

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 416**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/295** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

**A01N 1/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2005 PCT/US2005/019285**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2005 WO05117962**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2005 E 05757709 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 1750760**

54 Título: **Conservación mediante vaporización**

30 Prioridad:

**02.06.2004 US 576394 P**

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

**28.11.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSAL STABILIZATION TECHNOLOGIES,  
INC. (100.0%)  
4050 Sorrento Valley Boulevard, Suite L  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**BRONSHTEIN, VICTOR**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 644 416 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Conservación mediante vaporización

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

Esta es una invención en el campo de equipos y métodos para estabilización (conservación) de moléculas, virus (vacunas), células y pequeños especímenes multicelulares biológicamente activos a temperaturas ambiente. La invención descrita aquí puede ser utilizada en una escala menor, así como a escala industrial. Más particularmente, la invención se relaciona con métodos y equipos para facilitar el almacenamiento a largo plazo y transporte de estos materiales biológicos lábiles a temperaturas ambiente en un estado seco, líquido amorfo muy viscoso o vítreo.

Esta invención también se relaciona con un proceso tecnológico para integrar las siguientes etapas: conservación de los materiales biológicos mediante vaporización en viales (formato de dosis unitarias), o en un formato a granel utilizando bandejas, bolsas u otros contenedores con o sin subsecuente molienda y/o micronización del material conservado. La molienda y/o la micronización permite formar polvo seco, el cual puede ser utilizado en productos mixtos (por ejemplo, cereales) para diferentes aplicaciones prácticas de vacunas y otros productos biofarmacéuticos para uso tanto humano como animal, alimentación (incluyendo alimentación para bebés) y piensos animales.

20 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La conservación y almacenamiento de materiales biológicamente activos, virus, células y pequeños especímenes multicelulares es importante para muchas aplicaciones, incluyendo investigación, industrias de alimentos, microbiológica, farmacéutica y de cuidado de la salud, así como para la agricultura.

Uno de los criterios más importantes en la evaluación de la eficacia de prácticamente todas las técnicas de conservación es cuán estable es el producto resultante. Es bien sabido que, en estado acuoso, las vacunas virales y bacterianas, las proteínas terapéuticas y otros materiales biológicos pierden instantáneamente la actividad durante el almacenamiento a temperaturas ambiente (AT). Por ejemplo, de acuerdo con Dr. Truong (tal como se describe en la solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 20030219475), los virus envueltos -tales como el virus vivo de la influenza manufacturado a partir de fluido alantoide de huevo- pierde una escala logarítmica de potencia, definida como Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos (TCID<sub>50</sub>), en menos de dos a tres semanas cuando se almacena bajo temperatura refrigerada, esto es, aproximadamente 4 grados Celsius. A condiciones de temperatura ambiente (aproximadamente 25 grados Celsius) y a temperaturas más cálidas tales como a 37 grados Celsius, el virus pierde tal potencia en materia de días a horas, respectivamente. Una capacidad para almacenar materiales biológicamente activos deshidratados a temperatura ambiente durante períodos extendidos de tiempo conlleva enormes beneficios.

Los reactivos, materiales y materiales biológicos deshidratados son caracterizados por un peso significativamente reducido. Además, requieren menos espacio para almacenamiento y, al mismo tiempo, ofrecen estabilidad incrementada.

Actualmente, las vacunas contra el sarampión son conservadas por liofilización. Debido a que las vacunas liofilizadas son estables a temperaturas cercanas a 0°C, las vacunas contra el sarampión necesitan ser refrigeradas en todo momento. La Organización Mundial de la Salud (OMS) se han estimado que sólo en mantenimiento de la "cadena de frío" existente en países económicamente débiles (ECC) cuesta más de \$ 200 millones de dólares anualmente. Además, muchas áreas rurales no tienen refrigeración ninguna, lo que hace prácticamente imposible o muy costoso administrar vacunas contra sarampión existentes en tales áreas.

La disponibilidad de vacunas estables a temperatura ambiente y más potentes contra MMR, tuberculosis, gripe y otras enfermedades tendrá un enorme impacto sobre la salud humana a nivel mundial. El almacenamiento a temperaturas ambientales eliminaría la necesidad de una cadena de frío, un problema logístico costoso y desafiante en muchas partes del mundo, especialmente aquellas partes donde se requiere una máxima cantidad de estas vacunas.

Los métodos existentes para la manufactura y almacenamiento de vacunas vivas requieren un mejoramiento por dos razones principales. Primero, durante la manufactura, la vacuna típicamente es liofilizada o secada por congelación.

La liofilización convencional es muy nociva para los componentes celulares y otros materiales biológicos, lo cual, típicamente, da como resultado una viabilidad reducida de la vacuna por una escala logarítmica o más. En segundo lugar, los productos liofilizados convencionalmente son estables solamente a o cerca de 0°C, lo que requiere que la vacuna sea refrigerada desde el momento en que es manufacturada hasta el momento en que es administrada. Por lo tanto, una así llamada "cadena de frío" necesita ser mantenido durante el almacenamiento y el transporte. En muchos casos, incluyendo el transporte dentro de áreas del mundo en desarrollo y remotas, la refrigeración o no está disponible o es problemática. Incluso si hay refrigeración disponible, incrementa significativamente los costes de almacenamiento y transporte. Así, el desarrollo de un método para la estabilización de vacunas de manera que puedan ser almacenadas y transportadas a temperaturas ambiente es un objetivo importante de esta invención.

Hasta ahora, sin tener en cuenta los intentos de numerosos investigadores, no se han desarrollado tales métodos utilizando liofilización, y los métodos más comunes basados en liofilización han fallado en eliminar la necesidad de la "cadena de frío".

## 5 Estabilización por vitrificación (formación vítrea)

Mientras que para una cantidad limitada de tiempo (varios días), puede lograrse una estabilización de materiales biológicos sensibles, incluyendo macromoléculas biológicas, virus y objetos celulares, en un estado líquido, la estabilización a largo plazo, (varios meses, varios años o más) de los materiales biológicos requiere de tener la movilidad molecular para detener los procesos de degradación durante el almacenamiento. Esto puede lograrse mediante vitrificación, la cual es una transformación de un líquido a un estado sólido amorfo altamente inmóvil, no cristalino, conocido como el "estado vítreo".

Un "estado vítreo" es un estado sólido amorfo, el cual puede lograrse por superenfriamiento de un material que estaba inicialmente en estado líquido. La difusión en los materiales vitrificados (por ejemplo, vidrios) ocurre a ratas extremadamente bajas (por ejemplo, micrones/año). Consecuentemente, los cambios químicos y biológicos que requieren la interacción de más de una unidad estructural son en la práctica completamente inhibidos. Los vidrios normalmente aparecen como sólidos homogéneos, transparentes, frágiles, que pueden ser triturados o molidos para convertirlos en un polvo. Por encima de una temperatura conocida como la temperatura de transición vítrea  $T_g$ , la viscosidad cae rápidamente y el material se transforma a partir de un estado vítreo en lo que se conoce como un "estado de caucho" deformable. A medida que se incrementa la temperatura, el material sufre una transición a un estado líquido. Los beneficios óptimos de la vitrificación para almacenamiento a largo plazo pueden ser asegurados solamente bajo condiciones en las que  $T_g$  es mayor que la temperatura de almacenamiento.

Aunque los científicos todavía tienen disputas acerca de los modelos termodinámicos que explican la transformación de líquidos altamente superenfriados o soluciones sobresaturadas, hacia el "estado vítreo", durante el enfriamiento, la vitrificación ha sido utilizada ampliamente para preservar materiales biológicos y agentes químicos altamente reactivos. La premisa básica de la vitrificación es que una difusión limitada de procesos físicos y las reacciones químicas, incluyendo los procesos responsables de la degradación de los materiales biológicos, se detiene en el estado vítreo. Esta premisa está basada en la teoría de Einstein que establece la relación entre viscosidad y difusión. En términos generales, los vidrios son materiales amorfos termodinámicamente inestables que son mecánicamente estables a una viscosidad muy alta ( $10^{12}$ - $10^{14}$  Pa.s.). Un líquido típico tiene una rata de flujo de 10 m/s en comparación con  $10^{-14}$  m/s en el estado vítreo.

Durante muchos años, se ha sabido que los materiales biológicos pueden ser conservados a  $-196^\circ\text{C}$ . La  $T_g$  para el agua pura es aproximadamente  $-145^\circ\text{C}$ . Si se forman cristales de hielo durante el enfriamiento, la solución que permanece no congelada en los canales entre los cristales de hielos se vitrificará a  $T_g'$ , la cual es mayor que  $T_g$  para agua pura. Los materiales biológicos que son rechazados en los canales durante la formación del hielo serán estables a temperaturas por debajo de  $T_g'$ .

El efecto nocivo de la criopreservación está asociado principalmente con deshidratación inducida por la congelación, cambio en pH, incremento en la concentración extracelular de electrólitos, transformación de fases en membranas biológicas y macromoléculas a temperaturas bajas, y otros procesos asociados con la cristalización del hielo. El criodeterioro potencial es una desventaja en los métodos que se basan en la congelación de los materiales biológicos. Este deterioro podría ser disminuido utilizando excipientes crioprotectores (protectores), por ejemplo, glicerol, etilen glicol, dimetilsulfóxido (DMSO), sacarosa y otros azúcares, aminoácidos, polímeros sintéticos y/o biológicos, etc.

Los materiales biológicos pueden ser estabilizados a temperaturas substancialmente superiores a  $-145^\circ\text{C}$  si se colocan en soluciones de conservación concentradas con alta  $T_g$ . Por ejemplo, para una solución que contiene 80% de sacarosa, la  $T_g$  es aproximadamente  $-40^\circ\text{C}$ . Una solución que contiene 99% de sacarosa está caracterizada por  $T_g$  de aproximadamente  $52^\circ\text{C}$ . La presencia de agua en una muestra da como resultado un fuerte efecto plastificante, el cual hace disminuir la  $T_g$ . La  $T_g$  es directamente dependiente de la cantidad de agua presente, y por lo tanto puede ser modificada controlando el nivel de hidratación – cuanto menos agua, mayor será la  $T_g$ . Por lo tanto, los especímenes (que van a ser vitrificados a una temperatura ambiente) deben ser fuertemente deshidratados por secado. Sin embargo, el secado puede ser nocivo para los materiales biológicos. Por lo tanto, para estabilizar los materiales biológicos a temperatura ambiente y todavía conservar su viabilidad y funciones, necesitan ser secados en la presencia de un excipiente protector (esto es, un protector) o una combinación de excipientes, los cuales tienen una temperatura de transición vítrea  $T_g$  superior a la temperatura ambiente.

Hay al menos dos aspectos de estabilización en un estado seco que deberían ser optimizados para llegar a un método para conservar materiales biológicos que den como resultado un material conservado adecuado para un almacenamiento a largo plazo a temperaturas ambiente: (1) es importante formular una solución de conservación efectiva que no cristalice durante el proceso de secado y, al mismo tiempo, proteja de manera confiable el agente biológico frente al deterioro que pueda ser causado por la tensión de la deshidratación; y (2) el método de deshidratación debe permitir una manera eficiente y escalable de secar el material objetivo.

La técnica anterior enseña varios métodos para proveer preparaciones de estabilidad potenciada de materiales biológicos lábiles en forma deshidratada: liofilización, secado al vacío con aire por evaporación (conservación por evaporación), y conservación por formación de espuma.

5 Conservación por evaporación

La aplicación de secado para la conservación de agentes biofarmacéuticos fue registrada hace varios siglos. Se reportó entonces que el zumo de bayas de endrina "podía ser reducido por ebullición suave hasta una consistencia sólida, estado en el cual se mantendrá durante todo el año". A comienzo del siglo anterior, muchos científicos llevaron a cabo comparaciones entre los efectos estabilizadores de la evaporación a partir del estado líquido versus la liofilización. Como resultado, se ha establecido que la actividad de materiales biológicos secados por secado evaporativo de pequeñas gotas es comparable con y en muchos casos incluso mejor que la actividad de muestras liofilizadas. Por ejemplo, se ha demostrado que enzimas lábiles (luciferasa y deshidrogenasa isocítrica) pueden ser conservadas por secado evaporativo durante más un año a 50°C sin ninguna pérdida detectable de actividad durante el secado y almacenamiento subsecuente a 50°C (Bronstein, V., Frank, J.L., and Leopold, A.C. (1996). Protection of Desiccated Enzymes by Sugars. In: "Cryo 96 program", Abstract 22 of a Paper Presented at the 33rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Indianapolis, Indiana; Bronstein, V., and Leopold, A.C. (1996) Accelerated aging of dried luciferase and isocitrate dehydrogenase. Effect of sugar/enzyme mass ratio. In: "Cryo 96 program", Abstract 23 of a Paper Presented at the 33rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Indianapolis, Indiana). Desafortunadamente debido a que las soluciones deshidratadas que contienen protectores se hacen muy viscosas, toma largos períodos de tiempo evaporar el agua incluso de gotas pequeñas de una solución. Por lo tanto, hasta ahora, las aplicaciones industriales han utilizado los métodos de liofilización porque el secado evaporativo es un proceso limitado en difusión que no es escalable a cantidades industriales.

25 Liofilización (FD)

El secado por congelación o liofilización, ha sido conocido y aplicado para conservar diversos tipos de proteínas, virus y células, incluyendo RBCs, plaquetas y microorganismos. El FD consiste de dos etapas principales: secado primario y secado secundario.

La liofilización puede ser utilizada para producir materiales biológicos estables en cantidades industriales. Sin embargo, como asunto práctico, es muy difícil (sino imposible) desarrollar un proceso de liofilización de carga continua, para la confesión efectiva en costes de cantidades industriales de materiales biológicos estables. Además, es muy difícil ejecutar la liofilización como un proceso barrera (esto es, como un proceso donde el operador está suficientemente separado del material que está siendo conservado) tanto en viales para la producción de dosis unitarias, en bolsas, bandejas u otros contenedores para producción a granel. Son necesarios nuevos métodos para satisfacer todos los requerimientos de la producción industrial.

40 Liofilización primaria

Las limitaciones de la liofilización, tal como se describieron más arriba, resultan en parte de una necesidad de utilizar presión baja (o alto vacío) durante un proceso de liofilización. Se requiere un alto vacío porque la temperatura del material durante la liofilización primaria debería estar por debajo de su temperatura de colapsamiento, la cual es aproximadamente igual a  $T_g'$ . A tales temperaturas bajas, el secado primario toma muchas horas (a veces días) puesto que la presión de equilibrio por encima del hielo a temperaturas por debajo de -25°C es inferior a 0.476 Torrs.

Por lo tanto, un nuevo proceso debe permitir tiempos de producción más cortos. La presión de vacío baja utilizada en los métodos de liofilización existentes limita la cantidad de agua que puede ser retirada de una cámara de secado a un condensador por unidad de tiempo. Por lo tanto, es imposible construir un liofilizador interconectado industrial con un volumen de material para ser secado en cada cámara igual a varios litros o más, lo cual es necesario para una producción a escala industrial. Son necesarios nuevos métodos para permitir la producción a escala industrial eficiente de cantidades suficientemente grandes de materiales biológicos conservados.

Además, tales presiones de vapor de agua bajas limitan la selección de películas que pueden ser utilizadas para aislar el material objetivo en bolsas con respecto al ambiente de la cámara durante el proceso de liofilización. Actualmente la industria utiliza bandejas Lyoguard cubiertas con membranas Gore. Las membranas Gore están hechas con poros que son permeables al vapor de agua, lo cual es necesario para cualquier proceso de secado. Debido a la presencia de los poros, las membranas Gore también son permeables para algunos virus.

La liofilización primaria se lleva a cabo por sublimación del hielo a partir de un espécimen congelado a temperaturas cercanas a o por debajo de  $T_g'$  que es una temperatura a la cual una solución que permanece sin congelar entre cristales de hielo se hace sólida (vitriifica) durante el enfriamiento. De acuerdo con consideraciones convencionales, la ejecución de la liofilización a tales temperaturas bajas es importante por al menos dos razones.

La primera razón por la cual la liofilización a bajas temperaturas (esto es, por debajo de  $T_g'$ ) es importante es para asegurar que la torta remanente después de la eliminación del hielo por sublimación (secado primario) es "sólida" y

mecánicamente estable, esto es, que no colapsa. Esa es una razón válida. Al mantener la torta en un estado "sólido" mecánicamente estable después de la liofilización primaria es importante asegurar la reconstitución efectiva del material liofilizado. Se propusieron varios métodos para medir la  $T_g'$  para un material específico. Estos métodos se basan en diferentes interpretaciones de las características que pueden verse en termogramas de DSC (calorímetro de barrido diferencial). La manera más confiable para determinar la  $T_g'$  está basada en una evaluación de la temperatura a la cual el hielo comienza a fundirse y la concentración de agua que permanece no congelada ( $W_g'$ ) durante el enfriamiento lento. Los siguientes datos relevantes han sido reportados:

- Sacarosa:  $-38.8^\circ\text{C} < T_g' < -37.55^\circ\text{C}$ , y 18.76 porcentaje en peso  $< W_g' = 1 - C_g' < 19.42$  porcentaje en peso;
- Glucosa:  $-59.9^\circ\text{C} < T_g' < -49.37^\circ\text{C}$ , y 18.76 porcentaje en peso  $< W_g' = 1 - C_g' < 19.42$  porcentaje en peso;
- Sorbitol:  $-54.44^\circ\text{C} < T_g' < -52.03^\circ\text{C}$ , y 18.76 porcentaje en peso  $< W_g' = 1 - C_g' < 19.42$  porcentaje en peso.

Para una solución de albúmina de suero bovino en agua  $T_g'$  es  $-20^\circ\text{C}$  y  $W_g'$  es 20 por ciento en peso. Por esta razón, la liofilización primaria debería llevarse a cabo a temperaturas por debajo de  $-20^\circ\text{C}$  en un rango de temperatura denominado temperaturas bajas intermedias (ILT), las cuales están aproximadamente entre  $-25^\circ\text{C}$  y  $-50^\circ\text{C}$ .

La segunda razón típicamente avanzada para soportar la importancia de la liofilización a bajas temperaturas (esto es, por debajo de  $T_g'$ ) es que la tasa de supervivencia de materiales biológicos después de la liofilización es mayor si la liofilización primaria se lleva a cabo a temperaturas más bajas.

Se utilizan típicamente dos argumentos principales para soportar esta noción. El primero es que el secado a temperaturas más bajas es beneficioso porque "... disminuye la cinética de las reacciones de degradación" (véase por ejemplo, la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 10/412,630). El segundo argumento utilizado para soportar la conexión entre la liofilización a bajas temperaturas y la tasa de supervivencia de materiales biológicos es que los daños inducidos por la liofilización ocurren primariamente durante el secado secundario después de que se completa la liofilización del hielo. (Webb, S.D. Effect of annealing lyophilized and spray-lyophilized formulations of recombinant human interferon-gamma. J Pharm Sci, 2003, 92 (4) :715-729).

Sin embargo, ambos argumentos anteriores son erróneos porque el descenso en las tasas de reacción esperado a partir de la cinética de Arrhenius es aplicable únicamente a soluciones no congeladas. Las tasas de reacción realmente se incrementan en soluciones congeladas puesto que los cristales de hielo concentran los solutos y los materiales biológicos en los canales que permanecen no congelados entre los cristales. En teoría y en la práctica, la liofilización ("FD") es muy nociva para los materiales biológicos sensibles. Ocurren daños fuertes inducidos por FD durante la congelación (formación de cristales de hielo) así como durante el equilibrio subsecuente de los especímenes congelados a temperaturas bajas intermedias durante la sublimación del hielo. Factores bien conocidos que producen el daño celular durante la congelación incluyen: deshidratación inducida por la congelación, daños mecánicos de las células durante la cristalización y recristalización del hielo, transformación de fases en las membranas celulares, incremento de la concentración de electrolitos y otros. Sin embargo, posiblemente el factor principal que deteriora los materiales biológicos congelados es la ocurrencia de un gran cambio de pH en la fase líquida que permanece no congelada entre los cristales de hielo. Este cambio de pH anormal, que puede ser tan grande como 5 unidades (esto es,  $\text{pH} > 12$ ), está asociado con la hidrólisis por cristalización, como se describe en "Freezing Potentials Arising on Solidification of Dilute Aqueous Solution of Electrolytes." V.L. Bronshteyn, A.A. Chernov, J. Crystal Growth 112: 129-145 (1991).

La hidrólisis por cristalización ocurre porque los cristales de hielo capturan iones positivos y negativos de manera diferente. Esto crea un campo eléctrico significativo (aproximadamente  $10^7$  V/m) dentro de los cristales de hielo. La neutralización de este campo eléctrico ocurre debido a la electrólisis en los cristales de hielo a una tasa proporcional a la constante de la disociación de la molécula de agua en hielo. Esta neutralización da como resultado un cambio en el pH del líquido que permanece entre los cristales de hielo. El efecto nocivo de la hidrólisis por cristalización puede atenuarse reduciendo la superficie de hielo que se forma durante la congelación e incrementando el volumen de la fase líquida que permanece entre los cristales de hielo. Este líquido remanente también reduce el efecto nocivo (i) la concentración de electrolito creciente (o cualquier otra molécula altamente reactiva) y (ii) el daño mecánico a las células entre los cristales de hielo. El incremento de líquido entre los cristales de hielo puede alcanzarse mediante (I) incremento de la concentración inicial de los protectores agregados antes de la congelación y (ii) disminuyendo la cantidad de hielo formada en la muestra.

El evitar la congelación a temperaturas iguales a  $T_g'$  o inferiores (a las cuales la liofilización se lleva a cabo típicamente) permitirá reducir significativamente la cantidad de deterioro en el agente biológico conservado. Por lo tanto, un nuevo método que permita una conservación de materiales biológicos sin someter los materiales biológicos a temperaturas cercanas o por debajo de  $T_g'$  mejorará significativamente la calidad del material conservado.

## Liofilización secundaria

Después de que la eliminación del hielo por sublimación (secado primario) está completa, la muestra puede ser descrita como una torta porosa. La concentración de agua en la muestra al final del secado primario está por encima de la concentración de agua  $W_g'$  que permanece sin congelar en los canales vítreos entre los cristales de hielo a una temperatura por debajo de  $T_g'$ . Los datos presentados más arriba muestran que  $T_g'$  depende fuertemente de la composición de la solución, mientras que para la mayoría de solutos  $W_g'$  es aproximadamente 20% en peso. A tales concentraciones altas de agua, la temperatura de transición vítrea del material de torta está por debajo de la temperatura de liofilización primaria, y/o significativamente por debajo de  $-20^\circ\text{C}$ . Se lleva a cabo el secado secundario para eliminar el agua remanente (aproximadamente 20% en peso) e incrementar la temperatura de transición vítrea en el material de torta. Como asunto práctico, el secado secundario no puede ser llevado a cabo a temperaturas  $T_g'$  o inferiores puesto que la difusión del agua desde el material en un estado vítreo es extremadamente lenta. Por esta razón, el secado secundario se lleva a cabo calentando la torta hasta una temperatura de secado  $T_d$  que es superior a la temperatura de transición vítrea  $T_g$  del material de torta en un momento dado. Si durante la etapa de secado secundaria,  $T_d$  es substancialmente más alta que  $T_g$ , la torta "colapsada" y formará un jarabe viscoso, haciendo por lo tanto imposible una reconstitución estándar. Por lo tanto, el colapso de la torta es altamente indeseable.

El fenómeno de colapso, el cual es cinético por naturaleza, ha sido discutido extensamente en la literatura. La rata de colapso se incrementa a medida que la viscosidad del material de torta disminuye. Para evitar o llevar el proceso de colapso a una escala despreciable,  $T_d$  se mantiene cercana a  $T_g$  durante el secado secundario, asegurando por lo tanto que la viscosidad del material de torta es alta y que la rata de colapso es lenta.

Durante el secado secundario, la eliminación de agua ocurre a través de la evaporación desde las superficies interna y externa de la torta y está limitada principalmente por la rata de difusión de agua dentro del material de la torta. Por esta razón, un secado secundario también toma muchas horas. La difusión de agua dentro del material de torta muy viscoso durante la etapa de secado secundaria es un proceso muy lento que crea altos gradientes de concentración de agua dentro del material de torta. Por lo tanto, al final de la etapa de secado secundario, la  $T_g$  del material de torta está normalmente todavía muy por debajo de la  $T_d$  máxima utilizada durante el secado secundario. En muchos casos, esto explica por qué los materiales biológicos no son estables después de conservación por liofilización.

Para simplificar el análisis, el tiempo  $t$  característico de este proceso puede ser estimado utilizando la ecuación  $t = h^2/D$ , en el que  $h$  es un espesor del espécimen y  $D$  es el coeficiente de difusión de agua. Para agua,  $D$  es aproximadamente igual a  $10^{-5}\text{cm}^2/\text{seg}$ . Dado  $D = 10^{-5}\text{cm}^2/\text{seg}$ , tomará solamente aproximadamente  $10^{-3}$  segundos para secar un espécimen pequeño con un espesor de  $1\ \mu\text{m}$ . Sin embargo,  $D$  disminuye rápidamente a medida que el grado de deshidratación, a temperatura de vitrificación ( $T_g$ ) y viscosidad en el espécimen se incrementa. Si  $T_g$  puede ser incrementado durante la deshidratación hasta la temperatura a la cual se lleva a cabo el secado,  $D$  disminuirá (mientras que la viscosidad se incrementará) aproximadamente catorce (14) órdenes de magnitud o más. Como resultado, el tiempo requerido para eliminar agua de un espécimen de  $1\ \mu\text{m}$  será cercano a diez mil (10,000) años.

Por lo tanto, como asunto práctico, el estado vítreo solamente puede ser alcanzado enfriando (a presión constante) y no secando. Por la misma razón, cuando se seca una solución biológica, se puede alcanzar una temperatura de vitrificación  $T_g$  superior a la temperatura de  $T_d$  a la cual lleva a cabo el secado. Este es un fenómeno básico que ha sido pasado por alto por muchos científicos que no aprecian cuán lento es el secado a temperaturas cercanas a  $T_g$  o por debajo. Por ejemplo, Roser et al., (Patentes de los Estados Unidos No. 5,762,961), Schebor et al. (Journal of Food Engineering, 30, 269-282, 1996), Sun et al. (Physiologia Plantarum 90, 621-628, 1994), y muchos otros investigadores han reportado valores de  $T_g$  mucho mayores que la temperatura a la cual el material fue secado  $T_d$ . En estas publicaciones, para determinar  $T_g$ , los autores deben haber malinterpretado sus resultados de prueba obtenidos por dispositivos de DSC (calorimetría de barrido diferencial). Una medición más confiable de  $T_g$  debería llevarse a cabo midiendo la aparición de polarización estimulada térmicamente (o despolarización) o la aparición en cambios de calor específico durante una transición del estado vítreo al líquido.

## Conservación por formación de espuma (PFF)

Durante más de quince años, la liofilización ha sido un método dominante para conservación de materiales biológicos lábiles. Esta selección ha estado basada en la creencia convencional de que la liofilización es la única tecnología escalable (industrial) que puede permitir la conservación de materiales biológicos lábiles en estado seco.

Otros métodos conocidos, tales como secado por aspersión, secado con fluidos supercríticos y otros métodos escalables de desecación han fallado en conservar los materiales biológicos sensibles. Durante el secado por aspersión, pequeñas gotas de suspensiones o soluciones biológicas o farmacéuticas son asperjadas en un gas inerte caliente (por encima de  $100^\circ\text{C}$ ) o en atmósfera de aire, en donde son rápidamente secados y convertidos en un polvo. Las altas temperaturas utilizadas en este método producen daños inaceptables a materiales biológicos sensibles. Además, este método puede no proveer suficiente agente biológico deshidratado y, dependiendo de los requerimientos de humedad residual específico para la estabilidad del producto, pueda requerirse secado adicional por otros medios, tales como secado en bandejas de vacío.

Aproximadamente hace medio siglo, fue demostrado por Annear que las soluciones concentradas y los líquidos biológicos que contenían azúcares o aminoácidos podrían ser secados por un jarabe espumante bajo vacío. Annear aplicó este proceso para conservar varias bacterias en un estado seco. Para obtener un jarabe, Annear utilizó la sublimación y evaporación de agua de los especímenes. El no creía que este proceso pudiera ser utilizado para aplicaciones industriales. Más adelante, en 1996, Roser y Gribbon (WO 96/040077) divulgaron el uso de exactamente el mismo proceso para incorporar materiales biológicos en una matriz de espuma seca. De acuerdo con Roser y Gribbon, las soluciones biológicas deberían ser evaporadas antes de obtener un "jarabe" y, en segundo lugar, deberían ser espumadas poniendo en ebullición el jarabe bajo vacío. Realmente definieron el término "jarabe" con el significado de una solución viscosa que formaría espuma durante la ebullición. Así, para espumar especímenes bajo vacío, Annear tenía que obtener el jarabe primero por evaporación.

En 1996, se propuso un método para utilizar el proceso de espumación descubierto por Annear para construir una tecnología práctica para la conservación de materiales biológicos sensibles en un estado seco y se desarrolló una conservación escalable por un protocolo de formación de espuma (Patente de los Estados Unidos Nos. 5,766,520 y 6,306,345). Estas técnicas han sido utilizadas para desarrollar métodos para estabilización a temperaturas ambiente para muchas bacterias, virus, enzimas, proteínas terapéuticas y otros objetos moleculares. También ha sido demostrado que el proceso de Annear puede ser escalado hasta volúmenes de 0.5 litros evitando la evaporación para obtener el jarabe antes de que comience la ebullición. Desde 1996, esta tecnología innovadora ha sido aplicada exitosamente para conservar materiales biológicos sensibles.

Después de 1996, estudios adicionales extensos han demostrado los beneficios de la tecnología PFF. (La tecnología PFF también es conocida como tecnología VitriLife™). Algunos de los resultados obtenidos después de 1996 demuestran que:

- Artículos moleculares tales como anfotericina, uroquinasa, luciferasa,  $\beta$ -galactosidasa, proteína nucleante en hielo, Taq ADN polimerasa y otros pueden ser estabilizados a temperaturas de 37°C o mayores sin ninguna pérdida de actividad.
- Las vacunas virales vivas a partir de diferentes grupos taxonómicos, incluyendo Herpesviridae (Bovine Rhinotracheitis), Paramyxoviridae (sarampión, virus del síndrome respiratorio bovino (BRSV), Parainfluenza bovina, Parainfluenza canina, moquillo canino), Flaviviridae (Diarrea Viral Bovina), Parvoviridae (Parvovirus Canino) y retrovirus (MLV) pueden ser estabilizados a temperaturas de hasta de 37°C sin pérdida significativa de actividad.
- Vacunas bacterianas vivas como Salmonella choleraesuis, Salmonella typhi, Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida y Pasteurella haemolytica, y muchas otras bacterias incluyendo E. coli y L. acidophilus pueden ser estabilizadas efectivamente a 37°C o temperaturas más altas.

Al mismo tiempo, intentos conocidos para conservar materiales biológicos sensibles por tecnología de liofilización convencional, en muchos casos, dieron como resultado 10% o menos de rendimiento de supervivencia y estabilidad limitada a temperaturas ambiente, es, sin refrigeración. Por ejemplo, el rendimiento en supervivencia de BRSV después de liofilización convencional fue menor del 10% de una muestra de control. Sin embargo, no se observó pérdida detectable en la rata de supervivencia de BRSV en los especímenes conservados usando conservación por formación de espuma. En 2002, la tecnología VitriLife™ fue adquirida por Avant Immunotherapeutics, Inc. (Avant).

Las ventajas de la tecnología de vitrificación no han sido utilizadas completamente para alcanzar la estabilidad a largo plazo de materiales biológicos lábiles a temperaturas ambiente. Los métodos existentes de conservación a temperatura ambiente por secado están diseñados para el procesamiento a escala de laboratorio de cantidades relativamente pequeñas de materiales en viales de dosis unitaria, lo que hace estos métodos incompatibles con operaciones comerciales a gran escala. Los problemas técnicos relacionados con la monitorización de la temperatura de transición vítrea también han presentado obstáculos a la implementación comercial. Mientras que las tecnologías de secado y vitrificación son potencialmente atractivas como métodos escalables para almacenamiento eficiente a largo plazo de materiales biológicos, hay necesidad de abordar un cierto número de problemas antes de que las ventajas de almacenamiento en el estado vítreo puedan ser explotadas comercialmente.

A pesar de los muchos beneficios de la tecnología PFF (VitriLife™), la tecnología también tiene algunas desventajas. Si se utiliza la metodología descrita por Roser y Gribbon (WO 96/040077) y se aplica la evaporación para obtener un jarabe, se encontrará rápidamente que en muchos casos o en una porción de viales, la ebullición y el espumado no tendrán lugar de manera alguna, incluso después de una aplicación de un alto vacío puesto que la fase de vapor no puede nuclearse en un jarabe altamente viscoso. Este fenómeno hace prácticamente imposible validar un proceso de PFF a escala industrial desarrollado en un laboratorio para materiales biológicos específicos. El proceso divulgado por Bronshtein en 1996 (Patente de los Estados Unidos No. 5,766,520) provee una etapa de ebullición antes de que se alcance la viscosidad alta del material. Las principales desventajas de este proceso son que está caracterizado por erupciones incontrolables del material durante la ebullición. Estas erupciones dan como resultado que una porción de material se esparce sobre las paredes de los viales, lo cual puede contaminar los taponos.

Además, una parte de tal material puede ser liberado de los viales hacia la cámara de secado. Para suavizar la erupción durante la ebullición y para hacer la ebullición más suave, se ha propuesto utilizar protocolos de aplicación bidimensionales de temperatura/presión que reducen el sobrecalentamiento hasta un nivel aceptable. Sin embargo, este protocolo es difícil de implementar y es difícil de reproducir de manera confiable con diferentes formulaciones.

En muchos casos el procesamiento especial requiere iniciar la nucleación de burbujas de vapor (ebullición) (Patente de los Estados Unidos No. 6,884,866) del jarabe obtenido por evaporación.

Por lo tanto, el proceso PFF está caracterizado por un cierto número de desventajas significativas que limitan severamente su aplicación a escala industrial. Consecuentemente, es necesario un nuevo proceso libre de las desventajas asociadas con los métodos de PFF para mejorar la conservación de materiales biológicos a escala industrial.

La patente de los Estados Unidos No. 6,509,146 divulga métodos para la conservación a largo plazo de soluciones y suspensiones biológicas a escala industrial que contiene moléculas, células y pequeños especímenes multicelulares biológicamente activos, a temperaturas ambiente por deshidratación en un líquido viscoso muy amorfo o estado vítreo. El método de escalamiento comprende la etapa de secado primario de ebullición bajo vacío para formar una espuma mecánicamente estable y una etapa de secado secundario para incrementar la estabilidad. La vitrificación puede ser alcanzada subsecuentemente enfriando el material secado a la temperatura de almacenamiento que es inferior a la temperatura de transición vítrea.

La WO 97/45009 divulga un método útil para conservar especímenes biológicamente activos en almacenamiento vitrificándolos, esto es, deshidratándolos de tal manera que se alcance un verdadero estado vítreo a temperatura de almacenamiento por enfriamiento subsecuente. El método está basado en el reconocimiento de que para almacenar muestras en un estado vítreo verdadero la temperatura de deshidratación del material que va a ser deshidratado debe ser superior a la temperatura de almacenamiento sugerida. Puesto que la temperatura de vitrificación disminuye rápidamente con el contenido creciente de agua la muestra necesita ser deshidratada fuertemente para incrementar la  $T_g$  por encima de la temperatura de almacenamiento ( $T_s$ ). La temperatura de deshidratación debería ser seleccionada tan alta como la temperatura de almacenamiento sugerida, y el estado vítreo es alcanzado subsecuentemente enfriando después de la deshidratación.

La Patente de los Estados Unidos No. 5,298,261 divulga una tableta que se desintegra rápidamente en solución acuosa incluyendo una red de matriz parcialmente colapsada que ha sido secada al vacío por encima de la temperatura de colapsamiento de la matriz. La matriz preferiblemente es secada al menos parcialmente por debajo del punto de congelación de equilibrio de la matriz. Secar al vacío la tableta por encima de su temperatura de colapso en vez de liofilizarla por debajo de su temperatura de colapso provee un proceso para producir tabletas con integridad estructural potenciada, a la vez que se desintegran rápidamente en cantidades normales de saliva. La tableta preferiblemente lleva un fármaco, tal como acetaminofén. La red de matriz de la tableta incluye preferiblemente una goma, un carbohidrato y el fármaco. Realizaciones especialmente preferidas incluyen también un saborizante, un endulzante y un surfactante. La goma es preferiblemente goma de acacia, de guar, de xantano, de carragenano o tragacanto. El carbohidrato es preferiblemente manitol, dextrosa, sacarosa, lactosa, maltosa, maltodextrina o sólidos de jarabe de maíz.

La US 2003/0219475 revela métodos y composiciones para conservar materiales bioactivos en una matriz de espuma seca. Los métodos proveen la generación de espuma sin ebullición y la penetración de agentes conservantes a temperaturas cercanas a la temperatura de transición de fase de las membranas.

La Patente de los Estados Unidos No. 4,520,574 divulga un proceso para secar un alimento bajo una presión reducida para la preparación de un alimento seco que puede ser rehidratado a la condición original en un tiempo muy corto para tener sabor y textura placenteros sustancialmente comparables a un alimento no tratado. El proceso es caracterizado por la etapa de colocar el alimento que se va a secar en un ambiente de presión reducida suficientemente bajo para vaporizar una porción del agua contenida en el alimento y congelar el resto de agua por irradiación de calor por la vaporización, y la etapa de calentar para secar el alimento a temperatura relativamente baja bajo la presión reducida. Un rasgo característico adicional del proceso es una caída súbita o abrupta de la presión que circunda el alimento en la etapa inicial, con lo cual el alimento es ablandado de alguna manera mediante la acción del agua que se vaporiza vigorosamente a un estado seco con una porción de núcleo sustancialmente hueca y una capa superficial más densa.

La Patente de los Estados Unidos No. 3,716,382 divulga alimentos líquidos deshidratados sometidos a un vacío y a una temperatura baja solamente suficiente para congelar parte del contenido de agua para producir una masa. Se provee una rata de secado alta, acoplada con buena retención del sabor.

## RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención es como se define en las reivindicaciones.



La presente invención incluye nuevos y ventajosos métodos para conservar materiales bioactivos para el almacenamiento y transporte. La conservación por vaporización (PBV) es un nuevo método para la conservar materiales biológicos sensibles. El método comprende dos etapas principales: secado primario y secado para estabilidad. La etapa de secado primario se lleva a cabo mediante vaporización intensiva (sublimación, ebullición y evaporación) del agua a temperaturas significativamente más altas (aproximadamente 10°C o más) que  $T_g'$  a partir de un estado parcialmente congelado y al mismo tiempo sobrecalentado (cuando una presión de vacío está por debajo de la presión de equilibrio del vapor de agua) de un material biológico. El material que está siendo conservado puede tomar muchas diversas formas, incluyendo una solución biológica, suspensión biológica y un material biológico (por ejemplo, bacterias, virus, proteínas terapéuticas encapsuladas en hidrogeles, etcétera).

Al final de la etapa de secado primaria, el material que está siendo conservado es mecánicamente estable (por ejemplo, no colapsa) a una temperatura ambiente bajo alto vacío. Después de esto, se lleva a cabo el secado por estabilidad para incrementar la temperatura de transición vítrea del material seco para hacerlo mecánicamente estable a temperaturas ambiente sin vacío y para maximizar la potencia y viabilidad del material biológico después de un almacenamiento y/o transporte a largo plazo a temperaturas ambiente.

La conservación de hidrogeles (incluyendo un gel de alginato) por secado es más efectiva cuando el tamaño de las partículas de hidrogel es pequeño (aproximadamente 1 mm, o menos). Una razón que puede explicar el fenómeno es que el crecimiento de burbujas de vapor nucleadas dentro de las partículas de gel es limitado por la alta viscosidad dentro del gel.

Los contenedores (por ejemplo, bolsas) para el secado a granel descrito aquí permiten introducir asépticamente un fluido (por ejemplo, una solución biológica o una suspensión viral o celular) en un contenedor, secar asépticamente el fluido, almacenar asépticamente el espécimen seco en el contenedor, o transferir asépticamente el material seco desde el contenedor a otros dispositivos para procesamiento corriente abajo (por ejemplo, molindas).

El proceso PBV es beneficioso en comparación con los procesos de liofilización más convencionales porque entre otras cosas: (i) permite una conservación significativamente más rápida de materiales biológicos, (ii) puede ser llevado a cabo eficientemente a presiones de vacío (por ejemplo, aproximadamente de 1 a 3 Torr (133.3 a 400 Pa)) y (iii) produce materiales biológicos conservados que pueden ser almacenados y transportados durante períodos extendidos de tiempos sin refrigeración.

Las bolsas (u otros contenedores) usados para el procesamiento según los métodos de la invención reivindicados puede tener un coeficiente de permeación más bajo para el vapor de agua que una membrana Gore convencional (politetrafluoroetileno expandido) que contiene poros de 0.2 micrones. Por ejemplo, membranas respirables de polipropileno o poliuretano de 10 a 50 micrones (espesor) de Mylan Technologies Inc., o Inspire para vendajes de IntelliCoat Technologies pueden ser utilizadas para reemplazar las membranas Gore en el diseño de los contenedores (por ejemplo, bolsas) utilizadas para el secado. Además, los contenedores que utilizan membranas de polipropileno o poliuretano son menos costosos que las bandejas utilizadas comúnmente en la industria para tales aplicaciones (esto es, bandejas Lyogard) cubiertas con membranas costosas (por ejemplo, membranas Gore).

El uso de membranas de polipropileno o poliuretano en el diseño de los contenedores (por ejemplo, bolsas) permite hacer del secado un proceso de barrera aséptica. Al mismo tiempo, puesto que tales membranas son caracterizadas por una resistencia mecánica limitada, para abordar tal problema, se usa un diseño en "sándwich" que comprende la membrana respirable entre dos membranas porosas debajo coste (por ejemplo, membranas de Sartorius para ultrafiltración) caracterizadas por una permeabilidad más alta a vapores de agua y por una resistencia mecánica más alta. Equipo dedicado y especialmente diseñado permite utilizar por completo los beneficios del nuevo método PBV descrito aquí a escala industrial. Tal equipo puede ser diseñado como un colector múltiple puesto que el nuevo método PBV no requiere el procesamiento bajo una presión de vacío baja. Un diseño de un secador PBV múltiple industrial comprende cámaras de secado y un condensador a gran escala. Las cámaras de secado pueden ser unidas al condensador mediante una pluralidad de conectores. Los conectores contienen válvulas de vacío que controlan el flujo de aire o los vapores de agua provenientes de las cámaras de secado hacia el condensador. El material que va a ser secado por el nuevo método sugerido será colocado en una cámara de secado. Se proveerá calor apropiado mediante unas fuentes de calor para compensar la pérdida de energía debida a la evaporación durante el proceso de secado primario. Puede utilizarse un intercambiador de calor para enfriar el material hasta aproximadamente -10°C (por lo tanto, congelándolo) antes de secarlo. En algunos casos para asegurar que la congelación tiene lugar a temperaturas no significativamente por debajo de -10°C, puede ser necesario tomar medidas especiales para nuclear los cristales de hielo. Por ejemplo pueden utilizarse bacterias nucleadoras de hielo para este propósito.

El equipo también puede tener un sistema de control (por ejemplo, un aparato eléctrico o basado en un ordenador) para proveer el control de proceso apropiado de las diversas etapas del nuevo método. Por ejemplo, la etapa de calentamiento y los flujos de gas entre las cámaras y el condensador pueden ser controlados apropiadamente. El sistema de control puede ser diseñado y programado para proveer un proceso de secado automáticamente graduado en las cámaras. Así, cada cámara completará el secado en un tiempo diferente, lo cual a su vez permitirá un procesamiento de carga continua. El diseño del equipo puede permitir conectar una nueva cámara a la fuente de

vacío (por ejemplo, un condensador) y desconectar una cámara de la fuente de vacío cuando el proceso de secado dentro de esa cámara está terminado. La conexión y desconexión de cámaras a la fuente de vacío no tiene que resultar en un desprendimiento o movimiento físico de las cámaras. Las cámaras pueden ser desconectadas de la fuente de vacío mediante una válvula u otro dispositivo. Sin embargo, las cámaras que permiten desprendimientos químicos pueden proveer beneficios adicionales puesto que es considerablemente más fácil y menos costoso esterilizar y mantener estériles las cámaras en oposición a mantener estéril el conjunto completo de equipo.

Los nuevos métodos propuestos en conjunción con un diseño de equipo dedicado pueden permitir una manufactura a escala industrial de materiales biológicos conservados que pueden ser almacenados y transportados sin refrigeración durante periodos extendidos de tiempo. Al mismo tiempo, los nuevos métodos propuestos y un equipo dedicado pueden permitir llevar a cabo tales procesos de manufactura a las velocidades y con la eficiencia considerablemente mayor que las velocidades y la eficiencia disponibles a través de los métodos actualmente conocidos.

#### Definiciones.

Tal como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, o las formas singulares "un", "una" y "el/la/los/las" incluyen referentes plurales a menos que el contexto en el cual se utilizan dicte de manera no ambigua a otra cosa. Si un término definido está en mayúscula o no en el texto de esta divulgación no tendrá efecto sustantivo sobre su significado.

Los términos técnicos y científicos utilizados aquí estarán en concordancia con los términos utilizados comúnmente por una persona normal de experiencia del arte al cual es pertinente la invención. Por esta razón, a menos que se establezca expresamente aquí de otra manera serán utilizadas, las definiciones expresas mantenidas en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2003/0219475 A1 (Vu Truong-Le, "Preservation of Bioactive Materials by Freeze Dried Foam.").

"Temperaturas Ambiente" son aquellas en cualquier momento dado en un ambiente dado. Típicamente la temperatura ambiente (RT) es de aproximadamente 22 grados Celsius. Aquí, en busca de claridad podemos referirnos a una temperatura entre aproximadamente -10 grados Celsius y más 40 grados Celsius como temperatura ambiente.

"Ebullición" se refiere a la transición de fase rápida de líquido a vapor que tiene lugar cuando la temperatura de un líquido está por encima de su temperatura de ebullición bajo condiciones específicas. La temperatura de ebullición, como es bien sabido por los experimentados en el arte, como es la temperatura en la cual la presión de vapor de un líquido es igual a la presión aplicada. Durante el proceso de ebullición, las burbujas de vapor se nuclean dentro del líquido.

"Evaporación" significa un proceso de movimiento de moléculas a través de la interfase líquido-gas desde la superficie de un líquido hacia una fase gaseosa que ya existe. La evaporación no necesariamente requiere sobrecalentamiento y nucleación de las burbujas de vapor.

"Sublimación" o "Liofilización" significa un proceso de movimiento de moléculas desde un estado cristalizado sólido directamente a una fase gaseosa a través de una interfase cristal-fase gaseosa.

"Vaporización" significa un movimiento de moléculas hacia una fase gaseosa por evaporación, sublimación o ebullición.

"Regulador" significa una solución regulada que resiste cambios en pH mediante la acción de sus componentes conjugados ácido-base. El pH del regulador generalmente se seleccionará para estabilizar el material activo preferido, y podrá ser establecido por los expertos en el arte. En general, el pH del regulador estará en el rango del pH fisiológico, aunque algunas proteínas, pueden ser estables a un rango de pH más amplio, por ejemplo, pH ácido. Así, rangos de pH preferidos son desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10, siendo particularmente preferidos de aproximadamente 3 a aproximadamente 8. Aún más preferiblemente, el pH está en el rango desde aproximadamente 6.0 hasta aproximadamente 8.0. Aún más preferiblemente, el pH está en el rango de aproximadamente 7.0 hasta aproximadamente 7.4, y lo más preferiblemente, el pH está en el rango entre aproximadamente 7.0 y aproximadamente 7.2. Reguladores adecuados incluyen un regulador de fosfato de pH 7.2 y un regulador de citrato de pH de 7.0. Como será apreciado por los experimentados en la técnica, hay un gran número de reguladores adecuados que pueden ser usados. Los reguladores adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfato de potasio, fosfato de sodio, acetato de sodio, histidina, imidazol, citrato de sodio, succinato de sodio, bicarbonato de amonio y carbonato. En general, los reguladores utilizan a molaridades que van desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 2 M, siendo preferido desde aproximadamente 2 mM hasta aproximadamente 1 M, y desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 0.5 M especialmente preferidos, y siendo particularmente preferido de 25 a 50 mM.

"Seco" se refiere a un material con un contenido de humedad residual menor de aproximadamente 10%. Las composiciones secas comúnmente son secadas hasta humedades residuales de 5% o menos, o entre aproximadamente 3% y 0.1%.

5 "Excipientes protectores" o "protectores" (por ejemplo, incluyendo pero no limitándose a crioprotectores y lipoprotectores) se refieren generalmente a compuestos o materiales que se agregan para evitar el deterioro del agente terapéutico o de un agente biológico durante un proceso de secado y posteriormente. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, proteínas tales como albúmina de suero humana y bovina, gelatina, inmunoglobulinas, carbohidratos incluyendo monosacáridos (galactosa, d-manosa, sorbosa, etcétera.) y sus derivados no reductores (por ejemplo, metilglucósido), disacáridos (trehalosa, sacarosa, etcétera.), ciclodextrinas y polisacáridos (rafinosa, maltodextrinas, dextranos, etcétera); un aminoácido tal como glutamato monosódico, glicina, alanina, arginina o histidina, así como aminoácidos hidrófobos (triptófano, tirosina, leucina, fenilalanina, etcétera); una metilamina como betaína; una sal excipiente tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes azúcares trihídricos o superiores, por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol; propilen glicol; polietilen glicol; Pluronic; surfactantes; y combinaciones de los mismos.

Los "cosolutos" pueden estar presentes en las formulaciones y composiciones de la invención en pequeñas concentraciones que son mucho más pequeñas que las concentraciones de azúcares y otros protectores. Los Cosolutos pueden estar presentes en las formulaciones de la invención en cantidades desde aproximadamente 0.01 por ciento en peso hasta varios porcentajes en peso. De manera similar a lo reportado por otras personas, hemos encontrado que la supervivencia de algunos materiales biológicos después del secado puede ser mejorada si el hidrogel, solución o suspensión del método puede incluir cosolutos (surfactantes y/o un zwitterión). Los surfactantes pueden incluir, por ejemplo, monolauratos de polietilen glicol sorbitano (por ejemplo, Tween 80), monooleatos de polioxietilen sorbitano (por ejemplo, Tween 20), o polímeros de bloque de polietilen y propilen glicol (por ejemplo, Pluronic F68) y/o similares. Los zwitteriones del método pueden incluir, por ejemplo, arginina, histidina, glicina y/o similares. Creemos que es bien sabido que los Cosolutos como polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de bloque de polietilenglicol/polipropilenglicol, alquil éteres de polietilenglicol, alquiléteres de polipropilenglicol, copolímeros de bloque de polietilenglicol/polipropilenglicol, éter, alquilarisulfonatos, fenilsulfonatos, sulfatos de alquilo, sulfonatos de alquilo, sulfatos de alquil éter, sulfatos de aril alquil éter, fosfatos de alquil poliglicol éter, fosfatos de poliaryl fenil éter, alquilsulfosuccinatos, sulfonatos de olefinas, sulfonatos de parafina, sulfonatos de petróleo, táuridos, sarcósidos, ácidos grasos, ácidos alquilnaftalenosulfónicos, ácidos naftalenosulfónicos, ácidos lignosulfónicos, condensados de naftalenos sulfonados con formaldehído, o condensados de naftalenos sulfonados con formaldehído y fenol, licor residual de lignina-sulfito, fosfatos de alquilo, compuestos de amonio cuaternario, óxidos de amina, betaínas y/o similares. Surfactantes de Tween.RTM. y Pleuronic.RTM. tales como, por ejemplo, monolaurato de polietilenglicol sorbitano, monooleato de polioxietilensorbitano, o copolímeros de bloque de polietilen y polipropilen glicol y muchos otros pueden ser incluidos en la formulación antes del secado, sin embargo, las concentraciones óptimas de los cosolutos para diferentes materiales biológicos son diferentes y deberían ser determinadas experimentalmente.

40 "Vítreo", "estado vítreo" o "matriz vítrea" se refiere a un líquido que ha perdido su capacidad de fluir, esto es, un líquido con una viscosidad muy alta, en donde los rangos de viscosidad varían de  $10^{10}$  hasta  $10^{14}$  pascal-segundos. Puede verse como un sistema amorfo metaestable en el cual las moléculas tienen un movimiento vibracional pero muy lentos componentes rotacionales y traslacionales (casi no medibles). Como sistema metaestable, es estable durante períodos largos de tiempo cuando se almacena bien por debajo de la temperatura de transición vítrea.

45 "Temperatura de Transición Vítrea" es representada por el símbolo  $T_g$  y es la temperatura a la cual una composición cambia de un estado vítreo o vítreo a un estado de jarabe o gomoso durante el calentamiento. En general, la  $T_g$  se determina utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC) y se toma típicamente como la temperatura a la cual ocurre la aparición del cambio de capacidad de calor ( $C_p$ ) de la composición por barrido a través de la transición. La definición de  $T_g$  siempre es arbitraria y no hay una convención internacional actual que se aplique. La  $T_g$  puede ser definida como la aparición, punto medio o punto final de la transición. Para los propósitos de esta invención y divulgación utilizaremos la aparición de los cambios en  $C_p$  cuando se utiliza DSC. Véase el artículo titulado "Formation of Glasses from Liquids and Biopolymers" by C. A. Angell: Science, 267, 1924-1935 (Mar. 31, 1995) y el artículo titulado "Differential Scanning Calorimetry Analysis of Glass Transitions" de Jan P. Wolanczyk: Cryo-Letters, 10, 73-76 (1989). Para un tratamiento matemático detallado, véase "Nature of the Glass Transition and the Glassy State" de Gibbs and DiMarzio: Journal of Chemical Physics, 28, NO. 3, 373-383 (March, 1958).

Excipientes "Farmacéuticamente Aceptables" (vehículos, aditivos) son aquellos que pueden ser administrados razonablemente a un sujeto mamífero para proveer una dosis efectiva del ingrediente activo empleado. Preferiblemente, son excipientes que la Federal Drug Administration (FDA) tiene hasta la fecha designados como 'Vistos Generalmente como Seguro' (GRAS). "Composición farmacéutica" se refiere a preparaciones que están en forma tal que permiten que la actividad biológica de los ingredientes activos sea inequívocamente efectiva y que no contienen componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a los cuales se administraría la composición.

65 "Polioi" significa una sustancia con múltiples grupos hidroxilo, e incluye, por ejemplo, azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes azúcares y ácidos azúcares. Los polioles preferidos aquí tienen un peso molecular que

es menor de aproximadamente 600 kDa (por ejemplo, en el rango desde aproximadamente 120 hasta 400 kDa). Un "azúcar reductor" es un poliol que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir los iones metálicos o reaccionar covalentemente con la lisina y otros grupos amino en las proteínas. Un "azúcar no reductor" es un azúcar que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor. La mayoría de los monosacáridos son azúcares reductores incluyendo fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melizitosa y rafinosa. El manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol son ejemplos de alcoholes azúcares. El metil glucósido y la 2-dioxiglucosa son ejemplos de derivados no reductores de monosacáridos. Como ácidos azúcares, se incluyen L-gluconato y sales metálicas del mismo.

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

"Temperatura de almacenamiento" para una composición es la temperatura ( $T_s$ ) a la cual la composición seca puede ser almacenada para mantener la estabilidad del producto durante la vida útil de la composición con el fin de asegurar una dosis suministrada consistentemente. Esta temperatura está determinada inicialmente por el fabricante de la composición y aprobada por una agencia gubernamental responsable y por la aprobación de la composición para su comercialización (por ejemplo, la Food and Drug Administration de los Estados Unidos para productos farmacéuticos). Esta temperatura variará para cada fármaco aprobado u otro producto dependiendo de la sensibilidad a la temperatura del fármaco activo y otros materiales en el producto. La temperatura de almacenamiento recomendada variará desde aproximadamente 0 grados C hasta aproximadamente 40 grados C, pero en general estará alrededor de RT 22 grados C.

Se dice que un material biológicamente activo "retiene su actividad biológica" en una composición farmacéutica u otra, si la actividad biológica del material biológicamente activo, tal una enzima, en un momento dado está dentro de aproximadamente 10% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica exhibida en el momento en que la composición de la que se trata fue preparada según se determinó en un ensayo de enlazamiento. En el caso de virus o bacterias vivos, la actividad biológica puede ser considerada retenida cuando el título viral o el recuento de colonia de la composición está dentro de una escala logarítmica del título o recuento inicial. Para células vivas, la actividad biológica se considera retenida cuando el recuento de células vivas de la composición está dentro del 50% del recuento inicial. Una escala logarítmica FFU/ml es aproximadamente igual a una escala logarítmica de dosis infecciosa en cultivo de tejidos por ml (log TCID<sub>50</sub>/ml).

Un material biológicamente activo "retiene su estabilidad química" en una composición farmacéutica o biológica, si la estabilidad química en un momento dado es tal que el material biológicamente activo se considera que retiene su actividad biológica como se define aquí. La estabilidad química puede ser establecida detectando y cuantificando las formas químicamente alteradas del material biológicamente activo. La alteración química puede involucrar modificación de tamaño (por ejemplo recorte de proteínas) lo cual puede ser evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o espectrometría de masas desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI/TOF MS). Otros tipos de alteración química incluyen alteración de carga (por ejemplo, que ocurre como resultado de la desamidación) lo cual puede ser evaluado por cromatografía de intercambio de iones u otros métodos.

Un material biológicamente activo "retiene su estabilidad física" en una composición farmacéutica o biológica si no muestra incrementos significativos en la agregación, precipitación y/o colapso por examen visual del color y/o claridad, o según se mide por dispersión de luz Ultra Violeta o por cromatografía de exclusión por tamaño.

Una formulación o composición "Estable" es aquella en la cual el material biológicamente activo en la misma retiene esencialmente (dependiendo de una aplicación específica) su estabilidad física y/o estabilidad química y/o potencia biológica durante el almacenamiento y/o transporte. En el arte se conocen diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad y están revisadas como por ejemplo, en Peptide and Protein Drug Delivery, 247- 301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad puede ser medida a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. El análisis de tendencias puede ser utilizado para estimar una vida útil esperada antes de que un material haya estado realmente en almacenamiento durante ese período de tiempo. Para virus de influenza vivos, la estabilidad se define como el tiempo que toma perder 1 log de FFU/ml o 1 log de TCID<sub>50</sub>/ml. Preferiblemente, la composición es estable a una temperatura ambiente durante al menos tres meses, o a 40 grados Celsius durante al menos 1 mes, y/o estable a aproximadamente 2-8 grados Celsius durante al menos 1 año. Adicionalmente, la composición es preferiblemente estable después de la congelación (por ejemplo, hasta -70 grados Celsius), y descongelación de la composición.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un material biológicamente activo se refiere a una cantidad efectiva en la prevención o tratamiento de un trastorno o una enfermedad en la que un "trastorno" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con el material biológicamente activo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudos incluyendo aquellas condiciones patológicas que predisponen a los mamíferos al trastorno en cuestión.

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que requieren un tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como aquellos en los cuales el trastorno va a ser prevenido.

- 5 "Dosificación unitaria" se refiere a un receptáculo que contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de la invención.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 Los métodos novedosos de la presente invención permiten el almacenamiento y transporte extendidos de materiales bioactivos a temperaturas ambiente.

#### Secado primario

- 15 Se ha sabido comúnmente evitar o minimizar la congelación de los materiales biológicos porque la congelación es considerada por muchos como un proceso nocivo. Sin embargo, la congelación a temperaturas de cerca de  $-0^{\circ}\text{C}$  puede no ser nociva (o al menos es menos nociva en comparación con la congelación a o hasta  $-20^{\circ}\text{C}$  o menos) porque el cambio de pH asociado con la hidrólisis por cristalización es proporcional a la superficie de los cristales de hielo dividida por el volumen de fase líquida que permanece entre los cristales de hielo. Esta relación será pequeña durante la congelación cercana a  $0^{\circ}\text{C}$ . Al mismo tiempo, la vaporización de agua desde un material parcialmente congelado a temperaturas cercanas al punto de fusión del hielo (por ejemplo a  $-5^{\circ}\text{C}$  o superior) puede ser muy eficiente si se lleva a cabo bajo vacío, por ejemplo, por debajo de 3 Torr (400 Pa), la cual es la presión de equilibrio de vapor de agua sobre el hielo a  $-5^{\circ}\text{C}$ . A tales temperaturas, que son considerablemente más altas que  $T_g'$ , el material objetivo será una "masa", un sistema en dos fases de cristales de hielo y una solución concentrada que permanece entre los cristales de hielo.

- 20 Debido a que el potencial químico del agua en la masa es igual al potencial químico del hielo, la presión de equilibrio del vapor de agua por encima de la porción líquida en la masa es igual a la del hielo. Si la presión de vacío está por debajo de la presión de equilibrio, el líquido en la masa se sobrecalienta y hierve. Por lo tanto, el sometimiento de una masa a un vacío dará como resultado una vaporización rápida de agua desde la masa por sublimación desde los cristales de hielo, poniendo en ebullición la solución no congelada entre los cristales de hielo, y por evaporación desde la superficie de la masa simultáneamente.

- 30 La conservación por vaporización (PBV) es un proceso de conservación que comprende secado primario y secado en estabilidad. El secado primario se lleva a cabo por vaporización intensiva (sublimación, ebullición y evaporación) del agua a temperaturas significativamente (aproximadamente 10 C o más) superiores a  $T_g'$  a partir de un material parcialmente congelado y al mismo tiempo sobrecalentado (la presión de vapor está por debajo de la presión de equilibrio de vapor de agua).

- 40 Durante la PBV, la ebullición en el transcurso del secado primario no produce mucha dispersión puesto que la presión de equilibrio a temperaturas por debajo de cero encima de la masa es baja y los cristales de hielo sobre la superficie de la masa evitan o inhiben la dispersión. Típicamente, un material (por ejemplo, soluciones o suspensiones congeladas) que ha sido sometido a secado por PBV, se asemeja a una espuma cubierta parcialmente con una capa de una torta liofilizada delgada.

- 45 La prevención de erupciones (dispersión) durante la etapa de ebullición es importante para un secado a granel más efectivo. Es particularmente importante cuando se utilizan bandejas Lyoguard u otras bolsas cubiertas por membranas permeables al agua. Si tiene lugar la dispersión, afecta negativamente el flujo de vapor a través de la membrana puesto que la membrana está cubierta con gotas del material dispersado sobre su superficie. La dispersión también afecta negativamente la apariencia del material después del secado en los viales. La eliminación de la dispersión también obvia la necesidad de un protocolo de secado complejo y no confiable "bidimensional" discutido más arriba y simplifica la ejecución de la etapa de secado.

- 50 Además, a diferencia de la conservación por formación de espuma (PFF), la conservación por vaporización (PBV) puede ser muy efectiva para conservar materiales biológicos contenidos o incorporados con una formulación en gel de alginato u otras formulaciones en gel. Un proceso PBV puede ser llevado a cabo secando partículas de gel congeladas bajo vacío a temperaturas pequeñas negativas (en escala Celsius). Para tales sistemas en hidrogel, la vaporización comprende sublimación simultánea de cristales de hielo, ebullición de agua dentro de las microinclusiones no congeladas y evaporación desde la superficie del gel.

- 60 La PBV es diferente de la liofilización porque la liofilización sugiere que la temperatura de procesamiento del producto esté en o por debajo de  $T_g'$  (la cual típicamente está por debajo de  $-25^{\circ}\text{C}$ ) durante el secado primario y porque la liofilización sugiere evitar el fenómeno de "colapso" durante el secado primario y el secundario. La VBP comprende el secado a temperaturas substancialmente superiores a  $T_g'$ , esto es, superiores a  $-15^{\circ}\text{C}$ , mejor superiores que  $-10^{\circ}\text{C}$ , y aún mejor superiores a  $-5^{\circ}\text{C}$ .

Los métodos PFF divulgados en la Patente de los Estados Unidos No. 5,766,520 (Bronstein) o en WO 96/040077 (Roser y Gibbon) sugieren que la congelación del material que se va a secar debería ser evitada durante el secado primario.

## 5 Secado en estabilidad

El secado en estabilidad difiere del secado secundario, el cual es parte del proceso de liofilización. Sin secado secundario, el material liofilizado colapsará. Por otro lado al final de la etapa de secado primaria de PBV el material es estable mecánicamente (es decir, no colapsa) a temperatura ambiente bajo vacío. El secado en estabilidad se lleva (1) para incrementar adicionalmente la temperatura de transición vítrea del material seco, (2) para hacerlo mecánicamente estable a temperaturas ambiente sin vacío, y (3) para conservar la potencia (y, por lo tanto la eficiencia) del agente biológico durante un almacenamiento a largo plazo a temperaturas ambiente.

Para incrementar la  $T_g$  del material a por ejemplo a 37°C y por lo tanto asegurar la estabilización a esa temperatura, la etapa de secado en estabilidad debería llevarse a cabo a temperaturas significativamente mayores a 37°C durante muchas horas para eliminar el agua del interior del material ya secado.

El proceso de deshidratación de los especímenes biológicos a temperaturas elevadas puede ser muy nocivo para los materiales biológicos objetivos si la temperatura utilizada para secar es mayor que la temperatura de desnaturalización de la proteína aplicable. Para proteger la muestra del daño que puede ser causado por temperaturas elevadas, el proceso de deshidratación en estabilidad (esto es, secado en estabilidad) pueda requerir llevarse a cabo en etapas. La primera etapa (bien sea en aire o al vacío) debe de llevarse a cabo a una temperatura de partida para asegurar la deshidratación sin una pérdida significativa de la viabilidad y potencia de los materiales biológicos. Después de tal primera etapa de secado, el proceso de deshidratación puede ser continuado en etapas subsecuentes secando a una temperatura gradualmente superior durante cada etapa subsecuente. Cada etapa permitirá incrementos simultáneos en el grado de la deshidratación alcanzable y la temperatura usada para secar durante la siguiente etapa.

Por ejemplo, en el caso de la conservación de enzimas, se ha demostrado que después de secar a temperatura ambiente la temperatura de secado puede ser incrementada hasta al menos 50 grados Celsius. sin una pérdida de actividad enzimática. El grado de deshidratación obtenida o después de secar a 50 grados Celsius permitirá un incremento adicional en temperatura de secado, sin una pérdida de actividad. Cualquier espécimen dado que vaya a ser conservado se caracteriza por una temperatura máxima que puede soportar durante el proceso de conservación.

Sin embargo, diversos protectores y Cosolutos protectores pueden proveer protección adicional a los materiales durante el proceso de secado.

## Escalamiento del secado aséptico a granel

El proceso PBV es escalable porque el área de evaporación del material se incrementa muchos cientos de veces durante la formación de un espécimen mecánicamente estable. Esta área de evaporación se crea por la sublimación de los cristales de hielo y la formación de burbujas de vapor dentro del material. Es válido tanto para el secado de un hidrogel como para el secado de una solución o suspensión biológica.

El secado de una solución o suspensión por un proceso de VBP puede llevarse efectivamente en viales de 3 a 5 ml (llenado 0.5 ml), viales de 200 ml (llenados de 10-30 ml), contenedores de copa Lyoguard RTM cilíndricos pequeños, y bandejas Lyoguard RTM (250-300 ml llenos). Al final del secado primario por vaporización a partir del estado de masa, el material luce como una espuma seca parcialmente recubierta con una piel de torta liofilizada. Al final del secado primario, el material se hace mecánicamente estable si se almacena bajo vacío. El área de alta evaporación de este material permite entonces llevar a cabo efectivamente una etapa de secado en estabilidad bajo un vacío por evaporación a temperaturas elevadas.

El secado de los hidrogeles más efectivo cuando las partículas de hidrogel son pequeñas (aproximadamente 1 mm, o menos). La razón para esto puede ser que el crecimiento de burbujas de vapor nucleadas dentro de las partículas de gel es limitado por la alta viscosidad dentro del gel. Una etapa de secado PBV eficiente puede llevarse a cabo cuando el tamaño de partícula está alrededor o por debajo de 0.2 mm. Así, se ha demostrado que el secado por PBV primario de 1.5 kg de una enzima industrial encapsulada adentro de partículas esféricas de gel de alginato por un diámetro por debajo de 0.2 mm puede hacerse dentro de aproximadamente seis (6) horas. Para lograr esto, las partículas de gel se colocan y se secan sobre una bandeja de acero abierta utilizada en liofilización convencional.

El proceso PBV es beneficioso en comparación con el proceso de liofilización no solamente porque es más rápido, sino también porque puede ser llevado a cabo de manera eficiente a presiones de vacío más altas. Por ejemplo a 5°C o más el secado primario por PBV puede ser llevado a cabo efectivamente a varios Torr (1 a 3) (133.3 a 400 Pa) en la cámara. La presión de vapor durante la liofilización debería ser significativamente inferior a 0.476 Torr (63.5 Pa), la cual es la presión de equilibrio por encima del hielo a temperaturas por debajo de -25°Celsius. El proceso es incluso más eficiente si la presión está por debajo de 0.1 Torr (13.3 Pa). Debido a esto, las bolsas

utilizadas para el procesamiento de liofilización a granel deberían estar caracterizadas por un coeficiente muy alto de permeación al vapor de agua.

Un ejemplo de tales bolsas permeables a gases es un producto denominado Lyoguard. RTM, el cual ha sido desarrollado por W. L. Gore para liofilización a granel. La bolsa de liofilización Lyoguard RTM es una bolsa flexible y sellable por calor. Uno de sus lados está hecho de un plástico que no es permeable al vapor de agua. Su otro lado está hecho de una membrana de Gore-Tex RTM. Esta membrana es politetrafluoroetileno (PTFE) expandido, que contiene nominalmente 0.2 micrones, de tamaño de polo, hidrofóbico y no permeable al agua líquida, pero permeable al vapor de agua.

Debido a que la bolsa de Lyoguard puede pasar vapor de agua mientras está evitando todavía que un producto líquido penetre desde la membrana y se fugue, provee una manera de proveer los procesos de productos que requieren alguna esterilidad. También puede aplicarse una bandeja para productos de salud a animales, probióticos, alimentos, etcétera. Cualquier producto para el cual un contenedor incluido de procesamiento puede presentar una ventaja puede beneficiarse potencialmente del uso de las bolsas Lyoguard en la conservación por el proceso de vaporización. Tales ventajas pueden ser derivadas donde la esterilidad, la facilidad de manejo, el aislamiento de los patógenos (por ejemplo, bacterias) del personal de manufactura o el control de contaminación potenciados sean deseables.

Las bandejas Lyoguard pueden ser utilizadas en un equipo de procesamiento por PBV a escala industrial. Sin embargo, las bandejas Lyoguard RTM están caracterizadas por varias desventajas que necesitan ser abordadas: (1) las bandejas Lyoguard RTM son costosas y (2) los poros de 0.2 micrones en membranas de politetrafluoroetileno expandido no aseguran una barrera adecuada para virus, toxinas y otros agentes químicos peligrosos.

Puesto que el proceso PBV (y el proceso PFF) pueden ser llevados a cabo a presiones que son considerablemente más altas que las requeridas para la liofilización, las membranas de politetrafluoroetileno expandido costosas no son necesarias y pueden ser reemplazadas por membranas hechas de materiales menos costosos. Al mismo tiempo, tales membranas menos costosas pueden proveer mejores barreras para evitar virus, toxinas y otros agentes químicos peligrosos que puedan salir de los contenedores utilizados para el secado. Por ejemplo, las bolsas cubiertas con membranas Sartorius relativamente baratas utilizadas para ultrafiltración pueden ser utilizadas de manera efectiva en el secado por PBV a escala industrial según los métodos divulgados aquí. Otras membranas grado médico que pueden ser utilizadas para reemplazar las membranas de politetrafluoroetileno expandido son membranas respirables de polipropileno o poliuretano de 10 a 50 micrones tales como las películas Medfilm® Medical manufacturadas por Mylan Technologies Inc. y diversas películas de vendaje de herida Inspire (por ejemplo, Inspire 1101 (10 µm), 2202 (20 µm), etc.) hecha por InteliCoat Technologies. Debe entenderse que pueden utilizarse muchas otras membranas para implementar los métodos y diseños y aparatos divulgados aquí.

El uso de las membranas como se describió más arriba hace que el método de secado propuesto sea un proceso aséptico de barrera. Una metodología para utilizar membranas respirables ha sido divulgada para la liofilización (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,309,649). Sin embargo, esa metodología no ha sido utilizada en la industria porque la permeación de las membranas transpirables no porosas es demasiado lenta para la ejecución de un liofilizado efectivo. Por lo tanto el rendimiento de secado por PBV o PFF en un contenedor (por ejemplo, una bolsa) cubierta con una membrana respirable (por ejemplo, polipropileno o poliuretano) sin poros presenta una oportunidad novedosa para una conservación aséptica a escala industrial por secado. Puesto que tales membranas (las cuales están caracterizadas por un espesor en el rango de 20-50 micrones) tienen resistencia mecánica limitada, el diseño puede ser reforzado utilizando un "sándwich" que contiene una membrana respirable entre dos membranas porosas de bajo coste (por ejemplo, membranas Sartorius) que están caracterizadas por una permeabilidad al vapor de agua y por una resistencia mecánica más alta.

Los contenedores (por ejemplo, bolsas) para secar según los métodos de la invención divulgados aquí requieren conectores adecuados que permitan: (1) introducir asépticamente un fluido, tal como una solución biológica y/o una suspensión viral o celular, en un contenedor sin colapsar el contenedor, (2) secar asépticamente el fluido, (3) almacenar asépticamente el espécimen seco en el contenedor, y (4) transferir el producto seco terminado desde el contenedor a otros dispositivos para procesamiento corriente abajo (por ejemplo, molienda, mezcla, empaque, transporte, etcétera). Preferiblemente, los contenedores usados en los métodos novedosos divulgados podrían ser menos costoso que las bandejas Lyoguard costosas cubiertas con membranas costosas.

Equipo para producción industrial de carga continua.

Ahora, se describirá una realización de equipo para implementación a escala industrial de los métodos novedosos para conservación de materiales biológicos. Debe entenderse que las realizaciones descritas se presentan aquí solamente con propósitos de ilustración.

Hay varias barreras a través de las cuales tiene que pasar el vapor de agua en su camino desde el espécimen que va a ser secado hasta el condensador. Primero, el vapor pasa a la membrana que cubre el contenedor del espécimen (por ejemplo, una bolsa o bandeja utilizada para secado a granel) o sale de los viales a través de orificios

bajo los tapones durante el secado de la dosis unitaria. En segundo lugar, el vapor debe viajar a través de la cámara de secado hasta el condensador.

Debido a que la liofilización se lleva a cabo a presiones muy bajas, el flujo de vapor entre las cámaras de secado y el condensador se "atascan", limitando por lo tanto la velocidad del proceso de secado. Por esta razón, un liofilizador industrial típico que puede condensar muchos litros de agua desde el material objeto en un tiempo dado se construye actualmente como un aparato de una cámara en el cual el diámetro del conector entre la cámara y el condensador debe ser relativamente grande (típicamente, aproximadamente 1 metro o más). Esta es la razón por la cual los liofilizadores a vacío a escala industrial no pueden ser construidos utilizando un diseño múltiple, esto es, como un aparato con un cierto número de cámaras grandes.

A diferencia del equipo que utiliza un proceso de liofilización, el equipo que utiliza un equipo de proceso PBV hace posible construir un PBV basado en un múltiple o un equipo de PFF basado en un múltiple puesto que el secado primario para estos procesos puede ser llevado a cabo a presiones de vapor considerablemente más altas (por ejemplo 1 a 3 Torrs (183.3 a 400 Pa)), permitiendo por lo tanto flujos considerablemente más altos entre las cámaras y el condensador. Por ejemplo, se ha establecido en la práctica que el secado por PBV primario de 4.5 kg de una enzima industrial incorporada dentro de perlas de alginato dentro de una cámara de vapor del liofilizador modificado Génesis (de Virtis Co) puede ser logrado al cabo de aproximadamente seis horas. El aparato usado en ese proceso tiene un conector entre la cámara de secado y el condensador con un diámetro de solo aproximadamente 0.1 metro.

De la misma forma se ha reportado (Patentes de los Estados Unidos No. 6,306,345 y 6,692,695) que un aparato que utiliza un proceso PFF es capaz de eliminar una cantidad similar de agua de una cámara a un condensador a través de un conector con un diámetro similar al cabo de varias horas. Por lo tanto, el equipo que utiliza un proceso bien sea un PBV o PFF puede ser construido utilizando un diseño de aparato de secado múltiple, aprovechando por lo tanto una producción en carga continua (y así, más rápida y más eficiente).

Un secador múltiple puede ser diseñado y construido como un condensador grande, que comunica a través de una pluralidad de conectores con una pluralidad de cámaras de secado. Los conectores pueden estar equipados opcionalmente con válvulas de vacío (u otros dispositivos adecuados) para controlar o cerrar el flujo de aire o vapores de agua desde la cámara hacia el condensador. El material que va a ser secado se coloca dentro de las cámaras. Se provee una pluralidad de fuentes de calor para transportar calor a las cámaras con el fin de compensar pérdida de energía debido a la evaporación durante el proceso de secado. Adicionalmente, se provee un dispositivo de enfriamiento para permitir el enfriamiento del material antes de la etapa de secado hasta aproximadamente -10°C. El dispositivo de enfriamiento puede utilizar cualquier diseño convencional conocido para equipos de refrigeración, esto es, poder comprender un compresor y un intercambiador de calor.

Las cámaras, por ejemplo, pueden ser cilíndricas como se divulga en la Patente de los Estados Unidos No. 6,692,695. Las cámaras también pueden ser planas para acomodar una bandeja llena con viales, o bolsas como una bolsa Lyoguard.

El calor puede ser suministrado por conducción, radiación infrarroja, utilizando bajas frecuencias (50 Hz - 500 Hz), calentamiento electromagnético por radio frecuencia (5 MHz - 60 MHz) del material en el estado de masa durante el estado primario o por cualquier otra fuente o método conocido de generación y transferencia de calor.

El aparato también puede estar equipado con un sistema de control opcional que controlará los diversos procesos.

Por ejemplo, el sistema de control puede proveer control automático u otro del calentamiento, flujos de gas, enfriamiento y otras funciones del aparato. Adicionalmente, el sistema de control podría ser programable. También puede ser programado para definir ventajosamente el avance del proceso de secado en diversas cámaras del aparato. Esta característica permitirá conectar una nueva cámara al múltiple y desconectar una cámara cuando el proceso de secado haya terminado desde el secador dentro de periodos predeterminados de tiempo, por ejemplo, cada hora, o 30 minutos. Así, si la capacidad de la cámara es 5 Kg y se conecta a una nueva cámara cada 30 minutos, el rendimiento de la producción de una cámara será igual a aproximadamente 240 kg por día, esto es, 10 Kg por hora. Será apreciado por los experimentados en el arte que tales rendimientos son considerablemente superiores a los que se obtienen por el equipo de liofilización convencional.

El diseño de equipo tipo múltiple descrito más arriba puede proveer una rata de producción que está limitada no solamente por la capacidad del condensador. Si en lugar de utilizar un dispositivo de refrigeración mecánico, se utiliza nitrógeno líquido para enfriar el condensador, pueden alcanzarse ratas de producción considerablemente más alta. Incluso de forma más importante desde el punto de vista de producción industrial, el equipo de secado múltiple que utilizan bien sea un proceso PFF o PBV permite llevar a cabo producciones a alta velocidad en carga continua que, como se discutió más arriba, son imposibles utilizando un proceso de liofilización.

Debe entenderse que hay una gran pluralidad de maneras de diseñar y construir el equipo divulgado aquí que serán consistentes con los principios novedosos de la invención presente. Por ejemplo, el diseño mecánico de las cámaras



de secado, el diseño y configuración de los conectores, la geometría del múltiple, etc. pueden tomar muchas diferentes formas.

Calidad de la conservación.

5 Se ha llevado a cabo un cierto número de experimentos de factibilidad que demuestran que los métodos divulgados aquí son funcionales y efectivos. Por ejemplo, una vacuna viral envuelta viva ha sido estabilizada sin pérdida de actividad después de secado siguiendo un método PBV y almacenamiento subsecuente a 40°C durante un mes. Además, se han conservado enzimas y proteínas nucleantes en hielo utilizando el método PBV sin pérdida de actividad. Después de una conservación por vaporización, el material puede ser molido o procesado de alguna otra manera para hacerlo adecuado para modos específicos de administración.

### Ejemplos

15 Los siguientes ejemplos se ofrecen solamente para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1.

Conservación de bacterias nucleantes en hielo utilizando un proceso de PFF

20 Para obtener bacterias nucleantes en hielo (INB), se mezcló una mezcla de conservación de 180 g de suspensión concentrada de bacterias nucleantes en hielo *Pseudomonas Syringae* ATCC 53543 con 108 g de sacarosa y 12 g de maltrina. La mezcla fue mezclada entonces hasta que los azúcares se disolvieron por completo.

25 La mezcla resultante fue colocada en viales de suero de 100 ml. Así, se colocaron 16.66 g de la mezcla dentro de cada vial. La mezcla en los viales fue secada entonces dentro de una máquina de liofilización "Ultra" hecha por Virtis Corporation y modificada para un mejor control de presión de vacío en la cámara de secado. Los viales fueron colocados sobre la superficie de un estante de acero inoxidable dentro de la cámara de secado. La temperatura del estante fue mantenida circulando anticongelante de etilenglicol/agua a temperatura controlada dentro de la estantería. Los especímenes fueron conservados utilizando una conservación mediante el proceso de formación de espuma descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5,766,520. No se observó congelación en los viales durante la conservación. Después de que se formaron espumas secas estables dentro de los viales, las espumas fueron secadas a 50°C durante 24 horas bajo alto vacío. Después de esto, los viales fueron cerrados con tapones de goma bajo vacío y sellados con sellos de aluminio. Se observó mucha dispersión sobre las paredes de los viales. La dispersión intensiva tuvo lugar durante la ebullición del material dentro de los viales. Todas las paredes de vidrio de los viales fueron cubiertas con pequeñas gotas (1 mm o menos de diámetro) de la mezcla.

35 El material seco en los viales fue irradiado para esterilizar el material. La esterilidad fue probada sembrando bacterias reconstituidas sobre diferentes medios de agar. No se observó crecimiento bacteriano. La activación de nucleación de la INB conservada fue medida después de la reconstitución de la muestra con 100 ml de reconstitución de fosfato de 0.01 M. La actividad de nucleación en hielo fue medida como una concentración de centros nucleantes de hielo que pueden nuclear en un cristal de hielo en una gota de regulador de 10 µl durante 5 minutos a -5 grados Celsius. Los resultados del ensayo muestran que más del 50% de la actividad nucleante de hielo permaneció en las muestras conservadas incluso después del tratamiento con radiación. No se observó descenso en la actividad de la INB durante el almacenamiento subsecuente a temperatura ambiente y 37°C.

Ejemplo 2.

Conservación de bacterias nucleantes de hielo utilizando un proceso PBV

50 Cinco viales con bacterias INB conservadas del ejemplo 1 fueron reconstituidos con 9 g de agua. Los viales fueron colocados en una máquina liofilizadora "Ultra" (hecha por Virtis Corporation). Antes de la aplicación de vacío, la estantería fue preenfriada a -10°C y el material en el interior de los viales se congeló. Luego se aplicó vacío simultáneamente con incrementos en la temperatura de la estantería hasta 35°C. La presión de vacío fue controlada de tal manera que la temperatura dentro de los viales se mantuvo entre -5°C y -10°C. Después de aproximadamente 3 horas, el secado primario fue terminado sin dispersión visible del material sobre las paredes de los viales. El material seco era similar en espuma parcialmente cubierto con una piel de torta liofilizada delgada. Después de que se formó un material seco estable dentro de los viales, el material fue secado a 50°C durante 24 horas bajo alto vacío. Después de esto, los viales fueron cerrados con tapones de goma y sellados con sellos de aluminio. Los resultados del ensayo llevado a cabo después de la reconstitución de los viales con 100 ml de regulador de fosfato de 0.01 M no mostró descenso estadísticamente significativo de la actividad después del secado por PBV.

Ejemplo 3

65 Conservación de solución de isocitrato deshidrogenasa mediante un proceso PBV

Una solución acuosa al 50% de glicerol de Isocitrato deshidrogenasa de Sigma Chemical Co. fue dializado durante 5 horas en regulador TRIS HCl 0.1 M (pH 7.4). La actividad de la Isocitrato deshidrogenasa (IDH) en la solución TRIS HCl 0.1 M después de la diálisis fue de  $23 \pm 1$  unidad por ml. La IDH dializada fue mezclada 1:1 con solución de conservación que contenía 30% de sacarosa y 15% de rafinosa, depositada en viales de 5 ml (0.5 ml por vial) y colocada sobre el estante del liofilizador "Génesis" (hecho por VirTis Corporation) modificado para proveer mejor control de la presión de vacío en la cámara de secado. El material fue congelado primero por enfriamiento del estante a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Luego se aplicó un vacío (1 Torr (133.3 Pa) simultáneamente con la elevación de la temperatura del estante hasta  $45^{\circ}\text{C}$ .

Después de aproximadamente 1 hora se incrementó el vacío (la presión se disminuyó por debajo de 0.2 Torrs (26.7 Pa)). Luego el material fue secado durante la noche y sellado con tapones de goma; se liberó el vacío y los viales fueron colocados a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después del secado, el material era similar a una espuma cubierta parcialmente con una piel de torta liofilizada. No se observó dispersión sobre las paredes de los viales. Después de un mes de almacenamiento a  $37^{\circ}\text{C}$ , los especímenes fueron reconstituidos con 0.375 ml de agua y se midió la actividad de IDH. Las muestras reconstituidas fueron probadas en cuanto a su actividad ensayando la capacidad de reducir NADP, medida espectrofotométricamente a 340 nm. La mezcla de reacción incluía: 2 ml de regulador TRIS HCl 0.1 M, pH 7.4; 10  $\mu\text{l}$  de 0.5% en peso de NADP +; 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{MnSO}_4$  10 Mn; 10  $\mu\text{l}$  de 1-isocitrato 50 Mn; y 10  $\mu\text{l}$  de solución de IDH reconstituida. La actividad fue  $11 \pm 0.5$  unidades/ml, lo que significa que no hubo pérdida significativa de la actividad durante el secado y durante el mes de almacenamiento subsecuente a  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### Ejemplo 4

Conservación por PBV de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

El *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 es la cepa tipo de esta especie comercialmente significativa. El *L. acidophilus* (probióticos) crece por fermentación de lactosa, glucosa y una variedad de carbohidratos. El producto final de esta fermentación es casi exclusivamente ácido láctico.

Soluciones usadas:

1. Caldo Difco MRS que contiene 0.05% de cisteína y 0.1% de  $\text{Ca Cl}_2$ ;
2. Agar MRS;
3. 10% de cisteína, solución salina regulada de fosfato de Dulbecco (DPBS);
4. Solución de conservación - 1(PS-1): 20% de sacarosa, 10% de MSG; 0.1% de INB reconstituida del experimento 1.
5. Solución de Conservación - 2(PS-2): 20% de sacarosa, 10% de MSG, 1% de alginato; 0.1% de INB reconstituida del experimento 1.
6. Solución de EDTA-1 para reconstitución del polvo de gel seco que comprende 45g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 M + 30g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3 M + 75 g de agua + 15g de solución estándar de EDTA de J.T. Baker.

Crecimiento de precultivo:

Etapas:

1. *L. acidophilus*, cepa 4356, obtenida de ATCC se utilizó para inocular 150 ml de caldo MRS + 0.05% de cisteína.
2. El precultivo fue cultivado en un matraz de rotación Belco en incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación suave durante la noche. Al final la densidad óptica A (600) en precultivo fue de 3.027 y pH fue de 4.03.

Fermentación:

La fermentación se llevó a cabo utilizando un fermentador New Brunswick Scientific Company BioFlo 2000 con una capacidad de trabajo de 2 L.

Etapas:

1. Se prepararon 2L de caldo MRS a partir de polvo Difco comercial y se sometieron a autoclave dentro del fermentador BioFlo 2000 durante 30 minutos (ciclo líquido).
2. Se agregaron 10 ml de cisteína al 10% en el fermentador para obtener la concentración final de cisteína = 0.05%

## ES 2 644 416 T3

3. Se inocularon 20 ml de precultivo en el fermentador.
4. El fermentador fue operado a 37°C, con agitación a 50 RPM, sin regulación de pH.
- 5 5. Densidad óptica A (600) y pH después de 9 horas de fermentación permanecieron estables. A (600) = 2.9 - 3.0; pH = 4.08 - 4.00.
6. Después de 10.5 horas de fermentación el fermentador fue recolectado y el cultivo fue distribuido en tubos de centrifuga de 8 x 250 ml, 250 g de cultivo en cada tubo.
- 10 7. Los tubos fueron centrifugados a 4°C, a 3000 rpm, durante 15 minutos.
8. El sobrenadante fue separado por decantación.
- 15 Preparación de los especímenes para secado  
Etapas:
- 20 1. Para preparar la mezcla de conservación -1 (PM-1) las pellas en 7 tubos fueron reconstituidas con PS-1 (50g de PS-1 en cada tubo). Las mezclas fueron sometidas a vórtex exhaustivamente y unidas entre si.
2. Para preparar la mezcla de conservación -2 (PM-2) la pella en el octavo tubo remanente fue reconstituida con 50 g de PS-2. La mezcla fue sometida a vórtex exhaustivamente.
- 25 3. Se distribuyó el PM-1 en 50 x 5ml viales de suero, 0.5 g por vial (formulación 1).
4. El PM-1 fue depositado en cada uno de 5 contenedores pequeños cilíndricos Lyoguard (con tapa), 10 g por tapa (formulación 2).
- 30 5. Se colocaron 250g de PM-1 en una bandeja Lyoguard (Formulación 3).
6. Se liberaron 10 g de PM-2 a través de la aguja 20G en un baño que contenía CaCl<sub>2</sub> al 2% disuelto en 90% de PS-1 para formar partículas de gel similares a espaguetis. Las partículas de gel fueron recolectadas utilizando un tamiz de 90 micrones. El líquido por fuera de las partículas de gel fue extraído utilizando una bomba de vacío de laboratorio. Las partículas fueron colocadas en contenedores cilíndricos pequeños de 200 ml Lyoguard (tapas). Se llenaron 5 tapas (formulación 4).
- 35 7. La actividad de las bacterias en PM-1 y PM-2 antes del secado fue determinada sembrando 0.1 ml de PM diluido millones de veces sobre agar MRS + 0.05% de cisteína.
- 40 8. Todas las placas fueron almacenadas bajo condición anaeróbica en incubadora a 37°C durante 48 horas.
- Protocolo de secado.
- 45 1. La temperatura inicial del estante fue fijada a 0°C;
2. Los especímenes se congelaron después de que la temperatura dentro de los especímenes disminuyó a aproximadamente -4°C como resultado de la evaporación después de la aplicación de vacío. La congelación comenzó sobre la superficie de los especímenes. Después de esto la temperatura del estante fue incrementada a 50 35°C.
3. El secado primario fue llevado a cabo manteniendo la temperatura dentro de los especímenes entre -5°C y -10°C para obtener un estado deshidratado mecánicamente estable. Después de secar el material en los viales y en la bandeja Lyoguard tiene un aspecto espumoso con una piel de torta liofilizada por encima de la espuma. Las 55 partículas de alginato tenían la apariencia de espagueti seco.
4. El secado en estabilidad fue llevado a cabo bajo vacío completo primero a 25°C durante la noche. Luego la temperatura del estante fue elevada a 50°C durante 48 horas adicionales.
- 60 5. Después del secado en viales de vidrio la masa de material seco en un vial fue de aproximadamente 0.15g.
6. Después del secado, los materiales de las tapas y la bandeja fueron molidos en un cuarto seco (a 15% de humedad relativa) utilizando un homogeneizador de laboratorio VirTis. Los polvos molidos fueron depositados en viales de vidrio de 5ml (0.15 g por vial). Los viales fueron sellados con tapones de goma cubiertos con sellos de 65 aluminio.

## ES 2 644 416 T3

7. Para medir la actividad de 0.15 g de material seco en cada vial se reconstituyó con 4.85 ml de DPBS y luego se diluyó 100.000 veces adicionales antes de sembrar 0.1 ml sobre agar MRS + 0.05% de cisteína.

8. Para medir la actividad de 0.15g de material seco que contenía alginato se reconstituyó 4.85 ml de solución de EDTA-1 y luego se diluyó 100.000 veces adicionales antes de sembrar 0.1 ml sobre agar MRS + cisteína al 0.05%.

Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2

Condiciones de almacenamiento	Número de colonias			
	Form. 1	Form. 2	Form. 3	Form. 4
Justo antes del secado	PM-1 168±12	PM-1 170±16	PM-1 173±9	PM-2 106±10
Justo después del secado	79±8	76±13	66±6	72±12
1 semana a RT	75±9	70±12	72±13	79±11
1 semana a 37°C	83±11	69±15	69±12	48±7
1 mes a RT	82±14	85±12	84±7	63±9
1 mes a 37°C	77±10	71±7	57±7	54±4

### 10 Referencias citadas

#### Documentos de Patentes de los Estados Unidos

<u>4215153</u>	Jul., 1980	Kai et al.	
<u>4396563</u>	Aug., 1983	Gusmer.	
<u>4451569</u>	May., 1984	Kobayashi et al.	
<u>4559298</u>	Dec., 1985	Fahy.	
<u>4642903</u>	Feb., 1987	Davies et al.	
<u>4891319</u>	Jan., 1990	Roser.	
<u>5026566</u>	Jun., 1991	Roser.	
<u>5030469</u>	Jul., 1991	Mergelsberg.	
<u>5039540</u>	Aug., 1991	Ecanow et al.	
<u>5079018</u>	Jan., 1992	Ecanow et al.	
<u>5084101</u>	Jan., 1992	Engles et al.	
<u>5149653</u>	Sep., 1992	Roser.	
<u>5190987</u>	Mar., 1993	Parkinson.	
<u>5200399</u>	Apr., 1993	Wettlaufer et al.	
<u>5250429</u>	Oct., 1993	Jolly et al.	
<u>5252620</u>	Oct., 1993	Elliott et al.	
<u>5290582</u>	Mar., 1994	Dressel et al.	
<u>5354558</u>	Oct., 1994	Britton et al.	
<u>5425951</u>	Jun., 1995	Goodrich, Jr., et al.	
<u>5439945</u>	Aug., 1995	Smies.	
<u>5565318</u>	Oct., 1996	Walker et al.	
<u>5597416</u>	Jan., 1997	Fuisz et al.	
<u>5621094</u>	Apr., 1997	Roser.	
<u>5648206</u>	Jul., 1997	Goodrich, Jr. et al.	
<u>5762961</u>	Jun., 1998	Roser et al.	424/464.
<u>5766520</u>	Jun., 1998	Bronshtein.	

#### Documentos de Patentes Extranjeras

959786	Sep., 1982	RU.
WO 9314191	Jul., 1993	WO.
WO 9640077	Dec., 1996	WO.

1. Annear, "Preservation of Leptospir. ae butted. by drying" J. Path. Bact. vol. 72, pp. 322-3 323, 1956.
2. Annear, "Observations of the Preservation by Drying of Leotospirae and Some Other Bacteria", Austral. J. Exp. Biol. vol. 36, pp. 1-4., 1958.
- 5 3. Annear, "Observation on Drying Bacteria from the Frozen and From the liquid State" Austral. J. Exp. Biol. vol. 36, pp. 211-221, 1958.
- 10 4. Annear, "recovery of Strigomonas oncopeltii after Drying From the Liquid State" Aust. J. Exp. Biol., vol. 39, pp. 295-303, 1961.
5. Annear, "Preservation of the Reiter Treponeme by Drying From the Liquid State", J. Bact., vol. 83, pp. 932-933, 1962.
- 15 6. Annear, "The Preservation of Leptospirae by Drying From the Liquid State", J. Gen. Microbiol., vol. 27, pp. 341-343, 1962.
- 20 7. Annear, "Recoveries of Bacteria After Drying on Cellulose Fibres A Method for The Routine Preservation of Bacteria", Austral. J. Exp. Biol., vol. 40, pp. 1-8, 1962.
8. Annear, "Preservation of Yeast by Drying", Austral. J. Exp. Biol., vol. 41, pp. 575-580., 1963.
9. Annear, "Recoveries of Bacteria After Drying In Glutamate and Other Substances", Aust. J. exp. Biol. Med. Sci., vol. 42, pp. 717-722, 1964.
- 25 10. Annear, Recoveries of Bacteria After Drying in Vacuo at a Bath Temperature of 100.degree.C., Nature, No. 5050, p. 761, Aug. 13, 1966.
- 30 11. Annear, Survival of Bacteria in Desiccates at 100.degree.C in Dry Atmospheres, Nature vol. 206 No. 4991, pp. 1373-1374, Jun. 26, 1965.
12. Bronshtein, V. 1998. Preservation by foam formation. US patent # 5766520.
- 35 13. Burke, M.J. 1986. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In "Membranes, Metabolism, and Dry Organisms", p. 358-363, Ed. C. Leopold, Cornell University Press, Ithaca, NY.
14. Annear, D.I. (1958) Observations on drying bacteria from the frozen and from the liquid state. Austral. J. Exp. Biol., 36: 2111-222.
- 40 15. Bronshtein, V. 2004. Preservation by Foam Formulation, an Alternative to Freeze-Drying. Pharmaceutical Technology. 28: 88-91.
16. Bronshtein V. (2003) Scalable long-term shelf preservation of sensitive biological solutions and suspensions. US6509146.
- 45 17. Bronshtein, V. (2002) "Good" and "Bad" glasses for long-term preservation of biologicals. In: "Cryo 2002 program", Abstract S88 of a Paper Presented at the 39th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Breckenridge, Colorado.
- 50 18. Bronshtein, V. (2002) Preservation of viruses and bacteria at ambient temperatures with methylglucoside. In: "Cryo 2002 program", Abstract S55 of a Paper Presented at the 39th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Breckenridge, Colorado.
19. Bronshtein, V. (2001) Preservation and Formulation of Bioactive Materials for Storage And Delivery in Hydrophobic Carriers. WO00137656.
- 55 20. Bronshtein, V. (1998) Preservation by foam formation. US 5766520.
21. Bronshtein V., Braken R.B., Campbell, J.G. (2003) Bulk Drying and the Effect of Inducing Bubble Nucleation. US2003/0155669.
- 60 22. Bronshtein, V., Bracken, Kevin R., Livers, Ronnie K., and Williams, D. R. (2001) Industrial Scale Barrier Technology For Preservation Of Sensitive Biological Materials at Ambient Temperatures. US6306345.

23. Bronshtein, V., Frank, J.L., and Leopold, A.C. (1996). Protection of desiccated enzymes by sugars. In: "Cryo 96 program", Abstract 22 of a Paper Presented at the 33rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Indianapolis, Indiana.
- 5 24. Bronshtein, V., Isaac, Ch., and Djordjevic G. (2001) Preservation of Bacterial Cells at Ambient Temperatures. WO00112779.
25. Bronshtein, V., Isaac, C. (1999) Stabilization of bacterial cultures by VitriLifeSM preservation process. In: "Proceedings of the 17th International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH)", Veldhoven, The Netherlands, pp. 221-225.
- 10 26. Bronshtein, V., and Leopold, A.C. (1996) Accelerated aging of dried luciferase and isocitrate dehydrogenase. Effect of sugar/enzyme mass ratio. In: "Cryo 96 program", Abstract 23 of a Paper Presented at the 33rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Indianapolis, Indiana.
- 15 27. Bronshtein V., Lynkowsky L. (2001) Formulation of preservation mixtures containing sensitive biologicals to be stabilized for ambient temperature storage by drying. WO00137656.
28. Bronshtein, V. Hopkinson, J...
- 20 29. Bronshteyn, V.L. and Chernov A.A. (1991) Freezing potentials arising on solidification of dilute aqueous solution of electrolyte. *J. Crystal Growth* 112: 129-145.
30. Bronshtein, V.L. 1989. The theory of crystallization hydrolysis. *Cryobiology* 26:582-583 (Abstract 137, 26th Annual Meeting, Society for Cryobiology).
- 25 31. Bronshtein, V.L., Y.A. Itkin, G.G. Shurda, and P.G. Iserovich. 1983. Mechanism of lactic acid *Streptococcus cremoris* T1815 damage during freezing. *Kriobiologia i Kriomeditsina* 12: 31-35.
- 30 32. Burke M.J. (1986) The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In "Membranes, Metabolism, and Dry Organisms", 358-363, Ed. C. Leopold, Cornell University
33. Bruni, F. and Leopold A.C., 1992. Pools of water in anhydrobiotic organisms: a thermally stimulated depolarization current study *Biophys.J.* 63, 663.
- 35 34. Dye, C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, and M. C. Raviglione. 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA*. 282:677-686.
- 40 35. Frieden, T.R., T.R. Sterling, S.S. Munsiff, C.J. Watt, and C. Dye. 2003. Tuberculosis. *The Lancet* 362:887-899.
36. Franks, F. 1990. Freeze drying: From empiricism to predictability. *Cryo-Letters* 11,93-100.
- 45 37. Johari,G.P., Astl,G.,and Mayer,E. (1990) Enthalpy relaxation of glassy water. *J.Chem.Phys.*, 809-810.
38. Jennings T.A. (2002) Lyophilization. Interpharm/CRC Press LLC. 646 ps.
39. Roser, B.J. and E.M. Gribbon. 1996. Methods for stably incorporating substances within dry, foamed glass matrices and compositions obtained thereby. Patent WO9640077
- 50 US4609102 1986-09 Blum Plastic film bag lyophilization system
- US4973327 1990-11 Goodrich et al. Cryopharm Blood bag for lyophilization
- 55 US5257983 1993-11 Garyantes et al. Cryopharm Corporation Blood bag for lyophilization
- US5309649 1994-05 Bergmann et al. Boehringer Mannheim GmbH Process and container for freeze drying under sterile conditions
- 60 USD425205 2000-05 Henigan et al. Gore Enterprise Holdings, Inc. Lyophilization container
- USD430939 2000-09 Zukor et al. Gore Enterprise Holdings, Inc. Lyophilization container
- 65 US6517526 2003-02 Tamari Container for lyophilizing biological products 40.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método escalable para conservar uno o más materiales a una temperatura de almacenamiento, que comprende:
- 5 proveer uno o más materiales seleccionados del grupo consistente de una solución biológica, suspensión biológica y un agente biológico incorporado en un hidrogel y uno o más excipientes protectores para formar una primera composición;
- 10 llevar a cabo un secado primario por vaporización intensiva del agua a partir de una masa en dos fases que comprende una cantidad de hielo y una cantidad de solución concentrada y dispuesta entre los cristales de hielo, en donde dicho secado primario se lleva a cabo a temperaturas que son al menos 10°C mayores que la temperatura a la cual dicha solución concentrada solidifica durante el enfriamiento y dicho secado primario comprende simultáneamente aplicar vacío y calor de tal forma que dicha solución concentrada permanece en un estado líquido,
- 15 en el que el agua es eliminada de dicha masa en dos fases a través de ebullición simultánea de la solución, sublimación de los cristales de hielo, y evaporación de las moléculas de agua de la superficie de la masa para formar una espuma seca; y
- 20 llevar a cabo un secado en estabilidad que comprende calentar dicha espuma seca hasta una temperatura elevada.
2. El método de la reivindicación 1, en el que uno o más materiales es una solución o suspensión biológica.
3. El método de la reivindicación 1, en el que uno o más materiales comprende un tejido biológico delgado o un espécimen multicelular pequeño.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en donde uno o más materiales es conservado en viales de suero o en un contenedor para la conservación de barrera a granel.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el hidrogel es un gel de alginato, gel de pectina, gel basado en gelatina, o gel basado en quitosano.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en el que el hidrogel consiste de partículas de gel pequeñas, o es cortado a tamaños de partículas pequeñas de aproximadamente 1 mm o menos.
- 35 7. El método de la reivindicación 1, en el que el hidrogel es colocado en un contenedor cubierto con una membrana permeable al agua antes de llevar a cabo dicho secado primario.
8. El método de la reivindicación 1, en el que el agente biológico es seleccionado del grupo consistente de péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, vacunas, bacterias, virus, liposomas, plaquetas y otros componentes sanguíneos, y suspensiones celulares de mamífero.
- 40 9. El método de la reivindicación 1, en que la temperatura durante dicho secado primario es al menos 10°C superior que una temperatura de colapso y la temperatura a la cual la solución concentrada solidifica completamente durante el enfriamiento y la presión de vacío en la cámara de secado está por debajo de la presión de vapor de agua en equilibrio de tal manera que la primera composición es sobrecalentada.
- 45 10. El método de la reivindicación 8, en el que las vacunas son atenuadas comprendiendo las vacunas virales virus vivos seleccionados del grupo consistente de virus de la influenza, virus de la parainfluenza, AAV, adenovirus, virus sincicial respiratorio, virus del herpes simplex, citomegalovirus, virus de SARS, miembros de la familia de virus corona, matapneumovirus humano y virus de Epstein-Barr, sarampión, paperas, rubéola.
- 50 11. El método de la reivindicación 1, en el que dicho secado en estabilidad se lleva a cabo a una temperatura por encima de 40°C.
- 55 12. El método de la reivindicación 1, en el que dicho secado en estabilidad se lleva a cabo en etapas; como una primera etapa llevada a cabo a una temperatura de partida para asegurar la deshidratación sin pérdida de dicha viabilidad y potencia de los materiales biológicos y etapas subsecuentes en las cuales la deshidratación se continúa a una temperatura gradualmente más alta durante cada etapa subsecuente.
- 60 13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de almacenamiento es 22°C.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de almacenamiento está por encima de 40°C.
- 65 15. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de almacenamiento está por encima de 50°C.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de almacenamiento está por encima de 70°C.
- 5 17. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de almacenamiento está por encima de 80°C.
- 10 18. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el secado en estabilidad se lleva a cabo a una temperatura superior a la temperatura de almacenamiento en tanto llega a alcanzar estabilidad a la temperatura de almacenamiento.
- 15 19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el secado en estabilidad se lleva a cabo a una temperatura superior a la temperatura de almacenamiento en tanto alcanza una temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) igual o mayor que la temperatura de almacenamiento.
- 20 20. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que uno o más materiales es una solución biológica.
21. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el uno o más materiales es una suspensión biológica, incluyendo una suspensión viral, celular, liposómica y/o bacteriana de partículas de gel pequeñas.
- 25 22. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que uno o más materiales es congelado antes de que se aplique vacío haciendo disminuir la temperatura de congelación externa por debajo de 0°C.
23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que la temperatura de congelación está por encima de -20°C.
- 30 24. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que la temperatura de congelación está por encima de -15°C.
25. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que la temperatura de congelación está por encima de -10°C.
- 35 26. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que la temperatura de congelación está por encima de -5°C.
27. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en la que la congelación se lleva a cabo por enfriamiento evaporativo bajo un vacío que mantiene la temperatura externa en o por encima de 0°C.
- 40 28. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el secado en estabilidad se lleva a cabo a una temperatura de secado en estabilidad entre 20°C y 40°C durante 1 a 12 horas.
29. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la etapa de secado en estabilidad se lleva a cabo a una temperatura de secado en estabilidad entre 20°C y 100°C durante 6 a 24 horas.
- 45 30. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que los materiales comprenden soluciones y suspensiones de vacunas, componentes sanguíneos (celulares y no celulares), suspensión bacteriana (incluyendo probióticos), agentes terapéuticos o de diagnóstico.
- 50 31. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que subsecuente a dicho secado en estabilidad de la espuma seca es molida para incorporarla en aplicaciones para administración por inhalación, intranasal o intradérmica.
- 55 32. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho uno o más excipientes protectores comprende uno o más de: un monosacárido o un derivado no reductor del mismo, alcohol azúcar, oligosacáridos, aminoácidos, protectores poliméricos, albúmina, gelatina, proteínas estables al calor, y proteínas de suero, polaxómeros y/o moléculas anfifílicas.
- 60 33. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en que una pequeña cantidad de proteínas nucleantes de hielo se agregan a la primera composición para evitar un superenfriamiento inicial de la misma.
34. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la temperatura de la solución durante el secado primario está por encima de -20°C.
35. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de la solución durante el secado primario está por encima de -15°C.
- 65 36. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de la solución durante el secado primario está por encima de -10°C.



37. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de la solución durante el secado primario está por encima de  $-5^{\circ}\text{C}$ .
- 5 38. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el secado primario se lleva a cabo a hasta 400 Pa (3 Torr) de presión de vacío.
39. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el secado primario se lleva a cabo a hasta 266.6 Pa (2 Torr) de presión de vacío.
- 10 40. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el secado primario se lleva a cabo hasta a 133.3 Pa (1 Torr) de presión de vacío.
41. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el secado primario se lleva a cabo hasta a 66.7 Pa (0.5 Torr) de presión de vacío.
- 15 42. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos materiales incluyen objetos celulares que incluyen sangre y otras células animales, cargados con disacáridos, derivados no reductores de la glucosa, y/o aminoácidos utilizando métodos artificiales incluyendo poración y electroporación química.
- 20 43. El método de acuerdo con la reivindicación 42 en el que dicho derivado no reductor de glucosa es arbutina o metilglucósido.
44. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el secado primario por vaporización intensiva se lleva a cabo en contenedores cubiertos con una membrana de politetrafluoretileno expandido u otras membranas biocompatibles porosas que tienen alta permeabilidad al vapor de agua.
- 25 45. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el secado primario por la vaporización intensiva se lleva a cabo en contenedores cubiertos con una membrana respirable no porosa que es permeable al agua y otras moléculas pequeñas de vapor.
- 30 46. El método de la reivindicación 1, en el que un contenido de humedad de dicha espuma seca varía desde aproximadamente 0.01% a aproximadamente 2%.
- 35 47. El método de la reivindicación 1, en el que el contenido de humedad de dicha espuma seca varía desde aproximadamente 2% hasta aproximadamente 5%.
48. El método de acuerdo con la reivindicación 1 llevado a cabo utilizando un aparato de secado al vacío de una cámara convencional o un secador múltiple.
- 40 49. El método de la reivindicación 32, en la que el derivado no reductor de un monosacárido es metilglucósido.