

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 993**

51 Int. Cl.:

F26B 5/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2007 E 07750150 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1982133**

54 Título: **Método de inducción de nucleación de un material**

30 Prioridad:

10.02.2006 US 771868 P
05.02.2007 US 702472

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.08.2015

73 Titular/es:

PRAXAIR TECHNOLOGY, INC. (100.0%)
39 OLD RIDGEBURY ROAD
DANBURY, CT 06810-5113, US

72 Inventor/es:

GASTEYER, THEODORE HALL, III;
SEVER, ROBERT REX;
HUNEK, BALAZS;
GRINTER, NIGEL y
VERDONE, MELINDA LEE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 542 993 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 de inducción de nucleación de un material

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos número de serie 60/771.868, presentada el 10 de febrero, 2006.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un procedimiento de nucleación, y más en particular, a un método de inducción de la nucleación de una transición de fase en un material, en donde el material se lleva inicialmente a una temperatura cerca o por debajo de una temperatura de transición de fase y posteriormente se despresuriza de modo que se induzca la nucleación del material.

Antecedentes de la invención

15 El control del procedimiento en general aleatorio de nucleación en la etapa de congelación de un procedimiento de liofilización o secado por congelación, tanto para disminuir el tiempo de procesamiento necesario para completar la liofilización o secado por congelación como para aumentar la uniformidad del producto de un vial a otro en el producto acabado, sería muy deseable en la técnica. En un procedimiento de liofilización farmacéutico típico, se ponen múltiples viales que contienen una solución acuosa común en estantes que se enfrían, en general a una velocidad controlada, a bajas temperaturas. La solución acuosa en cada vial se enfría por debajo de la temperatura de congelación termodinámica de la solución y permanece en un estado líquido metaestable subenfriada hasta que se produce la nucleación.

20 El intervalo de temperaturas de nucleación a lo largo de los viales está distribuido aleatoriamente entre una temperatura cerca a la temperatura de congelación termodinámica y algún valor significativamente inferior (p. ej., hasta aproximadamente 30°C) que la temperatura de congelación termodinámica. Esta distribución de temperaturas de nucleación produce variaciones de un vial a otro en la estructura cristalina del hielo y finalmente en las propiedades físicas del producto liofilizado. Además, la etapa de secado del procedimiento de liofilización debe ser excesivamente larga para acomodar el intervalo de tamaños de los cristales de hielo y las estructuras producidas por el fenómeno de nucleación estocástica natural.

25 Se han usado aditivos para aumentar la temperatura de nucleación de las soluciones subenfriadas. Estos aditivos pueden tener muchas formas. Es bien conocido que determinadas bacterias (p. ej., *Pseudomonas syringae*) sintetizan proteínas que ayudan a la formación del hielo nucleado en las soluciones acuosas subenfriadas. Se pueden añadir las bacterias o sus proteínas aisladas a las soluciones para aumentar la temperatura de nucleación. Varios aditivos inorgánicos también demuestran un efecto de nucleación; el más común de dichos aditivos es el yoduro de plata, AgI. En general, cualquier aditivo o contaminante tiene el potencial de servir como un agente de nucleación. En los viales de liofilización preparados en entornos que contienen niveles altos de partículas, en general se produce nucleación y congelación a un grado menor de subenfriamiento que en los viales preparados en entornos con niveles bajos de partículas.

30 Todos los agentes de nucleación descritos antes son etiquetados como "aditivos", porque cambian la composición del medio en el que producen la nucleación de una transición de fase. Estos aditivos típicamente no son aceptables para los productos farmacéuticos liofilizados regulados y aprobados por la FDA. Estos aditivos tampoco proporcionan control sobre el tiempo ni la temperatura cuando se produce la nucleación y congelación en los viales. Más bien, los aditivos solo funcionan para aumentar la temperatura de nucleación media de los viales.

Los propios cristales de hielo pueden actuar ellos mismos como agentes de nucleación para la formación de hielo en soluciones acuosas subenfriadas. En el método de la "niebla helada", un liofilizador húmedo se llena con un gas frío para producir una suspensión en vapor de pequeñas partículas de hielo. Las partículas de hielo son transportadas a los viales e inician la nucleación cuando se ponen en contacto con la interfase de fluido.

45 El método de la "niebla helada" no controla la nucleación de múltiples viales simultáneamente en un tiempo y temperatura controlados. En otras palabras, el suceso de nucleación no se produce de forma simultánea o instantánea en todos los viales tras la introducción del vapor frío en el liofilizador. Los cristales de hielo tardarán algún tiempo en tener su efecto en cada uno de los viales para iniciar la nucleación, y es probable que los tiempos de transporte sean diferentes para los viales en diferentes posiciones dentro del liofilizador. Para los liofilizadores industriales a gran escala, la implementación del método de "niebla helada" requeriría cambios de diseño del sistema, ya que pueden ser necesarios dispositivos de convección internos para ayudar a una distribución más uniforme de la "niebla helada" por todo el liofilizador. Cuando los estantes del liofilizador se enfrían continuamente, la diferencia de tiempo entre cuando congela el primer vial y congela el último vial creará una diferencia de temperatura entre los viales, que aumentará la no uniformidad de un vial a otro en los productos liofilizados.

55 También se ha usado el pretratamiento de viales mediante marcado, rascado o rugosidad para disminuir el grado de

subenfriamiento necesario para la nucleación. Como con los otros métodos de la técnica anterior, el pretratamiento de los viales tampoco imparte ningún grado de control sobre el tiempo y la temperatura cuando se produce la nucleación y congelación de los viales individuales, si no que en su lugar solo aumenta la temperatura media de nucleación de todos los viales.

5 También se ha usado la vibración para la nucleación de una transición de fase en un material metaestable. La vibración suficiente para inducir nucleación ocurre a frecuencias superiores a 10 kHz y se puede producir usando una variedad de equipamiento. A menudo las vibraciones en este intervalo de frecuencias se denominan "ultrasónicas", aunque las frecuencias en el intervalo de 10 kHz a 20 kHz típicamente están dentro del intervalo audible de seres humanos. La vibración ultrasónica a menudo produce cavitación, o la formación de pequeñas burbujas de gas, en una solución subenfriada. En el régimen de cavitación transitoria o inercial, las burbujas de gas cercen rápidamente y colapsan, produciendo presión localizada muy alta y fluctuaciones de temperatura. La capacidad de que la vibración ultrasónica induzca nucleación en un material metaestable a menudo se atribuye a perturbaciones producidas por la cavitación transitoria. El otro régimen de cavitación, denominado estable o no inercial, se caracteriza por burbujas que presentan volumen estable u oscilaciones de forma sin colapso. La solicitud de patente de EE.UU. 20020031577 A1 describe que la vibración ultrasónica puede inducir nucleación incluso en el régimen de cavitación estable, pero no se ofrece una explicación del fenómeno. La solicitud de patente de GB 2400901A también describe que la probabilidad de producir cavitación, y por lo tanto nucleación, en una solución usando vibraciones con frecuencias superiores a 10 kHz se puede aumentar reduciendo la presión ambiente alrededor de la solución o disolviendo un fluido volátil en la solución.

20 También se ha usado un método de electrocongelación en el pasado para inducir la nucleación en líquidos subenfriados. La electrocongelación en general se lleva a cabo suministrando campos eléctricos relativamente altos (~1 V/nm) de una forma continua o pulsada entre electrodos estrechamente espaciados sumergidos en un líquido o solución subenfriada. Los inconvenientes asociados con un procedimiento de electrocongelación en aplicaciones de liofilización típicas incluyen la complejidad relativa y el coste para implementación y mantenimiento, en particular para aplicaciones de liofilización, usando múltiples viales o envases. Además, la electrocongelación no se puede aplicar directamente a soluciones que contienen especies iónicas (p. ej., NaCl).

30 Hay estudios recientes que examinan el concepto de "congelación de la superficie inducida por vacío" (véase, p. ej., la patente de EE.UU. nº 6.684.524). En dicha "congelación de la superficie inducida por vacío", los viales que contienen una solución acuosa se cargan en un estante de temperatura controlada en un liofilizador y se mantienen inicialmente a aproximadamente 10°C. Después se extrae el aire de la cámara del liofilizador hasta casi presión de vacío (p. ej., 1 mbar) lo que produce la congelación de la superficie de las soluciones acuosas hasta profundidades de algunos milímetros. La posterior liberación del vacío y disminución de la temperatura del estante por debajo del punto de congelación de la solución permite el crecimiento de cristales de hielo desde la capa de la superficie precongelada por el resto de la solución. Un inconveniente importante para implementar este procedimiento de "congelación de la superficie inducida por vacío" en una aplicación de liofilización típica es el riesgo alto de que la solución hierva violentamente o se desgasifique en las condiciones expuestas.

El documento DE19936281 A1 describe un método de inducción de la nucleación de una transición de fase de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1.

40 El control mejorado del procedimiento de nucleación puede permitir que la congelación de todos los viales de soluciones farmacéuticas no congeladas en un liofilizador, se produzca en un intervalo más estrecho de temperatura y tiempo, dando así un producto liofilizado con mayor uniformidad de un vial a otro. El control de la temperatura de nucleación mínima puede afectar a la estructura de los cristales de hielo formados dentro del vial y permite un procedimiento de liofilización muy acelerado.

45 Por lo tanto, existe la necesidad de controlar el procedimiento aleatorio de nucleación en diferentes procedimientos de congelación incluyendo la etapa de congelación de un procedimiento de liofilización o secado por congelación, tanto para disminuir el tiempo de procesamiento necesario para completar la liofilización como para mejorar la uniformidad del producto de un vial a otro en el producto acabado. Por lo tanto, sería deseable proporcionar un procedimiento que tuviera algunas, o preferiblemente todas las características anteriores.

Compendio de la invención

50 La presente invención es un método para inducir nucleación de una transición de fase en un material, como se define en la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

Los aspectos, características y ventajas anteriores y otros de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de los mismos, presentada junto con los siguientes dibujos en los que:

55 La figura 1 es una gráfica que representa la temperatura frente al tiempo de una solución que experimenta un procedimiento de nucleación estocástico y que muestra además el intervalo de temperaturas de nucleación de la solución;

La figura 2 es una gráfica que representa la temperatura frente al tiempo de una solución que experimenta un procedimiento de enfriamiento equilibrado con nucleación despresurizada de acuerdo con los presentes métodos; y

La figura 3 es una gráfica que representa la temperatura frente al tiempo de una solución que experimenta un procedimiento de enfriamiento dinámico con nucleación despresurizada de acuerdo con los presentes métodos.

5 Descripción detallada de la invención

La nucleación es el inicio de una transición de fase en una pequeña región de un material. Por ejemplo, la transición de fase puede ser la formación de un cristal a partir de un líquido. El proceso de cristalización (es decir, la formación de cristales sólidos a partir de una solución) asociado a menudo con la congelación de una solución, empieza con un suceso de nucleación seguido de crecimiento de cristales.

10 En el proceso de cristalización, la nucleación es la etapa donde moléculas seleccionadas dispersas en la solución u otro material empiezan a juntarse para crear conglomerados a escala nanométrica para volverse estables en las condiciones de trabajo actuales. Estos conglomerados estables constituyen los núcleos. Los conglomerados deben alcanzar un tamaño crítico con el fin de convertirse en núcleos estables. Dicho tamaño crítico normalmente viene dado por las condiciones de trabajo tales como la temperatura, contaminantes, grado de supersaturación, etc. y
15 pueden variar de una muestra de solución a otra. Es durante el suceso de nucleación que los átomos en la solución se disponen de una forma definida y periódica que define la estructura cristalina.

El crecimiento del cristal es el crecimiento posterior de los núcleos que consiguen el tamaño de conglomerados críticos. Dependiendo de las condiciones pueden predominar la nucleación o el crecimiento del cristal frente al otro, y como resultado, se obtienen cristales con diferentes tamaños y formas. El control del tamaño y forma de los
20 cristales constituye uno de los principales retos en la fabricación industrial, tal como para productos farmacéuticos.

El presente método se refiere a un procedimiento para controlar el tiempo y/o temperatura en el que se produce la transición de fase nucleada en un material. En aplicaciones de congelación, la probabilidad de que se produzca nucleación de un material espontáneamente y empiece a cambiar de fase, está relacionada con el subenfriamiento del material y la ausencia o presencia de contaminantes, aditivos, estructuras o perturbaciones que proporcionan un
25 sitio o superficie de nucleación.

La etapa de congelación o solidificación es particularmente importante en el procedimiento de liofilización donde las técnicas existentes dan como resultado diferencias de temperatura de nucleación a lo largo de una multitud de viales o envases. Las diferencias de temperatura de nucleación tienden a producir un producto no uniforme y un tiempo de secado excesivamente largo. Por otra parte, los presentes métodos proporcionan un grado superior de control del
30 procedimiento en procedimientos de solidificación en lotes (p. ej., liofilización) y producen un producto con estructura y propiedades más uniformes. A diferencia de algunas de las técnicas anteriores para inducir la nucleación, los métodos presentes requieren equipamiento y cambios operacionales mínimos para la implementación.

En principio, los métodos presentes se pueden aplicar a cualquier etapa de procesamiento de material que implique una transición de fase nucleada. Los ejemplos de dichos procedimientos incluyen la congelación de un líquido, cristalización de hielo a partir de una solución acuosa, cristalización de polímeros y metales a partir de fundidos, cristalización de materiales inorgánicos a partir de soluciones supersaturadas, cristalización de proteínas, producción de nieve artificial, deposición de hielo a partir de vapor, congelación de alimentos, concentración por congelación, cristalización fraccionada, crioconservación, o condensación de vapores en líquidos. Desde un punto de vista conceptual, los métodos presentes también se pueden aplicar a transiciones de fase tales como fusión y ebullición.
35

Los métodos presentes descritos representan una mejora de los procedimientos de liofilización farmacéuticos actuales. Por ejemplo, en un liofilizador industrial grande puede haber aproximadamente 100.000 viales que contienen un producto farmacéutico que hay que congelar y secar. La práctica actual en la industria es enfriar la solución en un grado muy alto de modo que se garantice que se congela la solución en todos los viales o envases en el liofilizador. Sin embargo, el contenido de cada vial o envase congela aleatoriamente a lo largo de un intervalo de temperaturas por debajo del punto de congelación, porque el proceso de nucleación no está controlado.
40 45

Volviendo ahora a las figuras, y en particular a la figura 1, se representa una gráfica de temperatura frente a tiempo de 6 viales de una solución acuosa que se somete a un procedimiento de nucleación estocástica convencional que muestra el intervalo típico de temperaturas de nucleación de la solución en los viales (11, 12, 13, 14, 15 y 16). Como se ve en la misma, el contenido de los viales tiene una temperatura de congelación termodinámica de aproximadamente 0°C aunque la nucleación natural de la solución en cada uno de los viales se produce en un intervalo amplio de temperaturas de aproximadamente -7°C a -20°C o más, como se destaca en la zona 18. La gráfica 19 representa la temperatura del estante dentro de la cámara de liofilización.
50

A la inversa, la figura 2 y figura 3 representan gráficas de temperatura frente a tiempo de una solución que se somete a un procedimiento de congelación con nucleación despresurizada de acuerdo con los métodos presentes. En particular, la figura 2 muestra la gráfica de la temperatura frente al tiempo de 6 viales de una solución acuosa que se somete a un procedimiento de enfriamiento equilibrado (véase el ejemplo 2) con la nucleación inducida por despresurización de la cámara (21, 22, 23, 24, 25 y 26). El contenido del vial tiene una temperatura de congelación
55

5 termodinámica de aproximadamente 0°C aunque la nucleación de la solución en cada vial se produce al mismo tiempo tras la despresurización y en un intervalo de temperaturas muy estrecho (es decir, de -4°C a -5°C) como puede verse en la zona 28. La gráfica 29 representa la temperatura del estante dentro de la cámara de liofilización y representa un procedimiento de congelación equilibrado, uno donde la temperatura de los estantes se mantiene más o menos estable antes de la despresurización.

10 De forma similar, la figura 3 muestra la gráfica de la temperatura frente al tiempo de 3 viales de una solución acuosa que se somete a un procedimiento de enfriamiento dinámico (véase el ejemplo 7) con nucleación inducida por despresurización de la cámara (31, 32 y 33). Otra vez, el contenido de los viales tiene una temperatura de congelación termodinámica de aproximadamente 0°C, aunque la nucleación de la solución en cada vial se produce al mismo tiempo tras la despresurización en un intervalo de temperaturas de aproximadamente -7°C a -10°C como se ve en la zona 38. La gráfica 39 representa la temperatura del estante dentro de la cámara de liofilización y en general representa un procedimiento de enfriamiento dinámico, uno donde la temperatura del estante se reduce activamente durante o antes de la despresurización.

15 Como se ilustra en las figuras, los métodos presentes proporcionan control mejorado del proceso de nucleación permitiendo que la congelación de soluciones farmacéuticas en un liofilizador se produzca dentro de un intervalo de temperaturas más estrecho (p. ej., de aproximadamente 0°C a -10°C) y/o simultáneamente, dando así un producto liofilizado con mayor uniformidad de un vial a otro. Aunque no se ha demostrado, es previsible que el intervalo de temperaturas de nucleación inducido pueda extenderse ligeramente por encima de la temperatura de transición de fase y pueda extenderse también a aproximadamente 40°C de subenfriamiento.

20 Otro beneficio asociado con los métodos presentes es que controlando la temperatura de nucleación más baja y/o el tiempo preciso de nucleación, se puede afectar a la estructura cristalina del hielo formado dentro de los viales o envases congelados. La estructura cristalina del hielo es una variable que afecta al tiempo que tarda el hielo en sublimar. Por lo tanto, controlando la estructura cristalina del hielo se puede acelerar mucho el procedimiento de liofilización total.

25 En un sentido amplio, los métodos presentes descritos para inducir la nucleación de una transición de fase en un material comprende las etapas de: (i) enfriar el material a una temperatura cercana o por debajo de una temperatura de transición de fase del material; y (ii) disminuir rápidamente la presión para inducir la nucleación del material. Cada una de estas importantes etapas se discutirán a continuación con más detalle.

Etapa 1 - Enfriamiento del material

30 Los materiales ilustrativos útiles en el método presente incluyen sustancias puras, gases, suspensiones, geles, líquidos, soluciones, mezclas o componentes dentro de una solución o mezcla. Los materiales adecuados para usar en el método presente pueden incluir, por ejemplo, materiales farmacéuticos, materiales biofarmacéuticos, alimentos, materiales químicos, y pueden incluir productos tales como productos para el cuidado de heridas, cosméticos, productos veterinarios y productos relacionados con el diagnóstico in vivo/in vitro, y similares. Cuando el material es un líquido, puede ser conveniente disolver gases en el líquido. Los líquidos en un entorno gaseoso controlado en general tendrán gases disueltos en los mismos.

40 Otros materiales ilustrativos útiles en el método presente incluyen materiales biológicos o biofarmacéuticos tales como tejidos, órganos, estructuras multicelulares. Para algunas aplicaciones biológicas y farmacéuticas, el material puede ser una solución o mezcla que incluye: un virus vivo o atenuado; ácidos nucleicos; anticuerpos monoclonales; anticuerpos policlonales; biomoléculas; análogos no peptídicos; péptidos, incluyendo polipéptidos, miméticos de péptidos y péptidos modificados; proteínas, incluyendo proteínas de fusión y modificadas; ARN y ADN y subclases de los mismos; oligonucleótidos; partículas víricas; y materiales o componentes similares a los mismos.

45 Las soluciones farmacéuticas o biofarmacéuticas contenidas en los viales o envases para la liofilización serían un buen ejemplo de un material que se beneficiaría del método presente. Las soluciones son principalmente agua y son sustancialmente incompresibles. Dichas soluciones farmacéuticas o biofarmacéuticas también son muy puras y en general están exentas de partículas que pueden formar sitios para la nucleación. La temperatura de nucleación uniforme es importante para crear una estructura cristalina del hielo constante y uniforme de un vial a otro o de un envase a otro. La estructura cristalina del hielo desarrollada también afecta mucho al tiempo requerido para el secado.

50 Como se aplica a un procedimiento de liofilización, el material se pone preferiblemente en una cámara, tal como una cámara de liofilización. Preferiblemente, la cámara se configura de modo que permita el control de la temperatura, presión y atmósfera gaseosa dentro de la cámara. La atmósfera gaseosa puede incluir, pero no se limita a: argón, nitrógeno, helio, aire, vapor de agua, oxígeno, dióxido de carbono, monóxido de carbono, óxido nitroso, óxido nítrico, neón, xenón, criptón, metano, hidrógeno, propano, butano, y similares, incluyendo mezclas permisibles de los mismos. La atmósfera gaseosa preferida comprende un gas inerte, tal como argón a una presión entre 149,6 y 446 kPa (de 7 a 50 psig) o más. Las temperaturas dentro de la cámara de liofilización a menudo vienen dadas por el procedimiento de liofilización y son controladas fácilmente por el uso de un fluido de transferencia de calor que enfría o calienta los estantes dentro de la cámara para dirigir la temperatura de los viales o envases y el material dentro de

cada vial o envase.

De acuerdo con los métodos presentes, el material se enfría a una temperatura cercana o por debajo de su temperatura de transición de fase. En el caso de una solución de base acuosa que se somete a un procedimiento de liofilización, la temperatura de transición de fase es el punto de congelación termodinámico de la solución. Cuando la solución alcanza temperaturas por debajo del punto de congelación termodinámico de la solución, se dice que está subenfriada. Cuando se aplica a un procedimiento de congelación de una solución de base acuosa, el método presente es eficaz cuando el grado de subenfriamiento varía desde cerca o por debajo de la temperatura de transición de fase hasta aproximadamente 40°C de subenfriamiento, y más preferiblemente entre aproximadamente 3°C de subenfriamiento y 10°C de subenfriamiento. En algunos de los ejemplos descritos más adelante, el método presente de inducción de nucleación funciona convenientemente incluso cuando la solución tiene solo aproximadamente 1°C de subenfriamiento por debajo de su punto de congelación termodinámico.

Cuando el material está a una temperatura por debajo de su temperatura de transición de fase, a menudo se dice que está en un estado metaestable. Un estado metaestable es un estado inestable y transitorio, pero relativamente de larga vida de un sistema químico o biológico. Un material metaestable existe temporalmente en una fase o estado que no es su fase o estado de equilibrio. En ausencia de cualquier cambio en el material o su entorno, un material metaestable finalmente producirá la transición de su estado de no equilibrio a su estado de equilibrio. Los materiales metaestables ilustrativos incluyen soluciones supersaturadas y líquidos subenfriados.

Un ejemplo típico de un material metaestable sería agua líquida a presión atmosférica y a una temperatura de -10°C. Con un punto de congelación normal de 0°C, el agua líquida no debería existir termodinámicamente a esta temperatura y presión, pero puede existir en ausencia de un suceso de nucleación o estructura que empiece el proceso de cristalización del hielo. El agua extremadamente pura se puede enfriar a temperaturas muy bajas (de -30°C a -40°C) a presión atmosférica y permanecer todavía en el estado líquido. Dicha agua subenfriada está en un estado metaestable termodinámicamente no equilibrado. Solo falta un suceso de nucleación que haga que empiece la transición de fase de modo que vuelva al equilibrio.

Como se ha discutido antes, los métodos presentes de inducción de la nucleación de una transición de fase dentro de un material o en la congelación de un material, se puede usar con diferentes perfiles de enfriamiento, incluyendo, por ejemplo, un entorno de enfriamiento equilibrado o un entorno de enfriamiento dinámico (véase las figuras 2 y 3).

Etapa 2 - Disminución rápida de la presión

Cuando el material ha alcanzado la temperatura deseada cerca o por debajo de la temperatura de transición de fase, la cámara se despresuriza rápido o rápidamente. Esta despresurización desencadena la nucleación y la transición de fase de la solución en los viales o envases. En la realización preferida, la despresurización de la cámara se lleva a cabo abriendo o abriendo parcialmente una válvula de control grande que separa la cámara de alta presión del entorno ambiente o una cámara o entorno de menor presión.

La presión elevada se disminuye rápidamente mediante el flujo de masa de la atmósfera gaseosa fuera de la cámara. La despresurización tiene que ser bastante rápida para inducir la nucleación. La despresurización debería terminar en varios segundos o menos, preferiblemente 40 segundos o menos, más preferiblemente 20 segundos o más, y lo más preferiblemente 10 segundos o menos.

En aplicaciones de liofilización típicas, la diferencia de presión entre la presión inicial de la cámara y la presión final de la cámara, después de despresurización, debe ser mayor que 48,3 kPa (7 psi), aunque disminuciones de presión menores en algunas situaciones pueden inducir la nucleación. La mayoría de los liofilizadores comerciales pueden acomodar fácilmente el intervalo de disminuciones de presión necesarias para controlar la nucleación. Muchos liofilizadores se diseñan con especificaciones de presión de más de 273,7 kPa (25 psig) para aguantar los procedimientos de esterilización convencional que usan vapor saturado a 121°C. Dichas especificaciones del equipamiento proporcionan una amplia ventaja para inducir la nucleación siguiendo los protocolos que despresurizan a partir de presiones iniciales superiores a la presión ambiente o la presión en el ambiente circundante. La elevada presión y posterior despresurización se pueden lograr por cualquier medio conocido (p. ej., neumático, hidráulico o mecánico). En las realizaciones preferidas, las presiones de operación para los métodos presentes deben permanecer por debajo de la presión supercrítica de cualquier gas aplicado, y debe evitarse someter el material a presiones bajas extremas (es decir, aproximadamente 0,013 mbar (10 mTorr) o menos) durante la nucleación del material.

Sin querer estar ligados por cualquier mecanismo particular, un posible mecanismo para explicar la nucleación controlada observada en la práctica del método presente, es que los gases en solución en el material salen de la solución con la despresurización y forman burbujas que producen la nucleación del material. Una presión elevada inicial aumenta la concentración del gas disuelto en la solución. La disminución rápida de presión después del enfriamiento reduce la solubilidad del gas, y la posterior liberación de gas de la solución subenfriada desencadena la nucleación de la transición de fase.

Otro posible mecanismo es que la disminución de temperatura del gas próximo al material durante la despresurización, produce un punto frío en la superficie del material que inicia la nucleación. Otro posible

mecanismo es que la despresurización produce evaporación de algo de líquido en el material y el enfriamiento resultante del proceso de evaporación endotérmica puede iniciar la nucleación. Otro posible mecanismo es que el gas frío despresurizado próximo al material congela algo de vapor en equilibrio con el material antes de la despresurización o liberado del material por evaporación durante la despresurización; las partículas sólidas resultantes vuelven a entrar en el material y actúan como semillas o superficies para iniciar la nucleación. Uno o más de estos mecanismos pueden contribuir al inicio de la nucleación de la congelación o solidificación en diferentes medidas, dependiendo de la naturaleza del material, su entorno y la transición de fase que produce la nucleación.

El procedimiento se puede llevar a cabo enteramente a una presión mayor que la presión ambiente o a lo largo de un intervalo de presiones que abarca la presión ambiente. Por ejemplo, la presión inicial de la cámara puede estar por encima de la presión ambiente y la presión final de la cámara, después de despresurización, puede estar por encima de la presión ambiente pero menor que la presión inicial de la cámara; la presión inicial de la cámara puede estar por encima de la presión ambiente y la presión final de la cámara, después de despresurización, puede ser aproximadamente la presión ambiente o ligeramente por debajo de la presión ambiente.

Se cree que la velocidad y magnitud de la disminución de presión también son un aspecto importante de los métodos presentes. Experimentos han mostrado que la nucleación será inducida donde la disminución de presión (ΔP) es mayor que 48,3 kPa (7 psi). Alternativamente, la magnitud de la disminución de presión se puede expresar como una relación de presiones absolutas, $R = P_i/P_f$, donde P_i es la presión absoluta inicial y P_f es la presión absoluta final. Se cree que la nucleación se puede inducir tras despresurización cuando la relación de presiones absolutas, R es mayor que aproximadamente 1,2 en muchas aplicaciones prácticas de los métodos presentes. La velocidad de disminución de la presión también tiene una función importante en los métodos presentes. Un método de caracterización de la velocidad de disminución de la presión es mediante el uso de un parámetro, A , donde $A = \Delta P/\Delta t$. De nuevo, se supone que la nucleación se inducirá para valores de A mayores que un valor prescrito, tal como aproximadamente 1,38 kPa/s (0,2 psi/s). Los datos empíricos de la experimentación ayudarían a determinar la disminución de presión preferida y velocidad de disminución de la presión.

Los siguientes ejemplos destacan diferentes aspectos y características de los métodos presentes descritos de inducción de la nucleación en un material y no deben considerarse en un sentido limitante. Al contrario, los ejemplos son solo ilustrativos y el alcance de la invención debe determinarse solo con respecto a las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Todos los ejemplos descritos en la presente memoria se realizarán en un liofilizador VirTis 51-SRC de escala piloto que tiene 4 estantes con aproximadamente 1,0 m² de espacio total de los estantes y un condensador interno. Esta unidad se modificó para aguantar presiones positivas de hasta aproximadamente 204,7 kPa (15 psig). También se añadió una abertura circular de 3,8 cm (1,5") de diámetro en la pared trasera de la cámara de liofilización con un tubo de acero inoxidable de 3,8 cm (1,5") de diámetro que se extiende desde el agujero a través del aislamiento de la pared trasera para salir de la parte posterior del liofilizador. Se unieron dos válvulas de bola accionadas por aire, de paso completo de 3,8 cm (1,5") a este tubo mediante conexiones sanitarias. Una válvula de bola dejaba que el gas fluyera a la cámara de liofilización y de esta forma proporcionaba presiones positivas de hasta 204,7 kPa (15 psig). La segunda válvula de bola dejaba que el gas fluyera fuera de la cámara de liofilización y de esta forma reducía la presión de la cámara a condiciones atmosféricas (101 kPa (0 psig)). Toda la refrigeración de los estantes y el condensador del liofilizador se llevó a cabo mediante circulación de fluido de transferencia de calor Dynalene MV enfriado mediante nitrógeno líquido, usando el sistema Praxair NCool™-HX.

Todas las soluciones se prepararon en una sala limpia de clase 100. El liofilizador se colocó con la puerta, estantes y controles todos accesibles desde la sala limpia, mientras que los otros componentes (bombas, calentadores, etc.) se colocaron en un entorno de sala no limpia. Todas las soluciones se prepararon con agua de calidad para HPLC (Fisher Scientific, filtrada a través de una membrana de 0,10 μ m). Las soluciones finales se filtraron a través de una membrana de 0,22 μ m antes de llenar los viales o envases de liofilización. Todos los gases se suministraron mediante cilindros y se filtraron a través de filtros de 0,22 μ m para separar las partículas. Los envases de vidrio (viales de 5 ml y botellas de 60 ml) se obtuvieron previamente limpios de partículas de Wheaton Science Products. Cuando era adecuado se usaron vehículos farmacéuticamente aceptables. Las etapas anteriores se hicieron para asegurar que los materiales y métodos cumplieran los estándares de fabricación farmacéutica convencional para partículas, que actúan como agentes de nucleación.

Como se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, antioxidantes, sales, recubrimientos, tensioactivos, conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoato de metilo o propilo, ácido sórbico, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la solución (p. ej., parafina), absorbentes (p. ej., arcilla caolín, arcilla bentonita), estabilizantes de fármacos (p. ej., laurilsulfato sódico), geles, aglutinantes (p. ej., jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, alginatos), excipientes (p. ej., lactosa, azúcar de leche, polietilenglicol), agentes disgregantes (p. ej., agar-agar, almidón, lactosa, fosfato cálcico, carbonato cálcico, ácido algínico, sorbitol, glicina), agentes humectantes (p. ej., alcohol cetílico, monoestearato de glicerol), lubricantes, aceleradores de la absorción (p. ej., sales de amonio cuaternario), aceites comestibles (p. ej., aceite de almendra,

5 aceite de coco, ésteres oleosos o propilenglicol), agentes edulcorantes, agentes de sabor, agentes colorantes, cargas (p. ej., almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol), lubricantes para formación de comprimidos (p. ej., estearato magnésico, almidón, glucosa, lactosa, harina de arroz, yeso), vehículos para la inhalación (p. ej., propulsores hidrocarburos), agentes de tamponamiento, o materiales similares y combinaciones de los mismos, como conoce el experto en la técnica.

10 Para las condiciones experimentales descritas en el presente documento y todas las formulaciones de liofilización estudiadas, se observó típicamente que la nucleación estocástica se producía a temperaturas del envase entre aproximadamente -8°C y -20°C y ocasionalmente tan caliente como -5°C . Los contenedores en general se podrían mantener a temperaturas más calientes que -8°C durante periodos de tiempo largos sin nucleación. El inicio de la nucleación y el posterior crecimiento de cristales (es decir, congelación) se determinó mediante medición de la temperatura como el punto al que la temperatura del envase aumenta rápidamente en respuesta al calor latente exotérmico de la fusión. El inicio de la congelación también se podría determinar visualmente a través de una mirilla en la puerta de la cámara del liofilizador.

Ejemplo 1 - Control de la temperatura de nucleación

15 Se llenaron 4 viales separados con 2,5 ml de solución de manitol al 5% en peso. El punto de congelación termodinámico previsto de la solución de manitol al 5% en peso es aproximadamente $-0,5^{\circ}\text{C}$. Los 4 viales se pusieron en un estante del liofilizador muy cerca unos de otros. Las temperaturas de los 4 viales se vigilaron usando los termopares montados en la superficie. El liofilizador se presurizó con argón a 197,8 kPa (14 psig).

20 El estante del liofilizador se enfrió para obtener temperaturas de los viales entre aproximadamente $-1,3^{\circ}\text{C}$ y aproximadamente $-2,3^{\circ}\text{C}$ (precisión de la medición de los termopares $\pm 1^{\circ}\text{C}$). Después, el liofilizador se despresurizó desde aproximadamente 197,8 kPa (14 psig) a aproximadamente presión atmosférica en menos de 5 segundos para inducir la nucleación de la solución dentro de los viales. En los 4 viales se produjo la nucleación y empezó la congelación inmediatamente después de la despresurización. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

25 Como se ve en la tabla 1, las temperaturas de nucleación controladas en este ejemplo (es decir, temperaturas iniciales de los viales) están bastante cerca del punto de congelación termodinámico previsto de la solución. Por lo tanto, el método presente permite el control de la nucleación para que se produzca en soluciones que tienen un grado muy bajo de subenfriamiento o a temperaturas de nucleación cercanas o solo ligeramente más frías que sus puntos de congelación.

30 Tabla 1. Control de la temperatura de nucleación

Vial n°	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [$^{\circ}\text{C}$]	Disminución de presión [kPa (psi)]	Resultado de la despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-2,3	96,5 (14)	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-1,3	96,5 (14)	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-2,1	96,5 (14)	Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-1,7	96,5 (14)	Nucleación

Ejemplo 2 - Control de la temperatura de nucleación

35 En este ejemplo, se llenaron 95 viales con 2,5 ml de solución de manitol al 5% en peso. El punto de congelación termodinámico de la solución de manitol al 5% en peso es aproximadamente $-0,5^{\circ}\text{C}$. Los 95 viales se pusieron en un estante del liofilizador muy cerca unos de otros. Se vigilaron las temperaturas de 6 viales colocados en diferentes posiciones en el estante del liofilizador usando termopares montados en la superficie. El liofilizador se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 197,8 kPa (14 psig). Después se enfrió el estante del liofilizador para obtener temperaturas de los viales cercanas a -5°C . Después, el liofilizador se despresurizó desde aproximadamente 197,8 kPa (14 psig) a aproximadamente presión atmosférica en menos de 5 segundos para inducir la nucleación de la solución dentro de los viales. Se observó visualmente en los 95 que se producía nucleación y empezaba la congelación inmediatamente después de la despresurización. Los datos de los termopares de los 6 viales vigilados confirmaron la observación visual. Los resultados se resumen en la tabla 2.

45 Como se puede ver en la misma, las temperaturas de la nucleación controlada en este ejemplo (es decir, temperaturas iniciales de los viales) son algo menores que el punto de congelación termodinámico previsto de la solución. Por lo tanto, el método presente permite el control de la nucleación que se produce en soluciones que tienen un grado de subenfriamiento moderado. Este ejemplo también demuestra que se puede aumentar la escala del método presente a una aplicación de múltiples viales.

Tabla 2. Control de la temperatura de nucleación

Vial n°	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Disminución de presión [kPa (psi)]	Resultado de la despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,2	96,5 (14)	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,4	96,5 (14)	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,6	96,5 (14)	Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,4	96,5 (14)	Nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,6	96,5 (14)	Nucleación
6	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	96,5 (14)	Nucleación

Ejemplo 3 - Control de magnitud de la despresurización

5 En este ejemplo, se llenaron múltiples viales con 2,5 ml de solución de manitol al 5% en peso. De nuevo, el punto de congelación termodinámico previsto de la solución de manitol al 5% en peso es aproximadamente -0,5°C. Para cada experimento del ensayo, los viales se pusieron en un estante del liofilizador muy cerca unos de otros. Como con los ejemplos descritos anteriormente, las temperaturas de los viales se vigilaron usando termopares montados en la superficie. La atmósfera de argón en el liofilizador se presurizó a diferentes presiones y el estante del liofilizador se enfrió para obtener temperaturas de los viales de aproximadamente -5°C. En cada experimento de ensayo, después
10 el liofilizador se despresurizó rápidamente (es decir, en menos de 5 segundos) desde la presión seleccionada a presión atmosférica, para intentar inducir la nucleación de la solución dentro de los viales. Los resultados se resumen en la tabla 3.

15 Como se ve en la tabla 3, se produjo la nucleación controlada donde la disminución de presión era aproximadamente 48,3 kPa (7 psi) o mayor, y la temperatura de nucleación (es decir, la temperatura inicial del vial) era entre aproximadamente -4,7°C y -5,8°C.

Tabla 3. Efecto de la magnitud de despresurización

Vial n°	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Disminución de presión [kPa (psi)]	Resultado de la despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,7	48,3 (7)	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	48,3 (7)	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,3	48,3 (7)	Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,6	48,3 (7)	No Nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,6	48,3 (7)	Nucleación
6	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,8	48,3 (7)	Nucleación
7	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4	41,2 (6)	No Nucleación
8	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,7	41,2 (6)	No Nucleación
9	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,8	41,2 (6)	No Nucleación
10	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	34,5 (5)	No Nucleación
11	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4	34,5 (5)	No Nucleación
12	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,5	34,5 (5)	No Nucleación
13	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,7	27,6 (4)	No Nucleación
14	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	27,6 (4)	No Nucleación
15	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,3	27,6 (4)	No Nucleación

Ejemplo 4 - Control de las velocidades de despresurización

20 Para este ejemplo, se llenaron múltiples viales con aproximadamente 2,5 ml de solución de manitol al 5% en peso que tenía un punto de congelación termodinámico previsto de aproximadamente -0,5°C. Para cada experimento de ensayo de distinto tiempo de despresurización, los viales se pusieron en un estante del liofilizador muy cerca unos de otros. Como en los ejemplos descritos antes, se vigilaron las temperaturas de los viales usando termopares montados en la superficie. Como en los ejemplos descritos antes, la atmósfera de argón en el liofilizador se presurizó a aproximadamente 197,8 kPa (14 psig) y el estante se enfrió para obtener temperaturas de los viales de
25 aproximadamente -5°C. En cada experimento de ensayo, el liofilizador después se despresurizó a diferentes velocidades de despresurización desde 197,8 kPa (14 psig) a presión atmosférica para inducir la nucleación de la solución dentro de los viales.

30 Para estudiar el efecto de la velocidad de despresurización o el tiempo de despresurización, se puso una válvula de bola reguladora de la velocidad en la salida de la válvula de control de la despresurización en la parte trasera del liofilizador. Cuando la válvula reguladora de la velocidad está completamente abierta, la despresurización desde aproximadamente 197,8 kPa (14 psig) a aproximadamente 101,3 kPa (0 psig) se lleva a cabo en aproximadamente 2,5 segundos. Cerrando solo parcialmente la válvula reguladora de la velocidad, se puede aumentar de forma variable el tiempo de despresurización de la cámara. Usando la válvula de bola reguladora de la velocidad se

llevaron a cabo varios experimentos de ensayo con la cámara del liofilizador despresurizada a diferentes velocidades para evaluar o determinar el efecto de la velocidad de despresurización en la nucleación. Los resultados se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Efecto del tiempo de despresurización

Vial nº	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Disminución de presión [kPa (psi)]	Tiempo [s]	Resultado de la despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,6	96,5 (14)	300	No Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4	96,5 (14)	300	No Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,8	96,5 (14)	300	No Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,6	96,5 (14)	200	No Nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4	96,5 (14)	200	No Nucleación
6	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4	96,5 (14)	200	No Nucleación
7	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,6	96,5 (14)	100	No Nucleación
8	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,2	96,5 (14)	100	No Nucleación
9	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,2	96,5 (14)	100	No Nucleación
10	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,7	96,5 (14)	60	No Nucleación
11	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	96,5 (14)	60	No Nucleación
12	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	96,5 (14)	60	No Nucleación
13	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	96,5 (14)	50	No Nucleación
14	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,3	96,5 (14)	50	No Nucleación
15	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,9	96,5 (14)	50	No Nucleación
16	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4	96,5 (14)	42	No Nucleación
17	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,5	96,5 (14)	42	No Nucleación
18	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,0	96,5 (14)	42	No Nucleación
19	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	96,5 (14)	32	Nucleación
20	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,7	96,5 (14)	32	Nucleación
21	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,6	96,5 (14)	32	Nucleación
22	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,7	96,5 (14)	13	Nucleación
23	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,3	96,5 (14)	13	Nucleación
24	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,5	96,5 (14)	13	Nucleación

5

Como se ve en la tabla 4, la nucleación solo se producía cuando el tiempo de despresurización eran menor que 42 segundos, la disminución de presión era aproximadamente 197,8 kPa (14 psig) o mayor y la temperatura de nucleación (es decir, la temperatura inicial del vial) era entre aproximadamente -4,6°C y aproximadamente -5,8°C. Estos resultados indican que es necesario llevar a cabo la despresurización relativamente rápido para que el método sea eficaz.

10

Ejemplo 5 - Control de la atmósfera gaseosa

De nuevo, se llenaron múltiples viales con aproximadamente 2,5 ml de solución de manitol al 5% en peso y se pusieron en un estante del liofilizador muy cerca unos de otros. Como en los ejemplos descritos antes, la temperatura de los viales de ensayo se vigiló usando termopares montados en la superficie. Para los diferentes experimentos de ensayo, la atmósfera gaseosa en el liofilizador se varió manteniendo siempre una presión positiva de aproximadamente 197,8 kPa (14 psig). En este ejemplo, el estante del liofilizador se enfrió para obtener temperaturas de los viales de aproximadamente -5°C a -7°C. En cada experimento de ensayo, el liofilizador después se despresurizó rápidamente desde aproximadamente 197,8 kPa (14 psig) a presión atmosférica para intentar inducir la nucleación de la solución dentro de los viales. Los resultados se resumen en la tabla 5.

15

Como se ve en la misma, la nucleación controlada se producía en todas las atmósferas gaseosa excepto para la atmósfera de helio gaseoso donde la disminución de presión era aproximadamente 197,8 kPa (14 psig) y la temperatura de nucleación (es decir, temperatura inicial del vial) era entre aproximadamente -4,7°C y aproximadamente -7,4°C. Aunque no se muestra en estos ejemplos, se cree que condiciones alternativas probablemente permitirán la nucleación controlada en una atmósfera de helio.

20

Tabla 5. Efecto de la composición de la atmósfera gaseosa

Vial n°	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Disminución de presión [kPa (psi)]	Resultado de la despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,9	96,5 (14)	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,2	96,5 (14)	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Nitrógeno	-4,7	96,5 (14)	Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Nitrógeno	-5,1	96,5 (14)	Nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Xenón	-4,8	96,5 (14)	Nucleación
6	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Xenón	-5,0	96,5 (14)	Nucleación
7	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Aire	-7,4	96,5 (14)	Nucleación
8	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Aire	-7,2	96,5 (14)	Nucleación
9	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Helio	-5,8	96,5 (14)	No Nucleación
10	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Helio	-5,5	96,5 (14)	No Nucleación

Ejemplo 6 - Soluciones de volumen grande

5 En este ejemplo, se llenaron 6 botellas de liofilización (60 ml de capacidad) con aproximadamente 30 ml de solución de manitol al 5% en peso que tenía un punto de congelación termodinámico previsto de aproximadamente -0,5°C. Las 6 botellas de liofilización se pusieron en un estante del liofilizador muy cerca unas de otras. La temperatura de las 6 botellas colocadas en diferentes posiciones en el estante del liofilizador se vigiló usando termopares montados en la superficie. El liofilizador se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 197,8 kPa (14 psig). Después, el liofilizador se enfrió para obtener temperaturas de las botellas cercanas a -5°C. Después, el liofilizador se despresurizó desde 197,8 kPa (14 psig) a aproximadamente presión atmosférica, en menos de 5 segundos para intentar inducir la nucleación de la solución dentro de las botellas. Los resultados se resumen en la tabla 6.

15 En un experimento separado, una bandeja de plástico de liofilización a granel (Gore LYOGUARD, 1800 ml de capacidad), se llenó con aproximadamente 1000 ml de solución de manitol al 5% en peso. La bandeja se obtuvo previamente limpia para cumplir los requisitos de bajo nivel de partículas de la USP. La bandeja se puso en un estante del liofilizador, y la temperatura de la bandeja se vigiló mediante un termopar montado en la superficie exterior de la bandeja cerca del centro de un lado. Después, el estante del liofilizador se enfrió para obtener una temperatura de la bandeja cercana a -7°C. Después, el liofilizador se despresurizó desde 197,8 kPa (14 psig) a aproximadamente presión atmosférica en menos de 5 segundos para inducir la nucleación de la solución dentro de la bandeja. Los resultados se resumen también en la tabla 6.

20 Como en los ejemplos descritos antes, en todos los envases se produjo nucleación y empezó la congelación inmediatamente después de la despresurización. También como en los ejemplos descritos antes, las temperaturas de nucleación (es decir, temperaturas de los envases) en este ejemplo, eran mucho más controlables al estar algo cerca de la temperatura de congelación termodinámica de la solución. Lo que es más importante, este ejemplo ilustra que el método presente permite que el control de la nucleación se produzca en soluciones de volumen mayor y diferentes formatos de envases. Debe indicarse, que se esperaba que la eficacia del método de despresurización mejorara al aumentar el volumen de la formulación, porque es más probable que ocurra el suceso de nucleación cuando hay más moléculas presentes para agregarse y formar núcleos críticos.

Tabla 6. Efecto del volumen de solución y el tipo de envase

Envase	Solución	Atmósfera	Temperatura del envase [°C]	Disminución de presión [kPa (psi)]	Resultado de la despresurización
Botella n° 1	30 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,3	96,5 (14)	Nucleación
Botella n° 2	30 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	96,5 (14)	Nucleación
Botella n° 3	30 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,9	96,5 (14)	Nucleación
Botella n° 4	30 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,2	96,5 (14)	Nucleación
Botella n° 5	30 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,9	96,5 (14)	Nucleación
Botella n° 6	30 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-6,1	96,5 (14)	Nucleación
Bandeja	1000 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-6,9	96,5 (14)	Nucleación

30 Ejemplo 7 - Enfriamiento dinámico frente a enfriamiento equilibrado

35 Los métodos presentes de control de la nucleación se pueden usar en diferentes modos. Los ejemplos 1-6, descritos antes, demuestran cada uno el aspecto del control de la temperatura de nucleación de una solución de liofilización que está esencialmente equilibrada a una temperatura inferior a su punto de congelación termodinámico (es decir, temperatura que cambia muy lentamente). Este ejemplo demuestra que la nucleación se puede producir a una temperatura inferior al punto de congelación termodinámico en un entorno de enfriamiento dinámico (es decir, la solución se somete a cambios rápidos de temperatura).

En este ejemplo, los viales 1 a 6 representan las muestras descritas antes con referencia al ejemplo 2. Además, se

llenaron también 3 viales separados (viales 7-9) con 2,5 ml de solución de manitol al 5% en peso. En un experimento de ensayo separado, los 3 viales adicionales se pusieron en un estante del liofilizador muy cerca unos de otros. El estante del liofilizador se enfrió rápidamente hacia una temperatura final del estante de -45°C. Cuando uno de los viales alcanzó una temperatura de aproximadamente -5°C, medido por los termopares montados en la superficie, el liofilizador se despresurizó rápidamente desde aproximadamente 197,8 kPa (14 psig) a 101,3 kPa (0 psig) para intentar inducir nucleación. En los 3 viales se produjo nucleación y empezó la congelación inmediatamente después de la despresurización. Las temperaturas de los viales disminuyeron significativamente a entre -6,8°C y -9,9°C antes de la nucleación, como resultado del entorno de enfriamiento dinámico. Los resultados comparativos se resumen en la siguiente tabla 7.

10 Tabla 7. Resultados de ensayo - Efecto del enfriamiento dinámico en la nucleación

Vial nº	Solución	Modo	Temperatura de nucleación [°C]	Disminución de presión [kPa (psi)]	Resultado de la despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Equilibrado	-4,2	96,5 (14)	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Equilibrado	-4,4	96,5 (14)	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Equilibrado	-4,6	96,5 (14)	Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Equilibrado	-4,4	96,5 (14)	Nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Equilibrado	-4,6	96,5 (14)	Nucleación
6	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Equilibrado	-5,1	96,5 (14)	Nucleación
7	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Dinámico	-6,8	96,5 (14)	Nucleación
8	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Dinámico	-7,2	96,5 (14)	Nucleación
9	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Dinámico	-9,9	96,5 (14)	Nucleación

La eficacia de los métodos presentes para controlar la nucleación en soluciones de liofilización equilibradas en un intervalo de temperaturas dado o en soluciones de liofilización enfriadas de forma dinámica, proporciona al usuario final dos modos potenciales de aplicación, con diferentes beneficios y compensaciones. Al permitir que las soluciones de liofilización se equilibren, el intervalo de temperaturas de nucleación será estrecho o se minimiza a los límites de rendimiento del propio liofilizador. La etapa de equilibrado puede requerir tiempo extra con respecto a los protocolos de congelación convencionales o dinámicos donde las temperaturas de la cámara y los viales se reducen a menos de aproximadamente -40°C en una etapa. Sin embargo, el uso de la etapa de equilibrado debe dar una uniformidad de la nucleación muy mejorada a lo largo de todos los viales o envases, así como la obtención de los otros beneficios asociados con el control preciso de la temperatura de nucleación del material.

Alternativamente, si no es deseable el equilibrado de las temperaturas del material o solución de liofilización, se puede implementar simplemente la etapa de despresurización en un tiempo adecuado durante la congelación normal o el protocolo de enfriamiento dinámico. La despresurización durante un enfriamiento dinámico producirá una dispersión más ancha en las temperaturas de nucleación para el material dentro de los envases de liofilización, pero añadirá un tiempo mínimo al protocolo de congelación y todavía permitirá mitigar los problemas de subenfriamiento extremo.

Ejemplo 8 - Efecto de diferentes excipientes

El método presente de control o inducción de la nucleación en un material se puede usar para controlar la temperatura de nucleación de soluciones subenfriadas que contienen diferentes excipientes de liofilización. Este ejemplo demuestra el uso de los métodos presentes con los siguientes excipientes: manitol; hidroxietilalmidón (HES); polietilenglicol (PEG); polivinilpirrolidona (PVP); dextrano; glicina; sorbitol; sacarosa; y trehalosa. Para cada excipiente, se llenaron dos viales con 2,5 ml de una solución que contenía el excipiente al 5% en peso. Los viales se pusieron en un estante del liofilizador muy cerca unos de otros. El liofilizador se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 197,8 kPa (14 psig). El estante del liofilizador se enfrió para obtener temperaturas de los viales cercanas a -3°C y después se despresurizó rápidamente para inducir la nucleación. Los resultados se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Efecto de diferentes excipientes de liofilización

Vial nº	Solución/excipiente	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Disminución de presión [kPa (psi)]	Resultado de la despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-3,3	96,5 (14)	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-3,0	96,5 (14)	Nucleación
3	2,5 ml de HES al 5% en peso	Argón	-3,1	96,5 (14)	Nucleación
4	2,5 ml de HES al 5% en peso	Argón	-3,7	96,5 (14)	Nucleación
5	2,5 ml de PEG al 5% en peso	Argón	-3,8	96,5 (14)	Nucleación
6	2,5 ml de PEG al 5% en peso	Argón	-3,4	96,5 (14)	Nucleación
7	2,5 ml de PVP al 5% en peso	Argón	-3,5	96,5 (14)	Nucleación
8	2,5 ml de PVP al 5% en peso	Argón	-3,3	96,5 (14)	Nucleación
9	2,5 ml de dextrano al 5% en peso	Argón	-4,0	96,5 (14)	Nucleación
10	2,5 ml de dextrano al 5% en peso	Argón	-3,1	96,5 (14)	Nucleación
11	2,5 ml de glicina al 5% en peso	Argón	-3,8	96,5 (14)	Nucleación
12	2,5 ml de glicina al 5% en peso	Argón	-3,9	96,5 (14)	Nucleación
13	2,5 ml de sorbitol al 5% en peso	Argón	-3,6	96,5 (14)	Nucleación
14	2,5 ml de sorbitol al 5% en peso	Argón	-3,4	96,5 (14)	Nucleación
15	2,5 ml de sacarosa al 5% en peso	Argón	-3,3	96,5 (14)	Nucleación
16	2,5 ml de sacarosa al 5% en peso	Argón	-3,4	96,5 (14)	Nucleación
17	2,5 ml de trehalosa al 5% en peso	Argón	-3,7	96,5 (14)	Nucleación
18	2,5 ml de trehalosa al 5% en peso	Argón	-3,1	96,5 (14)	Nucleación

Ejemplo 9 - Control de la nucleación de soluciones de proteínas

5 Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para controlar la temperatura de nucleación de soluciones de proteínas subenfriadas sin efectos negativos o adversos en la solubilidad de la proteína o la actividad enzimática. Se usaron en este ejemplo dos proteínas, la albúmina de suero bovino (BSA) y la lactato deshidrogenasa (LDH).

10 La BSA se disolvió en manitol al 5% en peso en una concentración de 10 mg/ml. Se llenaron 3 viales de liofilización con 2,5 ml de solución de BSA-manitol y se pusieron en un estante del liofilizador muy cerca unos de otros. El liofilizador se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 197,8 kPa (14 psig). El estante del liofilizador se enfrió para obtener temperaturas de los viales cercanas a -5°C. El liofilizador se despresurizó rápidamente para inducir la nucleación. En todos los viales de solución de BSA se produjo nucleación y empezó la congelación inmediatamente después de la despresurización. No se observó precipitación de la proteína tras la descongelación.

15 Las proteínas LDH se obtuvieron de dos proveedores diferentes y con fines de claridad se designan como LDH-1 y LDH-2 para distinguir los dos lotes diferentes. La LDH-1 se disolvió en manitol al 5% en peso en una concentración de 1 mg/ml. Se llenaron 6 viales de liofilización con 2,5 ml de la solución de LDH-1/manitol y se pusieron en un estante del liofilizador muy cerca unos de otros. El liofilizador se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 197,8 kPa (14 psig). El estante del liofilizador se enfrió empezando de temperatura ambiente para obtener temperaturas de los viales cercanas a -4°C. Después, el liofilizador se despresurizó rápidamente para inducir la nucleación. En todos los viales se produjo nucleación y empezó la congelación inmediatamente después de la despresurización. Los viales se mantuvieron en este estado durante aproximadamente 15 minutos. Después, el estante del liofilizador se enfrió a una velocidad de aproximadamente 1°C/min para obtener temperaturas de los viales cercanas a -45°C y se mantuvieron durante 15 min adicionales para asegurar que se completaba el proceso de congelación. Después de la etapa de congelación, el estante del liofilizador después se calentó a una velocidad de aproximadamente 1°C/min para elevar la temperatura de los viales a cerca de 5°C. No se observó precipitación de la proteína tras la descongelación. Se ensayó en el contenido de los viales la actividad enzimática, y los resultados se compararon con una muestra de control de solución de LDH-1/manitol no congelada.

30 Como parte del ejemplo 9, las muestras nucleadas despresurizadas de la solución de LDH-1/manitol se compararon con muestras nucleadas de forma estocástica. En las muestras de LDH-1 nucleadas de forma estocástica, se repitió el procedimiento de congelación sin presurización y despresurización y sin la atmósfera de argón. Específicamente, se disolvió LDH-1 en manitol al 5% en peso a una concentración de 1 mg/ml. Se llenaron 6 viales de liofilización con 2,5 ml de solución de LDH-1/manitol y se pusieron en un estante del liofilizador muy cerca unos de otros. El estante del liofilizador se enfrió empezando desde temperatura ambiente a una velocidad de aproximadamente 1°C/min para obtener temperaturas de los viales cercanas a -45°C y se mantuvieron durante 15 min para asegurar que se completaba el proceso de congelación. Después de la etapa de congelación, el estante del liofilizador se calentó a una velocidad de aproximadamente 1°C/min para elevar las temperaturas de los viales a cerca de 5°C. No se observó precipitación de la proteína tras la descongelación. Se ensayó en el contenido de los viales la actividad enzimática, y los resultados se compararon con la misma muestra de control de solución de LDH-1/manitol no congelada. También como parte del ejemplo 9, se repitieron los experimentos descritos antes para la LDH-1 usando la LDH-1. La única diferencia era una temperatura de nucleación cercana a -3°C para la LDH-2 en lugar de -4°C para la LDH-1.

5 Como se ve en la tabla 9, la nucleación controlada y el proceso de congelación logrados por despresurización claramente no disminuyen la actividad enzimática con respecto a una nucleación estocástica y protocolo de congelación comparables. De hecho, el proceso de nucleación controlada logrado por despresurización parece que conserva mejor la actividad enzimática con una pérdida media de actividad de solo 17,8% para la LDH-1 y 26,5% para la LDH-2 comparado con la pérdida media de actividad de 35,9% para la LDH-1 y 41,3% para la LDH-2 después de nucleación estocástica.

Tabla 9. Control de la temperatura de nucleación de soluciones de proteínas subenfriadas

Vial nº	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Disminución de presión [kPa (psi)]	Pérdida de actividad enzimática [%]	Resultado de la despresurización
1	2,5 ml de solución de BSA	Argón	-4,9	96,5 (14)	—	Nucleación
2	2,5 ml de solución de BSA	Argón	-4,3	96,5 (14)	—	Nucleación
3	2,5 ml de solución de BSA	Argón	-5,3	96,5 (14)	—	Nucleación
4	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-3,8	96,5 (14)	9,0	Nucleación
5	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-4,0	96,5 (14)	16,2	Nucleación
6	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-3,7	96,5 (14)	18,4	Nucleación
7	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-4,0	96,5 (14)	23,4	Nucleación
8	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-3,9	96,5 (14)	18,5	Nucleación
9	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-4,0	96,5 (14)	21,2	Nucleación
10	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-10,4	1,4 kPa (0)	35,7	Nucleación
11	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-16,5	1,4 kPa (0)	35,4	Nucleación
12	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-15,5	1,4 kPa (0)	36,1	Nucleación
13	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-10,5	1,4 kPa (0)	43,9	Nucleación
14	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-9,8	1,4 kPa (0)	24,9	Nucleación
15	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-11,0	1,4 kPa (0)	39,2	Nucleación
16	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-3,1	96,5 (14)	29,9	Nucleación
17	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-2,9	96,5 (14)	18,9	Nucleación
18	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-3,1	96,5 (14)	23,3	Nucleación
19	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-2,7	96,5 (14)	19,6	Nucleación
20	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-3,1	96,5 (14)	32,1	Nucleación
21	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-2,6	96,5 (14)	35,2	Nucleación
22	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-5,0	0 (0)	38,3	Nucleación
23	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-5,5	0 (0)	40,0	Nucleación
24	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-2,3	0 (0)	36,5	Nucleación
25	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-3,8	0 (0)	42,0	Nucleación
26	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-5,1	0 (0)	50,2	Nucleación
27	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-5,9	0 (0)	40,6	Nucleación

10 Debe observarse que las temperaturas de nucleación estocástica observadas para la LDH-2 eran sustancialmente más altas que las temperaturas de nucleación estocástica para la LDH-1. Esta diferencia puede deberse a algún contaminante que está actuando como un agente de nucleación en la LDH-2. Las temperaturas de nucleación estocástica están mucho más cerca de las temperaturas de nucleación controlada para la LDH-2 comparada con la LDH-1, aunque las mejoras en la retención de la actividad enzimática obtenida por la nucleación controlada para LDH-1 y LDH-2 son similares, con 18,1% y 14,8%, respectivamente. Este resultado sugiere que las mejoras de la

15 retención de actividad enzimática se pueden atribuir parcialmente a las características del propio proceso de nucleación controlada, no solo a las temperaturas de nucleación más altas prescritas obtenidas por la despresurización.

Ejemplo 10 - Reducción del tiempo de secado primario

20 Se preparó una solución de manitol al 5% en peso mezclando aproximadamente 10,01 gramos de manitol con aproximadamente 190,07 gramos de agua. Los viales se llenaron con 2,5 ml de la solución de manitol al 5% en peso. Los viales se pesaron vacíos y con la solución para determinar la masa de agua añadida a los viales. Los 20 viales se pusieron en una rejilla en un estante del liofilizador muy cerca unos de otros. Se vigiló la temperatura de los 6 viales usando termopares montados en la superficie; todos los viales vigilados estaban rodeados de otros viales para mejorar la uniformidad del comportamiento del vial. El liofilizador se presurizó a aproximadamente 197,8 kPa (14 psig) en un atmósfera gaseosa controlada de gas argón. El estante del liofilizador se enfrió desde temperatura

25 ambiente a aproximadamente -6°C para obtener temperaturas de los viales entre aproximadamente -1°C y -2°C. Después, el liofilizador se despresurizó desde aproximadamente 197,8 kPa (14 psig) a aproximadamente presión atmosférica en menos de 5 segundos para inducir la nucleación de la solución dentro de los viales. En todos los viales observados visualmente o vigilados con los termopares se produjo nucleación y empezó la congelación

30 inmediatamente después de despresurización.

Después, la temperatura del estante se disminuyó rápidamente a aproximadamente -45°C para completar el proceso de congelación. Una vez que todas las temperaturas de los viales eran de aproximadamente -40°C o menos, se extrajo el aire de la cámara de liofilización y se inició el procedimiento de secado primario (es decir, sublimación). Durante este procedimiento de secado, el estante del liofilizador se calentó a aproximadamente -14°C mediante una elevación de una hora y se mantuvo a esta temperatura durante 16 horas. El condensador se mantuvo a aproximadamente -60°C a lo largo de todo el procedimiento de secado. El secado primario se detuvo apagando la bomba de vacío y volviendo a llenar la cámara con argón a presión atmosférica. Los viales se sacaron rápidamente del liofilizador y se pesaron para determinar cuánta agua se había perdido durante el procedimiento de secado primario.

En un experimento separado como parte del ejemplo 10, se llenaron otros viales con 2,5 ml de la misma solución de manitol al 5% en peso. Los viales se pesaron vacíos y con la solución para determinar la masa de agua añadida a los viales. Los viales se cargaron en el liofilizador de la misma forma descrita antes, y las temperaturas de los 6 viales se vigilaron, una vez más, usando termopares montados en la superficie. El estante del liofilizador se enfrió rápidamente desde temperatura ambiente a aproximadamente -45°C para congelar los viales. La nucleación se produjo de forma estocástica entre aproximadamente -15°C y aproximadamente -18°C durante la etapa de enfriamiento. Una vez que todas las temperaturas de los viales eran de aproximadamente -40°C o menos, los viales se secaron de una forma idéntica al método descrito antes. Tras terminar el secado primario, las muestras se sacaron inmediatamente del liofilizador y se secaron para determinar cuánta agua se había perdido durante el procedimiento de secado primario.

Tabla 10. El aumento de la temperatura de nucleación mejora el secado primario

Vial nº	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [$^{\circ}\text{C}$]	Disminución de presión [kPa (psi)]	Pérdida de agua [%]	Resultado de la despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-1,3	96,5 (14)	89,9	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-1,9	96,5 (14)	85,2	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-1,3	96,5 (14)	87,1	Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-2,3	96,5 (14)	88,8	Nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-2,1	96,5 (14)	85,0	Nucleación
6	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-1,1	96,5 (14)	80,7	Nucleación
7	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Aire	-15,7	1,4 kPa (0)	65,7	—
8	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Aire	-16,7	1,4 kPa (0)	66,9	—
9	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Aire	-14,5	1,4 kPa (0)	64,6	—
10	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Aire	-15,6	1,4 kPa (0)	64,7	—
11	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Aire	-16,5	1,4 kPa (0)	64,1	—
12	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Aire	-17,9	1,4 kPa (0)	65,7	—

Los resultados del procedimiento de liofilización con nucleación controlada y nucleación estocástica se resumen en la tabla 10. Debe indicarse que estos dos experimentos solo difieren en la adición de la nucleación controlada mediante la etapa de despresurización en un experimento. Como se ve en la tabla 10, el procedimiento de nucleación controlada logrado por despresurización permite la nucleación a grados muy bajos de subenfriamiento, entre aproximadamente $-1,1^{\circ}\text{C}$ y $-2,3^{\circ}\text{C}$, en este ejemplo. Las temperaturas de nucleación mucho más altas para el caso de nucleación controlada comparado con el caso de nucleación estocástica dan una estructura del hielo y una torta liofilizada resultante con propiedades de secado notablemente mejoradas. Para la misma cantidad de tiempo de secado, los viales con nucleación que usaban los métodos de despresurización descritos entre aproximadamente $-1,1^{\circ}\text{C}$ y $-2,3^{\circ}\text{C}$, perdieron una media de 86,1% de su agua, mientras que los viales con nucleación estocástica entre aproximadamente $-14,5^{\circ}\text{C}$ y $-17,9^{\circ}\text{C}$ solo perdieron una media de 65,3%. Por lo tanto, los viales con nucleación estocástica requerirían mucho más tiempo de secado primario para obtener el mismo grado de pérdida de agua que los viales en los que se produjo la nucleación de una forma controlada de acuerdo con los métodos presentes descritos. La mejora en el tiempo de secado se atribuye probablemente a la formación de cristales de hielo más grandes a temperaturas de nucleación más altas. Estos cristales de hielo más grandes dejan detrás poros mayores tras la sublimación, y los poros mayores ofrecen menos resistencia al flujo de vapor de agua durante la posterior sublimación.

Aplicabilidad industrial

El método presente proporciona un método mejorado para controlar la temperatura y/o tiempo en el que se produce nucleación de materiales subenfriados, en particular líquidos o soluciones, y después congelan. Aunque esta aplicación se centra en parte en la liofilización, hay un problema similar para cualquier etapa de procesamiento de materiales que implica una transición de fase nucleada. Los ejemplos de dichos procedimientos incluyen la cristalización de polímeros y metales a partir de fundidos, cristalización de materiales a partir de soluciones supersaturadas, cristalización de proteínas, producción de nieve artificial, congelación de alimentos, concentración por congelación, cristalización fraccionada, crioconservación, o condensación de vapores a líquidos.

El beneficio más inmediato del control de la temperatura de nucleación de un líquido o solución, es la capacidad de controlar el número y tamaño de los dominios sólidos producidos por la transición de fase. En agua que congela, por ejemplo, la temperatura de nucleación controla directamente el tamaño y número de cristales de hielo formados. Hablando en general, los cristales de hielo son menos en número y más grandes en tamaño cuando la temperatura de nucleación es más alta.

La capacidad para controlar el número y tamaño de los dominios sólidos producidos por una transición de fase puede proporcionar beneficios adicionales. En un procedimiento de liofilización, por ejemplo, el número y tamaño de los cristales de hielo influye mucho en las propiedades de secado de la torta liofilizada. Los cristales de hielo más grandes producidos por temperaturas de nucleación más altas, dejan detrás poros mayores tras la sublimación y los poros mayores ofrecen menos resistencia al flujo de vapor de agua durante la posterior sublimación. Por lo tanto, los métodos presentes proporcionan un medio para aumentar las velocidades de secado primario (es decir, la sublimación) en procedimientos de liofilización aumentando la temperatura de nucleación.

Otro posible beneficio se puede encontrar en aplicaciones donde se conservan materiales sensibles mediante procedimientos de congelación (es decir, crioconservados). Por ejemplo, un material biológico incluyendo, pero no limitado a muestras de tejidos de mamífero (p. ej., sangre de cordón, biopsia tisular, óvulos y espermatozoides, etc.), líneas celulares (p. ej., de mamífero, levadura, procarionota, fúngica, etc.) y moléculas biológicas (p. ej., proteínas, ADN, ARN y subclases de las mismas) congelados en una solución acuosa, pueden experimentar diferentes tensiones durante el procedimiento de congelación que puede deteriorar la función o actividad del material. La formación de hielo puede alterar físicamente el material o crear cambios graves en la unión interfacial, fuerzas osmóticas, concentraciones de soluto, etc., experimentados por el material. Puesto que la nucleación controla la estructura y cinética de la formación de hielo, puede influir significativamente en estas tensiones. Los métodos presentes descritos proporcionan, por lo tanto, un medio único de mitigar las tensiones asociadas con el procedimiento de crioconservación y potenciar la recuperación de la función o actividad de los materiales crioconservados. Los métodos presentes también representan una mejora frente a los métodos de control de la nucleación convencionales (p. ej., siembra o contacto con superficies frías) usados para iniciar la formación de hielo extracelular en algoritmos de crioconservación de dos etapas diseñados para células vivas.

Los métodos presentes también se pueden aplicar a soluciones o mezclas complejas que contienen varios constituyentes tanto en aplicaciones de crioconservación como de liofilización. Estas formulaciones a menudo son soluciones con disolvente acuoso, orgánico o acuoso-orgánico mezclados que contienen un ingrediente farmacéuticamente activo (p. ej., un producto químico sintético, proteína, péptido o vacuna) y opcionalmente uno o más constituyentes de atenuación, incluyendo agentes de carga que ayudan a prevenir la pérdida física del ingrediente activo durante el secado (p. ej., dextrosa, glucosa, glicina, lactosa, maltosa, manitol, polivinilpirrolidona, cloruro sódico y sorbitol); agentes de tamponamiento o modificadores de la toxicidad que ayudan a mantener el pH del entorno adecuado o toxicidad para el constituyente activo (p. ej., ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido tartárico, y las sales de sodio de los ácidos mencionados antes); agentes estabilizantes que ayudan a conservar la estructura y función del constituyente activo durante el procesamiento o en su forma final líquida o secada (p. ej., alanina, dimetilsulfóxido, glicerol, glicina, albúmina de suero humano, polietilenglicol, lisina, polisorbato, sorbitol, sacarosa y trehalosa); agentes que modifican el comportamiento de transición vítrea de la formulación (p. ej., polietilenglicoles y azúcares), y antioxidantes que protegen el constituyente activo de la degradación (p. ej., ascorbato, bisulfito sódico, formaldehído de sodio, metabisulfito sódico, sulfito sódico, sulfoxilato y tioglicerol).

Puesto que la nucleación típicamente es un proceso aleatorio, una pluralidad del mismo material sometido a condiciones de procesamiento idénticas pueden producir nucleación a diferentes temperaturas. Como resultado, probablemente las propiedades de los materiales que dependen del comportamiento de nucleación diferirán, a pesar de las mismas condiciones de procesamiento. Los métodos descritos proporcionan un medio para controlar las temperaturas de nucleación de una pluralidad de materiales simultáneamente y por lo tanto ofrece una forma de aumentar la uniformidad de esas propiedades del producto que dependen del comportamiento de nucleación. En un procedimiento de liofilización típico, por ejemplo, la misma solución en viales separados puede producir nucleación estocástica a lo largo de un intervalo amplio de temperaturas, y como resultado, los productos liofilizados finales pueden tener una variabilidad significativa en propiedades críticas tales como la humedad residual, actividad y tiempo de reconstitución. Mediante el control de la temperatura de nucleación mediante el procedimiento presente descrito, la uniformidad de un vial a otro de las propiedades del producto de un procedimiento liofilización, pueden mejorar notablemente.

La capacidad para controlar el comportamiento de nucleación de un material también puede proporcionar un beneficio sustancial en la reducción del tiempo necesario para desarrollar un procedimiento industrial que depende de un suceso de nucleación normalmente no controlado. Por ejemplo, a menudo se tarda muchos meses en desarrollar un ciclo de liofilización satisfactorio que se pueda llevar a cabo en un tiempo razonable, que produzca las propiedades de producto deseadas dentro de la uniformidad especificada, y conserve suficiente actividad del ingrediente farmacéutico activo (API). Al proporcionar un medio de control de la nucleación y por lo tanto mejorar potencialmente el tiempo de secado primario, la uniformidad del producto y la actividad del API, los métodos presentes deberían reducir notablemente el tiempo necesario para desarrollar protocolos de liofilización satisfactorios.

- En particular, los potenciales beneficios del presente procedimiento de nucleación proporcionan mayor flexibilidad en la especificación de la composición de la formulación que se va a liofilizar. Puesto que la nucleación controlada puede conservar mejor el API durante la etapa de congelación, los usuarios deberían poder minimizar la adición de constituyentes atenuantes (p. ej., agentes estabilizantes) en la formulación o elegir combinaciones más sencillas de constituyentes de la formulación para lograr los objetivos combinados de estabilidad y procesamiento. Pueden aparecer beneficios sinérgicos en casos donde la nucleación controlada minimiza el uso de agentes estabilizantes u otros constituyentes atenuantes que prolongan inherentemente los tiempos de secado primario (p. ej., disminuyendo las temperaturas de transición vítrea de soluciones acuosas).
- Los métodos descritos son particularmente adecuados para la producción a gran escala u operaciones de fabricación, ya que se puede llevar a cabo usando el mismo equipamiento y los parámetros del procedimiento se pueden cambiar de escala fácilmente o adaptar a la fabricación de una amplia variedad de productos. El procedimiento proporciona la nucleación de materiales usando un procedimiento donde todas las manipulaciones se pueden llevar a cabo en una sola cámara (p. ej., un liofilizador) y donde el procedimiento no requiere el uso de vacío, uso de aditivos, vibración, electrocongelación o similares, para inducir la nucleación.
- A diferencia de la técnica anterior, el método presente no añade nada al producto liofilizado. Solo requiere que los materiales (p. ej., líquidos en los viales) se mantengan inicialmente a una presión especificada en un entorno gaseoso y que la presión se reduzca rápidamente a una presión menor. Cualquier gas aplicado se eliminará de los viales durante el ciclo de liofilización. Los viales o sus contenidos no se ponen en contacto o tocan nada excepto el gas. La manipulación sencilla de la presión ambiente y el entorno gaseoso es suficiente para lograr este objetivo. Basándose solo en el cambio de presión ambiente para inducir la nucleación, el presente método descrito en la presente memoria afecta de forma uniforme y simultánea a todos los viales dentro de un liofilizador.
- La presente realización también es más barata y más fácil de implementar y mantener que los métodos de la técnica anterior para influir en la nucleación de materiales en aplicaciones de liofilización. El método presente permite el secado primario significativamente más rápido en procedimientos de liofilización, reduciendo de esta forma los costes del procedimiento para productos farmacéuticos liofilizados. El método presente produce productos liofilizados mucho más uniformes que los métodos de la técnica anterior, reduciendo de esta forma las pérdidas de producto y creando barreras para la entrada para procesadores que no pueden cumplir especificaciones de uniformidad más estrictas. Este método logra estos beneficios sin contaminar el producto liofilizado. Un mayor control del procedimiento conduciría a un producto mejorado y tiempos de proceso más cortos.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de inducción de nucleación de una transición de fase en una solución de base acuosa que comprende las etapas de:
- llevar la solución de base acuosa a una temperatura cerca o inferior a una temperatura de transición de fase; y
- 5 disminuir la presión cercana de la solución de base acuosa para inducir la nucleación de la transición de fase en la solución de base acuosa;
- caracterizado porque la solución de base acuosa se enfría a una temperatura en el intervalo de 3°C por debajo de la temperatura de transición de fase a 20°C por debajo de la temperatura de transición de fase antes de la despresurización.
- 10 2.- El método de la reivindicación 1, que además comprende la etapa de continuar el enfriamiento de la solución de base acuosa nucleada después de despresurización a o por debajo de una temperatura final que asegure la transición de fase completa de la solución de base acuosa.
- 3.- El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la temperatura de transición de fase es el punto de congelación termodinámico de la solución.
- 15 4.- El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la solución de base acuosa comprende una o más sustancias disueltas y la temperatura de transición de fase es una temperatura de saturación a la que una sustancia disuelta precipitará o cristalizará en la solución.
- 5.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la etapa de presurizar la atmósfera que rodea la solución de base acuosa.
- 20 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la presión se disminuye en una cantidad mayor que 48,3 kPa (7 psi).
- 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la presión se disminuye de modo que la relación de presiones absolutas, P_i/P_f , es 1,2 o mayor.
- 8.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la presión se disminuye a una velocidad de disminución de la presión, $\Delta P/\Delta t$, mayor que 1,38 kPa (0,2 psi) por segundo.
- 25 9.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la presión disminuye en 40 segundos o menos.
- 10.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la solución de base acuosa contiene un componente que comprende virus vivos o atenuados; ácidos nucleicos; anticuerpos monoclonales o policlonales; biomoléculas; análogos no peptídicos; péptidos; y proteínas.
- 30 11.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la despresurización se inicia cuando la solución de base acuosa alcanza una temperatura de nucleación deseada.
- 12.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la despresurización se inicia un tiempo deseado después de iniciar la etapa de enfriamiento y cuando la temperatura de la solución de base acuosa está por
- 35 debajo de la temperatura de transición de fase.

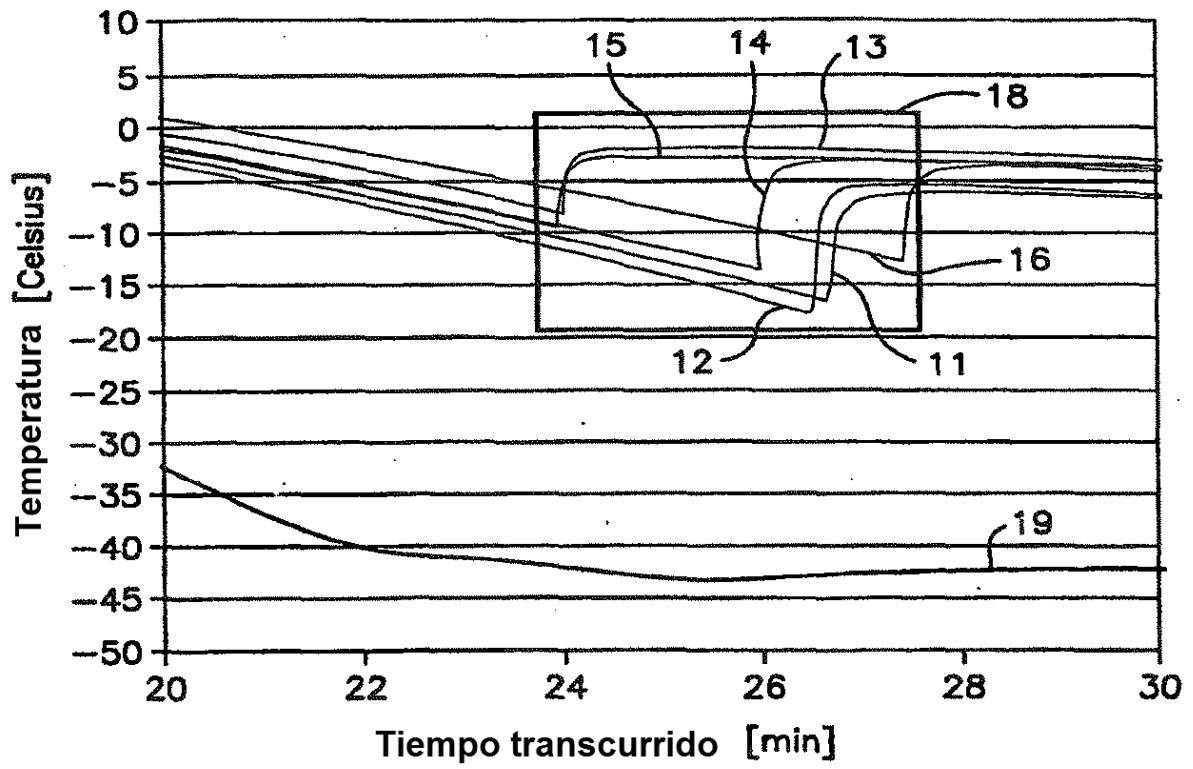


FIG. 1

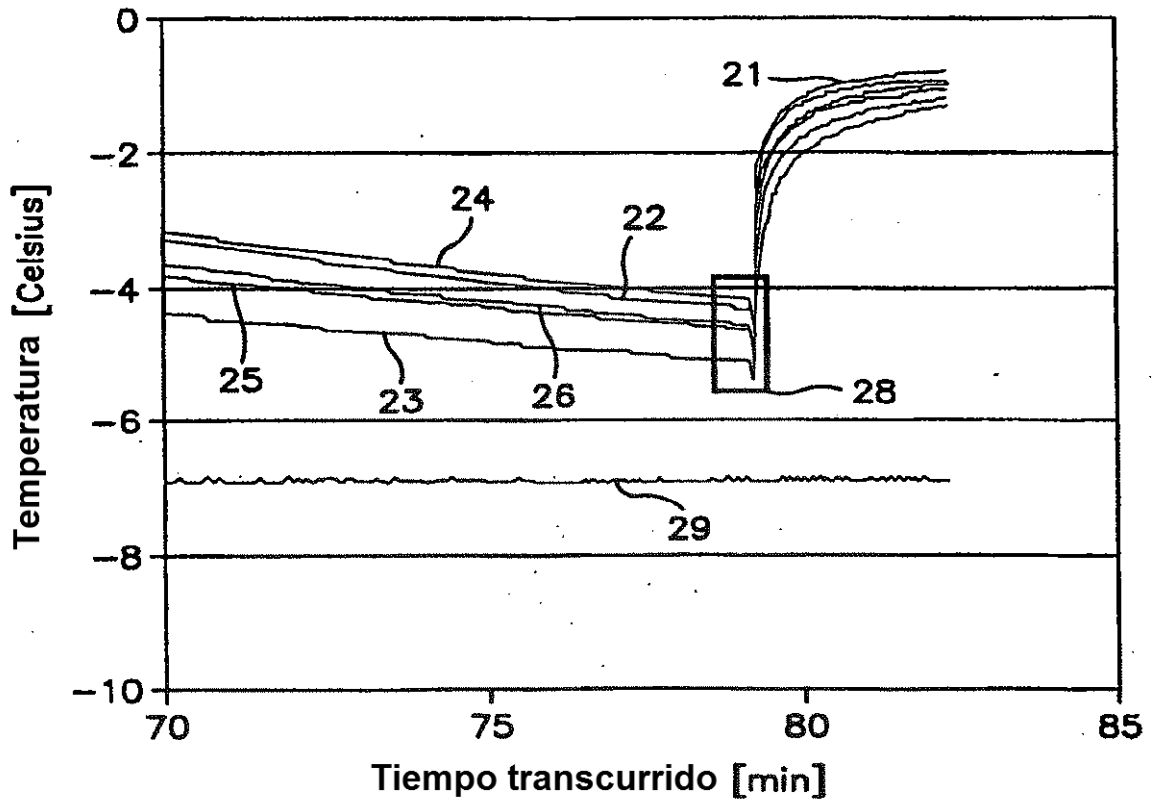


FIG. 2

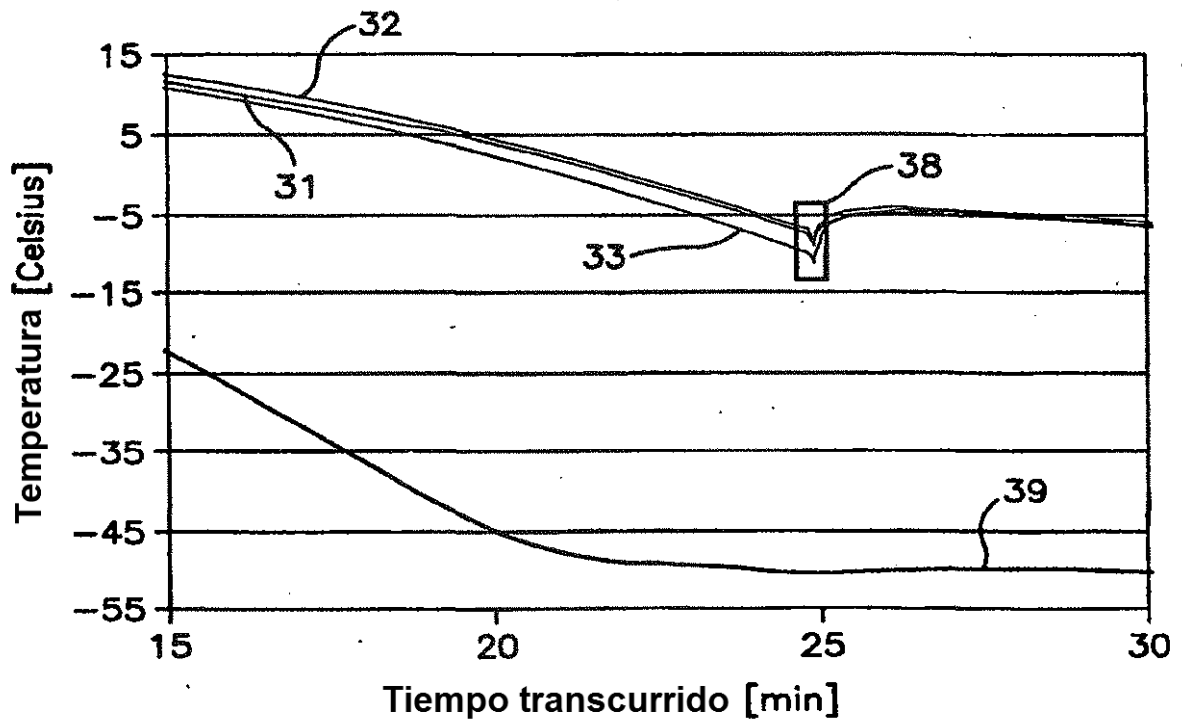


FIG. 3