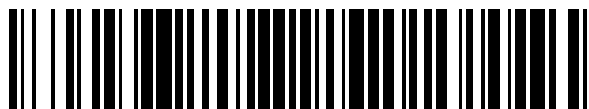


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 249**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2010 PCT/US2010/057816**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO11066291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2010 E 10833862 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2503995**

54 Título: **Procedimientos, composiciones y kits de liofilización**

30 Prioridad:

24.11.2009 US 264014 P

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

29.12.2017

73 Titular/es:

**GRIFOLS THERAPEUTICS INC. (100.0%)
4101 Research Commons 79 T.W. Alexander
Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**GUO, JIANXIN;
KLOS, ANTHONY y
BARNETTE, DEBORAH**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 648 249 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

Procedimientos, composiciones y kits de liofilización

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer procedimientos para liofilizar composiciones, en particular, formulaciones farmacéuticas acuosas que comprenden antitrombina-III (AT III).

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La liofilización es un procedimiento comúnmente utilizado para la preparación de ingredientes activos en formas más sólidas de productos farmacéuticos. Por ejemplo, un ingrediente activo tal como AT III, que es una glicoproteína α_2 normalmente presente en el plasma y es un inhibidor plasmático de la trombina, se ha demostrado que tiene relativamente poca estabilidad en disolución. En consecuencia, AT III ha sido procesada en preparaciones liofilizadas.

Se ha propuesto que la liofilización reduce o inhibe la degradación del ingrediente activo mediante la eliminación de componentes disolventes en una formulación a niveles en los que ya no soportan las reacciones químicas o el crecimiento biológico. Adicionalmente, se cree que la eliminación del disolvente reduce la movilidad molecular, reduciendo el potencial para la reacción de degradación. Además, es deseable para cristalizar excipientes (por ejemplo, aminoácidos y sales), que son comúnmente utilizados en los productos liofilizados, para cristalizar de la forma más completa posible durante la congelación a fin de proporcionar una matriz sólida para soportar la estructura de la torta. Sin embargo, diversos intentos anteriores para liofilizar formulaciones farmacéuticas acuosas no han logrado grados satisfactorios de cristalización. Por ejemplo, las diversas etapas de congelación y/o tratamiento térmico ("annealing") de un protocolo habitual de liofilización han demostrado ser ineficaces para promover la cristalización. Además, se ha sugerido que la presencia de ciertos excipientes de cristalización (por ejemplo, alanina y cloruro de sodio) puede inhibir o reducir la cristalización de cualquier excipiente, limitando también de esta manera el grado de la cristalización.

Si bien se han hecho varios intentos para liofilizar formulaciones farmacéuticas acuosas, sigue existiendo la necesidad de disponer de procedimientos eficaces de liofilización y composiciones preparadas a partir de los mismos.

35 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento de liofilización de una composición que comprende antitrombina-III (AT III) y, como mínimo, un excipiente de cristalización seleccionado del grupo que consiste en alanina, manitol, glicina y NaCl. El procedimiento comprende:

- (a) exponer la composición a una primera temperatura de aproximadamente -48 °C o menos
- (b) mantener la temperatura de la composición a aproximadamente -48 °C o menos durante un periodo de tiempo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 horas antes de la liofilización.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento de liofilización de una composición líquida que comprende AT III derivada de plasma, NaCl y alanina. El procedimiento comprende:

- (a) exponer la composición a aproximadamente 54 °C o menos de manera que la temperatura de la composición es aproximadamente de 48 °C o menos durante aproximadamente 5 horas o más, a fin de proporcionar una primera composición que tiene uno o más componentes en la misma completamente o casi completamente cristalizados, y
- (b) secar la primera composición para obtener una torta liofilizada.

La presente invención da a conocer composiciones que incluyen tortas liofilizadas preparadas según los procedimientos que se describen en el presente documento.

La presente invención también da a conocer un kit que comprende una o más de las composiciones y/o las tortas liofilizadas preparadas según los procedimientos que se describen en el presente documento.

60 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- Figura 1. Termograma de DSC durante la congelación y el calentamiento de la disolución de NaCl (0,15 M).
- Figura 2. Termogramas de DSC durante la congelación (A) y el calentamiento (B) de la disolución de alanina (0,1 M).
- Figura 3. Termogramas de DSC durante la congelación (A) y el calentamiento (B) de AT III reconstituida.
- Figura 4. Condiciones óptimas de cristalización obtenidas mediante el análisis DOE.

Figura 5. A. Cambio de la capacidad calorífica (Cp) durante la congelación y el tratamiento térmico mediante el ciclo ETP-5807. B. Cambio de Cp durante la primera congelación. C. Cambio de Cp durante el tratamiento térmico. D. Cambio de Cp durante la segunda congelación.

Figura 6. Cambio del flujo de calor con la temperatura mediante el ciclo ETP-5807. Se determinó que el calor de fusión para el pico de fusión era de 5,5 J/g.

Figura 7. A. Cambio de Cp durante la congelación y el tratamiento térmico por ampliación del tiempo de retención de la congelación a 5 horas. B. cambio de Cp durante la primera congelación. C. Cambio de Cp durante la rampa de calentamiento de -52 °C a -30 °C. D. Cambio de Cp durante el tratamiento térmico. E. Cambio de Cp durante la segunda congelación.

Figura 8. Cambio del flujo de calor con la temperatura por ampliación del tiempo de retención de la congelación de 2 horas a 5 horas. Se determinó que el calor de fusión para el pico de fusión era de 6,4 J/g.

Figura 9. Perfil de liofilización de AT III mediante el ciclo ETP-5807 llevado a cabo la unidad LyoStar II FTS.

Figura 10. Datos de temperatura del producto durante la congelación mediante el ciclo ETP-5807 en la unidad FTS.

Figura 11. Perfil de liofilización de AT III cuando se congeló a -54 °C durante 2 horas.

Figura 12. Datos de temperatura del producto cuando se congeló a -54 °C durante 2 horas.

Figura 13. Perfil de liofilización de AT III cuando se congeló a -54 °C durante 6 horas en la unidad FTS.

Figura 14. Datos de temperatura del producto cuando se congeló a -54 °C durante 6 horas en la unidad FTS.

Figura 15. Perfil de liofilización de AT III cuando se congeló a -50 °C durante 6 horas en la unidad FTS.

Figura 16. Datos de temperatura del producto cuando se congeló a -50 °C durante 6 horas en la unidad FTS.

Figura 17. Perfil de liofilización de AT III cuando se congeló a -60 °C durante 6 horas en Usifroid.

Figura 18. Datos de temperatura del producto cuando ATIII se congeló a -60 °C durante 6 horas en Usifroid.

Figura 19. Perfil de liofilización de AT III cuando se congeló a -52 °C durante 15 hrs.

Figura 20. Datos de temperatura del producto cuando se congeló a -52 °C durante 15 hrs.

Figura 21. Micrografía electrónica de barrido de las tortas (aumento de 200 veces). Las barras de escala equivalen a 100 µm. A: una torta colapsada. B: una torta sólida.

Figura 22. Micrografía electrónica de barrido de NaCl. Aumento de 200 veces en el lado izquierdo y de 1500 veces en el lado derecho. La barra de escala equivale a 100 µm (A) y 10 µm (B).

Figura 23. Micrografía electrónica de barrido de alanina. Aumento de 50 veces en el lado izquierdo y de 200 veces en el lado derecho. La barra de escala equivale a 500 µm (A) y 100 µm (B).

Figura 24. Patrones de difracción de rayos X (DRX) en polvo utilizando un difractómetro para NaCl, alanina, ETP 5807 (torta colapsada) y material del segundo experimento de ETP 5807 (torta sólida).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer el descubrimiento sorprendente de que una etapa de congelación a baja temperatura única antes del secado es suficiente para inducir la cristalización de excipientes cristalizables en formulaciones que comprenden un ingrediente activo, y, por lo tanto, los procedimientos de la presente invención proporcionan cristalización robusta de excipientes a la vez que proporcionan un protocolo de liofilización más eficiente, práctico y/o robusto. Los procedimientos de la presente invención permiten un grado mayor de agentes de carga cristalina en relación a los procedimientos anteriores, mientras se mantienen la estabilidad y la actividad del ingrediente activo presente en las formulaciones.

En un aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento de liofilización de una composición que comprende antitrombina-III (AT III) y, como mínimo, un excipiente de cristalización se selecciona del grupo de alanina, manitol, glicina y NaCl. El procedimiento comprende:

(a) exponer la composición a una primera temperatura de aproximadamente -48 °C o menos

(b) mantener la temperatura de la composición a aproximadamente -48 °C o menos durante un periodo de tiempo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 h antes de la liofilización.

La composición puede ser un líquido o una composición semilíquida. Por ejemplo, la composición puede ser una disolución o suspensión farmacéutica acuosa que comprende, como mínimo, un ingrediente activo y, como mínimo, un excipiente de cristalización.

En una realización, la composición es una formulación líquida, preferentemente una disolución acuosa. En otra realización, la composición es adecuada para uso farmacéutico, por ejemplo una composición farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición es una composición farmacéutica que comprende antitrombina-III (AT III) y, como mínimo, un excipiente de cristalización se selecciona del grupo que consiste en alanina, manitol, glicina y NaCl y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos y similares, que son fisiológicamente compatibles. El tipo de vehículo se puede seleccionar en base a la vía de administración prevista. En algunas realizaciones, el vehículo es adecuado para la administración, sin constituir limitación, por vía intravenosa, por inhalación, parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracelular, intracelular,

intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o por medios transdérmicos. Entre los vehículos farmacéuticamente aceptables se incluyen, sin constituir limitación, disoluciones o dispersiones acuosas estériles para la preparación de disoluciones o dispersiones inyectables estériles.

Ingrediente activo

En algunas realizaciones, el, como mínimo, un ingrediente activo es antitrombina-III (AT III). En otras realizaciones, la composición comprende sólo un ingrediente activo, en el que el ingrediente activo es AT III. En otra realización, AT III es el único ingrediente activo en la composición, sin embargo, la composición comprende otras proteínas, incluyendo proteínas que no son AT III y/o formas inactivas de AT III. Por ejemplo, la AT III funcional puede ser un porcentaje del contenido de proteína total de la composición.

El término "AT III", tal como se utiliza en el presente documento, se utiliza en un sentido amplio a menos que se indique específicamente lo contrario. Por ejemplo, el término se refiere a todos los polimorfos de origen natural de AT III. El término también incluye fragmentos funcionales de AT III, proteínas quiméricas que comprenden AT III o fragmentos funcionales de la misma, homólogos obtenidos por sustitución análoga de uno o más aminoácidos de AT III y especies homólogas. El término también se refiere a todos los polipéptidos de AT III que son un producto de la tecnología del ADN recombinante, incluyendo una AT III que es un producto de la tecnología transgénica. Por ejemplo, el gen que codifica la AT III se puede insertar en un gen de mamífero que codifica una proteína de suero de leche de manera que la secuencia de ADN se expresa en la glándula mamaria, tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. No. 5.322.775 la cual da a conocer un procedimiento para producir un compuesto proteínico. El término también se refiere a todas las proteínas de AT III sintetizadas químicamente mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, la síntesis de péptidos en fase sólida. El término también se refiere a la AT III preparada a partir de plasma. El término también se refiere a la AT III que puede obtenerse comercialmente. La AT III puede corresponder a una AT III humana o no humana.

En una realización, la AT III es AT III derivada de plasma. En otra realización, la AT III se prepara a partir de una pasta de fracción de plasma. En otras realizaciones, la AT III se prepara a partir de una fracción de plasma sin albúmina o de una fracción de preparación de AT III prepurificada. La Patente de EE.UU. No. 5.561.115 de Tenold da a conocer un procedimiento de preparación de AT III a partir de suero o plasma.

En otras realizaciones, la AT III es AT III recombinante. La producción de proteínas recombinantes, incluyendo AT III recombinante, se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.517.294, 4.632.981, 4.873.316, 5.420.252, 5.618.713, 5.700.663, 5.843.705, 6.441.145, 6.878.813, 7.019.193, en Fan y otros, JBC, 268:17588 (1993), Garone y otros, Biochemistry, 35:8881 (1996), la publicación de solicitud de Patente internacional No. WO02/02793, las solicitudes de Patentes en EE.UU. Nos. US2003/096974 y US2006/0024793, y Gillespie y otros, JBC, 266:3995 (1991), en las cuales se da a conocer la preparación de proteínas recombinantes, incluyendo AT III recombinante.

En una realización, la composición está caracterizada por que comprende una AT III que tiene una pureza superior al 90%. En otras realizaciones, la AT III tiene una pureza superior al 95%, preferentemente, como mínimo, aproximadamente de un 99%. En algunas realizaciones, como mínimo, aproximadamente un 50%, de forma ilustrativa, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 60% a aproximadamente un 90%, de aproximadamente un 70% a aproximadamente un 80%, de toda la AT III en la composición es AT III activa.

En otras realizaciones, la composición a ser liofilizada comprende, como mínimo, aproximadamente 0,1 mg/ml de AT III, de forma ilustrativa, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg/ml y de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg/ml de AT III, en la que la AT III es una fracción o la totalidad de la proteína total presente en la composición.

En una realización, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de AT III. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado terapéutico deseado, tal como por ejemplo, la anticoagulación asociada con la deficiencia hereditaria de antitrombina. Una cantidad terapéuticamente eficaz de AT III puede variar en función de factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y de la capacidad de AT III para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede ser aquella en la que se ve compensado cualquier efecto tóxico o perjudicial de AT III por los efectos terapéuticos beneficiosos.

En otras realizaciones, la composición comprende una cantidad profilácticamente eficaz de AT III. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado profiláctico deseado, tal como por ejemplo, la prevención o inhibición de episodios

tromboembólicos en individuos que han tenido episodios tromboembólicos múltiples, o pacientes que corren el riesgo de presentar nuevos episodios. Una cantidad profilácticamente eficaz se puede determinar tal como se ha descrito anteriormente para la cantidad terapéuticamente eficaz.

5 Excipiente de cristalización

En una realización, el, como mínimo, un excipiente de cristalización se selecciona del grupo que consiste en alanina, manitol, glicina y NaCl.

10 En algunas realizaciones, el, como mínimo, un excipiente de cristalización seleccionado del grupo que consiste en alanina, manitol, glicina y NaCl, está presente en la composición en una cantidad total de excipiente de cristalización, como mínimo, de aproximadamente un 0,01% (p/v), de forma ilustrativa, de aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 10%, de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 5% y de aproximadamente un 0,7% a aproximadamente un 1,8% (p/v).

15 En otras realizaciones, el producto liofilizado comprende, como mínimo, aproximadamente un 20% (p/v) de excipiente de cristalización total, seleccionado del grupo que consiste en alanina, manitol, glicina y NaCl, de forma ilustrativa, de aproximadamente un 20 a aproximadamente un 80%, de aproximadamente un 30 a aproximadamente un 70% y de aproximadamente un 36 a aproximadamente un 60% (p/v) de excipiente de cristalización total.

20 En algunas realizaciones, el, como mínimo, un excipiente de cristalización es alanina y NaCl. En una realización, el NaCl está presente en una cantidad de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 300 mM, preferentemente de aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 250 mM. En una realización, el propio cloruro de sodio se puede utilizar sin ninguno de los excipientes de cristalización mencionados anteriormente, en cuyo caso se puede incluir en la formulación en una cantidad de aproximadamente 300 mM o superior. En otras realizaciones, la composición (por ejemplo, formulación farmacéutica acuosa) es una disolución hipertónica.

Además de antitrombina-III (AT III) y del, como mínimo, un excipiente de cristalización seleccionado del grupo que consiste en alanina, manitol, glicina y NaCl, la composición también puede comprender uno o más excipientes diferentes, es decir, una o más de otras sustancias utilizadas en combinación con el ingrediente activo para constituir la composición. Algunos ejemplos no limitativos del excipiente o excipientes diferentes incluyen agentes estabilizantes, agentes de tampón, cationes divalentes (por ejemplo, sales de calcio), aglutinantes, lubricantes, disgregantes, diluyentes, colorantes, saborizantes, agentes de deslizamiento, agentes tensioactivos, absorbentes y agentes edulcorantes.

35 Las combinaciones de ingredientes activos y excipientes según la presente invención pueden proporcionar estabilidad de la antitrombina-III (AT III) en preparaciones liofilizadas, sin embargo, las composiciones de la presente invención también pueden mostrar un grado de estabilidad también en estado líquido o semilíquido.

40 En otras realizaciones, la composición comprende además un agente estabilizante. Por ejemplo, el agente estabilizante se puede seleccionar del grupo que consiste en sacarosa, manitol y trehalosa. Antes de la liofilización, los agentes estabilizantes pueden estar presentes en la composición en una cantidad total de agente estabilizante, como mínimo, de aproximadamente un 1%, de forma ilustrativa, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 4% y de aproximadamente un 2% a aproximadamente un 3%. En algunas realizaciones, el agente estabilizante está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente un 2%.

También puede estar presente un tampón en las composiciones de la presente invención, en particular cuando el ingrediente activo es susceptible de ser afectado negativamente por los cambios de pH durante la liofilización. El pH debe mantenerse preferentemente en el intervalo aproximadamente de 6 a 8 durante la liofilización, y más preferentemente a un pH de aproximadamente de 7. El agente tampón puede ser cualquier entidad química fisiológicamente aceptable o una combinación de entidades químicas que tienen la capacidad de actuar como tampones, incluyendo pero sin constituir limitación, tampón fosfato, tampón citrato, tampón acetato, tampón ácido cítrico/fosfato, histidina, tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris), 1, 3-bis-[tris-(hidroxi-metil) metilamino] - propano (Bis-Tris propano), piperazina-N, N'-bis-(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS), ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) y ácido N-2-acetamido-2-aminoetanosulfónico (ACES).

50 En una realización, el agente tampón se incluye en la composición en una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM. Cuando se añade histidina a las composiciones, se pueden utilizar concentraciones, como mínimo, de aproximadamente 20 mM, preferentemente de aproximadamente 25 mM, sola o en combinación con otros tampones, tales como Tris.

55 En otras realizaciones, la composición comprende además un catión divalente, por ejemplo una sal de calcio. En una realización, la sal de calcio está presente en una cantidad de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 5 mM.

En una realización, la composición comprende además un agente tensioactivo. El agente tensioactivo puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1% o menos. Entre los ejemplos no limitativos de tensioactivos se incluyen polisorbato 20 (por ejemplo, Tween® 20), polisorbato 80 (por ejemplo, Tween® 80), éster ácido graso de sorbitán polioxietileno (80), polioles plurónicos (por ejemplo, F-38, F -68) y éteres dodecil polioxietilenglicol (por ejemplo, Brij-35).

La composición también puede comprender un antioxidante. El antioxidante puede estar presente en la composición en una cantidad total, como mínimo, de 0,05 mg/ml, de forma ilustrativa, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/ml y de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/ml. Entre los ejemplos no limitativos de antioxidantes se incluyen N-Acetil-L-Cisteína / Homocisteína, glutatión, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 - tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), ácido lipoico, metionina, tiosulfato de sodio, platino, glicina-glicina-histidina (tripéptido) y hidroxitolueno butilado (BHT). En algunas realizaciones, la composición comprende además glutatión en una cantidad de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml.

Las composiciones de la presente invención también pueden comprender calcio u otro catión divalente, en particular cuando el catión proporciona interacción con el ingrediente activo para mantener su actividad. En una realización, la composición comprende además un catión divalente. En otra realización, el catión divalente es proporcionado como una sal de calcio, por ejemplo cloruro de calcio, pero también pueden ser otras sales de calcio tales como gluconato de calcio, glubionato de cálcico o gluceptato de calcio. En algunas realizaciones, la sal de calcio está presente en una cantidad de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 5 mM. En otras realizaciones, la sal de calcio está presente en una cantidad de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 4 mM, preferentemente aproximadamente 4 mM.

En algunas realizaciones, la combinación de histidina y glutatión puede producir efectos sinérgicos beneficiosos sobre la estabilidad de un ingrediente activo en particular presente en una composición. Por ejemplo, la histidina, si bien actúa como un tampón, también puede actuar como un agente quelante de metal. En la medida en que el nivel de actividad del ingrediente activo se cree que está afectado por oxidación inducida por metales, por ejemplo, la histidina puede actuar, por lo tanto, para estabilizar la unión mediante oxidación de los iones metálicos. Se cree que mediante la unión a estos metales, el glutatión (o cualquier otro antioxidante presente) es capaz, de esta manera, de proporcionar una protección antioxidante adicional, ya que el efecto oxidante de los iones metálicos unidos a la histidina ha sido detenido. También pueden incluirse otros agentes quelantes en las composiciones / formulaciones de la presente invención. Dichos agentes quelantes se unen preferentemente a metales tales como cobre y hierro con mayor afinidad que al calcio, por ejemplo, cuando se está utilizando una sal de calcio en la composición. Un ejemplo de dicho agente quelante es deferoxamina, que es un agente quelante que facilita la eliminación de Al^{++} y hierro.

Liofilización

Generalmente, las temperaturas específicas y/o intervalos de temperatura de un procedimiento de liofilización se refieren a la temperatura de la bandeja del equipo liofilizador, a menos que se indique lo contrario. La temperatura de la bandeja se refiere a la temperatura de control para el refrigerante que fluye a través de las bandejas del liofilizador, que es habitualmente lo que se controla en términos de temperatura durante la liofilización. La temperatura de la muestra (es decir, la temperatura del producto) depende de la temperatura de la bandeja, la presión de la cámara y/o la velocidad de evaporación / sublimación durante el secado primario (el enfriamiento por evaporación hace que las temperaturas del producto sean inferiores a la temperatura de la bandeja).

A. Congelación

En una realización, la primera temperatura es aproximadamente de -48 °C o menos. En otra realización, la primera temperatura es aproximadamente de -54 °C o menos. En otras realizaciones, el período de tiempo es de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 horas y de aproximadamente 6 a aproximadamente 7 horas. En una realización, el período de tiempo es aproximadamente de 6 horas.

La temperatura y el período de tiempo pueden depender de factores tales como el volumen de la disolución por vial, independiente de la composición a ser liofilizada.

La presente invención se refiere en ocasiones al objetivo de cristalización del excipiente completa o de un 100%, y un experto en la materia entiende que la "cristalización completa" puede ser difícil de verificar, en particular, cuando la sensibilidad de la tecnología no puede informar con absoluta certeza de que un excipiente está completamente o un 100% cristalizado. Por lo tanto, en términos prácticos, la presente invención da a conocer procedimientos de liofilización que, como mínimo, mejoran la cristalización del excipiente (seleccionado del grupo que consiste en alanina, manitol, glicina y NaCl) en relación a los procedimientos anteriores. Por consiguiente, tal como se utiliza en el presente documento, productos "completamente cristalizados" se pueden evaluar, por ejemplo, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), en la que un experto en la materia reconoce que un evento exotérmico no

reversible en un primer barrido representa un evento de cristalización, que indica que un excipiente de cristalización no cristalizó completamente durante la liofilización. En algunas realizaciones, el, como mínimo, un excipiente de cristalización está parcialmente cristalizado, en el que parcialmente cristalizado está caracterizado por que presenta un grado de cristalización de aproximadamente un 50% o más, de forma ilustrativa, como mínimo, de aproximadamente un 50%, como mínimo, de aproximadamente un 60%, como mínimo, de aproximadamente un 70%, como mínimo, de aproximadamente un 80%, como mínimo, de aproximadamente un 90%, como mínimo, de aproximadamente un 95%, como mínimo, de aproximadamente un 96%, como mínimo, de aproximadamente un 97%, como mínimo, de aproximadamente un 98%, como mínimo, de aproximadamente un 99%, como mínimo, de aproximadamente un 99,5%, como mínimo, de aproximadamente un 99,8% e inferior a un 100%.

B. Tratamiento térmico ("annealing")

En otras realizaciones, el procedimiento comprende además exponer la primera composición a una segunda temperatura durante un segundo período de tiempo para obtener una segunda composición, en el que la segunda temperatura es superior a la primera temperatura.

En una realización, la segunda temperatura es, como mínimo, de 5 °C superior a la primera temperatura, de forma ilustrativa, de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 30 °C y de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C superior a la primera temperatura. Por ejemplo, en el que la primera temperatura es de aproximadamente -50 °C, en algunas realizaciones, la segunda temperatura es de aproximadamente -30 °C.

En algunas realizaciones, el segundo período de tiempo es, como mínimo, de 10 minutos, de forma ilustrativa, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6 horas y de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas. En otras realizaciones, el segundo período de tiempo es inferior, mayor o aproximadamente igual al primer período de tiempo.

Sin estar sostenido por ninguna teoría en particular, se cree que dichas etapas del tratamiento térmico pueden ayudar a mejorar las velocidades de sublimación y/o disminuir la heterogeneidad intralote en dependencia de las condiciones y de la composición en particular.

En algunas realizaciones, una etapa de tratamiento térmico es opcional.

En otras realizaciones, tras el segundo período de tiempo, la segunda composición se expone a una tercera temperatura durante un tercer período de tiempo, en el que la tercera temperatura es inferior a la segunda temperatura. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la tercera temperatura es aproximadamente la misma que la primera temperatura. En otras realizaciones, la tercera temperatura es, como mínimo, de 5 °C inferior a la segunda temperatura, de forma ilustrativa, de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 30 °C y de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C inferior a la segunda temperatura. Por ejemplo, cuando la segunda temperatura es aproximadamente de -30 °C, en algunas realizaciones, la segunda temperatura es aproximadamente de -50 °C.

En algunas realizaciones, la presente invención da a conocer un procedimiento de liofilización de una composición que comprende antitrombina-III (AT III) y, como mínimo, un excipiente de cristalización seleccionado del grupo de alanina, manitol, glicina y NaCl. El procedimiento comprende:

- (a) exponer la composición a una primera temperatura de aproximadamente -48°C o menos durante un primer periodo de tiempo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 h, suficiente para obtener una primera composición que tiene el, como mínimo, un excipiente de cristalización parcial o completamente cristalizado;
- (b) exponer la primera composición a una segunda temperatura durante un segundo período de tiempo para obtener una segunda composición, en el que la segunda temperatura es superior a la primera temperatura; y
- (c) exponer la segunda composición a una tercera temperatura durante un tercer período de tiempo para obtener una tercera composición, en el que la tercera temperatura es inferior a la segunda temperatura.

En una realización, el período de tiempo es, como mínimo, de aproximadamente 30 minutos, de forma ilustrativa, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 20 horas, de aproximadamente 1 a aproximadamente 18 horas, de aproximadamente 2 a aproximadamente 16 horas, de aproximadamente 3 a aproximadamente 14 horas, de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 horas y de aproximadamente 6 a aproximadamente 7 horas. En otra realización, el período de tiempo es de aproximadamente 6 horas. En otras realizaciones, el período de tiempo es de aproximadamente 3 horas. En otras realizaciones, el tercer período de tiempo es inferior, superior o aproximadamente igual al primer período de tiempo. En otras realizaciones adicionales, las condiciones (por ejemplo, temperatura y tiempo) en la etapa (a) y (b) son las mismas o sustancialmente las mismas.

C. Secado

En otras realizaciones, los procedimientos de la presente invención comprenden además una fase de secado. La fase de secado puede comprender una fase de secado primario y una fase de secado secundario.

En consecuencia, en algunas realizaciones, la presente invención da a conocer un procedimiento para liofilizar una composición que comprende antitrombina-III (AT III) y, como mínimo, un excipiente de cristalización seleccionado del grupo que consiste en alanina, manitol, glicina y NaCl. El procedimiento comprende:

- (a) exponer la composición a una primera temperatura de aproximadamente -48°C o menos durante un primer período de tiempo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 h, suficiente para obtener una primera composición que tiene el, como mínimo, un excipiente de cristalización parcial o completamente cristalizado; y
- (b) secar la primera composición para formar una torta liofilizada

En otras realizaciones, la presente invención da a conocer un procedimiento para liofilizar una composición que comprende antitrombina-III (AT III) y, como mínimo, un excipiente de cristalización seleccionado del grupo que consiste en alanina, manitol, glicina y NaCl, comprendiendo el procedimiento:

- (a) exponer la composición a una primera temperatura de aproximadamente -48°C o menos durante un primer período de tiempo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 h, suficiente para obtener una primera composición que tiene el, como mínimo, un excipiente de cristalización parcial o completamente cristalizado;
- (b) exponer la primera composición a una segunda temperatura durante un segundo período de tiempo para obtener una segunda composición, en el que la segunda temperatura es superior a la primera temperatura;
- (c) exponer la segunda composición a una tercera temperatura durante un tercer período de tiempo para obtener una tercera composición, en el que la tercera temperatura es inferior a la segunda temperatura; y
- (d) secar la tercera composición para formar una torta liofilizada.

En una realización, el secado comprende una etapa de secado primario. El secado primario puede eliminar el agua congelada (sublimación del hielo). Preferentemente, el hielo no unido o de fácil eliminación se elimina de la muestra mediante el secado primario. El agua no unida al comienzo de la etapa de secado primario puede estar preferentemente en forma de hielo libre, que puede ser eliminado por sublimación, es decir, convirtiéndolo directamente de un sólido a un vapor.

En algunas realizaciones, la etapa de secado primario se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente -35°C a aproximadamente 20°C , o de aproximadamente -25°C a aproximadamente 10°C , o de aproximadamente -20°C a aproximadamente 0°C . En una realización, la etapa de secado primario se lleva a cabo a aproximadamente 0°C . En otras realizaciones, la etapa de secado primario puede llevarse a cabo durante un tiempo total, como mínimo, de aproximadamente 1 hora, de forma ilustrativa, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 4 días y de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 40 horas. En otra realización, la etapa de secado primario comprende el secado de la primera o la tercera composición bajo una presión de aproximadamente 0 a aproximadamente 200 mTorr, preferentemente de aproximadamente 100 mTorr, a una temperatura de aproximadamente -50°C durante aproximadamente 1 hora, seguido por 0°C durante aproximadamente 35 horas.

Se puede llevar a cabo una etapa opcional de "rampa de secado primario" (es decir, el aumento de la temperatura de la etapa antes del secado primario a la temperatura de secado primario) de conformidad con los procedimientos de la presente invención a una velocidad de aproximadamente $0,1^{\circ}\text{C}$ a aproximadamente 10°C por minuto.

La etapa de secado primario se puede llevar a cabo durante un tiempo suficiente para asegurar que sustancialmente toda el agua congelada se elimina de la muestra. Un experto en la materia entiende que el tiempo de secado primario varía con la configuración, en la que la duración del secado primario puede depender del volumen de llenado y la geometría (área de superficie de la torta - resistencia/flujo). En una realización, la duración del secado primario es, como mínimo, de aproximadamente 5 horas, de forma ilustrativa, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 100 horas, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 80 horas, de aproximadamente 30 horas a aproximadamente 60 horas y de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 horas.

El secado primario puede ser controlado mediante varios métodos que incluyen la observación de los cambios en la temperatura del producto durante la liofilización. Otro método es observar los cambios en la presión de la cámara, en el que cuando termina la sublimación, no hay más moléculas de agua en la cámara contribuyendo a los cambios en la presión. El final de la etapa de secado primario se puede determinar que es cuando la temperatura del producto (muestra) se aproxima a la temperatura de la bandeja, por ejemplo, evidenciado por un cambio significativo en la pendiente de la recta de temperatura del producto debido a una velocidad de sublimación reducida; cuando termina la sublimación, termina el enfriamiento por evaporación. Para evitar una terminación prematura, en algunas realizaciones, se puede añadir un extra de 2 a 3 horas a la duración del secado primario. Otro método para controlar la terminación del secado primario es la prueba de aumento de presión, en la que mediante la desconexión de la fuente de vacío, la presión de la cámara debe aumentar a una velocidad en función de la cantidad de humedad en el

producto. En una realización, el final de la etapa de secado primario se puede establecer que es cuando la velocidad del aumento de presión está por debajo de un valor especificado. Otro método para determinar el final de la etapa de secado primario es la medición de la velocidad de transferencia de calor.

5 En otras realizaciones, directamente antes del secado primario, la composición se puede colocar al vacío a la temperatura de la etapa directamente antes del secado primario. Una vez iniciado, el vacío puede estar presente durante el resto del proceso de liofilización, aunque el nivel de vacío puede cambiar.

10 Más información sobre el secado durante la liofilización se puede encontrar en Carpenter, JF y Chang, BS, *Lyophilization of Protein Pharmaceuticals, Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation*, KE Avis y VL Wu, eds. (Buffalo Grove, IL Interpharm Press, Inc.) (1996), por su enseñanza del secado.

15 En una realización, el secado comprende además una o más etapas de secado secundario para reducir los niveles de humedad, preferentemente a niveles que proporcionan una característica biológica y/o estructural deseada del producto final.

20 En algunas realizaciones, cada una de las una o más etapas de secado secundario se llevan a cabo a una temperatura que es de aproximadamente 0 °C o superior, de forma ilustrativa, de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 100 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 90 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 80 °C, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C y de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C. En una realización, la etapa de secado secundario comprende una primera, una segunda y una tercera etapa de secado secundario llevadas a cabo a aproximadamente 40 °C, a aproximadamente 45 °C y a aproximadamente 50 °C, respectivamente. En una
25 realización, la etapa de secado secundario comprende una temperatura de aproximadamente 35 °C durante un período de tiempo de aproximadamente 16 horas.

30 La etapa del aumento de la temperatura a las una o más etapas de secado secundario se denomina en el presente documento como la "rampa de secado secundario", que puede ser opcional. La rampa de secado secundario se puede llevar a cabo a una velocidad de aumento de la temperatura de aproximadamente 0,1 °C a aproximadamente 10 °C por minuto.

35 Cada una de las una o más etapas de secado secundario se puede llevar a cabo durante un tiempo suficiente para reducir el nivel de humedad residual en el producto liofilizado hasta un nivel final. En algunas realizaciones, el nivel final de humedad residual es de aproximadamente un 10% o menos, de forma ilustrativa, de aproximadamente un 9% o menos, de aproximadamente un 8% o menos, de aproximadamente un 7% o menos, de aproximadamente un 6% o menos, de aproximadamente un 5% o menos, de aproximadamente un 4 % o menos, de aproximadamente un 3% o menos, de aproximadamente un 2% o menos, de aproximadamente un 1% o menos, de aproximadamente un 0,8% o menos, de aproximadamente un 0,6% o menos, de aproximadamente un 0,5% o menos, de aproximadamente un 0,2% o menos, y de aproximadamente un 0,1% o menos.

40 En una realización, la etapa de secado secundario se lleva a cabo a aproximadamente 35 °C. En otras realizaciones, la etapa de secado secundario se puede llevar a cabo durante un tiempo total, como mínimo, de aproximadamente 1 hora, de forma ilustrativa, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 4 días y de aproximadamente 16 horas a aproximadamente 40 horas. En otra realización, la etapa de secado secundario comprende secar bajo una presión de aproximadamente 0 a aproximadamente 200 mTorr, preferentemente de aproximadamente 100 mTorr, a una temperatura de aproximadamente 35 °C durante aproximadamente 16 horas.

45 Para determinar el nivel de humedad residual en una muestra, se puede utilizar, por ejemplo, el método de Karl Fischer. Además, se puede utilizar la prueba de aumento de la presión o la medición de la velocidad de transferencia de calor para determinar el final de cada una de las una o más etapas de secado secundario. De forma alternativa, también se puede utilizar un higrómetro electrónico o un analizador de gas residual. Además, se puede determinar la duración mínima de las una o más etapas de secado secundario utilizando diferentes combinaciones de temperaturas de la bandeja y duraciones (en la que la temperatura de la bandeja de las una o más etapas de secado secundario es la misma o inferior que la temperatura utilizada en la etapa de alta temperatura). El contenido de
50 humedad residual se puede determinar mediante varios métodos, incluyendo la pérdida-en-secado, la valoración de Karl Fischer, análisis termogravimétrico (TGA), cromatografía de gases (GC) o espectroscopia infrarroja.

55 Sin estar sostenido por ninguna teoría en particular, se cree que durante la liofilización, la antitrombina-III (AT III) pasa de estar en una fase acuosa a estar en una fase amorfa sólida, que se piensa que protege el ingrediente activo de la inestabilidad química y/o conformacional. La preparación liofilizada no sólo contiene una fase amorfa, sino que también incluye un componente que cristaliza durante la liofilización. Éste puede proporcionar la liofilización de la antitrombina-III (AT III) y la formación de una torta más elegante (por ejemplo, una torta con una contracción mínima de los lados del recipiente en el que se liofilizó).

60

En una realización, la torta liofilizada se caracteriza por estar menos de un 50% colapsada. En otra realización, la torta liofilizada se caracteriza por estar aproximadamente de un 0% a aproximadamente un 24% colapsada.

La presente invención da a conocer un procedimiento de liofilización de una formulación farmacéutica acuosa que comprende AT III, comprendiendo el procedimiento:

(a) exponer la formulación a una temperatura inferior a aproximadamente -45 °C durante un período de tiempo suficiente para obtener una primera composición que tiene, como mínimo, un excipiente de cristalización parcial o completamente cristalizado; y

(b) secar la primera composición para formar una torta liofilizada.

La presente invención también da a conocer un procedimiento de liofilización de una formulación farmacéutica acuosa que comprende AT III, comprendiendo el procedimiento:

(a) exponer la formulación a una temperatura de congelación inferior a aproximadamente -50 °C durante un período de tiempo suficiente para obtener una primera composición que tiene, como mínimo, un excipiente de cristalización parcial o completamente cristalizado; y

(b) secar la primera composición para formar una torta liofilizada. En algunas realizaciones, el procedimiento, opcionalmente, comprende además una etapa de tratamiento térmico en la que la formulación se expone a una temperatura de tratamiento térmico que está por encima de la temperatura de congelación.

La presente invención da a conocer un procedimiento de liofilización de una formulación farmacéutica acuosa que comprende AT III, comprendiendo el procedimiento:

(a) exponer la formulación a una temperatura inferior a aproximadamente -60 °C durante un período de tiempo suficiente para obtener una primera composición que tiene, como mínimo, un excipiente de cristalización parcial o completamente cristalizado; y

(b) secar la primera composición para formar una torta liofilizada.

También se dan a conocer composiciones (por ejemplo, composiciones y tortas farmacéuticas cristalizadas y/o liofilizadas) preparadas según los procedimientos de la presente invención.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención da a conocer una composición o torta de ATIII liofilizada preparada según la presente invención.

En otras realizaciones, los procedimientos de la presente invención proporcionan productos que, como mínimo, mantienen o sustancialmente mantienen la potencia del ingrediente o los ingredientes activos tras el almacenamiento del producto liofilizado. En una realización, la potencia del ingrediente o los ingredientes activos se mantiene o se mantiene sustancialmente después del almacenamiento del producto de liofilización aproximadamente a 5 °C, aproximadamente a 25 °C o aproximadamente a 40 °C durante aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3 o aproximadamente 6 o más meses. En otra realización, después del almacenamiento del producto liofilizado, la potencia del ingrediente activo, como mínimo, es de aproximadamente un: 70%, 80%, 90%, 95%, 99% y 100% con respecto a su potencia antes de la liofilización.

Kits

También se dan a conocer kits que comprenden las composiciones farmacéuticas de la presente invención, en el que el kit comprende además un componente seco y un componente líquido, en el que los componentes seco y líquido pueden estar presentes en recipientes por separado en el kit, o algunos de los componentes se pueden combinar en un recipiente, tal como un kit en el que los componentes secos están presentes en un primer recipiente y los componentes líquidos están presentes en un segundo recipiente, en el que los recipientes pueden o no estar presentes en una configuración combinada. Opcionalmente, los kits pueden incluir además un número de reactivos adicionales. Opcionalmente, los kits pueden incluir además instrucciones de uso de los componentes del kit incluyendo, por ejemplo, instrucciones para reconstituir la composición liofilizada con un diluyente apropiado. Las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un inserto del empaquetado, en el etiquetado del recipiente del kit o en componentes de los mismos.

La presente invención se ilustra con más detalle mediante ejemplos, pero hay que señalar que la invención no se limita a dichos ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Para determinar las condiciones de congelación que promueven la cristalización de los componentes en una disolución de AT III y mejoran la apariencia física del producto acabado, se llevó a cabo la liofilización en

formulaciones de AT III que contienen AT III derivada de plasma humano (6,88 mg/ml), alanina (100 mM) y NaCl (150 mM). Tanto la alanina como NaCl son excipientes cristalinos. Para esta formulación, la apariencia física puede estar directamente relacionada con la cristalinidad de los excipientes. Era deseable cristalizar NaCl y alanina tan completamente como sea posible durante la congelación, a fin de obtener una matriz sólida para soportar la estructura de la torta.

Calorimetría Diferencial de Barrido: se investigaron eventos térmicos de congelación-descongelación de la formulación de AT III con un calorímetro diferencial de barrido (Modelo 2920, TA Instruments, Inc., New Castle, DE). La constante de la temperatura y la celda de la DSC se calibraron de acuerdo con el procedimiento estándar utilizando indio de alta pureza. Se utilizó DSC modulada para estudiar el cambio del flujo de calor y de la capacidad calorífica (Cp) de los solutos congelados-concentrados al máximo. Los experimentos se llevaron a cabo con una amplitud de 0,5 °C en un período de 80 seg. La muestra, 20 microlitros, se selló en un molde hermético de aluminio y se escaneó en un intervalo de temperaturas bajo cero.

Eventos térmicos de la disolución reconstituida de NaCl, alanina y AT III: se han investigado eventos de cristalización y fusión en disolución reconstituida de NaCl, alanina y AT III.

Diseño Experimental de DSC mediante E-CHIP: se llevó a cabo un DOE diseñado por Echip para evaluar los efectos de la temperatura de congelación, el tiempo de retención de congelación y tiempo de retención de tratamiento térmico sobre la cristalización de los excipientes. La rampa de congelación (de 5 °C hasta la temperatura de congelación) se estableció como 2 °C / min. Después del tratamiento térmico, el producto se congeló desde -30 °C hasta la temperatura de congelación a 5 °C / min. La velocidad de la rampa de calentamiento se fijó como 1 °C/min.

Efecto de la velocidad de la rampa sobre la cristalización: se compararon diferentes velocidades de enfriamiento (2 °C/min frente a 0,2 °C/min) para investigar el efecto de la velocidad de la rampa sobre la cristalización. También se evaluaron diferentes velocidades de rampa durante el tratamiento térmico (5 °C/min frente a 0,2 °C/min, 1 °C/min frente a 0,2 °C/min).

Formación de la fase condensada: durante el proceso de superenfriamiento, se congelaron las conformaciones y configuraciones moleculares que están disponibles en la fase líquida, pero no en una fase sólida cristalina. Este proceso de "captura" de conformaciones y configuraciones durante el enfriamiento se produce cuando la velocidad de aumento de la viscosidad supera la velocidad de reorientación molecular. La "congelación" de los estados conformacionales dio como resultado una fase condensada que tendrá cierto grado de orden molecular de corto alcance pero, de forma similar al líquido, carecerá de las características de orden molecular de largo alcance de un sólido cristalino PI.

La formación de la fase condensada se observó por DSC modulada, donde la capacidad calorífica (Cp) de la fase amorfa congelada-concentrada disminuye continuamente hasta que se alcanza el equilibrio. Cp es una propiedad intrínseca y está directamente relacionada con la movilidad molecular. Una mayor Cp significa una mayor movilidad y una menor Cp indica una menor movilidad. Un material en estado líquido tiene un Cp mayor que su contraparte sólida. La disminución de Cp es debido a la transformación física de un material de un estado más fluido a un estado sólido.

Se controló Cp utilizando el protocolo de congelación y tratamiento térmico que se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Ciclo de liofilización de AT III para el primer experimento.

Etapa	Tiempo de rampa (Tiempo)	Temp de la bandeja (°C)		Tiempo de retención (min)	Presión (mTorr)	
	Objetivo	Objetivo	Intervalo	Objetivo	Objetivo	Intervalo
Carga	N/A	5	±3	Hasta que la carga se complete	Atmosférica	
Congelado	N/A	5	±3	120	Atmosférica	
	150	-25	±3	60	Atmosférica	
	240	-52	±3	120	Atmosférica	
Tratamiento térmico	90	-30	±3	60	Atmosférica	
	180	-52	±3	120	Atmosférica	
Evacuación	Hasta que la presión esté controlada	-52	±3	60	100	+50
Secado primario	240	0	±3	1920	100	±50
Secado secundario	180	35	±3	840	100	±50

La disolución se congeló de 0 a -52 °C y se mantuvo durante 120 minutos. A continuación, se calentó hasta -30 °C y se mantuvo durante 1 hora. Finalmente, el producto se congeló de nuevo a -52 °C durante otras 2 horas y, a continuación, se aumentó en rampa hasta 0 °C. La primera velocidad de congelación fue de 0,2 °C/min. Se evaluó también el efecto del tiempo de retención de la congelación (2 h, 5 h y 10 h) y la temperatura (-46 °C, -48 °C y -52 °C) sobre Cp.

Liofilización: la mayoría de los experimentos se realizaron en el sistema LyoStar II FTS (SP Industries). Algunos se llevaron a cabo en el liofilizador Minilyo (Usifroid). Las técnicas de congelación se enumeran en la tabla 2.

Tabla 2: Técnica de congelación

Técnica	Temperatura de congelación (°C)	Tiempo de retención de congelación (h)
1	-52	2
2	-54	2
3	-54	6
4	-50	6
5	-60	6
6	-52	15

Las técnicas 1 a 5 difieren en la temperatura de la bandeja y el tiempo de retención para la primera etapa de congelación. La segunda temperatura de congelación se fijó igual que la primera temperatura de congelación. Y el tiempo de retención para la segunda congelación fue de 2 horas. La técnica 6 especifica la condición de que el producto se congeló a -52 °C durante 2 horas, el tratamiento térmico fue a -30 °C durante 1 hora y se congeló de nuevo a -52 °C durante otras 15 horas. El tratamiento térmico, los secados primario y secundario fueron los mismos para todos los ciclos que se enumeran en la tabla 1.

Microscopio Electrónico de Barrido (SEM): se utilizó un SEM (Hitachi, Modelo S-3200, NCSU) para examinar la morfología de las tortas liofilizadas. Las imágenes de la muestra en las superficies o debajo de las superficies se muestran con una ampliación de 50 a 5.000 veces. Debido a que las tortas liofilizadas eran buenos aisladores eléctricos, se cargaron tras la exposición al haz de electrones. Esto dio lugar a pérdida de resolución. Para reducir los efectos de carga sobre en la exposición de las muestras al haz eléctrico, todas las muestras fueron recubiertas con una fina capa de oro mediante bombardeo iónico utilizando una mesa de trabajo Denton Vacuum. Se tomaron imágenes de una torta colapsada, una torta sólida, cristal de NaCl y cristal de alanina.

Difracción de rayos X en polvo: se aplicó difracción de rayos X (XRD) en polvo para caracterizar la cristalinidad de una torta colapsada (ETP 5807) y una torta sólida (ETP 5807 26N9540). Los patrones de XRD se registraron mediante un difractómetro (Rigaku, modelo Multiflex) con radiación de cobre Ka a 40 kV y 40 mA. Los barridos se realizaron en el intervalo 20 de 10° a 90°. La velocidad de barrido fue de 1°/min para la muestra de NaCl y 0,125°/min para la alanina, ETP 5807.

Resultados y Discusión:

El trabajo de DSC tuvo como objetivo caracterizar los factores críticos que gobiernan las propiedades de cristalización de los excipientes en la formulación de AT III. Se determinaron la temperatura de cristalización (Tx), la temperatura de fusión eutéctica (Te) y el porcentaje de cristalización.

Cristalización y fusión de la disolución de NaCl, alanina y AT III: para la disolución de NaCl puro, el pico de cristalización exotérmica ocurrió aproximadamente a -38 °C durante la congelación y el pico de fusión endotérmica apareció en -19 °C durante el calentamiento (figura 1). El calor de fusión para el pico de fusión se determinó que era de 7,4 J/g. El termograma de la disolución alanina mostró un pico exotérmico a -45 °C durante la congelación lo que indica cristalización. Sin embargo, durante el calentamiento, hubo un grupo de pequeños picos aproximadamente a -44 °C. El origen de estos picos fue difícil de determinar (figura 2).

Cuando se analizó la disolución de AT III reconstituida, no hubo evidencia de actividad exotérmica observada durante la congelación. Sin embargo, se observó un pico de fusión eutéctico a -22 °C, lo más probable debido al NaCl (figura 3). El calor de fusión (2,0 J/g) fue menor que el de la disolución de NaCl puro. La reducción en el calor de fusión se puede atribuir a la cristalización parcial de NaCl en la formulación de AT III. En base a esta correlación, se calculó el porcentaje de cristalización dividiendo el calor de fusión obtenido a partir de las formulaciones por una constante, 7,4 J/g, que es el calor de fusión de la disolución de NaCl puro.

Resultados del DOE: se llevó a cabo un DOE diseñado por ECHIP utilizando el modelo de cubo compuesto central para evaluar los efectos de la temperatura de congelación, el tiempo de retención de la congelación y tiempo de retención del tratamiento térmico en la cristalización de la disolución AT III (tabla 3).

Tabla 3: Perfil de cristalización.

Ensayo	Temperatura de congelación (°C)	Tiempo de retención de congelación (h)	Tiempo de retención de tratamiento térmico (h)	Área del pico de fusión eutéctico de NaCl (J/g)	Porcentaje de cristalización de NaCl (%)
1	-44	5	5	0	0
2	-60	5	5	1,47	19,9
3	-52	0	5	0	0
4	-52	10	5	5,45	73,55
5	-52	5	0	2,81	37,99
6	-52	5	10	5,20	70,15
7	-60	10	10	4,30	58,05
8	-44	10	10	3,77	50,9
9	-60	0	10	0	0
10	-44	0	10	0	0
11	-60	10	0	2,01	27,12
12	-44	10	0	0,11	1,53
13	-60	0	0	0	0
14	-44	0	0	0	0
15	-52	5	5	4,12	55,58
16	-52	5	5	4,88	65,87
17	-52	5	5	4,62	62,39
18	-52	5	5	4,72	63,72
19	-52	5	5	4,89	65,98
NaCl				7,407	100

Los resultados del DOE indicaron que todas las condiciones variables evaluadas tuvieron un impacto significativo sobre la cristalización de la disolución. La congelación a -52 °C produjo un mayor porcentaje de NaCl cristalino cuando se compara con la congelación a temperaturas de -44 °C y -60 °C. La disminución de la cristalización a una temperatura más baja (-60 °C) puede ser explicada por una compensación entre la cristalinidad y la velocidad de cristalización. La cristalinidad fue mayor a menor temperatura. Sin embargo, la disolución era tan viscosa que la velocidad de cristalización se redujo significativamente. Mediante el análisis de los datos del DOE se obtuvo una temperatura de congelación óptima a -54 °C (figura 4).

La evaluación de los tiempos de retención indica que la extensión del tiempo de retención de la congelación y el tiempo de retención del tratamiento térmico produce un aumento del porcentaje de cristalización. Los resultados del DOE sugieren que el tiempo de retención óptimo es de 10 h, tanto para la congelación como para el tratamiento térmico (figura 4).

El análisis de datos también dio un mensaje “fuera de ajuste”, lo que indica que el modelo generado por el E-CHIP puede que no refleje completamente el proceso de cristalización. Por lo tanto, el trabajo adicional de DSC se llevó a cabo para comprender mejor el cambio de las propiedades físicas que acompaña el proceso de cristalización durante la congelación y el tratamiento térmico.

Efecto de la velocidad de la rampa en la cristalización: velocidad de enfriamiento: tal como un plastificante, el agua actúa como un diluyente físico que aumenta el volumen libre y la movilidad molecular. Es la capacidad del agua para aumentar la movilidad molecular que puede promover procesos controlados por difusión, tal como la cristalización. El enfriamiento rápido atrapa más agua dentro de la fase amorfa, mientras que el enfriamiento lento permite que el agua fluya fuera del sistema. Por consiguiente, un enfriamiento rápido promueve la formación de cristales. Cuando la velocidad de congelación se redujo de 2 °C/min hasta 0,2 °C/min, el porcentaje de cristalización de NaCl se redujo un 82% (de un 17% a un 3%).

Velocidad de la rampa durante el tratamiento térmico: cuando se aumenta gradualmente desde la congelación a una temperatura más alta, la movilidad molecular se incrementa hasta tal punto que ocurre la nucleación y la cristalización. La velocidad de la rampa en esta etapa debe ser lo suficientemente lenta para producir cristales

suficientes. La disminución de la velocidad de la rampa de 1 °C a 0,2 °C/min aumentó el porcentaje de cristalización del 38% al 95%. Una disminución adicional de la velocidad de la rampa a 0,1 °C/min no mostró mucha diferencia.

Como se disminuyó en rampa desde -30 °C a -52 °C, la disminución en la velocidad de 5 °C/min hasta 0,2 °C/min aumentó la cristalización 1,35 veces (desde 17% a 39%). Estos resultados sugieren que la velocidad de la rampa de 0,2 °C/min era apropiada para que ocurra la cristalización.

Fase condensada y la cristalización: El trabajo adicional se centró en la fase condensada y la cristalización. La figura 5A muestra el cambio de Cp en el tiempo mediante ciclo ETP-5807 (tabla 1). Hay cambios pequeños en Cp durante la primera congelación (figura 5B), el tratamiento térmico (figura 5C) y la segunda congelación (figura 5D). La formación de la fase condensada se demuestra por la caída de Cp. Los cambios pequeños en Cp indican que se produce poco cambio de fase durante la congelación y el tratamiento térmico. Utilizando estos parámetros, sólo se obtuvo un 75% de cristalización. El porcentaje de cristalización se calculó dividiendo el calor de fusión, que es de 5,5 J/g (figura 6), por una constante de 7,4 J/g, que es el calor de fusión de la disolución de NaCl puro.

La formación de la fase condensada se observó con la extensión del tiempo de retención de la congelación. La figura 7A muestra la imagen completa del cambio de Cp durante la congelación y el tratamiento térmico. Cuando el tiempo de retención de la primera congelación se amplió de 2 horas a 5 horas, Cp se redujo a un valor de equilibrio mínimo, lo que indica el cambio de una fase más fluida a una fase más condensada (figura 7B). El aumento posterior del tiempo de retención de 5 horas a 10 horas no mostró una disminución adicional de Cp (datos no mostrados). Se observó un pico de cristalización durante la rampa de calentamiento (figura 7C). Este pico único no estaba presente cuando el tiempo de retención de congelación fue de sólo 2 horas. Si la disolución se ha cristalizado completamente durante la primera congelación y la rampa de calentamiento, se puede especular que el tratamiento térmico o la congelación adicionales tendrían poco o ningún efecto sobre Cp. Esto se demostró por el hecho de que no se observó ningún cambio en Cp durante el tratamiento térmico y la segunda congelación (figuras 7D y 7E). El porcentaje de cristalización aumentó a un 87% cuando se extendió el tiempo de congelación de 2 horas a 5 horas. De nuevo, se calculó el porcentaje de cristalización, dividiendo el calor de fusión que es de 6,4 J/g (figura 8) por la constante 7,4 J/g.

Estos resultados indican que se requiere de 5 horas a -52 °C para que la fase amorfa de AT III complete la transformación física. La fase condensada apenas comienza a formarse si la congelación es sólo durante 2 horas. Un tiempo de retención de congelación suficiente es un requisito previo para la cristalización.

Un trabajo similar se llevó a cabo a temperaturas mayores que -52 °C. Estos resultados indicaron que no hay actividad de cristalización cuando la temperatura del producto era de -46°C. A una temperatura de -48 °C, cuando el tiempo de retención se incrementó de 4 horas a 5 horas, el porcentaje de cristalización aumentó de un 36% a un 84%. Por lo tanto, es preferible que la disolución de AT III se congele por debajo de -48 °C durante, como mínimo, 5 horas, con el fin de inducir suficiente cristalización.

Desarrollo del proceso de liofilización: Con el fin de confirmar los resultados del trabajo de DSC en una escala macroscópica, se evaluaron cuatro temperaturas de congelación (-50 °C, -52 °C, -54 °C y -60 °C) y dos tiempos de retención (2 y 6 horas) en un liofilizador de laboratorio.

Congelación a -52 °C durante 2 horas: se llevó a cabo una evaluación inicial de los parámetros del ciclo actual de la tabla 1, utilizados durante la ejecución utilizando la unidad LyoStar II FTS. El perfil de temperatura y de presión de la cámara se muestra en la figura 9. La mayor temperatura del producto medida mediante termopares durante el proceso de congelación fue de aproximadamente -49 °C (figura 10). Después del procesado, la inspección física reveló que sólo el 2% de las tortas eran aceptables, el 17% tenía pequeños agujeros, el 57% estaban parcialmente colapsadas y el 23% estaban deshechas. En base a los resultados de DSC, la temperatura del producto (-49 °C) fue lo suficientemente fría para inducir la cristalización, sin embargo, el tiempo de retención de congelación tiene que ser, como mínimo, de 5 horas para formar la fase condensada antes de la cristalización. La duración de la congelación de 2 horas fue demasiado corta para obtener cristales suficientes.

Congelación a -54 °C durante 2 horas: en este ciclo, la disolución de AT III se congeló a -54 °C durante 2 horas, se sometió al tratamiento térmico a -30 °C durante 1 hora y se congeló de nuevo a -54 °C durante 2 horas. La congelación se realizó en la unidad LyoStar II FTS. Los secados primario y secundario se llevaron a cabo en CSIO-0.5 (Serail 14L03). Los gráficos de las figuras 11 y 12 mostraron que las temperaturas del producto se mantuvieron por debajo de -50 °C durante la congelación. La inspección física reveló que el 74% de las tortas eran aceptables y el 26% tenía pequeños agujeros. A pesar de observar mejoras en el aspecto de la torta por la reducción de la temperatura del producto de -49 °C a -50 °C, el resultado aún no fue satisfactorio. Estos resultados indican que la congelación a baja temperatura por sí sola no es suficiente para inducir la completa cristalización.

Congelación a -54 °C durante 6 horas: en este ciclo, la disolución de AT III se congeló a -54 °C durante 6 horas, se sometió al tratamiento térmico a -30 °C durante 1 hora y se congeló de nuevo a -54 °C durante 2 horas. El ciclo se llevó a cabo en una unidad de liofilización FTS. Las temperaturas del producto se mantuvieron por debajo de -50 °C durante la congelación (figuras 13 y 14). La inspección física indicó a que todas las tortas eran aceptables. Estos

resultados indican que la temperatura del producto y tiempo de retención de la congelación son igualmente importantes para garantizar una cristalización óptima. Dicho resultado es coherente con la observación de DSC.

Congelación a -50 °C durante 6 horas: en este ciclo, la disolución de AT III se congeló a -50 °C durante 6 horas, se sometió al tratamiento térmico a -30 °C durante 1 hora y se congeló nuevamente a -50 °C durante 2 horas. El ciclo se llevó a cabo en la unidad LyoStar II FTS. Utilizando estos parámetros, las temperaturas del producto se mantuvieron por debajo de -47 °C y por encima de -48 °C durante la congelación (figuras 15 y 16). La inspección física indicó que sólo el 18% eran aceptables, el 23% tenía pequeños agujeros y el 59% estaban colapsadas. Este estudio confirma las observaciones anteriores obtenidas por DSC, de que la temperatura del producto debe estar por debajo de -48 °C para iniciar la cristalización. También demuestran que la extensión del tiempo de retención de la congelación por sí sola no es suficiente para formar suficientes cristales.

Congelación a -60 °C durante 6 horas: en este ciclo, la disolución de AT III se congeló a -60 °C durante 6 horas, se sometió al tratamiento térmico a -30 °C durante 1 hora y se congeló nuevamente a -60 °C durante 2 horas. El ciclo se llevó a cabo en el liofilizador Minilyo (Usifroid). La temperatura del producto fue -51,6 °C en la parte superior de la bandeja y de -52,7 °C en la parte inferior de la bandeja durante la congelación (figuras 17 y 18). La inspección física indicó que todas las tortas eran aceptables. Este experimento demostró además que la disminución de la temperatura de la bandeja y la extensión del tiempo de retención de la congelación son estrategias importantes para producir tortas farmacéuticamente aceptables.

Congelación a -52 °C durante 15 horas: en este ciclo, la disolución de AT III se congeló a -52 °C durante 2 horas, se hibridó a -30 °C durante 1 hora y se congeló de nuevo a -52 °C durante 15 hrs. La congelación se llevó a cabo en la unidad LyoStar II FTS. Los secados primario y secundario se llevaron a cabo en Serail, debido a que la válvula de aislamiento en el FTS se quedó atascada durante el secado primario. Las mayores temperaturas del producto medidas mediante termopares durante la congelación estaban por debajo de -48 °C (figuras 19 y 20). La apariencia física de todas las tortas era aceptable. En base a los resultados de DSC, -48 °C es la mayor temperatura de producto necesaria para inducir la cristalización. Y un tiempo de retención de 15 horas parece ser suficiente para garantizar una cristalización completa.

Resumen: la tabla 4 muestra la respuesta de la temperatura a diferentes puntos de ajuste de la temperatura de la bandeja.

Tabla 4: Respuesta de la temperatura a diferentes puntos de ajuste de la temperatura de la bandeja

Experimento	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	FTS	-52	-52,03	-51,15					-49
2	FTS	-54	-53,99	-53,15	-52,46	-51,75	-52,38	-51,98	-50
3	FTS	-54	-54,03	-53,23	-52,19	-51,81	-52,24	-51,77	-51
4	FTS	-50	-50,07	-49,18	-48,59	-47,46	-48,51	-48,12	-47
5	Usifroid	-60	-58,00	--	-54,24	-54,66	-55,44	-54,66	-51,6, -52,7
4	FTS	-52	-51,99	-51,15					48

A = Secador; B = Punto de ajuste de temperatura de la bandeja (°C); C = Entrada de la bandeja (°C); D = Salida de la bandeja (°C); E = parte superior entrada de la bandeja (°C); F = parte superior salida de la bandeja (°C); G = parte inferior entrada de la bandeja (°C); H = parte inferior salida de la bandeja (°C); e I = Temp. de producto (°C)

Debido a que la temperatura del producto es habitualmente de 4 °C a 6 °C más alta que el punto de ajuste objetivo de la temperatura de la bandeja, la temperatura de la bandeja objetivo se establece preferentemente a -54 °C para asegurar que todas las temperaturas de producto se mantienen por debajo de -48 °C en todo el liofilizador. En base a los resultados de estos estudios (tabla 5), la temperatura de la bandeja objetivo durante la congelación se puede seleccionar para asegurar que las temperaturas del producto estén muy por debajo de -48 °C.

Tabla 5. Efecto de la temperatura de congelación y el tiempo de retención sobre la apariencia de la torta

No.	Temp. de congelación (°C)	Primer tiempo de retención de la congelación (h)	Segundo tiempo de retención de la congelación (h)	Resultados			
				A (torta sólida)	B*	C**	D***
1	-52	2	2	2%	17%	57%	23%
2	-54	2	2	74%	26%	-	-
3	-52	2	15	100%	-	-	-
4	-50	6	2	18%	23%	59%	-

No.	Temp. de congelación (°C)	Primer tiempo de retención de la congelación (h)	Segundo tiempo de retención de la congelación (h)	Resultados			
				A (torta sólida)	B*	C**	D***
5	-60	6	4,5	100%	-	-	-
6	-54	6	2	100%	-	-	-
*agujeros pequeños; **colapsada; ***deshecha							

Además, se puede asignar un tiempo suficiente para asegurar la cristalización completa. Los datos indican que una temperatura de la bandeja de -54 °C con 6 horas de inmersión pueden lograr estas condiciones y promover la cristalización adecuada. Por lo tanto, tanto una extensión del tiempo de inmersión de la congelación de 2 horas a 6 horas como una disminución del punto de ajuste de la temperatura de la bandeja desde -52 °C -54 °C podrían mejorar el aspecto físico del producto acabado.

Morfología de las tortas liofilizadas: se observó la morfología de las tortas liofilizadas mediante un microscopio electrónico de barrido. Se utilizó una torta parcialmente colapsada como control para la torta sólida y fuerte. La torta colapsada contiene muchas escamas que son delgadas y porosas (figura 21A). Una torta sólida (figura 21B) se compone principalmente de cristales en forma de placas con algunos cristales redondeados distribuidos en toda la torta. El NaCl por sí mismo forma pequeños cristales redondeados (figura 22). La alanina sola (figura 23) forma placas continuas con algunos agujeros probablemente como resultado de la sublimación del hielo. Se puede deducir que los cristales en forma de placa en la figura 21B son principalmente de alanina y los cristales de forma redondeada de NaCl.

Difracción de rayos X en polvo: en base a los datos generados a partir de DSC y los estudios de congelación, se llevó a cabo un segundo experimento con carga máxima ETP-5807. Este experimento incorpora una temperatura de congelación inferior durante la primera etapa de congelación, así como un tiempo extendido para la inmersión. Con el ciclo modificado se obtuvo un producto con apariencia física aceptable.

Con el fin de caracterizar la cristalinidad de una torta colapsada del primer experimento y una torta sólida del segundo experimento, se evaluaron los patrones de XRD de NaCl, alanina, ETP 5807 (torta colapsada) y el material del segundo experimento de ETP 5807 (torta sólida) (figura 24). Los principales picos de difracción de NaCl cristalino están en 31,7° y 45,5°. El principal pico de difracción de alanina cristalina está en 20,5°. Un pico ancho que aparece en las muestras de alanina se asignó a la porción amorfa. Las tortas de ETP 5807 (primer experimento) y ETP 5807 (segundo experimento) muestran la combinación de picos de NaCl y de alanina. También se observó un pico ancho en ambas muestras.

La cristalinidad se calculó dividiendo el área del pico cristalino por la suma del área de los picos amorfo y cristalino. La cristalinidad de NaCl, alanina, ETP 5807 y ETP 5807 (segundo experimento) se ajustaron, respectivamente, a $99 \pm 20\%$, $50 \pm 1\%$, $66 \pm 2\%$ y $60 \pm 1\%$. No se observa diferencia en el patrón de difracción para la torta colapsada y la torta sólida.

Conclusiones: La formulación de AT III se caracterizó con énfasis en relación al porcentaje de cristalización para el diseño del protocolo de congelación en la liofilización. Los resultados indican que la temperatura de congelación y tiempo de retención son requisitos previos igualmente importantes para una cristalización completa. En algunas realizaciones, la liofilización puede comprender una temperatura de congelación aproximadamente de -54 °C, así como un tiempo de inmersión extendido aproximadamente de 6 horas. En los ensayos se obtuvieron productos acabados farmacéuticamente aceptables.

Ejemplo 2

Se llenaron viales moldeadas de treinta ml con diez mililitros de disolución estéril filtrada que comprende AT III (~ 6,88 mg/ml), alanina (100 mM (~ 8,91 mg/ml)) y NaCl (150 mM, (~ 8,7 mg / ml)). Las muestras de AT III se congelaron en primer lugar a -25 °C, se mantuvieron durante 2 horas y, a continuación, se congelaron nuevamente a -54 °C, seguido de un tiempo de retención de 6 horas. A continuación, la temperatura de la bandeja se elevó lentamente hasta -30 °C a una velocidad de 0,2 °C/min, y se mantuvo a esa temperatura durante 2 horas, y, a continuación, se disminuyó lentamente a 0,2 °C/min de nuevo a -54 °C. Los productos se mantuvieron a -54 °C durante 2 horas antes de iniciar el secado primario. El secado primario se llevó a cabo a una temperatura de la bandeja de 0 °C y una presión de la cámara controlada de 100 mTorr. El secado primario duró aproximadamente 32 horas antes de iniciar el secado secundario. El secado secundario se llevó a cabo a 35 °C de temperatura de temperatura de la bandeja y 100 mTorr presión de la cámara durante 14 horas.

Tras el secado, se obtuvo aproximadamente un 100% de torta liofilizada farmacéuticamente aceptable. El porcentaje de la torta farmacéuticamente aceptable se calculó dividiendo la cantidad de tortas aceptables por el número de tortas en todo el lote. Además, se aplicó DSC modulada y se observó la formación de una fase condensada durante la etapa de congelación y el proceso de cristalización durante la rampa de calentamiento.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de liofilización de una composición que comprende antitrombina-III (AT III y, como mínimo, un excipiente de cristalización, seleccionado del grupo que consiste en alanina, manitol, glicina y NaCl, comprendiendo el procedimiento:
 - (a) exponer la composición a una primera temperatura de aproximadamente -48°C o menos
 - (b) mantener la temperatura de la composición a aproximadamente -48°C o menos durante un periodo de tiempo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 h antes de la liofilización.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la primera temperatura es de aproximadamente -54 °C o menos.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el primer período de tiempo, como mínimo, es de aproximadamente 5 horas.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el, como mínimo, un excipiente de cristalización es alanina y NaCl.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que la alanina y el NaCl están presentes en la composición aproximadamente a 100 mM cada uno.
6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la primera temperatura y el primer período de tiempo son suficientes de modo que el, como mínimo, un excipiente de cristalización está completamente o casi completamente cristalizado.
7. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la composición comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en: un agente estabilizante, un agente tampón, un tensioactivo, un antioxidante y un catión divalente.
8. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la composición comprende además un tampón seleccionado del grupo que consiste en: tampón fosfato, tampón acetato, tampón citrato y tampón ácido cítrico/fosfato, histidina, tris-(hidroximetil)-aminometano, 1,3-bis[tris-(hidroxi-metil)metilamino]-propano, histidina, piperazina-N, N'-bis-(ácido 2-etanosulfónico), ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico, ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etanosulfónico, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico y ácido N-2-acetamido-2-aminoetanosulfónico.
9. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende además secar la primera composición para obtener una torta liofilizada.
10. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la torta liofilizada es, como mínimo, una torta sólida al 50%.
11. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la composición es una composición farmacéutica líquida que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende además exponer la primera composición a una segunda temperatura durante un segundo período de tiempo para obtener una segunda composición, en el que la segunda temperatura es superior a la primera temperatura.
13. Procedimiento, según la reivindicación 12, que comprende además exponer la segunda composición a una tercera temperatura durante un tercer período de tiempo para obtener una tercera composición, en el que la tercera temperatura es inferior a la segunda temperatura.
14. Procedimiento, según la reivindicación 13, que comprende además secar la tercera composición para obtener una torta liofilizada.
15. Procedimiento de liofilización de una composición líquida que comprende AT III derivada de plasma, NaCl y alanina, comprendiendo el procedimiento:
 - (a) exponer la composición aproximadamente a -54 °C o menos de tal manera que la temperatura de la composición es aproximadamente de -48 °C o menos durante aproximadamente 5 horas o más a fin de obtener una primera composición que tiene uno o más componentes en la misma completamente o casi completamente cristalizados; y
 - (b) secar la primera composición para obtener una torta liofilizada.

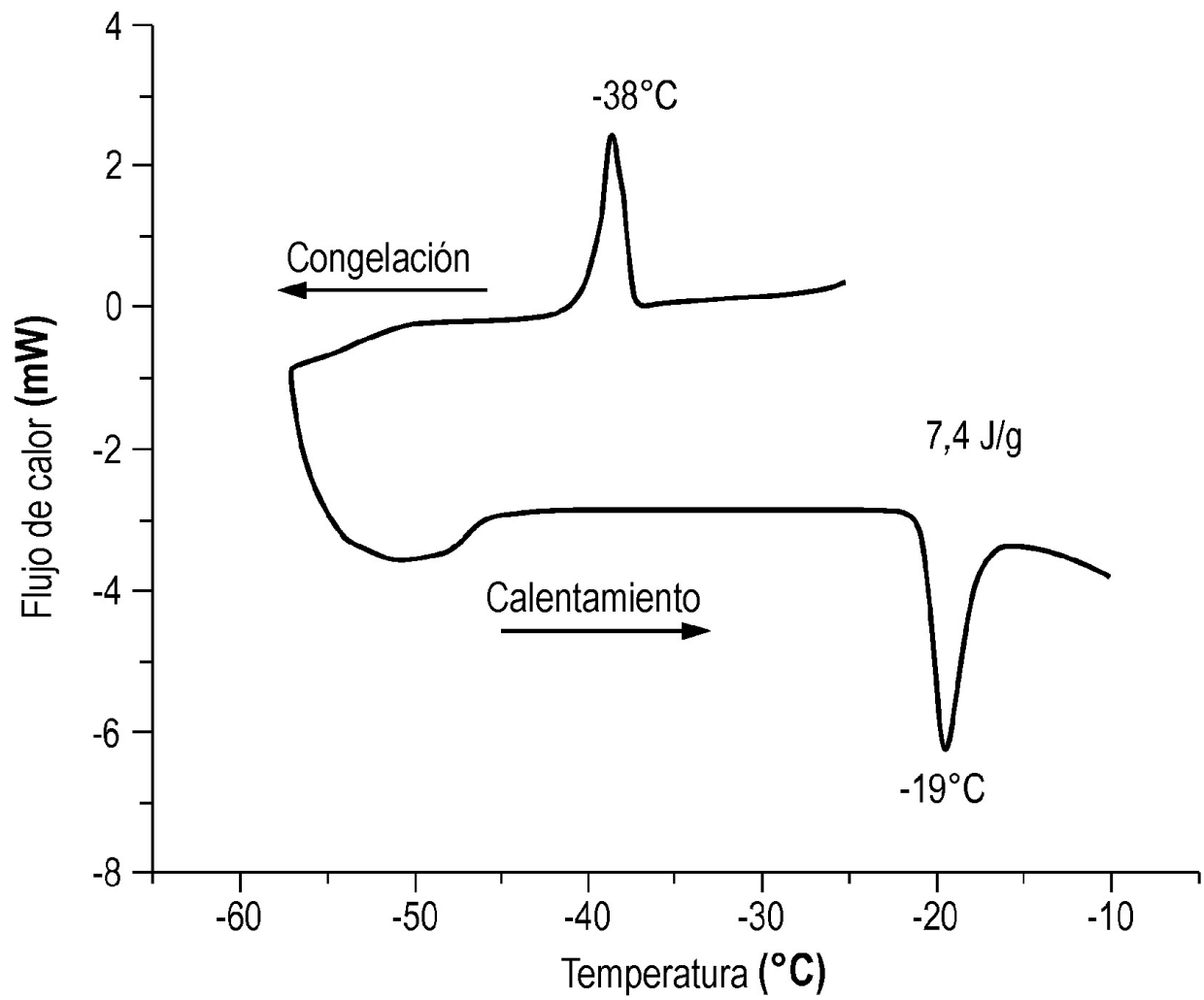


Fig. 1

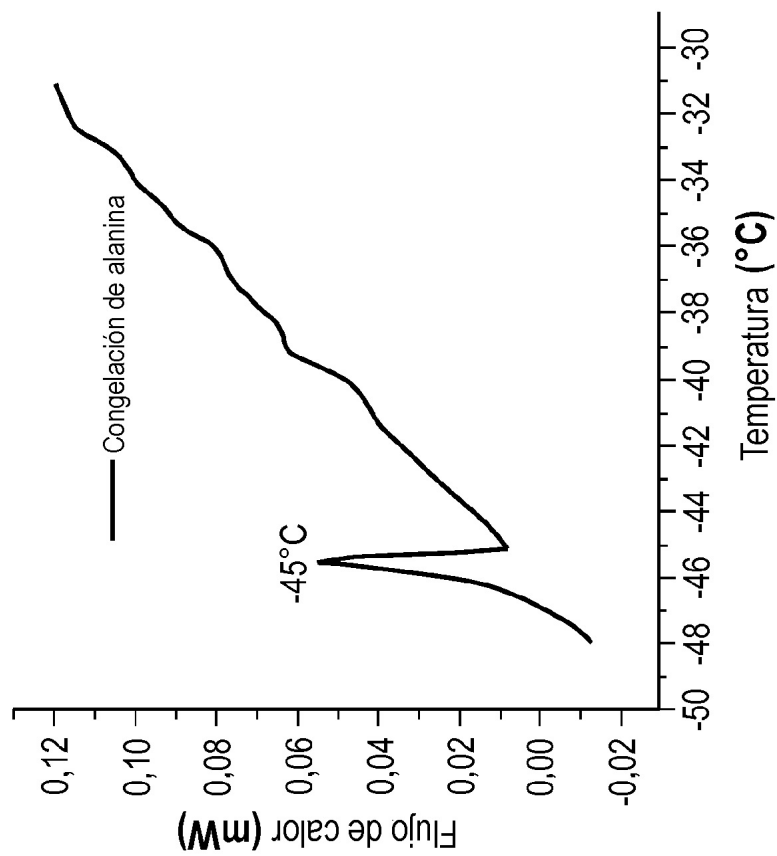


Fig. 2A

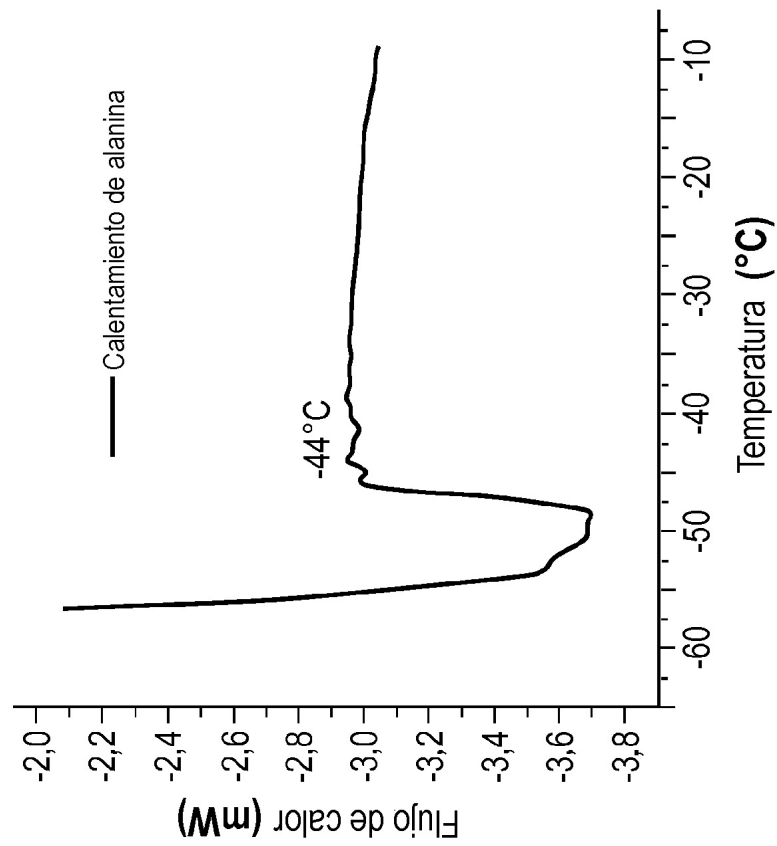
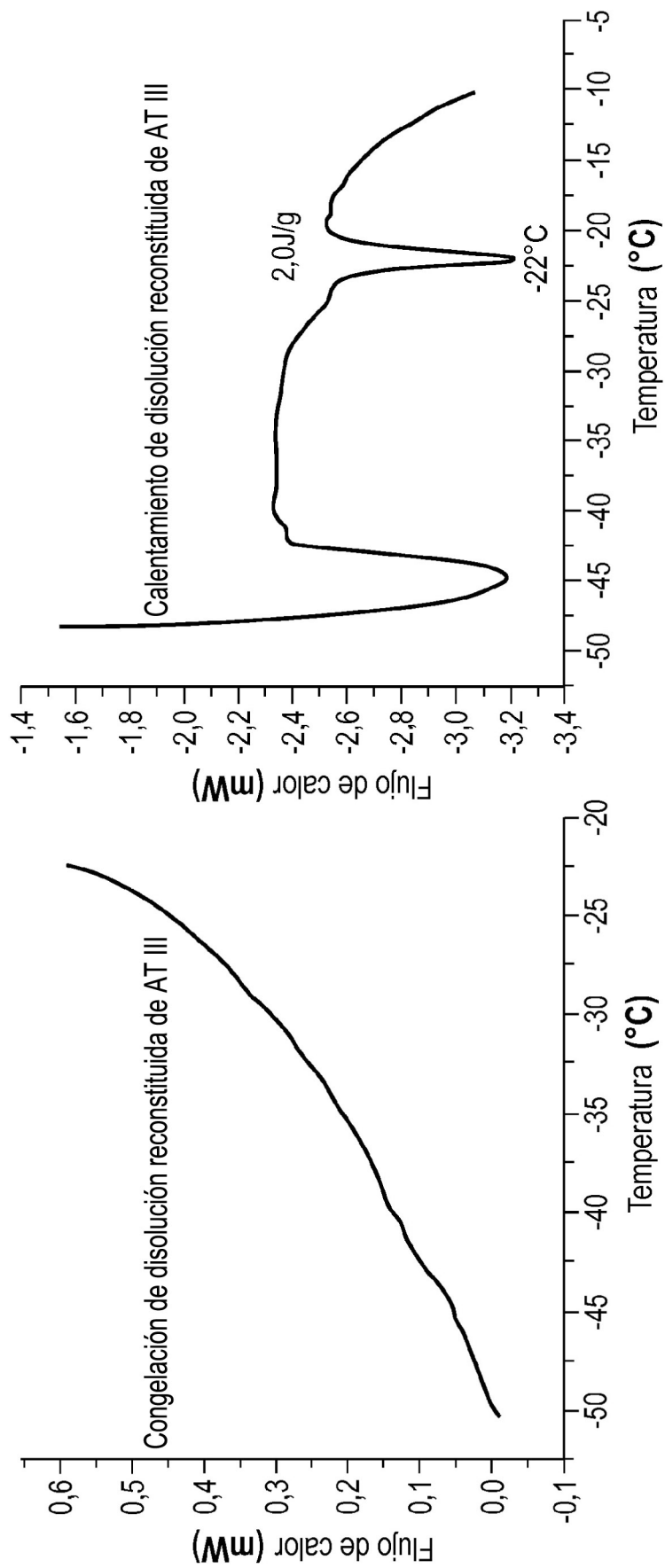
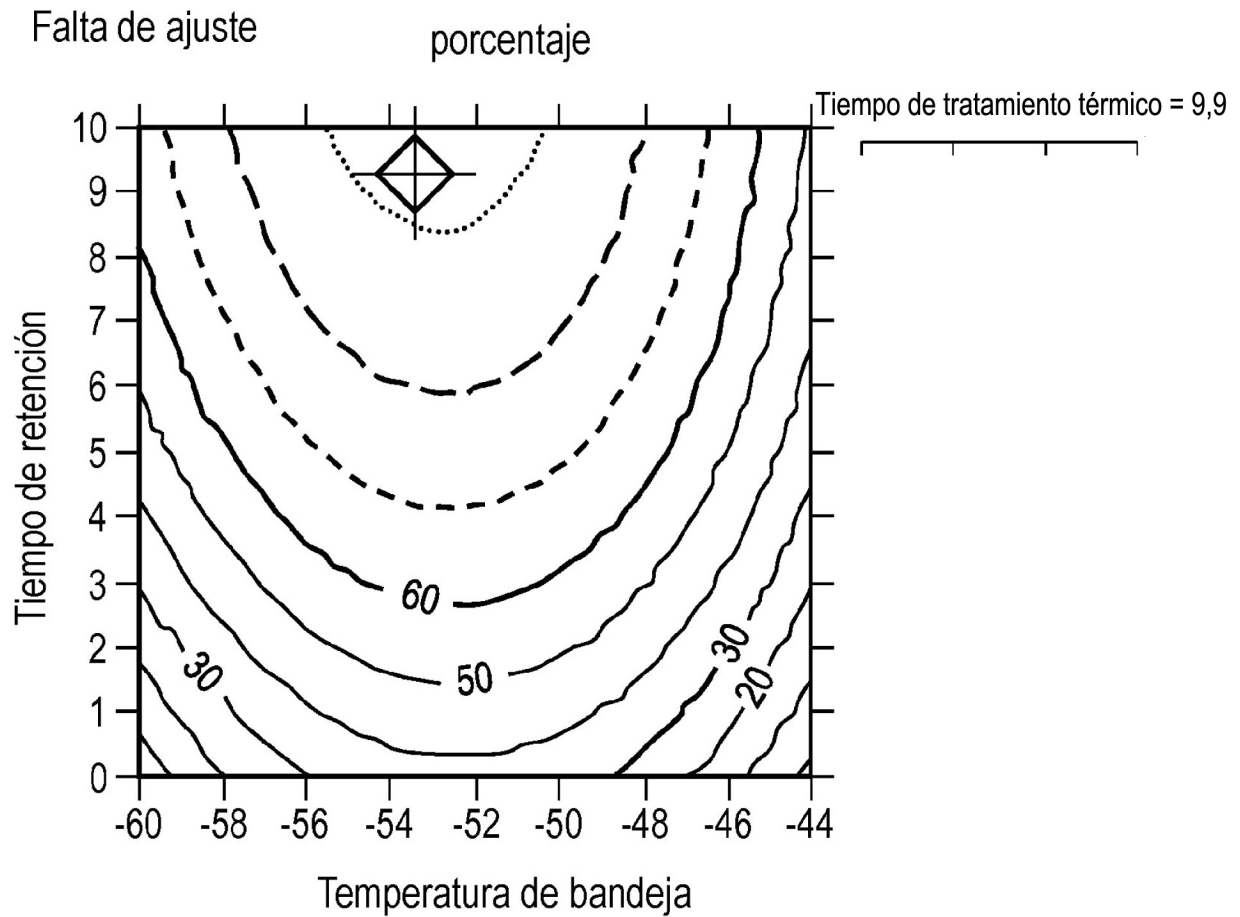


Fig. 2B





Temp. bandeja = -53,48	Tiempo de retención = 9,29	
Valor	límite inferior	límite superior
92,27	52,78	131,76

Fig. 4

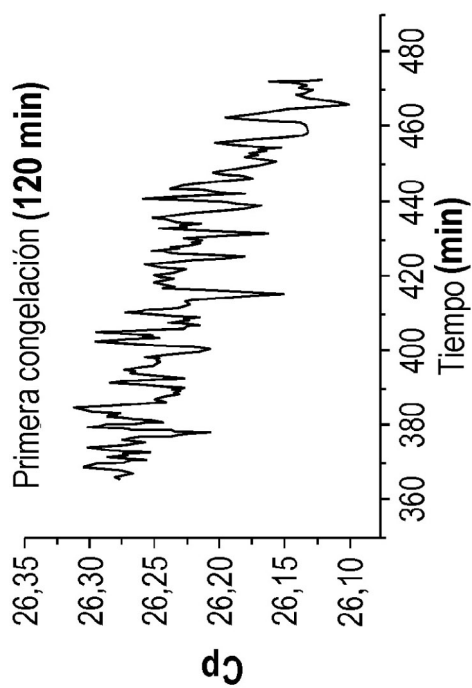


Fig. 5B

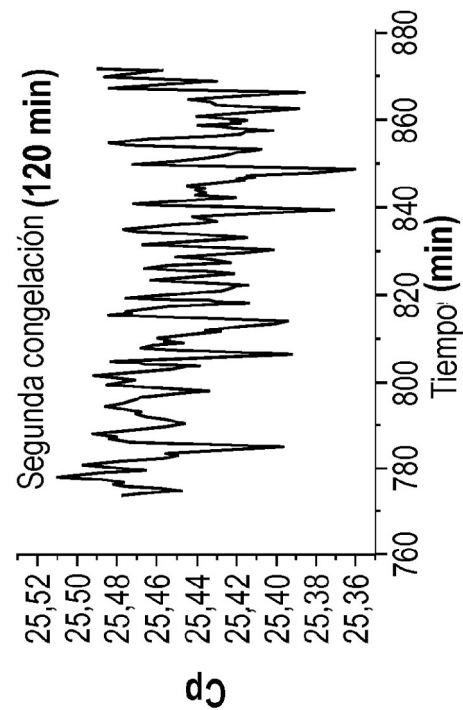


Fig. 5D

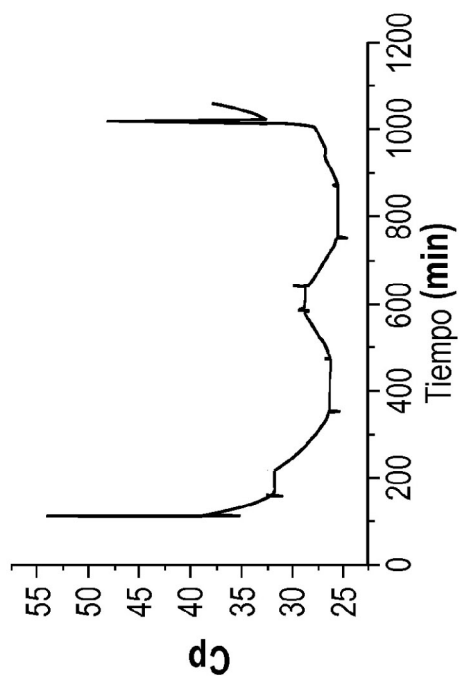


Fig. 5A

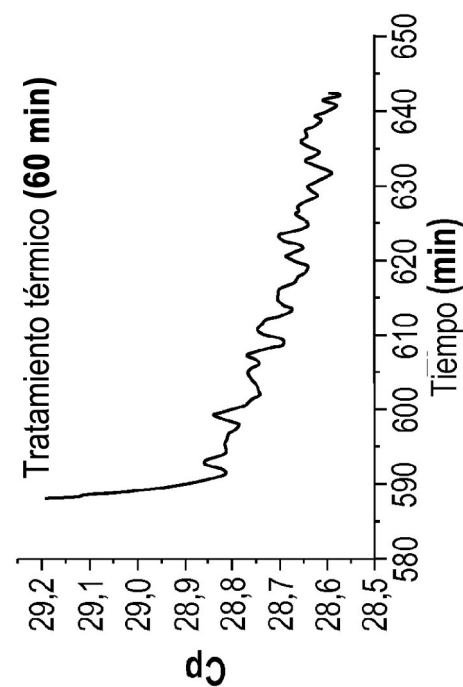


Fig. 5C

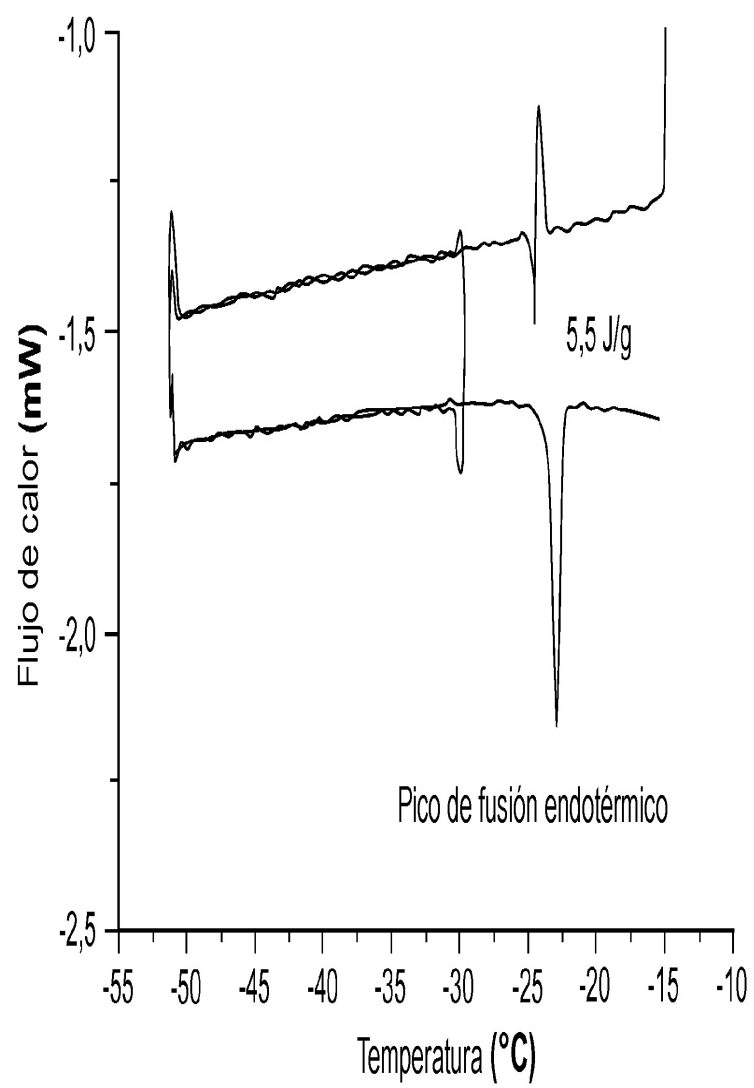


Fig. 6

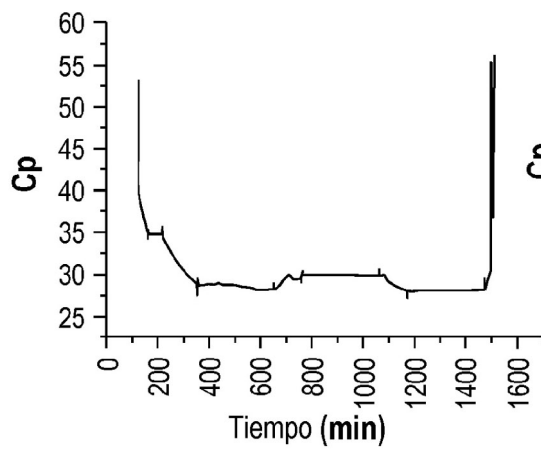


Fig. 7A

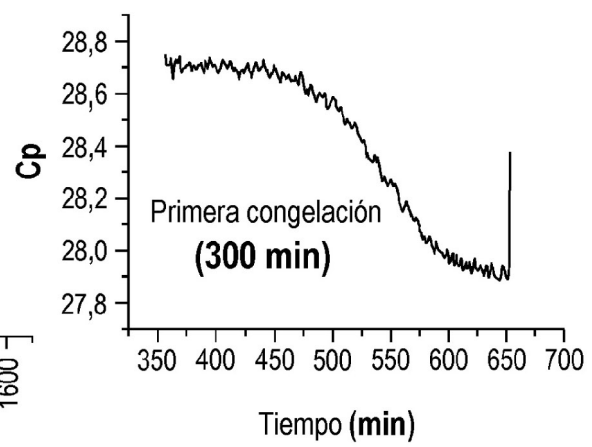


Fig. 7B

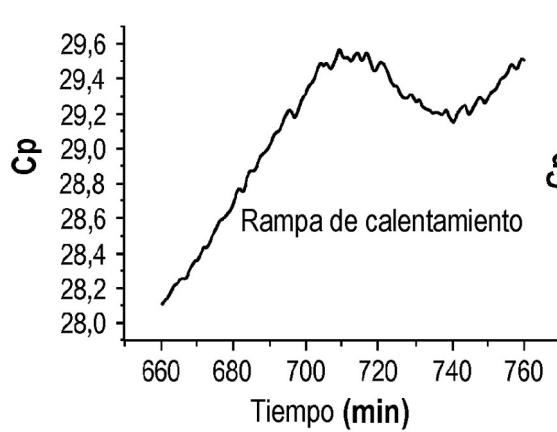


Fig. 7C

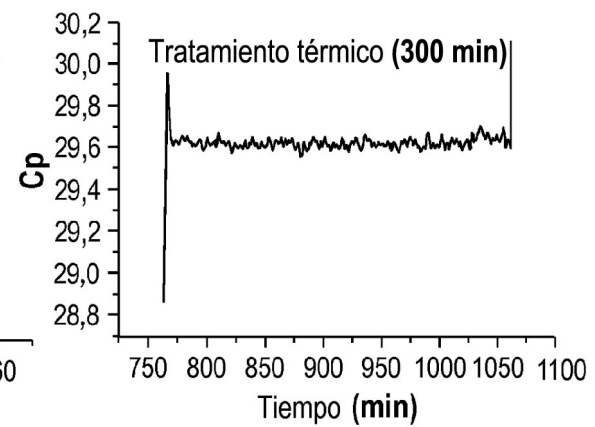


Fig. 7D

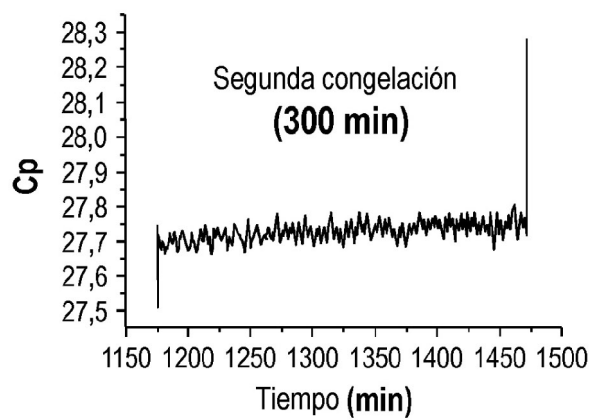


Fig. 7E

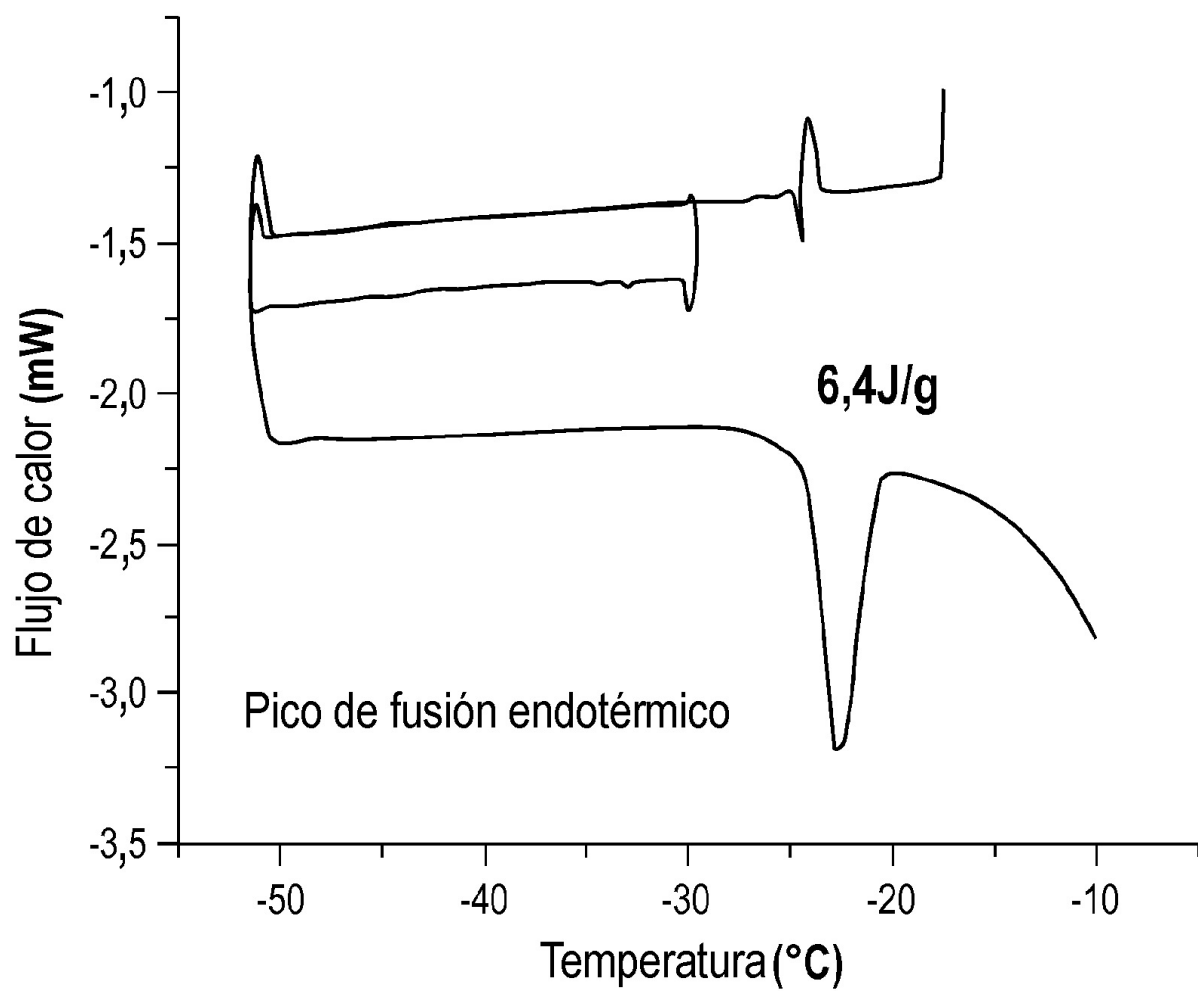


Fig. 8

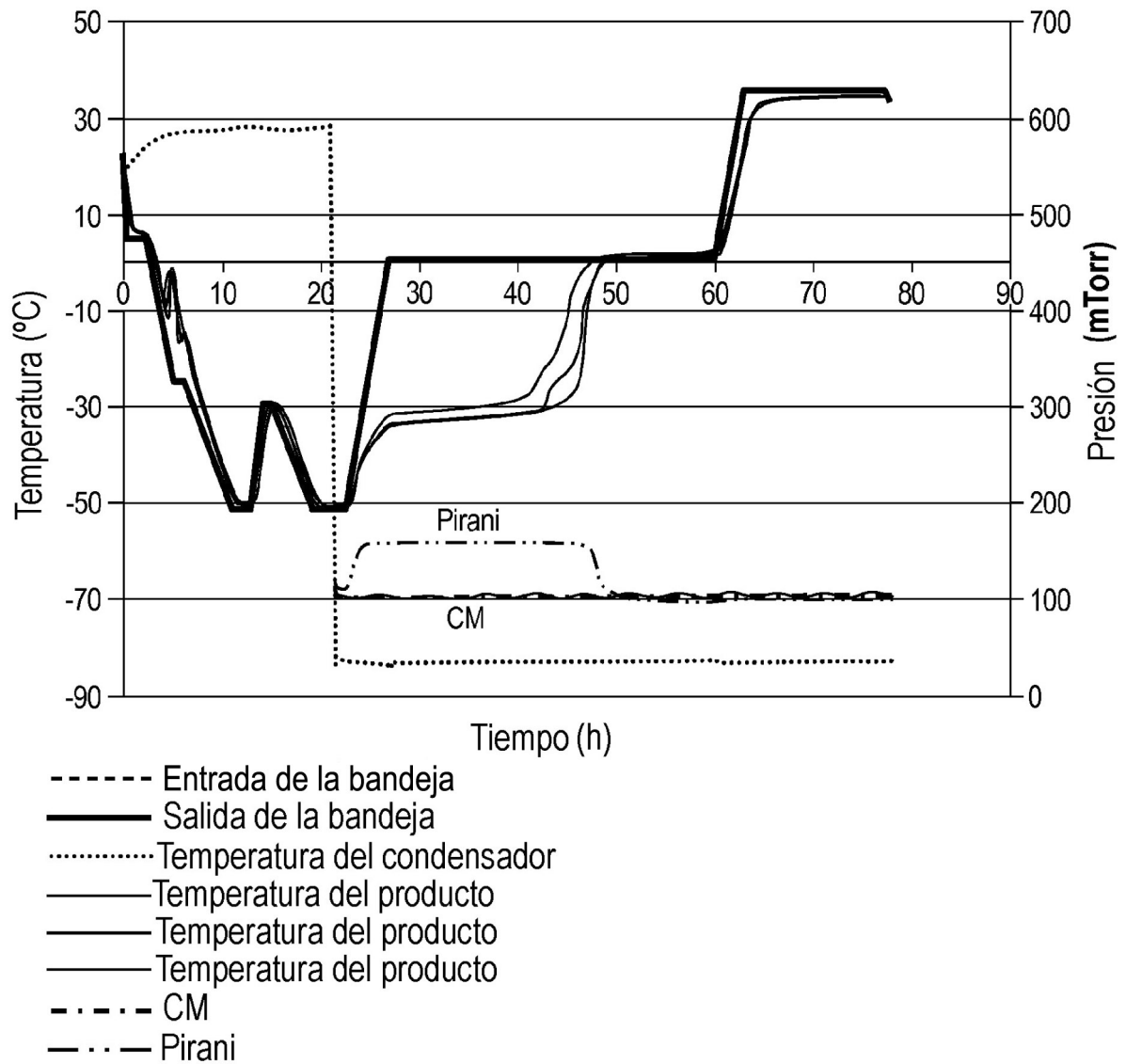


Fig. 9

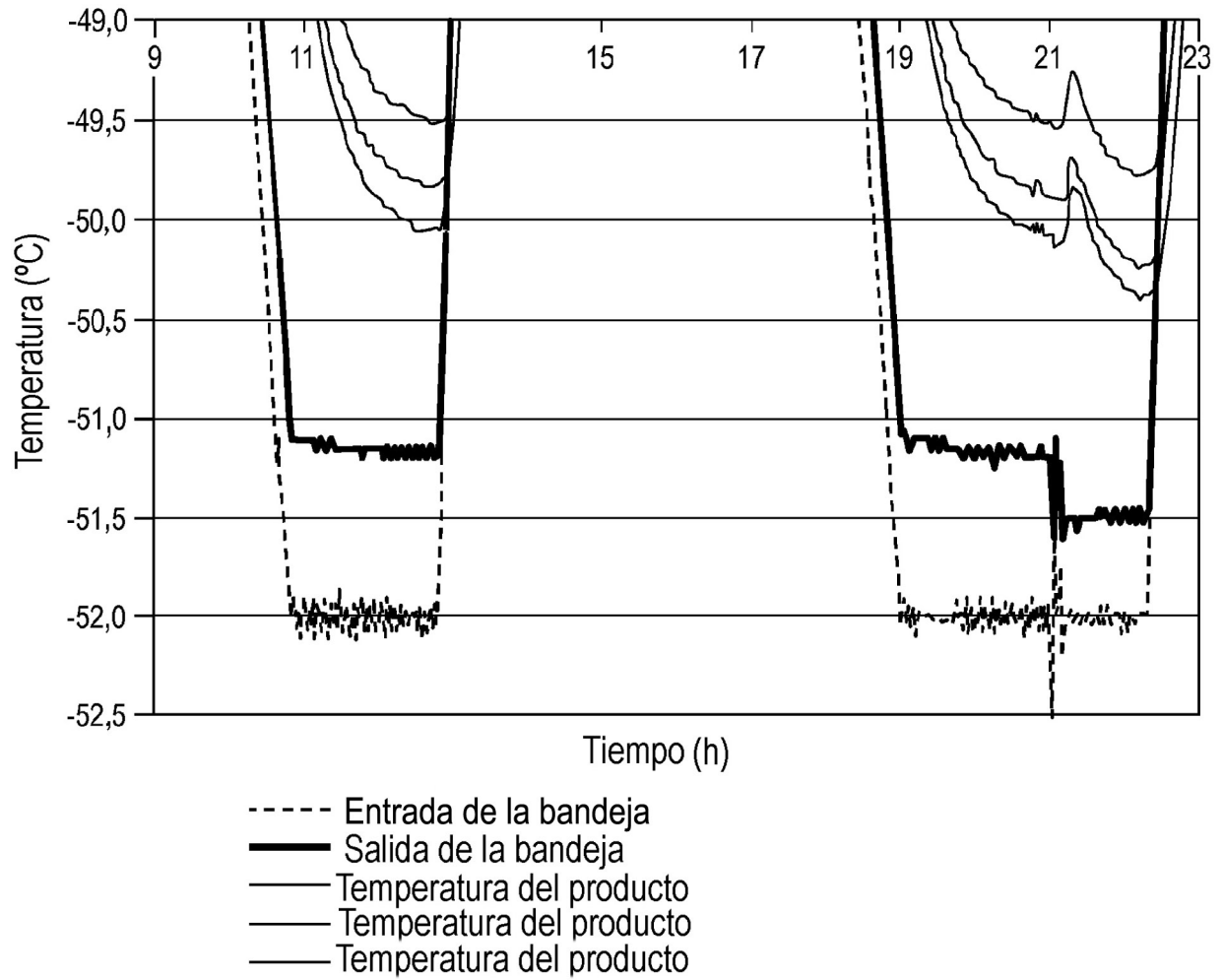


Fig. 10

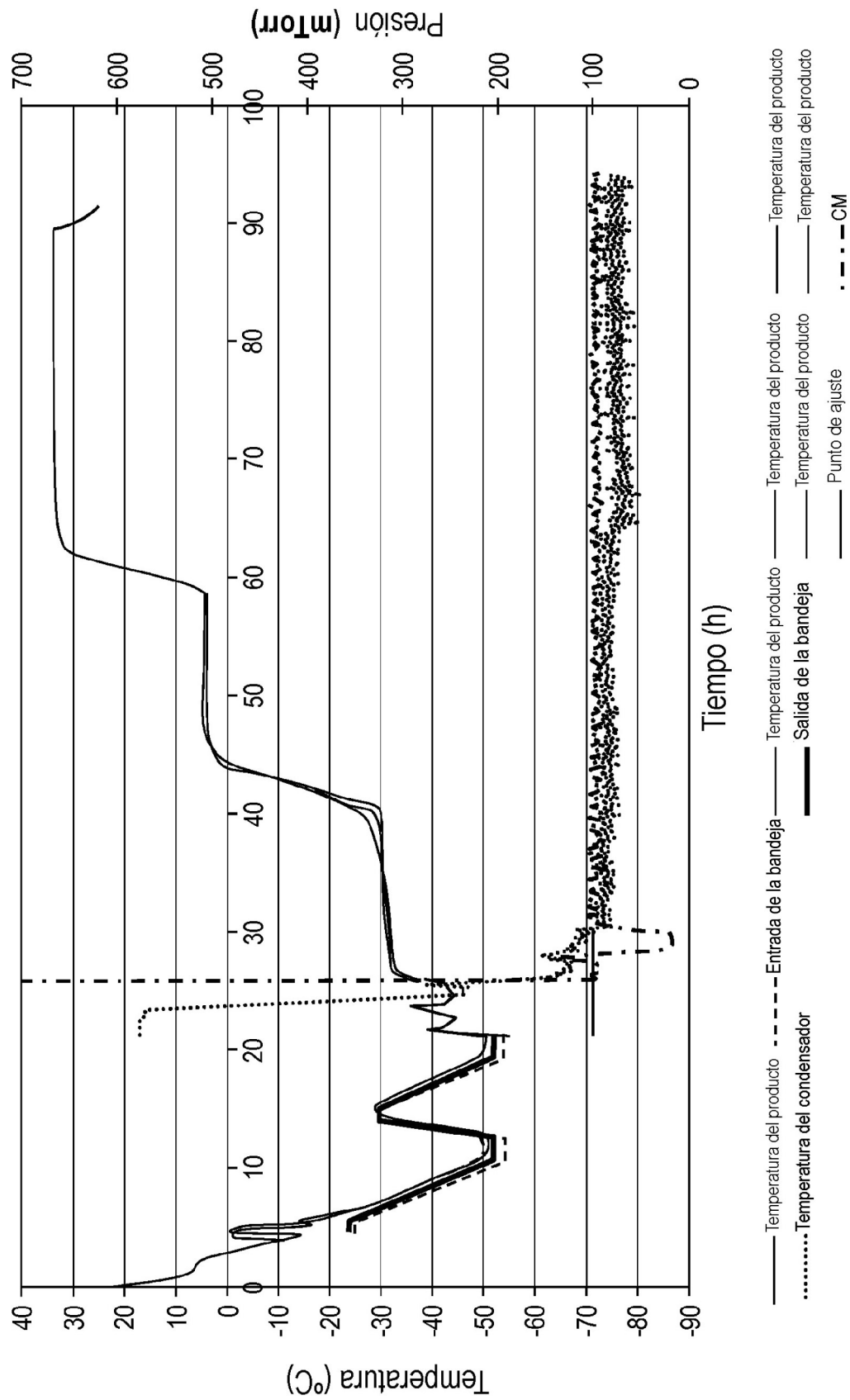


Fig. 11

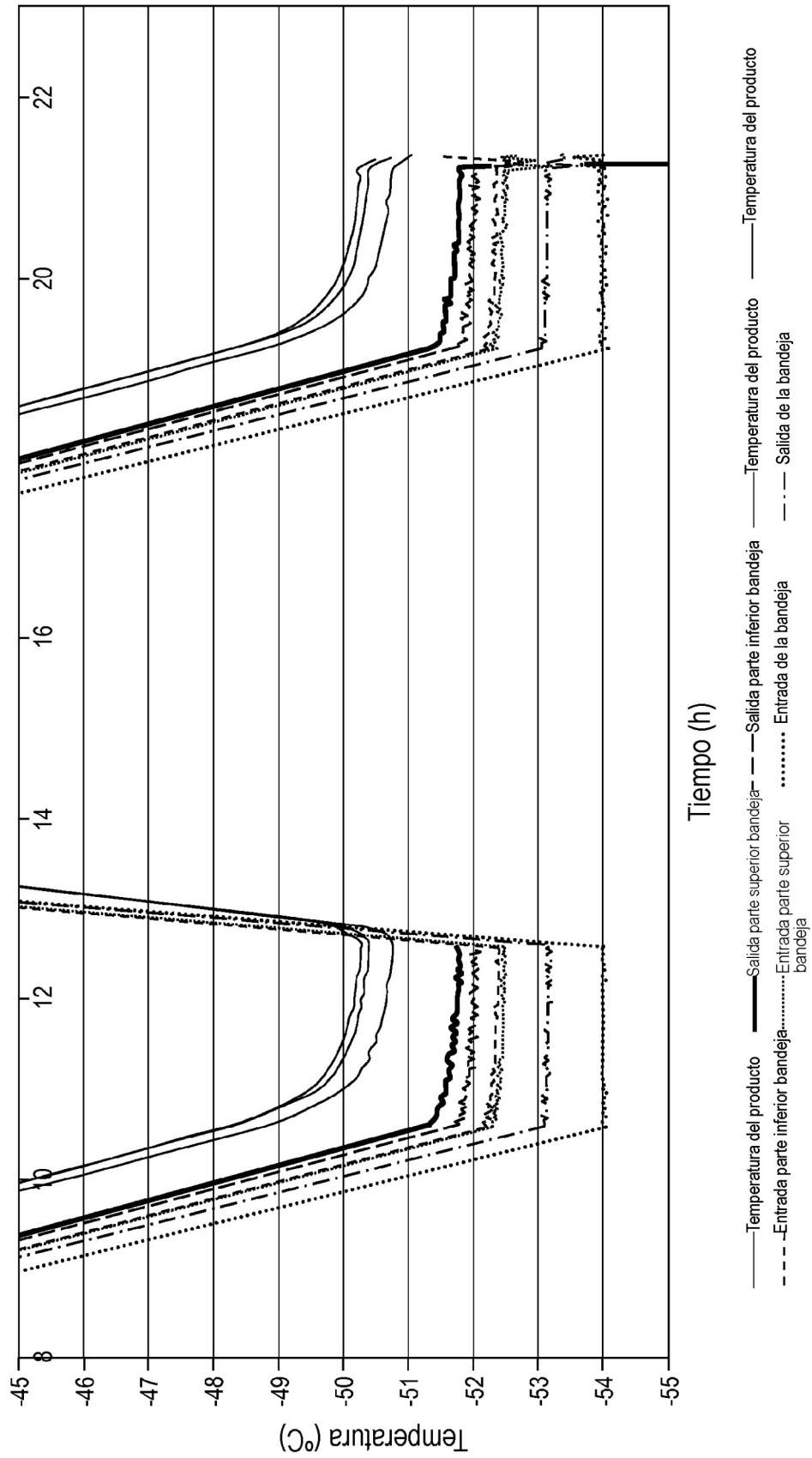


Fig. 12

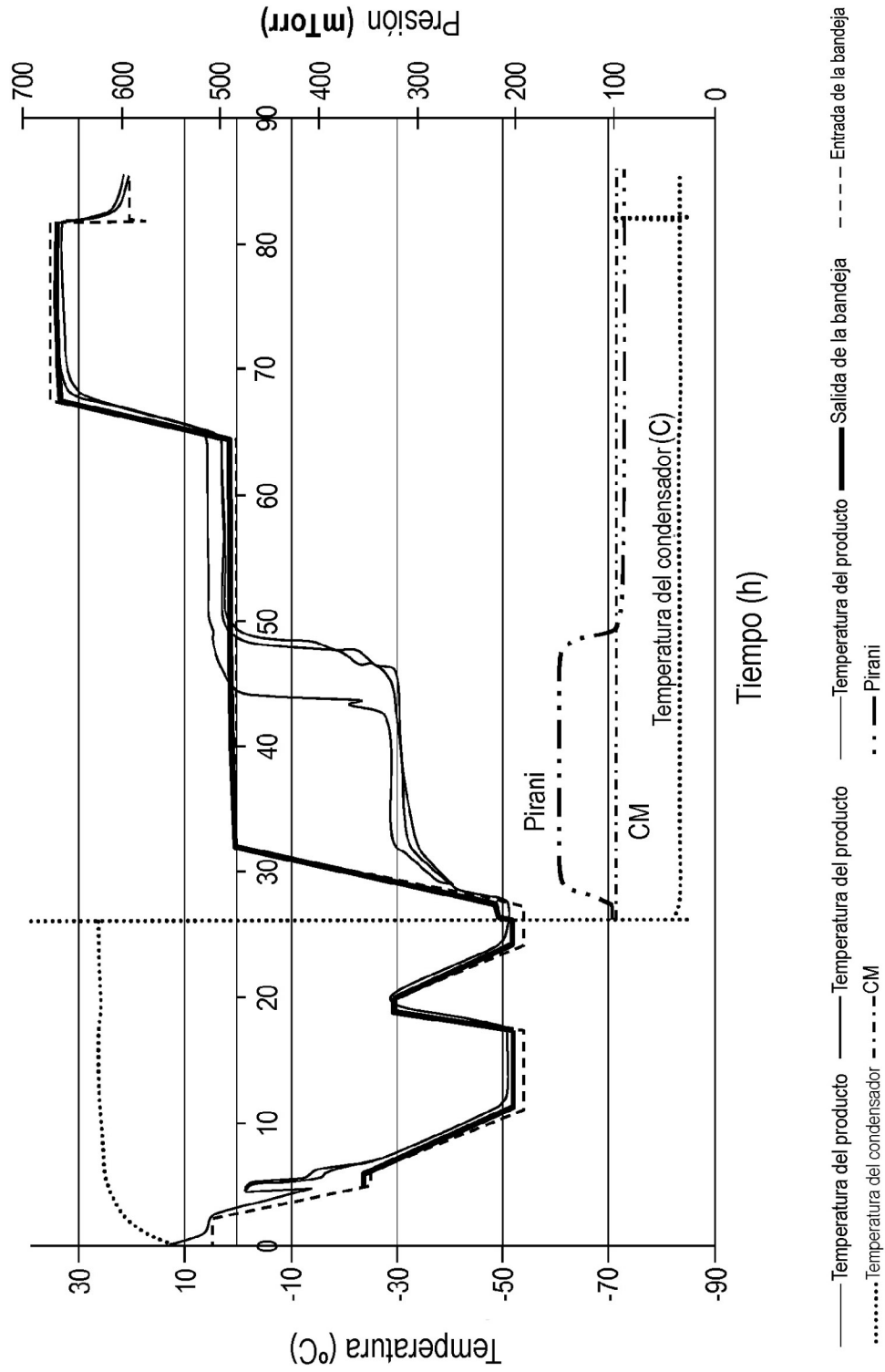


Fig. 13

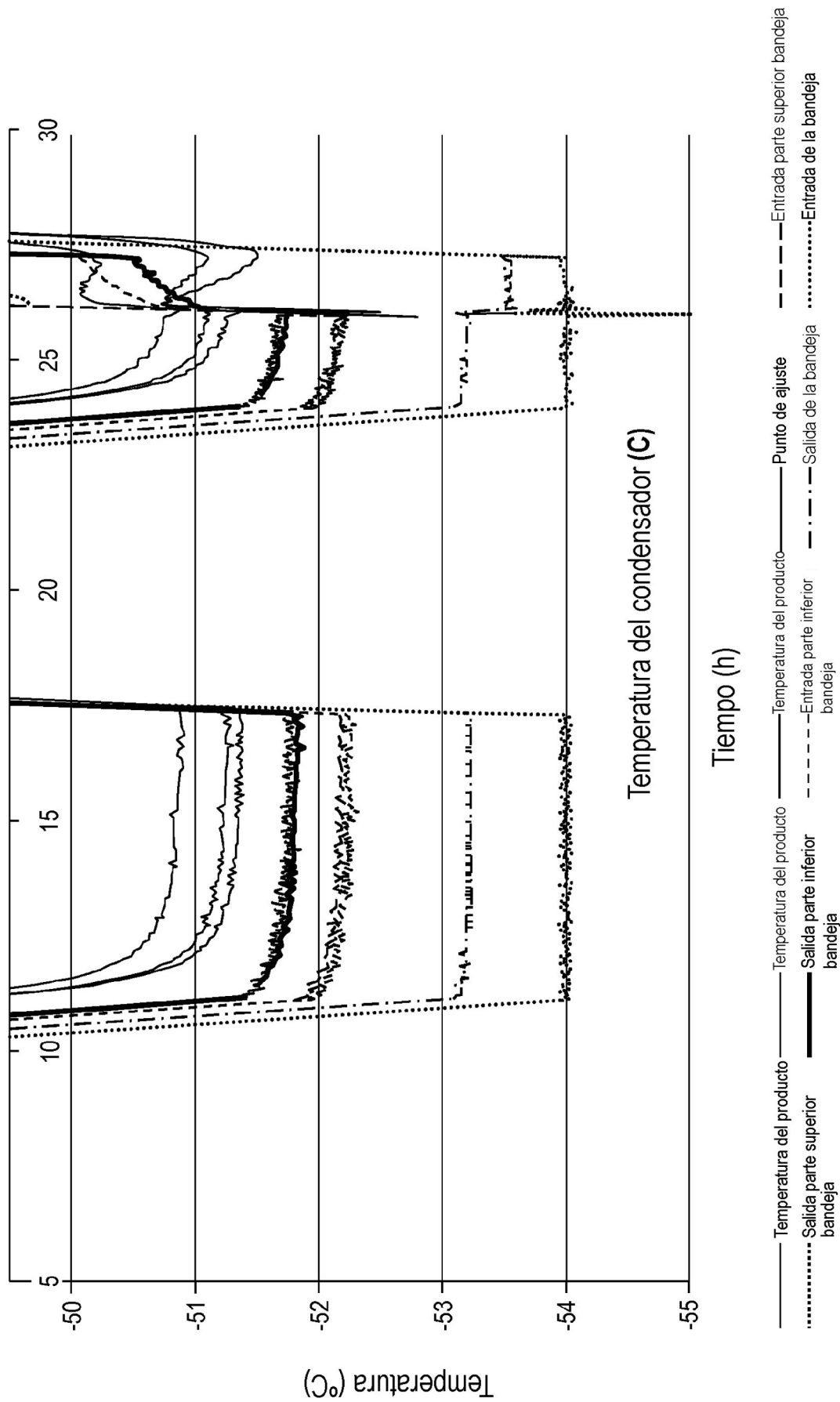


Fig. 14

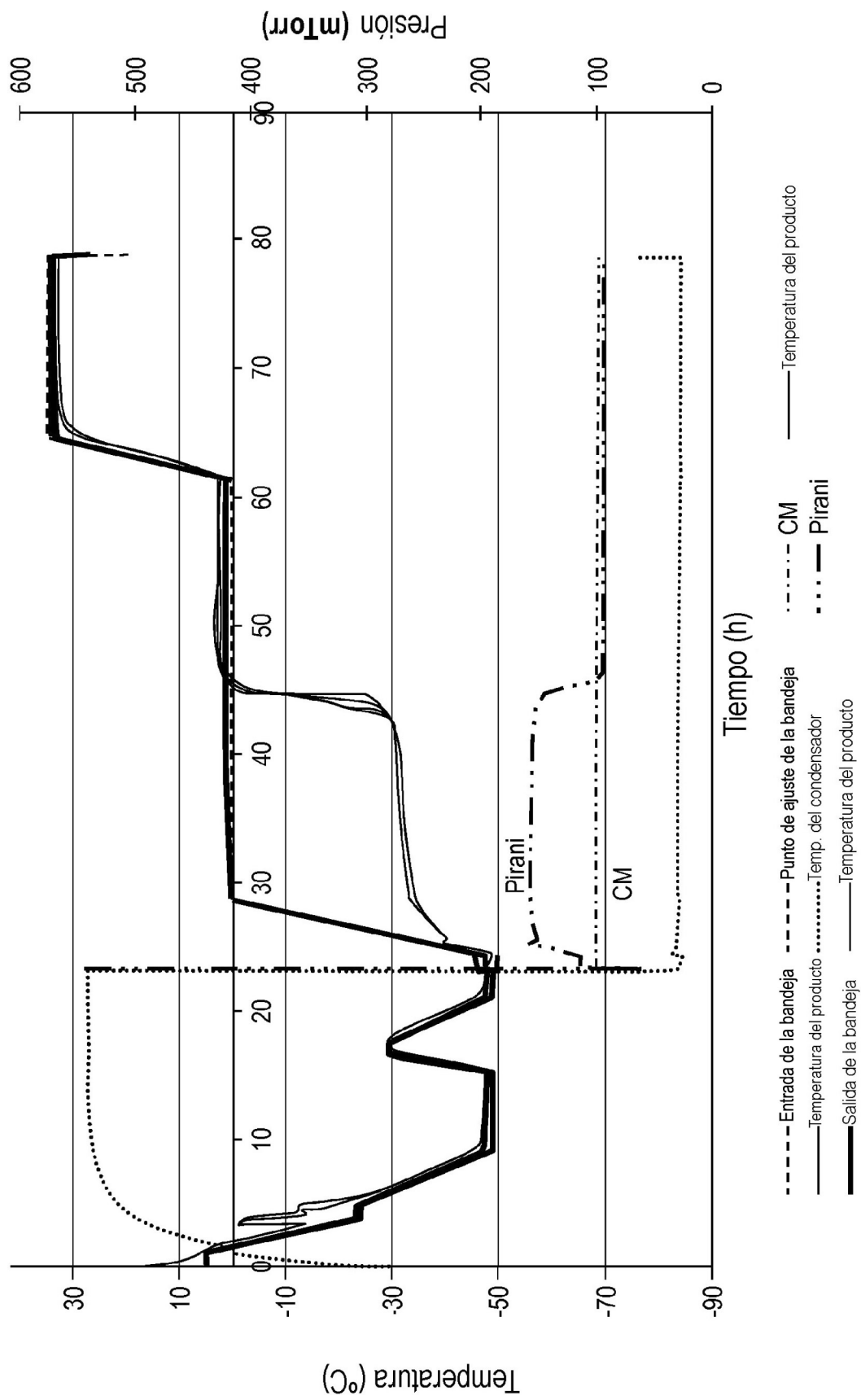


Fig. 15

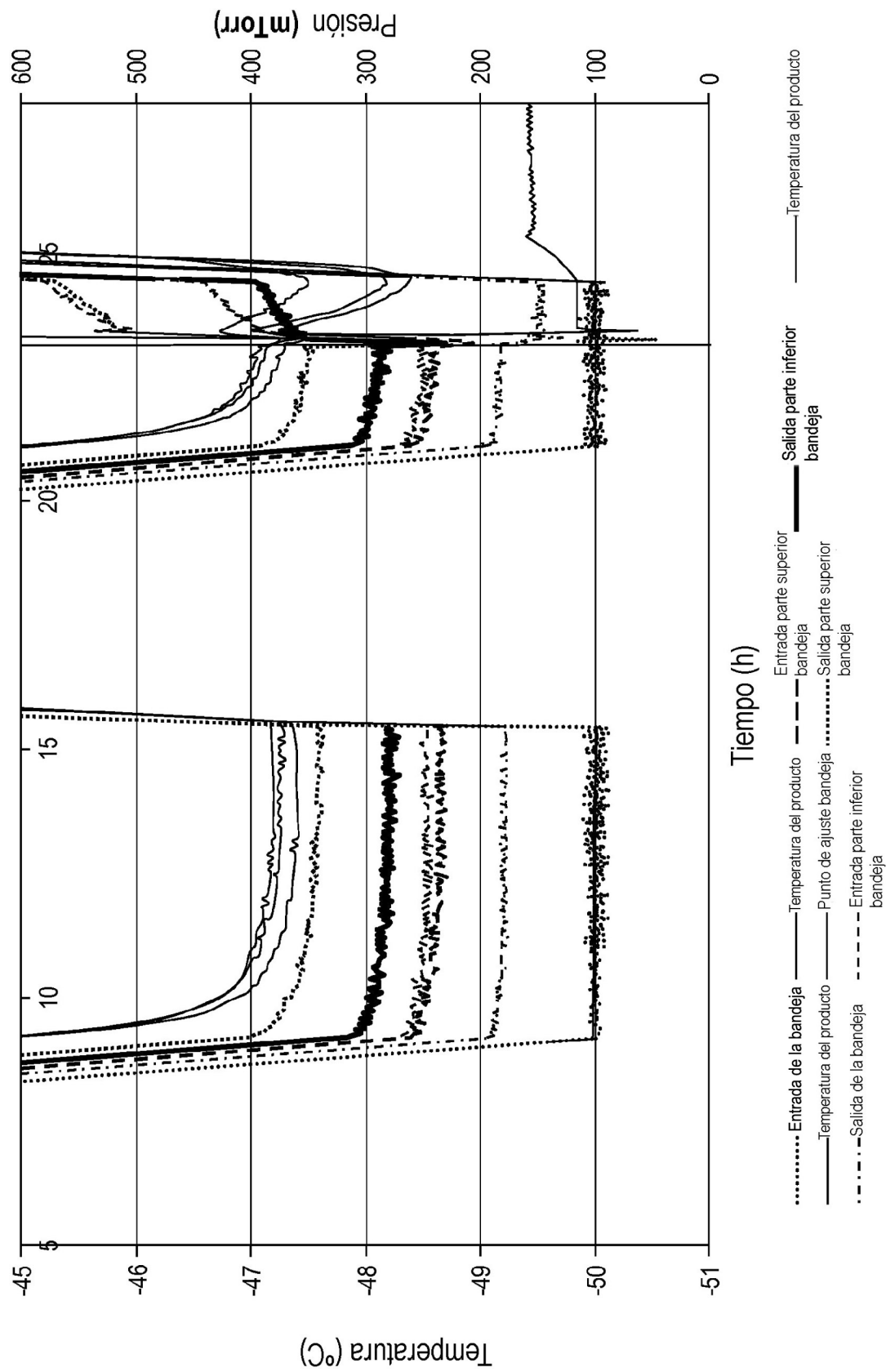


Fig. 16

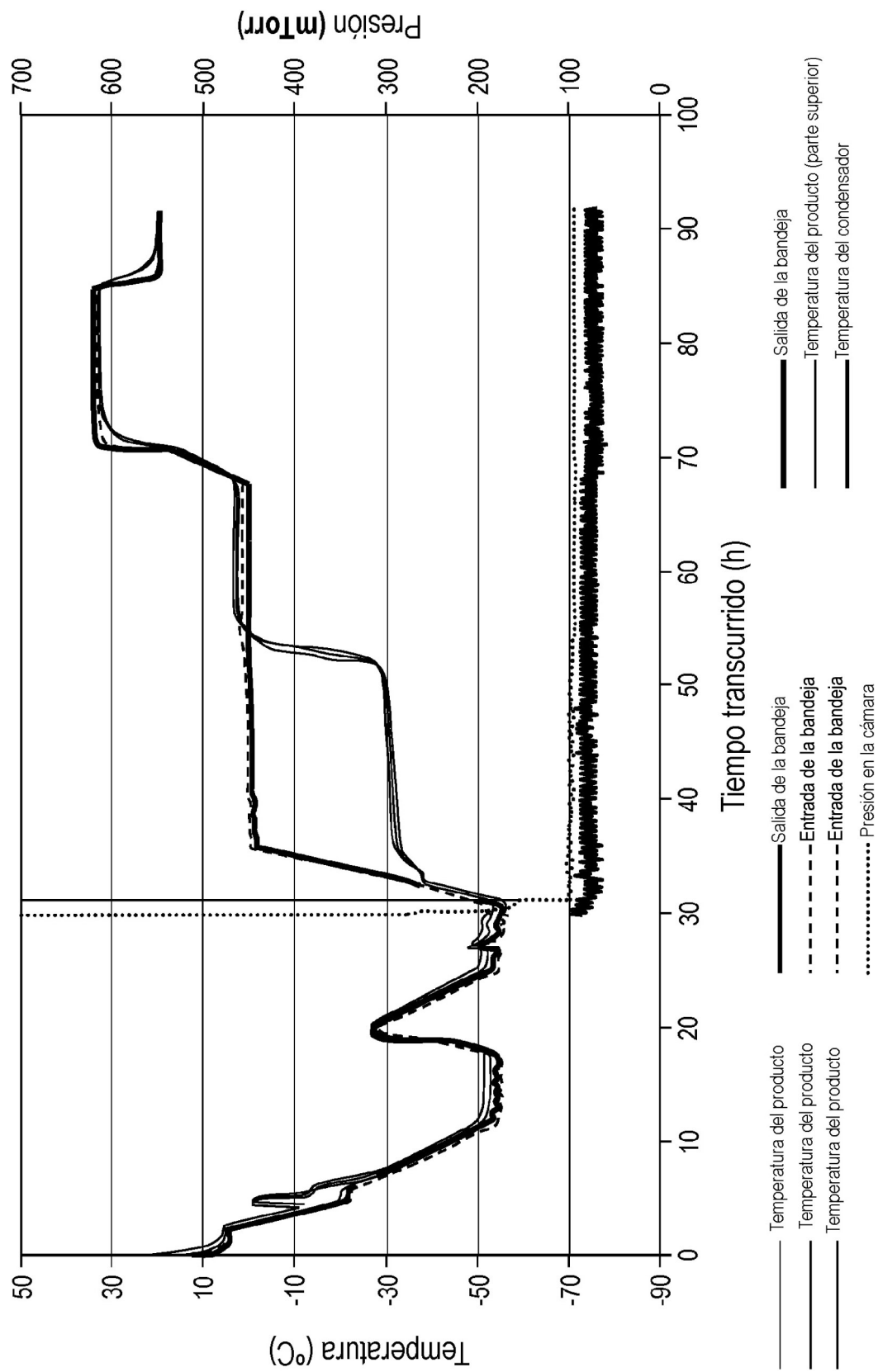


Fig. 17

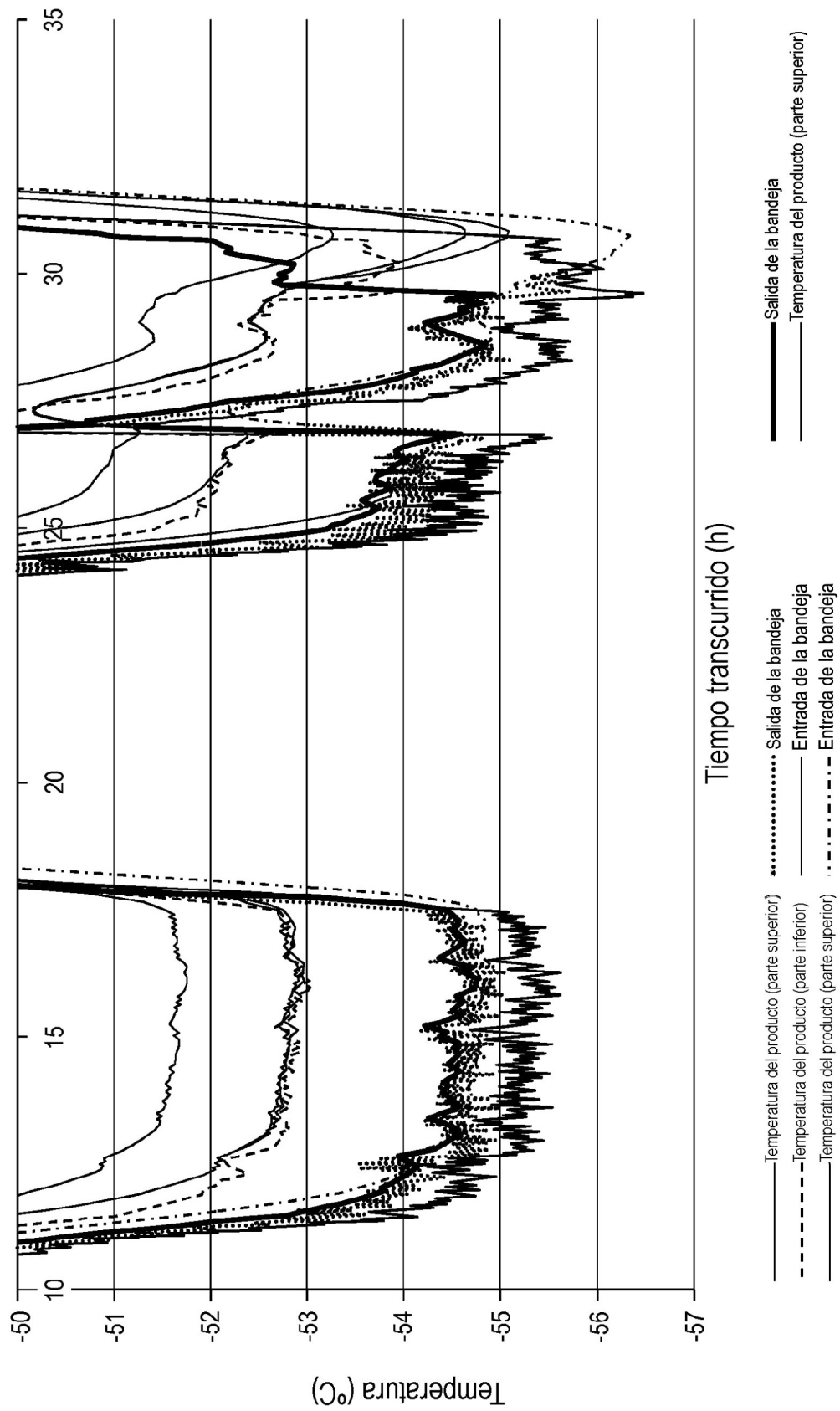


Fig. 18

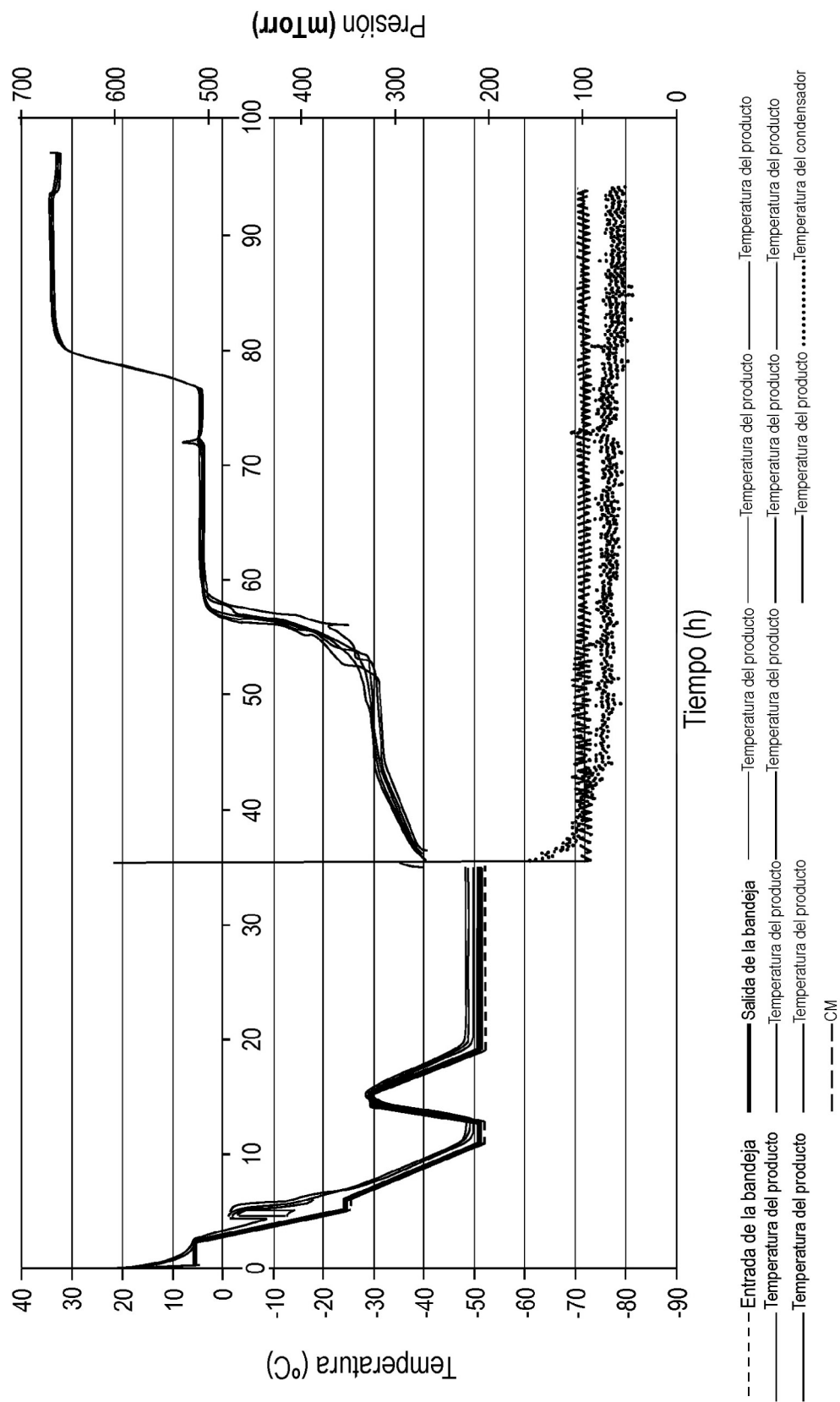


Fig. 19

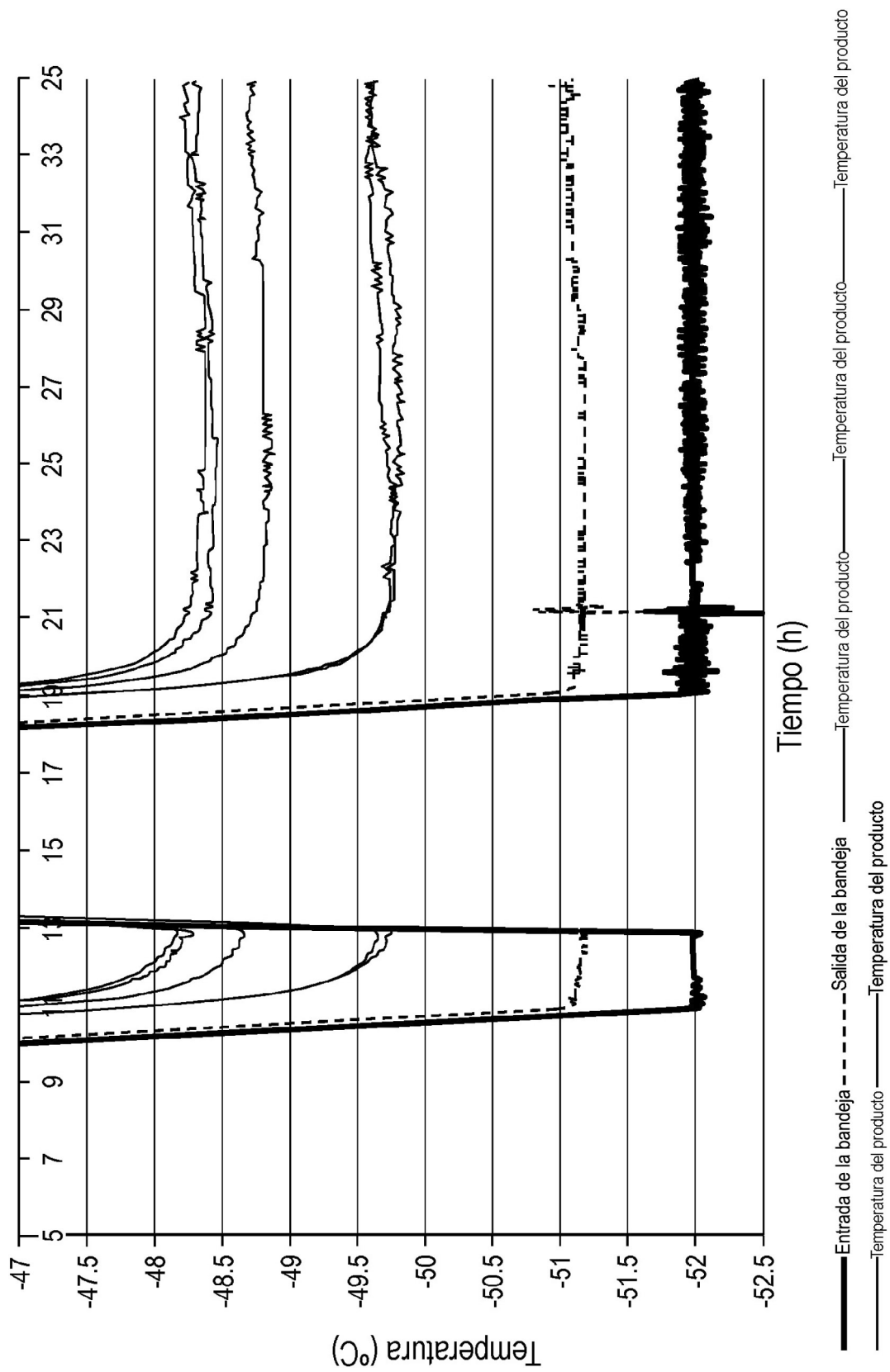


Fig. 20

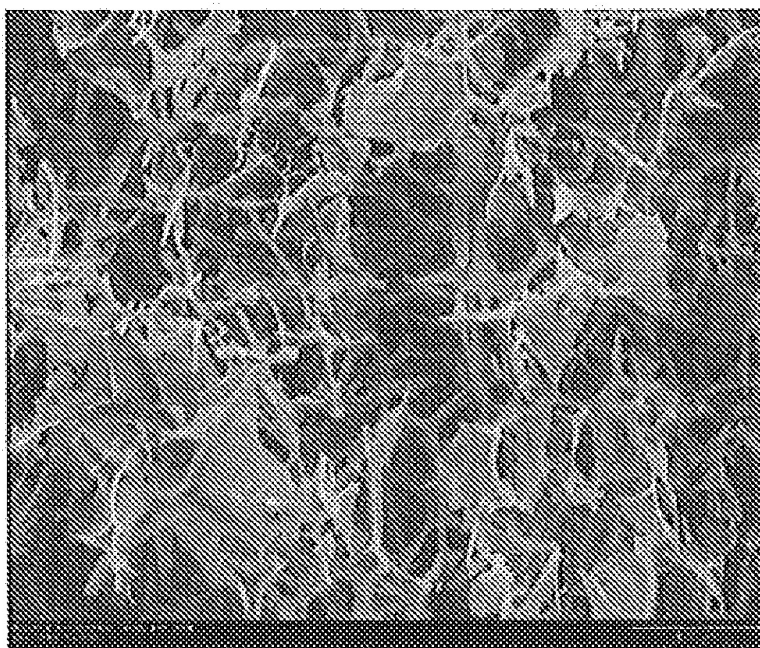


Fig. 21A

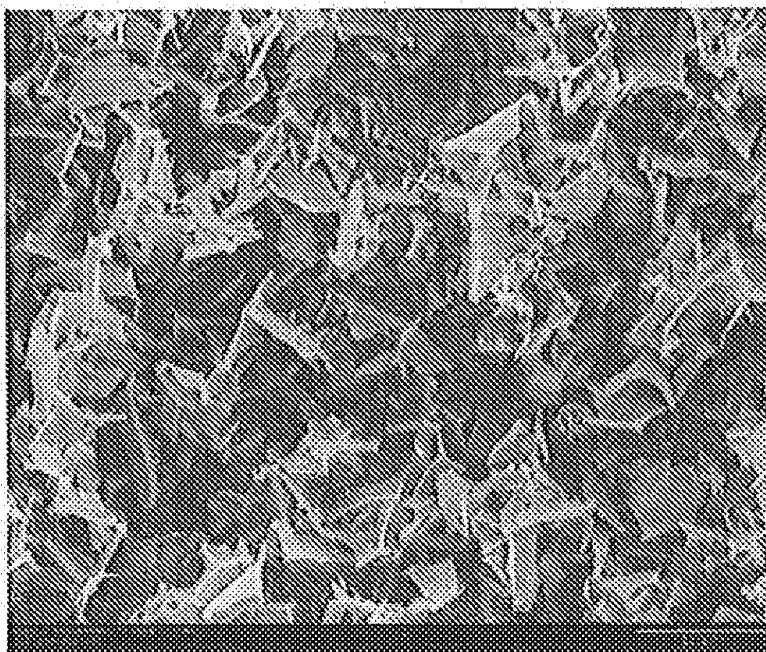


Fig. 21B

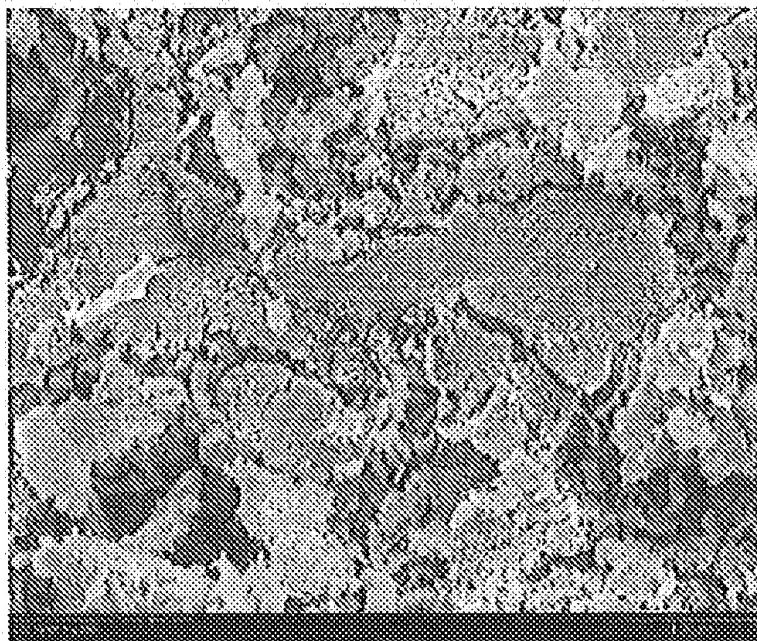


Fig. 22A

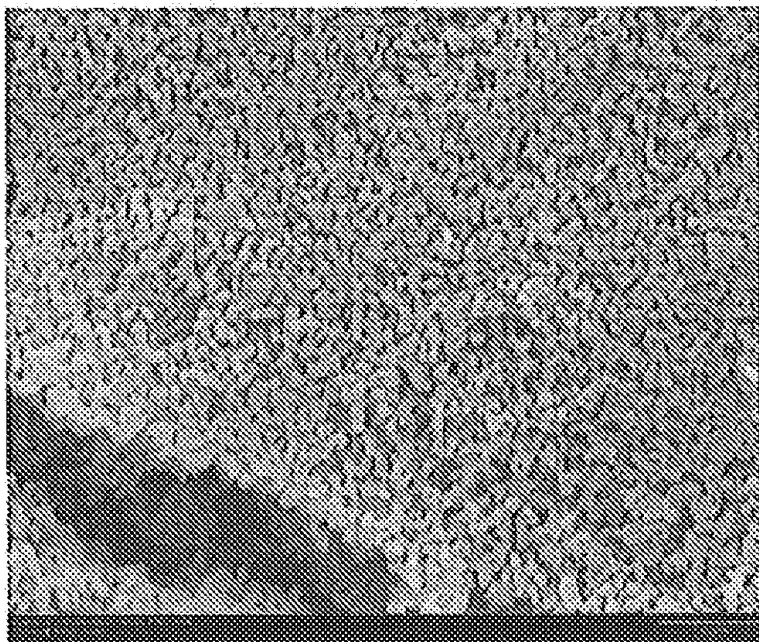


Fig. 22B

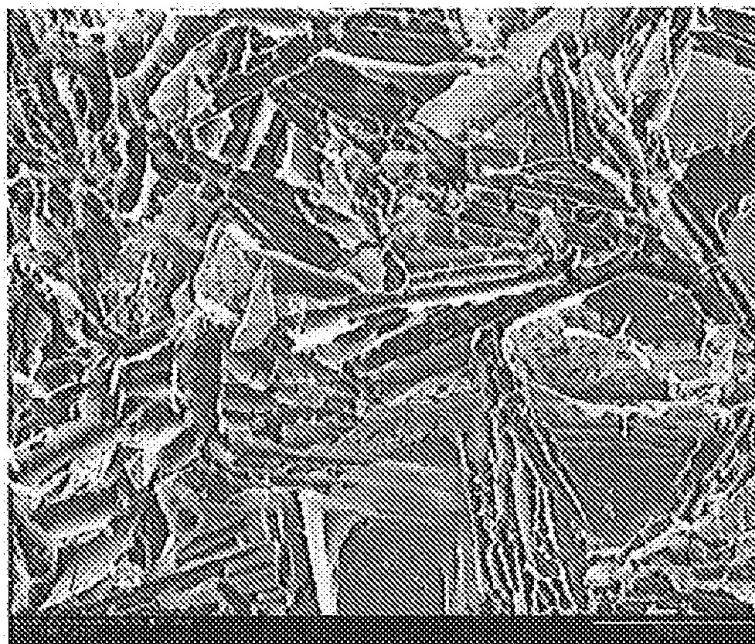


Fig. 23A

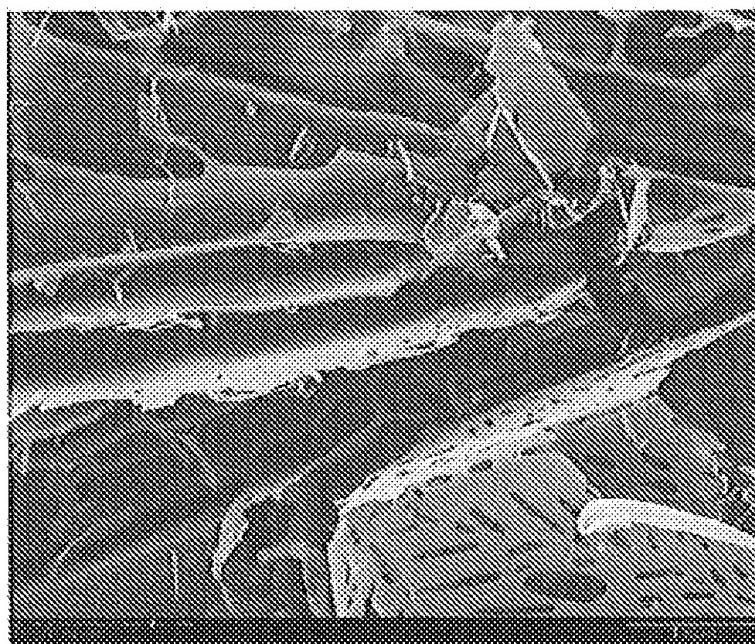


Fig. 23B

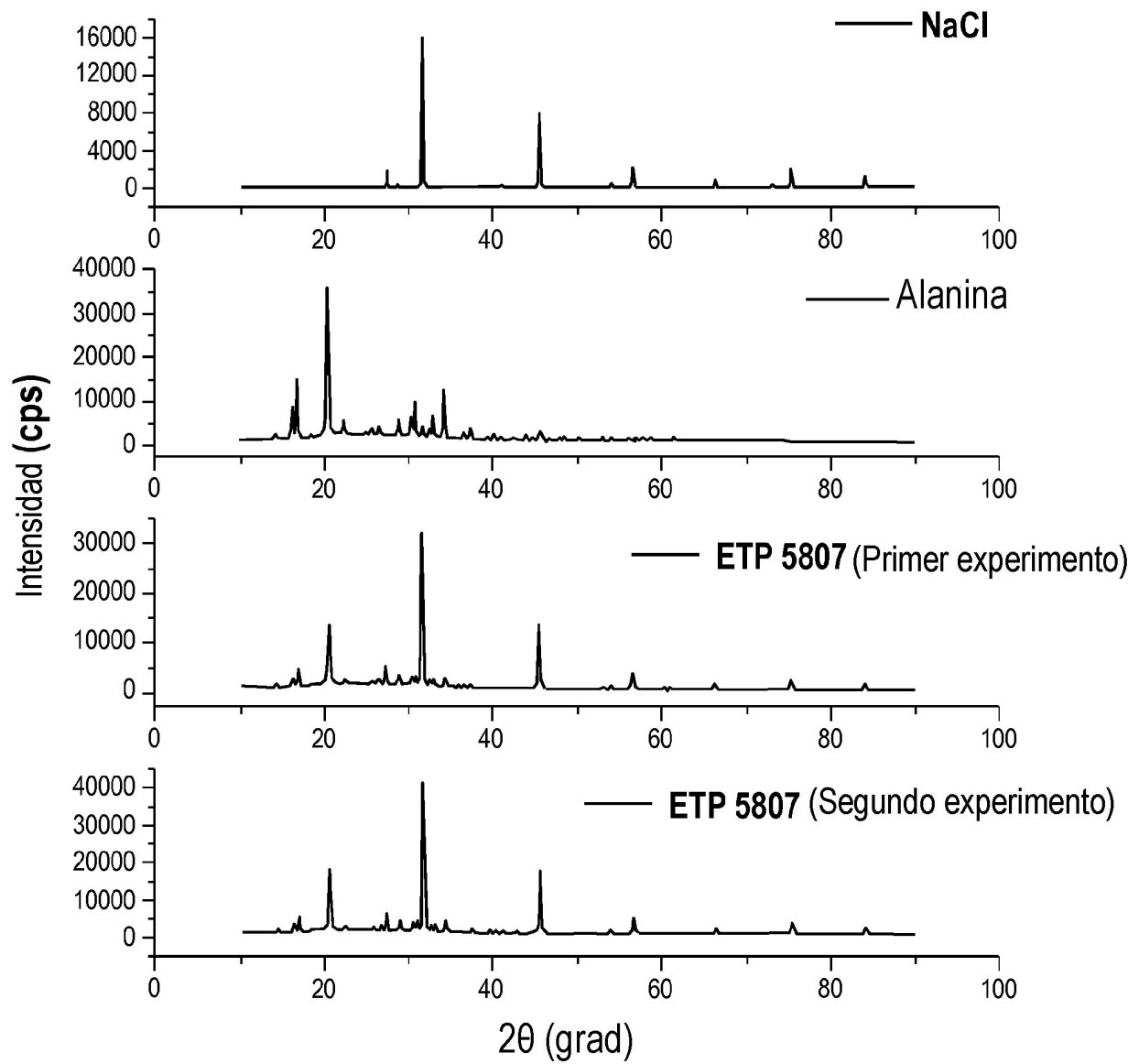


Fig. 24