

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 805**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/19** (2006.01)

**C07K 14/785** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2013 E 13716655 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2723323**

54 Título: **Liofilización de agente tensioactivo pulmonar liposómico sintético**

30 Prioridad:

**28.03.2012 US 201261616827 P**

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

**28.01.2016**

73 Titular/es:

**DISCOVERY LABORATORIES, INC. (100.0%)  
2600 Kelly Road, Suite 100  
Warrington, PA 18976-3622, US**

72 Inventor/es:

**CESCO-CANCIAN, SERGIO;  
HOY, THOMAS;  
TRAPPLER, EDWARD, H. y  
THOMAS, MICHAEL, S.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 557 805 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Liofilización de agente tensioactivo pulmonar liposómico sintético

**Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un agente tensioactivo pulmonar sintético sólido y a un método de fabricación del mismo.

**5 Antecedentes de la Invención**

El agente tensioactivo pulmonar (también denominado “agente tensioactivo para el pulmón”) es una mezcla compleja de lípidos y proteínas que promueve la formación de una monocapa en la interfase aérea-acuosa alveolar y que, mediante la reducción de la tensión superficial, previene el colapso del alveolo durante la expiración. Los agentes tensioactivos pulmonares revisten el epitelio alveolar de los pulmones de los mamíferos maduros. El agente tensioactivo pulmonar natural ha sido descrito como un “complejo de lipoproteínas” a causa de que contiene tanto fosfolípidos como apoproteínas que interactúan para reducir la tensión superficial en la interfase aérea-líquida del pulmón. Se han encontrado cuatro proteínas que están asociadas con el agente tensioactivo pulmonar, denominadas SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. Específicamente, el SP-B parece que es esencial para la acción biofísica del agente tensioactivo pulmonar. Una terapia aceptada para el tratamiento de una variedad de trastornos respiratorios consiste en administrar el agente tensioactivo pulmonar en los pulmones del paciente.

Desde un punto de vista farmacológico, el agente tensioactivo pulmonar exógeno óptimo para su uso en el tratamiento podría ser sintetizado completamente en el laboratorio. A este respecto, una sustancia imitadora del SP-B que se ha encontrado útil es KL4, que es un polipéptido catiónico de 21 aminoácidos.

Un método de fabricación de un agente tensioactivo pulmonar a escala comercial para uso médico es mediante un procedimiento que utiliza una operación unitaria en un evaporador de película delgada (TFE), por sus siglas en inglés). El procedimiento tal como se aplica a la producción del agente tensioactivo pulmonar de KL4 consiste en las siguientes etapas: 1) solubilizar los cuatro componentes de la formulación primaria, dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoil fosfatidilglicerol (POPG) y ácido palmítico (PA) y KL4 en etanol; 2) eliminar el etanol utilizando el TFE; y 3) dosificar la dispersión final en viales. La propia operación unitaria de TFE es compleja y tiene limitaciones de escala. Específicamente, 0,092 m<sup>2</sup> (1 pie<sup>2</sup>) de TFE produce un lote de 40 litros y la unidad comparativa más grande disponible es de 0,92 m<sup>2</sup> (10 pies<sup>2</sup>) de TFE. Esto restringe el tamaño del lote lo cual es indeseable porque las indicaciones adicionales son aprobadas para el agente tensioactivo de KL4, las cuales requieren cantidades aún más grandes del agente tensioactivo. Además, el procedimiento es efectuado bajo condiciones asépticas que contribuyen significativamente en el coste, la flexibilidad de la programación y la complejidad del producto.

Además del coste y la complejidad de utilizar un TFE, existe una complicación adicional debido a que la composición es almacenada en estado líquido. A causa de que los componentes polipeptídicos y lipídicos de la composición son sometidos a degradación, la solución debe ser mantenida refrigerada para retardar cualquier degradación y lograr una estabilidad a largo plazo.

La liofilización o el secado por congelamiento es un procedimiento importante en la fabricación de formulaciones farmacéuticas sólidas. Las formulaciones sólidas tienen una estabilidad más prolongada que las formulaciones líquidas y son más fáciles de transportar y almacenar. Durante el procedimiento de liofilización, una formulación farmacéutica puede ser secada hasta el 2 % o menos del contenido de humedad residual sin elevar la temperatura por encima de 30 °C. Por lo tanto, este procedimiento es menos probable que provoque la degradación térmica de las formulaciones que un procedimiento a temperatura elevada tal como, por ejemplo, el secado por pulverización.

El procedimiento de liofilización implica el congelamiento de una formulación líquida y la eliminación del disolvente asociado con la misma por sublimación directa desde la fase sólida hasta la fase de vapor sin pasar a través de la fase líquida intermedia. En general, el procedimiento de liofilización consiste en tres etapas: la etapa de congelamiento, el secado primario y el secado secundario.

La congelación es el procedimiento de solidificación de un líquido de partida por medio del enfriamiento del material por debajo de una temperatura dada menor que o igual a 0 °C. El secado primario es la porción del ciclo de liofilización en la cual se elimina la sublimación de la mayoría de los disolventes congelados mientras que el material es mantenido por debajo de una temperatura umbral para mantener la estructura establecida durante el congelamiento. El secado secundario es el procedimiento de desorción de una porción de la humedad residual y usualmente se lleva a cabo a temperaturas de 25 °C y por encima de ésta. Los parámetros de procedimiento críticos asociados con cada una de estas tres etapas son la temperatura de almacenamiento, la presión de la cámara y el tiempo.

El procedimiento de liofilización continúa evolucionando a través de décadas. A pesar del amplio conocimiento desarrollado en esta área, subsisten los desafíos de producir una torta distribuida uniformemente que tenga una estructura mecánicamente estable a una escala comercial en un tiempo y costes razonables.

La patente de EE.UU. N.º. 5.952.303 de Bronstein describe un agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado obtenido por la liofilización de una suspensión acuosa de una combinación de fosfolípidos, ácido palmítico y un péptido.

5 La patente de EE.UU. N.º. 7.582.312 de Johnson describe un procedimiento de fabricación de un agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado por la liofilización de una formulación líquida de fosfolípidos, ácido palmítico y un péptido en un sistema de disolventes que contienen 20 % o más de un disolvente orgánico.

10 El uso de los procedimientos de liofilización descritos en las patentes anteriores para la liofilización de un agente tensioactivo pulmonar sintético líquido que tiene un disolvente orgánico en un intervalo desde 5 % y por encima de este valor hasta menos del 20 %, produjo un material frágil y colapsado inaceptable para la distribución comercial. La fabricación de un agente tensioactivo pulmonar sintético utilizando los ciclos de liofilización descritos previamente condujo a un material que se eleva desde el fondo del vial ("levitación") lo que podría conducir a una menor transferencia de calor, una distribución no uniforme del calor y un rendimiento del producto de atributos de calidad variable tales como la morfología física y la humedad residual.

15 Por lo tanto, existe una necesidad de métodos mejorados de producción de composiciones del agente tensioactivo pulmonar y de composiciones mejoradas del agente tensioactivo pulmonar. La presente invención presenta una solución al problema de la fabricación de un agente tensioactivo pulmonar sintético seco, el cual es estable química y mecánicamente, sin comprometer su actividad biológica en el procedimiento de liofilización.

### Breve descripción de la invención

20 Un aspecto de la invención caracteriza un procedimiento de fabricación de un agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado que tiene una levitación de la torta reducida o eliminada durante el proceso. El procedimiento incluye proporcionar a una cámara de liofilización una mezcla de pre-liofilización que comprende dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoil fosfatidilglicerol (POPG), ácido palmítico y un péptido sintético con SEQ ID NO:1 (polipéptido de KL4) dispersados en un disolvente que tiene un disolvente orgánico en un intervalo de entre 3 % (v/v) y por debajo del 20 % (v/v) del volumen total de la mezcla de pre-liofilización siendo el resto agua y/o un tampón, en donde la mezcla de pre-liofilización es llenada en un recipiente, reducir la temperatura dentro de la cámara de liofilización para empezar el enfriamiento y la solidificación de la mezcla de pre-liofilización en una fase de congelamiento; en donde la fase de congelamiento comprende enfriar la mezcla de pre-liofilización a una primera temperatura de  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  o por debajo de  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de entre 0,1 y 1,0  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y mantener la mezcla de pre-liofilización a la primera temperatura durante un primer período de tiempo suficiente para solidificar al menos el 76 % del disolvente para formar una primera mezcla solidificada; llevar a cabo la fase de recocado antes de una fase de secado primario y reduciendo o eliminando por este medio la levitación de la torta de la primera mezcla solidificada y en el tensioactivo pulmonar sintético liofilizado, en donde la fase de recocado comprende (i) calentar la primera mezcla solidificada a una segunda temperatura seleccionada para reducir o eliminar la levitación de la primera mezcla solidificada, (ii) mantener la primera mezcla solidificada a la segunda temperatura durante un segundo período de tiempo suficiente para reducir o eliminar la levitación de la primera mezcla solidificada, y (iii) enfriar la primera mezcla solidificada a una tercera temperatura de  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  o por debajo de  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad entre 0,1 hasta 1,0  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  para formar una segunda mezcla solidificada, en donde la segunda mezcla solidificada es mantenida a la tercera temperatura durante un tercer período de tiempo suficiente para promover la separación de un disolvente orgánico no congelado a partir de la segunda mezcla solidificada y por esto lograr una migración del disolvente orgánico no congelado a una interfase entre el recipiente y la segunda mezcla solidificada; siendo llevada a cabo la fase de secado primaria a una presión reducida de 30 mT o más elevada, en donde la segunda mezcla solidificada es mantenida a la tercera temperatura durante un cuarto período de tiempo suficiente para eliminar al menos el 5 % del disolvente orgánico, seguido por el calentamiento a una cuarta temperatura suficiente para evitar que la segunda mezcla solidificada levite en el recipiente y retener una estructura establecida durante la fase de recocado, y además mantener la cuarta temperatura durante un quinto período de tiempo suficiente para eliminar al menos el 70 % del disolvente y formar por esto una tercera mezcla solidificada; y llevar a cabo una fase de secado secundaria a presión reducida durante un sexto período de tiempo suficiente para producir el agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado que tiene un contenido del disolvente residual como mucho del 2 %, en donde el agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado tiene un área superficial específica de al menos 2,2  $\text{m}^2/\text{g}$ .

50 En ciertas realizaciones del procedimiento, la relación del volumen de la mezcla de pre-liofilización en el recipiente con respecto al volumen del recipiente es desde aproximadamente 28 % hasta aproximadamente 68 %.

En ciertas realizaciones del procedimiento, la relación de una altura de la mezcla de pre-liofilización en el recipiente con respecto al diámetro del recipiente está en el intervalo desde aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 0,8.

55 En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende proporcionar la mezcla de pre-liofilización en donde el disolvente orgánico está en el intervalo desde aproximadamente 3 % hasta aproximadamente 15 %. Más particularmente, el disolvente orgánico está en el intervalo desde aproximadamente 5 % hasta aproximadamente 10 %. Aún más particularmente, el disolvente orgánico está en el intervalo desde aproximadamente 7 % hasta aproximadamente 10 %.

Cualquiera de las variaciones descritas anteriormente en el procedimiento pueden ser puestas en práctica al (1) llevar a cabo la fase de congelamiento de tal modo que la mezcla de pre-liofilización sea enfriada a la primera temperatura de  $-50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de entre 0,1 y 1,0  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; (2) llevar a cabo la fase de recocido de tal modo que la primera mezcla solidificada sea (i) calentada a la segunda temperatura de  $-22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad entre 0,1 y 1,0  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , (ii) mantenida a la segunda temperatura durante el segundo período de tiempo entre 4 y 8 horas, (iii) enfriada a la tercera temperatura de  $-50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de entre 0,1 y 1,0  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; y (iv) mantenida a la tercera temperatura durante el tercer período de tiempo durante aproximadamente 3 hasta 8 horas; y (3) llevar a cabo la fase de secado primaria a una presión seleccionada del intervalo de aproximadamente 30 mT hasta aproximadamente 200 mT y una temperatura de secado primaria seleccionada del intervalo de aproximadamente  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  elevándose gradualmente desde  $-50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y mantenida además en el secado primario durante al menos 10 horas.

En ciertas realizaciones del procedimiento resumido anteriormente, la fase de secado secundaria es llevada a cabo a una presión seleccionada del intervalo de aproximadamente 30 mT hasta aproximadamente 200 mT y una temperatura de como mucho  $46\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

En los procedimientos anteriores, la mezcla de pre-liofilización comprende un péptido que tiene la SEC ID NO:1 (polipéptido de KL4), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoil fosfatidilglicerol (POPG) y ácido palmítico, y el procedimiento produce un agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado con un área superficial específica de al menos  $2,2\text{ m}^2/\text{g}$ . En las realizaciones particulares, el área superficial específica está en el intervalo desde aproximadamente  $3,7\text{ m}^2/\text{g}$  hasta aproximadamente  $2,2\text{ m}^2/\text{g}$ . En ciertas realizaciones, el agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado tiene una porosidad por encima del 40 % en volumen de un área total del agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado.

Otro aspecto de la invención caracteriza una composición de un agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado que comprende un polipéptido sintético que tiene la SEC ID NO:1 (polipéptido de KL4), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoil fosfatidilglicerol (POPG) y ácido palmítico, y en donde la composición del agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado tiene un área superficial específica de al menos  $2,2\text{ m}^2/\text{g}$ .

En ciertas realizaciones, el agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado tiene un área superficial específica en el intervalo desde aproximadamente  $3,7\text{ m}^2/\text{g}$  hasta aproximadamente  $2,2\text{ m}^2/\text{g}$ .

En ciertas realizaciones, el agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado tiene una porosidad por encima del 40 % en volumen de un área total del agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado.

El agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado incluye un péptido que tiene una SEC ID NO:1 (polipéptido de KL4), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoil fosfatidilglicerol (POPG) y ácido palmítico.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un diagrama de barras que demuestra el movimiento del material liofilizado dentro de un vial durante la inversión o una falta de movimiento de un número de viales que contienen un material liofilizado que se movió durante la inversión (mostrado como barras negras) y un número de viales que contienen el material liofilizado que no se movió durante la inversión (mostrado como barras sombreadas) (véase el Ejemplo 5).

La figura 2 es una gráfica que demuestra la levitación del material durante el procedimiento de liofilización (véase el Ejemplo 5).

Las figuras 3A y 3B son imágenes de un microscopio de barrido electrónico (SEM, por sus siglas en inglés) del agente tensioactivo pulmonar liofilizado de la invención, hechas en viales de 30 ml, a una amplificación de X20, superficie A y superficie B, respectivamente.

Las figuras 4A y 4B son imágenes de SEM de la Formulación II del agente tensioactivo pulmonar liofilizado hecha por el Ciclo de Liofilización de Bornstein en viales de 30 ml como se describe en el Ejemplo 3, a una amplificación de X20, superficie A y superficie B, respectivamente.

Las figuras 5A y 5B son imágenes de SEM del agente tensioactivo pulmonar liofilizado de la invención hecho en viales de 30 ml, a una amplificación de X100, superficie A y superficie B, respectivamente.

Las figuras 6A y 6B son imágenes de SEM de la Formulación II del agente tensioactivo pulmonar liofilizado hecha por el Ciclo de Liofilización de Bornstein en viales de 30 ml como se describe en el Ejemplo 3, a una amplificación de X100, superficie A y superficie B, respectivamente.

### 50 Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

Se ha descubierto que un agente tensioactivo pulmonar sintético seco que tiene sólidos distribuidos uniformemente dispuestos en una formación rígida y mecánicamente estable, capaz de resistir el transporte por el aire y la manipulación, puede ser producido por un ciclo de liofilización mejorado.

Se espera que la formulación farmacéutica liofilizada tenga una apariencia uniforme en su estructura y textura y una buena resistencia física (por ejemplo, que sea capaz de resistir el transporte y la manipulación) para que sea adecuada para su distribución comercial. La apariencia uniforme ha sido relacionada con una estabilidad mejorada y una menor variabilidad en la actividad del fármaco, la elegancia y apariencia farmacéutica, la humedad residual y el tiempo de reconstitución.

La liofilización de las formulaciones farmacéuticas que contienen una suspensión de una composición liposómica y un disolvente orgánico es una tarea complicada debido a que el disolvente orgánico es atrapado como un líquido no congelado y la vaporización a una velocidad diferente cuando se compara con otros líquidos congelados tales como el hielo y, por lo tanto, se crea una varianza en la composición del disolvente que conduce a la pérdida del control del procedimiento, la dificultad en el mantenimiento del parámetro del procedimiento crítico de la presión de la cámara, así como la dificultad de controlar la presencia de disolventes residuales en el producto seco.

Los intentos para producir un agente tensioactivo pulmonar sintético seco a partir de una mezcla de pre-liofilización que contiene el disolvente orgánico dentro del intervalo desde 3 % hasta 20 % utilizando los ciclos de liofilización descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 5.952.303 y 7.582.312 fallaron en proporcionar productos aceptables comercialmente. Los productos resultantes tuvieron los sólidos distribuidos no uniformemente a lo largo de la superficie de los viales de liofilización; los sólidos aparecían levitados en los viales durante el procedimiento y tenían una superficie pulvulenta colapsada.

Las modificaciones de rutina de las temperaturas, presiones y tiempos de almacenamiento no produjeron el producto deseado con una apariencia uniforme en su estructura y textura y una buena resistencia física (por ejemplo, un producto liofilizado capaz de retener su forma y permanecer en su lugar durante la inversión de un vial que fue liofilizado en el mismo). La etapa inicial en el desarrollo del procedimiento de liofilización de la invención fue identificar los datos termoanalíticos, relacionados con el material inherente, respecto a los constituyentes y las relaciones específicas de aquellos constituyentes contenidos dentro de la formulación (en su mayoría los excipientes amorfos que también contienen sales en el tampón y el disolvente orgánico). Este análisis térmico fue llevado a cabo efectuando mediciones por Microscopía por Secado con Congelamiento (FDM), Resistencia Eléctrica (ER) y Calorimetría de Exploración Diferencial a Bajas Temperaturas (LT-DSC). Los análisis térmicos proporcionaron información crítica tales como los datos adecuados de temperatura de solidificación y de temperatura umbral en los cuales se seca de manera segura el material mientras en presencia de hielo durante el secado primario para asegurar la retención de la estructura establecida durante la etapa de congelamiento. Basado en el conocimiento del carácter y el comportamiento del constituyente orgánico durante el procesamiento, se podría esperar que no se pudiera lograr la solidificación completa en las condiciones utilizadas para un procedimiento de liofilización convencional. Este hecho presentó un desafío de procesamiento significativo adicional puesto que la solución a granel (es decir, una mezcla de pre-liofilización) comprendía un sistema de disolventes que tiene constituyentes volátiles, tales como el disolvente orgánico en el intervalo desde 3 % hasta por debajo del 20 %, preferiblemente desde 3 % hasta 15 %, más preferiblemente desde 5 % hasta 10 % y más preferiblemente desde 7 % hasta 10 % (v/v) del volumen total de la mezcla de pre-liofilización siendo el resto agua y/o tampón. Los constituyentes volátiles tienen puntos de fusión por debajo de las temperaturas que se pueden lograr por el condensador. En consecuencia, el disolvente orgánico podría no ser solidificado por el condensador y es recolectado frecuentemente de manera ineficiente por el condensador a través de todo el procedimiento de secado, como lo es en el método convencional. En este procedimiento, durante la fase de secado de la liofilización, los vapores orgánicos eliminados del material con presiones reducidas en la cámara, son recolectados momentáneamente sobre la superficie del condensador como resultado de la diferencia de temperaturas entre los disolventes en el producto y el condensador. Estos vapores, aunque están sobre la superficie del condensador, están presentes en un estado líquido. La presión de vapor asociada con cada disolvente orgánico recolectado como líquido, cuando es reducida hasta la temperatura del condensador, es suficientemente más elevada que la presión de la cámara, provocando una conversión subsiguiente de los líquidos orgánicos en su regreso al estado de vapor. Esta serie de eventos es denominada reflujo (vapor > líquido > vapor) y se repite continuamente a través de todo el procedimiento hasta que, durante el transcurso del tiempo, los vapores orgánicos escapan a la succión del condensador y son eliminados de la cámara por la bomba de vacío. Mientras tanto, el material en un estado de reflujo está liberando constantemente energía calorífica (de vapor a líquido) y consumiendo energía calorífica (de líquido a vapor) para cambiar de una fase a otra. El material recolectado sobre el condensador, como resultado, es sometido a la absorción y a la liberación del calor asociado con el reflujo y ya no es capaz de mantener las condiciones de estado estacionario. Si la sublimación del hielo ocurre a niveles elevados durante el reflujo de los disolventes orgánicos, tanto la fluctuación a temperatura constante como la cantidad del área superficial libre del condensador, el vacío del disolvente orgánico a reflujo, podrían tener un impacto en la condensación del vapor de agua a hielo, sobre la presión controlada de la cámara y por último, sobre la sublimación del hielo desde el producto. El método convencional para el secado por congelamiento es la sublimación del hielo para formar vapor de agua y la conversión de este vapor de agua de vuelta a hielo cuando se recolecta en el condensador y es considerado el estado del arte. Basado en el desafío provocado por la presencia de los disolventes orgánicos, en combinación con la observación de la levitación de la torta durante el procesamiento, se implementó una aplicación de secado primario de dos etapas específica para superar exitosamente estos efectos. El intento de los dos segmentos de secado primarios fue segregarse la vaporización de cualquier disolvente orgánico periférico desde la interfase matriz/vial a partir de la sublimación del agua congelada. Un espectrómetro de masas fue utilizado para medir los niveles de gas residual en la cámara de

liofilización. Estos datos indicaron que el disolvente orgánico estaba siendo eliminado durante este segmento inicial del secado primario y que los parámetros del ciclo objetivo para este segmento particular condujeron a niveles reducidos del disolvente orgánico, sugiriendo que el procedimiento podría haber avanzado hasta la segunda porción del secado primario. El uso de esta técnica, mediante la implementación de un segmento destinado a la eliminación de los disolventes libres por medio de la vaporización, condujo a la eliminación de la levitación de la torta en la presentación objetivo por primera vez. Entonces se razonó que la eliminación de los disolventes orgánicos no congelados en este segmento inicial podría reducir el fenómeno de la levitación de la torta si los parámetros de los segmentos afiliados, tales como la velocidad de congelamiento, de recocido y de calentamiento para el secado primario, podrían ser controlados adicionalmente para eliminar la movilidad del producto asociada con la levitación en el vial.

Los inventores determinaron que una de las causas para la levitación fue la solidificación inadecuada lograda por las temperaturas de congelamiento de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  empleadas previamente. Varios intentos para reducir la levitación por la reducción de la temperatura de almacenamiento a  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la elevación de la presión de la cámara durante la etapa de secado primaria no produjeron ninguna mejora significativa. La presencia del alcohol en la mezcla de liofilización creó un efecto "lubricante"; cuando la torta fue llevada a temperaturas más calientes, la presencia del alcohol a lo largo de los lados del vial hizo posible que la torta levitara. Se eliminó la levitación mediante la reducción de la temperatura de congelamiento final a  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  o por debajo de la fase de congelamiento, incluyendo, previo a la fase de secado primaria, un tratamiento térmico de recocido para provocar que más disolvente orgánico se separara de la mezcla. Los parámetros preferidos para la fase de congelamiento fueron como sigue: enfriamiento gradual hasta una temperatura de almacenamiento de  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  o por debajo de esta temperatura, preferiblemente, de  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  ("la temperatura de congelamiento final"), seguido por el mantenimiento a la temperatura de almacenamiento durante 1-10 horas, preferiblemente, 2-8 horas, más preferiblemente 3-5 horas, todas llevadas a cabo a presión atmosférica. El enfriamiento gradual empezó después de que la mezcla de pre-liofilización fuera equilibrada a  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante varias horas en la bandeja, y luego se empezó a reducir la temperatura a una velocidad aproximada de  $0,1$  a  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Además, intentando mejorar el tiempo de procesamiento y manteniendo aún la uniformidad y apariencia requeridas, los inventores analizaron una relación entre el volumen de la muestra y el tamaño del vial. Como la levitación de la torta es un fenómeno raro, es novedoso evaluar el comportamiento del procesamiento haciendo variar los tamaños del vial basado exclusivamente en la generación de un área superficial más grande para que la torta congelada se adhiera en lugar del método convencional de la evaluación de diversos tamaños del vial basado en la obtención de una relación minimizada de la altura de relleno con respecto al vial. Sorprendentemente, se descubrió que haciendo variar el tamaño de los viales desde una capacidad de 20 ml hasta 50 ml, mientras se tiene la misma cantidad inicial del relleno (13,7 ml), no proporcionó una mejora de la correlación en la apariencia de la torta liofilizada desde el vial de tamaño más pequeño al vial de tamaño más grande. Aunque las muestras del vial de 30 ml tuvieron una torta distribuida más uniformemente que las muestras del vial de 20 ml, las muestras del vial de 50 ml fueron menos uniformes que las muestras del vial de 20 ml. La falta de la mejora del material procesado en el vial de capacidad de 50 ml estaba relacionada probablemente con los niveles incrementados de la levitación de la torta observados en este recipiente que estaban asociados con la altura de la torta resultante, cuando se comparaba con la altura de la torta del vial de 20 cc y de 30 cc. En el aumento de escala del relleno, debe ser observada, para eliminar la levitación del material de relleno en el vial, la relación entre el volumen de relleno (el volumen de la mezcla de pre-liofilización) y el volumen del vial (u otro tipo de recipiente utilizado para contener el relleno) y/o la relación de la altura de relleno de la mezcla de pre-liofilización de la mezcla de pre-liofilización en el vial con respecto al diámetro del vial. La relación de la altura de relleno en el vial con respecto al diámetro del vial debe estar en el intervalo desde aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 0,8, preferiblemente desde aproximadamente 0,4 hasta aproximadamente 0,7 y, más preferiblemente, desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 0,6. La relación del volumen de relleno con respecto al volumen del vial debe ser desde observada 28 % hasta aproximadamente 68 % y el intervalo preferido debe ser desde aproximadamente 35 % hasta aproximadamente 55 %. Se debe entender que los volúmenes de los viales utilizados en estos cálculos son los volúmenes "listados" (es decir, los volúmenes listados en los catálogos y los folletos de marcas registradas) y no los volúmenes internos reales, en donde los volúmenes listados pueden diferir de los volúmenes reales en aproximadamente 10 %.

Los inventores determinaron que la adición de una fase de recocido después de una fase de congelamiento, o cuando se alcanza una etapa intermedia previa a la temperatura de congelamiento final, ayuda a crear una torta más rígida con un soporte expandido que se adherirá de manera más estrecha a los lados y al fondo del vial y que, por lo tanto, elimina la levitación de los sólidos. Otro objetivo logrado por la adición de la fase de recocido fue obtener un incremento en la velocidad de sublimación y, mediante esto, la reducción en el tiempo del procedimiento total, sin comprometer la apariencia de la torta.

La fase de recocido será descrita ahora con detalle. La expresión "fase de recocido" significa las condiciones del tratamiento térmico que promueven la separación de un componente y/o la cristalización de un componente de una mezcla. Este tratamiento térmico puede implicar (B) enfriar hasta una temperatura baja, luego calentar hasta una temperatura intermedia, seguido por un enfriamiento adicional hasta una temperatura baja final (la "temperatura de congelación final"). La "fase de recocido" está propuesta para que ocurra durante la fase de congelamiento del procedimiento de liofilización. La práctica del recocido incrementó la probabilidad de prevenir la levitación de la torta desde el fondo del vial durante el procesamiento por la creación de una matriz congelada más rígida. Además, el

recocido promovió la migración del disolvente no congelado hasta la interfase del vial/matriz y además promovió la separación subsiguiente del disolvente desde el producto durante las condiciones iniciales utilizadas para el secado primario, reduciendo efectivamente la cantidad del disolvente y provocando que los solutos, es decir, los APIs y las sales del tampón sean más rígidas mientras que cualquier agua que no esté congelada sea convertida en hielo. La temperatura intermedia es seleccionada según la caracterización termo-analítica y visual a bajas temperaturas del material en donde se determina ya sea una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) o la temperatura correspondiente a un cambio físico observado. La temperatura baja es seleccionada según la caracterización termo-analítica y visual del material, donde la temperatura de solidificación completa es medida. La  $T_g$  u otro cambio físico observado, tal como un cambio en la opacidad o en el movimiento del tipo líquido, determina que temperatura intermedia se debe recocer el producto y la temperatura de solidificación completa determina que punto de ajuste de la temperatura baja debe ser utilizado para promover los atributos del material congelado ideales para los cuales se debe proceder hasta el secado primario. Específicamente, el material debe ser recocido a una temperatura de pocos grados por encima de la  $T_g$  o el cambio físico observado y, como mínimo, el material debe ser enfriado a una temperatura igual o por debajo de la temperatura de solidificación completa. Para el material descrito como Formulación I en este documento, durante el análisis térmico, el cambio físico observado del movimiento tipo líquido fue observado a una temperatura de  $-28\text{ }^\circ\text{C}$  (la temperatura a la cual el movimiento tipo líquido fue observado bajo el microscopio de secado por congelamiento). En ciertas realizaciones, la temperatura de solidificación completa fue observada a  $-45\text{ }^\circ\text{C}$ . La nucleación debe ser confirmada primero antes de mantener la temperatura a condiciones bajas o intermedias. La selección de la temperatura puede estar basada en los constituyentes en la formulación o en la temperatura umbral. La temperatura umbral está definida como una temperatura en la cual la temperatura del producto necesita ser mantenida por debajo durante el secado primario, mientras que se está en la presencia de hielo, para evitar el colapso, la fusión o, en algunos casos, la levitación de la torta.

La etapa de recocido es llevada a cabo como se describió en (B) anteriormente. En ciertas realizaciones, la fase de recocido incluyó calentar la torta congelada desde  $-45\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$  (la temperatura de congelamiento final) hasta  $-22\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$  (la temperatura intermedia) a una velocidad seleccionada desde el intervalo de aproximadamente  $0,1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta aproximadamente  $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  (una etapa de calentamiento) y mantener durante un período de tiempo suficiente para promover la separación del disolvente orgánico desde la mezcla del soluto y originar un sólido más rígido que reduce o elimina la levitación, preferiblemente, 3-8 horas a  $-22\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$  (una etapa de mantenimiento), luego enfriar nuevamente a  $-45\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$  a una velocidad de aproximadamente  $0,1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta aproximadamente  $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  (una etapa de enfriamiento) y mantener durante un período de tiempo suficiente para asegurar la solidificación adecuada, por ejemplo, durante 3-8 horas, preferiblemente durante 4 horas, a  $-45\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ , en donde la totalidad de las cuatro etapas se llevaron a cabo a presión atmosférica. En ciertas realizaciones, la etapa de recocido es llevada a cabo como se describe en los Ejemplos 2, y 9-13.

Alternativamente, se puede lograr una solidificación adecuada con el enfriamiento directo hasta una temperatura baja mínima sin la etapa de mantenimiento final por el enfriamiento de los viales a una velocidad constante seleccionada del intervalo de aproximadamente  $0,1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta aproximadamente  $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  a una temperatura baja final, hasta que la temperatura deseada sea alcanzada.

En una realización, la fase de recocido incluyó el calentamiento de la torta congelada desde  $-50\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$  hasta  $-22\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$  a una velocidad de  $0,1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta  $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  y el mantenimiento durante 3-8 horas a  $-22\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ , luego el enfriamiento nuevamente a  $-50\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$  a una velocidad de  $0,1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta  $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  y el mantenimiento durante 3-8 horas, preferiblemente 4 horas, a  $-50\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ , en donde la totalidad de las cuatro etapas se llevaron a cabo a la presión atmosférica.

La fase de secado primaria se lleva a cabo a presión reducida (vacío) y se incluye un mantenimiento opcional a la temperatura de la etapa previa durante un período de tiempo suficiente para vaporizar al menos 5 %, preferiblemente, desde 5 hasta 10 % del disolvente orgánico, elevando gradualmente la temperatura de la etapa previa  $-50\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$  hasta una temperatura dentro del intervalo desde aproximadamente  $-25\text{ }^\circ\text{C}$  hasta aproximadamente  $0\text{ }^\circ\text{C}$  (la temperatura de secado primaria) a una velocidad de  $0,1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta  $2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  y una presión de 30 mT hasta 200 mT, preferiblemente, 40 mT  $\pm 10\text{ mT}$  (una etapa de calentamiento), seguido por una etapa de mantenimiento a la temperatura de secado primaria durante un período de tiempo suficiente para sublimar al menos el 70 % del disolvente, preferiblemente, al menos el 80 %, preferiblemente, desde 5 hasta 10 % del disolvente orgánico o si la etapa de mantenimiento opcional no es llevada a cabo, entonces durante un período de tiempo suficiente para sublimar al menos el 80 % del disolvente. La etapa de mantenimiento puede durar 10 horas o más. En ciertas realizaciones, la etapa de mantenimiento es de 18 hasta 140 horas, preferiblemente 18-100 horas. La selección de la temperatura para el secado primario entre  $0\text{ }^\circ\text{C}$  y  $-25\text{ }^\circ\text{C}$  estuvo basada en el deseo de evitar que la muestra en el vial levite y que se seque manteniendo la estructura establecida durante el congelamiento. La capacidad para optimizar la duración de la fase de secado primaria fue mejorada por el diseño de la fase de recocido.

A continuación, se describirá la fase de secado secundaria. El propósito de la fase de secado secundaria es reducir el contenido de humedad residual dentro del producto obtenido en la fase de secado primaria elevando su temperatura, típicamente para superar las temperaturas ambientales, para eliminar cualquier agua residual y el mantenimiento a la temperatura seleccionada durante un período de tiempo suficiente para producir el agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado con un contenido del disolvente residual como mucho del 2 %. El intervalo

típico de las temperaturas de secado secundarias es desde 20 °C hasta 30 °C. Sin embargo, la temperatura de secado secundaria puede ser tan baja como -7 °C hasta tan elevada como +60 °C. El punto de ajuste de la temperatura de secado secundaria debe ser seleccionado basado en 1) mantener al producto estable durante la fase de secado secundaria por la implementación de una temperatura de almacenamiento que mantiene la temperatura del producto por debajo de la Tg observada por al menos 5 °C y 2) promover la desorción por la implementación de una temperatura que sea lo suficientemente caliente para reducir eficazmente la humedad residual a aquella dentro de la especificación a una velocidad razonable comercialmente. La Tg observada de la Formulación 1 fue de entre 45 °C y 51 °C de modo que la temperatura durante el segundo secado puede ser tan elevada como 46 °C. Los resultados de la humedad residual indicaron que un punto de ajuste de la temperatura de secado secundaria de 25 °C fue eficaz para lograr los resultados de la humedad residual. A continuación, se llevó a cabo el mantenimiento del producto a la temperatura de secado secundaria seleccionada durante un período de tiempo suficiente para producir el producto final con un contenido del disolvente residual de como mucho el 2 %. Una de las maneras de estimar si el secado está comprometido, es efectuar una prueba de elevación de la presión (prueba de valoración), en donde la presión de 10 micrones indica que la humedad residual está dentro de la especificación. En ciertas realizaciones, la fase de secado secundaria fue llevada a cabo por el calentamiento desde la temperatura de almacenamiento en la etapa previa hasta 25 °C +/- 3 °C a la velocidad de 0,1 hasta 1 °C/min, preferiblemente, a la velocidad de 0,2 hasta 0,5 °C/min. La fase también fue llevada a cabo en un vacío como la fase previa. El intervalo de la presión preferido fue desde 30 mT hasta 500 mT, más preferiblemente, desde 40 mT hasta 150 mT. Después que el producto alcanzó la temperatura de almacenamiento seleccionada, se llevó a cabo una etapa de mantenimiento a 25 °C +/- 3 °C durante 4 hasta 10 horas, preferiblemente durante 6 horas.

El material liofilizado fue lavado entonces con un chorro de un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno a 0,5 bares ( $5 \times 10^4$  Pa) previo a la inserción total final de un tapón y el sellado para el almacenamiento.

Para determinar la reproducibilidad de los parámetros del ciclo objetivo, se compararon los atributos claves del producto tales como los perfiles de temperatura, las temperaturas de ruptura de la sublimación y las características del producto terminado después del procesamiento con ciclos de liofilización idénticos. La temperatura de "ruptura" de la sublimación es la temperatura inmediatamente anterior al punto cuando la temperatura del producto se aproxima estrechamente a la temperatura de almacenamiento durante el secado primario. Una "ruptura" de la temperatura del producto indica la finalización de la sublimación en un recipiente dado considerando que el termopar de medición está colocado en su lugar (el centro inferior) en donde el hielo es probable que persistirá. Para cada etapa significativa en el procedimiento (por ejemplo, el Recocado, el Congelamiento, el Secado Primario, la Ruptura de la Sublimación y el Secado Secundario), los intervalos de la temperatura del producto de ambos estudios estuvieron dentro de 0,5 °C para el Recocado y el Congelamiento, estuvieron dentro de 1 °C para el Secado Primario y la Ruptura de la Sublimación, y dentro de 1,5 °C para el Secado Secundario. Basado en esta variación nominal, se consideró reproducible el comportamiento térmico durante el procesamiento. La evaluación de los intervalos del tiempo final de la sublimación indicó que la sublimación había sido terminada dentro de un intervalo de 6 horas de estudio a estudio, sugiriendo también una reproducibilidad adecuada. Finalmente, la evaluación del producto terminado como la apariencia física, la humedad residual, el tiempo de reconstitución, la claridad de la solución, el pH reconstituido, la pérdida de masa termogravimétrica (TGA) y la Calorimetría de Exploración Diferencial a Alta Temperatura (HT-DSC) todos produjeron resultados comparables, apoyando además la viabilidad para reproducir una calidad del producto consistente de estudio a estudio a escala más grande. La conclusión deducida de la evaluación de estos estudios fue que los parámetros del ciclo de liofilización implementados para liofilizar el agente tensoactivo pulmonar sintético que contiene entre 3 y por debajo del 20 % del disolvente orgánico, preferiblemente desde 3 % hasta 15 %, más preferiblemente desde 5 % hasta 10 % y todavía más preferiblemente desde 7 % hasta 10 % (v/v) del volumen total de la mezcla de pre-liofilización, son robustos y adecuados para obtener un material consistente con atributos aceptables de la calidad del producto sin el fenómeno de la levitación de la torta.

La liofilización fue efectuada en una unidad secadora por congelamiento de cuatro bandejas proporcionando 0,743 metros cuadrados (ocho pies cuadrados) de espacio de almacenamiento, con una capacidad condensadora del hielo interna de 15 kilogramos. La unidad fue construida de acero inoxidable del tipo 304L, certificada como un recipiente a presión para operar hasta 1,407 kg/cm<sup>2</sup> (20 psig) para la esterilización con vapor. El equipo de secado por congelamiento típico consiste en una cámara calibrada a presión, un condensador, un sistema de vacío con una característica de control de la presión y un bucle para el fluido de transferencia del calor en circulación capaz de un intervalo de temperatura de aproximadamente -55 °C hasta 50 °C.

El material liofilizado apareció blanco, dispersado uniformemente en los viales, de forma cilíndrica (es decir, imitando la forma de los viales) y de apariencia densa con un encogimiento mínimo cuando se compara con el relleno inicial, que tiene una estructura rígida de tal modo que no se mueva en la inversión del vial y sin trazas del material o reborde por encima de la superficie superior del material. El material poseía una superficie mate a lo largo de la parte superior, los lados y el fondo de la torta. El material liofilizado satisface la especificación para la humedad residual, la DSC, la reconstitución, el pH y la viscosidad.

La mezcla de pre-liofilización y su preparación serán descritas ahora con detalle. Los componentes primarios – ingredientes farmacéuticos activos (API) fueron los fosfolípidos dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) y palmitoiloleoil fosfatidilglicerol (POPG), ácido palmítico (PA) y un péptido pulmonar sintético con SEC ID NO:1 (polipéptido KL4).



5 En ciertas realizaciones, las sustancias imitadoras del polipéptido del agente tensioactivo pulmonar se refieren a polipéptidos con una secuencia de residuos de aminoácidos que tienen una hidrofobicidad del material compuesto de menos de cero, preferiblemente menor que o igual a -1, más preferiblemente menor que o igual a -2. El valor de la hidrofobicidad del material compuesto para un péptido es determinada por la asignación a cada residuo de aminoácido en un péptido de su valor de hidrofiliicidad correspondiente como se describe en Hopp *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**:3824-3829, 1981. Para un péptido dado, los valores de la hidrofobicidad son sumados, representando la suma el valor de hidrofobicidad del material compuesto.

10 En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la sustancia imitadora del polipéptido del agente tensioactivo pulmonar imita la configuración de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos de SP18 y efectúa la función de la región hidrofóbica de SP18 como se describe en la patente de EE.UU. No. 3.789.381 incorporada aquí en su totalidad. En ciertas realizaciones, las sustancias imitadoras de SP-B para su uso en este documento incluyen un péptido sintético con SEC ID NO:1 (polipéptido KL4).

Las sustancias imitadoras del polipéptido de SP-B ejemplares son mostradas en la Tabla de los Péptidos Imitadores del Agente Tensioactivo Pulmonar.

15 Tabla de los Péptidos Imitadores del Agente Tensioactivo Pulmonar

Denominación <sup>1</sup>	SEC ID NO	Secuencia de resto de aminoácido
KL4	1	KLLKLLKLLKLLK
DL4	2	DLLLDLLLDLLLD
RL4	3	RLLLRLLLRLLLR
RL8	4	RLLLLLRLLLLLRL
R2L7	5	RRLLLLLRLLLLLRL
	6	RLLCLLRLLCCLR
	7	LLLCLLRLLCCLR
	8	RLLCLLRLLCCLR DLLDLLLDLLLDLLD
RCL1	9	RLLCLLRLLCCLR
RCL2	10	RLLCLLRLLCCLR
RCL3	11	RLLCLLRLLCCLR
KL8	12	KLLLLLLKLLLLLLKLL
KL7	13	KKLLLLLLKLLLLLLKLL

<sup>1</sup> La denominación es una abreviatura para la secuencia del residuo de aminoácido indicado.

Los fosfolípidos útiles en las composiciones suministradas por la invención son dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) y dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) (C18:1).

20 El ácido graso útil en estas mezclas es el ácido palmítico.

25 Un ejemplo de un lípido natural modificado o semi-sintético es cualquiera de los lípidos descritos anteriormente, los cuales han sido modificados químicamente. La modificación química puede incluir un número de modificaciones; sin embargo, una modificación preferida es la conjugación de uno o más grupos de polietilenglicol (PEG) con una de las porciones deseadas del lípido. El polietilenglicol (PEG) ha sido utilizado ampliamente en biomateriales, biotecnología y medicina principalmente a causa de que el PEG es un polímero biocompatible, no tóxico, no inmunogénico y soluble en agua. En el área del suministro de fármacos, los derivados de PEG han sido utilizados ampliamente en enlace covalente (es decir, la "PEGilación") con las proteínas para reducir la inmunogenicidad, la proteólisis y la depuración desde el riñón y para mejorar la solubilidad.

30 Los lípidos que han sido conjugados con el PEG son referidos aquí como "PEG-lípidos". Preferiblemente, cuando los PEG-lípidos son utilizados en los métodos y las composiciones de esta invención, los mismos están presentes en los alcoholes y/o los aldehídos.

35 Otros excipientes pueden ser combinados con el polipéptido del agente tensioactivo pulmonar, uno o más lípidos, y un sistema de disolventes orgánicos antes de la liofilización que incluyen, pero no están limitados a, varios azúcares tales como la dextrosa, fructosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, sorbitol, trehalosa y semejantes; agentes tensioactivos tales como, por ejemplo, el polisorbato-80, el polisorbato-20, el trioleato de sorbitán, el tiloxapol y semejantes; polímeros tales como el PEG, el dextrano y semejantes, sales tales como NaCl, CaCl<sub>2</sub> y semejantes; alcoholes, tales como el alcohol cetílico y tampones.

El péptido del agente tensioactivo pulmonar es combinado con los fosfolípidos DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina), POPG (palmitoiloleoil fosfatidilglicerol) y el ácido graso libre ácido palmítico (PA). Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5.789.381.

5 La primera etapa en la preparación de una mezcla pre-liofilizada es obtener una mezcla líquida sustancialmente homogénea del péptido del agente tensioactivo pulmonar, fosfolípidos y ácido graso en un sistema de disolventes orgánicos que contienen 93-100 % del disolvente orgánico, preferiblemente 95 % de etanol. Por la expresión "sustancialmente homogéneo" se entiende que los componentes están dispersados uniformemente entre sí, por ejemplo, como en una solución. Los API son mezclados en el sistema de disolventes orgánicos calentados a 45 °C + 5 °C hasta que se obtiene una solución. La solución resultante es filtrada entonces a través de un filtro estéril (0,22 micrones) en un tampón, preferiblemente, la solución del tampón de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) calentada a 45 °C ± 5 °C y se agita para producir la mezcla de pre-liofilización en la forma de una suspensión liposómica, que tiene la concentración del disolvente orgánico en un intervalo entre 3 % y por debajo del 20 % (v/v) del volumen total de la mezcla de pre-liofilización, preferiblemente desde 3 % hasta 15 %, más preferiblemente desde 5 % hasta 10 % y todavía más preferiblemente desde 7 % hasta 10 %, siendo el resto agua y/o tampón.

15 En ciertas realizaciones preferidas, una mezcla del péptido del agente tensioactivo pulmonar, los fosfolípidos DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina) y POPG (palmitoiloleoil fosfatidilglicerol) y el ácido graso libre ácido palmítico (PA) se combina con el sistema de disolventes orgánicos para formar la mezcla líquida sustancialmente homogénea. Los componentes individuales pueden estar presentes en la mezcla a cualquier concentración. La concentración total del fosfolípido en la dispersión puede variar, por ejemplo, desde aproximadamente 1 hasta por encima de aproximadamente 80 mg del contenido de fosfolípidos totales/ml. Los tampones adecuados incluyen, pero no están limitados, tris acetato, tris clorhidrato, fosfato de sodio, fosfato de potasio y semejantes. Los tampones son típicamente los que están disponibles comercialmente.

25 En una realización preferida, la suspensión liposómica para uso en los métodos de la presente invención comprende DPPC, POPG, PA y KL4 (proporción en peso de aproximadamente 7,5 : 2,5 : 1,35 : 0,267) en un disolvente aceptable fisiológicamente que tiene la concentración del disolvente orgánico en un intervalo de entre 3 % y por debajo del 20 % (v/v) del volumen total de la mezcla de pre-liofilización, preferiblemente desde 3 % hasta 15 %, más preferiblemente desde 5 % hasta 10 % y todavía más preferiblemente desde 7 % hasta 10 % siendo el resto agua y/o tampón.

30 En ciertas realizaciones, el sistema de disolventes orgánicos comprende excipientes adicionales, incluyendo, pero sin estar limitado, varios azúcares tales como dextrosa, fructosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, sorbitol, trehalosa y semejantes; agentes tensioactivos tales como, por ejemplo, polisorbato-80, polisorbato-20, trioleato de sorbitán, tiloxapol y semejantes; polímeros tales como PEG, dextrano y semejantes; sales tales como NaCl, CaCl<sub>2</sub> y tampones. En ciertas realizaciones preferidas, el sistema de disolventes orgánicos está sustancialmente libre de sal. En ciertas realizaciones preferidas, el sistema de disolventes orgánicos está sustancialmente libre de NaCl.

35 En ciertas realizaciones, el sistema de disolventes orgánicos puede ser preparado combinando la totalidad de los componentes del sistema. Por ejemplo, en ciertas realizaciones en donde el disolvente orgánico consiste en el disolvente orgánico y un medio acuoso a temperatura ambiente, el medio acuoso y el disolvente orgánico pueden ser combinados para componer el sistema de disolventes orgánicos. Preferiblemente, el sistema de disolventes orgánicos es una emulsión o una solución miscible.

40 El disolvente orgánico seleccionado es compatible preferiblemente con la filtración y liofilización en condiciones estériles. Preferiblemente, los disolventes orgánicos de esta invención son seleccionados del grupo que consiste en oxihidrocarburos inferiores, halohidrocarburos inferiores, haloxihidrocarburos inferiores, sulfoxihidrocarburos inferiores, ciclohidrocarburos inferiores y combinaciones de los mismos.

45 Los disolventes orgánicos adecuados para uso en esta invención incluyen, pero no están limitados, alcohol isopropílico, metanol, etanol, acetona, acetonitrilo, ciclohexano, clorobutanol, dimetilsulfóxido, t-butanol, hexanol, alcohol bencílico, ácido acético, pentanol (1-pentanol), n-butanol, n-propanol, acetato de metilo, carbonato de dimetilo, metil-etil-acetona, metil-isobutil-acetona, tetracloruro de carbono, hexafluoroacetona, clorobutanol, dimetilsulfona, ciclohexano y combinaciones de los mismos. Los disolventes preferibles incluyen alcoholes inferiores, tales como t-butanol, etanol, alcohol isopropílico y semejantes. Un disolvente particularmente preferido de la invención es el etanol.

55 En ciertas realizaciones preferidas, la composición del agente tensioactivo pulmonar es lucinactant u otra formulación del agente tensioactivo pulmonar que comprende el péptido del agente tensioactivo pulmonar sintético KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (KL4; SEC ID NO:1). En ciertas realizaciones preferidas, el agente tensioactivo pulmonar liofilizado de la invención, cuando es reconstituido, podría dar una combinación de API: DPPC, POPG, PA y el péptido de KL4 en una proporción en peso de aproximadamente 7,5 : 2,5 : 1,35 : 0,267 o en la misma proporción en peso que en el agente tensioactivo pulmonar sintético líquido SURFAXIN® (lucinactant) de Discovery Laboratories, Inc. (Warrington, PA, EE.UU.). En ciertas realizaciones, la composición del agente tensioactivo pulmonar es formulada a concentraciones, por ejemplo, de 10, 20 y 30 mg/ml del contenido del fosfolípido. En ciertas otras realizaciones, la composición del agente tensioactivo pulmonar es formulada a concentraciones más

grandes, por ejemplo, a un contenido del lípido de 60, 90, 120 o más mg/ml, con los incrementos concomitantes en la concentración de KL4.

En ciertas realizaciones ejemplares de la presente invención, las cantidades relativas del péptido del agente tensioactivo pulmonar, los fosfolípidos y los ácidos grasos libres es de aproximadamente 1 parte en peso de un péptido del agente tensioactivo sintético; aproximadamente desde 20 hasta aproximadamente 150 partes en peso de fosfolípidos por parte en peso del péptido del agente tensioactivo sintético; aproximadamente desde 0 hasta aproximadamente 25 partes en peso del ácido graso libre por parte en peso del péptido del agente tensioactivo sintético. En ciertas realizaciones, la cantidad relativa del sistema de disolventes orgánicos está en el intervalo de más de 62,5 y menor que 250 partes en peso del péptido del agente tensioactivo pulmonar. En ciertas realizaciones, el sistema de disolventes orgánicos está presente en un intervalo desde 80 hasta 125 partes en peso por parte en peso del péptido del agente tensioactivo pulmonar. En ciertas realizaciones ejemplares, las cantidades relativas del péptido del agente tensioactivo pulmonar, los fosfolípidos y el ácido graso libre es de aproximadamente 1 parte en peso del péptido del agente tensioactivo pulmonar, el KL4; desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 100 partes en peso de DPPC; desde 0 hasta aproximadamente 50 partes en peso de POPG y aproximadamente desde 0 hasta aproximadamente 25 partes en peso de ácido palmítico.

El material liofilizado de la invención apareció blanco, dispersado uniformemente en los viales, de forma cilíndrica (es decir, imitando la forma de los viales), denso con una contracción mínima cuando se compara con el relleno inicial, que tiene una estructura rígida de tal modo que no se mueva durante la inversión del vial y sin trazas de materiales o reborde por encima de la superficie superior del material. El agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado de la invención preparado por el método descrito anteriormente tiene un área superficial específica más grande (de al menos 2,2 m<sup>2</sup>/g) y un área de poro total más grande (al menos 40 %) que la de los agentes tensioactivos pulmonares preparados por otros métodos de liofilización. Preferiblemente, el área superficial específica del agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado de la invención está en el intervalo desde aproximadamente 3,7 m<sup>2</sup>/g hasta aproximadamente 2,2 m<sup>2</sup>/g. También se encontró que además del uso del recocado para crear la estructura de la torta más rígida, la variación en el vacío, durante el secado primario influyó en el área superficial específica. Los datos de BET representados en el Ejemplo 15 muestran que a 40 micrones, el área superficial específica fue la más grande cuando se compara con el área superficial específica de las muestras hechas a 150 micrones. Este descubrimiento ayudará además a refinar el diseño de la estructura de la torta del agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado.

El material liofilizado pasó la inspección de la humedad residual, el tiempo de reconstitución, el pH, la viscosidad y su actividad biológica. El material liofilizado fue reconstituido con 10 ml del agua estéril para la inyección (WFI) y los sólidos fueron dispersados dentro del intervalo de 20 a 30 segundos. El pH estuvo en el intervalo de 7,6 – 7,9. La viscosidad medida por el uso del Viscosímetro de Brookfield, Modelo LVDV-II a 37 °C (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA) estuvo en el intervalo de 77-105 cP (0,077-0,105 Pa.s). Las muestras fueron analizadas con el aparato Surfactometer de Burbujas Pulsantes (PBS) modelo EC-PBS-B (Electronetics Corporation, EUA, ahora General Transco Inc., Largo, FL) a 37 °C para verificar la capacidad para reducir la tensión superficial (por ejemplo, la actividad biológica); las mediciones promedio de la tensión superficial estuvieron entre 2 y 7 dinas/cm (2 x 10<sup>-3</sup> hasta 7 x 10<sup>-3</sup> N/m). El valor aceptable para un agente tensioactivo pulmonar efectivo está por debajo de 10 dinas/cm (0,01 N/m).

Una manera de caracterizar un material liofilizado es medir su área superficial específica. El área superficial específica es una medida de la superficie expuesta de una muestra sólida sobre la escala molecular. El método del análisis del área superficial BET (Brunauer Emmet and Teller) es un modelo establecido utilizado para determinar el área superficial específica de los sólidos por la adsorción física de las moléculas de gas (véase la Farmacopea de EE.UU., Título: <846> Área Superficial Específica ([http://www.pharmacopeia.en/v29240/usp29nf24s0\\_e846.html](http://www.pharmacopeia.en/v29240/usp29nf24s0_e846.html))). Las muestras son preparadas comúnmente por calentamiento mientras que se evacua simultáneamente o se hace fluir el gas sobre la muestra para eliminar las impurezas liberadas. Las muestras preparadas son enfriadas entonces con nitrógeno líquido o criptón y analizadas por la medición del volumen del gas adsorbido a las presiones específicas. Las pruebas de 11 puntos de BET se llevaron a cabo sobre las muestras seleccionadas por Micromeritics Pharmaceutical Services (Norcross, GA) utilizando un Sistema de Porosidad y Área Superficial Acelerada ASAP® 2420 (Micromeritics Instruments Co., (Norcross, GA). Las muestras fueron desgasificadas a 25 °C durante 16 horas bajo vacío. Se utilizó 100 % de criptón como material adsorbente. La Temperatura del Baño del Análisis fue de aproximadamente 77K. Los siguientes parámetros fueron medidos: Masa de la Muestra (g), Espacio Libre Frío (cm<sup>3</sup>), Espacio Libre Caliente (cm<sup>3</sup>), la Presión de Saturación (Po) (mm Hg), La Presión Absoluta (P) (mm Hg) y el Tiempo Transcurrido. Las Gráficas Lineales de las Isotermas fueron calculadas para cada muestra, en donde el eje Y fue la Cantidad Adsorbida (cm<sup>3</sup>/g de STP) y el eje X fue la Presión Relativa (P/Po). El STP es conocido como la temperatura y presión estándares, es decir, la temperatura de 273,15 K y presión atmosférica (1,013 x 10<sup>5</sup> Pa). Los datos son presentados en los Ejemplos posteriores.

Otro parámetro útil en la caracterización de la morfología del material liofilizado es su porosidad definida como una relación del volumen de la totalidad de los poros en un material con respecto al volumen total. La porosidad del material liofilizado fue determinada utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL 6480 Scanning Electron Microscope (JEOL, Japón). Las muestras fueron eliminadas de los viales por el corte de la parte superior del vial con una sierra de diamante y el corte a la mitad a través de su anchura. Las secciones transversales de las

muestras cortadas fueron colocadas en la unidad de SEM y se visualizaron a una amplificación (X) de 20 y 100. El análisis se efectuó bajo vacío a temperatura ambiente. El área superficial de la amplificación X20 fue de aproximadamente 6,4 mm x 5,1 mm. El área superficial de la amplificación X100 fue de aproximadamente 1.200 micrones x 965 micrones.

5 Las micrografías de SEM de las matrices seccionadas transversalmente revela una estructura porosa o de microcanal en la sección transversal completa de cada muestra. Dos puntos de recolección fueron seleccionados para la formación de imágenes: la parte superior de la torta (área no cortada) como la “superficie A” y el interior de la torta como la “superficie B”. Las figuras 3A y 3B muestran la imagen ampliada del agente tensioactivo pulmonar liofilizado de la invención hecho en viales de 30 ml, a una amplificación de X20, la superficie A y la superficie B, respectivamente. Las figuras 4A y 4B muestran la imagen ampliada de la Formulación II del agente tensioactivo pulmonar liofilizado hecho por el Ciclo de Liofilización de Bornstein en viales de 30 ml como se describe en el Ejemplo 3, a una amplificación de X20, de la superficie A y de la superficie B, respectivamente. Las figuras 5A y 5B muestran la imagen ampliada del agente tensioactivo pulmonar liofilizado de la invención hecho en viales de 30 ml, a una amplificación de X100, la superficie A y la superficie B, respectivamente. Las figuras 6A y 6B muestran la imagen ampliada de la Formulación II del agente tensioactivo pulmonar liofilizado hecho por el Ciclo de Liofilización de Bornstein en viales de 30 ml como se describe en el Ejemplo 3, a una amplificación de X100, de la superficie A y de la superficie B, respectivamente.

20 Notablemente, la Formulación III (A0490-62) hecha como se describió en el Ejemplo 4 utilizando el “Ciclo de Liofilización de Johnson” podría no ser analizada con el SEM debido a su fragilidad. La torta no pudo tolerar ni tan siquiera una ligera presión de la sierra y se desmoronó. La comparación del área del poro rotal de la Formulación I (A0490-55) hecha como se describió en el Ejemplo 2 utilizando el Ciclo de Liofilización Novedoso con el área del poro total de la Formulación II (A0490-58) hecha como se describió en el Ejemplo 3 utilizando el “Ciclo de Liofilización de Bornstein”, se observó que la Formulación I fue más porosa con la diferencia absoluta de al menos 11 %.

25 Se utilizó el software Images Plus 2.0 de MOTIC® (Motic Group Co., Ltd, Xiamen, China) para un microscopio, para calcular el área abierta en la imagen seleccionada. El filtro de relevo fue aplicado para realzar las áreas abiertas y luego, utilizando las características de autosegmentación y el cálculo automático, se calculó el área superficial abierta. Este método minimiza la manipulación manual de los datos y se eliminó la desviación entre las imágenes comparativas. Para la formulación I, las áreas porosas constituyeron el 49,1 % del área medida para la parte superior de la muestra (Superficie A) y el 50,5 % del área medida para el interior de la torta (Superficie B). Para la Formulación II, las áreas del poro constituyeron el 37,3 % del área medida para la parte superior de la muestra (Superficie A) y el 36,7 % del área medida para el interior de la torta (Superficie B). Las diferencias respectivas fueron de 11,8 % y 13,8 %.

35 El cálculo del poro manual fue llevado a cabo para probar la exactitud del método anterior para las muestras mostradas en la Figura 5A (Formulación I, superficie A, X100) y Figura 6A (Formulación II, superficie A, X100). Cada micrografía fue recortada al tamaño de 6,4 mm (anchura) y 3,9 mm (altura) y fueron medidos 20 “poros” en su altura y anchura en cada imagen y se compararon.

40 La composición del agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado de la invención tiene la combinación única de un área superficial más grande (al menos 2,7 m<sup>2</sup>/g), una porosidad más grande (por encima del 40 % en volumen) y mostró rigidez, por ejemplo, la resistencia observada al movimiento cuando es invertida y también resistencia al movimiento cuando el vial que contiene el material era tapado. Una masa más rígida podría correlacionarse con la movilidad molecular reducida, un precursor para las reacciones químicas, y por lo tanto un producto más estable.

45 Previamente se observó que de las cuatro API, la sinapultida o el péptido de KL4 se degrada más rápido en un medio ambiente líquido que en estado sólido como material liofilizado (véase la patente de EE.UU. No. 5.952.303 de Bornstein). Basado en la creencia que la apariencia uniforme de la formulación liofilizada también es una manifestación de un producto más estable, los inventores anticipan que la formulación liofilizada obtenida por el método de la invención descrito en este documento mostrará una estabilidad mejorada de al menos el péptido de KL4 al menos en menos de los 3 meses de almacenamiento a 25 °C. Se espera que dentro un plazo de almacenamiento más prolongado, por ejemplo, 6 meses y 9 meses a 25 °C y también si es almacenado a temperaturas más elevadas, por ejemplo, 30 °C y 40 °C, la estabilidad de KL4 y otros API será estadísticamente mejor para la formulación liofilizada obtenida por el método inventivo cuando se compara con la formulación liofilizada hecha por otros procedimientos de liofilización. La mejora en la estabilidad se espera que esté al menos por encima del 2 %, al menos por encima del 5 % o al menos por encima del 10 %.

55 Los agentes tensioactivos pulmonares liofilizados de la invención pueden ser reconstituidos con agua u otros diluyentes farmacéuticamente aceptables. El uso de agentes tensioactivos pulmonares, líquidos o liofilizados, ya ha sido descrito previamente. Los agentes tensioactivos pulmonares liofilizados novedosos exhiben una torta excelente y una capacidad para resistir el movimiento y el transporte, los cuales son atributos necesarios del producto farmacéutico.

La invención será ilustrada con mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos, pero se debe entender que la presente invención no se considera que esté limitada a los mismos.

**Ejemplos**

Ejemplo 1

- 5 La liofilización se llevó a cabo utilizando el procedimiento novedoso y los procedimientos publicados previamente descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 5.952.303 y 7.582.312 para demostrar las diferencias impartidas por cada procedimiento sobre el producto liofilizado resultante.

Materiales: los ingredientes en las formulaciones liofilizadas por cada uno de los tres procedimientos son resumidos más abajo en la Tabla 1. Las cantidades reales son ajustadas según la pureza de las materias primas.

- 10 Tabla 1. Las materias primas para las Formulaciones I, II, y III (Tamaño del Lote 3000 g).

Materiales	Cantidad (mg) por gramo de formulación	Cantidad (mg) por lote
KL <sub>4</sub> (API)	0,74 mg	2,22 g
DPPC (API)	18,00 mg	54,00 g
POPG, Na (API)	5,82 mg	17,47 g
PA (API)	3,113 mg	9,38 g
95% Etanol	0,105 mg	316 g
Tampón TRIS:		
NaCl	5,83 mg	17,49 g
Trometamina	1,86 mg	5,57 g
Agua	0,859 g	2578 g

- 15 Procedimiento: fueron preparados dos lotes de 3000 gramos para cada uno de los tres procedimientos. fue utilizada Una jeringuilla para cargar el peso de relleno estándar de 13,7 gramos por vial. Preparación de una mezcla de pre-l  
 20 fue filtrada en condiciones estériles utilizando una presión a través de un filtro de 33 mm de 0,22 micrones en una solución de tampón tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) en agitación a 45 °C ± 2 °C para producir una formulación liposómica con una concentración de etanol final del 10 % (p/p). Después del enfriamiento a una temperatura por debajo de 30 °C, la formulación liposómica resultante, es decir, la mezcla de pre-l  
 25 de los viales de liofilización de vidrio de borosilicato de 20, 30 y 50 ml a un volumen de relleno de 13,7 g/vial. El material liofilizado resultante fue almacenado a 5 °C.

Ejemplo 2

Formulación I. La mezcla de pre-liofilización de la Tabla 1 fue utilizada como relleno en viales de vidrio de 20, 30 y 50 ml y fue liofilizada utilizando el método de liofilización novedoso descrito anteriormente. La Tabla 2 resume los parámetros del procedimiento de liofilización.

- 25 Tabla 2. Parámetros para el Procedimiento de Liofilización Novedoso

Fases del Ciclo Liofilizado	Etapas	Parámetros
Fase de inicio*	Temperatura de Mantenimiento Inicial:	5° C mantenidos durante 2 horas
Fase de congelación*	Etapa de enfriamiento	-20° C a 1,0° C/min
	Etapa de enfriamiento	-30° C a 0,5° C/min
	Etapa de enfriamiento	-40° C a 0,25° C/min

ES 2 557 805 T3

	Etapa de enfriamiento	-50° C a 0,10° C/min
	Etapa de mantenimiento	-50° C durante 4 horas
Fase de recocido*	Etapa de calentamiento	-22° C a 0,5° C/min
	Etapa de recocido	-22° C durante 4 horas
	Etapa de enfriamiento	-30° C a 0,5° C/min
	Etapa de enfriamiento	-40° C a 0,25° C/min
	Etapa de enfriamiento	-50° C a 0,10° C/min
	Etapa de mantenimiento	-50° C durante 4 horas
Fase de secado primaria **	Vacío:	40 mT
	Etapa de mantenimiento	-50° C durante 1 hora
	Etapa de calentamiento	-25° C a 0,10° C/min
	Etapa de mantenimiento	-25° C durante 100 horas
Fase de secado secundaria**	Etapa de calentamiento	25° C a 0,5° C/min
	Etapa de mantenimiento	25° C durante 6 horas
Fase de acabado **	Flujo inverso:	N <sub>2</sub> a ½ bar (50 kPa) antes del sellado de los viales

\* La fase se lleva a cabo a la presión atmosférica.

\*\* La fase se lleva a cabo bajo vacío.

Ejemplo comparativo 3

- 5 Formulación comparativa II. La mezcla de pre-liofilización de la Tabla 1 fue utilizada como relleno en viales de vidrio de 20, 30 y 50 ml y fue liofilizada utilizando el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. No. 5.952.303 de Bornstein ("Ciclo de Liofilización de Bornstein"). La Tabla 3 resume los parámetros del procedimiento de liofilización.

Tabla 3. Parámetros de Liofilización para el Ciclo de Liofilización de Bornstein

Temperatura de Mantenimiento Inicial:	25° C
Etapa de enfriamiento*	-40° C a 1,0° C/min
Vacío:	40 mT
Etapa de mantenimiento*	-40° C durante 2 horas
Etapa de calentamiento**	0° C a 0,5° C/min
Etapa de mantenimiento**	0° C durante 48 horas
Etapa de calentamiento**	26° C a 0,5° C/min
Etapa de mantenimiento**	26° C durante 12 horas
Flujo inverso:	N <sub>2</sub> a ½ bar (50 kPa) antes del sellado de los viales*

\* La fase se lleva a cabo a la presión atmosférica.

\*\* La fase se lleva a cabo bajo vacío.

- 10 Ejemplo comparativo 4

Formulación comparativa III. La mezcla de pre-liofilización de la Tabla 1 fue utilizada como relleno en viales de vidrio de 20, 30 y 50 ml y fue liofilizada utilizando el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. No. 7.582.312 de Johnson ("Ciclo de Liofilización de Johnson"). La Tabla 4 resume los parámetros del procedimiento de liofilización.

Tabla 4. Parámetros de Liofilización para el Ciclo de Liofilización de Johnson

Temperatura de Mantenimiento Inicial*:	25° C
Etapa de enfriamiento*	-30° C a 1,0° C/min
Etapa de mantenimiento*	-30° C hasta que los viales estén llenos
Vacío**:	500 mT
Etapa de calentamiento**	Mantenida hasta que los viales alcancen la temperatura
Flujo inverso**:	N <sub>2</sub> a ½ bar (50 kPa) antes del sellado de los viales*

\* La fase se lleva a cabo a la presión atmosférica.

\*\* La fase se lleva a cabo bajo vacío.

Ejemplo 5

- 5 Evaluación de la apariencia física del material liofilizado. Los 20 viales fueron seleccionados arbitrariamente. Los lotes 55-20, 55-30 y 55-50 corresponden a la Formulación I en viales de 20, 30 y 50 ml, respectivamente. Los lotes 58-20, 58-30 y 58-50 corresponden a la Formulación II en viales de 20, 30 y 50 ml, respectivamente. Los lotes 62-20, 62-30 y 62-50 corresponden a la Formulación III en viales de 20, 30 y 50 ml, respectivamente. Todas las variables categóricas fueron resumidas utilizando la frecuencia y, cuando sea apropiado, el porcentaje. Todas las variables continuas fueron resumidas utilizando la Desviación Estándar (SD), con la mediana y el intervalo (mínimo, máximo)
- 10 utilizado para las evaluaciones seleccionadas. La Formulación I y las Formulaciones Comparativas II y III liofilizadas en viales de 20, 30 y 50 ml fueron inspeccionadas visualmente para verificar los signos de levitación tales como un anillo blanco por encima de la altura de relleno inicial. Para un vial de 20 ml, la altura de relleno del líquido fue de 25 mm, para un vial de 30 ml, la altura de relleno del líquido fue de 20 mm, y para un vial de 50 ml, la altura de relleno del líquido fue de 15 mm.
- 15

Las mediciones de la distancia de levitación real y la medición desde el fondo del vial hasta el anillo blanco por encima de la altura de relleno inicial menos la altura de relleno inicial fueron tomadas y presentadas en la Tabla 5 y la Figura 2.

Tabla 5

Número de vial	Nº de lote 62-20	Nº de lote 62-30	Nº de lote 62-50	Nº de lote 58-20	Nº de lote 58-30	Nº de lote 58-50	Nº de lote 55-20	Nº de lote 55-30	Nº de lote 55-50
1	11	4	0	3	4	4	1	0	0
2	6	4	0	2	5	0	1	0	0
3	15	4	0	3	3	5	0	0	0
4	7	5	0	2	3	3	0	0	0
5	20	4	4	2	3	3	0	0	0
6	10	6	5	2	3	4	0	0	0
7	7	3	4	3	4	3	0	0	0
8	12	5	7	3	4	4	2	0	0
9	14	5	4	4	4	4	1	0	0
10	8	4	3	3	3	3	2	0	0
11	10	5	5	4	2	3	0	0	0
12	10	5	6	5	3	0	0	0	0
13	9	4	5	4	3	2	0	0	0

14	12	4	5	3	4	1	0	0	0
15	8	6	10	3	2	3	1	0	0
16	4	5	5	3	3	0	1	0	0
17	11	3	2	4	2	3	0	0	0
18	9	5	3	4	3	2	0	0	0
19	10	5	2	4	2	2	0	0	0
20	8	5	4	3	3	2	0	0	0

Las muestras de la Formulación 1 (lotes 55-30 y 55-50) (el agente tensioactivo pulmonar liofilizado de la invención) en los viales de 30 y 50 ml no tuvieron ninguna señal de levitación mientras que las muestras en los viales de 20 ml (lote 55-20), tuvieron alguna ligera levitación de hasta 2 mm en 7 de las 20 muestras. Las muestras de la Formulación Comparativa II (58-20, 58-30 y 58-50) en la totalidad de los tres tamaños y así como las muestras de la Formulación Comparativa III (62-20, 62-30 y 62-50), con las muestras de la Formulación Comparativa III en los viales de 20 ml fueron las peores, todas exhibieron signos de levitación durante el procedimiento de liofilización. Claramente, utilizando el procedimiento de liofilización novedoso, el problema de la levitación fue reducido significativamente o eliminado.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 20 viales seleccionados aleatoriamente de la Formulación I y las Formulaciones Comparativas II y III liofilizadas en viales de 20, 30 y 50 ml fueron inspeccionados para verificar las señales de movimiento durante la inversión, por la inversión de un vial una vez. La figura 1 es un diagrama de barras que muestra un número de viales que contienen el material liofilizado que se movió durante la inversión (mostrado como barras negras) y el número de viales que contienen el material liofilizado que no se movió durante la inversión (mostrado como barras sombreadas). Ninguna de las muestras de la Formulación I (el agente tensioactivo pulmonar liofilizado de la invención) se movieron durante la inversión, mientras que la totalidad de las muestras de la Formulación Comparativa III y la mayoría de las muestras de la Formulación Comparativa II se movieron. Esta prueba demostró que el agente tensioactivo pulmonar liofilizado de la invención tuvo una posición superior en los viales cuando se compara con las otras muestras.

Ejemplo 6

- 20
- Estudios propuestos para la estabilidad y la potencia de API. Los cuatro API, KL4 (sinapultida), DPPC, POPG y ácido palmítico (PA), fueron probados para verificar la integridad durante los intervalos de tiempo seleccionados, en el transcurso de 3 hasta 12 meses de almacenamiento a 25 °C, 30 °C o 40 °C utilizando HPLC. Los parámetros de HPLC son presentados en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones Cromatográficas

Instrumento:	HPLC (Waters ALLIANCE , Waters Corp, Milford, MA)
Columna:	Zorbax SB-C18 9 (Agi lent Technologies, Santa Clara, CA) 150 x 4,6 mm, tamaño de partículas 3,5 micras o columna equivalente de las misma dimensiones y fase
Temperatura de columna:	50° C
Caudal:	0,8 mL/minuto
Detección:	Detector de Aerosol Cargado Corona Plus (CAD); ESA Corona Plus CAD
Volumen de Inyección:	Al menos 33 $\mu$ L,
Nitrógeno (N <sub>2</sub> ):	Generador de N <sub>2</sub> de Flujo de Nitrógeno; ajustado a 35 psi
Fase Móvil A:	Metanol : Agua : Ácido Trifluoroacético (50,0 : 50,0 : 0,8, v/v/v)
Fase Móvil B:	Isopropanol : Metanol : Tetrahidrofurano : Ácido Trifluoroacético (70 : 15 : 15 : 0,8, v/v/v/v)

- 25
- Los estándares que incluyen cada uno de los 4 API son aplicados para averiguar la configuración de la solución. Las muestras fueron cargadas sobre la columna y se calculan las cantidades del API.

Ejemplo 7



5 La Formulación I y las Formulaciones Comparativas II y III en viales de 20, 30 y 50 ml fueron sometidas al mismo tiempo a la prueba de BET. Notablemente, cuando la Formulación I y las Formulaciones Comparativas II y III fueron transportadas a Micromeritics por medio de FEDEX, durante la noche, para la prueba de BET, la Formulación Comparativa III no llegó intacta, de tal modo que la torta había colapsado visiblemente y, por lo tanto, fue inutilizable para la prueba. El material fue transportado nuevamente utilizando un empaque más seguro y todavía las muestras en los viales de 50 ml (62-50) aparecieron colapsadas. Los resultados de la prueba para la muestra 62-50 podrían no representar el valor verdadero.

10 La prueba de BET fue efectuada como sigue: Adsorbente de Análisis: Kr; Corrección Térmica; Si; Intervalo de Equilibrio: 10 s, Temperatura Ambiental: 22,00 °C; Desgasificación Automática: Si. Los resultados para el material liofilizado de la invención (Formulación I) en viales de 20 ml, 30 ml y 50 ml se representan en la Tabla 7. Los resultados para las Formulaciones Comparativas II y III se representan en la Tabla 8.

Tabla 7

Parámetros	Muestra: 55-20 Formulación 1, en viales de 20 ml	Muestra: 55-30 Formulación 1, en viales de 30 ml	Muestra: 55-50 Formulación I, en viales de 50 ml
Temp. del Baño de Análisis	77,155K	77,139K	77,110K
Masa de la Muestra	0,3762 g	0,4164 g	0,1844 g
Espacio Libre Caliente Medido	27,7288 cm <sup>3</sup>	27,4722 cm <sup>3</sup>	28,0054 cm <sup>3</sup>
Espacio Libre Frio	84,7298 cm <sup>3</sup>	83,1997 cm <sup>3</sup>	85,6894 cm <sup>3</sup>
Área Superficial de Único Punto	Medida a P/Po = 0,241772386: 2,4402 m <sup>2</sup> /g	Medida a P/Po = 0,239917356: 2,5954 m <sup>2</sup> /g	Medida a P/Po 0,243909821: 1,9668 m <sup>2</sup> /g
Área Superficial BET	3,4203 m <sup>2</sup> /g ± 0,0239 m <sup>2</sup> /g	3,6868 ± 0,0194 m <sup>2</sup> /g	2,7108 ± 0,0243 m <sup>2</sup> /g
Pendiente	1,438722 ± 0,011382 g/cm <sup>3</sup> STP	1,328621 ± 0,007963 g/cm <sup>3</sup> STP	1,825983 ± 0,018413 g/cm <sup>3</sup> STP
Corte eje Y	0,211127 ± 0,001832 g/cm <sup>3</sup> STP	0,201998 ± 0,001275 g/cm <sup>3</sup> STP	0,255709 ± 0,003006 g/cm <sup>3</sup> STP
C	7,814496	7,577384	8,140860
Qm	0,6061 cm <sup>3</sup> /g STP	0,6533 cm <sup>3</sup> /g STP	0,4804 cm <sup>3</sup> /g STP
Coefficiente de Correlación	0,9997498	0,9998563	0,9995935
Área Transversal Molecular	0,2100 nm <sup>2</sup>	0,2100 nm <sup>2</sup>	0,2100 nm <sup>2</sup>

Tabla 8

	Formulación Comparativa II, 20 ml	Formulación Comparativa II, 30 ml	Formulación Comparativa II, 50 ml	Formulación Comparativa III, 20 ml	Formulación Comparativa III, 30 ml
Área Superficial BET, m <sup>2</sup> /g	1,7613 ± 0,0167 m <sup>2</sup> /g	1,7663 ± 0,0193 m <sup>2</sup> /g	0,6462 ± 0,0069 m <sup>2</sup> /g	0,9445 ± 0,0061 m <sup>2</sup> /g	0,7282 ± 0,0032 m <sup>2</sup> /g
Qm, cm <sup>3</sup> /g STP	0,3121 cm <sup>3</sup> /g STP	0,3130 cm <sup>3</sup> /g STP	0,1145 cm <sup>3</sup> /g STP	0,1674 cm <sup>3</sup> /g STP	0,1291 cm <sup>3</sup> /g STP

- 5 El área superficial específica para las muestras de la Formulación I varió desde aproximadamente 3,7 m<sup>2</sup>/g hasta aproximadamente 2,7 m<sup>2</sup>/g. El área superficial específica para las muestras de la Formulación Comparativa II estuvo en el intervalo desde aproximadamente 1,7 m<sup>2</sup>/g. El área superficial específica para las muestras de la Formulación Comparativa III estuvo en el intervalo desde aproximadamente 0,6 m<sup>2</sup>/g hasta aproximadamente 0,9 m<sup>2</sup>/g. Claramente, el área superficial específica para las muestras de la Formulación I fue significativamente más grande que la de las otras muestras.

Ejemplo 8

Formulación IV.

- 10 Cuando se reconstituyó con 10 ml de agua estéril para inyección, la Formulación IV liofilizada proveerá la siguiente concentración de API como se muestra en la Tabla 9:

Tabla 9

API	(mg/mL)
Sinapultida (KL4)	0,862
Ácido Palmítico	4,05
DPPC	22,50
POPG	7,50

Tabla 10. Materias Primas para la Formulación IV (Tamaño del Lote de 8000 g)

Materiales	Cantidad (mg) por gramo de formulación	Cantidad (g) por lote
KL4 (API)	0,797 mg	6,376 g
DPPC (API)	17,99 mg	143,9g
POPG, Na (API)	5,82 mg	46,6 g
PA (API)	3,11 mg	24,88g
Etanol al 95%		623,2g
Tampón TRIS:		
NaCl	5,83 mg	46,64g
Trometamina	1,86 mg	14,88 g
Agua		6074 g

- 15 Varios lotes fueron preparados de acuerdo con la Tabla 10. Preparación de una mezcla de pre-liofilización: los API fueron disueltos en etanol al 95 % a 46 °C ± 1 °C para obtener una solución. La solución resultante fue filtrada a presión a través de un filtro N°. de Cat. SLGV033NS de Millipore Millex GV (PVDF) de 33 mm, 0,22 micrones, en una solución tamponada de TRIS en agitación a 45 °C ± 2 °C para producir una formulación liposómica con una concentración de etanol final de 7 % (p/p). Después del enfriamiento a una temperatura por debajo de 30 °C, la
- 20 formulación liposómica resultante, es decir, la mezcla de pre-liofilización, fue transferida hacia viales de liofilización de vidrio de borosilicato de 30 ml en un volumen de relleno de 13,7 g/vial utilizando una bomba peristáltica y liofilizada como se describe en los ejemplos 9-14, aplicaciones 1-6.

Ejemplo 9

Aplicación 2

- 25 Tabla 11

ES 2 557 805 T3

Etapa	Temperatura	Presión	Duración		Descripción	
			°C	micras		horas
Carga	1	5			Temperatura de Carga de Mantenimiento	
Congelación	2	5	1	00	Mantenido a 5,0 °C	
	3	-45	4	10	Pendiente a 0,2 °C/min	
	4	-45	4	00	Mantenido a -45 °C	
	5	-22	1	55	Pendiente a 0,2 °C/min	
	6	-22	4	00	Mantenido a -22 °C	
	7	-45	4	40	Pendiente a 0,1 °C/min	
	Evacuación	1	-45	100	0	30
Secado Primario	1	-5	100	3	20	Pendiente a 0,2 °C/min
	2	-5	100	18	00	Mantenido a -5 °C
Secado secundario	3	+25	100	2	30	Pendiente a 0,2 °C/min
	4	+25	100	13	00	Mantenido a +25 °C Prueba Prise 100□
	5	+25	100	10	00	Mantenido a +25 °C
Tampón 10,0 Psia					Final del Ciclo	

Ejemplo 10

Aplicación 3

Tabla 12

Etapa	Temperatura	Presión	Duración		Descripción	
			°C	micras		horas
Carga	1	5			Temperatura de Carga de Mantenimiento	
Congelación	1	5			Temperatura de Carga de Mantenimiento	
	2	5	1	00	Mantenido a 5,0 °C	
	3	-45	4	10	Pendiente a 0,2 °C/min	
	4	-45	4	00	Mantenido a -45 °C	
	5	-22	1	55	Pendiente a 0,2 °C/min	
	6	-22	4	00	Mantenido a -22 °C	
	7	-45	4	40	Pendiente a 0,1 °C/min	
Evacuación	1	-45	150	0	30	Succión de Vacío
Secado Primario	1	0	150	3	45	Pendiente a 0,2 °C/min
	2	0	150	18	00	Mantenido a 0 °C

ES 2 557 805 T3

Secado secundario	3	+25	150	2	05	Pendiente a 0,2 °C/min
	4	+25	150	13	00	Mantenido a +25 C Prueba Prise 100□
	5	+25	150	10	00	Mantenido a +25 °C
Tampón 10,0 Psia						Final del Ciclo

Ejemplo 11

Aplicación 4

Tabla 13

Etapa		Temperatura	Presión	Duración		Descripción
		°C		micras	horas	
Carga	1	5				Temperatura de Carga de Mantenimiento
Congelación	2	5		1	00	Mantenido a 5,0 °C
	3	-45		4	10	Pendiente a 0,2 °C/min
	4	-45		4	00	Mantenido a -45 °C
	5	-22		1	55	Pendiente a 0,2 °C/min
	6	-22		4	00	Mantenido a -22 °C
	7	-45		4	40	Pendiente a 0,1 °C/min
Evacuación	1	-45	50	0	30	Succión de Vacío
Secado Primario	1	0	50	3	45	Pendiente a 0,2 °C/min
	2	0	50	18	00	Mantenido a -5 °C
Secado secundario	3	+25	50	2	30	Pendiente a 0,2 °C/min
	4	+25	50	13	00	Mantenido a +25 C Prueba Prise 100□
	5	+25	50	10	00	Mantenido a +25 °C
Tampón 10,0 Psia						Final del Ciclo

5

Ejemplo 12

Aplicación 5

Tabla 14

Etapa		Temperatura	Presión	Duración		Descripción
		°C		micras	horas	
Carga	1	5				Temperatura de Carga de Mantenimiento
Congelación	2	5		1	00	Mantenido a 5,0 °C
	3	-45		4	10	Pendiente a 0,2 °C/min

ES 2 557 805 T3

	4	-45		4	00	Mantenido a -45 °C
	5	-22		1	55	Pendiente a 0,2 °C/min
	6	-22		4	00	Mantenido a -22 °C
	7	-45		4	40	Pendiente a 0,1 °C/min
Evacuación	1	-45	50	0	30	Succión de Vacío
Secado Primario	1	-10	50	2	55	Pendiente a 0,2 °C/min
	2	-10	50	18	00	Mantenido a -5 °C
Secado secundario	3	+25	50	2	55	Pendiente a 0,2 °C/min
	4	+25	50	13	00	Mantenido a +25 C Prueba Prise 100□
	5	+25	50	10	00	Mantenido a +25 °C
Tampón 10,0 Psia						Final del Ciclo

Ejemplo 13

Aplicación 6

Tabla 15

Etapa		Temperatura	Presión	Duración		Descripción
		°C		micras	horas	
Carga	1	5				Temperatura de Carga de Mantenimiento
Congelación	2	5		1	00	Mantenido a 5,0 °C
	3	-45		4	10	Pendiente a 0,2 °C/min
	4	-45		4	00	Mantenido a -45 °C
	5	-22		1	55	Pendiente a 0,2 °C/min
	6	-22		4	00	Mantenido a -22 °C
	7	-45		4	40	Pendiente a 0,1 °C/min
Evacuación	1	-45	150	0	30	Succión de Vacío
Secado Primario	1	-10	150	2	55	Pendiente a 0,2 °C/min
	2	-10	150	18	00	Mantenido a -5 °C
Secado secundario	3	+25	150	2	55	Pendiente a 0,2 °C/min
	4	+25	150	13	00	Mantenido a +25 C Prueba Prise 100□
	5	+25	150	10	00	Mantenido a +25 °C
Tampón 10,0 Psia						Final del Ciclo

5

Ejemplo Comparativo 14

Aplicación 1

Tabla 16

Etapa		Temperatura	Presión	Duración		Descripción
		°C	micras	horas	minutos	
Carga	1	5				Temperatura de Carga de Mantenimiento
Congelación	2	5		1	00	Mantenido a 5,0 °C
	3	-15		1	40	Pendiente a 0,2 °C/min
		-15		1	00	Mantenido a -15 °C
	4	-45		5	00	Pendiente a 0,1 °C/min
	5	-45		3	00	Mantenido a -45 °C
Evacuación	1	-45	100	0	30	Succión de Vacío
Secado Primario	1	-5	100	3	20	Pendiente a 0,2 °C/min
	2	-5	100	18	00	Mantenido a -5 °C
Secado secundario	3	+25	100	2	30	Pendiente a 0,2 °C/min
	4	+25	100	13	00	Mantenido a +25 °C Prueba Prise 100□
	5	+25	100	10	00	Mantenido a +25 °C
Tampón 10,0 Psia						Final del Ciclo

Ejemplo 15

5 Los productos liofilizados que resultan de las Aplicaciones 1-6 fueron sometidos al mismo tiempo a la prueba de BET.

La prueba de BET fue efectuada con los mismos parámetros que se describieron en el Ejemplo 7 anterior. Se probaron tres viales de cada aplicación. Los resultados son presentados en la Tabla 17.

Tabla 17

	Vial 1	Vial 2	Vial 3
	Área Superficial de BET, m <sup>2</sup> /g	Área Superficial de BET, m <sup>2</sup> /g	Área Superficial de BET, m <sup>2</sup> /g
Aplicación 1	2,8346	2,3442	2,81
Aplicación 2	2,811	2,2773	2,9054
Aplicación 3	2,3712	2,4207	2,2615
Aplicación 4	2,8611	3,0281	2,9269
Aplicación 5	2,7151	3,4333	3,2092
Aplicación 6	2,3428	2,4349	2,2654

10 Métodos: Reconstitución. Los requerimientos de una solución reconstituida son que no existe un material insoluble visible y la solución no es menos clara que el diluyente después de una cantidad predeterminada de tiempo. El volumen para la reconstitución puede retornar al producto al mismo volumen y concentración que el producto de partida para el llenado de la solución a granel y puede ser el mismo volumen propuesto para el suministro del paciente en una instalación clínica. El agua purificada, USP como diluyente, a un volumen de 10 ml fue extraída con una jeringa. El diluyente fue extruido entonces hacia el centro de la torta seca y se accionó el temporizador. El

15

- 5 producto fue inspeccionado entonces en intervalos de aproximadamente 5 minutos en una caja de iluminación para verificar la ausencia de cualquier material insoluble y la claridad de la solución. La solución, una vez totalmente reconstituida, fue caracterizada como clara, incolora, turbia, opaca y/o con grumos. Las partículas, si están presentes, fueron clasificadas desde insolubles y finas hasta fibras y vastas. Los excipientes no disueltos o API son anotados como tales.
- 10 Medición del pH – Las soluciones reconstituidas (véase anteriormente) fueron medidas para verificar el pH por USP<791>, pH. La estandarización con dos o tres tampones de pH que encuadraron el intervalo de la muestra esperada fue efectuada previa a su uso. Los tampones del pH elegidos no fueron mayores que tres unidades de pH pero, no menores que dos unidades de pH de separación (por ejemplo, 4,01, 7,00 y 10,01). Una sonda de ATC fue utilizada para la compensación automática de la temperatura. Una cantidad de la solución de la muestra suficiente para cubrir el sensor de la sonda de pH y cualquier unión de referencia sobre un lado de la sonda fue distribuida en un recipiente adecuado. La solución fue agitada suavemente y luego se dejó reposar todavía y se estabilizó a un valor constante durante un período de al menos 15 segundos, tiempo en el cual, el valor del pH exhibido fue registrado.
- 15 Titulación Colorimétrica de Karl Fischer – La prueba de la humedad siguió los métodos convencionales aceptados ampliamente descritos bajo USP<921>, Determinación del Agua. Se pesaron la muestra seca inicial y el recipiente. En un método de extracción con disolventes, con metanol anhidro, se inyectó un reactivo especial, el A.C.S. en el recipiente utilizado para suspender y disolver la sustancia seca. El volumen de extracción del metanol utilizado para cubrir el material seco fue de 13,0 ml hasta 13,7 ml para cada estudio. Luego se dejó que se remojaran las muestras durante un tiempo predeterminado para la extracción de la humedad en el producto. Luego se retiró una alícuota, se midió el volumen y después se inyectó en el recipiente de la reacción del instrumento de KF. Cuando se alcanzó un punto final de la titulación, los resultados se registraron. El instrumento de KF resuelve el contenido de agua hasta microgramos. El recipiente vacío fue pesado entonces y se calculó la humedad porcentual para los contenidos iniciales del recipiente.
- 20
- 25 Calorimetría de Exploración Diferencial a Alta Temperatura (HT DSC) – Utilizada como un medio para la determinación de la transición vítrea de los materiales sólidos, lo cual provee una información útil para la evaluación de la formulación y la evaluación del comportamiento en el estado seco. La HT DSC sigue la norma USP<891> común, Análisis Térmico, y se efectuó utilizando un DSC 7 de Perkin Elmer interconectado a un Controlador del Instrumento TAC 7/7. Los parámetros de prueba y el análisis de los datos se llevaron a cabo utilizando el software PYRIS versión 4.0 en una interfase de PC. Aproximadamente 10-15 mg del material sólido fueron colocados en una bandeja de aluminio para la muestra con una tapa ventilada rebordeada. El nitrógeno, NF, fue utilizado para purgar la muestra continuamente a una velocidad de flujo de 20 ml/minuto. El material liofilizado fue calentado para evaluar el comportamiento térmico a temperaturas más elevadas. Durante el calentamiento, la evolución o la absorción del calor desde la muestra reflejó las diferencias en la energía cuando la muestra sufrió un evento térmico. Los datos de la exploración fueron registrados y se representaron simultáneamente utilizando el software 4.0 de Pyris®. Los cálculos identificaron la temperatura al inicio y el pico de un evento térmico una vez que se complementó la exploración. Basado en los resultados de la exploración, se determinaron las temperaturas para eventos térmicos tales como la transición vítrea (T<sub>g</sub>), la cristalización, el punto de fusión (T<sub>m</sub>) y el calor de fusión asociado y/o el calor específico del producto terminado seco utilizando este método.
- 30
- 35
- 40 Resultados. Los valores de humedad residual promedio de las muestras liofilizadas de la Formulación I estuvieron cercanos al 0 %. El tiempo de reconstitución promedio fue de entre 8 y 10 segundos. Las exploraciones de DSC a alta temperatura efectuadas sobre el material, a 2 °C por minuto, indicaron que un pico endotérmico significativo consistente fue observado a una temperatura de entre 49,0 °C y 51,0 °C.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de un agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado que tiene una levitación de la torta reducida o eliminada durante el procedimiento, comprendiendo el procedimiento:
- 5 proporcionar a una cámara de liofilización una mezcla de pre-liofilización que comprende dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoil fosfatidilglicerol (POPG), ácido palmítico y un péptido sintético con SEQ ID NO:1 (polipéptido de KL4) dispersados en un disolvente que tiene un disolvente orgánico en un intervalo de entre 3 % (v/v) y por debajo del 20 % (v/v) del volumen total de la mezcla de pre-liofilización siendo el resto agua y/o un tampón, en donde la mezcla de pre-liofilización es llenada en un recipiente;
- 10 reducir la temperatura dentro de la cámara de liofilización para empezar el enfriamiento y la solidificación de la mezcla de pre-liofilización en una fase de congelamiento; en donde la fase de congelamiento comprende enfriar la mezcla de pre-liofilización a una primera temperatura de  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  o por debajo de  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de entre 0,1 y  $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y mantener la mezcla de pre-liofilización a la primera temperatura durante un primer período de tiempo suficiente para solidificar al menos el 76 % del disolvente para formar una primera mezcla solidificada;
- 15 llevar a cabo la fase de recocido antes de una fase de secado primario y reduciendo o eliminando por este medio la levitación de la torta de la primera mezcla solidificada y en el tensioactivo pulmonar sintético liofilizado, en donde la fase de recocido comprende (i) calentar la primera mezcla solidificada a una segunda temperatura seleccionada para reducir o eliminar la levitación de la primera mezcla solidificada, (ii) mantener la primera mezcla solidificada a la segunda temperatura durante un segundo período de tiempo suficiente para reducir o eliminar la levitación de la primera mezcla solidificada, y (iii) enfriar la primera mezcla solidificada a una tercera temperatura de  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  o por
- 20 debajo de  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad entre 0,1 hasta  $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  para formar una segunda mezcla solidificada, en donde la segunda mezcla solidificada es mantenida a la tercera temperatura durante un tercer período de tiempo suficiente para promover la separación de un disolvente orgánico no congelado a partir de la segunda mezcla solidificada y por esto lograr una migración del disolvente orgánico no congelado a una interfase entre el recipiente y la segunda mezcla solidificada;
- 25 llevar a cabo la fase de secado primaria a una presión reducida de 30 mT o más elevada, en donde la segunda mezcla solidificada es mantenida a la tercera temperatura durante un cuarto período de tiempo suficiente para eliminar al menos el 5 % del disolvente orgánico, seguido por el calentamiento a una cuarta temperatura suficiente para evitar que la segunda mezcla solidificada levite en el recipiente y retener una estructura establecida durante la fase de recocido, y además mantener la cuarta temperatura durante un quinto período de tiempo suficiente para
- 30 eliminar al menos el 70 % del disolvente y formar por esto una tercera mezcla solidificada; y
- llevar a cabo una fase de secado secundaria a presión reducida durante un sexto período de tiempo suficiente para producir el agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado que tiene un contenido del disolvente residual como mucho del 2 %, en donde el agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado tiene un área superficial específica de al menos  $2,2\text{ m}^2/\text{g}$ .
- 35 2. El procedimiento de la reivindicación 1, caracterizado porque una proporción del volumen de la mezcla de pre-liofilización en el recipiente con respecto al volumen del recipiente es desde aproximadamente 28 % hasta aproximadamente 68 %.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la relación de una altura de la mezcla de pre-liofilización en el
- 40 recipiente con respecto al diámetro del recipiente está en el intervalo desde aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 0,8.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento proporcionar la mezcla de pre-liofilización en donde el disolvente orgánico está en el intervalo desde aproximadamente 3 % hasta aproximadamente 15 %.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento proporcionar la mezcla de pre-liofilización en donde el disolvente orgánico está en el intervalo desde aproximadamente 5 % hasta aproximadamente 10 %.
- 45 6. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento proporcionar la mezcla de pre-liofilización en donde el disolvente orgánico está en el intervalo desde aproximadamente 7 % hasta aproximadamente 10 %.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, comprendiendo el procedimiento:
- llevar a cabo la fase de congelamiento, en donde la mezcla de pre-liofilización es enfriada a la primera temperatura de  $-50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad entre 0,1 y  $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ;
- 50 llevar a cabo la fase de recocido, en donde la primera mezcla solidificada es (i) calentada a la segunda temperatura de  $-22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad entre 0,1 y  $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , (ii) mantenida a la segunda temperatura durante un segundo período de tiempo entre 3 y 8 horas, (iii) enfriada a la tercera temperatura de  $-50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad entre 0,1 y  $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; y (iv) mantenida a la tercera temperatura durante el tercer período de tiempo durante aproximadamente 3 hasta 8 horas;



llevar a cabo la fase de secado primario a una presión seleccionada del intervalo de 30 mT hasta 200 mT y una temperatura de secado primaria seleccionada del intervalo de aproximadamente  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  elevándose gradualmente desde  $-50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y mantenida además en el secado primario durante al menos 10 horas.

- 5 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, comprendiendo el procedimiento llevar a cabo la segunda fase de secado a una presión seleccionada del intervalo de aproximadamente 30 mT hasta aproximadamente 200 mT y a una temperatura cuanto mucho de  $46 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el área superficial específica está en el intervalo desde aproximadamente  $3,7\text{ m}^2/\text{g}$  hasta aproximadamente  $2,2\text{ m}^2/\text{g}$ .
- 10 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado tiene una porosidad por encima del 40 % en volumen de un área total del agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado.
11. Una composición del agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado que comprende:  
un polipéptido sintético con SEC ID NO:1 (polipéptido de KL4), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoil fosfatidilglicerol (POPG) y ácido palmítico, en donde el agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado tiene un  
15 área superficial específica de al menos  $2,2\text{ m}^2/\text{g}$ .
12. El agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado de la reivindicación 11, en donde el área superficial específica está en el intervalo desde  $3,7\text{ m}^2/\text{g}$  hasta aproximadamente  $2,2\text{ m}^2/\text{g}$ .
13. El agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado de la reivindicación 11, en donde el agente tensioactivo pulmonar sintético liofilizado tiene una porosidad por encima del 40 % en volumen de un área total del agente  
20 tensioactivo pulmonar sintético liofilizado.

FIG. 1

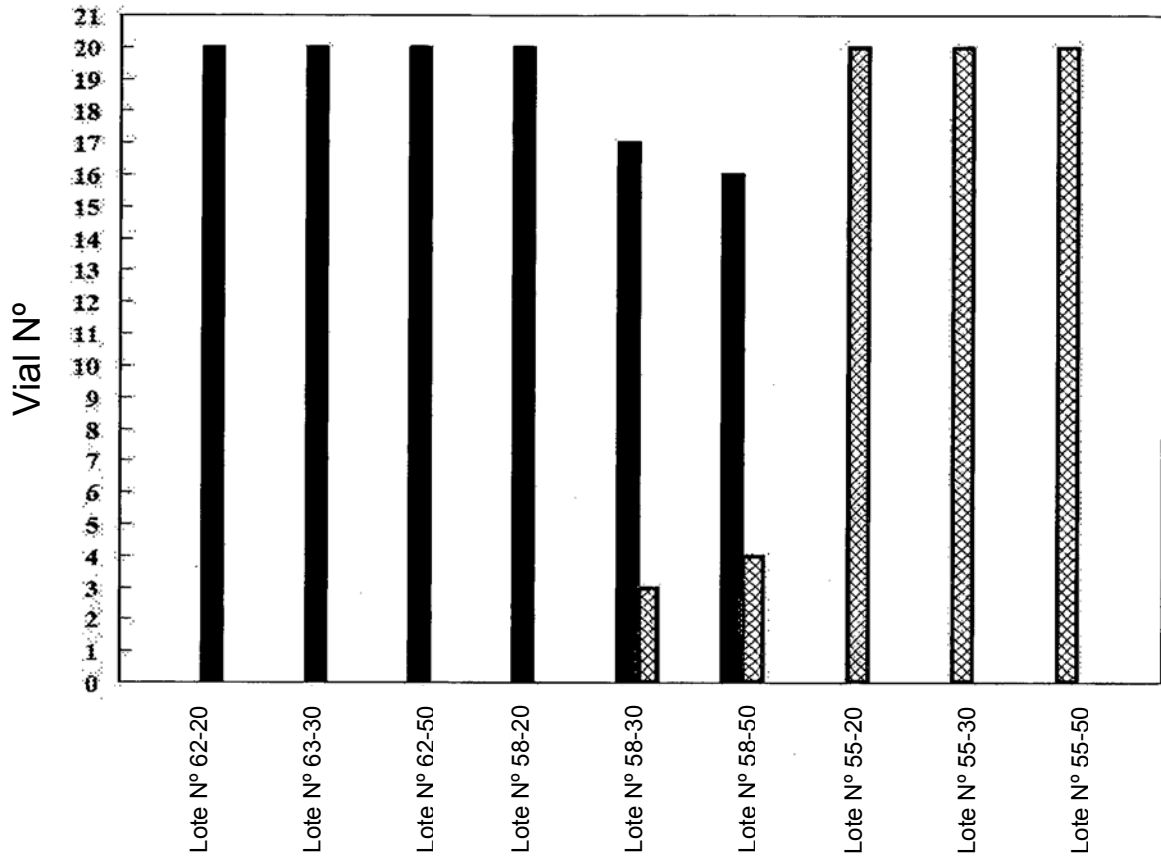
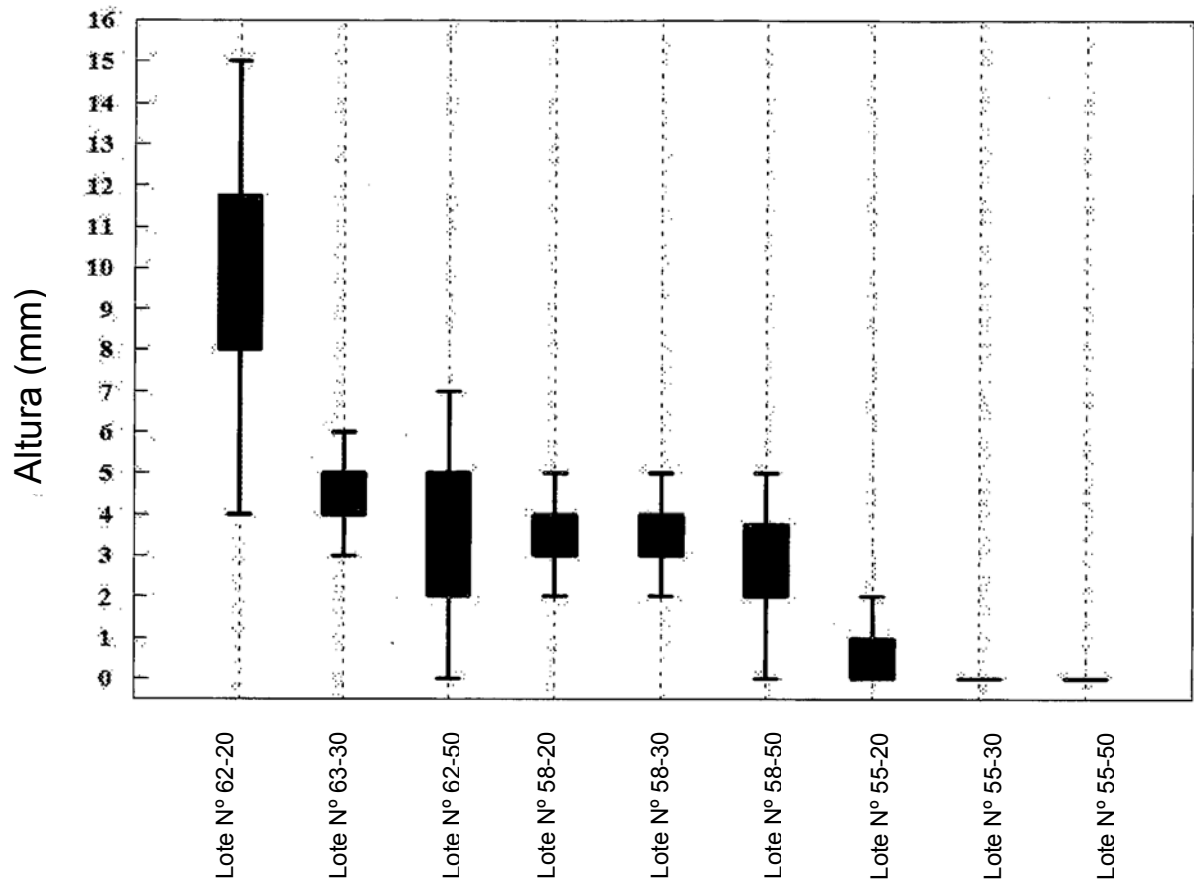
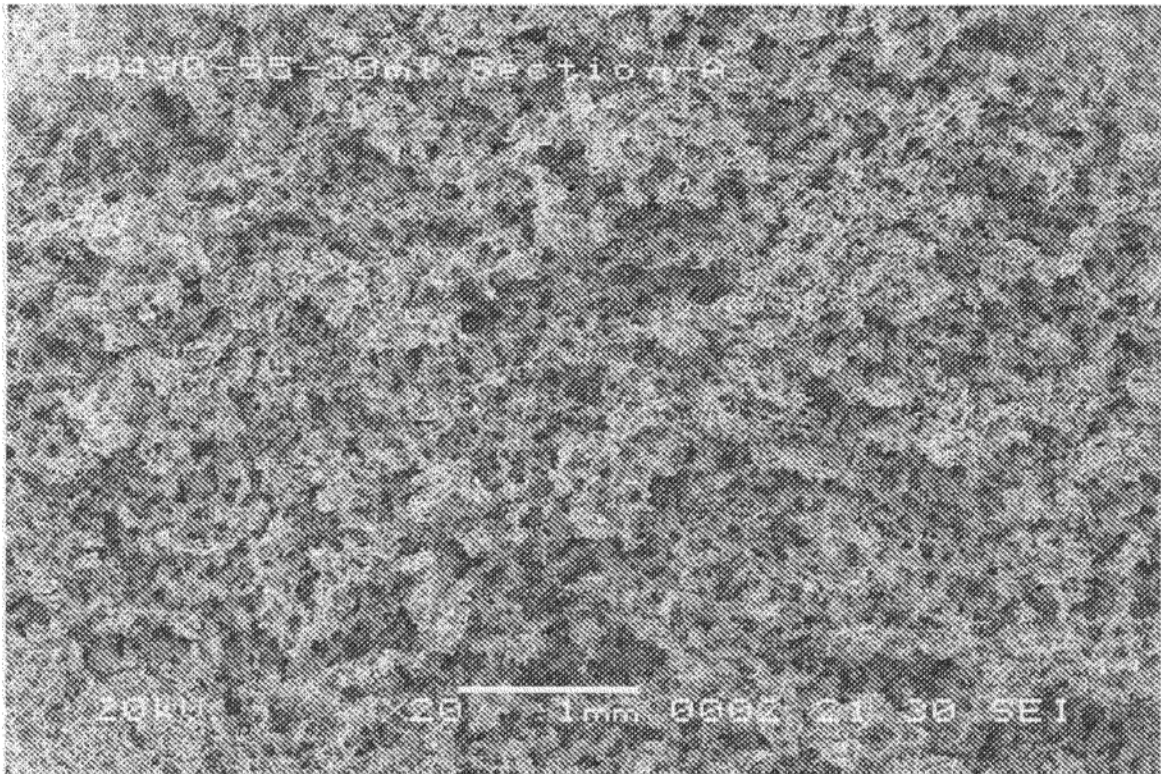


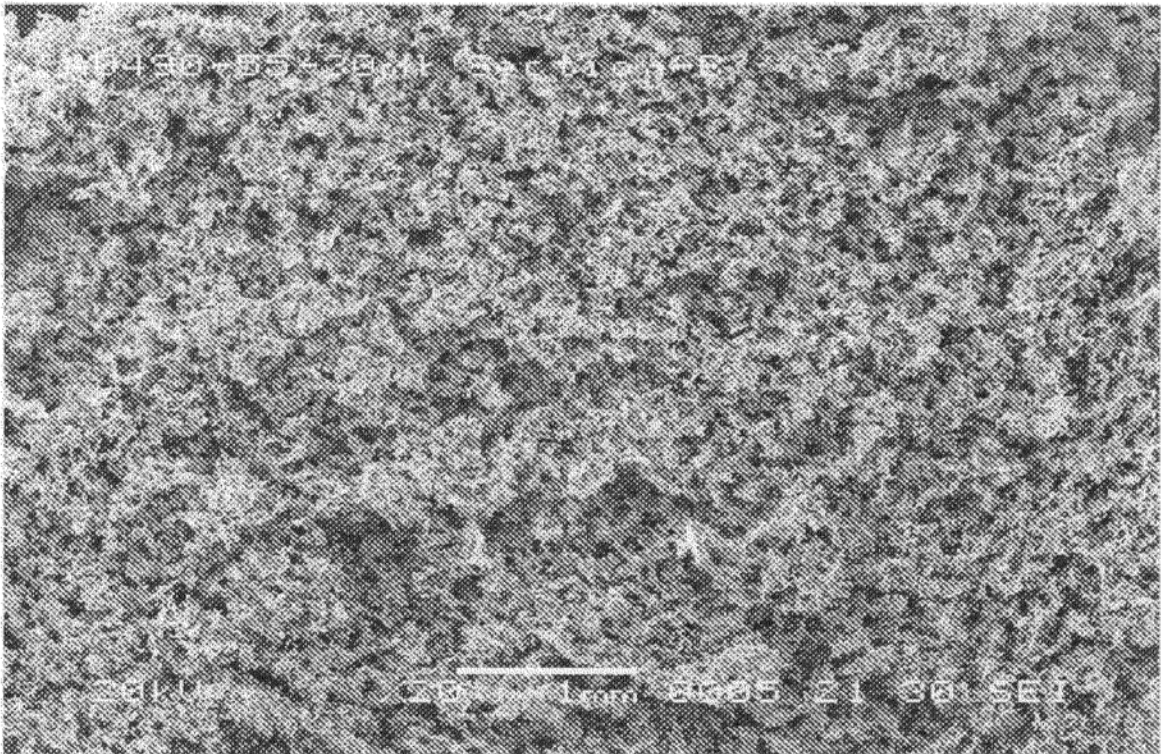
FIG. 2



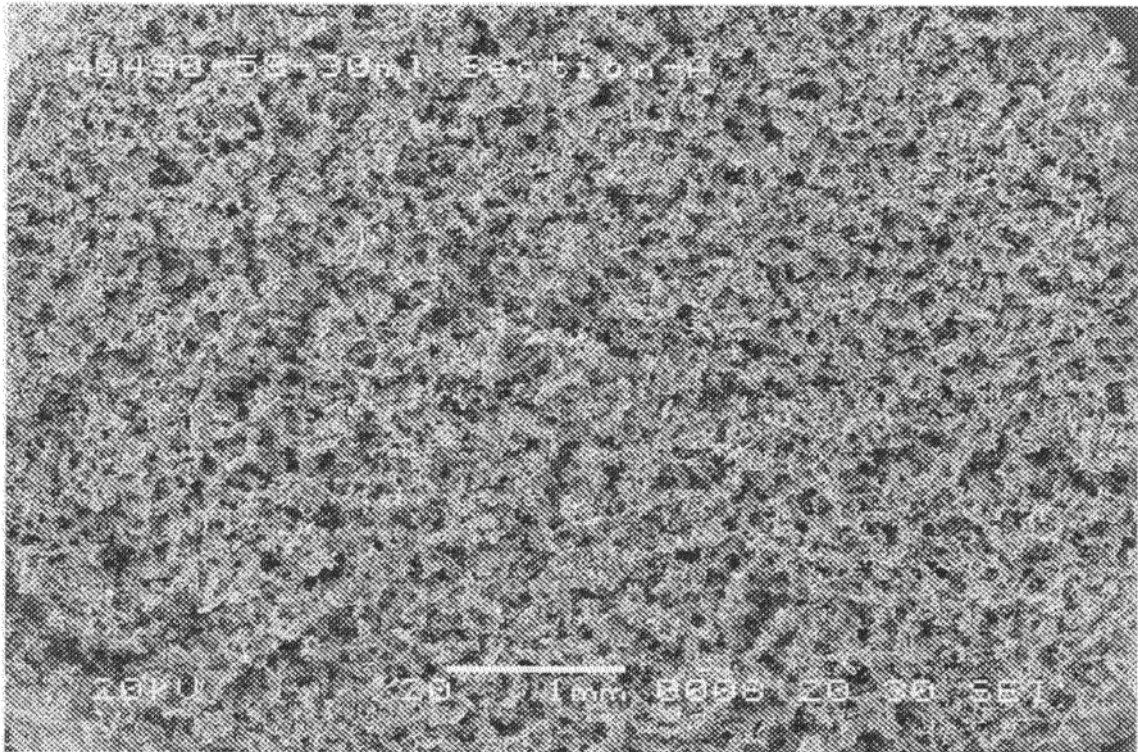
**FIG. 3A**



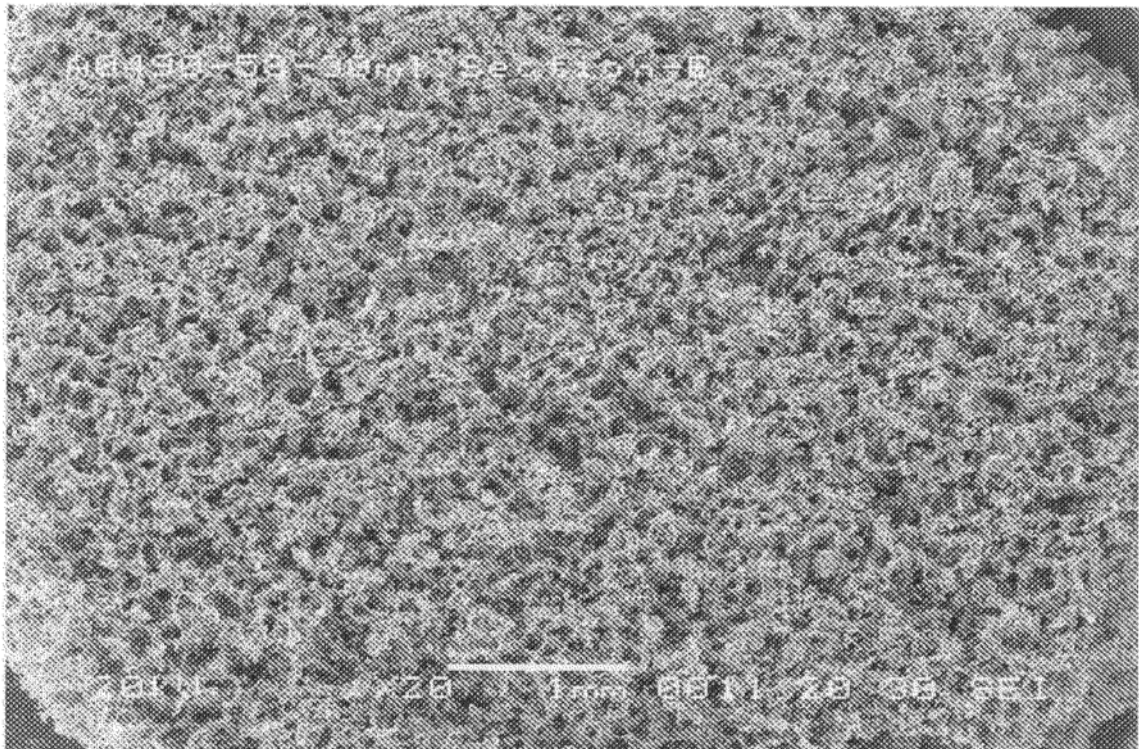
**FIG. 3B**



**FIG. 4A**

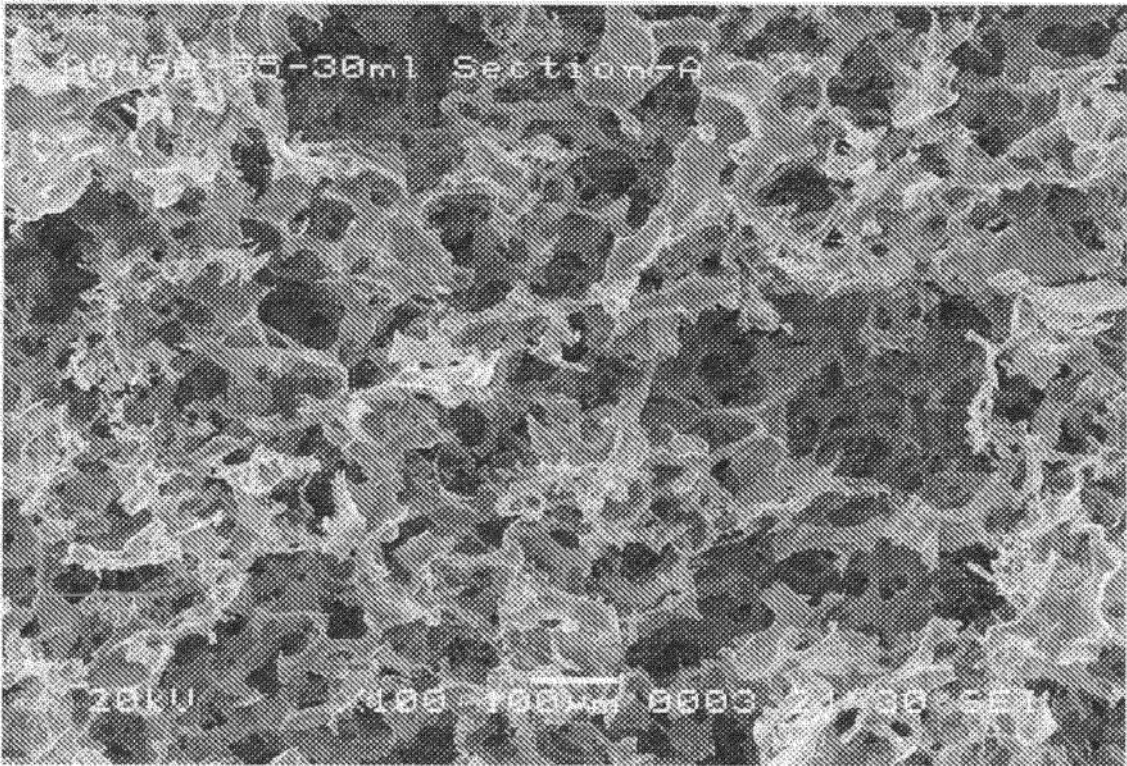


**FIG. 4B**

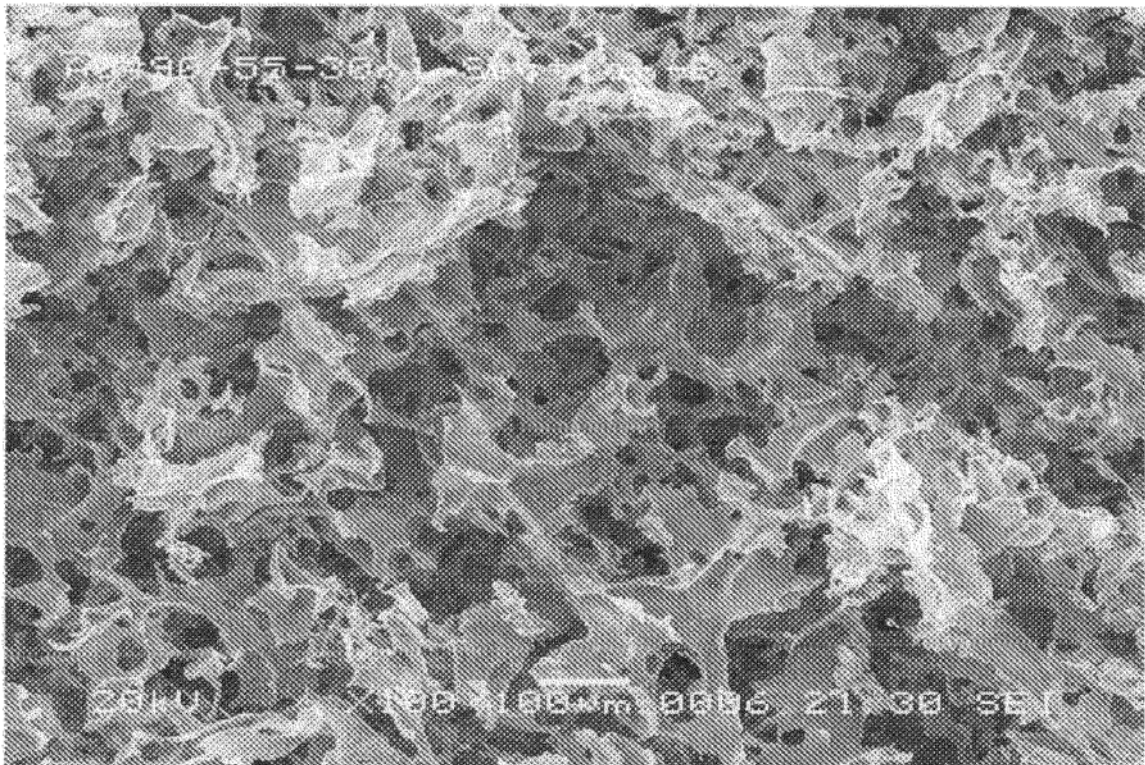




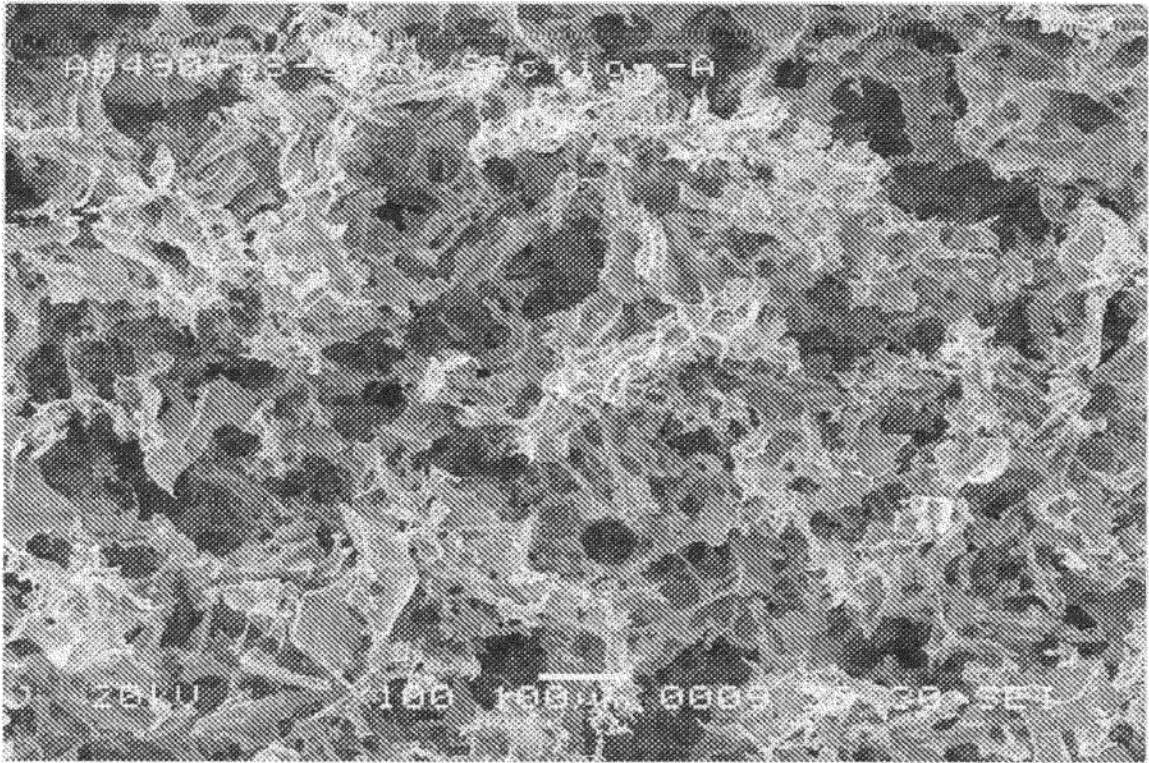
**FIG. 5A**



**FIG. 5B**



**FIG. 6A**



**FIG. 6B**

