



## FORMULACIÓN EN UN PROCESO DE LIOFILIZACIÓN

*La liofilización es un método de estabilización cuyo objetivo principal es prolongar la vida útil de los productos farmacológicos. La eliminación del solvente, de naturaleza acuosa en la mayoría de los casos, reduce significativamente las desestabilizaciones que este genera.*



**María Aguilar**, Freeze Drying Laboratory Manager en COMSER

**EL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN** consiste en la congelación de la solución, y la posterior eliminación del disolvente en fase sólida, mediante sublimación y desorción. Esto se lleva a cabo con el aporte de calor al producto de forma controlada, en condiciones de baja presión. Un ciclo de liofilización comprende principalmente cuatro etapas: congelación, evacuación, secado primario y secado secundario.

Este proceso puede resultar potencialmente dañino para el producto, por lo que las diferentes etapas, así como el posterior almacenamiento, deben considerarse individualmente ya que cada una de ellas supone una causa de estrés muy distinta para la molécula activa.

El estudio térmico del producto, el correcto diseño de una receta de liofilización y conseguir el control del proceso son premisas fundamentales para mantener los requerimientos de calidad del producto final.

Pero, además del diseño y control del proceso, es totalmente necesario una adecuada formulación del producto para mantener la estabilidad del principio activo (API).

En la actualidad, el desarrollo de nuevos fármacos lleva a un escenario con nuevas moléculas multiobjetivo compuestas por estructuras complejas. Esto hace estrictamente necesario el conocimiento de la naturaleza de las estructuras que la forman, para así proporcionarles la protección para que puedan soportar todo el proceso de fabricación. Algunos de los retos que se pretenden superar con la formulación de un principio activo son la inestabilidad de las biomoléculas como son la agregación, hidrólisis, oxidación o desnaturalización, en el caso de las proteínas, por ejemplo.

Para una formulación de calidad, los datos generados a partir de estudios de pre-formulación son fundamentales y siembran la base necesaria para la fórmula definitiva del producto final.

La selección de excipientes en las proporciones correctas debe tener en cuenta el proceso de liofilización

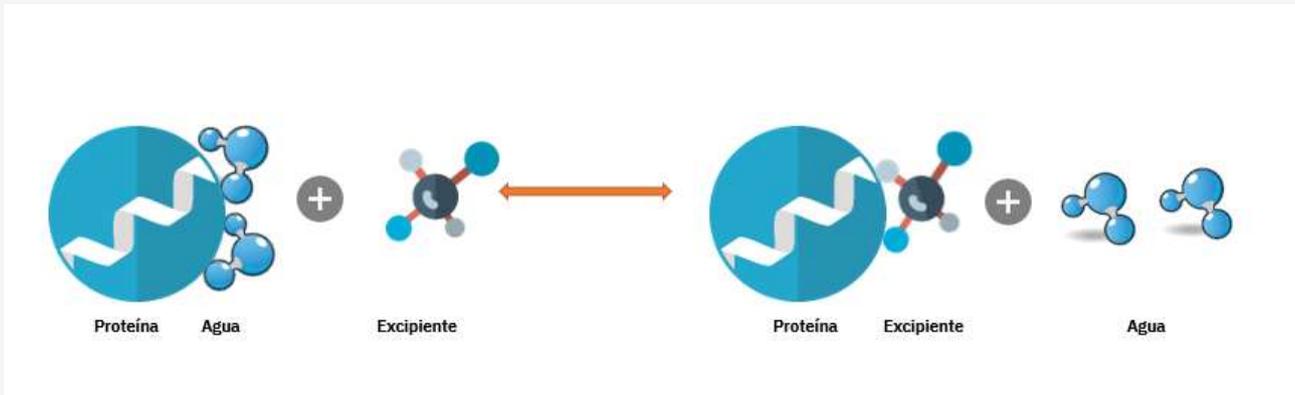
desde la fase temprana de desarrollo del fármaco. Aunque los excipientes se definen como terapéuticamente inactivos, es un hecho conocido el que puedan interactuar con el API y otros excipientes en la formulación. Esta interacción reduce la eficacia de la forma farmacéutica.

Algunas de las características de calidad relacionadas con el producto liofilizado a cumplir tras el desarrollo de la fórmula y el proceso de liofilización son:

- Criterios estéticos:
  - Integridad de la pastilla
  - Apariencia
  - Uniformidad del color
- Estabilidad física y química
- Tiempo de reconstitución
- Humedad residual final
- Recuperación del principio activo
- Niveles de impurezas
- Esterilidad
- Criterios de administración al paciente: libre de partículas, adecuada tonicidad, pH...

Por tanto, los motivos por los que un principio activo necesita de la adición de algunos excipientes para mantener su funcionalidad y cumplir los criterios de aceptación de calidad tras el proceso de liofilización se pueden dividir principalmente en:

- Degradación durante la liofilización
  - Estrés por congelación
    - » Estrés por baja temperatura
    - » Criocentración: durante la congelación, la solución restante se vuelve más concentrada, lo que puede promover la reacción química y la agregación.
    - » Adsorción, adhesión de las moléculas de la superficie al interactuar con el medio: hielo-agua, molécula-pared del vial.
    - » Cambios pH
    - » Separación de fases



**Figura 1:** Sustitución de las moléculas de agua por un excipiente para mantener los enlaces de hidrógeno.  
Fuente: Elaboración propia.

- Estrés por secado
- Estrés por deshidratación
- Baja concentración del API

Los excipientes utilizados en el desarrollo de un fármaco se pueden clasificar según su funcionalidad, aunque uno mismo puede cumplir con varios objetivos dentro de la fórmula. Los más comúnmente utilizados se pueden clasificar en:

- **Estabilizadores**, se pueden dividir en crioprotectores y lioprotectores.

Los crioprotectores mantienen la estructura molecular durante la congelación, desplazando las moléculas de agua para evitar que se creen cristales dentro de la célula, degradándola. Dentro de este grupo se encuentran el glicerol y la glucosa.

**comser** | FREEZE-DRY SOLUTIONS

## EL CÍRCULO COMPLETO EN LIOFILIZACIÓN

Overcoming freeze-drying & aseptic processing challenges



Al lado del laboratorio desde la formulación hasta la fabricación



AYUDAMOS A REDUCIR EL TIME TO MARKET DE SU PROYECTO





Tampón	Rango de pH
Citrato	4,5 - 5,5
Histidina	5,0 - 6,5
Fosfato	6,0 - 7,0
TRIS	6,5 - 7,5

**Tabla 1:** Rangos de pH donde actúan diferentes tampones de pH. Fuente: Elaboración propia.



Excipiente	Temperatura de colapso
Sorbitol	-54,0 °C
Glucosa	-41,0 °C
Sacarosa	-31,0 °C
Lactosa	-30,5 °C
Trehalosa	-28,5 °C
Dextrano	-11,0 °C

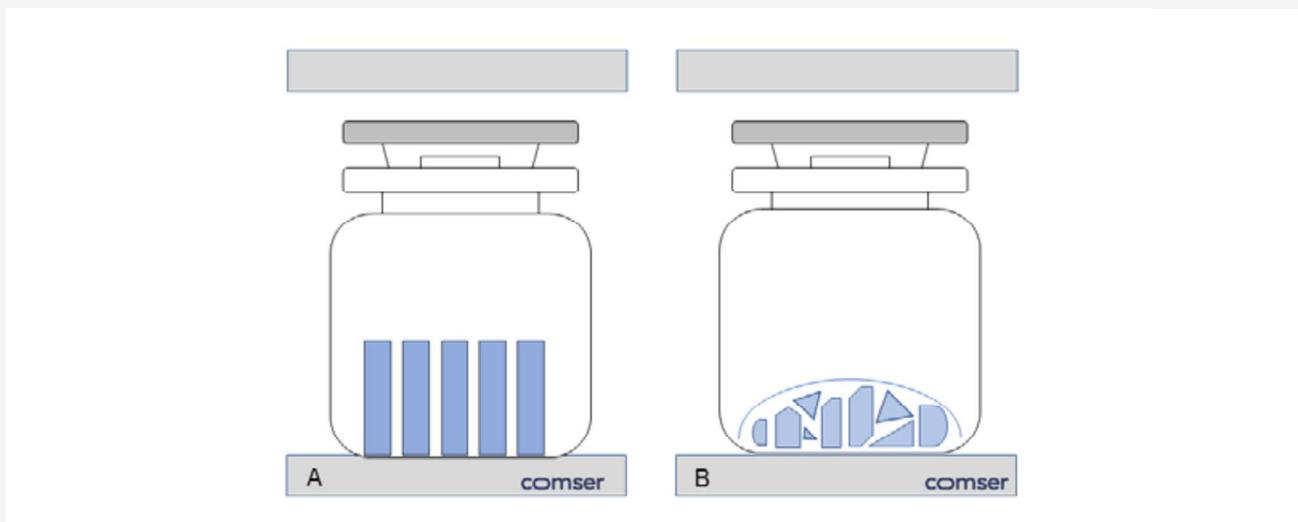
**Tabla 2:** Temperatura de colapso de algunos de los excipientes utilizados en liofilización. Fuente: Elaboración propia.

Los lioprotectores, protegen la estructura durante el secado mediante unión preferencial, sustituyendo los enlaces de hidrógeno de las moléculas de agua, en el caso de las proteínas, o vitrificando la estructura, reduciendo la movilidad molecular. La sacarosa y la trehalosa son ejemplos de este tipo de excipiente.

- **Tensioactivos**, se utilizan para evitar las posibles interacciones por adsorción de las moléculas con el medio, como puede ser la desnaturalización superficial de las proteínas cuando interactúan con la pared del vial o entre la transición hielo-agua. Estos se añaden en baja cantidad ya que la temperatura de transición vítrea suele ser baja. El uso del tampón de histidina/arginina es muy frecuente debido a la multifuncionalidad, así como el polisorbato 20 o polisorbato 80.
- **Tampones de pH**, evitan los cambios de pH que se puedan producir en la congelación debido a las crío-concentraciones. La elección del tampón depende del perfil de estabilidad del pH del ingrediente activo. El tampón debe tener una temperatura de colapso alta, poseer baja volatilidad y tener una temperatura de transición vítrea (Tg)

alta. En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos, según el rango de pH que abarcan.

- **Modificadores de tonicidad**, mantienen la isotonicidad en los tejidos cuando son suministrados al paciente. Ya que pueden reducir la temperatura de colapso del producto, puede ser agregado al diluyente de reconstitución en lugar del producto liofilizado, como es el caso del cloruro sódico. La dextrosa es otro ejemplo claro dentro de esta clase. La glicina se utiliza en la liofilización de proteínas.
- **Agentes de carga**, proporcionan consistencia a la pastilla y atribuyen cierto grado de cristalinidad al producto, mejorando la creación de poros en la estructura seca facilitando la salida del vapor de agua. Azúcares como el manitol o aminoácidos como la glicina son componentes muy comunes en las fórmulas liofilizadas.
- **Modificadores de la temperatura de colapso**, pretenden reducir el tiempo de la etapa de secado primario. Se añaden a la fórmula cuando poseen



**Figura 2:** A. Estructura seca con una formación de poro correcta, que deja salir el vapor de agua con facilidad. B. Estructura con poca consistencia, donde la estructura se ha colapsado, deformando los canales e incrementando la resistencia de la salida de este. Fuente: Elaboración propia.

una temperatura de colapso muy baja. Excipientes como la gelatina o el dextrano, elevan la temperatura de colapso del producto (tabla 2).

- **Antioxidantes**, por ejemplo, la histidina, preservan la formulación de cualquier proceso oxidativo.
- **Polímeros**, como el polietilenglicol, se usan para aumentar la Tg, mejorando la naturaleza vítrea de la matriz.

En resumen, una de las directrices que se deben tener en cuenta para afrontar el desarrollo satisfactorio de la formulación de un producto que cumpla con los criterios de calidad, a la vez que se logre un ciclo eficiente, sería, primeramente, el entendimiento de la función y comportamiento fisicoquímico de cada excipiente.

En base a esto, emplear excipientes que tengan una temperatura de transición vítrea alta, así como utilizar excipientes de carga de tipo cristalino que optimicen la concentración del producto, además de ajustar la temperatura de colapso, ya que, si las concentraciones finales son elevadas, la sublimación se dará de forma lenta, por lo que la duración total del proceso será muy larga. Por otro lado, la humedad residual final de la pastilla será alta, así como el tiempo de reconstitución.

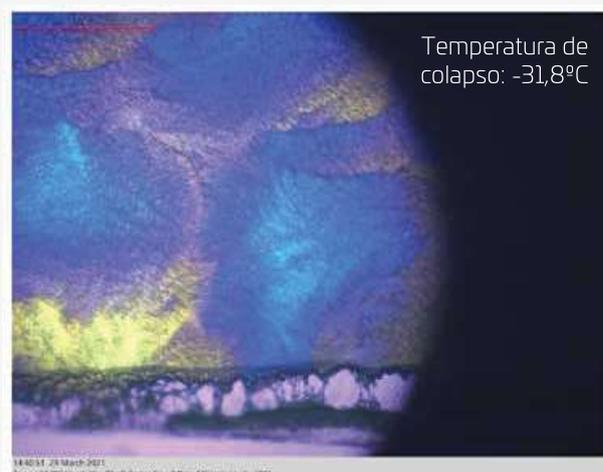
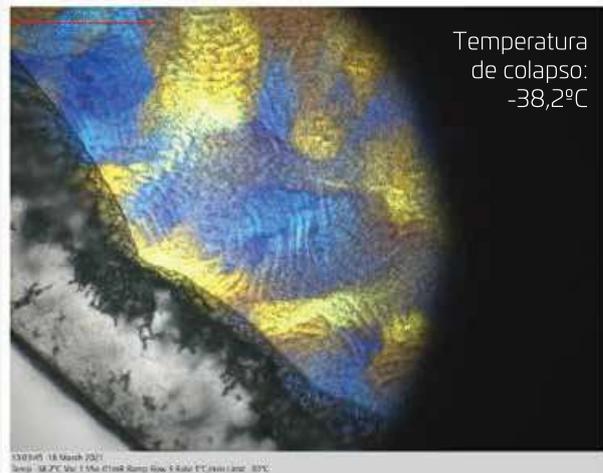
A su vez, estos excipientes deberán garantizar la estabilidad del producto acabado en el tiempo.

Si la molécula activa precisa de un componente para la administración que dificulte la liofilización se puede incorporar en el diluyente.

Una manera para valorar qué formulación es la más apropiada, evitando el método ensayo-error con la realización de diversos ciclos de liofilización, con el gasto de energía y tiempo que esto supone, es la realización de dos análisis para la caracterización térmica de cada fórmula. Estos permiten dilucidar qué temperaturas aproximadas tendrá nuestra receta final y saber si se está ante un ciclo conservador (lento) o si se parte de un ciclo optimizable.

El primero de estos ensayos es una calorimetría diferencial de barrido, mediante un barrido de temperatura, normalmente hasta  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se detecta la temperatura de transición vítrea de la solución. El segundo, trata de una liofilización microscópica, mediante un ensayo en el microscopio criogénico, donde es posible detectar la temperatura de colapso del producto.

A continuación, se muestran tres micrografías pertenecientes a una misma concentración de una enzima, como principio activo, con diferentes excipientes durante el análisis al microscopio de liofilización. La temperatura de colapso cambia en 7 grados, aun así,



**Figura 3:** Imágenes del microscopio de liofilización de Comser durante el desarrollo de una formulación para liofilización. Fuente: Elaboración propia.

una temperatura de colapso de  $-31,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  se considera muy baja, por lo que la fórmula se optimizó hasta elevar la temperatura de colapso (figura 3):

En conclusión, se puede afirmar que la formulación y el desarrollo del proceso están fuertemente relacionados el uno con el otro en liofilización ☺