

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 084**

51 Int. Cl.:

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2013 PCT/EP2013/064422**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO2014009328**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2013 E 13734433 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2872179**

54 Título: **Un método de producción de un producto medicinal que comprende una proteína biológicamente activa y el producto resultante**

30 Prioridad:

10.07.2012 US 201261669797 P

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

27.06.2017

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**O'CONNELL, KEVIN y
BUCHANAN, SANDHYA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 620 084 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

Un método de producción de un producto medicinal que comprende una proteína biológicamente activa y el producto resultante

5

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la conservación de proteínas biológicamente activas, en particular, con fines de almacenamiento. En particular, la presente invención se refiere a un método de producción de un producto medicinal que comprende una proteína biológicamente activa, comprendiendo el método la conservación de la proteína mediante liofilización en una matriz protectora que comprende un azúcar. La invención también se refiere al producto resultante que, en particular, es un cuerpo liofilizado que comprende la proteína, estabilizado por el azúcar.

10

Antecedentes de la técnica

15

Las proteínas biológicamente activas (también denominadas simplemente "proteínas" en la presente memoria descriptiva), en general, son inestables cuando se almacenan en medios sólidos o en soluciones líquidas. En particular, la estructura secundaria y terciaria de las proteínas, que dependen de los enlaces de hidrógeno del interior de la molécula, tienden a degenerarse. Dado que la estructura secundaria y terciaria conducen, en particular, a los dominios reconocibles de la estructura de la proteína, la conservación de esta estructura suele ser clave para la conservación de la actividad biológica de la proteína. Los organismos enteros suelen estar rodeados por una membrana basada en lípidos complejos y proteínas integrales que son estabilizadas estructuralmente por la naturaleza de la solución acuosa circundante, incluyendo las propiedades ideales de la estructura en estado de baja energía libre. Ese estado de baja energía libre es difícil de obtener, y el cambio de estructura, así como las proteasas producidas por el propio organismo o las células hospedadoras acompañantes, dificultan mucho la estabilización de las estructuras en una forma líquida. Los procesos de liofilización (criodesecación), en los que las composiciones acuosas, que normalmente comprenden agua como disolvente principal, se congelan y luego se secan por sublimación, se usan comúnmente para estabilizar las proteínas biológicamente activas. La eliminación del disolvente y la sustitución por una matriz que comprende moléculas protectoras tales como moléculas de azúcar, puede aumentar la estabilidad de la proteína mediante la prevención de la degradación y la desnaturalización de esta proteína.

20

25

30

En la liofilización, la proteína comúnmente se mezcla como una suspensión en agua con un agente protector, se congela y se deshidrata por sublimación y secado secundario. Las bajas temperaturas de congelación y el secado por sublimación, junto con las bajas proporciones de la superficie con respecto al volumen implicadas, pueden requerir largos períodos de secado. Dichos períodos de secado largos pueden provocar daños estructurales en la proteína. El aumento de la temperatura de secado para reducir los tiempos de secado no suele ser una opción, ya que la temperatura de secado tiene que permanecer muy por debajo de la temperatura de transición vítrea de la matriz protectora. Por otra parte, las altas temperaturas de secado conducen inherentemente a la pérdida de la actividad biológica de la proteína. Se produce un problema particular al usar un azúcar no polimérico como agente protector. Como es comúnmente conocido, los azúcares no poliméricos son muy adecuados para la estabilización de las proteínas biológicamente activas, pero tienen la desventaja inherente de que la temperatura de transición vítrea de la matriz resultante es relativamente baja (normalmente inferior a 100 °C, a menudo de entre 20 y 45 °C). En particular, cuando se usan altas cantidades de azúcar, y el cuerpo congelado tiene un espesor considerable (normalmente, superior a 2 mm), esto conduce a tiempos de secado muy prolongados en el intervalo de 72 a 96 horas. En particular, cuando la cantidad de azúcar no polimérico se acerca al 20 % p/p, la matriz resultante se vuelve tan densa que los tiempos de secado aumentan exponencialmente (por lo tanto, en la técnica, se aplica hasta 15-16 % (p/p), como máximo, cuando se trata de cuerpos secados de forma homogénea). Los tiempos de secado inherentemente prolongados conducen a una pérdida significativa de la actividad biológica de la proteína, y son muy poco atractivos desde el punto de vista de la fabricación.

35

40

45

50

En la técnica, se ha proporcionado una solución en el documento US 5.565.318. Dicha referencia propone el uso de un azúcar polimérico (tal como dextrano o ficoll) como agente protector. Dado que la temperatura de transición vítrea de dicho azúcar polimérico, en general, es superior a las de los azúcares no poliméricos (normalmente, superior a 200 °C frente a inferior a 100 °C), se pueden usar temperaturas de secado sustancialmente más altas para llegar a tiempos de secado más cortos. Sin embargo, las propiedades estabilizantes de dichos azúcares poliméricos son mucho menos superiores que las de los azúcares no poliméricos. Además, las temperaturas de secado más altas para obtener tiempos de secado más cortos también pueden dar lugar a una mayor tasa de degradación y/o desnaturalización de la proteína biológicamente activa durante el propio proceso de liofilización.

55

60

En el documento US 2010/0297231, se proporciona una solución alternativa en la que una formulación que comprende la proteína biológicamente activa y un poliol (que puede ser un azúcar no polimérico tal como fructosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, trehalosa, ribosa, ramnosa, sorbitol, xilitol, etc.) se expande en una espuma, tras lo que la espuma se congela y se seca en una composición de espuma seca estable. Dado que la espuma comprende un espesor de 2 mm o inferior, y la proporción de la superficie con respecto al volumen es sumamente alta, se pueden obtener tiempos de secado cortos incluso con altos porcentajes de azúcares no poliméricos. Una

65

desventaja del método conocido es que la espuma ocupa mucho espacio en el liofilizador para la baja cantidad relativa de material activo que se está procesando, y también, que una espuma tiene que ser molida en un polvo para su uso posterior, tal como la administración por inhalación, o para la obtención de cantidades predeterminadas de material seco para la reconstitución en un líquido que permita un uso en la práctica diaria. Una desventaja adicional es que, por lo general, un agente de formación de espuma está comprendido en la formulación. Esto limita el uso del producto resultante.

Por lo tanto, la conservación de las proteínas biológicamente activas, en particular, para obtener un producto final fácil de usar que permita un amplio espectro de aplicaciones y que tenga una matriz que proporcione altas propiedades de conservación siguen planteando un desafío importante. Es un objeto de la invención hacer frente a dicho desafío.

Sumario de la invención

Para cumplir el objeto de la invención, se proporciona un método de producción de un producto medicinal que comprende una proteína biológicamente activa, que comprende las etapas de proporcionar una composición acuosa que comprende un disolvente, la proteína biológicamente activa y entre el 20 % p/p y el 60 % p/p de un azúcar no polimérico, congelar la composición, formando de ese modo al menos un cuerpo congelado que comprende el disolvente en forma congelada, poner el cuerpo congelado en un aparato de secado mientras es transportado por un soporte, comprendiendo el soporte uno o más elementos de contención que definen uno o más límites del soporte, en el que, como máximo, el 30 % de la superficie del cuerpo es contigua con el uno o más elementos de contención, lo que reduce la presión en el aparato de secado por debajo de la presión atmosférica, y proporcionar calor al cuerpo (normalmente, mediante conducción y/o radiación) para sublimar el disolvente congelado del cuerpo y obtener un cuerpo seco.

Para sorpresa del inventor, usando una técnica de liofilización que se basa en la obtención de cuerpos congelados individuales a partir de una composición que comprende una alta cantidad de un azúcar no polimérico, secándose los cuerpos asegurándose de que la mayor parte de su superficie no es contigua a un elemento de contención (tal como un fondo cerrado o una pared) de un recipiente, es posible secar los cuerpos en un tiempo relativamente corto, esencialmente, inferior a 72-96 horas, a pesar de que la proporción de la superficie con respecto al volumen es muy inferior a la proporción cuando se aplica una espuma, y a pesar de que el espesor puede ser incluso superior a 2 mm. Actualmente, se cree que la cantidad relativamente alta de superficie que no es contigua a un elemento que evitaría el libre flujo de disolvente sublimado fuera del cuerpo congelado (como como, por ejemplo, el fondo de vidrio y la pared de viales típicos de liofilización) es esencial en la obtención de los resultados de secado ventajosos de estas composiciones de alto contenido de azúcar. Reconociendo esto, es evidente que la invención no depende esencialmente de la forma del cuerpo. Por ejemplo, cuando se usan cubos, pirámides, ladrillos, estrellas, diamantes, cuerpos en forma de tic-tac o cualquier otra forma, al colocarlos sobre un soporte de manera que, como máximo, el 30 % de la superficie del cuerpo es contigua al uno o más elementos de contención del soporte, se dispone de suficiente superficie libre de cada cuerpo para que el disolvente sublimado salga del cuerpo.

De hecho, en la técnica anterior, se conocen técnicas de liofilización en las que los cuerpos congelados se secan mientras que la mayor parte de su superficie no es contigua a un elemento de contención del recipiente, por ejemplo, el documento WO 2010/125087. Sin embargo, esta referencia no desvela la liofilización de una composición que comprende una proteína biológicamente activa a partir de una solución que comprende al menos un 20 % p/p de un azúcar no polimérico. Para los compuestos distintos de las proteínas biológicamente activas, en particular, para las moléculas estables (pequeñas), se pueden obtener tiempos de secado rápido aumentando la cantidad de calor necesaria para la sublimación del disolvente congelado, ya que la desnaturalización no suele ser un problema. Para las proteínas biológicamente activas, sin embargo, esto no es una opción. Por lo tanto, normalmente, cuando se seca un cuerpo constituido a partir de un disolvente acuoso congelado que comprende una proteína biológicamente activa, se está usando un disolvente con el 3-10 % p/p de un azúcar no polimérico.

La invención también se realiza en un producto medicinal en forma de un cuerpo liofilizado esencialmente homogéneo que tiene un volumen de entre 50 y 1.000 μ l que comprende una proteína biológicamente activa, estando la proteína dispersa en una matriz sólida de un azúcar no polimérico, que se caracteriza porque el cuerpo comprende entre aproximadamente el 21 y el 72 % p/v de dicho azúcar. El 21-72 % p/v del cuerpo seco final corresponde a aproximadamente del 20 al 60 % p/p de la azúcar en la composición acuosa de partida (que se puede calcular usando la fórmula para el cálculo de la densidad aproximada de una solución de azúcar en agua: densidad \approx 0,3723 veces (concentración de azúcar en gramos/litro) + 1002,2). Este cuerpo se puede tratar individualmente, no necesita ninguna molienda ni otra forma de reelaboración antes de su aplicación real como producto medicinal, y es muy adecuado para la conservación de la proteína biológicamente activa debido a la alta densidad del azúcar no polimérico en la matriz. Preferentemente, el cuerpo es un esferoide.

Definiciones

Producir: proporcionar para su uso posterior, por ejemplo, para su uso en un laboratorio, para su uso en una planta, como un producto intermedio o para su uso por un consumidor (usuario final). Producir incluye fabricar, es decir,

producir de una manera repetible controlada para proporcionar cantidades mayores del mismo producto.

Producto medicinal: cualquier producto que se puede usar para prevenir, tratar o curar una enfermedad o un trastorno de un organismo vivo, en particular, un ser humano o un animal.

5 *Una proteína biológicamente activa:* cualquier proteína que tiene una estructura tridimensional de modo que la proteína es capaz de inducir o interferir con un proceso fisiológico en un organismo vivo, tal como un proceso metabólico o un proceso inmunológico. La expresión proteína biológicamente activa puede indicar una proteína de longitud completa o un fragmento de la misma. Los ejemplos de proteínas biológicamente activas son enzimas,
10 toxinas, toxoides, cualquier (otra) proteína inmunológica (por ejemplo, una proteína de la superficie de un microorganismo o un fragmento de la misma), un anticuerpo o un fragmento del mismo, etc. Las vacunas contienen normalmente una o más proteínas biológicamente activas, bien como parte de un microorganismo vivo o muerto, o como una subunidad aislada o expresada de forma recombinante de dicho microorganismo.

15 *Un disolvente:* cualquier fluido portador, siendo el fluido adecuado para disolver y/o dispersar la sustancia que se vaya a transportar.

% p/p: porcentaje de masa frente a la masa total de la composición.

20 % p/v: porcentaje de masa frente al volumen total de la composición.

Un azúcar: cualquiera de un grupo de hidratos de carbono hidrosolubles de peso molecular relativamente bajo y que normalmente tiene un sabor dulce. El término azúcar incluye azúcares reductores (tales como fructosa y maltosa), azúcares no reductores (tales como sacarosa y trehalosa), alcoholes de azúcar (tales como xilitol y sorbitol) y ácidos de azúcar (tales como ácido glucónico y ácido tartárico).

25 *Un azúcar no polimérico:* moléculas de azúcar mono-, di-, tri- y oligoméricas, que comprenden, como máximo, seis moléculas de azúcar monoméricas.

Un cuerpo, que tiene un volumen de modo que se puede tratar individualmente a mano (manualmente), que tiene normalmente un volumen igual o superior a 50 μl (que equivale a una esfera que tiene un radio de aproximadamente 2 mm). Preferentemente, es lo suficientemente pequeño para usarlo como un comprimido para la administración a un animal (incluyendo el término "animal" un ser humano), en particular, que tiene un volumen inferior a 2.000 μl . Preferentemente, el volumen del cuerpo es de entre 50 μl y 1.500 μl , normalmente inferior a 1.000 μl , en particular, de entre 75 μl y 750 μl , más concretamente de entre 100 μl y 500 μl .

35 Seco: menos del 5 % de humedad residual, en particular, menos de 4 ½, 4, 3 ½, 3, 2 ½, 2 %, 1 ½ % o 1 % de humedad residual.

40 *Un elemento de contención:* elemento real que constituye una superficie de contención que actúa en la definición de los límites de un elemento de apoyo. Por lo general, un elemento de contención es un fondo cerrado (continuo), una pared lateral o la tapa de un recipiente. Sin embargo, también puede ser el cableado de una rejilla o un estante de rejilla.

45 *Contiguo/a:* compartir un límite.

Un esferoide: un cuerpo que tiene la forma de una esfera, pero no es necesariamente perfectamente redondo. Por ejemplo, puede ser un cuerpo achatado, un cuerpo alargado, un cuerpo que consiste, en parte, en una esfera y, en parte, en un cuerpo achatado o alargado, una esfera con una o varias abolladuras, rebordes u otras irregularidades, combinaciones de los anteriores, etc.

50 **Realizaciones de la invención**

En una realización, el disolvente congelado se sublima en menos de 48 horas. El flujo de calor se selecciona preferentemente de manera que el cuerpo se seca en 48 horas. Esto reduce significativamente el tiempo que la proteína biológicamente activa se somete a las temperaturas relativamente altas de secado. Sorprendentemente, en la configuración actual, dichos tiempos cortos de secado se pueden obtener sin perder una cantidad significativa de actividad de la proteína. Preferentemente, el disolvente congelado se sublima en menos de 36 horas, o incluso en 16 a 24 horas. En comparación con los métodos de liofilización de la técnica anterior para el secado de cuerpos que comprenden una proteína biológicamente activa y al menos un 20 % p/p de un azúcar no polimérico, este es un tiempo de secado muy corto.

En otra realización, como máximo, el 20 % de la superficie del cuerpo es contigua al uno o más elementos de contención del soporte, preferentemente incluso, como máximo, el 10 %. Parece que al tener más superficie disponible para la sublimación libre del disolvente (por tener menos superficie del cuerpo contigua a un elemento de contención del soporte), el tiempo de secado se puede reducir aún más, conservando al mismo tiempo la actividad biológica de la proteína.

Preferentemente, el cuerpo congelado es un esferoide, de modo que el porcentaje de la superficie del cuerpo que es contigua a un elemento de contención del soporte normalmente es inferior al 3 %, o incluso casi del 0 %. En una realización adicional, el esferoide tiene un volumen de entre 50 μl y 1.000 μl que se aproxima a un radio del esferoide de entre 2 y 6 mm (en función de la forma del esferoide).

En una realización en la que el elemento de contención del soporte es un suelo, disponiéndose el cuerpo sobre dicho suelo, y estando el soporte abierto para permitir que la radiación pase libremente a dicho suelo, al menos una parte del calor se proporciona emitiendo radiación térmica de una fuente de radiación presente en el aparato de secado por encima del soporte, para alcanzar el cuerpo congelado. Se ha observado que el secado adecuado de cuerpos que contienen un alto nivel de azúcar se puede lograr proporcionando el calor (al menos en parte) a través de la radiación. La radiación tiene la ventaja de que no depende de un material conductor del calor para transferir el calor.

En otra realización, al menos una parte del calor es suministrado mediante la conducción del calor a través del elemento de contención que es contiguo al cuerpo congelado, de acuerdo con los procesos de liofilización comunes. A pesar de que, en el método actual, como máximo, el 30 % de la superficie del cuerpo es contigua a un elemento de contención del soporte (hasta incluso una cifra tan baja como del 1 al 3 %), mientras que en los métodos de la técnica anterior, normalmente, es superior al 50 %, parece que esto basta para proporcionar un flujo de calor adecuado hacia el cuerpo.

En otra realización más, en la que el elemento de contención del soporte es un suelo, disponiéndose el cuerpo sobre dicho suelo, y estando el soporte abierto para permitir que la radiación pase libremente a dicho suelo, el calor se proporciona mediante la emisión de radiación térmica desde una fuente de radiación presente en el aparato de secado por encima del soporte para llegar al cuerpo en combinación con la conducción de calor a través del elemento de contención que es contiguo al cuerpo congelado (una configuración que se conoce por el documento EP 2249810). Un flujo de calor combinado por conducción y radiación ha demostrado ser muy adecuado para el secado de los cuerpos que tienen un porcentaje relativamente bajo de su cuerpo en contacto con un soporte.

En una realización, la cantidad del azúcar en la composición acuosa se selecciona del grupo que consiste en los intervalos del 20 al 55 % p/p, del 20 al 50 % p/p, del 20 al 45 % p/p, del 25 al 45 % p/p, del 25 al 40 % p/p, del 25 al 35 % p/p y del 27 al 30 % p/p. Preferentemente, la cantidad de azúcar es superior al 25 % p/p, normalmente del aproximadamente 27 % p/p.

En una realización, el azúcar comprende moléculas monoméricas y/o diméricas, en particular, seleccionadas del grupo que consiste en glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, fructosa, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol y xilitol.

En una realización en la que el elemento de contención del soporte es un suelo, se disponen múltiples cuerpos congelados en forma de una monocapa sobre dicho suelo mientras se está secando. De esta manera, se pueden secar grandes cantidades de cuerpos congelados de una manera eficaz.

En otra realización, el contenido de humedad residual del cuerpo seco es inferior al 2 % p/p, normalmente es de entre el 0,5 y 2 % p/p, por ejemplo, de entre el 1 y 2 % p/p.

La invención se explicará con más detalle usando los siguientes ejemplos y figuras.

La Figura 1 muestra esquemáticamente un primer tipo de soporte, en concreto, un vial de vidrio, lleno de esferoides congelados o una composición líquida, congelada tras llenar el soporte.

La Figura 2 muestra esquemáticamente una configuración de secado de un aparato de liofilización.

La Figura 3 muestra esquemáticamente una configuración alternativa de secado de un aparato de liofilización.

La Figura 4 muestra esquemáticamente una configuración alternativa de secado adicional de un aparato de liofilización.

El Ejemplo 1 es un primer ejemplo de liofilización de composiciones de alto nivel de azúcar.

El Ejemplo 2 es un segundo ejemplo de liofilización de composiciones de alto nivel de azúcar.

El Ejemplo 3 es un tercer ejemplo de liofilización de composiciones de alto nivel de azúcar.

El Ejemplo 4 es un cuarto ejemplo de liofilización de composiciones de alto nivel de azúcar.

El Ejemplo 5 es un quinto ejemplo de liofilización de composiciones de alto nivel de azúcar.

El Ejemplo 6 proporciona datos de estabilidad de los productos medicinales de acuerdo con la invención.

Figura 1

La Figura 1 muestra esquemáticamente un primer tipo de soporte, en concreto, un vial de vidrio, lleno de esferoides congelados o una composición líquida, congelada tras llenar el soporte. La figura representa un primer vial de vidrio (1) que está lleno de aproximadamente 15 esferas congeladas (5) de aproximadamente 110 μl cada una. La figura también representa un segundo vial de vidrio (1') lleno de 1,5 ml de composición líquida que se ha congelado para

formar una torta congelada (6).

Figura 2

5 La Figura 2 muestra esquemáticamente una configuración de secado de un aparato de liofilización (el aparato en su conjunto no se muestra). La figura representa un estante (10) que porta los viales 1 y 1'. Los viales 1 están llenos de esferas congeladas 5 y los viales 1' están llenos de una torta de líquido congelado (6). El estante se puede calentar a través de calentadores eléctricos incorporados (no mostrados).

10 **Figura 3**

La Figura 3 muestra esquemáticamente una configuración alternativa de secado en un aparato de liofilización. En esta configuración, se dispusieron los viales en un soporte elevado (20) que está prácticamente aislado térmicamente del estante calentado (10). De esta manera, los viales casi no recibirán calor a través de la conducción del calor generado en el estante (10). Por encima de los viales, hay un segundo estante calentado (10'), estante que está dotado de un recubrimiento negro (11). Este recubrimiento negro hace que el estante actúe como una buena fuente de radiación, emitiendo radiación térmica 12 (principalmente, luz infrarroja) hacia los viales.

20 **Figura 4**

La Figura 4 muestra esquemáticamente una configuración alternativa de secado adicional de un aparato de liofilización. Esta configuración usa dos estantes, un estante calentado 10, que actúa como una primera fuente de calor, y un estante calentado 10', que actúa como una segunda fuente de calor (a través del recubrimiento negro 11 que proporciona una superficie radiante de la parte inferior del estante 10', correspondiente a la configuración presentada en la Figura 3). Sobre el primer estante 10, hay recipientes abiertos 15 y 15'. El recipiente 15 está lleno de una monocapa de esferas congeladas (5), mientras que el segundo recipiente 15' está lleno de un líquido congelado (6').

30 Los Ejemplos 1 a 5 son ejemplos demostrativos preliminares que muestran que usando el método de acuerdo con la invención, se puede obtener un cuerpo secado esencialmente homogéneo en un ciclo de secado rápido razonable, a pesar del hecho de que hay más del 20 % p/p de un azúcar no polimérico en la composición acuosa inicial. Para estos ejemplos, se usó una solución simple de sacarosa al 30 % (p/v) en agua (que se aproximaba al 27 % p/p). Parte de esta composición acuosa, se usó para fabricar esferas congeladas que tenían un volumen de aproximadamente 100 µl. Para esto, se usó un proceso como el descrito en el documento WO 2010/125084, en particular, el proceso mencionado de la línea 33, página 20, a la línea 2, página 21 (en relación con las Figuras 1, 2, 3 y 4 de la misma solicitud internacional). Las esferas congeladas se usan en los ejemplos como se describe a continuación.

40 En el Ejemplo 1, se llena un primer conjunto de tres viales de liofilización de vidrio de 10 ml (1), que tienen un diámetro de aproximadamente 20 mm, con aproximadamente 15 esferas (5), lo que equivale aproximadamente a 1,5 ml de la composición acuosa inicial. En los viales, esto se traduce en aproximadamente una capa y media de esferas. En dicha configuración, menos del 10 % de la superficie de las esferas congeladas (aproximadamente 1-3 %) está contigua a las una o más paredes (elementos de contención) del vial de soporte. Se llena un segundo conjunto de tres de los viales correspondientes (1') con 1,5 ml de la composición líquida descrita anteriormente en el presente documento, tras lo que se congela el líquido. De esta manera, aproximadamente el 60 % de la superficie del cuerpo congelado está contigua a la una o más paredes del vial de soporte. Los viales llenos resultantes se muestran esquemáticamente en la Figura 1.

50 Se colocan estos viales en un estante de un aparato de liofilización convencional, cuyas partes principales se muestran esquemáticamente en la Figura 2, que se ha llevado de antemano a una temperatura de aproximadamente -45 °C. Este liofilizador se somete al siguiente ciclo de liofilización (Tabla 1).

Tabla 1

Fase						
Congelación	Temperatura [°C]	-45	-45			
	Tiempo [min]	0	1			
	Vacío [kPa (mbar)]	ND	ND			
Sublimación inicial	Temperatura [°C]	-45				
	Tiempo [min]	0				
	Vacío [kPa (mbar)]	0,004 (0,04)				

Sublimación	Temperatura [°C]	-45	-45	35	35	35
	Tiempo [min]	0	10	123	960	240
	Vacío [kPa (mbar)]	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)	0,034 (0,34)

Como puede observarse en la Tabla 1, tras cargar el estante con los recipientes llenos, el estante (10) se mantiene en primer lugar a una temperatura de -45 °C durante 1 minuto (fase de "congelación"). Con esto, se llevan los cuerpos congelados a una temperatura de -45 °C. La presión se mantiene atmosférica. A continuación, se reduce la presión hasta 0,004 kPa (0,04 mbar), mientras que se mantiene la temperatura del estante a menos 45 °C ("sublimación inicial"). En estas condiciones, el líquido congelado ya se ha sublimado, y se suministra calor a los microgránulos mediante conducción a través del estante. Sin embargo, la velocidad de sublimación en estas condiciones es relativamente baja. Para aumentar la velocidad de la sublimación, se lleva el estante a una temperatura de 35 °C ("Sublimación"), y se mantiene a esa temperatura durante aproximadamente 22 horas (un total de 1.333 minutos, como se indica en "Sublimación"). Se mantiene la presión en el valor bajo de 0,004 kPa (0,04 mbar). Tras ello, se completa el proceso de sublimación, y los cuerpos congelados pierden hasta aproximadamente el 98 % del líquido congelado, transformándose así en cuerpos secos. A continuación, se conduce el gas nitrógeno seco con una temperatura de aproximadamente 20 °C al liofilizador hasta que la presión es aproximadamente la atmosférica. Esto tarda aproximadamente 2 minutos. Entonces, se puede abrir la puerta para sacar los viales.

En el tiempo de secado de aproximadamente 22 horas, las esferas se secaron en general y tenían una buena forma, con una ligera falta de secado en algunas zonas. Sin embargo, en la segunda serie de viales, el cuerpo congelado se había convertido en un lío de espuma y líquido almibarado.

En el Ejemplo 2, se usa el mismo aparato de liofilización usado en el Ejemplo 1, aunque la parte inferior del estante de encima del estante que porta los viales se proporciona con una placa de PTFE negra (politetrafluoroetileno). Mediante el contacto íntimo entre esta placa negra y el estante, se calienta esta placa a prácticamente la misma temperatura que el propio estante y, por lo tanto, actuará como una fuente de calor de radiación. Sin embargo, solo una pequeña parte de la radiación llegará a los cuerpos congelados directamente, ya que la pared de vidrio del vial absorberá y reflejará la mayor parte de la radiación. En el documento WO 2010/125084, se describe una configuración comparable en relación con la Figura 5 de dicha referencia. Al tener un flujo de calor hacia los viales no solo por conducción a través de los viales colocados en un estante, sino también mediante la radiación desde el estante de encima, se puede mejorar el rendimiento de secado. Sin embargo, solo para las esferas, esto conduce a un mejor resultado de secado, es decir, las esferas se pueden secar en aproximadamente 20 horas. Sin embargo, los viales llenos de líquido siguen conduciendo a un resultado de secado muy poco homogéneo.

En el Ejemplo 3, se usa la configuración de liofilización descrita en combinación con el Ejemplo 2, aunque se descartada prácticamente un flujo de calor por conducción poniendo los viales en un soporte elevado, manteniéndolos prácticamente aislados del estante que los porta. Dicha configuración se muestra en la Figura 3. Al escoger esta configuración, el flujo de calor requerido hacia los cuerpos congelados se obtiene prácticamente por completo a través de la radiación desde el estante de encima. El ciclo de secado, que ahora incluye la congelación real del material a partir de un líquido en un cuerpo sólido congelado, se muestra a continuación, en la Tabla 2.

Tabla 2

Fase							
Congelación	Temperatura [°C]	-45	-45	-20	-20	-45	-45
	Tiempo [min]	0	10	15	60	15	20
	Vacío [kPa (mbar)]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sublimación inicial	Temperatura [°C]	-45					
	Tiempo [min]	0					
	Vacío [kPa (mbar)]	0,004 (0,04)					
Sublimación parte 1	Temperatura [°C]	-45	-45	35	35		
	Tiempo [min]	0	10	123	960		
	Vacío [kPa (mbar)]	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)		

Sublimación parte 2	Temperatura [°C]	35					
	Tiempo [min]	240					
	Vacío [kPa (mbar)]	(0,34)					

Esto dio el mismo resultado de secado descrito en relación con el Ejemplo 1, en aproximadamente el mismo tiempo de secado.

5 En el siguiente ejemplo, el Ejemplo 4, se intentó obtener un resultado de secado razonablemente bueno de un cuerpo como el presente en el segundo conjunto de viales descritos en el Ejemplo 1. Se colocaron estos viales en un estante del mismo aparato liofilización, por tanto, usando solo un flujo de calor mediante conducción a través del estante. Se usó un ciclo de secado de acuerdo con la Tabla 3, que dio lugar a un tiempo de secado largo de más de 76 horas.

10 Aunque se obtuvo un resultado de secado notablemente mejor al compararlo con el resultado del Ejemplo 1, el cuerpo seco resultante seguía teniendo regiones esencialmente fundidas, grietas profundas y algo de formación de espuma. Esto significa que serían necesarios tiempos de secado todavía más largos para conseguir un resultado de secado que fuera comparable con el que se puede obtener usando el método de acuerdo con la invención.

15

Tabla 3

Fase							
Congelación	Temperatura [°C]	-45	-45				
	Tiempo [min]	0	30				
	Vacío [kPa (mbar)]	ND	ND				
Sublimación inicial	Temperatura [°C]	-45					
	Tiempo [min]	0					
	Vacío [kPa (mbar)]	0,004 (0,04)					
Sublimación 1	Temperatura [°C]	-25	-25	20	20	35	35
	Tiempo [min]	15	2880	600	360	240	240
	Vacío [kPa (mbar)]	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)	0,02 (0,20)
Sublimación 2	Temperatura [°C]	35					
	Tiempo [min]	200					
	Vacío [kPa (mbar)]	0,027 (0,27)					

20 En el Ejemplo 5, se usa otro tipo de soporte para el secado de los cuerpos congelados (véase la Figura 4). Este soporte es un recipiente abierto (15, 15') que tiene una anchura de aproximadamente 20 cm, una longitud de aproximadamente 30 cm y una altura de aproximadamente 4 cm. El recipiente es de un material de plástico conductor del calor, en este caso polietilentereftalato lleno de negro de carbono. Se puede poner el recipiente en un contacto conductor de calor con un estante sobre el que reposa. La diferencia con dicho recipiente cuando se compara con un vial de liofilización convencional es que dicho recipiente está abierto en esencia y, por lo tanto, permite que la radiación pase libremente al suelo de dicho recipiente para alcanzar el material congelado. En la disposición mostrada en la Figura 4, un recipiente 15 está lleno de una monocapa de esferas congeladas 5 y el otro recipiente 15' está lleno de una capa congelada 6' de la composición que contiene sacarosa (con un espesor de aproximadamente 5 ½ mm). La configuración de secado es la configuración descrita en relación con el Ejemplo 2. Mediante el calentamiento de los estantes, los cuerpos congelados pueden recibir calor a través de la parte inferior y de las paredes laterales calentadas de los recipientes, y mediante irradiación desde el estante calentado de encima. Un ciclo de secado como el indicado en la Tabla 4 se usa para secar el material congelado.

35 El resultado de este ciclo de secado es que las esferas individuales están bien secas, teniendo una buena forma y careciendo prácticamente zonas de secado incompleto. Sin embargo, la capa de la composición de sacarosa congelada se secó de forma no homogénea, con un secado incompleto sustancial y formación de espuma.

Tabla 4

Fase							
Congelación	Temperatura [°C]	-45	-45	-20	-20	-45	-45
	Tiempo [min]	0	10	15	60	15	20
	Vacío [kPa (mbar)]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sublimación inicial	Temperatura [°C]	-45					
	Tiempo [min]	0					
	Vacío [kPa (mbar)]	0,004 (0,04)					
Sublimación 1	Temperatura [°C]	-45	-45	35	35		
	Tiempo [min]	0	10	123	960		
	Vacío [kPa (mbar)]	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)	0,004 (0,04)		
Sublimación 2	Temperatura [°C]	35					
	Tiempo [min]	240					
	Vacío [kPa (mbar)]	0,034 (0,34)					

El Ejemplo 6 proporciona algunas realizaciones de productos medicinales que comprenden una proteína biológicamente activa que se obtiene usando un método de acuerdo con la invención, en particular, un método como el descrito en el presente documento anteriormente en relación con el Ejemplo 2. El primer producto (indicado como "CDV") es la vacuna en forma de lioesferas, que pueden servir para la formulación de una vacuna para inyección mediante la resuspensión de una o más esferas en agua para inyección. Cada esfera, que tiene un volumen de aproximadamente 100 µl, contiene virus del moquillo canino vivo atenuado en un título de aproximadamente 7 (log10 de TCID50). Este producto se obtiene de dos formas, tanto a pH 7,2 usando un tampón de KPO₄ 10 mM, una primera forma de acuerdo con la técnica anterior que tiene 3,7 % (p/p) de sacarosa como agente estabilizante (y, además, gelatina al 0,8 % p/v y amina NZ al 1,0 % p/v como agentes de carga), y una segunda forma que tiene 21,4 % (p/p) de azúcar no polimérico (sacarosa al 15,3 % (p/p) y trehalosa al 6,1 % (p/p)) como agente estabilizante (junto a arginina al 5,2 % p/v, gelatina al 0,8 % p/v y amina NZ al 1,0 % p/v como agentes de carga). Se sometieron estas esferas a un ensayo en el que las esferas se almacenaron a 45 °C durante un máximo de 4 semanas. Se determinó el título resultante tras 1, 2 y 4 semanas de almacenamiento. Los resultados se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Títulos de las esferas de CDV tras el almacenamiento a 45 °C

Tiempo de almacenamiento en semanas	Esfera de CDV de azúcar al 3,7 % (p/p) log 10 de TCID50	Esfera de CDV de azúcar al 21,4 % (p/p) log 10 de TCID50
0	7,5	7,2
1	4,6	4,7
2	4,3	5,1
3 (estimación, interpolación)	3,4	5,0
4	2,6	5,0

El segundo producto (indicado como "CPI") también es una vacuna en forma de lioesferas que puede servir para la formulación de una vacuna para inyección mediante la resuspensión de una o más esferas en agua para inyección. Cada esfera, que tiene un volumen de aproximadamente 100 µl, contiene virus paragripal canino vivo atenuado en un título de aproximadamente 7 (log10 de TCID50). Este producto se obtiene de dos formas, una primera forma de acuerdo con la técnica anterior que tiene 3,7 % (p/p) de sacarosa como agente estabilizante y una segunda forma que tiene 21,4 % (p/p) de azúcar no polimérico como agente estabilizante (como se ha indicado anteriormente en el presente documento). Se sometieron estas esferas a un ensayo en el que se almacenaron las esferas a 45 °C durante un máximo de 4 semanas. El título resultante se determinó tras 1, 2 y 4 semanas de almacenamiento. Los resultados se indican en la Tabla 6.

Tabla 6. Títulos de las esferas de CPI tras el almacenamiento a 45 °C

Tiempo de almacenamiento en semanas	Esfera de CPI de azúcar al 3,7 % (p/p) log 10 de TCID50	Esfera de CPI de azúcar al 21,4 % (p/p) log 10 de TCID50
0	6,7	6,9
1	4,6	5,0
2	4,2	5,3
3 (estimación, interpolación)	3,3	5,1
4	2,5	4,9

5 El tercer producto (indicado como "CAV2") también es una vacuna en forma de liosferas, que pueden servir para la formulación de una vacuna para inyección mediante la resuspensión de una o más esferas en agua para inyección. Cada esfera, que tiene un volumen de aproximadamente 100 µl, contiene adenovirus canino de tipo 2 vivo atenuado en un título de aproximadamente 5 (log10 de TCID50). Este producto se obtiene de dos formas, una primera forma de acuerdo con la técnica anterior que tiene 3,7 % (p/p) de sacarosa como agente estabilizante, y una segunda forma que tiene 22,8 % (p/p) de sacarosa como agente estabilizante. Se sometieron estas esferas a un ensayo en el que se almacenaron las esferas a 45 °C durante un máximo de 4 semanas. Se determinó el título resultante tras 1, 2, 3 y 4 semanas de almacenamiento. Los resultados se indican en la Tabla 7.

Tabla 7. Títulos de las esferas de CAV2 tras su almacenamiento a 45 °C

Tiempo de almacenamiento en semanas	Esfera de CAV2 de azúcar al 3,7 % (p/p) log 10 de TCID50	Esfera de CAV2 de azúcar al 22,8 % (p/p) log 10 de TCID50
0	5,0	4,7
1	2,6	4,3
2	2,8	3,9
3 (estimación, interpolación)	2,7	4,1
4	2,5	4,2

15 Se repitieron los experimentos anteriores con los antígenos CPi, CAV2 y CDV con una mezcla de azúcar no polimérico diferente por encima del 20 % p/p, para ver si se podrían obtener resultados comparables. En este experimento, el estabilizante contenía 21,6 % (p/p) de azúcar no polimérico (sacarosa al 6,1 % (p/p) y trehalosa al 15,5 % (p/p)) en un tampón de KPO₄ 10 mM a pH 7,2. El agente de carga fue el mismo que en el otro experimento (arginina al 5,2 % p/v, gelatina al 0,8 % p/v y amina NZ al 1,0 % p/v). Se volvieron a someter las esferas a un ensayo en el que las esferas se almacenaron a 45 °C durante un máximo de 4 semanas. Se determinó el título resultante tras 1, 2 y 4 semanas de almacenamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Con este estabilizante, se pudo obtener un resultado equivalente al de la formulación anterior.

Tabla 8

Tiempo de almacenamiento en semanas	Esfera de CPi de azúcar al 21,6 % (p/p) log 10 de TCID50	Esfera de CAV2 de azúcar al 21,6 % (p/p) log 10 de TCID50	Esfera de CDV de azúcar al 21,6 % (p/p) log 10 de TCID50
0	6,50	4,42	7,08
1	5,50	4,33	5,83
2	5,67	4,33	5,42
4	4,67	4,33	5,33

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de producción de un producto medicinal que comprende una proteína biológicamente activa, que comprende las etapas de:
- proporcionar una composición acuosa que comprende un disolvente, la proteína biológicamente activa y entre el 20 % p/p y el 60 % p/p de un azúcar no polimérico;
 - congelar la composición, formando así al menos un cuerpo congelado que comprenda el disolvente en forma congelada;
 - 10 - poner el cuerpo congelado en un aparato de secado mientras es portado por un soporte, comprendiendo el soporte uno o más elementos de contención que definen uno o más límites del soporte, en donde, como máximo, el 30 % de la superficie del cuerpo está contigua a los uno o más elementos de contención;
 - reducir la presión en el aparato de secado por debajo de la presión atmosférica;
 - 15 - proporcionar calor al cuerpo para sublimar el disolvente congelado del cuerpo y obtener un cuerpo seco, teniendo el cuerpo liofilizado un volumen de entre 50 y 1.000 μ l.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el disolvente congelado se sublima en menos de 48 horas.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** el disolvente congelado se sublima en menos de 36 horas.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** el disolvente congelado se sublima en 16 a 24 horas.
- 25 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, como máximo, el 20 % de la superficie del cuerpo está contigua al uno o más elementos de contención del soporte.
- 30 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que**, como máximo, el 10 % de la superficie del cuerpo está contigua al uno o más elementos de contención del soporte.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el cuerpo congelado es un esferoide.
- 35 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el elemento de contención del soporte es un suelo, proporcionándose el cuerpo tendido sobre este suelo y estando el soporte abierto para permitir que la radiación pase libremente hacia dicho suelo, **caracterizado por que** al menos una parte del calor se proporciona mediante emisión de radiación térmica desde una fuente de radiación presente en el aparato de secado de encima del soporte, para llegar al cuerpo congelado.
- 40 9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el elemento de contención del soporte es un suelo, proporcionándose el cuerpo tendido sobre este suelo y estando el soporte abierto para permitir que la radiación pase libremente hacia dicho suelo, **caracterizado por que** el calor se proporciona mediante la emisión de radiación térmica desde una fuente de radiación presente en el aparato de secado sobre el soporte para llegar al cuerpo en combinación con la conducción de calor a través del elemento de contención que está contiguo al cuerpo congelado.
- 45 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la cantidad del azúcar de la composición acuosa se selecciona del grupo que consiste en los intervalos del 20 al 55 % p/p, del 20 al 50 % p/p, del 20 al 45 % p/p, del 25 al 45 % p/p, del 25 al 40 % p/p, del 25 al 35 % p/p y del 27 al 30 % p/p.
- 50 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el azúcar comprende moléculas monoméricas y/o diméricas.
- 55 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado por que** el azúcar comprende glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, fructosa, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol y/o xilitol.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** un contenido de humedad residual del cuerpo seco es inferior al 2 % p/p.
- 60 14. Un producto medicinal en forma de un cuerpo liofilizado esencialmente homogéneo que tiene un volumen de entre 50 y 1.000 μ l que comprende una proteína biológicamente activa, estando la proteína dispersada en una matriz sólida de un azúcar no polimérico, **caracterizado por que** el cuerpo comprende entre aproximadamente el 21 y el 72 % p/v de dicho azúcar.
- 65

15. Un producto en forma de un cuerpo liofilizado esencialmente homogéneo que tiene un volumen de entre 50 y 1.000 μl que comprende una proteína biológicamente activa, pudiéndose obtener el cuerpo mediante un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

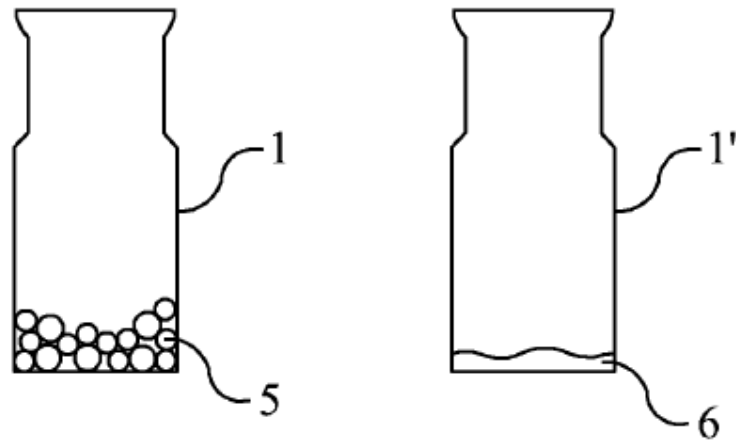


FIG. 1

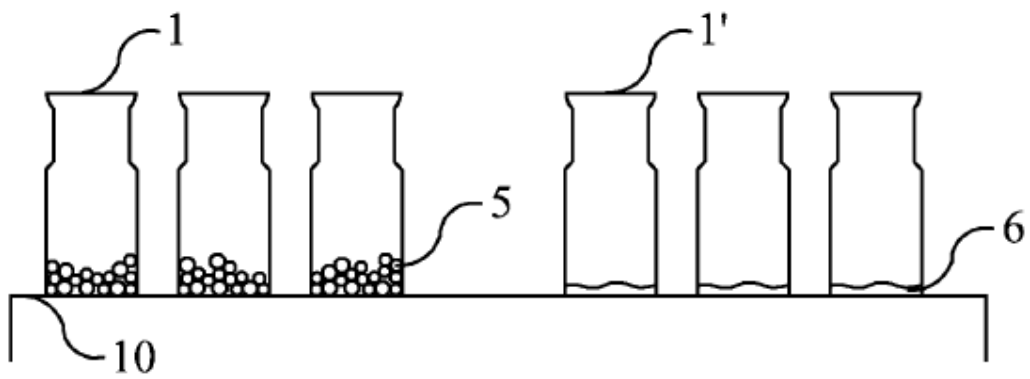


FIG. 2

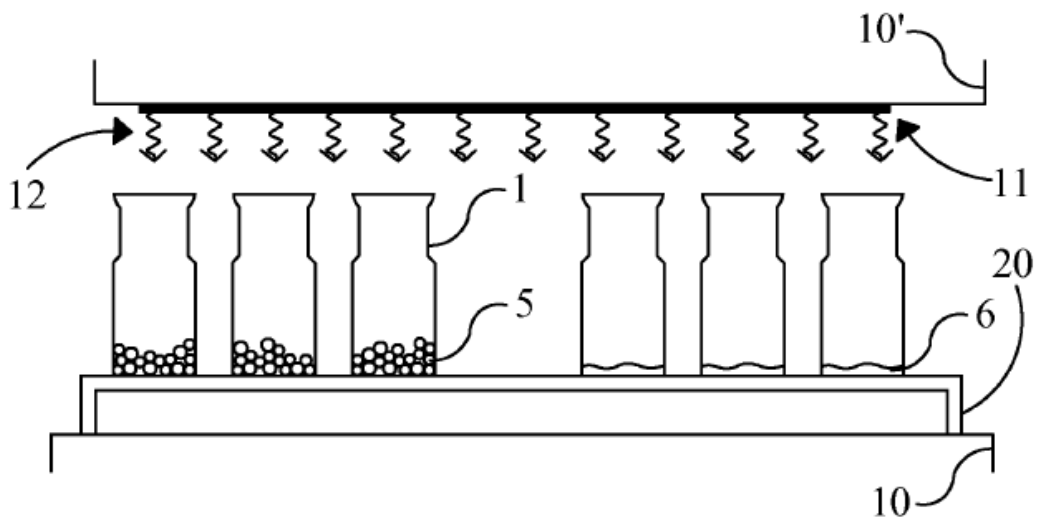


FIG. 3

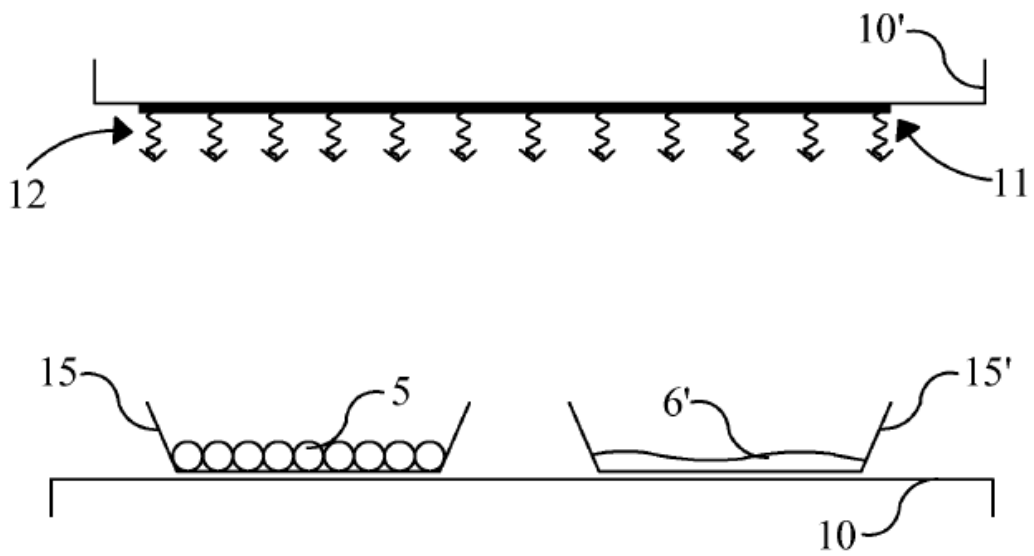


FIG. 4