



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2148923 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 1/04 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.01.14
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.08.22
(86)	Europeisk søknadsnr	08767620.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.05.06
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.02.03
(30)	Prioritet	2007.05.18, US, 930746 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	MedImmune, LLC, One MedImmune Way, Gaithersburg, MD 20878, US-USA
(72)	Oppfinner	VEHRING, Reinhard, 4119 Skymont Drive, Belmont, CA 94002, US-USA AO, Yi, 570 Pena Court, Palo Alto, CA 94306, US-USA
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Preservering av bioaktive materialer ved frysetørket skum
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2003 219 475 US-B1- 6 423 252 WO-A2-2007/038420 MORGAN C A ET AL: "Preservation of micro-organisms by drying; A review" JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL LNKD- DOI:10.1016/J.MIMET.2006.02.017, vol. 66, no. 2, 1 August 2006 (2006-08-01) , pages 183-193, XP025073180 ISSN: 0167-7012 [retrieved on 2006-08-01] PISAL S ET AL: "Vacuum foam drying for preservation of LaSota virus: Effect of additives" AAPS PHARMSCTECH 20060721 US LNKD- DOI:10.1208/PT070360, vol. 7, no. 3, 21 July 2006 (2006-07-21), XP002604339

BESKRIVELSE

KRYSS-REFERANSE TIL RELATERTE SØKNADER

[0001] Dette programmet krever prioritet fra U.S. foreløpig patentsøknad 60/930,746, "Preservation of Bioactive Materials by Freeze Dried Foam" fra Reinhard Vehring, et al., arkivert 18. mai 2007. Denne søknaden er relatert til tidligere U.S. Utility Application 10/412, 630 (nå U.S. patent 7,135,180), "Preservation of Bioactive Materials by Freeze Dried Foam" fra Vu Truong-Le, arkivert 10. april 2003, og til et tidligere U.S. foreløpig søknadsnummer 60/372,236, "Formulations and Methods for Preparation" fra Vu Truong-Le, arkivert 11. april 2002.

OPPFINNELSENS OMRÅDE

[0002] Den foreliggende oppfinnelse er innen feltet for preservering av biologiske materialer ved lagring. Spesielt angår oppfinnelsen, f.eks. preservering av bioaktive molekyler og levedyktige biologiske emner etter glassifisering i en beskyttende tørr skummatrise. Prosesser og systemer gir høy gjenvinning av virus og bakterielevedyktighet.

BAKGRUNNEN TIL OPPFINNELSEN

[0003] Biologiske materialer, som proteiner, eukaryotiske celler, bakterier og virus, er generelt ustabile ved lagring i medier eller andre flytende løsninger. For eksempel mister virus med lipidkapsel, som levende influensavirus framstilt fra egg-allantoid væske, en log med styrke, definert som Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀), på mindre enn to til tre uker ved oppbevaring i kjøleskapstemperatur, dvs. ca 4 °C. Ved romtemperaturforhold (cirka 25 °C) og ved høyere temperaturer, som 37 °C, mister viruset slik styrke i løpet av henholdsvis noen dager til timer. Lyofiliseringsprosesser, hvor vannholdige sammensetninger blir frosset og deretter tørket ved sublimering, brukes ofte til å stabilisere disse biologiske materialene. Fjerning av vann og substituering av beskyttende molekyler, som karbohydrater, kan øke stabiliteten ved å hindre kjemisk nedbrytning, denaturering, og vekst av mikrobielle forurensninger.

[0004] I lyofilisering (frysetørking), blir det biologiske materiale vanligvis blandet som en oppløsning eller suspensjon med beskyttende midler, frosset og deretter

dehydrert ved sublimering og sekundære tørking. De lave temperaturene ved frysing og tørking ved sublimering kan bremse kinetikken til degenereringsreaksjoner. Imidlertid, de lave temperaturer og lave forholdet mellom overflate og volum som er involvert kan kreve lang tørketider. Resultatet er ofte betydelige strukturelle skader ved konvensjonelle frysetørkeprosesser på grunn av den trege frysehastighet og tidsrommet bioaktivt materiale blir holdt i frossen tilstand. Denne skaden kan innebære denaturering, aggregering og andre uønskede fysiske påkjenninger som stammer fra iskrystallstrukturene som dannes under isnukleasjonen og utbredningstrinnene. Av denne grunn utgjør biomaterialer med en cellevegg eller lipidmembran en betydelig utfordring for å bevare bioaktivitet av større og mer komplekse enheter som virus, bakterier og celler.

[0005] I tillegg, selv under optimale frysetørkebetingelser, kan skade oppstå under det sekundære tørketrinnet. En fersk studie har antydnet at skader indusert ved frysetørking hovedsakelig oppstår under det sekundære dehydreringstrinnet når den siste gjenværende mengden med vann blir fjernet (Webb, S.D. Effects of annealing lyophilized and spraylyophilized formulations of recombinant human interferon-gamma. J Pharm Sci 2003 Apr;92(4):715-29). Derfor, er det tilstrekkelig bevis å vise at lyofilisering og sekundære tørkeprosesser, for eksempel, kan tvinge et protein eller celle til å gjennomgå betydelige kjemiske og fysiske endringer. Slike endringer kan resultere i tap av aktivitet til proteinet grunnet konsentrasjon av salter, utfelling/krystallisering, skjærspenninger, pH-ytterpunkter, og restfuktighet gjennom frysetørkingen.

[0006] Beskyttende midler er kjemikalier som er tilsatt en sammensetning for å beskytte celler og molekyler under frysing og for å forbedre stabiliteten under lagring. For eksempel omfatter stabilisatorer for levende virusvaksiner generelt høye konsentrasjoner av sukker som sukrose, mannitol eller sorbitol for å forbedre virusstabiliteten under lyofilisering og lagring. Men med virus med lipidkapsel og andre biologiske emner, penetrerer ikke nødvendigvis de beskyttende midlene tilstrekkelig for å beskytte aktive molekyler i membranvolumet. Det forblir derfor en betydelig utfordring å utvikle en optimal tørkeprosess og sammensetning for å oppnå tilstrekkelig stabilitet for labile biologiske emner.

[0007] Noen av problemene med lyofilisering blir overvunnet av visse tørrskum-preserveringsprosesser. I U.S. patent 5.766.520, Preservation by Foam Formation, fra Bronshtein blir f.eks. biologiske løsninger eller suspensjoner fortykket i et løs-

ningsmiddel ved først å tørke under et moderat vakuum før påføring av et kraftig vakuum for å forårsake skummende koking av gjenværende løsningsmiddel slik at det dannes et tørt stabilt skum. Normalt unngås slik koking ved prosessering av biologisk materiale, på grunn av oksydering og denaturering som kan oppstå på bobleoverflater. I tillegg krever koking, selv under vakuum, krever tilførsel av varme, noe som kan medføre fare for stabiliteten av bioaktivt materiale. Disse problemene er redusert av Bronshtein ved å inkludere beskyttende midler, som karbohydrater og overflateaktive midler, i oppløsningen eller suspensjonen. Tørrskum-preserveringsprosesser av denne typen har fordelen av hurtigere tørking grunnet konveksjon av væsken under kokingen og den økte overflatearealet p grunn av skumboble-overflatene. Likevel kan den varme sekundære tørkingen til lave fuktighetsnivåer redusere levedyktigheten til celler og virus med 90 % eller mer. Rekonstituering av et slikt tørt skum kan skje rask på grunn av nærværet av de hydrofile beskyttende midlene og det store skumoverflatearealet. Det tørre skummet kan bli malt til et fint pulver for å ytterligere forbedre rekonstitueringstidene eller for administrering av det biologiske materialet ved inhalering.

[0008] Tørrskum-preserveringsprosessene beskrevet ovenfor er begrenset i fleksibilitet til å beskytte et utvalg av biologiske materialer. For eksempel utelukker prosessen et frysetrinn (se for eksempel Bronstein i spalte 1, linje 41 - "[f] reezing and other steps of the freeze-drying process are very damaging to many sensitive biological materials.") og påfølgende sublimering av isen som en metode til å fjerne vann fra skummet. Fordi frysing unngås i Bronshtein må sammensetningen bli fortykket før skumming og tørking, slik at store mengder vann ikke går tapt, sammen med latent varme, for å fryse skummet. For å unngå frysing kreves det at prosessen utføres ved lavere vakuumnivå (7-24 Torr) enn ved konvensjonelle frysetørkings eller spray-frysetørkings prosesssykluser. Koking i Bronshtein krever tilførsel av signifikante, og mulige destabiliserende, mengder med varme for å gi den nødvendige utbrudd av skum.

[0009] Bronshtein tørrskum-prosessen er ikke spesielt godt tilpasset for bevaring av biologiske materialer med lipidmembraner. For eksempel er ikke prosessen godt tilpasset for preservering av biologiske emner, som liposomer, virus eller levedyktige celler. Lipidmembraner hindrer ofte inntrengning av de beskyttende midlene i lukkede volumer eller forhindrer tilstrekkelig fjerning av vann fra det innelukkede volumet. Uten tilstrekkelig penetrasjon av beskyttende midler, kan enzymatiske prosesser som proteolyse, og kjemiske prosesser som oksydasjon og angrep av frie

radikaler, ødelegge aktiviteten eller levedyktigheten av det biologiske materialet. Hypoosmotiske væsker som blir igjen inne i volumer lukket av membranen kan fremme ustabilitet av det biologiske materialet. Varm sekundærtørking kan drepe celler.

[0010] Det gjenstår et behov for metoder for å preservere biologisk materiale, som proteiner, virioner og celler ved lagring, spesielt ved temperaturer over frysepunktet. Metoder for å preparere tørrskum-preserveringsmatriser gjennom prosesser som gir tilstrekkelig tørking, uten eksponering for varme temperaturer, ville være ønskelig. Sammensetninger som kan beskytte slike biologiske emner ved lagring ville gi fordeler innen medisin og forskning. Foreliggende oppfinnelse gir disse og andre egenskaper som vil fremgå ved gjennomgang av følgende.

SAMMENDRAG OVER OPPFINNELSEN

[0011] Den foreliggende oppfinnelse omfatter en fremgangsmåte og et system for preservering av materialer, som peptider, proteiner, nukleinsyrer, antistoffer, vaksiner, bakterier, virus, liposomer, blodplater og/eller cellesuspensjoner, ved lagring. Oppfinnelsen gir en fremgangsmåte i samsvar med krav 1 i dette dokumentet.

Metoden kan varierende omfatte f.eks. frysing av skummet før tørking, inkludering av skummemidler i sammensetningen, holde sammensetningen ved faseovergangstemperaturen til en lipidmembran for å forbedre penetrering av beskyttende midler, utvidelse av sammensetningen ved trykk mellom ca 200 Torr og 25 mTorr, sekundær tørking av skum i form av et tynt lag, og/eller tørking av skummet ved en relativt lav temperatur, for eksempel romtemperatur eller lavere.

[0012] Det bioaktive materialet kan være, for eksempel, et peptid, protein, nukleinsyre, antistoffer, vaksiner, bakterier, virus, liposomer, blodplater og/eller cellesuspensjoner.

For bioaktive materialer som omfattende volumer omsluttet i en lipidmembran, kan det være foretrukket å holde sammensetningen eller skummet ved en temperatur innenfor 2 °C av membranens overgangstemperatur for det bioaktive materialet i 2 eller flere minutter før ekspandering av skummet.

[0013] I foretrukne utførelsesformer av lavtemperatur-tørkemetoder, omfatter de bioaktive materialene peptider, proteiner, nukleinsyrer, antistoffer, vaksiner, bakterier, virus, liposomer, blodplater og/eller celleduspensjoner. I en utførelsesform, omfatter det bioaktive materialet et virus eller bakterier, for eksempel en *listeria-bakterie* eller en stamme *influensavirus*. I en utførelsesform er *listeriatypen listeria monocytogenes*. I en annen utførelsesform, brukes en svekket stamme av *listeria monocytogenes*. I enda en annen utførelsesform, brukes en stamme av *listeria monocytogenes* rekombinant konstruert som en vaksine for å uttrykke et antigen peptid. Konstruksjon av *listeria*-baserte vaksiner, deriblant tilbehørssekvenser, er gitt i detalj i U.S. Provisional Patent Application Nos. 60/532,696, 60/602,588, 60/615,548 og 60/617,564, med tittelen "EphA2 Vaccines", arkivert henholdsvis 24. desember 2003, 18. august 2004, 1. oktober 2004 og 7. oktober 2004, U.S. Provisional Application Nos. 60/556,631, 60/615,470 og 60/617,544, med tittelen "Listeria-based EphA2 Vaccines", arkivert 26. mars 2004, 1. oktober 2004 og 7. oktober 2004 og internasjonale publikasjoner nr. WO 2005/067460 og WO 2005/037233.

I nok en annen utførelsesform, er stammene med *influensavirus* influensa A- og B-virus. I en annen utførelsesform, er stammene med *influensavirus* dempet for bruk som levende vaksiner.

[0014] I foretrukne metoder har skummet en tykkelse på 2 mm eller mindre, f.eks., for rask sekundær tørking ved lave temperaturer, på f.eks. 25 °C eller mindre, 20 °C eller mindre, 15 °C eller mindre. Det er foretrukket for sluttproduktets stabilitet at skummet tørkes i et tidsrom tilstrekkelig til å redusere skummet til en restfuktighet på 10 prosent eller mindre, 5 prosent eller mindre, 3 prosent eller mindre eller 1 prosent eller mindre. Det er ofte å foretrekke at den sekundære tørketemperatur forblir under glassomvandlingstemperaturen til skum-polyol-matrisen. Det er ofte å foretrekke at den primære tørkingen og/eller sekundære tørkingen omfatter fjerning av oppløsningsmidler ved et trykk på 100 Torr eller mindre, 50 Torr eller mindre, 10 Torr eller mindre, 1 Torr, 100 mTorr, 10 mTorr eller mindre, f.eks. for å øke hastigheten av fjerning av fuktighet fra skummet ved lave temperaturer.

[0015] Det tørkede skummet kan være i form av ark eller store partikler. Eventuelt kan det tørkede skum males til et pulver med en gjennomsnittlig partikkelstørrelse fra, f.eks. ca 0,1 µm til omtrent 100 µm, for lagring eller for administrering ved in-

halering. Eventuelt kan skummet bli administrert til et pattedyr som en rekonstituert væske, f.eks. ved injeksjon.

[0016] Den foreliggende oppfinnelsen omfatter systemer for effektivt å gjennomføre metodene for preparering av stabile tørrskum-sammensetninger. For eksempel kan systemer som tillater rask sekundær tørking ved relativt lave temperaturer, som for eksempel 20 °C eller mindre, åpent utsette skummet for et kraftig vakuum i form av et tynt ark. Et system for fremstilling av en stabil tørr skumsammensetning av bioaktivt materiale kan omfatte et miljø-kontrollkammer som gir kontroll over interne temperaturer og innvendig trykk, og et skum inne i kammeret som omfatter et bioaktivt materiale, og en polyol eller polymer, i et løsningsmiddel. Tørkingen kan aksellereres ved å gi skummet en tykkelse på 2 mm eller mindre, og/eller et sideforhold (bredde eller lengde i forhold til tykkelse) på 10 eller mer, eller en tykkelse på 1 mm eller mindre og/eller et sideforhold på 100 eller mer. Skummet tørkes fortrinnsvis til en 10 prosent restfuktighet eller mindre, ved en temperatur på 25 °C eller mindre, i løpet av en periode på 2 dager eller mindre.

[0017] Med hensyn til metodene, kan det bioaktive materialet til systemene være ethvert bioaktivt materiale. Men systemene gir kjente fordeler særlig til levedyktigheten til virus eller bakterier, f.eks. listeriabakterien eller stammer av influensavirus. I en utførelsesform er listeriatypen *listeria monocytogenes*. I en annen utførelsesform, brukes en svekket stamme av *listeria monocytogenes*. I enda en annen utførelsesform, brukes en stamme av *listeria monocytogenes* rekombinant konstruert som en vaksine for å uttrykke et antigen peptid. I nok en annen utførelsesform, er stammene med influensavirus influenza A- og B-virus. I en annen utførelsesform, er stammene med influensavirus dempet for bruk som levende vaksine.

[0018] Den foreliggende oppfinnelse omfatter stabile tørrskum-sammensetninger. For eksempel kan sammensetningene omfatte: peptider, proteiner, nukleinsyrer, antistoffer, vaksiner, bakterier, virus, liposomer, blodplater og/eller celleduspensjoner, i en tørr skummatrise omfattende en restfuktighet på 10 prosent eller mindre, hvori matrisen omfatter en polyol og/eller polymer, og hvor det tørre skummet ble fremstilt fra en flytende sammensetning av det bioaktive materiale med mindre enn en 0,5 log10 tap av levedyktighet. Slik opprettholdt levedyktighet kan lett oppnås som beskrevet heri, selv ved tørking av skummet til en restfuktighet på 5 prosent eller mindre. I en utførelsesform kan det bioaktive materialet med virus eller bakterier for eksempel omfatte en *listeria*-bakterie eller en stamme influensavirus. I en

utførelsesform er listeriatypen *listeria monocytogenes*. I en annen utførelsesform, brukes en svekket stamme av *listeria monocytogenes*. I enda en annen utførelsesform, brukes en stamme av *listeria monocytogenes* rekombinant konstruert som en vaksine for å uttrykke et antigen peptid, dvs. at aktuelt peptid ikke er et opprinnelig *listeria*-peptid. I nok en annen utførelsesform, er stammene med influensavirus influenza A- og B-virus. I en annen utførelsesform, er stammene med influensavirus dempet for bruk som levende vaksine. Virusene eller bakteriene kan f.eks. omfatte en *listeria*-bakterie eller en stamme influensavirus. I foretrukne utførelsesformer av prosessen er tap av levedyktighet mindre enn en 0,5 log₁₀ tap, mindre enn en 0,3 log₁₀ tap, mindre enn en 0,1 log₁₀ tap, dvs. oppnådd ved hjelp av metoder og/eller systemer ifølge foreliggende oppfinnelse.

DEFINISJONER

[0019] Det skal forstås at denne oppfinnelsen ikke er begrenset til bestemte systemer eller metoder, som, selvfølgelig, kan variere. Det skal også forstås at terminologien som brukes heri kun er for det formål å beskrive spesielle utførelsesformer, og er ikke ment å være begrensende. Som brukt i denne beskrivelsen og de vedlagte krav, omfatter entallsformer som "en", "et" og "den", "det" flertallsreferanser, med mindre innholdet klart tilsier noe annet. Derfor omfatter, for eksempel, referanse til "en overflate" en kombinasjon av to eller flere overflater, referanse til "bakterie" omfatter blandinger av bakterier og lignende.

[0020] Med mindre annet er definert, har alle tekniske og vitenskapelige begreper som brukes heri, samme betydning som vanligvis forstått av en med vanlige kunnskaper innen faget som oppfinnelsen vedrører. Selv om alle metoder og materialer lik eller tilsvarende de som er beskrevet heri kan brukes ved praktisering av den foreliggende oppfinnelsen uten unødig eksperimentering, er de foretrukne materialer og metoder beskrevet heri. Ved beskrivelse av og krav for den foreliggende oppfinnelsen vil følgende terminologi bli brukt i samsvar med definisjonene nedenfor.

[0021] "Omgivelser" - temperaturer eller betingelser som til enhver tid finnes i et gitt miljø. Vanligvis, er omgivelses-romtemperatur 22 °C, omgivelses-atmosfæretrykk, og omgivelses-luftfuktighet kan lett måles og vil variere avhengig av tiden på året, værforhold, høyde over havet osv.

[0022] "Koking" refererer f.eks. til den raske faseovergangen fra væske til gass som skjer når temperaturen til en væske er over dens koketemperatur. Koketemperaturen er, som vel kjent for fagfolk innen bransjen, temperaturen hvor damptrykket til en væske er lik det påførte trykket. Kokingen kan være særlig sterk når varme blir tilført til en væske som er på sitt kokepunkt.

[0023] "Buffer" refererer til en bufret løsning som motstår endringer i pH ved virkningen av sine syre-base konjugat-komponenter. pH til bufferen vil generelt bli valgt for å stabilisere det aktive valgte materialet, og vil kunne fastsettes av de i bransjen. Vanligvis vil denne være i samme størrelsesorden som fysiologisk pH, selv om noen proteiner kan være stabile ved et bredere område med pH-verdier, for eksempel sur pH. Dermed er foretrukne pH-områder fra omkring 1 til omkring 10, med fra omkring 3 til omkring 8 som spesielt foretrukket, mer foretrukket fra omkring 6,0 til omkring 8,0, ennå mer foretrukket fra omkring 7,0 til omkring 7,4, og mest foretrukket, på omkring 7,0 til omkring 7,2. Egnede buffere inkluderer en pH 7,2 fosfatbuffer og en pH 7,0 sitratbuffer. Som det vil forstås av de i bransjen, er det et stort antall egnede buffere som kan benyttes. Egnede buffere omfatter, men er ikke begrenset til, kaliumfosfat, natriumfosfat, natriumacetat, histidin, imidazol, natriumcitrat, natriumsuksinat, ammoniumbikarbonat og karbonat. Vanligvis brukes buffere ved molariteter fra omkring 1 mM til ca 2 M, med fra omkring 2 mM til omkring 1 M foretrukket, og fra omkring 10 mM til omkring 0,5 M spesielt foretrukket, og 25 til 50 mM som særlig foretrukket.

[0024] "Avgassing" refererer til frigjøring av en gass fra oppløsning i en væske når partialtrykket til gassen er større enn det påførte trykket. Hvis vann blir eksponert for nitrogengass ved én atmosfære (ca. 760 Torr), og partialtrykket til nitrogen i vannet når likevekt med gassfasetrykket, kan nitrogenet boble fra vannet hvis gasstrykket reduseres. Dette er ikke koking, og kan ofte skje ved trykk over et trykk som ville koke et løsningsmiddel. For eksempel bobler det raskt i bruflasker, med et høyt partialtrykk av CO₂-gass, (men bruksen koker ikke) når trykket reduseres ved å fjerne korken.

[0025] "Dispergerbarhet" betyr i hvilken grad en pulverammensetning kan dispergeres (dvs. suspenderes) i en luftstrøm, slik at de dispergerte partiklene kan respirert eller inhalert inn i lungene til et individ. Dermed betyr det at et for pulver som bare er 20 % dispergerbart, kan kun 20 % av massen av partikler suspenderes for inhalering inn i lungene.

[0026] "Tørr" i konteksten med tørkede skumsammensetninger, refererer til restfuktighet på mindre enn omtrent 10 %. Tørkede skumsammensetninger blir vanligvis tørket til restfuktigheter på 5 % eller mindre, eller mellom omtrent 3 % og 0,1 %. Et "tørt skum" kan være et stabilisert skum med mindre enn 10 % restfuktighet, et skum etter primærtørking, og/eller et skum etter sekundærtørking. "Tørr" i sammenheng med partikler for inhalering betyr at sammensetningen har et fuktighetsinnhold slik at partiklene er lett dispergerbare i en inhaleringsinnretning for å danne en aerosol. Primærtørking, med hensyn til prosesser beskrevet heri, refererer til tørking som finner sted fra tidspunktet for initiell frysing av skummet til punktet der sekundærtørking starter. Vanligvis vil hoveddelen av primærtørking finne sted ved sublimering ved frysetemperaturer. Sekundærtørking, med hensyn til prosesser som er beskrevet heri, refererer til tørking som finner sted ved temperaturer over frysetemperaturer (f.eks. 0 °C eller frysepunktet for det frosne sammensetningen). I en typisk fryse-skumtørkeprosess, vil et sekundært tørkettrinn bringe skummet fra en restfuktighet på omtrent 25 prosent til en restfuktighetsverdi på 10 prosent eller mindre.

[0027] "Hjelpestoffer" eller "beskyttende midler" (inkludert cryo-beskyttende midler og lyo-beskyttende midler) refererer vanligvis til forbindelser eller materialer som er tilsatt for å sikre eller øke stabiliteten av det terapeutiske midlet under spray frysetørkingsprosessen og etterpå, for langsiktig stabilitet og flyteevne til pulverproduktet. Egnede hjelpestoffer er generelt relativt frittstrømmende partikkelformete faste stoffer, som ikke tykner eller polymeriserer ved kontakt med vann, som i hovedsak er ufarlige ved inhalering av en pasient, og ikke signifikant samhandle med det terapeutiske middel på en måte som endrer den biologiske aktiviteten. Egnede hjelpestoffer er beskrevet nedenfor og omfatter, men er ikke begrenset til, proteiner som humant og bovint serumalbumin, gelatin, immunglobuliner, karbohydrater inkludert monosakkarider (galaktose, D-mannose, sorbose osv.), disakkarider (laktose, trehalose, sukrose osv.), cyclodekstriner og polysakkarider (raffinose, maltodekstriner, dextraner osv.), en aminosyre som mononatriumglutamat, glycin, alanin, arginin eller histidin, samt hydrofobiske aminosyrer (tryptofan, tyrosin, leucin, fenylalanin osv.), et metylamin som for eksempel betaine, et hjelpestoffs salt slik som magnesiumsulfat, en polyol slik som trihydriske eller høyere sukkeralkoholer, f.eks. glycerin, erytritol, glycerol, arabitol, xylitol, sorbitol og mannitol, propylen-glykol, polyetylen glykol, pluronikke midler, overflateaktive midler, og kombinasjoner av disse.

[0028] "Glass" eller "glassaktig tilstand" eller "glassaktig matrise" refererer til en væske som har mistet sin evne til å flyte, dvs. en væske med en meget høy viskositet, hvori viskositetsområdet varierer fra 10^{10} til 10^{14} Pascal-sekunder. Det kan sees på som et metastabilt amorft system der molekylene har vibrasjonell bevegelse, men har svært langsom (nesten uendelige) rotasjons- og translasjonkomponenter. Som etn metastabilt system, er den stabil i lange tidsperioder når lagret godt under glassomvandlingstemperaturen. Fordi glass ikke er i en tilstand av termodynamisk likevekt, vil glass som lagres ved temtemperaturer på eller nær glassomvandlingstemperaturen slippe av til likevekt og miste sin høye viskositet. Den resulterende, gummiaktige eller siruplignende, flytende væsken er ofte kjemisk og strukturelt destabilisert. Mens et glass kan oppnås ved mange forskjellige framgangsmåter, synes det å være fysisk og strukturelt det samme materialet, på et mikronivå, uavhengig av framgangsmåten som er brukt. Det er likevel vert å legge merke til at fryse-skummene ifølge oppfinnelsen omfatter, f.eks., en skummet åpen celle og/eller lukket celle makrostruktur ikke funnet i tidligere kjente frysetørkede materialer. Prosessen som brukes til å oppnå en glassaktig matrise for formålene til denne oppfinnelsen er generelt en løsningsmiddelsublimering og/eller fordampningsteknikk.

[0029] "Glassovergangstemperaturen" er representert ved symbolet T_g og er den temperatur ved hvilken en sammensetning endres fra en glassaktig eller vitrøs tilstand til en sirupslignende eller gummiaktig tilstand. Vanligvis bestemmes T_g ved bruk av differensial-skannekalorimetri (DSC) og er som standard regnet som den temperaturen ved hvilken startende endring av varmekapasitet (C_p) til sammensetningen skjer ved skanning gjennom overgangen. Definisjonen av T_g er alltid vilkårlig og det er ingen gjeldende internasjonal konvensjon. T_g kan defineres som oppstart, midtpunkt eller endepunkt av overgangen, for denne oppfinnelsens formål vil vi bruke oppstart av endringene i C_p ved bruk av DSC. Se artikkelen med tittelen "Formation of Glasses from Liquids and Biopolymers" av C.A. Angell: Science, 267, 1924-1935 (31. mars 1995) og artikkelen med tittelen "Differential Scanning Calorimetry Analysis of Glass Transitions" av Jan P. Wolanczyk: Cryo-Letters, 10, 73-76 (1989). For detaljert matematisk omtale, se "Nature of the Glass Transition and the Glassy State" av Gibbs og DiMarzio: Journal of Chemical Physics, 28, NO. 3, 373-383 (Mars, 1958).

[0030] "Penetreringsforbedrere" er overflateaktive forbindelser som fremmer penetrering av et medikament gjennom en slimhinne eller membran og kan generelt benyttes der denne egenskapen er ønskelig, f.eks, intranasalt, intrarektalt og intravaginalt.

[0031] "Farmasøytisk akseptabel" eksipienter (kjøretøy, tilsetningsstoffer) er de som med rimelighet kan administreres til et pattedyr for å gi en effektiv dose av den aktive bestanddelen som anvendes. Fortrinnsvis er dette hjelpestoffer som Federal Drug Administration (FDA) hittil har utpekt som "Generally Regarded as Safe" (GRAS).

[0032] "Farmasøytisk preparat" refererer til preparater som er i en slik form at den tillater den biologiske aktiviteten til de aktive ingrediensene for å være entydig effektive, og som ikke inneholder noen tilleggskomponenter som er giftig til individene som sammensetningen skal administreres til.

[0033] Et "polyol" er et organisk stoff med flere hydroksylgrupper, og inkluderer, f.eks. sukkere (reduserende og ikkereduserende sukkere), sukkeralkoholer og sukkersyrer. Foretrukne polyoler heri har en molekylvekt som er mindre enn ca 600 kDa (f.eks. i området fra omtrent 120 til omtrent 400 kDa). Et "reduserende sukker" er en polyol som inneholder en hemiacetalgruppe som kan redusere metallioner eller reagere kovalent med lysin og andre aminogrupeer i proteiner. Et "Ikkereduserende sukker" er et sukker som ikke har disse egenskapene til et reduserende sukker. Eksempler på reduserende sukkere er fruktose, mannose, maltose, laktose, arabinose, xylose, ribose, rhamnose, galaktose og glukose. Ikkereduserende sukkerer omfatter sukrose, trehalose, sorbose, melezitose og raffinose. Mannitol, xylitol, erytritol, threitol, sorbitol og glyserol er eksempler på sukkeralkoholer. Med hensyn til sukkersyrer, inkluderer disse L-glukonat og metallsalter derav.

[0034] Et "pulver" er en sammensetning som består av fint dispergerte faste partikler som er relativt frittstrømmende og istand til å lett å bli dispergert i en inhaleringsinnretning og deretter inhaleret av en pasient, slik at partiklene er egnet for intranasal eller pulmonær administrering via de øvre luftveier, inkludert neseslimhinnen.

[0035] "Anbefalt lagringstemperatur" for en sammensetning er temperaturen (T_s) hvor det pulveriserte medikamentmaterialet kan lagres for å opprettholde stabilitet.

ten av legemidlet over levetiden til sammensetningen for å sikre en konsekvent avgitt dose. Denne temperaturen blir opprinnelig bestemt av produsenten av sammensetningen og godkjent av det statlige organet ansvarlig for godkjenning av sammensetningen for markedsføring (f.eks. Food and Drug Administration i USA). Denne temperatur vil variere for hvert godkjent legemiddelprodukt avhengig av temperaturfølsomheten for det aktive legemidlet og andre materialer i produktet. Den anbefalte lagringstemperaturen vil variere fra omtrent 0 °C til omtrent 40 °C, men vil generelt være omgivelsestemperatur, dvs. omtrent 25 °C. Vanligvis vil et medikamentprodukt bli holdt ved en temperatur som er ved eller under den anbefalte lagringstemperaturen.

[0036] Et biologisk aktivt materiale "beholder sin biologiske aktivitet" i et farmasøytisk preparat, hvis den biologiske aktiviteten til det biologisk aktive materialet, som et enzym, på et gitt tidspunkt er innenfor omtrent 10 % (innenfor feilene av analysen) av den biologiske aktiviteten vist på tidspunktet når det farmasøytiske preparatet ble fremstilt som bestemt i f.eks. en bindingsanalyse. I tilfelle levende virus eller bakterier, kan biologisk aktivitet anses som beholdt når viral titer eller kimtall til blandingen er innen én log av innledende titer eller tall. For levende celler anses biologisk aktivitet beholdt når levende celletall til sammensetningen er innenfor 50 % av den opprinnelige tellingen. Analysen som blir brukt til å bestemme levende influensavirus titer er Fluorescent Focus Assay (FFA-analyse). Titer fra denne analysen blir rapportert som log Fluorescent Focus Unit per milliliter (log FFU/ml). Én log FFU/ml er omtrent lik én log Tissue Culture Infectious Dose per ml (log TCID50/ml). Andre "biologisk aktivitet" -analyser er utdypet nedenfor.

[0037] Et biologisk aktivt materiale "beholder sin kjemiske stabilitet" i en farmasøytisk sammensetning hvis den kjemiske stabilitet ved et gitt tidspunkt er slik at det biologisk aktive materialet blir vurdert å beholde sin biologiske aktivitet, som definert heri. Kjemisk stabilitet kan vurderes ved å detektere og kvantifisere kjemisk endrede former av det biologisk aktive materialet. Kjemisk endring kan innebære modifisering av størrelse (f.eks. klipping av proteiner), som kan evalueres ved hjelp av gelfiltrerings-kromatografi, SDS-PAGE og/eller matrise-assistert laserdesorpsjon ionisering/flyvetidsmassespektrometri (MALDI/TOF MS), for eksempel. Andre typer kjemisk endring inkluderer ladningsendring (f.eks. forekommende som et resultat av deamidering), som kan evalueres ved ionutvekslings-kromatografi, for eksempel.

[0038] Et biologisk aktivt materiale "beholder sin fysiske stabilitet" i en farmasøytisk sammensetning dersom det viser ingen signifikant økning i aggregering, persivering og/eller denaturering ved visuell undersøkelse av farge og/eller klarhet, eller målt ved UV-lysspredning eller gelfiltrerings-kromatografi.

[0039] En "stabil" sammensetning eller preparat er ett hvori det biologisk aktive materialet deri hovedsak beholder dets fysiske stabilitet og/eller kjemiske stabilitet og/eller biologiske aktivitet ved lagring. Ulike analyseteknikker for måling av stabilitet er tilgjengelig i bransjen og er gjennomgått, for eksempel i Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) og Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Stabilitet kan måles ved en valgt temperatur i en valgt tidsperiode. Trendanalyse kan brukes til å estimere en forventet holdbarhet før et materiale faktisk har vært lagret for denne tidsperioden. For levende influensavirus defineres stabilitet som tiden det tar å miste 1 log av FFU/ml eller 1 log TCID₅₀/ml. Fortrinnsvis er sammensetningen stabil ved romtemperatur (~ 25 °C) i minst tre måneder, eller ved 40 °C i minst 1 måned og/eller stabilt ved omtrent 2-8 °C i minst 1 år. Videre er sammensetningen fortrinnsvis stabil etter frysing (til f.eks. -70 °C) og opptining av sammensetningen.

[0040] I farmakologisk forstand refererer en "terapeutisk effektiv mengde" av et biologisk aktivt materiale til en mengde effektiv ved forebygging eller behandling av en lidelse hvori en "lidelse" er enhver tilstand som vil ha nytte av behandling med det biologisk aktive materialet. Dette inkluderer kroniske og akutte lidelser eller sykdommer, inkludert de patologiske tilstander som predisponerer pattedyret til den aktuelle lidelsen.

[0041] "Behandling" henviser til både terapeutisk behandling og profylaktiske eller forebyggende tiltak. De som trenger behandling inkluderer de som allerede har lidelsen, samt de hvor lidelsen skal forebygges.

[0042] "Enhetsdosering" refererer til en beholder inneholdende en terapeutisk effektiv mengde av en sammensetning ifølge oppfinnelsen.

[0043] "Livskraftig" med hensyn til bakterier, refererer til evnen til å danne en koloni på et næringsmedium egnet for vekst av bakterier. Levedyktighet, med hensyn til virus, refererer til evnen til å infisere og reproducere i en egnet vertscelle, f.eks. som resulterer i dannelse av et plakk på en plen med vertsceller.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

[0044] Figur 1 er et diagram over temperatur og trykk i forhold til tid under en eksemplarisk skumtørkeprosess.

[0045] Figur 2A til 2D er fotografiske bilder av en sammensetning av skum som frysetørkes i glassampuller.

[0046] Figur 3 viser faseovergangene til FluMist™ A/Sydney influensavirusvaksine ved bruk av Fourier-transformert infrarød spektroskopi (FTIR).

[0047] Figur 4 viser tap av prosessaktivitet (viral titer) for B/Harbin influensavirusvaksine etter frysetørking av skumprosess der tørking ble utført ved 10 °C, 15 °C og 20 °C.

[0048] Figur 5 viser stabilitetstrenden for B/Harbin influensavirusvaksine som er utsatt for frysetørking av skumprosess der primærtørking ble utført ved 10 °C, 15 °C og 20 °C.

[0049] Figur 6 viser stabilitetstrenden for styrke av skumtørket B/Ann Arbor influensavirus ved lagring ved 37 °C og 50 °C.

[0050] Figur 7 viser stabilitetstrenger for tre ulike stammer av influensavirusvaksine skumtørket i sammensetning AVS53.

[0051] Figur 8 viser røntgendiffraksjonsdata og et elektronmikroskopbilde som viser den amorfe natur en skumsammensetning ifølge oppfinnelsen.

[0052] Figur 9 viser et diagram over prosess temperaturer og kumulativt tap av levedyktighet for en fryse/skum-prosess som slutter med et 33 °C sekundært tørke-trinn.

[0053] Figur 10 viser et diagram over levedyktighet til listeria når vann fjernes i en fryse/skum-prosess. Sekundærtørking ved en lavere temperatur ga 10 ganger bedre levedyktighet i et tørt skum med mindre enn 5 prosent restfuktighet enn for samme materiale sekundært tørket ved en høyere temperatur.

[0054] Figur 11 er et skjematisk diagram over et eksempelsystem for lav temperatur frysetørking av skum.

[0055] Figurene 12A og B viser diagrammer som viser fordelene for mikrobelevedyktighet ved lavtemperatur sekundærtørking sammenlignet med tørking ved moderat temperatur.

[0056] Figur 13 er et diagram som viser hvordan trinnvise sekundære tørketemperaturer kan redusere endelig fuktighetsnivå og samtidig øke levedyktighet i forhold til ikke-trinnvise prosesser.

[0057] Figur 14 presenterer et diagram som viser bevis for at levedyktighet til mikrober ved fryse/skum-tørking ikke påvirkes vesentlig av hvorvidt skummatrisen opplever en ikke-glasstilstand.

DETALJERT BESKRIVELSE

[0058] Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse kan gi langtidslagring av bioaktive materialer, som f.eks. peptider, proteiner, nukleinsyrer, antistoffer, vaksiner, bakterier, virus, liposomer, blodplater og/eller celleduspensjoner, i en glassaktig matrise av et tørt skum. Fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen gir en tørr skum-preserveringssammensetning i henhold til fremgangsmåten ifølge krav 1 heri.

I fremgangsmåter, f.eks. spesielt godt egnet til preserving av bioaktive materialer omfattende lipidmembraner, kan det bioaktive materialet sammensettes til en suspensjon med beskyttende midler, forkjølt, holdt ved en temperatur nær faseovergangstemperaturen til membranen for å la de beskyttende midlene penetrere membranen før ekspandering av sammensetningen til et skum, tørket i et tynt skumlag, tørket ved svært lave trykk, og tørket ved en lav sekundær tørketemperatur, f.eks. nær romtemperatur.

[0059] Tap av mikroorganismelevedyktighet i skum/tørkeprosesser kan skyldes en kombinasjon av høye skjærkrefter, kavitasjon ved koking, oksyderingsstress og andre overflate mikro-miljøpåkjenninger av skumming, frysing og fryse/tinepåkjenninger, temperatur- og uttørkingspåkjenninger. I et overraskende resultat, har vi for noen virus og bakterier i særdeleshett, funnet at temperaturpåkjenningen,

særlig ved det sekundære tørkettrinnet, kan være en vesentlig årsak til log død. Dette, selv om de samme tørketemperaturene ikke var så skadelige i sammenheng med standard ikke-skum lyofiliseringer. Derfor har vi utviklet unike systemer og metoder for å beholde levedyktighet gjennom fryse/skum-lyofiliseringsprosesser.

METODER FOR PREPARERING AV STABILT TØRT SKUM

[0060] Metoder for fremstilling av stabilt tørt skum for preservering av bioaktive materialer omfatter, generelt, f.eks. preparering av en sammensetning som kombinerer det bioaktive materialet med en polyol og/eller polymer i en oppløsning eller suspensjon, redusere trykket til sammensetningen for å initiere skumming, frysing av skummet, primærtørking av skummet etter lyofilisering og sekundærtørking av skummet til 10 prosent restfuktighet eller mindre ved en temperatur på omtrent 25 °C eller mindre.

[0061] I foretrukne utførelsesformer for preservering av levedyktige virus og/eller mikroorganismer, som bakterier, skum/tørkeprosessen inkluderer, f.eks. å holde en sammensetning av mikroorganismer og en polyol ved en temperatur rundt faseovergangstemperaturen til mikroorganismens membraner. Sammensetningen blir kjølt til omkring 10 °C ved frysing før sammensetningen ekspanderes til et skum ved reduksjon eller det atmosfæriske trykket under omgivende trykkforhold. Tap av latent varme og/eller miljøkjøling fryser skummet. Skummet opplever foreløpige tørking ved lyofilisering til omtrent 60 % eller 75 % fast stoff, eller mer. Sekundærtørking utføres i et miljø med en temperatur over frysepunktet. Under hele eller mesteparten av den sekundære tørkefasen, kan det være foretrukket at skummet forblir frosset og/eller under glassovergangstemperaturen (T_g) til skummet. Sekundærtørking er typisk fullført når restfuktigheten er redusert til omtrent 10 prosent eller mindre, fortrinnsvis omtrent 5 prosent fuktighet.

[0062] I en utførelsesform, blir for eksempel en sammensetning av bioaktivt materiale, polyol og/eller polymer, i et løsningsmiddel, utvidet til et skum under et trykk på mellom omtrent 200 Torr og omtrent 25 Torr før stabilisering og tørking av skummet. Denne utførelsesformen skiller seg fra kjent teknologi omtalt ovenfor, f.eks. ved at det ikke kreves et kraftig vakuum (trykk 24 Torr eller mindre) for å oppnå tilstrekkelig skumekspandering. I denne utførelsesformen kan tilstrekkelig skumming oppnås ved høyere trykk fordi fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen gir skumekspansjon, f.eks. fra avgassing av mettede gasser fra sammensetningen, ko-

king av løsemidler med høyt damptrykk fra sammensetningen, gassdannende kjemi og/eller utvidelse av bobler injisert eller fanget i sammensetningen. Sammensetninger til denne utførelsesformen kan f.eks. være foravkjølt og/eller miste vesentlig latent varme under ekspansjon av skum eller tørking som f.eks. eventuelt fører til frysing og/eller lyofilisering av skummet. Etter at det primære tørkettrinnet er fullført, kan det stabiliserte tørre skumet holdes, f.eks. ved sekundære tørketemperaturer ved trykk under 50 mTorr, for å avslutte tørkingen av formuleringen.

[0063] I en annen utførelsesform, er det et skummiddel til stede i sammensetningen, f.eks. for å gi skumekspandering og/eller kontroll med eller uten koking. For eksempel, kan en sammensetning inneholdende et skummiddel, et bioaktivt materiale, og en polyol og/eller polymer, bli utsatt for et redusert trykk hvorved sammensetningen blir ekspandert til et skum (ved virkningen av skummidlet), stabilisert og tørket. Skummidlet kan være, f.eks. gass i oppløsning i sammensetningen, et løsemiddel med høyt damptrykk (flyktig), et karbonat, et aktivt metall, en direkte elektrisk strøm, en suspensjon av fine gassbobler, og/eller lignende, som beskrevet nedenfor i avsnittet om skumming av sammensetningen.

En membran-faseovergangstemperatur er den temperatur ved hvilken lipidmembran går over fra en flytende (høy mobilitet) fase til en stivere gel-krystallinsk fase. Det er postulert at fordi lipidmembraner har en tendens til å være gjennomtrengelige for passiv diffusjon av eksternt miljø ved lipidbilagets karakteristiske faseovergangstemperatur, er det en måte å laste stabilisatorer/beskyttende midler til celler, bakterier eller virus med preinkubering med slik faseovergang.) Trykket kan deretter reduseres, f.eks. å koke sammensetningen og produsere et skum. Vann kan raskt gå tapt fra sammensetningen, sammen med latent varme, noe som resulterer, f.eks. ved frysing av skummet. Vann fortsetter å gå tapt, f.eks. ved sublimering i løpet av flere minutter for å gi en i det vesentlige tørr skumsammensetning. Temperaturen kan varmes, f.eks. for å drive bort ytterligere restfuktighet og vann for hydrering for å forbedre den fysiske og/eller kjemiske stabilitet til tørt skum.

[0064] Figur 1 viser et eksempel på fryse/tørkeprosessen for skum ifølge oppfinnelsen. Overlagret på et diagram over vakuumkammer-temperaturer og trykk i forhold til tid er fotografiske bilder av sammensetninger som inneholder et innhyllt virus på ulike stadier av tørking. Kammertemperaturlinje 11 indikerer temperaturen i vakuumkammeret under fryse-skummeprosessen. Kammertemperaturen holdes omtrent på faseovergangstemperaturen til viruset, eller omtrent 15 °C, gjennom pe-

netreringstrinnet 12, skummetrinnet 13 og innledende (primært) tørkettrinn 14. Kammertemperaturen var trappet opp til tørketemperaturer på ca 33 °C under sekundær tørkefase 15. Kammertrykk linje 16 forblir på eller over atmosfærisk trykk under penetreringstrinnet, synker til omtrent 2500 mTorr under skummetrinnet, omtrent 250 mTorr under det innledende tørkettrinnet, og omtrent 50 mTorr under det sekundære tørkettrinnet. Ampulleteperaturlinjene 17 representerer temperaturene målt fra termoelementer plassert i sammensetningene i representative ampuller under prosessen. Ampullene holder membran-faseovergangstemperaturen under penetreringstrinnet men kjøles plutselig når trykket faller i løpet av skummetrykket på grunn av tap av latent varme ved fordampning og sublimering av vann fra sammensetningen. Ampulleteperaturene stiger gradvis til nær kammerets tørketemperaturer ettersom raten med restfuktighetstap reduseres i det sekundære tørkettrinnet.

[0065] Figurene 2A til 2D viser fotografiske bilder av representative ampuller med sammensetning under stadier av frysetørking av skummet. I figur 2A begynner væskesammensetningen i bunnen av ampullen å koke ettersom trykket i kammeret begynner å falle. I figur 2B har en skummende matrise begynt å stabilisere seg når den tykner med tap av vann og lavere temperaturer. I figur 2C, er skummet frosset og har mistet det meste av vannet fra det opprinnelige tørkettrinnet. Figur 2D viser tørrskum glassaktig matrise godt inne i det sekundære tørkettrinnet.

[0066] En sammensetning kan omfatte et levende svekket influensavirus som bioaktivt materiale i en løsning av 40 % sukrose, 5 % gelatin, 0,02 % Pluronic F68, og en pH 7,2 fosfatbuffer. Sammensetningen alikvoteres i sterile 10 ml silikoniserte ampuller og foravkjølt til 15 °C (omkring faseovergangstemperaturen til virusets lipidkapsel, se figur 3) i omtrent 30 minutter. Trykket reduseres hurtig til omtrent 50 mTorr i omtrent en halv time for å generere skummet med isnuklering og full isutbredelse. Etter innledende skumming og frysing, gir issublimering og fordamping et fysisk stabilt skum. (Et slikt skum kan bli generert ved vakuum mellom omtrent 400 Torr og 7,7 Torr eller mindre, eller 2,5 Torr til omtrent 50 mTorr, når sammensetningen inneholder skummidler). Temperaturen økes til omtrent 33 °C i omtrent 2 dager i et sekundært tørkettrinn for å redusere restfuktighet til sammensetningen til et ønsket nivå. Ampullene er aseptisk forseglet for å holde ut kontamineringer og fuktighet for stabil lagring.

Preparering av en sammensetning

[0067] Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan f.eks. omfatte et bioaktivt materiale satt sammen som en løsning eller suspensjon som inneholder en polyol, polymer, skummiddel, overflateaktivt stoff og/eller en buffer. Sammensetningens ingredienser kan kombineres i en sekvens ved hjelp av teknikker tilpasset bestanddelene, slik det vurderes av fagfolk innen bransjen. For eksempel kan polymerene og/eller høye konsentrasjoner av polyoler bli oppløst i en oppvarmet vannholdig løsning med omrøring før avkjøtling og innblanding med det bioaktive materialet. Det bioaktive materialet, som et virus eller en bakterie, kan f.eks. være konsentrert og separert fra vekstmedier ved sentrifugering eller filtrering før resuspending i sammensetningen.

[0068] Det bioaktive materialet kan f.eks. være et materiale av interesse som gir en type bioaktivitet, f.eks. som enzymatisk aktivitet, lagring av genetisk informasjon, en affinitetsinteraksjon, induksjon av immunresponser, cellulær multiplisering, infeksjon, inhibering av cellevekst, stimulering av cellevekst, terapeutiske effekter, farmakologiske effekter, antimikrobielle effekter og/eller lignende. For eksempel kan de bioaktive materialene være enzymer, antistoffer, hormoner, nukleinsyrer, bakterier, virus, liposomer, blodplater, andre celler og/eller lignende. Det bioaktive materialet kan f.eks. være levende celler og/eller levedyktige virus. Det bioaktive materiale kan f.eks. være ikke levende celler eller liposomer nyttige som vaksiner eller leveringsmidler for terapeutiske midler. Virale bioaktive materialer ifølge oppfinnelsen kan f.eks. være levende virus og svekkede levende virus som, influensavirus, parainfluenza-virus, AAV, adenovirus, respiratorisk syncytielt virus, herpes simplex-virus, cytomegalovirus, SARS-virus, medlemmer i koronavirusfamilien, menneskelig metapneumovirus, Epstein-Barr-virus og/eller liknende.

[0069] De beskyttende midlene til metodene kan f.eks. inkludere noen av en rekke polyoler. For eksempel, polyolen, som sukrose, kan fysisk omgi det bioaktive materialet for å fremme opprettholdelse av molekylær struktur gjennom tørkeprosessen og gi strukturell stivhet til den glassaktige matrisen i tørr tilstand. Andre funksjoner til polyolen kan f.eks. inkludere å beskytte det bioaktive materialet ved eksponering for skadelig lys, oksygen, fuktighet og/eller lignende. For eksempel kan polyolen, som sukrose, fysisk omringe og beskytte det bioaktive materialet ved eksponering for skadelig lys, oksygen, fuktighet og/eller lignende. Polyolene kan f.eks. erstatte vann til hydrering tapt under tørking, for å hindre denaturering av biomolekyler til materialet. I metodene ifølge oppfinnelsen kan polyoler f.eks. gi et fortykningsmid-

del med fasthet til å fremme dannelse og stabilisering av bobler som danner den tørre skumstrukturen til conserveringsmiddelsammensetningene. Selv om oppfinnelsen ikke er begrenset til noen spesielle polyoler, kan sammensetningen og skumpreparatene inkludere f.eks. sukrose, trehalose, sorbose, melezitose, sorbitol, stachyose, raffinose, fruktose, mannose, maltose, laktose, arabinose, xylose, ribose, rhamnose, galaktose, glukose, mannitol, xylitol, erytritol, threitol, sorbitol, glyserol, L-gluconat og/eller lignende. De fleste polyoler kan lett oppløses for blanding i sammensetningen i mengder som f.eks. strekker seg fra omtrent 1 vektprosent til omtrent 45 vektprosent, omtrent 2 vektprosent til omtrent 40 vektprosent, eller omtrent 5 vektprosent til omtrent 20 vektprosent.

[0070] Polymerer kan inkluderes i sammensetningene til metoden, f.eks. for å gi beskyttende fordeler og/eller strukturell stabilitet til skummet. Som med polyoler, kan polymerer f.eks. gi fysisk og kjemisk beskyttelse til de bioaktive materialene. Polymerene kan ofte f.eks. gi mer tyknende viskositet etter vekt til sammensetningene enn enkle polyoler. De lineære eller forgrenete trådene til polymerer kan f.eks. gi økt strukturell styrke til de tørkede skumsammensetningene ifølge oppfinnelsen. Mange polymerer er f.eks. sterkt oppløselig i vann, slik at de ikke i vesentlig grad hindrer rekonstituering av tørt skum. Beskyttende midler av polymer kan i metodene ifølge oppfinnelsen f.eks. omfatte hydrolysert gelatin, ikke-hydrolysert gelatin, vannløselige polymerer som polyvinylpyrrolidon, ovalbumin, kollagen, chondroitinsulfat, et sialaert polysakkarid, aktin, myosin, mikrotubuli, dynein, kinein, humant serumalbumin og/eller liknende.

[0071] Skummidler kan f.eks. være sammensetningsbestandeler som kan medføre ekspansjon av sammensetningen i et skum ved bruk av redusert trykk. Skummidler kan f.eks. være små bobler suspendert i sammensetningen, som kan utvides ved bruk av redusert trykk og/eller bestanddeler som er i stand til å generere gassbobler i sammensetningen. Skummidler kan f.eks. være gasser i løsning, gassdannende kjemikalier, lettkokende løsningsmidler, fangete eller suspenderte bobler, injisert bobler og/eller lignende.

[0072] Overflateaktive midler kan inkluderes i sammensetninger i henhold til metodene for f.eks. å gi økt oppløselighet til andre sammensetningsbestanddeler, beskyttelse mot overflatespenningsindusert denaturering av visse biomolekyler under skummingen, boblestabilisering, raskere rekonstituering og/eller lignende. De over-

flateaktive midlene kan f.eks. være egnete ioniske eller ikke-ioniske vaskemidler, doble overflateaktive midler, pluroniske overflateaktive midler og/eller lignende.

[0073] Buffere kan settes til sammensetningene i henhold til metoden, f.eks. for å gi en passende stabil pH til sammensetninger i henhold til metoden og ifølge oppfinnelsen. Typiske buffere til oppfinnelsen omfatter, f.eks. kaliumfosfat, natriumfosfat, natriumacetat, histidin, imidazol, natriumcitrat, natriumsuksinat, ammoniumbikarbonat og/eller et karbonat. Bufferne kan justeres til passende syre og saltformer for f.eks. å gi pH-stabilitet i området fra omtrent pH 4 til omtrent pH 10. En pH nært nøytralt, som f.eks. pH 7,2, er foretrukket for mange sammensetninger.

[0074] Andre eksipienter kan inkluderes i sammensetningen. For eksempel kan aminosyrer, som arginin og metionin, være bestanddeler av sammensetningen og preparater. Aminosyrene kan f.eks. fungere som zwitter-ioner som blokkerer ladede grupper på behandlingsoverflater og lagringsbeholdere for å hindre uspesifikk binding av bioaktive materialer. Aminosyrene kan øke stabiliteten til preparater f.eks. ved å jakte på oksidasjonsmidler, jakte på de-amideringsmidler, og stabilisere konformeringen av proteiner. I et annet eksempel kan glycerol inngå i preparatene ifølge oppfinnelsen, f.eks. for å fungere som en polyol og/eller mykner i den tørkede skumsammensetningen. EDTA kan inkluderes i preparatet, f.eks. for å jakte på metallioner som kan initiere ødeleggende kjemi med frie radikaler.

Kjøling av sammensetningen

[0075] Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan kjøles før skumekspandering, skumstabilisering, frysing og/eller tørking, for å gi fordeler, som f.eks. stabilisering av bioaktivitet, fortykkelse av sammensetningen, forbedret penetrering av sammensetningsbestanddeler gjennom membraner, og/eller frysing av sammensetningen før lyofilisering.

[0076] Kjøling kan skje med enhver egnet teknikk som er kjent innen bransjen. For eksempel, kan kjøling være ved kontakt og ledning med nedkjølt maskinvare, kontakt med strømmen av kalde væsker, tap av latent varme og/eller lignende. Vanligvis blir sammensetninger holdt i glassbeholdere på metalstativer i et temperaturstyrt prosesskammer der temperaturen utjevner seg til den styrte temperaturen. Kammeret kan f.eks. omfatte trykkstyringsmuligheter, slik at kjøling kan bli drevet

ved av tap av latent varme fra fordampning eller sublimering av løsemidler i sammensetningen.

[0077] Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan f.eks. være foravkjølt til faseovergangstemperaturen til lipidmembraner forbundet med biologisk materiale for å forbedre penetrering av beskyttende midler. Lipid-bilag til biologiske membraner, og monolag av noen liposomer, kan eksistere i en fluidfase ved temperaturer over hovedfaseovergangstemperaturen (T_m) og som en krystallinsk fase ved temperaturer under T_m . Fluidfasemembraner og krystallinfasemembraner kan presentere en kontinuerlig hydrofob barriere for penetrering av hydrofile molekyler. Uten å være bundet av noen spesiell teori, er det antatt at ved temperaturer i nærheten av T_m , kan transmembrane defekter eksistere på grensene mellom regionene av flytende og krystallinske faser på en lipidmembran. Slike transmembrane defekter kan gi økt permeabilitet for hydrofile molekyler, som mange av de beskyttende midlene ifølge oppfinnelsen. Videre, fordi sammensetningen har et høyt innhold av faste stoffer, produseres en kjemisk gradient som ytterligere driver oppløsninger, som beskyttende midler, inn i membranen. Når fuktighet senere blir fjernet fra sammensetningen, kan de beskyttende midler bli beholdt på stabiliserende nivåer innenfor volumet avgrenset av membranen. Forbedret prosessstabilitet og lagringsstabilitet for virus utsatt for beskyttende midler ved membran-faseovergangstemperatur (se figur 3) er vist henholdsvis i figurene 4 og 5.

[0078] T_m for mange lipidmembraner er over frysepunktet og glassovergangstemperaturer (T_g) til sammensetningene. Dette tillater tydelig diffusjon av beskyttende midler i flytende løsning gjennom lipidmembraner på omtrent deres T_m . For eksempel forblir en 40 % oppløsning av sakkarose flytende for effektiv penetrering av en celle ved en typisk membran- T_m på 15 °C. Økt permeabilitet av beskyttende midler i flytende løsning gjennom membraner i faseovergang kan beskytte biologiske molekyler innenfor membranens lukkede volum.

[0079] T_m for en membran kan bestemmes, f.eks. med Fourier Transformed Infra-red (FTIR) mikroskopi, bøyestivhetsmetoder, ioniske permeabilitetsstudier og lignende. Sammensetninger av bioaktive materialer med lipidmembraner kan f.eks. holdes ved temperaturer på mellom omtrent 0 °C til omtrent 70 °C, omtrent 2 °C til omtrent 45 °C, omtrent 12 °C til 16 °C, eller omtrent 15 °C. Skum med levende influensavirus tørket ved den antatte faseovergangstemperaturen på 15 °C (se figur 3) ble funnet å være mer motstandsdyktig mot prosess-relaterte tap av styrke

(se figur 4), og oppviste betydelig bedre langtidsstabilitet ved romtemperatur enn for skum tørket ved 10 °C og 20° C (se figur 5). Sammensetninger kan bli holdt på T_m å tillate tilstrekkelig penetrering av beskyttende midler. For eksempel kan sammensetninger bli holdt på lipid-membranens T_m i omtrent 10 til omtrent 60 minutter, eller omtrent 30 minutter.

Skumme sammensetningen

[0080] Foaming kan f.eks. skyldes oppsamling av gasser som frigis fra sammensetningen og/eller ekspandering av eksisterende bobler i suspensjon. For eksempel, når gasstrykket over sammensetningen blir redusert, kan kokepunktet til løsemiddel-bestanddeler synke under temperaturen til sammensetningen, noe som resulterer i hurtig fordampning eller koking av løsemidlet. Betydelig bobling kan også oppstå i sammensetningen når f.eks. trykket reduseres under partialtrykket til gasser oppløst i løsemidlet, noe som resulterer i bobler fra avgassing. Bobledannelse kan induseres kjemisk. Alternativt kan bobling induseres fysisk ved å innføre en gass gjennom bunnen av beholderen, f.eks. slik som gjennom fritte-glass.

[0081] Ekspandering av sammensetningen til et skum kan f.eks. skje ved utvidelse av bobler i sammensetningen ved reduksjon av påført trykk. Boblene kan f.eks. være foreksisterende, injisert og/eller bli generert in situ. Boblene kan f.eks. være suspendert i sammensetningen før ekspandering, injisert i sammensetningen før eller under ekspanderingen, eller generert ved koking, avgassing, eller gassdannende kjemiske reaksjoner. Sammensetningens bestanddeler, f.eks. inkludert for å fremme ekspandering av sammensetningen til et skum, kan være skummidler ifølge oppfinnelsen.

[0082] Ekspandering av sammensetningen kan f.eks. resultere fra koking av sammensetningen. Koking oppstår f.eks. ved kokepunktet til et løsemiddel, eller når damptrykket til et løsemiddel i sammensetningene overskrider omgivelsestrykket. Kokingen kan f.eks. styres ved å justere temperaturen til sammensetningene (høyere temperaturer gir høyere damptrykk) og/eller ved å justere det påførte trykket. Vanligvis kan sammensetningene til oppfinnelsen kokes under redusert trykk (vakuu eller trykk mindre enn atmosfærisk) for å gi en redusert koketemperatur som bidrar til stabiliteten til bioaktive materialer. Sammensetninger som omfatter et løsemiddel med et lavt kokepunkt (eller høyt damptrykk) kan koke ved lavere tempe-

raturer. For eksempel kan inkludering av visse alkoholer, etere, fluorkarboner og/eller liknende, gi senkede kokepunkter for sammensetningene til oppfinnelsen.

[0083] Avgassing kan f.eks. gi ekspandering av sammensetningen til et skum. Gasser kan diffunderes og oppløses i flytende løsemidler inntil en likevekt etableres mellom partialtrykkene til gasser i væsken og omgivende atmosfære. Hvis trykket til den omgivende atmosfæren f.eks. plutselig faller, kan gassene unnslippe væsken raskt, slik at den bobler. For eksempel, når en vannholdig løsning, som er blitt ekvilibrert med en gass ved atmosfærisk trykk, blir eksponert for et redusert trykk, kan gassbobler dannes på veggene i beholderen eller kan bryte ut fra løsningen som en "brusing". Dette er ikke koking, men frigjøring av oppløste gasser fra løsningen, eller avgassing. Hvis trykket senkes ytterligere, kan gassene i hovedsak bli fjernet fra løsningen. Eventuelt, avhengig av løsemidlet, temperaturen og trykket, kan løsemidlet til løsningen starte å koke. Sammensetninger til oppfinnelsen kan ekspanderes til skum under redusert trykk ved avgassing. Sammensetningene kan ekspanderes for gasser ved egnede trykk, som for eksempel én atmosfære (omtrent 760 Torr ved havnivå) til omtrent 500 atmosfærer, for å drive gasser inn i sammensetningene. Hvor gassen har ekvilibrert med sammensetningen ved høye trykk (mer enn 1 atmosfære) trenger ikke det reduserte trykk som gir utvidelse å være et vakuum (mindre enn 1 atmosfære). Hvor gassen har ekvilibrert med sammensetningen ved omgivende trykk, eller lavere, kan det reduserte trykket som initierer ekspandering av bobler f.eks. være et vakuum. Gasser som kan fungere som skummidler ifølge oppfinnelsen kan være hvilke som helst som er kjent innenfor bransjen, som, luft, nitrogenoksid, nitrogen, oksygen, hydrokarboner med lav molekylvekt, inerte gasser, karbondioksyd og/eller lignende.

[0084] Kjemiske reaksjoner som f.eks. genererer en gass, kan gi ekspandering av sammensetningen til et skum. Skummidler ifølge oppfinnelsen kan f.eks. være kjemikalier involvert i gassgenererende kjemiske reaksjoner, som vil bli forstått av fagfolk innen bransjen. For eksempel, kan et karbonat i sammensetningen reagere med en syre for å produsere CO₂ gass. I andre reaksjoner kan f.eks. aktive metaller, som natrium eller litium, i nærvær av vann reagere for å gi hydrogengass. Elektrolytiske reaksjoner som bruker direkte elektrisk strøm kan f.eks. brukes til å gi hydrogen- og/eller oksyngengass ved elektrodene. Gasser som genereres i sammensetningen kan f.eks. ekspanderes adiabatisk eller under konstant trykk for å ekspandere sammensetningen til et skum. Alternativt kan gasser som genereres

kjemisk i sammensetningen ekspanderes ved reduksjon av det påførte trykket for å ekspandere sammensetningen til et skum.

[0085] Bobler kan inkorporeres i sammensetninger, f.eks. gjennom mekaniske prosesser. Sammensetninger kan bli ekspandert til skum, f.eks. etter tvungen inkorporering av gassbobler i sammensetningen og/eller ved ekspandering av injiserte små bobler ved redusert trykk. For eksempel kan bobler bli omrørt, pisket, homogenisert, blåst, strålt, aggitert, sonikert, spiralblandet og/eller lignende, inn i sammensetningen. Etter innføring, f.eks. i viskøse sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan boblene forbli suspendert i en matrisestruktur i lange tidsperioder. Suspenderte bobler kan f.eks. bli ekspandert ved bruk av redusert trykk og/eller stabilisert ved tørking eller kjøling av sammensetningen. I en utførelsesform kan små bobler (f.eks. 0,01 til 0,1 til 1 mm i diameter) bli introdusert i en sammensetning av kraften til en trykksatt gass gjennom en filtermembran.

[0086] Skumming kan igangsettes eller ekspandert ved å redusere trykket over sammensetningen. Skumming kan f.eks. være resultatet fra avgassing av gasser fra sammensetningen, utvidelse av små inkorporerte bobler og/eller koking av løsemidlet. De utslippende gassene kan bli fanget, f.eks. ved de viskøse beskyttende midlene og/eller overflateaktive stoffene i sammensetningen. Skummetrinnet kan f.eks. resultere i innledende tørking i sammensetningen, fortykning og strukturell stabilisering og/eller frysing av skummet.

[0087] Fremgangsmåter for preservering av bioaktive materialer med lipidmembraner omfatter f.eks. en kombinasjon av forkjøling til en faseovergangstemperatur og vakuumbetingelser som kan resultere i frysing av sammensetningen. Fordi frysing kan være en vesentlig årsak til skader på protein (og membran) under frysetørking, er dagens teknologi basert på bruk av høyere trykk (f.eks. -100 Torr eller mer), konsentrerte løsninger og/eller høyere initiale temperaturer for å forhindre frysing. Bruken av sammensetninger som inneholder forskjellige cryoprotective midler og prosessparametrene ifølge oppfinnelsen kan cryobeskytte bioaktive proteiner og/eller membraner om frysing skjer under skum-ekspanderings-, skumstabiliserings- eller tørkestadier til prosessen.

[0088] Fodamping av løsemiddel fra sammensetningen kan gi akselerert innledende tørking av sammensetningen under vakuum. Koking av løsemiddel øker hastigheten på innledende tørking av sammensetningen, f.eks. ved rask overføring av løsemid-

let ut av sammensetningen, konvektiv gjennomrøring av sammensetningen, og ved å øke overflatearealet. I mange tilfeller, er det ønskelig ikke å koke sammensetningen fordi bobler kan være for store eller sammensetningen kan søles ut fra beholderen.

[0089] Når fordampningen fortsetter, kan skumstrukturen bli stabilisert. Når løsemidlet drives ut fra sammensetningen, kan beskyttende midler i løsningen bli konsentrert og tykkere. Fordampning av løsemidlet og tap av latent varme kan kjøle sammensetningen. På et tidspunkt, kan de avkjølte og konsentrerte beskyttende midlene nå sin glassovergangstemperatur og slutte å flyte som en væske. Tap av latent varme kan medføre frysing av sammensetningen. Vanligvis kan frysing skyldes varmefjerning gjennom kontakt med kjølte overflater og/eller kjølt atmosfære. Den glassaktige og/eller frosne sammensetningen kan preservere en stabil skumstruktur. En åpen celle skumstruktur kan skaffes hele veien, f.eks. ved å gi en etset glass bunn til oppbevaringsbeholderen for å fremme bobledannelse ved bunnen av beholderen. Bobler som går opp gjennom den tykknende sammensetningen kan danne sammenkoblede åpninger til et skum med åpne celler. Skum med åpne celler kan også fremmes ved rask tørking og fortykkelse som hindrer sedimentering av boblefri sammensetning eller dannelse av en tettende hud over sammensetningen. Skum med åpne celler kan forkorte sekundære tørketider og rekonstitueringstidene.

[0090] Skumming kan påvirkes av forhold som f.eks. typer og konsentrasjoner av sammensetningsbestanddeler, sammensetningstemperaturer, anvendte trykknivåer, frekvensen for trykkforandringer og/eller lignende. For eksempel kan tilstedeværelse av overflateaktive midler eller fortykningsmidler stabilisere bobler for et mindre tett skum. I et annet eksempel kan f.eks. erstatning av tapt latent varme ved oppvarming av prosesskammeret, forlenge koking av løsemidlet. I et annet eksempel, kan lavere trykk gi mer energisk eller kontinuerlig koking og/eller ekspansjon. Trykket kan reduseres, f.eks. til mindre enn omtrent 400 Torr, omtrent 200 Torr eller mindre, mellom omtrent 100 Torr og omtrent 25 Torr eller mindre, mellom 25 Torr og 7,7 Torr eller mindre, eller mellom 2500 mTorr og omtrent 50 mTorr, eller omtrent 25 mTorr eller mindre, for å produsere ønsket skumming og/eller frysing i metodene ifølge oppfinnelsen. Vakuomet kan opprettholdes i ca 1 time eller omtrent 2 timer, f.eks. for å fullføre skummingen, skumstabiliseringen og innledende tørking av skummet.

[0091] Initiell (dvs. primær) tørking i metodene ifølge oppfinnelsen kan f.eks. omfatte lyofilisering. Når latent varme går tapt uten utskifting eller varme ledes bort, kan f.eks. frysepunktet til sammensetningen bli nådd. Når ytterligere varme går tapt på grunn av fordamping, kontaktoverføring og/eller sublimering, kan sammensetningen fryse og f.eks. stabilisere en skumstruktur. Initiell tørking kan f.eks. fortsette når ekstra løsemidler blir fjernet ved sublimering i vakuum. Sublimering en og/eller fordampningen kan f.eks. bli drevet ved fjerning av løsemiddel (fuktighet) fra det gassformige miljøet rundt skummet ved kondensering eller uttørking.

Sekundær tørking

[0092] Sekundære tørking av strukturelt stabilisert og initielt tørket skum kan f.eks. fjerne innesluttet løsemiddel, eller vann fra molekylær hydrering, for å gi et preparat som er stabilt ved lagring i lengre perioder ved romtemperatur. Sekundær tørking kan f.eks. innebære bruk av kalde til varme temperaturer i et kraftig vakuum over flere timer til dager. I foretrukne utførelsesformer for beskyttelse av bioaktive materialer omfattende en livsform, har man funnet at levedyktigheten i stor grad avhenger av temperaturmoderasjon f.eks. ved eller under romtemperatur i det sekundære tørkettrinnet.

[0093] For eksempel, kan varme bli tilsatt initielt tørket skum å drive ut gjenværende løsemiddel. For moderat oppvarming av skummet, kan varme tilføres sparsomt f.eks. for å erstatte latent varme fra fordampning eller sublimering, uten å tilføre vesentlige mengder ekstra varme, eller heve temperaturen av skummet. Varme kan f.eks. tilføres gjennom oppvarming av atmosfæren med redusert trykk, som IR-lys, og/eller varme kan tilføres skummet gjennom tilhørende maskinvare, for eksempel hyller, brett og glassampuller. Tørketemperaturen kan f.eks. være mindre enn glassovergangstemperaturen til gjenværende sammensetning for å hindre kollaps av skumstrukturen. Metodene ifølge oppfinnelsen resulterer i en farmasøytisk akseptabel, glassaktig matrise omfattende minst et biologisk aktivt materiale i den amorfe glassaktige matrisen. Den glassaktige matrisen kan være et fast materiale danner storskala-skummatrisestrukturen til veggene rundt hule skumbobleceller. Fortrinnsvis er sammensetningen nesten helt tørr. Vann eller annet vannholdig løsemiddel kan forbli i preparatet, men typisk blir det ikke igjen mer enn 10 % restfuktighet etter vekt.

I foretrukne utførelsesformer for preserrvering av mikroorganismer og virus er den sekundære tørketemperaturen mindre enn 25 °C, 20 °C eller mindre. I en foretrukket utførelsesform for sekundær tørking av mikroorganismer, blir tørketemperaturen langsomt hevet fra primære tørkebetingelser sakte og kontinuerlig (f.eks. med en temperaturgradientprofil) eller i en serie av små trinn. Som anvendt heri omfatter "tørr", "tørket" og "hovedsakelig tørket" disse sammensetningene med fra omtrent 0 % til omtrent 5 % vann. Fortrinnsvis vil den glassaktige matrisen ha et fuktighetsinnhold fra omtrent 0,1 % til omtrent 3 % som målt ved hjelp av Karl Fisher-metoden.

[0094] Et vakuum kan tilveiebringes i den sekundære tørkeprosessen for drive mengden av vann som fjernes og/eller til å forflytt fjerningen til lavere restfuktighetsnivåer. Vakuomet under den sekundære tørkingen kan f.eks. være mindre enn 400 Torr, mindre enn 100 Torr, mindre enn 2,5 Torr, mindre enn 500 mTorr, mindre enn 100 mTorr, mindre enn 50 mTorr, eller fortrinnsvis omtrent 25 mTorr. I foretrukne utførelsesformer for å preservere mikroorganismer, brukes relativt lave trykk ved den sekundære tørkingen, f.eks. mindre enn 10 Torr, mindre enn 1 Torr, mindre enn 500 mTorr, mindre enn 100 mTorr, mindre enn 50 mTorr, og dermed økes hastigheten på tørkingen ved de lave temperaturene som benyttes. For bevaring av livsformer, er det foretrukket å drive sekundær tørking med svært lave absolute trykk og å unngå høye sekundære tørketemperaturer over lengre tid.

[0095] De resulterende produktet fra fryse/skum-tørkeprosessen er generelt et amorft, fast stoff (se figur 8), hvor det glassaktige eksipientmaterialet, f.eks. sukrose, er i en amorf glassaktig tilstand og omgir det biologisk aktive materialet, og hindrer dermed proteinutfolding og bremser signifikant molekylære interaksjoner eller kryssreaktivitet, grunnet sterkt redusert mobilitet av forbindelsen og andre molekyler innenfor den glassaktige sammensetningen. Denne prosessen er blitt postulert å opptre enten via mekanisk immobilisering av proteinet av det amorfe glasset eller via hydrogenbinding til polare og ladede grupper på proteinet, dvs. via vannutskiftning, og dermed hindre tørkeindusert denaturering og hemme ytterligere nedbrytende interaksjoner. Så lenge det glassaktige faststoffet er ved en temperatur under dens glassovergangstemperatur, og den gjenværende fuktigheten som forblir i hjelpestoffene er relativt lav, kan de labile proteinene og/eller bioaktivt materiale som inneholder lipidmembraner forbli relativt stabilt. Det bør bemerkes at det å oppnå en glassaktig tilstand ikke nødvendigvis er en forutsetning for langtidsstabilitet, da noen aktive ingredienser kan oppnå det bedre i en mer krystallinsk til-

stand. Mens det er allment anerkjent at biomaterialer generelt er lettere å stabilisere når tørket til en amorf glassaktig tilstand, er det tilfeller hvor slike glassaktige tilstander verken er nødvendig eller tilstrekkelig for langsiktig preservering. Det er viktig å merke seg at mekanismene tilskrevet stabilisering av biologisk materiale kan være multifaktoriell og ikke begrenset til den amorfe egenskapen til pulvermatisen hvor den aktive bestanddelen er innkapslet. Stabilisering under prosessen som er beskrevet her kan omfatte en rekke faktorer, inkludert, men ikke begrenset til reduksjon i konformasjonell mobilitet og fleksibilitet til proteinsidekjeder og/eller reduksjon i fritt volum som et resultat av innstøpingen, forbedring i den strukturelle stivheten til matrisen, fysisk penetrering av stabiliseringsmidler, reduksjon i fase-separasjon av eksipient fra den aktive bestanddelen, forbedring i graden av vannfortrengning ved å velge den optimale hydrogenbindingsdonoren. Sistnevnte er en funksjon av affinitet og aviditet til hjelpestoffet for overflaten av proteinet, nukleinsyrer, karbohydrater eller lipider som blir stabilisert. Generelt, så lenge det faste stoffet er ved en temperatur under dens glassovergangstemperatur, og den gjenværende fuktigheten som forblir i hjelpestoffene er relativt lav, kan de labile proteinene og/eller bioaktivt materiale som inneholder lipidmembraner forbli relativt stabilt.

Fylling og administrering

[0096] Sammensetningene kan f.eks. være fylt i beholdere før skumming og tørking, eller alikvoterer i individuelle beholdere for bruk, som ønsket. Sammensetninger kan f.eks. bli fylt i standard lyofiliseringsampuller av glass for prosessering til stabilisert skum. Glassampullene kan være sterile med en etset bunn og en hermetisk forseglbar propp. Bioaktive materialer ifølge oppfinnelsen kan f.eks. administreres ved injeksjon av oppløsninger eller suspensjoner eller innånding av pulverpartikler av malt skum.

[0097] Sammensetningene beskrevet heri kan være stabile, dvs. at bevarer den biologiske aktivitet til det innkapslete biologisk aktive materialet og er kjemisk og/eller fysisk stabile. Sammensetningene ble testet for stabilitet ved å utsette dem for aldring ved forhøyet temperatur (f.eks. 37 °C) og å måle den biologiske aktivitet, kjemisk og/eller fysisk stabilitet til sammensetningene. Som et eksempel på levende svekket influensavirus vaksine (FluMist™), viser resultatene av disse studiene at viruset formulert i disse sammensetningene var stabilt i minst en måned ved 50 °C og i mer enn tre måneder ved 37 °C (se figur 6). Stabilitet er definert som

tiden for tap av styrke med én log fluorescent focus unit/ml (FFU/ml). Ved 25 °C var levende influensavirus stabilt i mer enn ett år (se figur 7). Slike formuleringer er stabile selv ved høye konsentrasjoner av det biologisk aktive materialet som brukes. Dermed er disse sammensetningene fordelaktige ved at de kan sendes og lagres ved temperaturer på eller over romtemperatur for lange tidsperioder.

[0098] Den stabile sammensetning av det bioaktive materialet i en amorf glassaktig matrise (se figur 8) tilgjengelig etter tørking, kan bearbeides videre under bruk av metoder kjent innenfor bransjen. For eksempel, er glassmatrisen lett delelig ved skjæring, fresing eller andre oppdelingsteknikker. Prosesser for sliping eller pulverisering av medikamenter er velkjente innen bransjen. For eksempel kan det brukes en hammermølle, en slagmølle kalt Entoleter-mølle, en strålemølle, en stiftmølle, en Wiley-mølle eller lignende maleenhet. Den foretrukne partikkelstørrelsen er mindre enn omtrent 100 µm til omtrent 0,1 µm, og fortrinnsvis mindre enn 50 µm. Partikler mindre enn ca 10 µm i størrelse er f.eks. egnet for pulmonal administrering ved inhalering, mens større partikler kan være egnet for administrering til de øvre luftveier og nasale regioner. Partikkelstørrelsen kan velges slik at man oppnår varierende dispergering og strømningssegenskaper. For eksempel kan frittstrømmende pulvere være spesielt ønskelig for intranasal eller pulmonal levering. Pulveriserte sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan lett rehydreres med vann, saltvann eller andre væsker.

[0099] Tørre skumsammensetninger kan rekonstitueres med en egnet vannholdig buffer for administrering ved injeksjon eller inhalasjon. For eksempel, kan sammensetninger gis til et pattedyr ved å levere det bioaktive materialet via intravenøse, intramuskulære, intraperitoneale, intracerebrospinale, subkutane, intraartikulære, intrasynoviale, intratekale, perorale, topiske, intranasale eller pulmonale ruter. Den store overflaten til skum og den høye løselighet av mange beskyttende midler tillater at tørrskum ifølge oppfinnelsen kan rekonstitueres ved lavere eller høyere konsentrasjoner enn den opprinnelige sammensetningen. I noen tilfeller kan f.eks. det bioaktive materialet rekonstitueres ved høye konsentrasjoner, for eksempel opp til ca 400 mg/ml, for levering av en adekvat dose i en subkutan injeksjon med lite volum. Mindre konsentrerte rekonstitueringer kan f.eks. bli administrert som en aerosol ved inhalering. Valg av administreringsrute kan f.eks. avhenge av virkningsstedet, farmakologiske vurderinger og lignende. En typisk dose av det bioaktive materialet i metodene ifølge oppfinnelsen er fra omtrent 0,01 ng/kg til omtrent 15 mg/kg.

[0100] Den aktuelle dosering ("terapeutisk effektiv mengde") av det biologisk aktive materialet vil for eksempel avhenge av den tilstanden som skal behandles, alvorlighetsgraden og forløpet av tilstanden, om det biologisk aktive materialet blir administrert for forebyggende eller terapeutiske formål, tidligere terapi, pasientens kliniske historie og respons til det biologisk aktive materialet, type biologisk aktivt materiale som brukes, og skjønnet til behandlende lege. Det biologisk aktive materialet kan hensiktsmessig administreres til pasienten på en gang, eller over en serie behandlinger, og kan administreres til pasienten til enhver tid fra diagnose og utover. Det biologisk aktive materialet kan administreres som den eneste behandlingen eller i forbindelse med andre legemidler eller behandlinger som er nyttige i behandling av den aktuelle tilstanden.

[0101] Som en generell forslag vil den terapeutisk effektive mengden av det biologisk aktive materialet som administreres være i området fra omtrent 0,01 ng/kg til omtrent 50 mg/kg av pasientens kroppsvekt enten ved en eller flere administreringer, med den typisk rekken med proteiner som brukes, omtrent 0,05 ng/kg til omtrent 20 mg/kg, mer foretrukket omtrent 0,1 ng/kg til omtrent 15 mg/kg, administrert daglig, for eksempel. Imidlertid kan andre doseringsregimer være nyttig. Fremdriften av denne behandlingen kan overvåkes ved konvensjonelle teknikker.

SAMMENSETNINGENE

[0102] Sammensetningene inkluderer tørre skumsammensetninger at et bioaktivt materiale og en polyol og/eller en polymer. Fordi sammensetningene ble fremstilt ved frysing før tørking, er de iboende forskjellige i struktur og funksjon fra skum som ble tørket uten frysing først. Legg for eksempel merke til forskjellen mellom kun tørking av en sammensetning og frysetørking av en sammensetning, selv på makroskopisk nivå. Sammensetninger kan f.eks. fremstilles ved metodene til oppfinnelsen.

Sammensetningene omfatter f.eks. rekonstituert tørt skum i en vannholdig buffer.

[0103] En sammensetning kan være en vaksine av levende, svekket influensavirus. Sammensetningen fremstilles f.eks. ved metodene til oppfinnelsen.

En slik sammensetning kan være stabil ved lagring på tilnærmet 25 °C i 1 år eller mer. Initial levedyktighet gjennom prosessen kan vesentlig forbedres ved å holde viruset i sammensetningen ved en temperatur nær membran-faseovergangstemperaturen (f.eks. omtrent 15 °C, se figur 4) og/eller sekundære tørking ved en relativt lav temperatur (f.eks. 22 °C).

[0104] Med hensyn på levedyktige bioaktive materialer, har angitte prosesser ifølge oppfinnelsen vist en evne til å holde levedyktigheten utover den til skumtørking etter kjent teknologi. Encellede mikroorganismer og virus har vist seg å nyte særlig godt av en kombinasjon av forbehandling av materialet med polyoler omtrent ved faseovergangstemperaturen til membranene, initiering av skumming ved en lav temperatur, primær tørking ved sublimering, holde under glassovergangstemperaturer ved sekundær tørking, holde under omtrent 30 °C ved sekundære tørking, akselerert tørking ved anvendelse av kraftigere vakuum, og/eller sekundære tørking av relativt tynne skum. Ved bruk av slike metoder, kan sammensetninger fremstilles av et bioaktivt materiale i et skum med mindre enn 10 prosent restfuktighet, og samtidig beholde høye nivåer av levedyktighet. For eksempel, kan en bakterie i familien Enterobacteriaceae settes sammen med en polyol og/eller polymer, eksponeres for et vakuum for å generere et skum, fryses og lyofiliseres, sekundærtørkes ved en temperatur trappet opp til omtrent 25 °C (eller lavere) i løpet av timer eller dager, for å produsere en sammensetning som beholder 25 prosent, 50 prosent, 75 prosent, 90 prosent eller mer av de levedyktige kolonitallene funnet i den innledende flytende sammensetningen.

[0105] Figurene 5 og 6 viser diagrammer over stabilitetsdata for et virus med lipidmembran bevart i det tørre skummet ifølge oppfinnelsen og lagret ved 25 °C, 37 °C, og 50 °C. Diagrammer over styrke (fluorescent focus units per mL - FFU/mL) over tid med individuelle data/tid-punkter som prikker eller firkanter. Trendlinjene 51 og 95 %-konfidensintervaller 52 indikerer en predikert stabilitet (ikke mer enn 1 log tap av styrke) for omtrent 40 måneder for virus lagret i preparatet ifølge oppfinnelsen ved 25 °C.

[0106] - Sammensetninger omfatter f.eks. blodplater preservert i stabil lagring som bioaktivt materiale i et tørt skum. Blodplater er cytoplasmatiske fragmenter av megakaryocytter som kan aggregere på lesjonssteder til blodårer for å hindre blødninger og initiere reparasjoner. Blodplateinfusjoner til pasienter brukes til å korrigere mangler eller dysfunksjoner til sirkulerende blodplater som et resultat av trau-

me, sykdom eller legemiddelindusert dysfunksjon. For eksempel kan pasienter som lider av idiopatisk trombocytopeni, sigdcelleanemi, og de som gjennomgår ablativ kjemoterapi behandles med blodplateinfusjoner. Den økende bruk av ablativ kjemoterapi for et bredt utvalg av maligniteter har resultert i et økende behov for utskiftings-blodplateterapi. Et stort problem ved å bruke isolerte blodplater er deres korte holdbarhet. Blodplater er av Food and Drug Administration (FDA) kun godkjent for lagring i flytende tilstand i opptil fem dager ved romtemperatur, og på den tiden forringes de funksjonelle egenskapene raskt. Dette fører til mange logistiske problemer i både sivil og militær medisin.

[0107] Sammensetninger for bevaring av blodplater kan fremstilles ved å samle blod i en egnet antikoagulant etterfulgt ved å skaffe blodplaterikt plasma (PRP) med en hvilken som helst metode kjent i bransjen. Blodplatene kan behandles i henhold til metodene ifølge oppfinnelsen for å gi et stabilt tørket skum som omfatter blodplatene. Fordi blodplater er store og har mer kompleks struktur enn et virus, er tørking ved deres karakteristiske faseovergang spesielt viktig. De tørkede blodplatene kan rekonstitueres ved resuspensjon i en fysiologisk akseptabel buffer før infusjon. For terapeutisk anvendelse, er bufferen steril. Bufferen kan være enhver buffer med egnet pH. Fortrinnsvis kan rekonstitueringsbufferen inneholde et stoff eller stoffer med høyt kolloidalt osmotisk trykk, inkludert, men ikke begrenset til, polyetylenglykol (PEG) og hydroksyetyl-stivelse (HES). Fortrinnsvis er bufferen 1-5 % humant serumalbumin (HSA) i saltvann. I foretrukne utførelsesformer behandles blodplater, liposomer, dyreceller og planteceller som anbefalt for andre mikrober, f.eks. ved hjelp av membran-faseovergangstemperatur-infusjon av beskyttende midler og bruk av lav temperatur/høyyakuum sekundær tørking.

Sammensetning for preparering av tørrskumsammensetninger

[0108] Sammensetninger for fremstilling av tørrskumsammensetninger kan f.eks. omfatte polymerer, polyoler, skummidler, overflateaktive stoffer og/eller buffere. Slike sammensetninger kan bli behandlet i henhold til metodene ifølge oppfinnelsen for å gi stabile sammensetninger for lagring og administrering av bioaktive materialer.

[0109] Bioaktive materialer omfatter f.eks. materialer med påviselig bioaktivitet i levende systemer, biologiske celler og molekyler som brukes i analyser, biologiske celler og molekyler som brukes i medisin, biologiske celler og molekyler som brukes

i undersøkelser og/eller lignende. For eksempel omfatter bioaktive materialer fra sammensetningene ifølge oppfinnelsen peptider, proteiner, hormoner, nukleinsyrer, antistoffer, vaksiner, bakterier, virus, liposomer, blodplater celleduspensjoner og/eller lignende.

[0110] Bioaktive materialer som omfatter lipidmembraner i sammensetningene er generelt levende, og/eller svekkete, biologisk aktive, levende eller ikke-levende, celler, virus, mikroorganismer (som for eksempel bakterier) og/eller liposomer. For eksempel kan de bioaktive midlene omfatte vaksiner, virus, liposomer, bakterier, blodplater og/eller celler. Virale bioaktive stoffer kan f.eks. omfatte influensavirus, parainfluenzavirus, AAV, adenovirus, respiratorisk syncytialvirus, herpes simplex-virus, SARS-virus, menneskelig metapneumovirus, virus i korona-familien, cytomegalovirus og/eller Epstein-Barr-virus som kan være til stede i sammensetningene ifølge oppfinnelsen i mengder som varierer fra omtrent 10^1 TCID₅₀/mL eller mer, fra omtrent 10^3 TCID₅₀/mL opp til omtrent 10^{12} TCID₅₀/mL eller fra omtrent 10^6 til omtrent 10^9 TCID₅₀/mL TCID₅₀/mL. Det bioaktive materialet vil generelt være tilstede i en mengde på mindre enn omtrent 1 %, mer foretrukket, mindre enn omtrent 0,001 %, og mest foretrukket, mindre enn omtrent 0,0001 % etter vekt.

[0111] Sammensetningene for preparering av tørre skumsammensetninger kan f.eks. inkludere betydelige totale mengder tørrstoff (bestanddeler minus løsemidler som vann). En stor andel av de totale faststoffene kan omfatte det bioaktive materialet, en polyol og/eller en polymer. For eksempel kan polyolen være tilstede i sammensetningen i en konsentrasjon i området fra omtrent 2 vektprosent til omtrent 50 vektprosent, fra omtrent 5 vektprosent til omtrent 45 vektprosent, eller fra omtrent 20 vektprosent til omtrent 40 vektprosent. I et annet eksempel, kan polymeren være til stede i sammensetningen i en konsentrasjon i området fra omtrent 1 vektprosent til omtrent 10 vektprosent, eller omtrent 5 vektprosent. Fortrinnsvis skal sammensetningen ha et høyt faststoffinnhold før initiering av skumdannelse, vanligvis mellom omtrent 5 % og 70 %, eller mellom omtrent 30 % til 50 %. Viskositeten til sammensetninger ifølge oppfinnelsen er typisk større enn 5 centipoise (cP), mer foretrukket, større enn 10 cP. En foretrukket sammensetning har ~ 12 cP.

[0112] Polyoler kan f.eks. omfatte ulike sukker, karbohydrater og alkoholer. For eksempel, kan polyolene omfatte ikke-reduserende sukker, sukrose, trehalose, sorbose, melezitose og/eller raffinose. Polyolene kan f.eks. omfatte mannose, maltose,

laktose, arabinose, xylose, ribose, rhamnose, galaktose og glukose, mannitol, xylitol, erytritol, threitol, sorbitol, glycerol eller L-glukonat. Hvor det er ønskelig at sammensetningen skal være fryse/tine-stabil, er polyolen fortrinnsvis en som ikke krystalliserer ved minusgrader (f.eks. -20 °C), slik at den destabiliserer det biologisk aktive materialet i sammensetningen. Det kan være fordelaktig å inkludere to eller flere forskjellige polyoler å hemme dannelsen av krystaller.

[0113] Polymerer kan f.eks. omfatte ulike karbohydrater, polypeptider, lineære og forgrenede hydrofile molekyler. For eksempel kan polymerer i sammensetningen omfatte gelatin, hydrolysert gelatin, ovalbumin, polyvinylpyrrolidon, kollagen, chondroitinsulfat, et sialert polysakkarid, actin, myosin, mikrotubuli, dynein, kinetin eller humant serumalbumin. Disse tilsetningsstoffer er ikke nødvendigvis utelukkende stabiliserende på det biologisk aktive materialet mot inaktivering, de kan også bidra til å hindre fysisk sammenbrudd av frysetørketmateriale under lyofiliseringen og etterfølgende lagring i fast form. Andre gelatinerstatninger som også kan fungere som stabilisatorer omfatter naturlig kollagen og alginat.

[0114] Det brukes fortrinnsvis gelatin og mer foretrukket, hydrolysert gelatin. "Hydrolysert gelatin" refererer til gelatin som har vært utsatt for partiell hydrolyse for å gi et delvis hydrolysert gelatin med en molekylvekt på fra omtrent 1 kDa til omtrent 50 kDa, eller omtrent 3 kDa. Dette gelatin-hydrolyseproduktet har omtrent samme aminosyresammensetning som gelatin. Den typiske aminosyresammensetning til hydrolysert gelatin er kjent. Delvis hydrolysert gelatin kan fås fra mange kommersielle kilder. Delvis hydrolysert gelatin kan også skaffes ved enzymatisk hydrolyse av gelatin ved hjelp av et proteolytisk enzym, som for eksempel papain, chymopapain og bromelin, selv om andre kjente hydrolysemetoder kan anvendes, f.eks. syrehydrolyse. Fortrinnsvis brukes en gelatin med en molekylvekt på mellom omtrent 1 kDa og 50 kDa. Gelatin hydrolysert til omtrent 3 kDa eller mindre kan være mindre allergifremkallende enn fulllengde gelatin. Gelatinet kan være avledet fra en rekke kilder, inklusive gris og storfe. Det kan brukes humanisert kollagen samt høyforedlet kollagen, for eksempel FreAlagin, et farmasøytisk gelatin med redusert allergisk virkning, tilgjengelig fra Miyagi Chemical Industrial Co, Ltd. Igjen vil mengden av gelatin som brukes i sammensetningen variere avhengig av den generelle sammensetningen og dens tiltenkte bruk. Generelt vil konsentrasjonen av gelatin være fra omtrent 1 til omtrent 7 %, mer foretrukket, mellom omtrent 1 og 5 %. En foretrukket sammensetning omfatter omtrent 5 % gelatin.

[0115] Formuleringer for fremstilling av sammensetningene kan f.eks. omfatte en eller flere overflateaktive midler for å hjelpe i løselighet og stabilitet av sammensetningsbestanddelene, og for å hjelpe å danne og stabilisere skummet. De overflateaktive midlene kan f.eks. omfatte ikke-ioniske vaskemidler, som polyetylen-glykol sorbitanmonolaurat (Tween 20), polyoksyetylensorbitan monooleat (Tween 80), blokk-kopolymerer av polyetylen og polypropylenglykol (Pluronic) og/eller lignende. Sammensetningene kan inkludere ioniske vaskemidler. Sammensetningene kan inkludere overflateaktive stoffer som f.eks. polyetylglykol, polypropylen, polyetylglykol / polypropylenglykol-kopolymerer, polyetylglykol alkyletere, polypropylenglykol alkyletere, polyetylglykol / polypropylen glykoleter blokk-kopolymerer, alkylarylsulfonater, fenylsulffonater, alkylsulfater, alkyl-sulfonater, alkyl-eter-sulfater, alkyl-aryl etersulfater, alkyl polyglykol eterfosfater, polyaryl fenyl eterfosfater, alkylsulfosuccinater, olefinsulfonater, parafinsulfonater, petroleumssulfonater, taurider, sarcosider, fettsyrer, alkylnaftalensulfonsyrer, naftalensulfonsyrer, lignosulfonsyrer, kondensater av sulfonerte naftalener med formaldehyd, eller kondensater av sulfonerte naftalener med formaldehyd og fenol, lignin-sulfit avlut, alkylfosfater, kvaternære ammoniumforbindelser, aminoksyder, betainer og/eller liknende. Overflateaktive stoffer kan være til stede i sammensetningene ifølge oppfinnelsen i en konsentrasjon som strekker seg fra omtrent 0,001 vektprosent til omtrent 2 vektprosent, eller omtrent 0,01 vektprosent til omtrent 1 vektprosent.

[0116] Buffere kan være til stede, f.eks. for å kontrollere pH, forbedre stabilitet, påvirke konstituentoppløselighet, gi komfort ved administrering og lignende, i sammensetninger for fremstilling av tørre skumsammensetninger. Sammensetningens pH kan kontrolleres i området fra omtrent pH 4 til omtrent pH 10, fra omtrent pH 6 til omtrent pH 8, eller omtrent pH 7,2. Foretrukne buffere er ofte koblete syre og saltformer av et bufferanion generelt anerkjent som sikre for den spesielle administreringsruten til det bioaktive materialet. Typiske buffere for bruk i sammensetningene inkluderer f.eks. kalium-fosfat, natriumfosfat, natriumacetat, natriumsitrat, histidin, imidazol, natrium, succinat, ammoniumbikarbonat, karbonater og lignende.

[0117] I en utførelsesform inneholder sammensetningen midlene som er identifisert ovenfor (dvs. biologisk aktivt materiale, polyol, overflateaktivt middel og gelatin) og er hovedsakelig fritt for ett eller flere konserveringsmidler, for eksempel benzylalkohol, fenoly, m-kresol, klorbutanol og benethonium klorid). I en annen utførel-

sesform, kan et konserveringsmiddel inngå i sammensetningen, spesielt når sammensetningen er en multidose-sammensetning.

[0118] En eller flere farmasøytisk akseptable bærere, eksipienter eller stabilisatorer slik som de som er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, Osol, A. Ed. (1980) kan bli inkludert i sammensetningen, forutsatt at de ikke negativt påvirker de ønskede egenskapene til sammensetningen. Akseptable bærere, eksipienter eller stabilisatorer er ikke-toksiske for mottakerne i de doseringer og konsentrasjoner som anvendes, og omfatter ytterligere bufringsmidler; koløsemidler; saltdannende mot-ioner som kalium og natrium, antioksydanter som metionin, N-acteyl cystein eller askorbinsyre; chelaterende midler, som EDTA eller EGTA. Aminosyrer som f.eks. arginin og metionin kan inkluderes i sammensetningene. Arginin kan være tilstede i sammensetningene i en mengde som strekker seg fra omtrent 0,1 vektprosent til omtrent 5 vektprosent. Metionin kan være til stede i sammensetningen i en konsentrasjon i området fra omtrent 1 mM til omtrent 50 mM, eller omtrent 10 mM. Glycerol kan være til stede i sammensetningen i en konsentrasjon i området fra omtrent 0,1 vektprosent til omtrent 5 vektprosent, eller omtrent 1 vektprosent. EDTA kan være til stede i sammensetningen i en konsentrasjon i området fra omtrent 1 mM til omtrent 10 mM, eller omtrent 5 mM.

EKSEMPLER

[0119] De følgende eksempler er gitt for å illustrere, men ikke for å begrense den foreliggende oppfinnelsen.

EKSEMPEL 1

PRESERVERING AV LEVENDE, SVEKKEDE VIRUS

[0120] Dette eksempel beskriver en sammensetning som opprettholdte proteinintegritet og -stabilitet etter lagring ved 37 °C i 125 dager.

[0121] Enverdig levende svekket influensavirusB/Harbin (lot CAZ039) ble formulert som en 8,0 log FFU/ml titer-oppløsning (-10 mikrogram/ml total proteinkonsentrasjon av viral-stamopløsning) inneholdende 40 % sukrose, 5 % gelatin, 0,02 % Pluronic F68, 25 mM 7,2 pH KP04 buffer. En mL alikvoter av denne løsningen ble deretter fordelt i 10 ml lyofiliserings-glassampuller, delvis dekket med lyofilise-

ringstopper, og lyofilisert ved hjelp av en VirTis Genesis 25EL lyofiliserer (tilgjengelig fra VirTis, Gardiner, NY) i henhold til følgende syklusbetingelser:

- 1) Forkjølte hyller til 15 °C (med tørkemiddel på lyofiliseringshylle med kondensator satt på -60 °C);
- 2) Last ampullene og la stabilisere i 30 minutter;
- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 60 minutter;
- 5) Gradient til 33 °C på omtrent 0,7 °C/minutt;
- 6) Hold i 48 timer, og
- 7) Sett topp på apullene.

Det resulterende skummet hadde et fuktighetsinnhold på omtrent 2,2 % (etter vekt) og en Tg på omtrent 43 °C.

EKSEMPEL 2

SAMMENSETNINGER

[0122] Følgende sammensetninger ble fremstilt i henhold til metodene ifølge oppfinnelsen ved hjelp av B/Harbin influensavirus eller placebo. pH til sammensetningene ble justert med enten natriumhydroksyd eller kaliumhydroksyd.

ID	Glutamat	Polyol	Polymer-tilsetning	Overflateaktivt stoff	Annet
AVS1	20 %	10 % sukrose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	2 % arginin, 5 mM EDTA, 10 mM metionin, 50 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS2	20 %	10 % sukrose	-	0,1 % Pluronic F68	5 % arginin, 5 mM EDTA, 10 mM metionin, 7,2 KPO4 buffer 50 mM
AVS3	25 %	15 % sukrose	-	0,1 % Pluronic F68	5 % arginin, 5 mM EDTA, 50 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS4	25 %	15 %	--	0,1 % Pluronic	5% arginin , 50 mM

ID	Glutamat	Polyol	Polymer-tilsetning	Overfpateaktivt stoff	Annet
		sukrose		F68	7,2 KPO4 buffer
AVS5	25 %	5 % sukrose	--	0,1 % Pluronic F68	5 % arginin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS1A	20	10 % sukrose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	2 % arginin, 5 mM EDTA, 10 mM metionin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS2A	20	10 % sukrose		0,1 % Pluronic F68	5% arginin, 5 mM EDTA, 10 mM metionin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS3A	25	15 % sukrose		0,1 % Pluronic F68	5% arginin, 5 mM EDTA, 10 mM metionin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS4A	25	15 % sukrose		0,1 % Pluronic F68	5 % arginin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS5A	25	5 % sukrose		0,1 % Pluronic F68	5 % arginin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
		sukrose			
AVS6	20	10 % sukrose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	2 % arginin, 5 mM EDTA, 10 mM metionin
AVS7	20	10 % sukrose		0,1 % Pluronic F68	5% arginin, 5 mM EDTA, 10 mM metionin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS8	25	15 % sukrose		0,1 % Pluronic F68	5% arginin, 5 mM EDTA, 10 mM metionin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS9	25	15 % sukrose		0,1 % Pluronic F68	5 % arginin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS10	25	5 % sukrose		0,1 % Pluronic	5 % arginin, 50 mM

- 40 -

ID	Glutamat	Polyol	Polymer-tilsetning	Overfpateaktivt stoff	Annet
		se		F68	7,2 KP04 buffer
AVS11	10 %	20 % sukrose, 10 % raffinose		0,2 % Pluronic F68	1 % arginin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS12	20	20 % raffi-nose		0,2% Pluronic F68	1 % arginin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS13	25	10 % sukrose, 2 % raffinose		0,2% Pluronic F68	5 % arginin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS14	20	10 % sukrose		0,2 % Pluronic F68	10 mM metionin, 50 mM 7,2 KP04 buffer
AVS15	20	10 % sukrose	1 % gela-tin	0,2 % Pluronic F68	10 mM metionin
AVS16	20	10 % sukrose	1 % gela-tin	0,2% Pluronic F68	10 mM metionin
AVS17	20	2 % raffi-nose	1 % gela-tin	0,2 % Pluronic F68	10 mM metionin
AVS18	20	10 % raffi-nose		0,2 The Pluronic F68	10 mM metionin
AVS19	20	10 % sukrose		0,2% Pluronic F68	10 mM metionin, 100 mm 7,0 citrat-buffer
AVS20	20	10 % sukrose	1 % gela-tin	0,2 % Pluronic F68	10 mM metionin, 100 mm 7,0 citrat-buffer
AVS21	20	10 % sukrose, 2 % raffinose	1 % gela-tin	0,2 % Pluronic F68	10 mM metionin, 100 mm 7,0 citrat-buffer
AVS22	20	2 %	1 % gela-tin	0,2 % Pluronic F68	10 mM metionin
	20	raffinose		F68	100 mM 7,0 citrat-buffer
AVS23	20	10 % raffi-		0,2 % Pluronic	10 mM metionin,

ID	Glutamat	Polyol	Polymer-tilsetning	Overfpateaktivt stoff	Annet
		nose		F68	100 mM 7,0 citrat-buffer
AVS24	20	10 % sukrose, 5 % raffinose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS25	20	15 % sukrose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS26	20	15% raffinose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS27	20	10 % sukrose, 5% raffinose		0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS28	20	10 % sukrose, 5% raffinose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	2 % ovalbumin, 10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS29		40% raffinose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS30	10	40% sukrose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS31	10	40% sukrose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mm 7,2 KP04 buffer, 1 % glyserol
AVS32	20	15% sukrose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS33	20	15% sukrose	1% gelatin	0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer

ID	Glutamat	Polyol	Polymer-tilsetning	Overfpateaktivt stoff	Annet
AVS34	20	15% sukrose		0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS35	20	20% sukrose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS36	20	20% sukrose		0,1 % Pluronic F68	2 % ovalbumin, 10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS37	10	20 % sukrose,		0,1 % Pluronic F68	1% arginin, 10 mM metionin, 25 mM
		10% raffinose		0,2% Pluronic F68	7,2 KP04 buffer
AVS38	20	20% sukrose	1% gelatin	0,005 % Tween 20	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS39	20	20% sukrose	5 % gelatin	0,1 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS40	20	20% sukrose		0,005 % Tween 20	2 % ovalbumin, 10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS41	10	40% sukrose	5 % gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS42	10	40% sukrose	5 % gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mm 7,2 KP04 buffer, 1 % glyserol
AVS43		40% sukrose	5 % gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KP04 buffer
AVS44		40% sukrose	5 % gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mm 7,2 KP04 buffer, 1 % glyserol

ID	Glutamat	Polyol	Polymer-tilsetning	Overfpateaktivt stoff	Annet
AVS45	10	40% sukrose	5 % gelatin		10 mM metionin, 1 % glycerol
AVS46		50% sukrose	1 % gelatin		10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer, 1 % glycerol
AVS47	10	40% sukrose	5 % gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer, 1 % glycerol
AVS48		40 % sukrose, 5 % raffinose	5 % gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer, 1 % glycerol
AVS49		40% sukrose	3% gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS50		40% sukrose	1% gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS51		40% sukrose		0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS52		40% sukrose	5 % gelatin		10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS53		40% sukrose	5 % gelatin	0,02% Pluronic F68	25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS54		40% sukrose	5 % gelatin		25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS55		20% sukrose	5 % gelatin	0,02 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS56		10 % sukrose	5 % gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS57		40% sukro-		0,02% Pluronic	5% ovalbumin, 25

ID	Glutamat	Polyol	Polymer-tilsetning	Overfpateaktivt stoff	Annet
		se		F68	mM 7,2 KPO4 buffer
AVS58A		40% sukrose	5 % gelatin (Sigma AD)	0,02% Pluronic F68	25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS58B		40% sukrose	5 % gelatin Sigma (R)	0,02% Pluronic F68	25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS59		40% sukrose	5 % gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS60		40% sukrose	5 % gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS61		20% sukrose	2,5% gelatin	0,01 % Pluronic F68	5 mM metionin, 12,5 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS62		40% sukrose		0,02% Pluronic F68	5% arginin, 10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS63		40% sukrose		2,5 % PEG 1000, 0,02 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS64		40% sukrose		2,5 % PVP 10 000, 0,02 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS65		40% sukrose		2,5 % Ficoll 400K, 0,02 % Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS66		20% sukrose	2% gelatin	0,02% Pluronic F68	10 mM metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS67		40% sukrose	5 % gelatin	0,02% Pluronic F68	1% metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer

ID	Glutamat	Polyol	Polymer-tilsetning	Overfpateaktivt stoff	Annet
AVS68		20% sukrose	2% gelatin	0,02% Pluronic F68	1% metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS69		40% sukrose		0,02% Pluronic F68	5 % arginin, 1 % metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer
AVS70		20% sukrose		0,02% Pluronic F68	5 % arginin, 1 % metionin, 25 mM 7,2 KPO4 buffer

[0123] Termostabiliteten til ovennevnte sammensetninger etter post-lyofiliseringslagring ved 37 °C eller 50 °C ble målt. Økt termostabilitet kan observeres som vist som en reduksjon i frekvensen av tap av styrke, målt som log FFU/ml eller TCID50/ml. Den nødvendige tid for et tap i størrelsesorden én log FFU/ml er gitt nedenfor for ulike sammensetninger til oppfinnelsen:

Sammensetning	Stabilitet ved 37 °C
AVS43	125 dager
AVS41	97 dager
AVS44	142 dager
AVS30	93 dager
AVS31	48 dager
AVS42	146 dager

EKSEMPEL 3

SKUMTØREBETINGELSER

[0124] Sammensetninger ble preparert ved hjelp av følgende betingelser for lyofilisering/tørkekammer:

Syklus 1:

- 1) Forkjøle hyller til 25 °C;
- 2) Last ampullene og la stabilisere;

- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 30 minutter;
- 5) Rampe til 45 °C;
- 6) Hold i 1 time;
- 7) Juster temperaturen til 37 °C og hold i 1 time, og
- 8) Sett topp på apullene.

Syklus 2:

- 1) Forkjøre hyller til 30°C;
- 2) Last ampullene og la stabilisere;
- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 2 timer;
- 5) Rampe til 37°C;
- 6) Hold i 16 timer, og
- 7) Sett topp på apullene.

Syklus 3:

- 1) Forkjøre hyller til 15°C;
- 2) Last ampullene og la stabilisere;
- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 60 minutter;
- 5) Rampe til 37°C;
- 6) Hold i 20 timer, og
- 7) Sett topp på apullene.

Syklus 4:

- 1) Forkjøre hyller til 12°C;
- 2) Last ampullene og la stabilisere;
- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 25 minutter;
- 5) Rampe til 33°C;
- 6) Hold i 24 timer, og
- 7) Sett topp på apullene.

Syklus 5:

- 1) Forkjøre hyller til 17°C;
- 2) Last ampullene og la stabilisere i 10 minutter;
- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 60 minutter;
- 5) 5) Rampe til 37°C;
- 6) Hold i 48 timer;

- 7) Rampe til 40°C;
- 8) Hold i 48 timer, og
- 9) Sett topp på apullene.

Syklus 6:

- 1) Forkjøle hyller til 20°C;
- 2) Last ampullene og la stabilisere;
- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 60 minutter;
- 5) Rampe til 33°C;
- 6) Hold i 72 timer, og
- 7) Sett topp på apullene.

Syklus 7:

- 1) Forkjøle hyller til 15°C;
- 2) Last ampullene og la stabilisere;
- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 60 minutter;
- 5) Rampe til 25°C;
- 6) Hold i 72 timer, og
- 7) Sett topp på apullene.

Syklus 8:

- 1) Forkjøle hyller til 7°C;
- 2) Last ampullene og la stabilisere;
- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 120 minutter;
- 5) Rampe til 20°C;
- 6) Hold i 72 timer, og
- 7) Sett topp på apullene.

Syklus 9:

- 1) Forkjøle hyller til 15°C;
- 2) Last ampullene og la stabilisere i 30 minutter;
- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 60 minutter;
- 5) Rampe til 33°C;
- 6) Hold i 48 timer, og
- 7) Sett topp på apullene.

Syklus 10:

- 1) Forkjøle hyller til 15°C;

- 2) Last ampullene og la stabilisere i 30 minutter;
- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 18 timer;
- 5) Rampe til 25 °C ved 0,2 °C/minutt;
- 7) Hold i 5 timer;
- 8) 8 Rampe til 33°C ved 0,2 °C/minutt;
- 9) Hold i 19 timer, og
- 10) Sett topp på apullene.

Syklus 11:

- 1) Forkjøle hyller til 7°C;
- 2) Last ampullene og la stabilisere;
- 3) Sett vakuum til 50 mTorr;
- 4) Hold i 3 timer;
- 5) 5 Rampe til 15°C ved 0,2 °C/minutt;
- 6) Hold i 16 timer;
- 7) Rampe til 25 °C ved 0,2 °C/minutt;
- 8) Hold i 2 timer;
- 9) Rampe til 33°C ved 0,2 °C/minutt;
- 10) Hold i 27 timer, og
- 11) Sett topp på apullene.

EKSEMPEL 4

SAMMENSETNINGER

[0125] Den tørkesyklusen som er vist i eksempel 1 ble anvendt for å stabilisere levende B/Harbin influensavirus. Tabellen nedenfor oppsummerer de observerte stabilitetsprofilene til disse sammensetningene etter lagring i ti måneder ved 25 °C:

[illegible]

- 49 -

Sammen- setning	KP04 buff.	Sukrose	Gelatin	Metionin	Pluronic	Hel- ning	Måne- der	Prosess
	pH 7,2 (mM)	(%)	(%)	(mM)	F68	ved 25 oC	til 1 log	Tap
					(%)		FFU/ml	(Log
							tap	FFU/ml)
AVS068	25	10	0	0	0,02	- 0,167	6	0,20
AVS071	25	10	0	10	0	- 0,245	4,1	0,13
AVS072	25	10	0	66,7	0,2	- 0,047	21,4	0,37
AVS073	25	10	2	0	0,2	- 0,089	11,2	0,63
AVS074	25	10	2	10	0,02	- 0,056	17,8	1,13
AVS075	25	10	2	66,7	0	- 0,154	6,5	0,43
AVS076	25	10	5	0	0	- 0,145	6,9	0,67
AVS077	25	10	5	10	0,2	- 0,008	121,2	0,47
AVS078	25	10	5	66,7	0,02	- 0,050	20,0	0,27
AVS079	25	10	5	66,7	0,2	- 0,043	23,1	0,83
AVS080	25	20	0	0	0	- 0,132	7,6	0,50
AVS081	25	20	0	10	0,02	- 0,060	16,8	0,53
AVS082	25	20	0	66,7	0,2	- 0,045	22,4	0,07
AVS083	25	20	2	0	0,02	- 0,040	24,9	2,27

- 50 -

Sammen- setning	KP04 buff.	Sukrose	Gelatin	Metionin	Pluronic	Hel- ning	Måne- der	Prosess
	pH 7,2 (mM)	(%)	(%)	(mM)	F68	ved 25 oC	til 1 log	Tap
					(%)		FFU/ml	(Log
							tap	FFU/ml)
AVS084	25	20	2	10	0	- 0,096	10,4	0,33
AVS085	25	20	2	66,7	0,2	- 0,040	25,0	0,43
AVS086	25	20	5	0	0,2	- 0,022	44,6	0,30
AVS087	25	20	5	10	0,2	- 0,005	200,4	0,40
AVS088	25	20	5	66,7	0	- 0,060	16,7	-0,07
AVS089	25	20	5	66,7	0,02	- 0,022	44,5	0,67
AVS090	25	40	0	0	0,2	- 1,283	0,8	0,63
AVS091	25	40	0	10	0,2	- 1,117	0,9	0,77
AVS092	25	40	0	66,7	0	- 0,120	8,3	0,50
AVS093	25	40	0	66,7	0,02	- 0,033	30,2	0,73
AVS094	25	40	2	0	0	- 0,116	8,6	0,83
AVS095	25	40	2	10	0,2	- 0,016	63,8	0,47
AVS096	25	40	2	66,7	0,02	- 0,030	33,2	0,80
AVS097	25	40	2	66,7	0,2	- 0,017	58,1	0,27

Sammen- setning	KP04 buff.	Sukrose	Gelatin	Metionin	Pluronic	Hel- ning	Måne- der	Prosess
	pH 7,2 (mM)	(%)	(%)	(mM)	F68	ved 25 oC	til 1 log	Tap
					(%)		FFU/ml	(Log
							tap	FFU/ml)
AVS053s	25	40	2	0	0,02	- 0,022	44,6	0,47
AVS098	25	40	5	0	0,2	- 0,023	43,4	0,37
AVS052b	25	40	5	10	0	- 0,087	11,6	0,67
AVS043c	25	40	5	10	0,02	- 0,037	27,2	0,77
AVS099	25	40	5	66,7	0	- 0,067	15,0	0,40

EKSEMPEL 5

PROSESSER SOM GIR HØY LEVEDYKTIGHET

[0126] I tidligere forsøk hadde vi registrert at prosessstap av levedyktighet for virus og bakterier var typisk større for fryse/skum-tørking enn for standard lyofilisering med samme sammensetning. Vi forventet at forskjellen skyldtes hovedforskjellene i prosessene: skuming og kokende av for-tørktrinn før frysing i skum/fryseprosessen sammenlignet med standard lyofiliseringsprosedyren. Eksperimenter ble utført for å undersøke og karakterisere prosessstapene av levedyktighet med prosessstrinn, tid, temperatur og tørrhet.

[0127] *Listeria monocytogenes* ble behandlet i en sukrose-basert sammensetning gjennom skum-frysetørkesekvens med fjerning av prøver for analyser på viktige punkter.

Figur 9 viser et diagram av ampulleteperaturer i forhold til sukrosemasse-fraksjon (tørkegrad) gjennom prosessen. Ampuller med en *Listeria*-sammensetning ble plas-

sert i et trykk- og temperaturkontrollert kammer. Prosessen startet 80 med *Listeria* i en sammensetning på ca 30 % sukrose ved 15 °C. Sammensetningen ble ekspandert for å produsere et skum i et skummetrinn 81. Skummet ble deretter frosset 82 og vann fjernet i et primært tørkettrinn ved en hylletemperatur på 15 °C ved fordamping og sublimering 83. Når omtrent 25 % fuktighet var igjen, ble det sekundære tørkettrinnet 84 akselerert ved å heve kammertemperaturen raskt til omtrent 33 °C, som for vår standard ikke-skummet lyofilisering. Sekundær tørking fortsatte inntil restfuktigheten var omtrent 3 % 85. Prøver ble tatt ved forskjellige punkter i prosessen for *Listeria* koloni-tellinger.

[0128] Til vår overraskelse, var svært lite av tapet av levedyktighet i skum/fryseprosessen på grunn av de første skumme- og frysetrinnene unike for fryse/skumprosessen. Dermed var de uventet ikke en vesentlig årsak for forskjellen i levedyktighet mellom lyofiliseringsprosesser for skum og ikke-skum. Fordi tørketemperaturene som ble brukt var relativt lav sammenlignet med mange sekundære tørkettrinn ved lyofilisering i bransjen, og det samme for fryse/skum som for standard lyofiliseringsprosesser, forventet vi ikke at tørkingen var en viktig faktor i forskjeller i levedyktighet forskjeller mellom prosessene. Igjen ble vi overrasket fordi de største tapene i levedyktighet for fryse/skum var forbundet med sekundær tørking (omtrent -1,5 log10). Vi teoretiserte at tapene skyldtes en kombinasjon av varme og uttørkingsstress over tid, selv om slike temperaturer ikke var problematisk i en standard lyofilisering.

[0129] Forsøket ble gjentatt, denne gang med primærtørking ved 15 °C hylletemperatur som strekker seg gjennom det sekundære tørkettrinnet i et tidsrom tilstrekkelig til å redusere restfuktighet til under 10 %. Her tok det omtrent 4 til 5 timer på 15 °C for å nå 10 % restfuktighet. Total, primær og sekundær tørking ved 15 °C fortsatte i omtrent 16 timer for å oppnå en restfuktighet på omtrent 7 %. Deretter et endelig tørkettrinn med en trinnvis økning av temperaturen til 33 °C. Som vist i figur 10, skyldes tapene i levedyktighet forbundet med fryse/skum-tørking hovedsakelig valg av sekundære tørketemperaturer til punktet med 10 % restfuktighet. Prosesseringstiden og ultimate uttørkingsnivåer ble funnet å ha relativt liten innflytelse på levedyktigheten i fryse/skum-tørkeprosesser.

[0130] De viktigste forskjellene mellom fryse/skum-tørking og standard lyofiliseringsprosesser var skummingen og konvektiv koketørking som oppstår før frysing, og den utvidede sekundære tørketiden involvert i fryse/skumprosessen. Disse eks-

perimentene ga det overraskende resultatet at disse faktorene ikke er de største bidragsyterne til tapene i levedyktighet observert i sammenligninger av fryse/skum- og standard lyofiliseringsprosesser. Dette eksperimentet identifiserte en variabel blant mange som har en dominerende innflytelse på utfallet for levedyktighet. Ved å redusere sekundære tørketemperaturer for fryse/skum-tørking, har vi funnet at man kan oppnå sammenlignbare levedyktigheter som for standard lyofilisering.

EKSEMPEL 6

SYSTEM FOR LASK LAVTEMPERATUR SEKUNDÆRTØRKING

[0131] Som beskrevet ovenfor, kan fryse/skum-preserveringsprosesser ha nytte av lavere temperaturer under sekundærtørkettrinnet. Men dette kan føre til lengre prosesseringstid som kan påvirke framstillingsproduktiviteten. De følgende eksemplene identifiserer systemelementer som kan fremskynde lavtemperatur sekundærtørking som brukes i visse fryse/skum-tørkeprosesser ifølge oppfinnelsen.

[0132] Forholdet mellom overflate og volum for fryse/skum-tørkematerialet kan være relativt lavt f.eks. i forhold til mange lyofiliserings- eller spray-tørkeprosesser. Denne ulempen kan være særlig problematisk når et dypt eller tykt frosset skum skal tørkes i en hovedsakelig lukket beholder, slik som en lyofiliseringsampulle. Vi tror sekundærtørking ved lave sekundære tørketemperaturer kan oppnås ved praktiske tidsskalaer og resultere i høy levedyktighet for virus og mikroorganismer, f.eks. ved å redusere beholderens innvirkning på tørkingen og/eller ved å redusere avstanden vannet må bevege seg for å forlate skummet.

[0133] Systemer kan utformes for å øke hastigheten for lavtemperaturtørking av frosset skum. For eksempel, som vist i figur 11, kan systemer inkludere et miljøkontrollkammer 110, som gir styring av interne temperaturer og trykk. Inne i kammeret kan det være en sammensetning med et bioaktivt materiale 111 (flytende oppløsning og/eller suspensjon) for skumming og frysing. Sammensetningen kan anordnes på en overflate 112. Selv om overflaten kan være den indre overflate av en beholder, er den for raskere tørking fortrinnsvis ikke en indre overflate av en beholder. Det indre trykk i kammeret kan reduseres for å ekspandere sammensetningen til et skum 113. Skummet kan fryses, f.eks. ved eksponering for en kjølt intern atmosfære, fordampingskjøling og/eller avkjøling av overflaten 112. I foretruk-

ne utførelsesformer har det frosne skummet en tykkelse 114 på mindre enn omtrent 10 mm, mindre enn 5 mm, mindre enn 2 mm, omtrent 1 mm eller mindre. Det tynne skummet, direkte eksponert for det innvendige kammermiljøet uten innvikning fra en beholder, kan utvikle seg raskt gjennom sekundærtørking til 10 % restfuktighet eller mindre.

[0134] I systemene ifølge oppfinnelsen, kan frosne skum lyofiliseres og sekundærtørket enten satsvis eller kontinuerlig, f.eks. på overflaten av en stor beholder, en plate, et belte eller en trommel 115. I det kontinuerlige prosesseringssystemet som vises, kan formuleringen påføres ved å sprøyte et lag på en trommeloverflate. Laget kan ekspanderes til et skumlag med et internt vakuum. Skummet kan fryses på overflaten med primærtørkingen som kan være med lyofilisering. Trommelen kan rotere og overføre varme til eller fra laget som ønsket, på forskjellige punkter langs rotasjonen, f.eks. ved kontakt med varmevekslere, temperaturkontrollerte gassstrømmer, infrarødt lys, termoelektriske enheter og/eller lignende. For eksempel, ved et punkt langs trommelflaten hvor skummingen er fullført, kan trommelflaten bli kjølt for å fryse skummet. Overflaten kan deretter varmes litt på punkter videre langs posisjoner av trommelrotasjonen for å erstatte varmen tapt ved sublimering. Ved sekundærtørkepunkter ytterligere langs trommelrotasjonen, kan ytterligere varme tilføres overflaten for å f.eks. opprettholde omtrent 25 °C for å fjerne restfuktighet. Endelig kan produktet med fryse/skum-tørket bioaktivt materiale høstes fra trommelen, for eksempel ved skaping.

[0135] Alternativt kan påføring, skumming, frysing, primærtørking, sekundærtørking og høsting skje i en batch-sekvensprosess på hele prosessoverflaten. For eksempel, kan formuleringen helles eller spres på en plate eller bunnen av en stor åpen beholder for å danne et tynt lag. Arket kan plasseres i et miljøstyrt kammer og sammensetningen kan ekspanderes til et tynt skum (f.eks. 1 mm til 10 mm) ved trykkreduksjon. Skummet kan fryses ved en kombinasjon av tap av latent varme og varmeledning ut fra skummet. Primærtørkingen kan være ved sublimering med erstatning av latent varme fra omgivende atmosfære i det temperaturstyrte kammeret. Sekundærtørkingen kan omfatte eksponering av skummet til en atmosfære ved 15-25 °C i den tiden som er nødvendig for å oppnå 5 % relativ fuktighet. Skummet kan høstes ved å bryte skumplaten opp i partikler og helle dem i konvensjonelle beholdere for lagring.

EKSEMPEL 7

FORLENGET LAVTEMPERATURTØRKING

[0136] Levedyktigheten til *Listeria* er blitt økt gjennom forlenget lavtemperatur vakuumtørrking godt inne i, eller gjennom, det sekundære trinnet.

[0137] Som vist i figur 12A, forblir levedyktigheten til *Listeria monocytogenes* relativt stabil under primær- og sekundærtørrking ved en kammertemperatur på 15 °C. Men på slutten med sekundærtørrking ved 33 °C ble tap i levedyktighet akselerert.

[0138] Ved å ganske enkelt utvide 15 °C tørketemperatur til slutten av tørketiden, som vist i figur 12B, beholdt man høye nivåer for levedyktighet, selv til en restfuktighet på omtrent 5 %.

EKSEMPEL 8

TRINNVIS SEKUNDÆRTØRKING

[0139] Levedyktigheten til *Listeria* er blitt økt gjennom forlenget lavtemperatur vakuumtørrking med tørkingen fullført med trinnvise temperaturøkninger.

[0140] Som vist i figur 13, preserves *Listeriaceae* med primærtørrking og tidlig sekundær på omtrent 7 °C, fulgt av ytterligere sekundærtørrking ved 15 °C. Denne trinnvise tørkingen ga høy levedyktighet til omtrent 7 % restfuktighet i en praktisk prosesseringstid. Ytterligere sekundærtørrking ved omtrent 25 °C og til slutt omtrent 33 °C reduserte ikke levedyktigheten vesentlig, f.eks. i forhold til 33 °C tørking vist i figur 12A. På denne måten ble tørking til mindre enn 5 % restfuktighet oppnådd samtidig som man beholdt høy levedyktighet, selv med en endelig 33 °C tørketrinn.

EKSEMPEL 9

EFFEKTEN AV IKKE-GLASSAKTIG MATRISE PÅ LEVEDYKTIGHET

[0141] *Listeria* ble preservert i polyolmatriser tørket under og over matrisen Tg uten vesentlig å endre levedyktigheten til mikroben.

[0142] *Listeria* ble fryse/skum-tørket i en sammensetning med sukrose (ren Tg 34,5 °C) og i en sammensetning med trehalose (ren Tg 53,9). Sammensetningene ble tørket i ampuller ved temperaturer som passerte over Tg til sukrosesammensetningene men forble under Tg til trehalosesammensetningen. Som vist i diagrammet på figur 14, ble ikke levedyktigheten til *Listeria* gjennom prosesstrinnene og i det endelige tørkede produktet nevneverdig påvirket av hvorvidt matrisen forble i en glassaktig tilstand under tørkeprosessen.

[0143] Det skal forstås at eksemplene og utførelsesformene som er beskrevet her, kun er veiledende og at forskjellige modifikasjoner eller endringer i lys derav vil bli foreslått til erfarne personer innen bransjen , og skal regnes med i omfanget av de etterfølgende kravene.

[0144] Mens den foregående oppfinnelse er blitt beskrevet i noen detalj for klarhets skyld og forståelse, vil det være klart for en fagmann i bransjen ved lesning av denne beskrivelsen, at forskjellige endringer i form og detalj kan gjøres uten å avvike fra det sanne omfanget av oppfinnelsen. For eksempel kan sammensetningene, teknikkene og apparatene som er beskrevet ovenfor brukes i forskjellige kombinasjoner.+

KRAV

1. En metode for fremstilling av en stabil tørr skumsammensetning omfattende et bioaktivt materiale, denne metoden omfatter:

preparering av en sammensetning omfattende det bioaktive materialet, og en polyol eller polymer, i et løsemiddel;

ekspandering av sammensetningen til et skum;

frysing av skummet;

primærtørking av det frosne skummet ved sublimering ved en skum temperatur på 0 °C eller lavere, og,

sekundærtørking av skummet i et miljø med en temperatur på 25 °C eller mindre i et tidsrom tilstrekkelig til å redusere skummet til en restfuktighet på 10 prosent eller mindre.

2. Metoden i krav 1, karakterisert ved:

det bioaktive materialet omfatter et virus eller bakterier, eller

det bioaktive materialet omfatter en Listeria-bakterie eller en stamme med influensavirus.

3. Metoden i krav 2, karakterisert ved at metoden ytterligere omfatter å holde sammensetningen innenfor 2 °C av en membran-faseovergangstemperatur til viruset eller bakteriene.

4. Metoden i krav 1, karakterisert ved:

skummet har en tykkelse på 2 mm eller mindre;

en sekundær tørketemperatur forblir under glassovergangstemperaturen til skummet;

- 2 -

primærtørkingen eller sekundærtørkingen omfatter lyofilisering ved et trykk på 100 Torr eller mindre, eller

skummet blir tørket i et tidsrom tilstrekkelig til å redusere skummet til en restfuktighet på 5 prosent eller mindre.

5. Metoden i krav 1, videre bestående av:

slipe det tørre skummet til et pulver med en gjennomsnittlig partikkelstørrelse fra omtrent 0,1 μm til omtrent 100 μm , eller

rekonstituering av skummet til væske eller slipe skummet til pulver for administrering til et pattedyr.

6. En metode for fremstilling av en stabil tørr skumsammensetning omfattende et bioaktivt materiale, denne metoden omfatter:

preparering av en sammensetning omfattende det bioaktive materialet, og en polyol eller polymer, i et løsemiddel;

ekspandering av sammensetningen til et skum;

frysing av skummet;

primærtørking av skummet ved sublimering ved en temperatur hvor skummet er frosset eller forblir under glassovergangstemperaturen til skummet, og,

sekundærtørking av skummet i et miljø på 25 °C eller mindre i et tidsrom tilstrekkelig til å redusere skummet til 10 prosent restfuktighet eller mindre.

7. Metoden i krav 6, karakterisert ved:

det bioaktive materialet omfatter et virus eller bakterier, eller

det bioaktive materialet omfatter en Listeria-bakterie eller en stamme med influensavirus.

8. Metoden i krav 7, videre bestående av å holde sammensetningen ved en temperatur innenfor 2 °C av en membran-overgangstemperatur til det bioaktive materialet i 2 eller flere minutter før ekspandering av skummet.
9. Metoden i krav 6, karakterisert ved:
 - skummet har en tykkelse på 2 mm eller mindre; eller
 - skummet blir tørket i et tidsrom tilstrekkelig til å redusere skummet til en restfuktighet på 5 prosent eller mindre.
10. Et system for fremstilling av en stabil tørr skumsammensetning omfattende et bioaktivt materiale, dette systemet omfatter:
 - et miljøstyre-kammer som gir kontroll over intern temperatur og internt trykk, og,
 - et skum i kammeret, dette skummet omfatter det bioaktive materialet, og en polyol eller polymer, i et løsemiddel;
 - hvor, skummet har en tykkelse på 2 mm eller mindre, eller et aspektforhold på 10 eller mer, og,
 - hvor systemet er konfigurert til å tørke skummet til 10 prosent restfuktighet eller mindre, ved en temperatur på 25 °C eller mindre, i løpet av en periode på 2 dager eller mindre.
11. Systemet i krav 10, karakterisert ved:
 - det bioaktive materialet omfatter et virus eller bakterier, eller
 - det bioaktive materialet omfatter en Listeria-bakterie eller en stamme med influensavirus.
12. Systemet i krav 10, karakterisert ved at skummet har en tykkelse på 1 mm eller mindre, eller et aspektforhold på 100 eller mer.

- 5 -

1/14

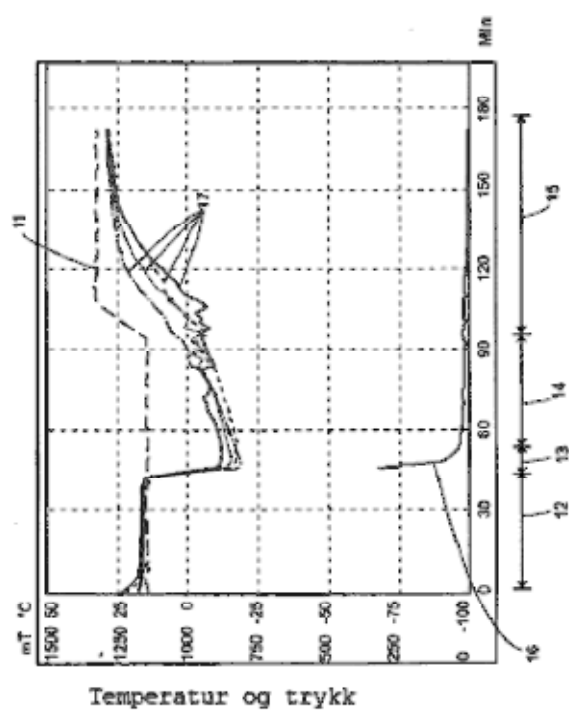


Fig. 1

- 6 -

2/14



Fig. 2A



Fig. 2B



Fig. 2C



Fig. 2D

- 7 -

3/14

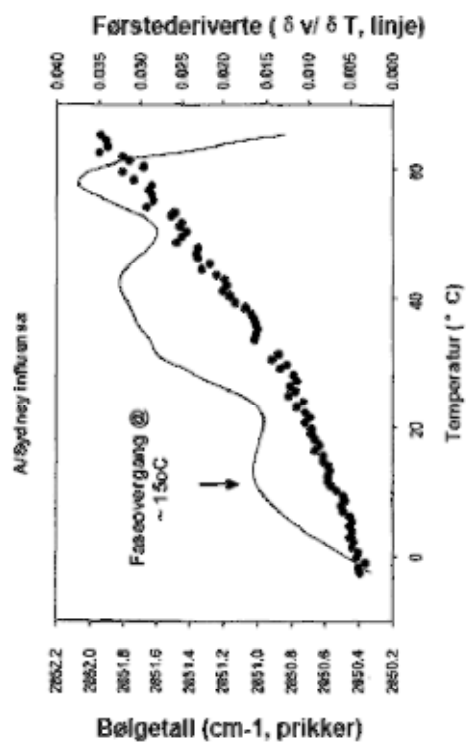
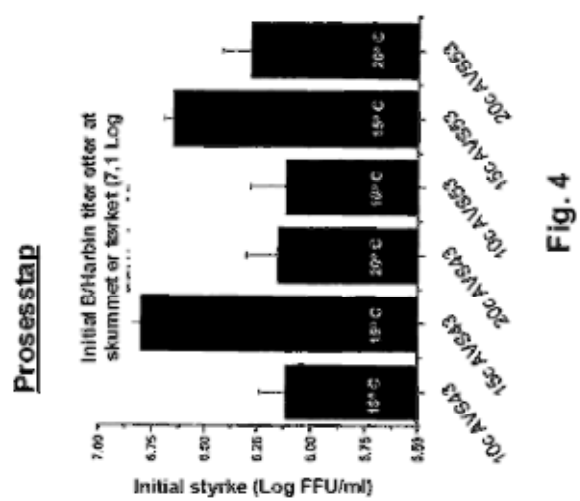


Fig. 3

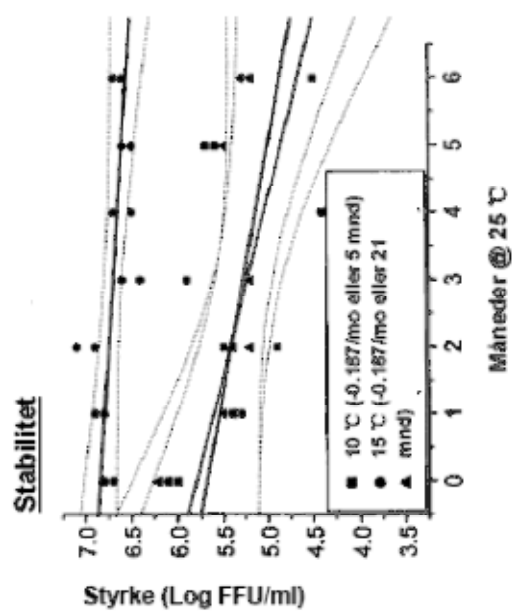
- 8 -

4/14



- 9 -

5/14



- 10 -

6/14

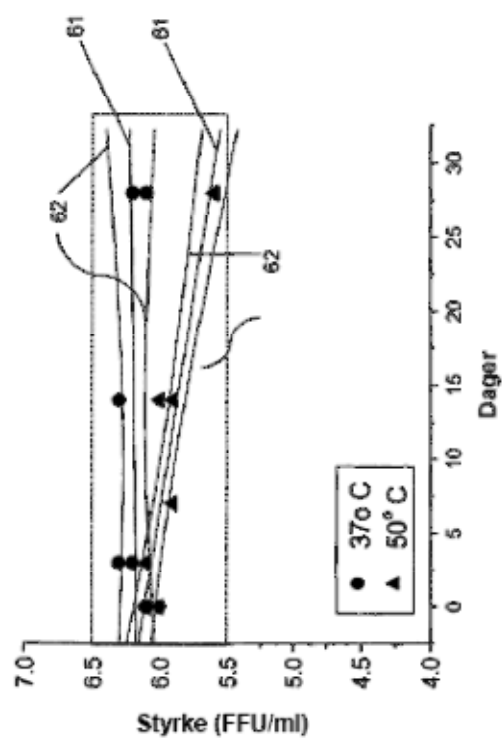


Fig. 6

- 11 -

7/14

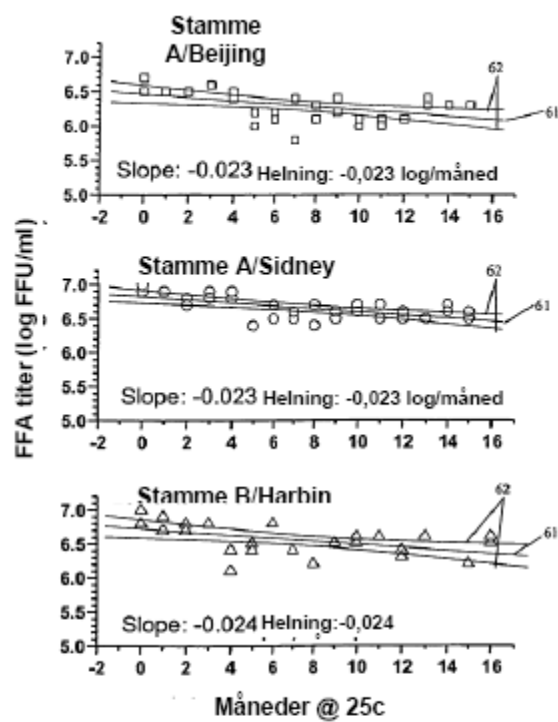


Fig. 7

- 12 -

8/14

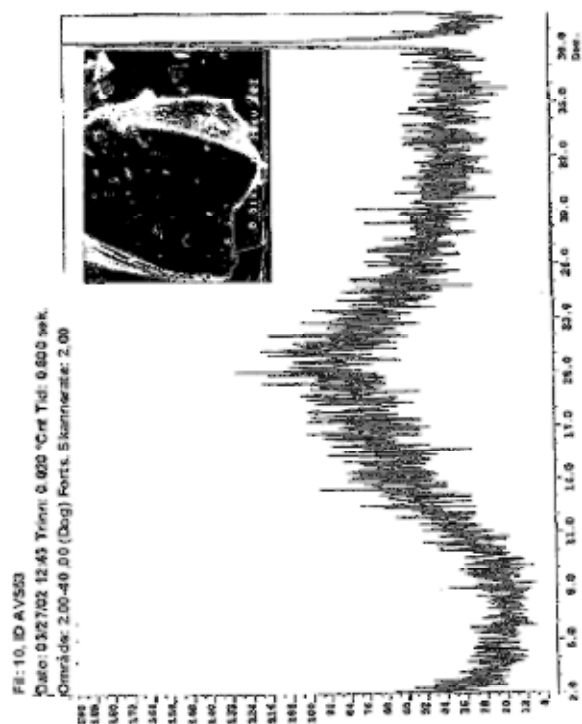


Fig. 8

- 13 -

9/14

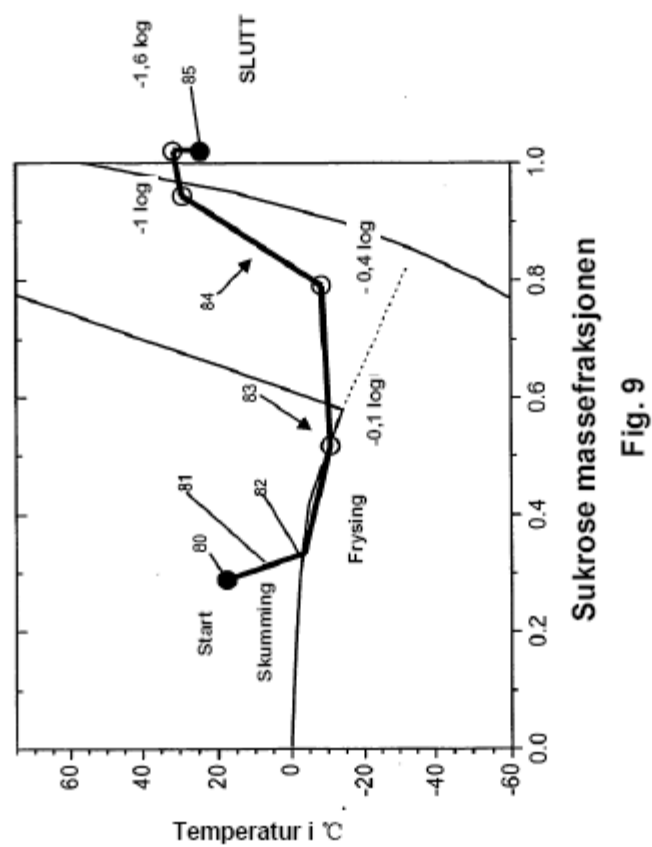


Fig. 9

- 14 -

10/14

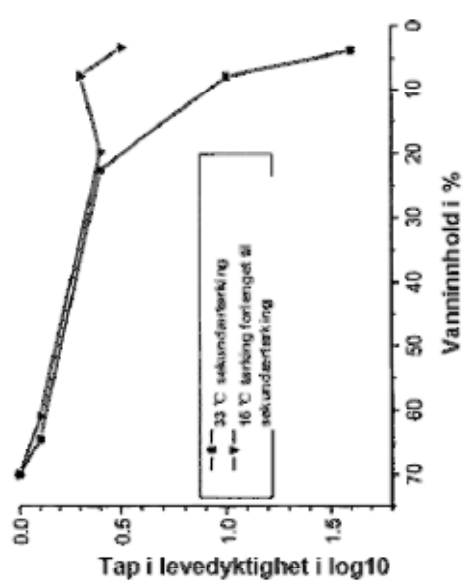


Fig. 10

- 15 -

11/14

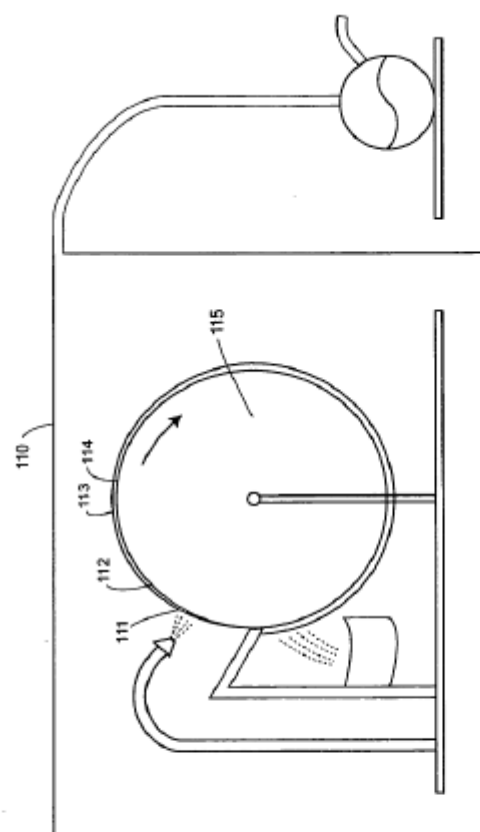


Fig. 11

- 16 -

12/14

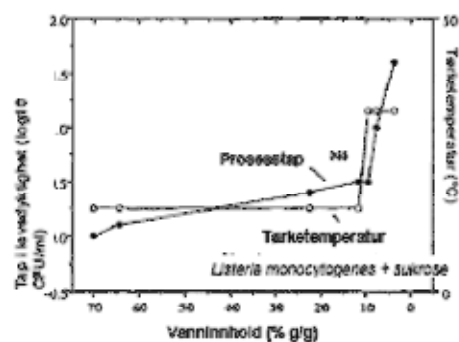


Fig. 12A

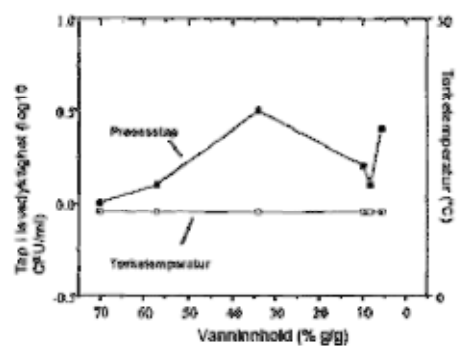


Fig. 12B

- 17 -

13/14

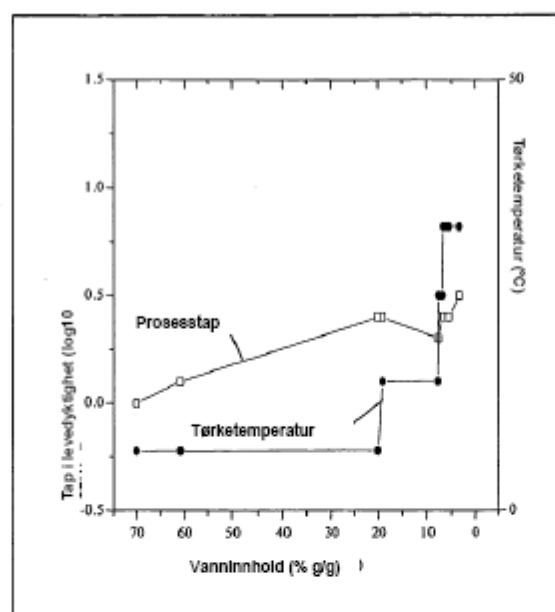


Fig. 13

- 18 -

14/14

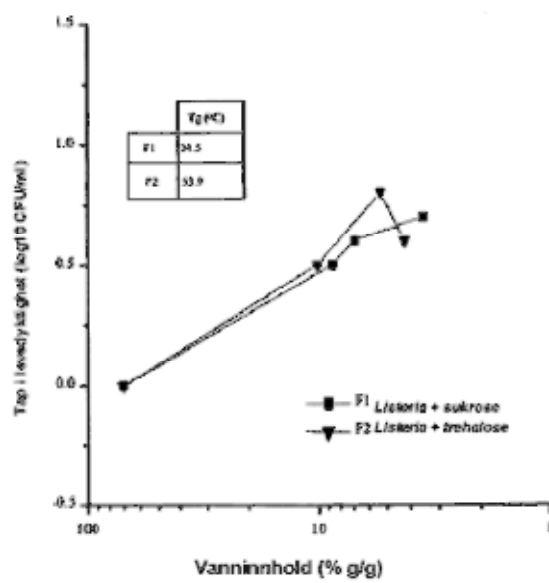


Fig. 14