

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 410**

51 Int. Cl.:

F25D 3/10 (2006.01)

F25D 29/00 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2008 E 08848066 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 2209885**

54 Título: **Método y sistema para la congelación a velocidad controlada de material biológico**

30 Prioridad:

09.11.2007 US 986814 P

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

09.04.2013

73 Titular/es:

**PRAXAIR TECHNOLOGY, INC. (100.0%)
39 OLD RIDGEBURY ROAD
DANBURY, CT 06810, US**

72 Inventor/es:

CHENG, ALAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 400 410 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y sistema para la congelación a velocidad controlada de material biológico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en términos generales a un procedimiento de crioconservación y más particularmente a un método y sistema para proporcionar la congelación a velocidad controlada de materiales biológicos que minimiza el daño celular que es el resultado de la formación de hielo intercelular y de los efectos del soluto que surgen durante el procedimiento de crioconservación.

Antecedentes de la invención

10 La crioconservación es un procedimiento usado para estabilizar materiales biológicos a muy bajas temperaturas. Los intentos previos para congelar materiales biológicos, tales como células vivas a menudo dan como resultado una pérdida significativa de viabilidad celular y en algunos casos tanto como 80% o más pérdida de actividad y viabilidad celular.

15 En algunos casos, el daño celular durante la crioconservación usualmente ocurre como resultado de la formación de hielo intracelular dentro de la célula viva durante la etapa de congelación o durante la recristalización. El enfriamiento rápido conduce a menudo a la formación de más hielo intracelular dado que las moléculas de agua no migran totalmente fuera de la célula durante el corto periodo de tiempo asociado a las rápidas velocidades de enfriamiento. La formación de hielo intercelular puede surgir también durante la recristalización que ocurre durante los ciclos de calentamiento o deshielo. Si queda demasiado agua dentro de la célula viva, puede ocurrir daño debido a la formación inicial de cristales de hielo durante la rápida fase de enfriamiento y la subsecuente recristalización durante las fases de calentamiento y tal daño es usualmente letal.

20 Por otra parte, los perfiles de enfriamiento lento durante la crioconservación a menudo dan como resultado un incremento en los efectos del soluto cuando migra exceso de agua fuera de las células. El exceso de agua que migra de las células afecta adversamente a las células debido a un incremento del desequilibrio osmótico. De este modo, ocurre un daño celular como resultado de los desequilibrios osmóticos que pueden ser perjudiciales para la supervivencia celular y finalmente conduce al daño celular y viabilidad celular.

25 Del documento WO-A-01/95716 se conoce un método de congelación o enfriamiento a velocidad controlada de materiales biológicos, en tal método el material se sumerge en un depósito de fluido de enfriamiento, y el fluido de enfriamiento se hace circular pasando por el material a una velocidad y temperatura predeterminadas sustancialmente constantes para congelar el material.

30 Las técnicas actuales de crioconservación implican usar equipo de enfriamiento criogénico basado en la conductividad tal como estante frío o unidad congeladora del tipo liofilizador o equipo de enfriamiento criogénico basado en convección tal como congeladores de velocidad controlada y unidades de criocongelador. Tales equipos, sin embargo, son solo apropiados para capacidades de relativamente pequeño volumen solo y no son apropiados para la producción y conservación a escala comercial de materiales biológicos tales como líneas celulares terapéuticas. Por ejemplo, el mayor congelador de velocidad controlada comercialmente disponible para su uso con materiales biológicos contiene solo alrededor de 8000 más o menos viales empaquetados compactamente. Tales congeladores de velocidad controlada existentes también adolecen de no uniformidad en el enfriamiento de vial a vial debido, en parte, al flujo no uniforme de criógeno dentro de los congeladores y al requerimiento de empaquetamiento compacto dentro del congelador.

40 Muchos sistemas de congelación convencionales utilizan ventiladores internos para dispersar el criógeno alrededor de la unidad y suministrar la refrigeración a los viales vía convección. Tales sistemas de enfriamiento o congelación basados en convección no pueden conseguir uniformidad de temperatura ya que los viales están a menudo colocados a distancias variables del ventilador interno o empaquetados en la sombra de otros viales o bandejas. Los viales de material biológico expuestos a flujo turbulento de alta velocidad de criógeno se enfrían típicamente a una velocidad diferente y a menudo mucha más rápida que los viales situados más alejados del ventilador.

45 También existen congeladores de velocidad controlada del tipo de liofilizador que pueden manejar grandes volúmenes de viales pero típicamente se basan en conducción térmica entre estantes fríos en la unidad liofilizadora y los viales. Sin embargo, es imposible hacer que el fondo de los viales de vidrio tenga un área superficial conductora uniforme dado que la mayoría de los fondos de los viales de vidrio son cóncavos. Por lo tanto, las variaciones de temperatura durante el procedimiento de congelación de vial a vial son el mayor inconveniente para estos tipos de equipo. Además, la velocidad de enfriamiento puede ser penosamente lenta debido a la muy pequeña superficie conductora del vial que permanece en contacto con los estantes fríos.

50 Los intentos previos para mitigar la pérdida de actividad y viabilidad celular implicaba el uso de aditivos crioprotectores tales como DMSO y glicerol. El uso de tales crioprotectores durante el procedimiento de crioconservación ha demostrado una reducción de pérdidas de células atribuibles a los ciclos de congelación y subsecuente descongelación. Sin embargo, muchos crioprotectores tales como DMSO son tóxicos para las células

humanas y aparte de eso no son apropiados para su uso en terapias de células completas. Desventajosamente, los crioprotectores añaden también un grado de complejidad y coste asociado al procedimiento de producción y conservación celular. Además, los crioprotectores solos no han erradicado el problema de pérdida de actividad y viabilidad celular.

- 5 Lo que se necesita es un método y sistema para reducir o minimizar adicionalmente el daño celular que ocurre debido a la formación de hielo o a los efectos del soluto durante los procedimientos de criopreservación con o sin el uso de crioprotectores. Además, el sistema y método debe ser tanto eficiente como fácilmente escalable para manejar la producción y conservación a escala comercial de materiales biológicos y proporcionar enfriamiento rápido y uniforme de tal material biológico.

10 **Sumario de la invención**

La presente invención puede ser caracterizada como un sistema de congelación o enfriamiento criogénico para materiales biológicos que incluye una fuente de criógeno, un circuito de entrada acoplado a la fuente de criógeno y adaptada para proporcionar un flujo uniforme de gas frío criogénico a una cámara de enfriamiento, un circuito de salida y un sistema de control. La cámara de enfriamiento comprende una cámara de entrada, un colector de salida, y dos o más superficies porosas paralelas que definen un área de enfriamiento entre superficies paralelas adyacentes con una de las superficies porosas paralelas dispuesta adyacente a la cámara de entrada y en comunicación fluida con la cámara de entrada y otra de las superficies porosas paralelas dispuestas adyacentes al colector de salida, las superficies porosas paralelas y área de enfriamiento están adaptadas para retener una pluralidad de recipientes de materiales biológicos. El circuito de salida del sistema de enfriamiento o congelación está adaptado para retirar el gas criogénico del colector de salida de la cámara de enfriamiento mientras que el sistema de control está adaptado para ajustar los caudales de la fuente de criógeno en el circuito de entrada y cualquier gas criogénico en el circuito de salida para ajustar la temperatura del gas criogénico frío suministrado a la cámara de enfriamiento en respuesta a una deseada velocidad de enfriamiento de los materiales biológicos y temperaturas medidas dentro de la cámara de enfriamiento. De esta manera, se suministra un flujo laminar, unidireccional y uniforme de gas frío criogénico de temperatura ajustada al área de enfriamiento entre las superficies porosas paralelas y cada uno de la pluralidad de recipientes para enfriar uniformemente los materiales biológicos.

La presente invención se puede caracterizar como método de congelación o enfriamiento a velocidad controlada de materiales biológicos que comprende las etapas de: (i) colocar una pluralidad de recipientes de los materiales biológicos en un área de enfriamiento definida como el área entre superficies porosas paralelas dentro de una cámara de enfriamiento; (ii) mezclar un líquido criogénico con un gas más caliente para producir un gas criogénico frío a un perfil de temperatura seleccionado, correspondiendo el perfil de temperatura a la velocidad de enfriamiento de los materiales biológicos dentro de los recipientes; (iii) suministrar un flujo laminar unidireccional del gas frío criogénico de temperatura ajustada a través de una de las superficies porosas del área de enfriamiento entre las superficies porosas paralelas y cada uno de la pluralidad de recipientes para enfriar uniformemente los materiales biológicos; y (iv) rápidamente expulsar el gas de la cámara de enfriamiento vía otra superficie porosa paralela para evitar la recirculación del gas dentro del área de enfriamiento.

Breve descripción de los dibujos

El anterior y otros aspectos, características y ventajas de la presente invención serán más evidentes de la siguiente, más detallada de sus descripciones, presentada junto con los siguientes dibujos, en los que:

- 40 La Fig. 1 es una ilustración esquemática de una realización de una unidad congeladora criogénica de flujo uniforme adaptada para su uso con el presente sistema y método;

La Fig. 2 es una vista detallada de un corte de una porción de la unidad congeladora criogénica de flujo uniforme de la Fig. 1 que representa las características de flujo uniforme del gas criogénico próximo a los viales de materiales biológicos;

- 45 La Fig. 3 es un dibujo de una realización de una unidad congeladora criogénica de flujo uniforme de un solo lote que incorpora las características y ventajas del sistema y método presentemente descrito;

La Fig. 4 es una vista esquemática de una realización de una cámara de enfriamiento de flujo uniforme a escala comercial grande o multi-lote;

- 50 La Fig. 5 es una vista esquemática de otra realización de una unidad de enfriamiento de flujo uniforme de tipo continuo que incorpora las características y ventajas del sistema y método presentemente descrito;

Las Figs. 6 a 8 representan perfiles de temperatura seleccionados del gas criogénico y la correspondiente relación con las velocidades de enfriamiento de materiales biológicos observados durante los experimentos iniciales del presente sistema y métodos; y

- 55 La Fig. 9 representa un sistema de enfriamiento de flujo uniforme a escala comercial o multi-lotes con vistas más detalladas de los procedimientos y aspectos de la instrumentación de la entrada, salida y circuitos de recirculación

del gas.

Descripción detallada de la invención

5 La crioconservación de materiales biológicos típicamente implica el enfriamiento rápido de muestras biológicas de temperaturas de 40°C o más a temperaturas de -100°C o menos. Las temperaturas, velocidades de enfriamiento, y perfiles de enfriamiento especificadas expresadas como temperatura de los materiales en función del tiempo, dependen mucho de los materiales biológicos específicos a congelar. En la mayor parte de las crioconservaciones de materiales biológicos, el procedimiento de congelación debe controlar con precisión. La uniformidad en las temperaturas, velocidades de enfriamiento, y perfiles de enfriamiento de vial a vial y de lote a lote es de mucha importancia en un procedimiento de producción.

10 El método y sistema presentemente descrito representa una mejora de los actuales procedimientos de crioconservación para materiales biológicos. El sistema y método presentemente descrito proporciona la capacidad de enfriar rápidamente los materiales biológicos contenidos en viales u otros recipientes dentro de una unidad de enfriamiento principalmente vía enfriamiento convectivo forzado usando un flujo uniforme y laminar de criógeno en proximidad a cada uno de la pluralidad de viales dispuestos dentro de la unidad de enfriamiento. Además, el presente sistema y método es capaz de proporcionar el rápido enfriamiento de los materiales biológicos en un amplio intervalo de velocidades de enfriamiento y también mantener la temperatura de los materiales biológicos a cualquier temperatura prescrita cuando se especifique.

20 Más específicamente, el rápido enfriamiento de los materiales biológicos se consigue controlando con precisión y ajustando la temperatura del criógeno que se introduce en el sistema como función del tiempo. En un modo, las realizaciones descritas del sistema se adaptan para proporcionar un descenso rápido o por etapas de la temperatura 102 del criógeno (Véase la Fig. 6) para generar un grado más alto de sub-enfriamiento dentro de los materiales 100 de muestra, minimizando por ello los efectos exotérmicos de la transición de fase (por ejemplo, la transformación de agua a hielo) en los viales. En otro modo, las realizaciones descritas del presente sistema y método de enfriamiento criogénico o congelación a velocidad controlada están adaptada para proporcionar un descenso en rampa de la temperatura del gas frío criogénico de alrededor de -4,5°C por minuto 112 (véase la Fig. 7) y de alrededor de -5,0°C por minuto (Véase la Fig. 8) para proporcionar un rápido enfriamiento de los materiales biológicos de muestra 110, 120 minimizando cualquier variación de temperatura de vial a vial.

30 Las temperaturas del gas criogénico frío introducido en la cámara o unidad de enfriamiento se ajustan o controlan mezclando una fuente de nitrógeno líquido con una fuente de nitrógeno gaseoso más caliente justo antes de la introducción del gas criogénico frío en la unidad de enfriamiento. El flujo mixto a continuación se introduce y dispersa por toda la unidad de enfriamiento por medio de circuitos de entrada de criógeno apropiados, como se describe aquí. El nitrógeno gaseoso más caliente es preferentemente nitrógeno gaseoso a temperatura ambiente de una fuente de suministro o nitrógeno gaseoso que sale de la unidad de enfriamiento y se recicla al circuito de entrada de criógeno. El nitrógeno gaseoso más caliente mezclado con el nitrógeno frío líquido o gaseoso también actúa como gas móvil y preferentemente tiene un caudal volumétrico mucho mayor que el del nitrógeno líquido o frío. Por medio de la mezcla apropiada del nitrógeno gaseoso más caliente con el flujo de nitrógeno más frío, el presente sistema crea un flujo laminar y uniforme del criógeno por todo el área de enfriamiento a la que se dirige el gas criogénico frío. Reciclando el nitrógeno gaseoso que sale de la(s) unidad(es) de enfriamiento, el sistema y método presentemente descrito ofrece también una mayor eficiencia de utilización del criógeno (por ejemplo, nitrógeno) que los congeladores de velocidad controlada existentes.

40 Dado el flujo uniforme del gas criogénico frío por todas las muestras o viales del material biológico, se ha encontrado que el control preciso de la temperatura del gas criogénico frío y del gradiente de temperatura del criógeno tiene un correlación directa con las velocidades de enfriamiento observadas del material biológico dentro de la unidad de enfriamiento, para un material biológico dado. Por ejemplo, cuando la temperatura del gas criogénico frío proporcionado a la presente unidad de enfriamiento se varía según una rampa de alrededor de -4,5°C/min a alrededor de -5,0°C/min, se consigue una velocidad de enfriamiento media del material biológico de aproximadamente -2,5°C/min con mínimas variaciones de temperatura de vial a vial (Véase las Figs. 7 y 8).

50 Volviendo ahora a las Figs. 1 y 2, se representan vistas seleccionadas de una unidad de enfriamiento, denominada congelador 10 criogénico de flujo uniforme. Como se ve aquí, el congelador 10 criogénico de flujo uniforme incluye un circuito 12 de entrada de criógeno o conducción unida a una fuente de criógeno (no mostrada). El congelador 10 criogénico de flujo uniforme incluye adicionalmente una caja 14 de inyección de gas base, una placa 16 metálica porosa colocada o dispuesta en o cerca de la superficie 17 superior de la caja 14 de inyección de gas base, y una caja 18 de retirada de gas correspondiente colocada inmediatamente encima de la caja 14 de inyección de gas base y una placa 19 metálica porosa dispuesta allí. Alternativamente, se pueden usar varias disposiciones de varias membranas poliméricas soportadas apropiadas para soportar las temperaturas criogénicas u otras placas perforadas con agujeros perforados mecánicamente o químicamente grabados en lugar de las placas metálicas porosas.

55 La placa 16 metálica porosa asociada a la caja 14 de inyección de gas está adaptada para recibir y sostener una pluralidad de viales 20 que contienen materiales biológicos. También están dispuestos en o cerca de los viales 20 una pluralidad de sensores 25 para ser usados como entradas al controlador del sistema (no mostrado). El circuito o

conducción 12 de entrada de criógeno está unido adicionalmente a la caja 14 de inyección de gas que está adaptada para recibir el flujo de entrada de criógeno y distribuir uniformemente el criógeno por la placa 16 metálica porosa. El gas criogénico frío fluye de una manera uniforme dentro de una cámara 32 de entrada en la caja 14 de inyección de gas a través de la placa 16 metálica porosa inferior que sujeta los viales 20 en el espacio 30 de enfriamiento y a continuación a la caja 18 de retirada de gas que también incluye una placa 19 metálica porosa superior y un colector 34 de salida. Del colector 34 de salida, el nitrógeno gaseoso usado sale vía el circuito 28 o conducción de salida de gas.

Como se discutió anteriormente, el enfriamiento de los viales 20 se proporciona por la transferencia de calor entre los viales 20 y el gas 27 frío criogénico que fluye a través del área 30 de enfriamiento. El gas 27 frío criogénico se produce en el circuito 12 de entrada de criógeno mezclando nitrógeno líquido con nitrógeno gaseoso más caliente o nitrógeno gaseoso usado recirculado del circuito 28 de salida de gas con el apropiado aparato de mezcla o válvulas 36. Los viales 20 se enfrían generalmente a velocidad ligeramente menor que el gas frío criogénico. La diferencia de temperatura entre los viales 20 y el gas 27 frío criogénico es la fuerza conductora térmica para enfriar los viales 20. Por lo tanto, es posible congelar los viales 20 con cualquier perfil de temperatura controlando con precisión la temperatura del gas 27 frío criogénico con un perfil de temperatura en particular.

Preferentemente, la temperatura del gas frío criogénico, y más particularmente, el perfil de temperatura se controla activamente en respuesta a las temperaturas medias indicadas por los sensores 25 de temperatura o térmicos dispuestos en o cerca de los viales 20. En la presente realización, las temperaturas medias en una pluralidad de viales 20 se están usando como entradas para el control activo del sistema. Preferentemente, una metodología de control basada en cascada en la que las temperaturas del sistema que incluyen las temperaturas de los viales se monitorizan y controlan por un controlador del sistema primario, que transfiere señales de puntos determinados y otros comandos a un controlador esclavo responsable de la modulación de las temperaturas del gas frío criogénico en el circuito de entrada. Como se discute con más detalle a continuación, el perfil de temperatura del gas frío criogénico se crea por medio del control operativo de una válvula de mezcla que mezcla un volumen especificado de nitrógeno líquido frío con un volumen especificado de nitrógeno gaseoso más caliente. La mezcla es preferentemente una operación continua que cambia en función del tiempo para dar un gas frío criogénico que tiene una temperatura o perfil de temperatura prescrito (es decir, temperatura que cambia en función del tiempo). Resumiendo, el control de temperatura operativo del congelador criogénico de flujo uniforme se consigue controlando el perfil de temperatura del gas frío criogénico en los circuitos de entrada. Como se discutió anteriormente, se ha encontrado que el control preciso de las temperaturas y gradientes de temperatura del gas criogénico frío tiene una correlación directa con las velocidades de enfriamiento observadas del material biológico dado.

Cuando el gas frío criogénico entra en la caja 14 de inyección de gas inferior, el gas 27 frío criogénico se dispersa en una cámara 32 de entrada a través de una serie de conducciones o canales rociadores orientados hacia abajo dentro de la caja de inyección de gas (no mostrada). Esta dispersión en la cámara 32 de entrada promueve una distribución uniforme del gas 27 frío criogénico por toda la superficie de la placa 16 metálica porosa. La distribución orientada hacia abajo del gas 27 frío criogénico en la cámara 32 de entrada evita el impacto directo del gas 27 frío criogénico en la placa 16 metálica porosa, dando como resultado puntos fríos y enfriamiento no uniforme. La placa 16 metálica porosa en la caja 14 de inyección de gas fuerza el gas 27 frío criogénico para que se distribuya uniformemente por toda el área 30 de enfriamiento del congelador 10 criogénico de flujo uniforme, en la que se sitúan los viales u otros recipientes de material biológico. El nitrógeno usado se recoge en un colector 34 de salida dispuesto encima de la placa 19 porosa en la caja 18 de retirada de gas. Como se ilustra, el gas 27 frío criogénico frío tiene solo un corto camino para viajar desde la cámara 32 de entrada por la placa 16 porosa hacia arriba dentro del área 30 de enfriamiento, a través de la placa 19 porosa y dentro del colector 34 de salida. La dirección uniforme y la corta distancia del flujo de gas frío criogénico dan como resultado un alto nivel de uniformidad del enfriamiento de viales 20 dentro del congelador 10 criogénico. Los tamaños de poro de las placas 16, 19 metálicas son preferentemente del orden de alrededor de 2 a 50 micrómetros de diámetro, ya que los poros pequeños mejoran la dispersión y la uniformidad resultante en el enfriamiento. Enfriando o congelando el material biológico a la velocidad optimizada, se mejora el porcentaje de supervivencia de las células dando una potencia del fármaco potencialmente más alta.

En el punto de congelación de las disoluciones, el calor de cristalización evita que la tempera de disolución disminuya, y a veces la temperatura dentro del vial se puede elevar también. Usando uno o más sensores 25 de temperatura o térmicos sumergidos en o cerca de los viales de control seleccionados, la temperatura del gas frío criogénico se puede ajustar para minimizar la desviación de temperatura de la velocidad de enfriamiento optimizada, según se necesite. En otras palabras, el control del sistema se puede preprogramar o puede ser una operación basada en la retroalimentación en tiempo real.

Las disoluciones farmacéuticas, biofarmacéuticas o biológicas contenidas en viales o recipientes para crioconservación se beneficiarían del presente sistema y métodos. Tales materiales biológicos o biofarmacéuticos pueden incluir microorganismos, tejidos, órganos, células madre, células primarias, líneas celulares establecidas, pequeños organismos multicelulares, estructuras celulares complejas tales como embriones, o una disolución o mezcla que incluye: virus vivos o atenuados; ácidos nucleicos; anticuerpos monoclonales; anticuerpos policlonales; biomoléculas; análogos no péptidos; péptidos; proteínas, incluyendo proteínas modificadas y de fusión; ARN, ADN y

sus subclases; oligonucleótidos; partículas virales; y similares a tales materiales o sus componentes. Además, los recipientes usados para contener los materiales biológicos pueden incluir viales, cañas, bolsas plásticas, u otra forma de recipiente apropiado.

5 Las Figs. 3, 4 y 5 representan varias realizaciones del presente congelador a velocidad controlada o congelador criogénico que incorpora el concepto o enfoque del flujo uniforme. Más específicamente, la Fig. 3 es un dibujo de una única unidad 40 modular del congelador de velocidad controlada adaptada para contener uno de los congeladores criogénicos de flujo uniforme. La envoltura externa de la unidad 40 representada en la Fig. 3 es una envoltura sólida de acero inoxidable con una caja 44 de inyección de gas que tiene una conducción 42 de entrada, una cámara, y una placa 46 porosa así como una caja 48 de retirada de gas que tiene una placa porosa, un colector de salida, y un conducto de salida. La unidad representada está dimensionada para contener un solo congelador criogénico de flujo uniforme y laminar como se describe anteriormente con referencia a las Figs. 1 y 2.

10 La Fig. 4 representa una unidad 5 a escala comercial multi-lote que incluye una cámara 52 de enfriamiento que incluye una pluralidad de estantes o railes 54 adaptados para contener múltiples conjuntos de congeladores criogénicos de flujo uniforme. Tal unidad 50 a escala comercial multi-lote es preferentemente capaz de crioconservar 50.000 o más viales u otros de tales recipientes por operación de producción. Como se ve en la Fig. 4, el circuito 56 de entrada de criógeno y el circuito 58 de salida de gas usado se diseñan y dimensionan para circular suficiente criógeno a los múltiples congeladores 60 criogénicos individuales. El sistema 70 de control se usa para controlar operativamente el perfil de temperatura del gas criogénico frío proporcionado a cada estante 54, o a cada conjunto 60 de congeladores criogénicos dependiendo de las entradas de los sensores térmicos dispuestos dentro del sistema.

15 La Fig. 5 representa otra realización posible más a escala comercial del congelador o sistema 80 congelador a velocidad controlada que funciona de una manera continua o transportada. De nuevo, la unidad 80 y el circuito 90 de entrada de gas frío criogénico y el circuito 92 de salida de gas se diseñan y dimensionan para circular suficiente gas frío criogénico para los recipientes individualizados o conjunto de bandejas 88 dispuestas a lo largo de un transportador 86 dentro de la cámara 82 congeladora del tipo de túnel que tiene una entrada y medios 84 de salida. En esta operación continua, los perfiles de enfriamiento de diferentes recipientes, viales o bandejas podrían estar basado en el tiempo, como se describe anteriormente con respecto a los sistemas por lotes, o basados en el espacio (por ejemplo, localización espacial dentro de la cámara).

20 La capacidad para controlar con precisión la velocidad de enfriamiento de material biológico proporciona muchos beneficios. Por ejemplo, el material biológico congelado en una disolución acuosa puede experimentar varias tensiones durante la congelación y el subsecuente proceso de descongelación que pueden afectar a la función o actividad del material. La formación de hielo puede alterar físicamente el material o crear severos cambios en los enlaces interfaciales, fuerzas osmóticas, concentraciones de soluto, etc. experimentados por el material. El apropiado diseño del procedimiento de congelación puede mitigar tales tensiones y el presente sistema y método permite el control preciso del procedimiento de congelación para conseguir la uniformidad en el material congelado en todos los viales según el perfil de congelación diseñado.

25 Volviendo ahora a la Fig. 9, el sistema 210 congelador criogénico ilustrado incluye una cámara 220 de congelación adaptada para recibir un gas 260 frío criogénico de un circuito 262 de gas frío criogénico, una fuente de nitrógeno 230 líquido, un circuito 232 de suministro de líquido que incluye un separador 234 de fases, un suministro 240 de nitrógeno gaseoso, un circuito 242 de suministro de gas, un gas 250 criogénico recirculante y un circuito 252 de recirculación de gas. El sistema 210 congelador criogénico incluye adicionalmente un sistema 270 de control basado en un controlador lógico programable (PCL) que controla operativamente los circuitos de fluido en respuesta a las temperaturas y presiones medidas así como ciertos parámetros definidos por el usuario incluyendo los perfiles de enfriamiento deseados.

30 La cámara 220 de enfriamiento ilustrada tiene una pluralidad de estantes 222 de enfriamiento usados para enfriar un gran número de viales que contienen ingredientes farmacéuticos activos o moléculas biológicas activas. Un gas 260 frío criogénico se suministra a la cámara 220 de enfriamiento desde un mezclador 263 estático en línea que mezcla nitrógeno líquido de la fuente de nitrógeno 230 líquido vía el circuito 232 de suministro de líquido con una corriente de nitrógeno gaseoso medida precisamente del circuito 242 de suministro de gas y gas 250 criogénico recirculante del circuito 252 de recirculación de gas.

35 La temperatura del gas 260 frío criogénico se mide preferentemente con un sensor 264 de temperatura dispuesto aguas abajo del mezclador 263 estático en línea. Ajustando con precisión el flujo de nitrógeno del circuito 232 de suministro de líquido con nitrógeno gaseoso del circuito 242 de suministro de gas y del circuito 252 de recirculación de gas es posible cambiar rápidamente la temperatura del gas 260 frío criogénico que permite enfriar los viales en la cámara 220 de enfriamiento con un amplio intervalo de perfiles de enfriamiento para optimizar las condiciones de funcionamiento y maximizar la viabilidad celular, uniformidad de los fármacos, así como la potencia de los fármacos.

Una vez que se forma un gas 260 frío criogénico mezclando este nitrógeno gaseoso con nitrógeno líquido, se divide en múltiples niveles de estantes 222 de enfriamiento en una sola cámara 220 de enfriamiento. Para proporcionar la división exacta del gas 260 frío criogénico a los múltiples estantes 222 de enfriamiento, se usan una pluralidad de

5 orificios 265 de flujo crítico para dividir el gas 260 frío criogénico en múltiples corrientes de gas. En condiciones críticas de flujo de estrangulamiento, el flujo de gas frío criogénico a los estantes 22 de enfriamiento se mantiene independiente de la presión aguas abajo. Se usa un gran colector 266 de gas frío criogénico para eliminar o minimizar las diferencias de presión aguas arriba de los orificios 265 de flujo crítico mientras que la resistencia de flujo de gas aguas abajo no tiene impacto en el flujo de gas a través de los orificios 265 de flujo crítico. De esta manera, el flujo de gas frío criogénico a cada uno de los estantes 222 de enfriamiento en la cámara de enfriamiento 220 es casi idéntico.

10 El sistema 210 congelador criogénico es un sistema de enfriamiento de contacto directo con un gas 260 frío criogénico que fluye en la misma dirección con respecto a cada vial y preferentemente a lo largo del eje longitudinal de los viales, creando de este modo un perfil de enfriamiento uniforme extremo para todos los viales. Una membrana (Véase las Figs. 1 y 2) porosa metálica proporciona una resistencia uniforme a través de todas las superficies de enfriamiento, permitiendo de este modo que los viales individuales reciban idéntica o uniforme cantidad de refrigeración.

15 El suministro 240 de nitrógeno gaseoso se recibe preferentemente de un depósito de almacenamiento voluminoso y se dirige a través de un filtro 244 para retirar los materiales en partículas. El suministro 240 de nitrógeno gaseoso se disminuye a continuación hasta la presión deseada por medio de un regulador 245 de presión por descarga. Las presiones de las conducciones antes y después del regulador 245 de presión se monitorizan preferentemente usando uno o más indicadores 246 de presión.

20 Un controlador 247 de flujo másico que incluye un sensor 248 de flujo másico con válvula 249 de control electro neumático se usa preferentemente para controlar y mantener un caudal de nitrógeno gaseoso medido con precisión a través del circuito 242 de suministro de gas al mezclador 263 estático en línea. Una válvula 243 eléctrica de solenoide se incluye también en el circuito 242 de suministro de gas para proporcionar capacidad de apagado positiva cuando el sistema 210 congelador criogénico no está funcionando. Se pueden disponer alarmas en el sistema 270 de control para desactivar esta válvula 243 de solenoide si se requiere una parada de emergencia del sistema 210 congelador criogénico.

25 El sistema ilustrado representa una fuente de gas adicional, concretamente aire, para usar para hacer funcionar varias válvulas de control. El circuito 215 de suministro de aire ilustrado incluye un filtro 216 adaptado para retirar cualquier partícula de la conducción, un regulador 218 de presión que está adaptado para reducir la presión de aire hasta alrededor de 172,25 kPa para un funcionamiento seguro, y uno o más indicadores 219 de presión usados para monitorizar la presión el circuito 215 de suministro de aire.

30 El circuito 232 de suministro de nitrógeno líquido incluye una fuente de nitrógeno líquido 232, un separador 234 de fases, uno o más sensores 233 de temperatura y presión, un colector 235 de nitrógeno líquido, una o más válvulas 236 de escape/seguridad, un colador 237, y una válvula 238 de control de flujo criogénico principal. Todas las conducciones de nitrógeno líquido están preferentemente aisladas para minimizar cualquier cambio de fase del nitrógeno líquido a nitrógeno gaseoso y el flujo de dos fases resultante en cualquiera de las conducciones dentro del circuito 232 de suministro de nitrógeno.

35 El separador 234 de fases de nitrógeno líquido está diseñado para retirar cualquier nitrógeno gaseoso que se forme en el circuito 232 de suministro de nitrógeno líquido debido a fuga térmica o cambios en las presiones de la conducción. El separador 234 de fases ilustrado es un depósito cilíndrico de doble pared montado verticalmente. El recipiente del líquido interno tiene una presión de trabajo máxima permisible (MAWP) de 1.722,5 kPa, proporcionando el recipiente externo un aislamiento a vacío. La válvula 239 de venteo de la fase gaseosa controla operativamente el llenado del separador 234 de fases con nitrógeno líquido de la fuente de nitrógeno 230 líquido. A un nivel de líquido bajo, la válvula 239 de venteo de la fase gaseosa se abre para ventear 280 vapor a presión del separador 234 de fases, permitiendo que se transfiera nitrógeno líquido de la fuente de nitrógeno 230 líquido. Cuando el nivel de nitrógeno líquido se incrementa en el separador 234 de fases, la válvula 239 de venteo de fase gaseosa comienza a cerrarse y la velocidad de llenado disminuye hasta que la válvula 239 se cierra completamente y se detiene el llenado del separador 234 de fases con nitrógeno líquido.

40 El colador 237 está acoplado a una válvula 236A de escape de purga que se hace funcionar según se requiera para limpiar el colador 237 o purgar cualquier nitrógeno gaseoso vaporizado del circuito 232 de suministro de nitrógeno líquido. El colador 237 sirve también para filtrar cualquier partícula en el nitrógeno líquido para evitar un rendimiento adverso o daño a la válvula de control criogénico principal o válvulas de escape.

45 Una de las válvulas de seguridad ilustradas es una válvula 236B de solenoide eléctrica criogénica que proporciona el cierre positivo del suministro de nitrógeno líquido. Desactivando la válvula 236B eléctrica de solenoide se corta todo el flujo de nitrógeno líquido a través del circuito de suministro de nitrógeno líquido y hacia el mezclador 263 estático en línea. Esta válvula 236B eléctrica de solenoide está configurada de tal modo que al cortar la energía eléctrica inmediatamente detiene el flujo de nitrógeno líquido a través del circuito de suministro de nitrógeno líquido y ventea 280 cualquier nitrógeno líquido atrapado del circuito. Además, otros procedimientos de parada y procedimientos de parada de emergencia dentro del sistema de control 270 generan señales de mando a una o más válvulas 236 de seguridad. Por ejemplo, cuando el sistema 210 congelador criogénico ha detenido su funcionamiento al final del ciclo

ES 2 400 410 T3

de congelación o por otras razones que incluyen las condiciones de alarma preestablecidas. El sistema 270 de control detiene el flujo de nitrógeno líquido en el circuito 232 de suministro de nitrógeno líquido cerrando una o más de las válvulas 236 de seguridad.

5 La válvula 238 de control de flujo criogénico principal recibe señales del sistema 270 de control para controlar la cantidad de nitrógeno líquido suministrado al circuito 262 de gas frío criogénico en respuesta a las temperaturas y presiones medidas dentro del sistema 210 de congelación criogénica así como a ciertos parámetros definidos por el usuario incluyendo los perfiles de enfriamiento deseados.

10 El nitrógeno líquido del circuito 232 de suministro de nitrógeno líquido se dirige al mezclador 263 estático en línea. El nitrógeno líquido se evapora en forma de gas 260 frío criogénico mezclándose con el nitrógeno gaseoso que se dirige desde el circuito 242 de suministro de gas y el circuito 252 de recirculación de gas. El mezclador 263 estático en línea se usa para asegurar que no entra nada de nitrógeno líquido sin evaporar en la cámara 220 de enfriamiento. La temperatura en el circuito 262 de gas frío criogénico se monitoriza con un sensor 264 de temperatura dispuesto en o cerca de la salida del mezclador 263 estático en línea. El sistema 270 de control recibe esta temperatura medida y regula el caudal de nitrógeno líquido y los caudales de gas al mezclador 263 estático en línea en respuesta a ella basado en perfiles de temperatura programada y parámetros preestablecidos.

15 Aguas abajo del mezclador 263 estático en línea, el gas 260 frío criogénico se dirige a un gran colector 266 de gas frío criogénico y a continuación a múltiples estantes 222 de enfriamiento en la cámara 220 de enfriamiento vía una pluralidad de orificios 265 de flujo crítico. El gran colector 266 de gas frío criogénico se usa para asegurar que todos los puntos de distribución de gas realizan las mismas o similares presiones. El caudal de gas frío criogénico real suministrado a cada uno de los estantes 222 de la cámara 220 de enfriamiento está determinado por el tamaño del orificio 265 de flujo crítico asociado a cada estante 222 de enfriamiento.

20 Dentro de la cámara 220 de enfriamiento en cada nivel, hay una serie de conducciones de distribución de gas con boquillas dirigidas hacia abajo. El propósito de las conducciones de distribución de gas adicionales dentro de la cámara de enfriamiento es evitar o minimizar los gradientes de presión locales generados por la velocidad que pueden influir sobre la distribución de gas frío criogénico a través de cualquier gran membrana metálica porosa. Con los orificios 265 de flujo crítico y las redes de distribución de gas, se puede usar una gran cámara de enfriamiento que contiene miles de viales o envases con muy alto grado de uniformidad de enfriamiento.

25 Las superficies de enfriamiento dentro de los múltiples niveles de la cámara 220 de enfriamiento están hechas de membranas 227 metálicas porosas adaptadas para generar flujo de gas uniforme por la pluralidad de viales. Debido al pequeño tamaño de poro y alto flujo en las membranas 227 metálicas, se genera un flujo laminar que se eleva desde toda la superficie de enfriamiento. Aunque se prefiere un flujo laminar de la superficie de enfriamiento, es tolerable un flujo turbulento con tal de que el flujo permanezca paralelo a los viales y de que no ocurra macrocirculación del gas dentro de la cámara 220 de enfriamiento.

30 Encima de las membranas metálicas porosas en cada nivel en la cámara 220 de enfriamiento está un colector 225 de salida con una placa perforada dispuesta en una orientación paralela a las membranas 227 metálicas porosas para mantener el flujo uniforme del gas 260 frío criogénico durante el enfriamiento de los viales. El gas recibido en el colector 225 de salida se retira inmediatamente de la cámara 220 de enfriamiento para evitar o minimizar cualquier flujo que circule internamente del nitrógeno gaseoso usado. Es importante evitar la recirculación interna del nitrógeno gaseoso ya que tal gas recirculado está generalmente a una temperatura más caliente que gas 260 frío criogénico suministrado a la cámara 220 de enfriamiento. Tal flujo que circula internamente es la principal causa de la no uniformidad de la temperatura con efectos de borde en los dispositivos de enfriamiento laminar de la técnica anterior o convencionales.

35 El gas expulsado retirado de la cámara 220 de enfriamiento se desvía preferentemente a un circuito 252 de recirculación de gas. El circuito 252 de recirculación de gas ilustrado incluye un colector 253 de gas recirculante dispuesto entre los colectores 225 de expulsión en la cámara 220 de enfriamiento y un soplador 254 de recirculación que arranca automáticamente durante la última parte del ciclo de enfriamiento. El circuito 252 de recirculación de gas incluye también un medidor 255 de flujo másico acoplado al sistema 270 de control que mide el flujo a través del circuito 252 de recirculación de gas para ajustar el caudal de gas de formación del circuito 242 de suministro de gas para mantener un nivel deseado de flujo 260 de gas frío criogénico en el circuito 262 de gas frío criogénico. El regulador 256 de contrapresión mantiene la presión del soplador 254 de recirculación mientras que la válvula 258 de control evita que el nitrógeno gaseoso de formación del circuito 242 de suministro de gas entre en el circuito 252 de recirculación de gas cuando el soplador 254 de recirculación no está funcionando. La válvula 259 de escape de seguridad proporciona protección frente a la sobrepresión para la cámara 220 de enfriamiento en el caso de que haya bloqueos en el circuito 252 de recirculación de gas.

40 La presión y temperatura dentro de la cámara 220 de enfriamiento se monitorizan con el medidor 228 de presión y los sensores 229 de temperatura o termopares dispuestos dentro de la cámara 220 de enfriamiento próximos a algunos viales. Los medidores 228 de presión, sensores 229 de temperatura así como los termopares están acoplados y proporcionan entradas para el sistema 270 de control.

5 Los sistemas y métodos descritos son particularmente apropiados para operaciones de producción biológica a gran escala o de tipo comercial dado que el procedimiento se realiza usando el mismo equipo y parámetros del procedimiento que son fácilmente escalables o adaptables para fabricar una amplia variedad de productos biológicos. El procedimiento presentemente descrito proporciona la congelación a velocidad controlada de materiales biológicos usando un procedimiento que consigue un alto grado de uniformidad de enfriamiento o congelación del material biológico de muestra a muestra, vial a vial, recipiente a recipiente, y lote a lote.

10 Además, un examen más detenido de las Figs. 5-8 ilustra que el presente procedimiento de enfriamiento o congelación se puede usar como medio para iniciar y controlar la nucleación de la congelación en materiales biológicos. Como se ilustra en las Figs. 5 a 8, la nucleación de la congelación de los materiales biológicos en todos los viales monitorizados ocurrió aproximadamente al mismo tiempo y a la misma temperatura. La nucleación de la congelación se exhibe por un corto pico concurrente en la temperatura de la muestra (véase 100, 110, 120) como resultado del proceso exotérmico que ocurre durante el cambio de fase que ocurre en las muestras. De este modo, el control de la nucleación, es posible controlando precisamente el tiempo y magnitud del agudo o rápido descenso de temperatura usando los sistemas y métodos de congelación controlada anteriormente descritos. Cuando se
15 compara con el amplio espectro de tiempos y temperaturas en la nucleación de la congelación que es el resultado del uso los congeladores de velocidad controlada convencionales, el sistema y método presente proporciona un mayor grado de control que posiblemente influye en otros aspectos del rendimiento y características del material biológico conservado. Además, como el contemplado inicio y control de la nucleación depende de la temperatura, funciona igualmente bien en recipientes o viales abiertos o cerrados.

20 Preferentemente, las envolturas para las unidades en las Figs. 3, 4, 5 y 9 son envolturas clasificadas por la presión de modo que el presente método de congelación a velocidad controlada se puede combinar con o puede incorporar aspectos del sistema y procedimientos de nucleación controlada, como se describe generalmente en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 11/702.472.

25 De lo precedente, se debe apreciar que la presente invención de este modo proporciona un sistema y método de congelación a velocidad controlada de materiales biológicos.

REIVINDICACIONES

1. Un congelador o sistema de congelación criogénico para materiales biológicos que comprende:
una fuente de criógeno (230, 240);
5 un circuito de entrada (12; 262) acoplado a la fuente de criógeno y adaptado para proporcionar un flujo uniforme de un gas frío criogénico a una cámara de enfriamiento (52; 220);
la cámara (52; 220) de enfriamiento que comprende una cámara (32; 266) de entrada, un colector (34; 225) de salida, y dos o más superficies (16, 19) porosas paralelas que definen un área (30) de enfriamiento entre superficies paralelas adyacentes con una de las superficies porosas paralelas dispuesta adyacente a la cámara de entrada y en comunicación fluida con la cámara de entrada y otra de las superficies porosas paralelas dispuesta adyacente al
10 colector de salida, las superficies porosas paralelas y el área de enfriamiento adaptadas para retener una pluralidad de recipientes (20) de materiales biológicos;
un circuito (28) de salida adaptado para retirar el gas criogénico del colector (34) de salida de la cámara de enfriamiento; y
un sistema (70, 270) de control adaptado para ajustar los caudales de la fuente de criógeno en el circuito de entrada y de cualquier gas criogénico en el circuito de salida para ajustar la temperatura del gas criogénico frío suministrado a la cámara de enfriamiento en respuesta a una velocidad de enfriamiento deseada de los materiales biológicos y a las temperaturas medidas dentro de la cámara de enfriamiento;
15 en el que un flujo laminar, unidireccional y uniforme de gas frío criogénico a temperatura ajustada se suministra a un área de enfriamiento entre las superficies porosas paralelas y cada uno de la pluralidad de recipientes para enfriar uniformemente los materiales biológicos:
20
2. El sistema de la reivindicación 1, en el que la fuente de criógeno adicionalmente comprende un criógeno (230) líquido y un gas (240) más caliente.
3. El sistema de la reivindicación 2, en el que el circuito de entrada comprende adicionalmente un mezclador (263) en línea adaptado para mezclar el criógeno líquido y gas más caliente para producir el gas frío criogénico (260).
25
4. El sistema de la reivindicación 3, en el que el circuito de salida adicionalmente comprende un circuito (252) de recirculación que recircula gas del colector (225) de salida de nuevo al circuito (262) de entrada.
5. El sistema de la reivindicación 4, en el que el sistema (270) de control operativamente ajusta los caudales del criógeno líquido, el gas más caliente en el circuito (262) de entrada y circuito (252) de recirculación para ajustar la temperatura del gas criogénico frío suministrado a la cámara (220) de enfriamiento.
30
6. El sistema de la reivindicación 1, en el que el circuito (262) de entrada comprende adicionalmente uno o más orificios (265) de flujo crítico dispuestos aguas arriba de la cámara (226) de entrada para estrangular el flujo de gas frío criogénico a la cámara (220) de enfriamiento.
7. Un método de enfriamiento o congelación a velocidad controlada de materiales biológicos que comprende las etapas de:
35 colocar una pluralidad de recipientes (20) de los materiales biológicos en un área (30) de enfriamiento definida como el área entre superficies (16, 19) porosas paralelas dentro de una cámara de enfriamiento;
mezclar un criógeno (230) líquido con un gas (240) más caliente para producir un gas (260) criogénico frío a un perfil de temperatura seleccionado, correspondiendo el perfil de temperatura a una velocidad de enfriamiento deseada de los materiales biológicos dentro de los recipientes; y
40 suministrar un flujo laminar unidireccional del gas frío criogénico de temperatura ajustada a través de una de las superficies porosas al área de enfriamiento entre las superficies porosas paralelas y cada uno de la pluralidad de recipientes para enfriar uniformemente los materiales biológicos, y
expulsar con prontitud el gas de la cámara de enfriamiento vía otra superficie porosa paralela para evitar la recirculación del gas dentro del área de enfriamiento.
45
8. El método de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente la etapa de recircular el gas expulsado para mezclarlo con el gas más caliente.
9. El método de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente la etapa de regular la presión y el caudal del gas frío criogénico de temperatura ajustada previamente a suministrar el flujo laminar unidireccional a través de las superficies (16, 19) porosas al área (30) de enfriamiento.
50

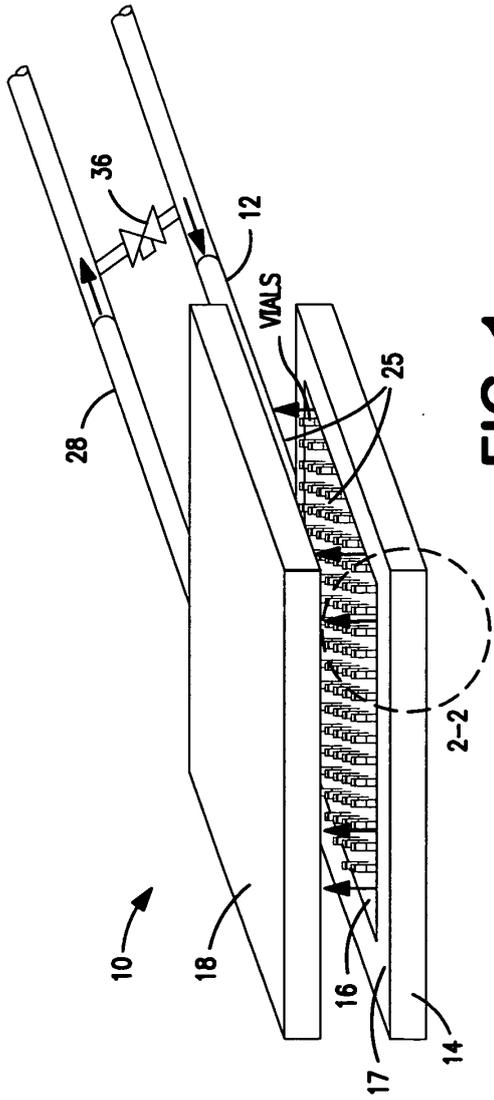


FIG. 1

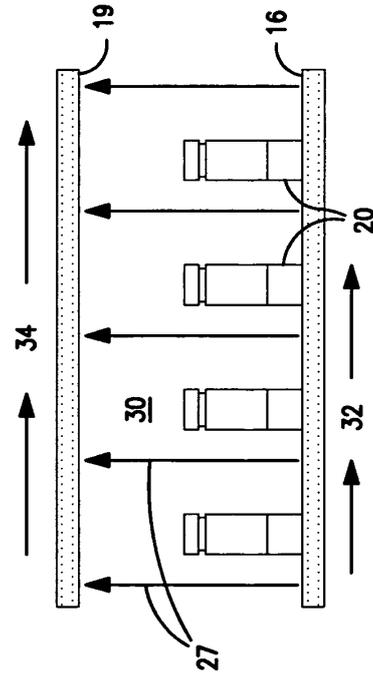


FIG. 2

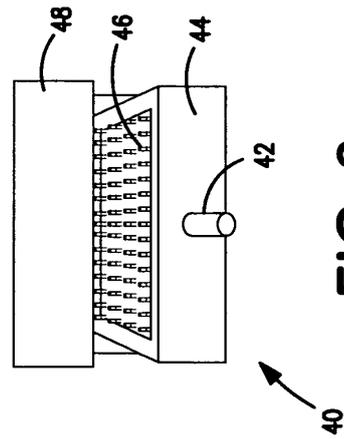


FIG. 3

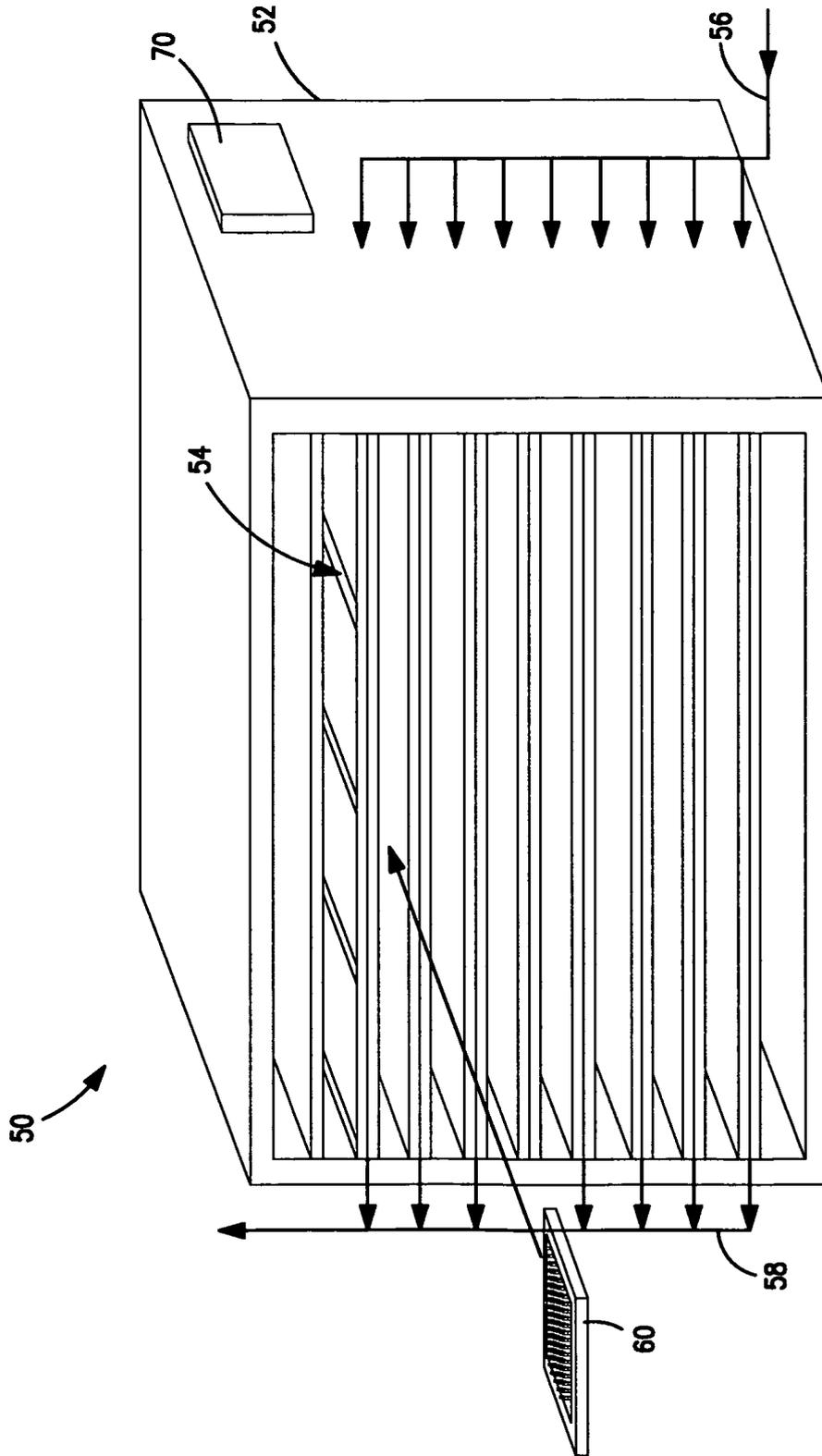


FIG. 4

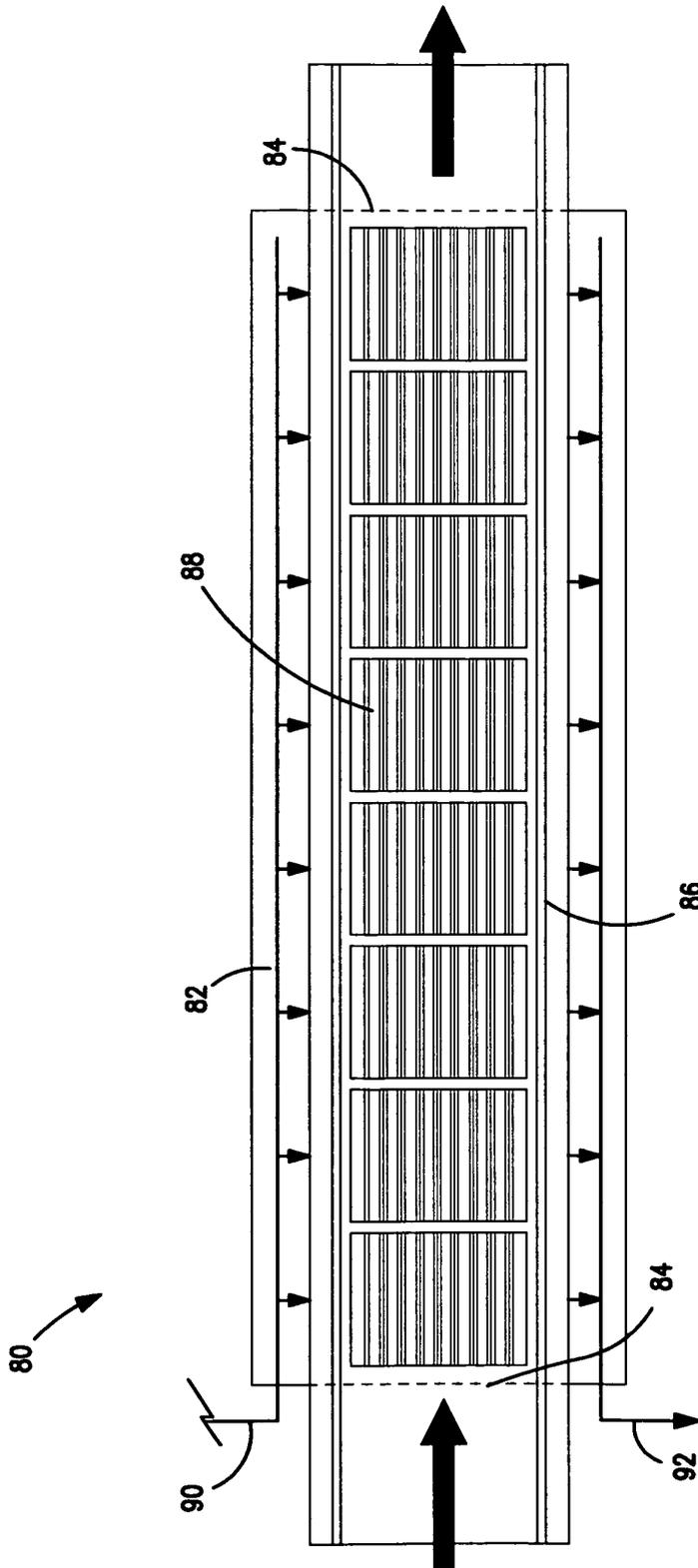


FIG. 5

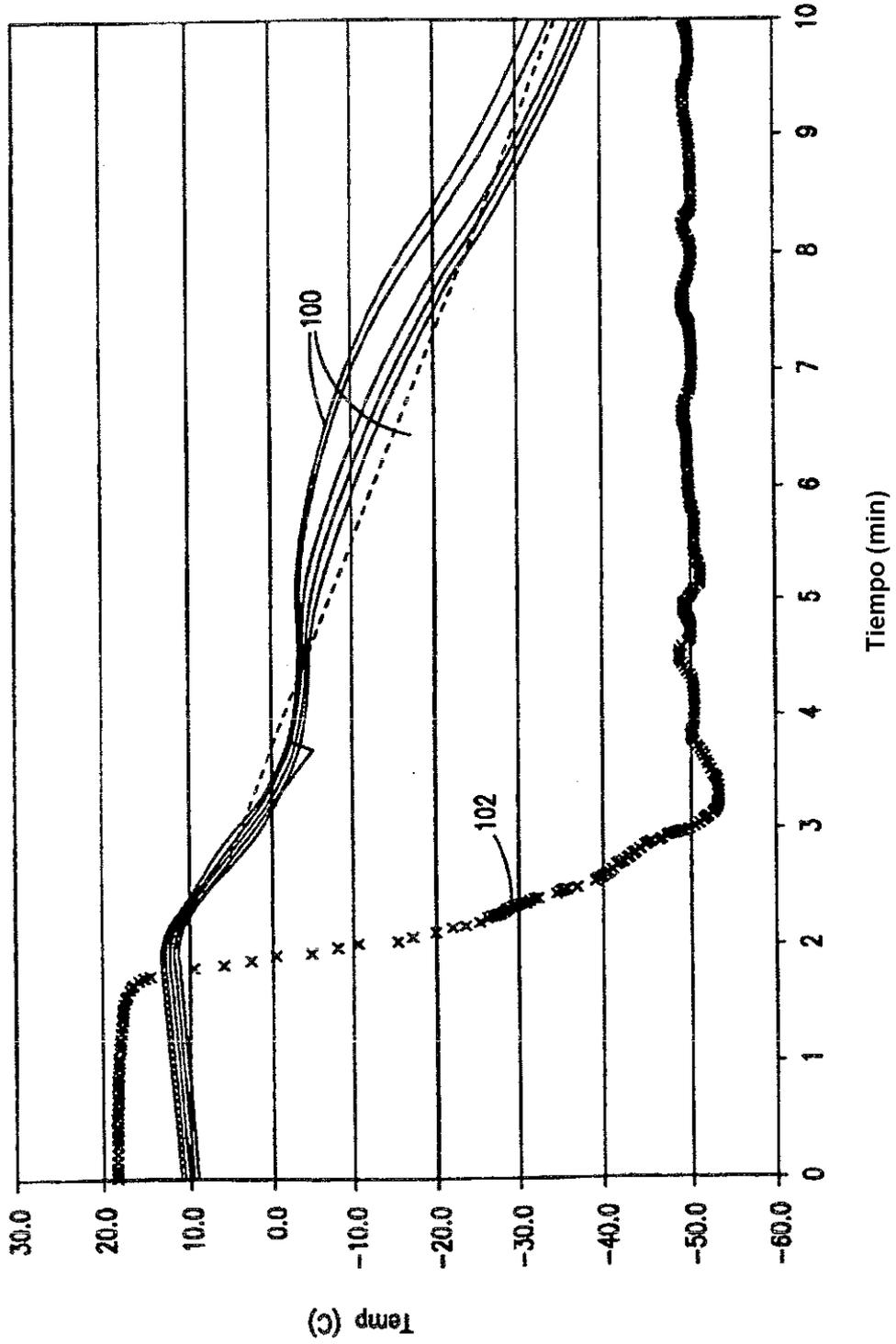


FIG. 6

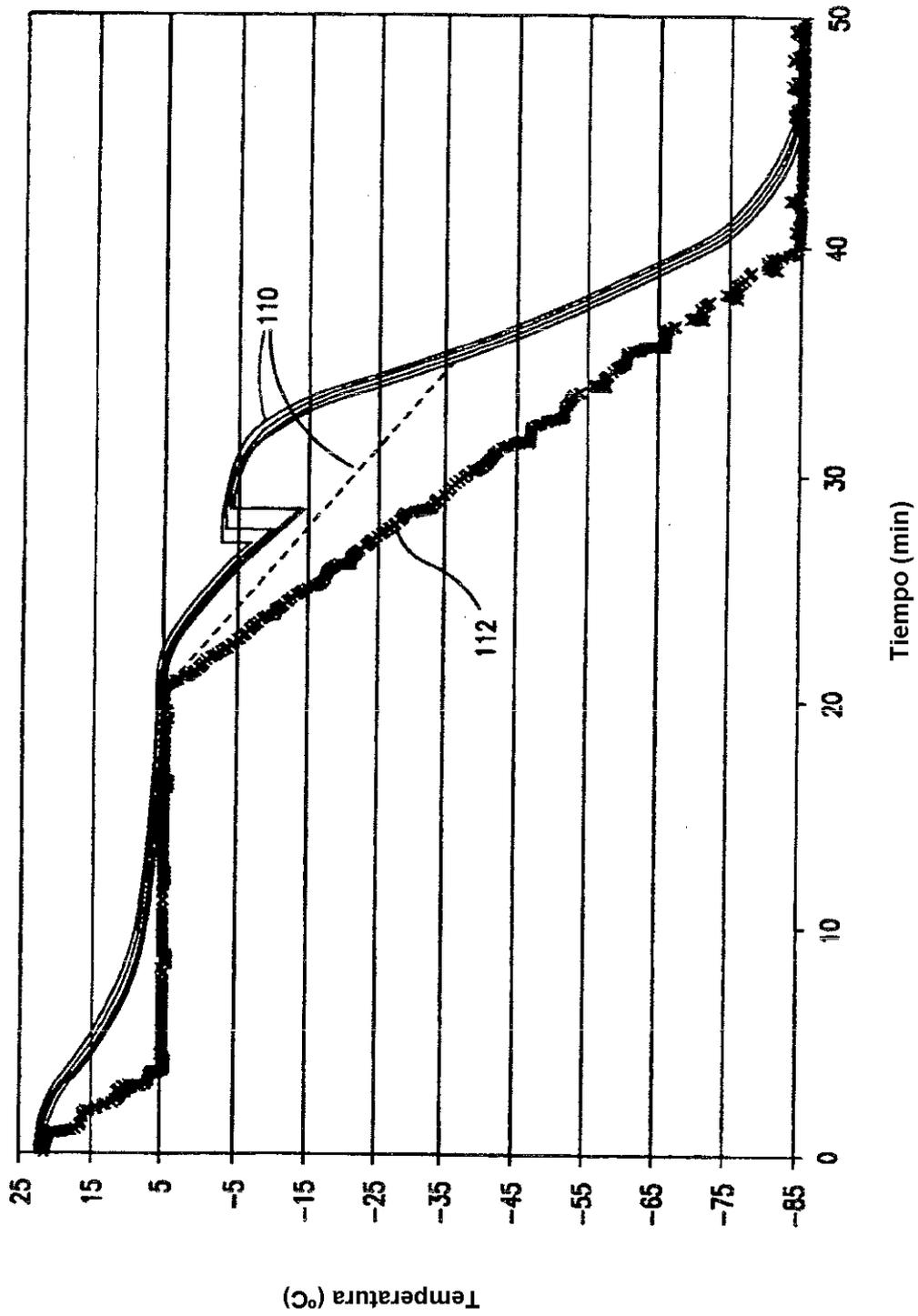


FIG. 7

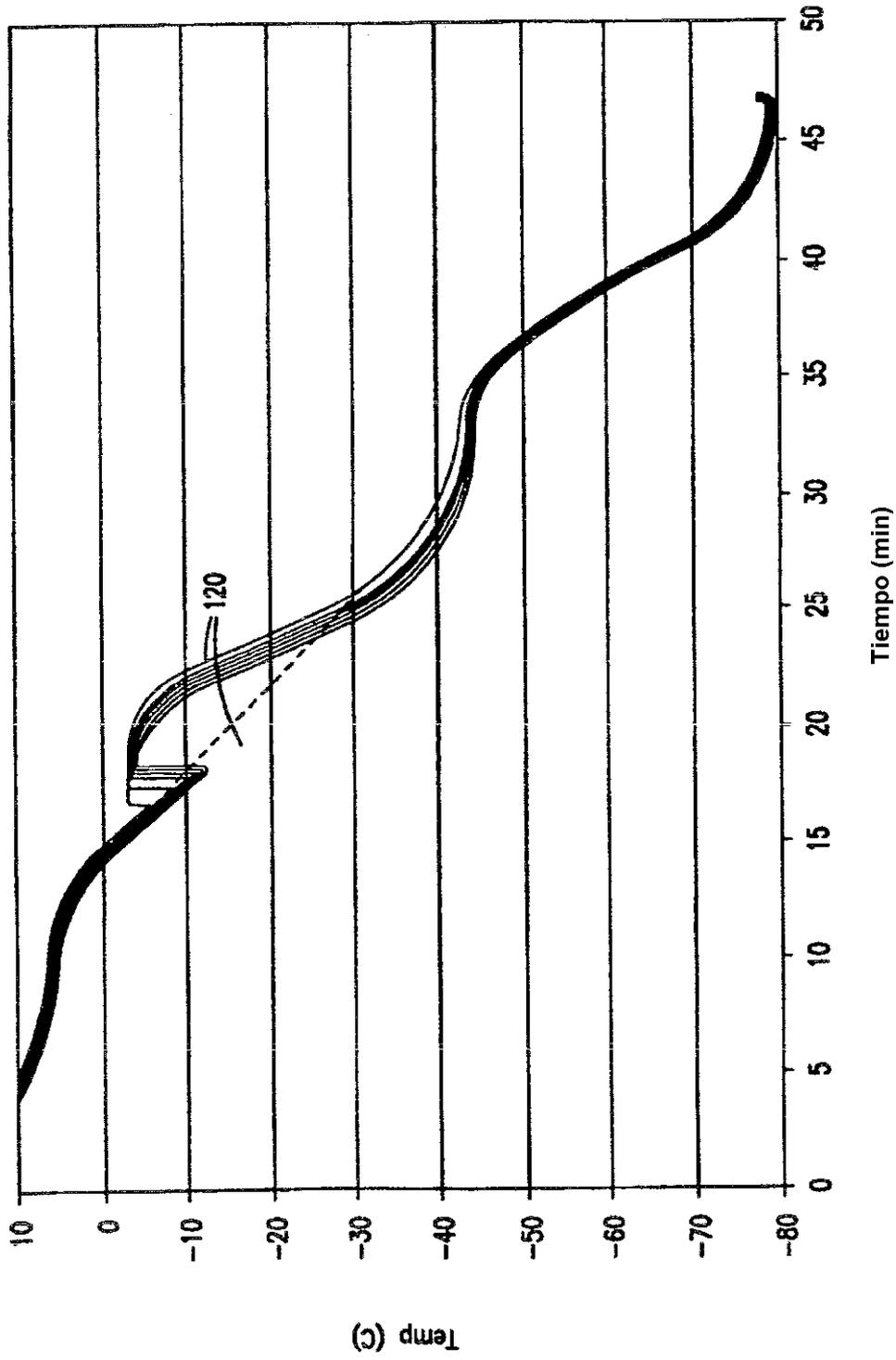


FIG. 8

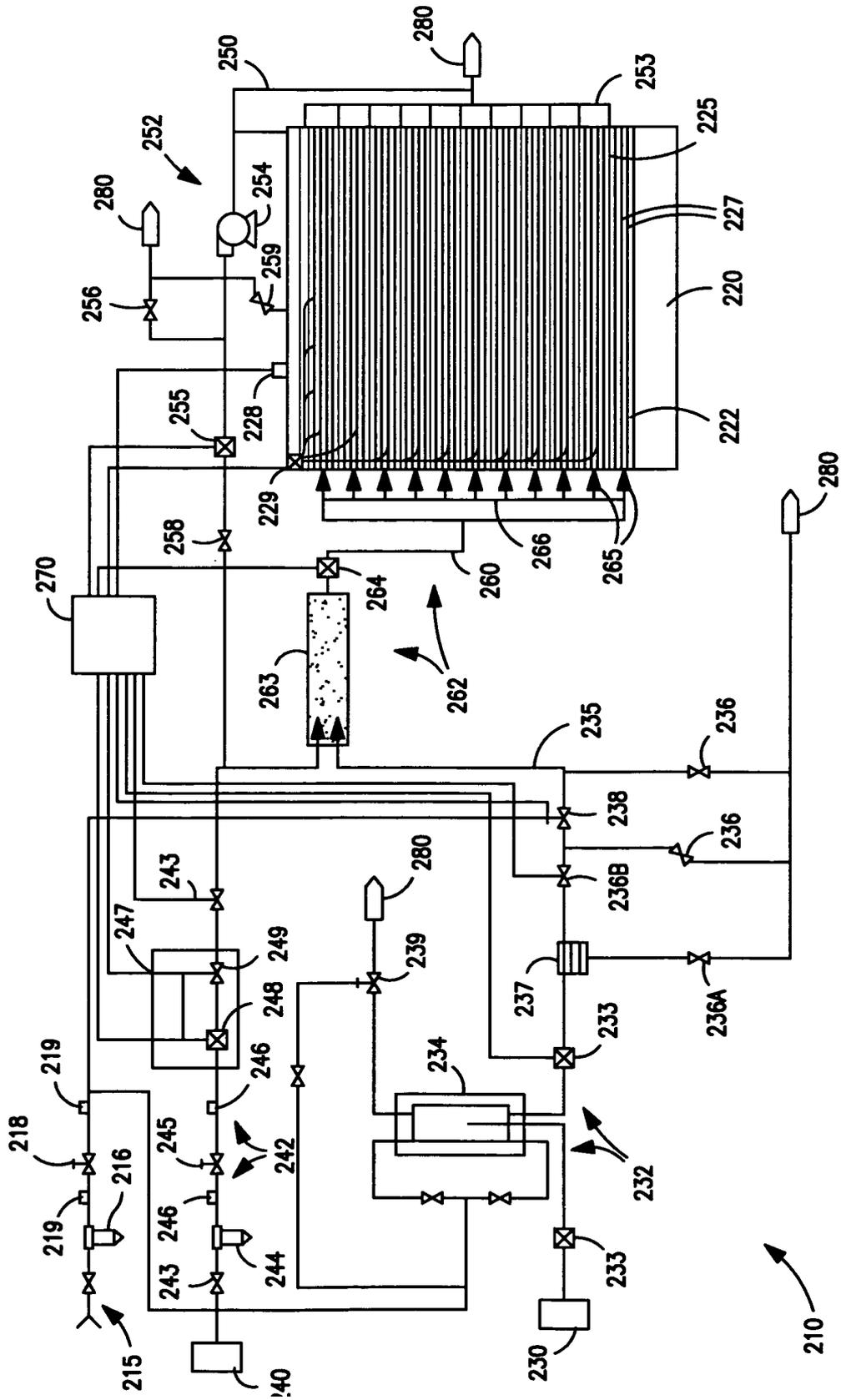


FIG. 9