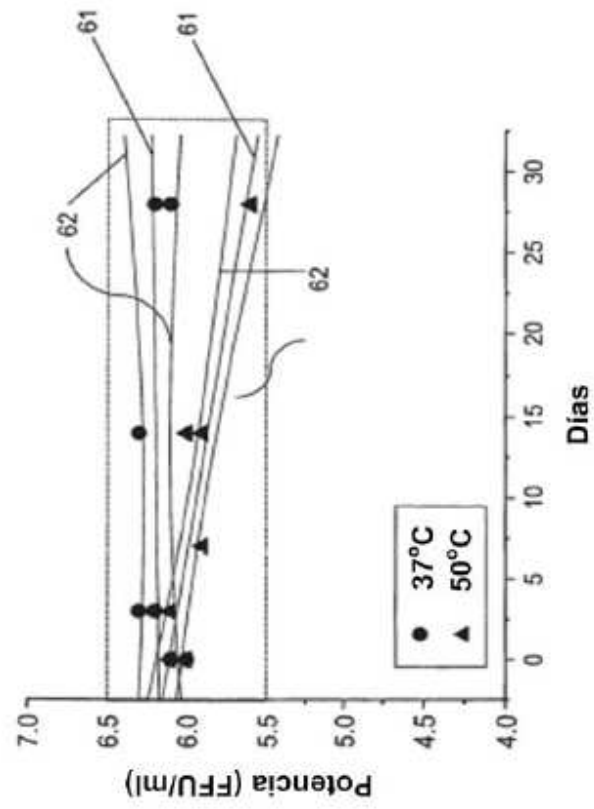


Figura.6

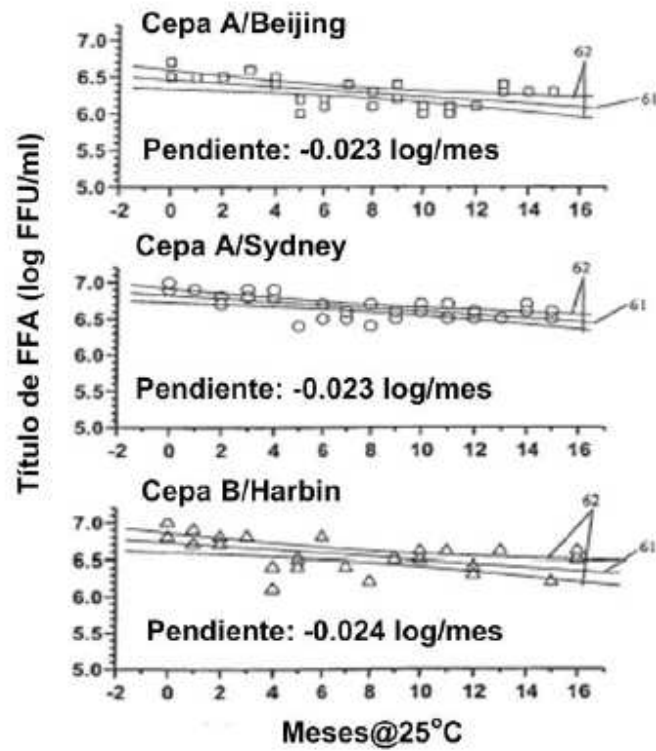


Figura.7

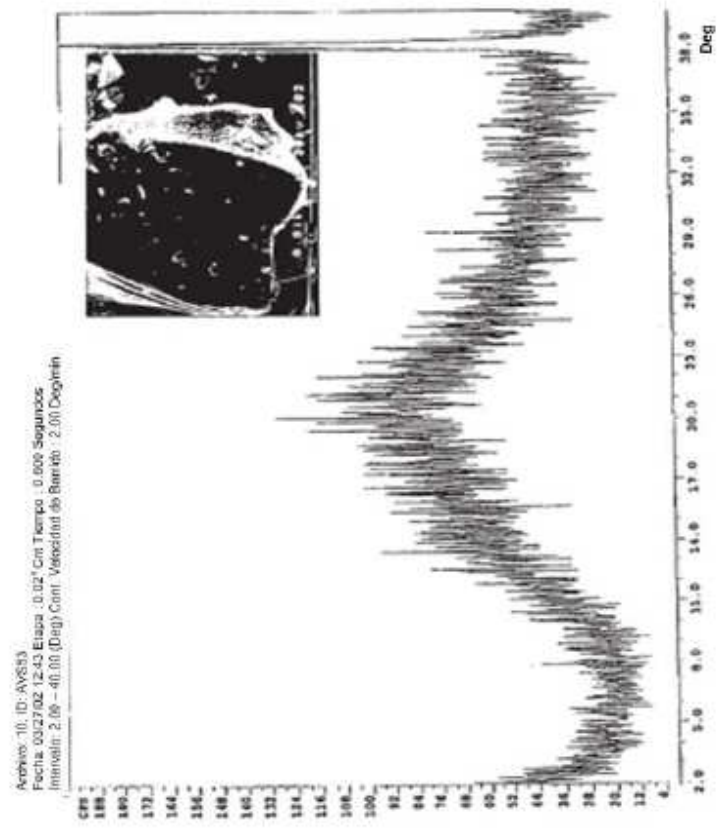


Figura.8

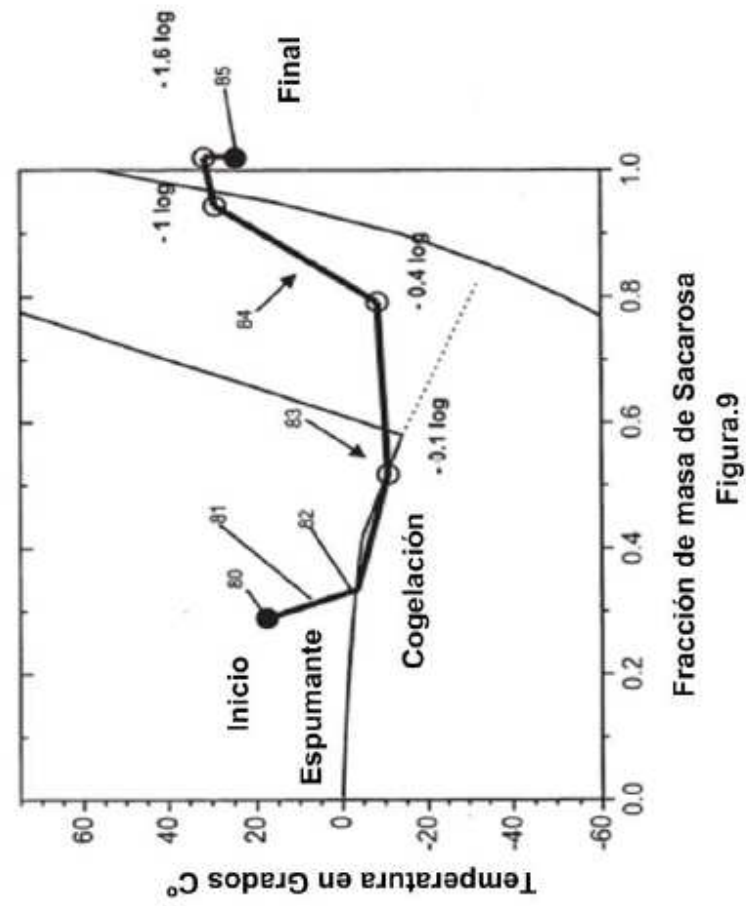


Figura.9

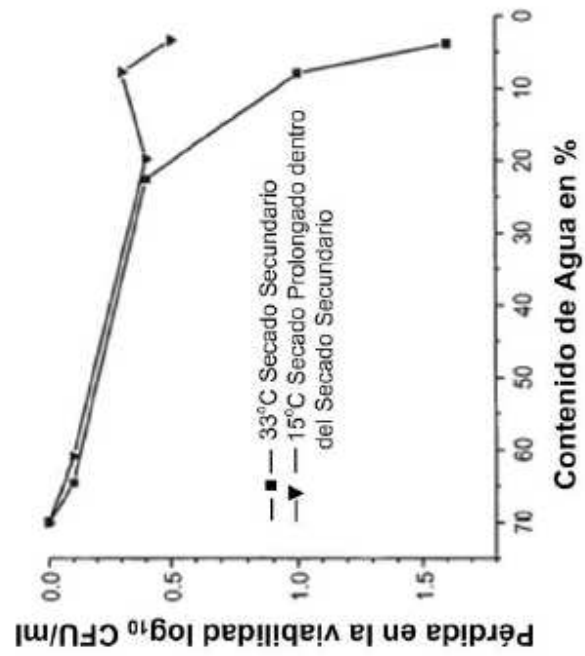


Figura.10

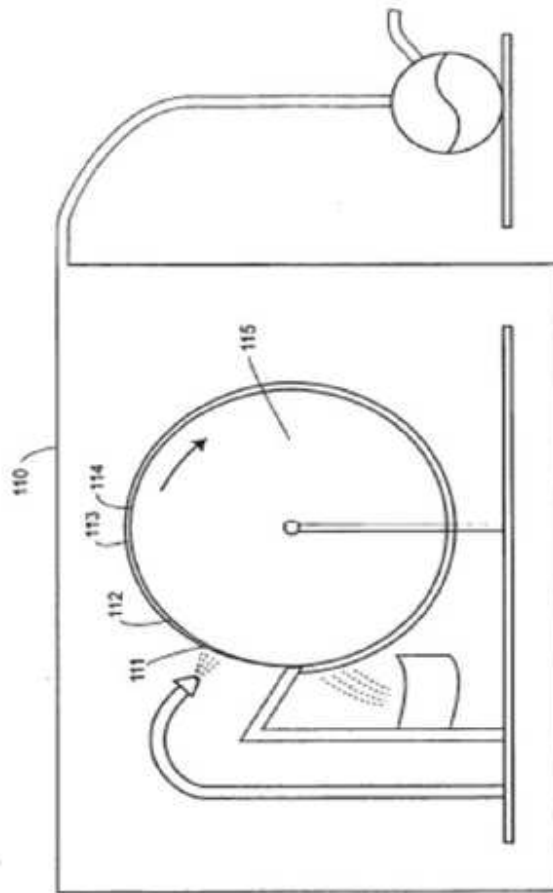


Figura.11

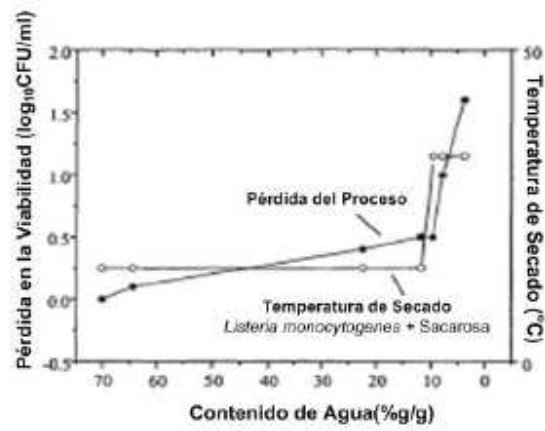


Figura.12A

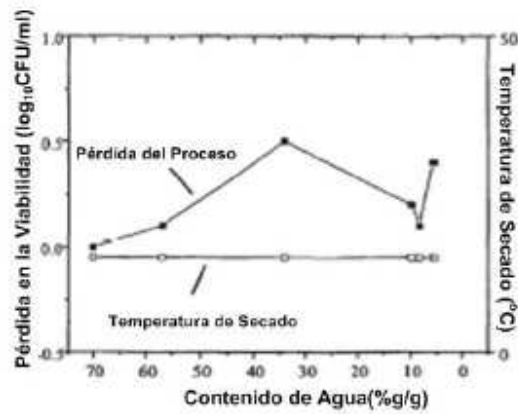


Figura.12B

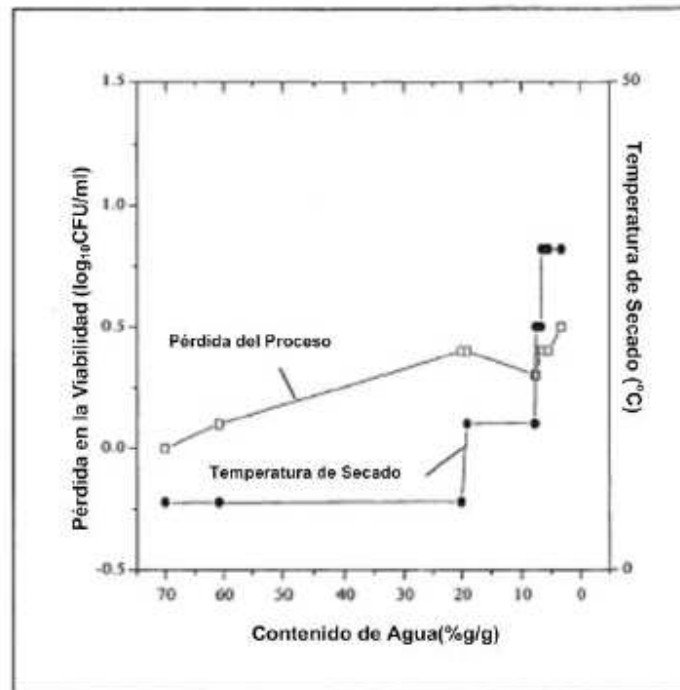


Figura.13

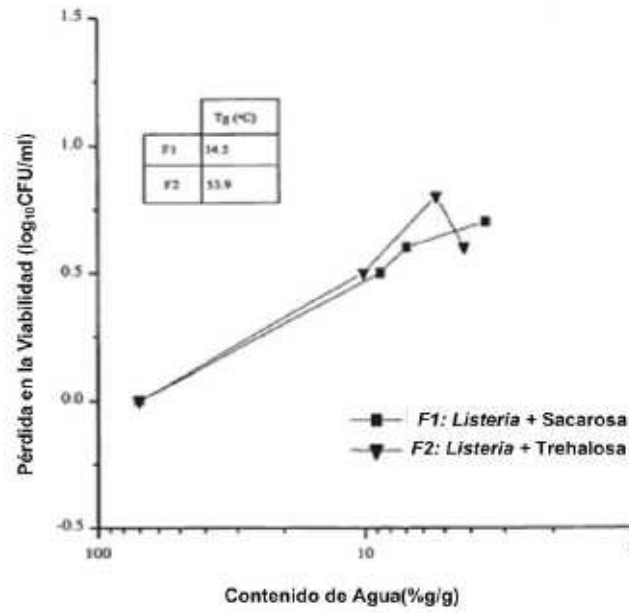


Figura.14