

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 501**

51 Int. Cl.:

F26B 5/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2007 PCT/US2007/003281**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2007 WO07095033**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2007 E 07750149 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 1982132**

54 Título: **Método de liofilización**

30 Prioridad:

10.02.2006 US 771868 P
05.02.2007 US 702479

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2017

73 Titular/es:

SP INDUSTRIES, INC. (100.0%)
935 Mearns Road
Warminster, PA 18974-2811, US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 602 501 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 liofilización

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un proceso de liofilización, y más particularmente, a un método para inducir la nucleación de congelar un material en el que el material se enfría inicialmente a una temperatura por debajo de una temperatura de transición de fase y posteriormente se despresuriza con el fin de inducir la nucleación de la congelación en el material.

Antecedentes de la Invención

10 El control del proceso de nucleación, generalmente aleatorio, en la etapa de congelación de un proceso de liofilización o secado por congelación para disminuir tanto el tiempo de procesamiento necesario para completar el secado por congelación como para aumentar la uniformidad del producto a partir de un vial a otro en el producto acabado sería muy deseable en la técnica. En un proceso de secado por congelación farmacéutico típico, múltiples viales que contienen una disolución acuosa común son colocados en estantes que son enfriados, por lo general a una tasa controlada, a bajas temperaturas. La disolución acuosa en cada uno de los viales se enfría por debajo de la temperatura de congelación termodinámica de la disolución y permanece en un estado líquido meta-estable sub-enfriado hasta que se produzca la nucleación.

15 El intervalo de temperaturas de nucleación a través de los viales se distribuye aleatoriamente entre una temperatura próxima a la temperatura de congelación termodinámica y un valor significativamente (p. ej., hasta aproximadamente 30°C) inferior a la temperatura de congelación termodinámica. Esta distribución de las temperaturas de nucleación provoca una variación de un vial a otro en la estructura de los cristales de hielo y en última instancia de las propiedades físicas del producto liofilizado. Además de ello, la etapa de secado del proceso de secado por congelación debe ser excesivamente larga para dar cabida a la gama de tamaños de los cristales de hielo y estructuras producidas por el fenómeno de la nucleación estocástico natural.

20 Se han utilizado aditivos para aumentar la temperatura de nucleación de disoluciones sub-enfriadas. Estos aditivos pueden adoptar muchas formas. Es bien conocido que determinadas bacterias (p. ej., *Pseudomonas syringae*) sintetizan proteínas que ayudan a nuclear la formación de hielo en disoluciones acuosas sub-enfriadas. Cualquiera de las bacterias o sus proteínas aisladas se pueden añadir a las disoluciones para aumentar la temperatura de nucleación. Varios aditivos inorgánicos también muestran un efecto de nucleación; el aditivo más común de este tipo es el yoduro de plata, AgI. En general, cualquier aditivo o contaminante tiene el potencial de servir como un agente de nucleación. Viales de liofilización preparados en entornos que contienen altos niveles de materiales en partículas se nuclearán y congelarán generalmente en un menor grado de sub-enfriamiento que los viales preparados en entornos de bajos niveles de materiales en partículas.

25 Todos los agentes de nucleación descritos anteriormente se marcan como "aditivos", porque cambian la composición del medio en el que nuclean una transición de fase. Estos aditivos no son típicamente aceptables para productos farmacéuticos secados por congelación regulados y aprobados por la FDA. Estos aditivos tampoco proporcionan control sobre el tiempo y la temperatura cuando se nuclean los viales y se congelan. Más bien, los aditivos sólo actúan para aumentar la temperatura media de nucleación de los viales.

30 Los cristales de hielo pueden actuar por sí mismos como agentes nucleantes para la formación de hielo en disoluciones acuosas sub-enfriadas. En el método de "niebla de hielo", un liofilizador húmedo se llena con un gas frío para producir una suspensión de vapor de pequeñas partículas de hielo. Las partículas de hielo son transportadas a los viales e inician la nucleación cuando entran en contacto con la interfaz de fluido.

35 El método de "niebla de hielo" no controla la nucleación de múltiples viales simultáneamente en un tiempo y temperatura controlados. En otras palabras, el evento de nucleación no se produce al mismo tiempo o instantáneamente dentro de todos los viales después de la introducción del vapor frío en el liofilizador. Los cristales de hielo necesitarán un cierto tiempo para introducirse en cada uno de los viales para iniciar la nucleación, y los tiempos de transporte son probablemente diferentes para viales en diferentes lugares dentro del liofilizador. Para liofilizadores a escala industrial, la implementación del método de "niebla de hielo" requeriría cambios en el diseño

del sistema, ya que se requieren dispositivos de convección internos para ayudar a una distribución más uniforme de la "niebla de hielo" a lo largo de todo el liofilizador. Cuando los estantes de liofilizadores son enfriados continuamente, la diferencia de tiempo entre cuando se congela el primer vial y se congela el último vial creará una diferencia de temperatura entre los viales, lo que aumentará la no uniformidad de un vial a otro en productos liofilizados.

El pre-tratamiento del vial por rayadura, rascado o corrugación también se ha utilizado para reducir el grado de sub-enfriamiento requerido para la nucleación. Al igual que con los otros métodos de la técnica anterior, el tratamiento previo vial también no imparte grado de control alguno sobre el tiempo y la temperatura, cuando los viales individuales se nuclean y congelan, sino que sólo aumenta la temperatura media de nucleación de todos los viales.

La vibración también se ha utilizado para nuclear una transición de fase en un material meta-estable. Una vibración suficiente para inducir la nucleación se produce a frecuencias superiores a 10 kHz y puede producirse utilizando una diversidad de equipos. A menudo, las vibraciones en este intervalo de frecuencias se denominan "ultrasónicas", aunque las frecuencias en el intervalo de 10 kHz a 20 kHz están típicamente dentro del intervalo audible de los seres humanos. La vibración ultrasónica produce a menudo una cavitación, o la formación de pequeñas burbujas de gas, en una disolución sub-enfriada. En el régimen de cavitación transitoria o de inercia, las burbujas de gas rápidamente crecen y se colapsan, provocando fluctuaciones de muy alta presión y temperatura localizadas. La capacidad de la vibración ultrasónica para inducir la nucleación en un material meta-estable se atribuye a menudo a las perturbaciones provocadas por la cavitación transitoria. El otro régimen de cavitación, denominado estable o no inercial, se caracteriza por burbujas que exhiben oscilaciones de volumen o forma estables sin colapsarse. La solicitud de patente de EE.UU. 20020031577 A1 describe que la vibración ultrasónica puede inducir la nucleación, incluso en el régimen de cavitación estable, pero no se ofrece explicación alguna del fenómeno. La solicitud de patente GB 2400901A también describe que la probabilidad de provocar cavitación y, por lo tanto, nucleación, en una disolución utilizando vibraciones con frecuencias superiores a 10 kHz puede aumentarse mediante la reducción de la presión ambiente en torno a la disolución o la disolución de un fluido volátil en la disolución.

También se ha utilizado en el pasado un método de electrocongelación para inducir la nucleación en líquidos sub-enfriados. La electrocongelación se logra generalmente suministrando campos eléctricos relativamente altos (~ 1 V/nm) de una manera continua o pulsada entre los electrodos espaciados estrechamente sumergidos en una disolución líquida o sub-enfriada. Los inconvenientes asociados con un proceso de electrocongelación en aplicaciones típicas de liofilización incluyen la relativa complejidad y el coste de implementación y mantenimiento, particularmente para aplicaciones de liofilización utilizando múltiples viales o recipientes. La electrocongelación tampoco se puede aplicar directamente a disoluciones que contienen especies iónicas (p. ej., NaCl). Recientemente, existen estudios que examinan el concepto de 'congelación de la superficie inducida por vacío' (Véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N° 6.684.524). En una 'congelación de la superficie inducida por vacío' de este tipo, los viales que contienen una disolución acuosa se carga en un estante de temperatura controlada en un liofilizador y se mantienen inicialmente en aproximadamente 10 grados Celsius. Se hace luego un vacío en la cámara de secado por congelación a una presión próxima al vacío (p. ej., 1 mbar) que provoca la congelación superficial de las disoluciones acuosas a profundidades de unos pocos milímetros. La subsiguiente liberación de vacío y la disminución de la temperatura del estante por debajo del punto de congelación de la disolución permiten el crecimiento de cristales de hielo de la capa de la superficie pre-congelada a través del resto de la disolución. Un inconveniente importante para la implementación de este proceso de 'congelación de la superficie inducida por vacío' en una aplicación de liofilización típica es el alto riesgo de la ebullición violenta o la desgasificación de la disolución bajo condiciones establecidas.

Un control mejorado del proceso de nucleación puede permitir que se produzca la congelación de todos los viales de disolución farmacéutica no congelados en un liofilizador dentro de un intervalo de temperaturas y tiempos más estrecho, proporcionando de ese modo un producto liofilizado con una mayor uniformidad de un vial a otro. El control de la temperatura mínima de nucleación puede afectar a la estructura del cristal de hielo formado dentro del vial y permitir un proceso de secado por congelación muy acelerado.

Por lo tanto, existe la necesidad de controlar el proceso aleatorio de la nucleación en diversos procesos de congelación, incluyendo la etapa de congelación de un proceso de secado por congelación o liofilización tanto para reducir el tiempo de procesamiento necesario para completar el secado por congelación y mejorar la uniformidad del producto de un vial a otro en el producto acabado. Por tanto, sería deseable proporcionar un proceso que posea algunas, o preferiblemente todas las características anteriores.

Sumario de la Invención

La presente invención es un método de liofilizar un material tal como se define en la reivindicación 1.

Breve Descripción de los Dibujos

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

- 5 La Fig. 1 es un gráfico que representa la temperatura en función del tiempo de una disolución que se somete a un proceso de congelación estocástico y que muestra además el intervalo de temperaturas de nucleación de la disolución;
- 10 la Fig.2 es un gráfico que representa la temperatura en función del tiempo de una disolución que se somete a un proceso de congelación equilibrado con nucleación despresurizada de acuerdo con los presentes métodos;
- 15 la Fig. 3 es un gráfico que representa la temperatura en función del tiempo de una disolución que se somete a un proceso de congelación dinámica con nucleación despresurizada de acuerdo con los presentes métodos; y
- la Fig. 4 es una representación esquemática de un sistema de liofilización de acuerdo con la presente invención.

Descripción Detallada de la Invención

20 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 disolución), a menudo asociado con la congelación de una disolución, comienza con un evento de nucleación seguido del crecimiento del cristal.

25 En el proceso de cristalización, la nucleación es la etapa en la que moléculas seleccionadas dispersadas en la disolución u otro material comienzan a reunirse para crear racimos a escala nanométrica para volverse estables bajo las actuales condiciones de funcionamiento. Estos racimos estables constituyen los núcleos. Los racimos necesitan para alcanzar un tamaño crítico con el fin de convertirse en núcleos estables. Este tamaño crítico viene generalmente dictaminado por las condiciones de funcionamiento tales como la temperatura, los contaminantes, el grado de sobresaturación, etc., y puede variar de una muestra de la disolución a otra. Es durante el evento de nucleación que los átomos en la disolución se disponen de una manera definida y periódica que define la estructura cristalina.

30 El crecimiento de cristales es el crecimiento subsiguiente de los núcleos que lograron alcanzar el tamaño crítico del racimo. Dependiendo de las condiciones, la nucleación o el crecimiento de los cristales puede predominar sobre el otro, y como resultado, se obtienen cristales con diferentes tamaños y formas. El control del tamaño y la forma de los cristales constituye uno de los principales retos en la fabricación industrial tal como para productos farmacéuticos.

35 El presente método se refiere a un proceso para controlar el tiempo y/o la temperatura a la que se produce una transición de fase nucleada en un material. En las aplicaciones de congelación, la probabilidad de que un material se nuclee de forma espontánea y comience a cambiar de fase está relacionada con el grado de sub-enfriamiento del material y la ausencia o presencia de contaminantes, aditivos, estructuras o perturbaciones que proporcionan un sitio o superficie para la nucleación.

40 La etapa de congelación o de solidificación es particularmente importante en el proceso de secado por congelación, en donde las técnicas existentes dan lugar a diferencias de temperatura de nucleación a través de una multitud de viales o recipientes. Las diferencias de la temperatura de nucleación tienden a proporcionar un producto no uniforme y un tiempo de secado excesivamente largo. Los actuales métodos, por otro lado, proporcionan un mayor grado de control del proceso en procesos de solidificación por lotes (p. ej., secado por congelación) y proporcionan un producto con estructura y propiedades más uniformes. A diferencia de algunas de las técnicas de la técnica anterior para inducir la nucleación, los presentes métodos requieren un equipo mínimo y cambios operacionales de implementación.

45 En principio, los presentes métodos se pueden aplicar a cualquier etapa de procesamiento del material que implica una transición de fase nucleada. Ejemplos de tales procesos incluyen la congelación de un líquido, la cristalización de hielo de una disolución acuosa, la cristalización de los polímeros y metales a partir de masas fundidas, la

5 cristalización de materiales inorgánicos a partir de disoluciones sobresaturadas, la cristalización de proteínas, la producción de nieve artificial, la deposición de hielo a partir de vapor, la congelación de alimentos, la concentración por congelación, la cristalización fraccionada, la crioconservación, o la condensación de los vapores a líquidos. Desde un punto de vista conceptual, los presentes métodos también pueden aplicarse a transiciones de fases tales como fusión y ebullición.

10 El método descrito en esta memoria representa una mejora a los procesos de liofilización farmacéuticos actuales. Por ejemplo, dentro de un gran liofilizador industrial puede haber más de 100000 viales que contienen un producto farmacéutico que debe ser congelado y secado. La práctica actual en la industria es enfriar la disolución a un grado muy alto, de manera que se garantice que la disolución en todos los viales o recipientes en el liofilizador se congele. El contenido de cada uno de los viales o recipientes, sin embargo, se congela al azar a lo largo de un intervalo de temperaturas por debajo del punto de congelación, debido a que el proceso de nucleación es incontrolado.

15 Volviendo ahora a las Figuras, y en particular a la Fig. 1, en ella se representa un gráfico de temperatura en función del tiempo de seis viales de una disolución acuosa que se somete a un proceso de nucleación estocástico convencional que muestra el intervalo típico de temperaturas de nucleación de la disolución dentro de los viales (11,12,13,14,15 y 16). Como se ve en ella, los contenidos de los viales tienen una temperatura de congelación termodinámica de aproximadamente 0°C, pero la disolución dentro de cada uno de los viales vial nuclea de forma natural en el amplio intervalo de temperaturas de aproximadamente -7°C a -20°C o más, tal como se destaca en la zona 18. El gráfico 19 representa la temperatura del estante dentro de la cámara de secado por congelación.

20 A la inversa, la Fig. 2 y la Fig. 3 representan gráficos de temperatura en función del tiempo de una disolución sometida a un proceso de congelación con nucleación despresurizada de acuerdo con los presentes métodos. En particular, la Fig. 2 muestra el gráfico de temperatura en función del tiempo de seis viales de una disolución acuosa sometida a un proceso de enfriamiento equilibrado (Véase el Ejemplo 2) con nucleación inducida a través de la despresurización de la cámara (21, 22, 23, 24, 25 y 26). El contenido del vial tiene una temperatura de congelación termodinámica de aproximadamente 0°C, sin embargo la disolución dentro de cada uno de los viales se nuclea al mismo tiempo tras la despresurización y dentro de un intervalo de temperaturas muy estrecho (es decir, -4°C a -5°C) tal como se ve en la zona 28. El gráfico 29 representa la temperatura del estante dentro de la cámara de secado por congelación y representa un proceso de congelación equilibrada, uno en el que la temperatura de los estantes se mantiene más o menos constante antes de la despresurización.

30 De manera similar, la Fig. 3 muestra el gráfico de temperatura en función del tiempo de tres viales de una disolución acuosa sometida a un proceso de enfriamiento dinámico (Véase el Ejemplo 7) con la nucleación inducida a través de la despresurización de la cámara (31,32 y 33). Una vez más, el contenido del vial tiene una temperatura de congelación termodinámica de aproximadamente 0°C, sin embargo la disolución dentro de cada uno de los viales se nuclea al mismo tiempo tras la despresurización a un intervalo de temperaturas de aproximadamente -7°C a -10°C tal como se ve en la zona 38. El gráfico 39 representa la temperatura del estante dentro de la cámara de secado por congelación y, en general, representa un proceso de enfriamiento dinámico, en el que la temperatura de los estantes se reduce activamente durante o antes de la despresurización.

40 Tal como se ilustra en las Figuras, los presentes métodos proporcionan un control mejorado del proceso de nucleación al permitir que se produzca la congelación de disoluciones farmacéuticas en un liofilizador dentro de un intervalo de temperaturas más estrecho (p. ej., aproximadamente 0°C a -10°C) y/o al mismo tiempo, proporcionando de ese modo un producto liofilizado con una mayor uniformidad de vial a vial. Si bien no se ha demostrado, es previsible que el intervalo de temperaturas de nucleación inducida pueda incluso extenderse ligeramente por encima de la temperatura de transición de fase y también pueda extenderse a aproximadamente 40°C de sub-enfriamiento.

45 Otro beneficio asociado con los presentes métodos es que mediante el control de la temperatura de nucleación mínima y/o el momento preciso de la nucleación se puede afectar a la estructura de los cristales de hielo formados dentro de los viales o recipientes congelados. La estructura de los cristales de hielo es una variable que afecta el tiempo que transcurre para que el hielo se sublime. Por lo tanto, mediante el control de la estructura de los cristales de hielo es posible acelerar enormemente el proceso general de la liofilización.

50 Volviendo ahora a la Fig. 4, la unidad de liofilizador (200) ilustrada tiene diversos componentes principales más sistemas auxiliares adicionales para llevar a cabo el ciclo de liofilización. En particular, la unidad de liofilizador (200) incluye una cámara de liofilización (202) que contiene los estantes (204) adaptados para contener viales o recipientes de la disolución a liofilizar (no mostrado). La disolución a liofilizar se formula de forma especial y típicamente contiene el ingrediente activo, un sistema de disolvente y varios agentes de estabilización o de otros

soportes o aditivos farmacéuticamente aceptables. La liofilización de esta formulación tiene lugar a partir de recipientes especializados ubicados en los estantes huecos. Estos recipientes pueden incluir viales con tapones, ampollas, jeringas o, en el caso de la liofilización a granel, cuencos.

5 La unidad de liofilizador (200) ilustrada también incluye un condensador (206) que está adaptado para separar el disolvente sublimado y desorbido de la fase de vapor por condensación o congelación del mismo en forma de hielo para mantener el vacío adecuado en el interior del liofilizador. El condensador (206) puede estar internamente situado en la cámara de liofilización (202) o como una unidad externa separada en comunicación con la cámara de liofilización (202) a través de una denominada válvula de aislamiento. La unidad de liofilizador (200) también incluye preferiblemente una bomba de vacío (208) acoplada operativamente al condensador (206) y adaptada para hacer un vacío en la cámara de liofilización (202) y el condensador (206).
10

El sistema de refrigeración criogénico (210) proporciona medios de control de temperatura para la unidad de liofilizador (200) por enfriamiento de un fluido prescrito de transferencia de calor que se hace circular por los estantes (204) dentro de la cámara de liofilización (202) y el condensador (206). Tal como se ilustra, el sistema de refrigeración criogénico (210) comprende una fuente de material criógeno (218), tal como nitrógeno líquido, un intercambiador de calor criogénico (220) y un circuito de fluido de transferencia de calor (222), un orificio de ventilación (224), un calentador (226) y bombas (227, 228).
15

El intercambiador de calor criogénico (220) es preferiblemente un sistema de intercambio de calor criogénicos no congelante NCOOL™ disponible de Praxair, Inc. Un aspecto importante del intercambiador de calor criogénico (220) es la vaporización del nitrógeno líquido en el o dentro del intercambiador de calor, sin embargo de una manera que evita el contacto directo del nitrógeno líquido sobre las superficies expuestas al fluido de transferencia de calor. Detalles de la estructura y el funcionamiento de un intercambiador de calor de este tipo se pueden encontrar en la Patente de EE.UU N° 5.937.656 (Cheng et al.), cuya descripción se incorpora como referencia en esta memoria.
20

El circuito de fluido de transferencia de calor (222) prescrito está adaptado para hacer circular un fluido de transferencia de calor y está acoplado operativamente tanto a la cámara de liofilización (202) como al condensador (206). Más específicamente, el fluido de transferencia de calor circula por el interior de los estantes huecos (204) dentro de la cámara de liofilización (202) para comunicar con precisión el enfriamiento o el calentamiento a través de los estantes (204) a la disolución según sea necesario. Además, el fluido de transferencia de calor prescrito también fluye a través del condensador (206) para proporcionar los medios de enfriamiento necesarios para sublimar el hielo y desorber aún más el disolvente.
25

La bomba (227) y el calentador (226) están dispuestos a lo largo del circuito de fluido de transferencia de calor (222) aguas arriba de la cámara de liofilización (202) y aguas abajo del intercambiador de calor criogénico (220). La bomba (227) está dimensionada para mover el fluido de transferencia de calor a través del circuito de transferencia de calor (222) a los caudales requeridos. El calentador (226) es preferiblemente un calentador eléctrico adaptado para proporcionar calor suplementario al fluido de transferencia de calor y a la cámara de liofilización (202) según sean necesarios durante los procesos de secado.
30
35

Tal como se ve en la realización de la Fig. 4, el condensador (206) también es enfriado por un fluido de recirculación de transferencia de calor de baja temperatura. La refrigeración del fluido de transferencia de calor que fluye a través del condensador (206) también es proporcionada por un intercambiador de calor criogénico (220). El intercambiador de calor criogénico (220) es capaz de enfriar el fluido de transferencia de calor de forma continua sin congelación. Durante las fases de secado, el intercambiador de calor criogénico (220) se fija o adapta para conseguir la temperatura más baja requerida para el condensador (206). Tal como se describió anteriormente, el intercambiador de calor criogénico (220) pre-evapora el nitrógeno líquido en un gas frío criogénico para la transferencia de calor al fluido de transferencia de calor. A través de la pre-evaporación del nitrógeno líquido se asegura que el nitrógeno líquido evite la separación por ebullición directamente sobre una superficie de intercambio de calor en donde se dispone el fluido de transferencia de calor en el otro lado. Una disposición de este tipo evita la congelación del intercambiador de calor criogénico (220), puesto que el nitrógeno líquido hierve a aproximadamente -195 grados centígrados a la presión atmosférica.
40
45

La realización ilustrada de la Fig. 4 también incluye medios para controlar la atmósfera de gas de la cámara de liofilización (250) y, en particular, la composición del gas y la presión dentro de la cámara (202). El control de la presión de la cámara (202) permite la presurización y la despresurización rápida de la cámara para inducir la nucleación de la disolución. La realización descrita utiliza preferiblemente una o más válvulas de control de flujo (252) adaptadas de forma controlable para facilitar la introducción de una atmósfera de gas a presión en la cámara
50

(202) de una fuente de gas (no mostrada) y para despresurizar la cámara ventilando la atmósfera del gas a presión lejos de la cámara (202) de una manera controlada y preferiblemente rápida, induciendo de este modo la nucleación de la disolución en los diversos recipientes o viales.

5 Aunque no se muestra, la unidad de liofilizador (200) también incluye diversos sistemas de hardware y software de control adaptados para ordenar y coordinar las diversas partes del equipo de liofilización, y llevar a cabo el ciclo de liofilización pre-programado. Los diversos sistemas de hardware y software de control también pueden proporcionar documentación, registro de datos, alarmas, al igual que las capacidades de seguridad del sistema. Además, sistemas auxiliares para la unidad de liofilizador (200) pueden incluir diversos subsistemas para limpiar y esterilizar la cámara de liofilización (202), auto-cargar y descargar el producto en la cámara de liofilización (202); y accesorios del sistema criogénicos asociados tales como patines de refrigeración, tanques de nitrógeno líquido, tuberías, válvulas, sensores, etc.

15 En un sentido amplio, los métodos descritos en esta memoria para inducir la nucleación de una transición de fase dentro de un material comprenden las etapas de: (i) enfriar el material a una temperatura cerca o por debajo de una temperatura de transición de fase del material; y (ii) disminuir rápidamente la presión para inducir la nucleación de una transición de fase en el material. Cada una de estas etapas importantes se discutirá con más detalle más adelante.

ETAPA 1 – ENFRIAMIENTO DEL MATERIAL

20 Materiales ilustrativos útiles en el presente método incluyen sustancias puras, gases, suspensiones, geles, líquidos, disoluciones, mezclas o componentes dentro de una disolución o mezcla. Materiales adecuados para uso en el presente método puede incluir, por ejemplo, materiales farmacéuticos, materiales biofarmacéuticos, productos alimenticios, materiales químicos, y pueden incluir productos tales como productos para el cuidado de heridas, cosméticos, productos veterinarios y productos relacionados con agentes de diagnóstico in vivo/in vitro y similares. Cuando el material es un líquido, puede ser deseable disolver los gases en el líquido. Los líquidos en un entorno de gas controlado tendrán, por lo general, gases disueltos en ellos.

25 Otros materiales ilustrativos útiles en el presente método incluyen material biológico o biofarmacéutico tales como tejidos, órganos y estructuras multicelulares. Para determinadas aplicaciones biológicas y farmacéuticas, el material puede ser una disolución o mezcla que incluye: virus vivos o atenuados; 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, ADN y subclases de los mismos; oligonucleótidos; partículas virales; y materiales o componentes de los mismos similares de este tipo.

35 Disoluciones farmacéuticas o biofarmacéuticas contenidas en viales o recipientes para el secado por congelación serían un buen ejemplo de un material que se beneficiaría del presente método. Las disoluciones son principalmente de agua y son sustancialmente incompresibles. Tales disoluciones farmacéuticas o biofarmacéuticas son también altamente puras y generalmente están libres de materiales en partículas que pueden formar sitios para la nucleación. Una temperatura de nucleación uniforme es importante para crear una estructura de cristal de hielo consistente y uniforme de un vial al otro o de un recipiente a otro. La estructura de cristal de hielo desarrollaba también afecta en gran medida al tiempo necesario para el secado.

40 Tal como se aplica a un proceso de secado por congelación, el material se coloca preferiblemente en una cámara tal como una cámara de secado por congelación. Preferiblemente, la cámara está configurada de manera que permita el control de la temperatura, presión y atmósfera de gas dentro de la cámara. La atmósfera de gas 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 de gas preferida comprende un gas inerte tal como argón, a una presión entre 149,6 a 446,0 kPa (7-50 psig) o más. Las temperaturas dentro de la cámara del liofilizador a menudo vienen dictaminadas por el proceso de secado por congelación y se controlan fácilmente mediante el uso de un fluido de transferencia de calor que enfría o calienta los estantes dentro de la cámara para conducir la temperatura de los viales o recipientes y el material dentro de cada uno de los viales o recipientes.

50 De acuerdo con los presentes métodos, el material se enfría a una temperatura próxima a o por debajo de su temperatura de transición de fase. En el caso de una disolución de base acuosa que se somete a un proceso de secado por congelación, la temperatura de transición de fase es el punto de congelación termodinámica de la

disolución. En los casos en los que la disolución alcanza temperaturas por debajo del punto de congelación termodinámico de la disolución, se dice que está sub-enfriado. Cuando se aplica a un proceso de congelación de una disolución de base acuosa, el presente método es eficaz cuando el grado de sub-enfriamiento oscila desde cerca a o por debajo de la temperatura de transición de fase hasta aproximadamente 40°C de sub-enfriamiento, y más preferiblemente entre aproximadamente 3°C de sub-enfriamiento y 10°C de sub-enfriamiento. En algunos de los ejemplos descritos más adelante, el presente método de inducir la nucleación funciona deseablemente incluso en los casos en los que la disolución tiene sólo aproximadamente 1°C de sub-enfriamiento por debajo de su punto de congelación termodinámico.

En los casos en los que el material está a una temperatura por debajo de su temperatura de transición de fase, se alude a menudo como estando en un estado metaestable. Un estado metaestable es un estado inestable y transitorio, pero de vida relativamente larga, 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 cualesquiera cambios en el material o en su entorno, un material metaestable pasará finalmente de su estado de no equilibrio a su estado de equilibrio. Materiales metaestables ilustrativos incluyen disoluciones súper-saturadas y líquidos sub-enfriados.

Un ejemplo típico de un material metaestable sería el agua líquida a presión atmosférica y 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 evento o estructura de nucleación para comenzar el proceso de cristalización del hielo. Agua extremadamente pura se puede enfriar a temperaturas muy bajas (-30°C a -40°C) a presión atmosférica y todavía puede permanecer en el estado líquido. Un agua sub-enfriada de este tipo se encuentra en un estado de no-equilibrio termodinámicamente metaestable. Sólo falta un evento de nucleación para hacer que comience la transición de fase mediante el cual se volverá al equilibrio.

Tal como se comentó anteriormente, los métodos actuales de inducir la nucleación de una transición de fase dentro de un material o la congelación de un material pueden utilizarse con diferentes perfiles de refrigeración, incluyendo, por ejemplo, un entorno de refrigeración equilibrada o un entorno de refrigeración dinámico (Véanse las Figs. 2 y 3).

ETAPA 2 – DISMINUIR RAPIDAMENTE LA PRESIÓN

Cuando el material ha alcanzado la temperatura deseada cerca o por debajo de la temperatura de transición de fase, la cámara es apresurada o rápidamente despresurizada. Esta despresurización dispara la nucleación y la transición de fase de la disolución dentro de los viales o recipientes. En la realización preferida, la despresurización de la cámara se logra mediante la apertura o la apertura parcial de una válvula de control grande que separa la cámara de alta presión, ya sea del entorno ambiental o de una cámara o entorno de presión inferior. La presión elevada es reducida rápidamente por el flujo de masa de la atmósfera gaseosa fuera de la cámara. La despresurización necesita ser bastante rápida para inducir la nucleación. La despresurización debería terminarse en varios segundos o menos, preferentemente 40 segundos o menos, más preferiblemente 20 segundos o menos, y lo más preferiblemente 10 segundos o menos.

En aplicaciones de secado por congelación típicas, la diferencia de presión entre la presión de la cámara inicial y la presión de la cámara final, después de la despresurización, debe ser mayor que aproximadamente 48,3 kPa (7 psi), a pesar de que caídas de presión más pequeñas pueden inducir la nucleación en algunas situaciones. La mayoría de los liofilizadores comerciales pueden acomodar fácilmente el intervalo de caídas de presión necesarias para controlar la nucleación. Muchos liofilizadores están diseñados con capacidades de presión de más de 273,7 kPa (25 psig) para soportar procedimientos de esterilización convencionales empleando vapor de agua saturado a 121°C. Tales capacidades de los equipos proporcionan una amplia ventana para inducir la nucleación siguiendo protocolos que se despresurizan desde presiones de partida por encima de la presión ambiente o la presión en el entorno ambiente circundante inmediato. La presión elevada y la subsiguiente despresurización se pueden lograr a través de cualquier medio conocido (p. ej. neumático, hidráulico o mecánico). En las realizaciones preferidas, las presiones de trabajo de los presentes métodos deben permanecer por debajo de la presión súper-crítica de cualquier gas aplicado, y someter el material a bajas presiones extremas (es decir, aproximadamente 0,013 mbar (10 mTorr) o menos) deberían evitarse durante la nucleación del material.

Aunque no se desea estar ligado a ningún mecanismo particular, un posible mecanismo para explicar la nucleación controlada observado en la práctica del presente método es que los gases en disolución en el material salgan de la disolución tras la despresurización y formen burbujas que nuclean el material. Una presión elevada inicial aumenta la concentración de gas disuelto en la disolución. La rápida disminución de la presión después del enfriamiento reduce

la solubilidad del gas, y la liberación subsiguiente de gas de la disolución sub-enfriada dispara la nucleación de la transición de fase.

5 Otro posible mecanismo es que la disminución de la temperatura del gas próximo al material durante la despresurización provoca un punto frío en la superficie del material que inicia la nucleación. Otro posible mecanismo es que la despresurización provoca la evaporación de algo de líquido en el material y la refrigeración resultante del proceso de evaporación endotérmico puede iniciar la nucleación. Otro posible mecanismo es que el gas frío despresurizado próximo al material congela algo de vapor, ya sea 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 puede contribuir a la iniciación de la nucleación de la congelación o solidificación en diferentes grados, dependiendo de la naturaleza del material, de su entorno y de la transición de fase que esté siendo nucleada.

15 El proceso puede llevarse a cabo por completo 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 ser superior a la presión ambiente y la presión final de la cámara, después de la despresurización, puede estar por encima de la presión ambiente, pero es menor que la presión inicial de la cámara; la presión inicial de la cámara puede estar por encima de la presión ambiental y la presión de la cámara final, después de la despresurización, puede ser aproximadamente la presión ambiente o ligeramente por debajo de la presión ambiente.

20 También se cree que la tasa y la magnitud de la caída de presión son un aspecto importante de los presentes métodos. Los experimentos han demostrado que se inducirá la nucleación en los casos en los que la caída de presión (ΔP) sea mayor que aproximadamente 48,3 kPa (7 psi). Alternativamente, la magnitud de la caída de presión puede ser expresada como una relación de presión absoluta, $R = P_i/P_f$, en donde P_i es la presión absoluta inicial y P_f es la presión absoluta final. Se cree que la nucleación puede ser inducida tras la despresurización, en donde la relación de presión absoluta, R , es mayor que aproximadamente 1,2 en muchas aplicaciones prácticas de los presentes métodos. La tasa de caída de presión también juega un papel importante en los presentes métodos. Un método de caracterizar la tasa de caída de presión es a través del uso de un parámetro, A , en que $A = \Delta P/\Delta t$. Una vez más, se supone que se induce la nucleación para valores de A mayores que un valor prescrito, tal como aproximadamente 1,38 kPa/s (0,2 psi/s). Los datos empíricos a través de la experimentación deben ayudar a uno a determinar la caída de presión y la velocidad de caída de presión preferida.

30 Los siguientes ejemplos ilustran diversos aspectos y características de los métodos descritos en esta memoria de inducir la nucleación en un material y no han de tomarse en un sentido limitativo. Más bien, estos ejemplos son sólo ilustrativos y el alcance de la invención sólo debe determinarse con respecto a las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

35 Todos los ejemplos descritos en esta memoria se realizaron en un liofilizador VirTis 51-SRC a escala piloto que tiene cuatro estantes con aproximadamente espacio de estantería total de 1,0 m² y un condensador interno. Esta unidad fue reforzada para mantener presiones positivas de hasta aproximadamente 204,7 kPa (15 psig). Una abertura circular de un diámetro de 3,8 cm (1,5") también se añadió a la pared posterior de la cámara de secado por congelación extendiéndose un tubo de acero inoxidable de 3,8 cm (1,5") de diámetro desde el agujero a través del aislamiento de la pared posterior para salir de la parte posterior del liofilizador. Dos válvulas de bola accionadas con aire, de paso completo, de 3,8 cm (1,5 ") se fijaron a este tubo a través de accesorios sanitarios. Una válvula de bola permitió el flujo de gas hacia la cámara de secado por congelación y, con ello, proporcionó presiones positivas de hasta 204,7 kPa (15 psig). La segunda válvula de bola permitió el flujo de gas fuera de la cámara de secado por congelación y, con ello, reducir la presión de la cámara a las condiciones atmosféricas (101,3 kPa (0 psig)). Toda la refrigeración de los estantes del liofilizador y el condensador se consiguió a través de la circulación del fluido de transferencia de calor Dynalene MV enfriado con nitrógeno líquido utilizando el sistema Praxair NCool™-HX.

50 Todas las disoluciones se prepararon en una sala limpia de clase 100. El liofilizador se colocó con las puertas, los estantes y los controles de todo lo accesible desde la sala limpia, mientras que los otros componentes (bombas, calentadores, etc.) se encontraban en un entorno de sala no limpia. Todas las disoluciones se prepararon con agua de calidad HPLC (Fisher Scientific, filtrada a través de una membrana de 0,10 μm). Las disoluciones finales se filtraron a través de una membrana de 0,22 μm antes de llenar los viales o recipientes de liofilización. Todos los gases se suministraron a través de cilindros y se filtraron a través de filtros de 0,22 μm para separar los materiales en partículas. Los recipientes de vidrio (viales de 5 mL y frascos de 60 mL) se obtuvieron previamente limpiados de

materiales en partículas de Wheaton Science Products. Se utilizaron, en caso apropiado, soportes farmacéuticamente aceptables. Las etapas anteriores se realizaron para asegurar que los materiales y métodos cumplieran las normas de fabricación farmacéutica convencionales para los materiales en partículas, que actúan como agentes de nucleación.

- 5 Tal como se utiliza en esta memoria, "soporte farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, antioxidantes, sales, revestimientos, agentes tensioactivos, conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoato de metilo o propilo, ácido sórbico, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la disolución (p. ej., parafina), absorbentes (p. ej., arcilla de caolín, arcilla de bentonita), estabilizadores de fármacos (p. ej., lauril-sulfato de sodio), geles, aglutinantes (p. ej., jarabe, acacia, 10 gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona, carboxi-metil-celulosa, alginatos), excipientes (p. ej., lactosa, azúcar de la leche, polietilenglicol), agente de desintegración (p. ej., agar-agar, almidón, lactosa, fosfato de calcio, carbonato de calcio, 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., 15 aceite de almendras, aceite de coco, ésteres oleosos o propilenglicol), agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, materiales de carga (p. ej., almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol), lubricantes de formación de comprimidos (p. ej., estearato de magnesio, almidón, glucosa, lactosa, flor de arroz, greda), soportes para la inhalación (p. ej., propelentes de hidrocarburos), agentes tamponadores, o materiales de este tipo y combinaciones de los mismos, tal como será conocido por un experto ordinario en la técnica.

20 Para las condiciones experimentales descritas en esta memoria y todas las formulaciones de liofilización estudiadas, se observó que la nucleación estocástica se producía típicamente a temperaturas de los recipientes entre aproximadamente -8°C y -20°C y en ocasiones tan calientes como -5°C. Los recipientes en general podrían mantenerse a temperaturas más cálidas que -8°C durante largos períodos de tiempo sin nucleación. El inicio de la nucleación y el posterior crecimiento del cristal (es decir, la congelación) se determinó midiendo la temperatura como 25 el punto en el que la temperatura del recipiente aumentó rápidamente en respuesta al calor latente exotérmico de fusión. El inicio de la congelación también se pudo determinar visualmente a través de una mirilla en la puerta de la cámara del liofilizador.

Ejemplo 1 - Control de la Temperatura de Nucleación

30 Cuatro viales separados se llenaron con 2,5 mL de disolución de manitol al 5% en peso. El punto de congelación termodinámica predicho de la disolución de manitol al 5% en peso es de aproximadamente -0,5°C. Los cuatro viales se colocaron en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. Las temperaturas de las cuatro viales fueron controladas utilizando termopares montados en superficie. El liofilizador se presurizó con argón a 197,9 kPa (14 psig).

35 El estante del liofilizador se enfrió para obtener temperaturas del vial de entre aproximadamente - 1,3°C y aproximadamente -2,3°C (+/- 1°C precisión de medición de los termopares). A continuación, el liofilizador se despresurizó de aproximadamente 197,9 kPa (14 psig) a aproximadamente la presión atmosférica en menos de cinco segundos para inducir la nucleación de la disolución dentro de los viales. Los cuatro viales se nuclearon y comenzaron a congelarse inmediatamente después de la despresurización. Los resultados se resumen en la Tabla 1 que figura a continuación.

40 Tal como se ve en la Tabla 1, las temperaturas de nucleación controlada en este ejemplo (es decir, las Temperaturas Iniciales del Vial) son bastante próximas al punto de congelación termodinámica predicho de la disolución. Así, el presente método permite que se produzca el control de la nucleación en disoluciones que tienen un grado muy bajo de sub-enfriamiento o a temperaturas de nucleación cercanas o sólo ligeramente más frías que sus puntos de congelación.

45

Tabla 1. Control de la Temperatura de Nucleación.

Vial N°	Disolución	Atmós.	Temperatura Inicial del Vial [°C]	Caída de Presión [kPa (psi)]	Resultado de 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

5 En este ejemplo, noventa y cinco viales se llenaron con 2,5 mL de disolución de manitol al 5% en peso. El punto de congelación termodinámica de la disolución de manitol al 5% en peso es de aproximadamente -0,5°C. Los noventa y cinco viales se colocaron en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. La temperatura de seis viales colocados en diferentes lugares en el estante del liofilizador se monitorizó continuamente utilizando termopares montados en superficie. El liofilizador se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 197,9 kPa (14 psig). El estante del liofilizador se enfrió a continuación para obtener temperaturas de los viales de cerca de -5°C. A 10 continuación, el liofilizador se despresurizó de aproximadamente 197,9 kPa (14 psig) a aproximadamente la presión atmosférica en menos de cinco segundos para inducir la nucleación de la disolución dentro de los viales. Todos los noventa y cinco viales se observaron visualmente que nucleaban y empezaba la congelación inmediatamente después de la despresurización. Los datos de termopar para los seis viales monitorizados confirmaron la observación visual. Los resultados se resumen en la Tabla 2. Como se puede ver en ella, las temperaturas de 15 nucleación controlada en este ejemplo (es decir, temperaturas Iniciales del Vial) están algo por debajo del punto de congelación termodinámica predicho de la disolución. Así, el presente método permite que se produzca el control de la nucleación en disoluciones que tienen un grado moderado de sub-enfriamiento. Este ejemplo también demuestra la escalabilidad del presente método a una aplicación vial múltiple.

Tabla 2. Control de la Temperatura de Nucleación.

Vial N°	Disolución	Atmós.	Temperatura Inicial del Vial [°C]	Caída de Presión [kPa (psi)]	Resultado de 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

20 Ejemplo 3 - Control de la Magnitud de Despresurización

En este ejemplo, múltiples viales se llenaron con 2,5 mL de solución de manitol al 5% en peso. Una vez más, el punto de congelación termodinámica predicho de la disolución de manitol al 5% en peso es de aproximadamente - 0,5°C. Para cada uno de los ensayos realizados, los viales se colocaron en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. Al igual que con los ejemplos descritos anteriormente, las temperaturas de los viales se 25 monitorizaron mediante termopares montados en superficie. La atmósfera de argón en el liofilizador se presurizó a presiones diferentes y el estante del liofilizador se enfrió para obtener temperaturas de los viales de

aproximadamente -5°C. En cada uno de los ensayos realizados, el liofilizador fue luego rápidamente (es decir, en menos de cinco segundos) despresurizado de la presión seleccionada a la presión atmosférica en un esfuerzo para inducir la nucleación de la disolución dentro de los viales. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

5 Tal como se ve en la Tabla 3, la nucleación controlada se producía en los casos en los que la caída de presión era de aproximadamente 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°	Disolución	Atmós.	Temperatura Inicial del Vial [°C]	Caída de Presión [kPa (psi)]	Resultado de Despresurización
1	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-4,7	48,3 (7)	Nucleación
2	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,1	48,3 (7)	Nucleación
3	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,3	48,3 (7)	Nucleación
4	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,6	48,3 (7)	Sin nucleación
5	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,6	48,3 (7)	Nucleación
6	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,8	48,3 (7)	Nucleación
7	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,4	41,4 (6)	Sin nucleación
8	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,7	41,4 (6)	Sin nucleación
9	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,8	41,4 (6)	Sin nucleación
10	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,1	34,5 (5)	Sin nucleación
11	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,4	34,5 (5)	Sin nucleación
12	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,5	34,5 (5)	Sin nucleación
13	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-4,7	27,6 (4)	Sin nucleación
14	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,1	27,6 (4)	Sin nucleación
15	2,5 mL de manitol al 5% en peso	al Argón	-5,3	27,6 (4)	Sin nucleación

Ejemplo 4 - Control de las Tasas de Despresurización

10 Para este ejemplo, múltiples viales se llenaron con aproximadamente 2,5 mL de disolución de manitol al 5% en peso que tiene un punto de congelación termodinámica predicho de aproximadamente -0,5°C. Para cada uno de los ensayos realizados de la variación del tiempo de despresurización, los viales se colocaron en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. Al igual que con los ejemplos descritos anteriormente, las temperaturas de los viales se monitorizaron mediante termopares montados en superficie. Al igual que los ejemplos descritos anteriormente, la atmósfera de argón en el liofilizador se presurizó a aproximadamente 197,9 kPa (14 psig) y el estante se enfrió para obtener temperaturas de los viales de aproximadamente -5°C. En cada uno de los ensayos realizados, el liofilizador se despresurizó entonces a diferentes velocidades de despresurización de 197,9 kPa (14 psig) a la presión atmosférica en un esfuerzo para inducir la nucleación de la disolución dentro de los viales. Para estudiar el efecto de la tasa de despresurización o el tiempo de despresurización, una válvula de bola restrictiva fue

15

5 colocada en la salida de la válvula de control de despresurización en la parte trasera del liofilizador. Cuando la válvula de restricción está completamente abierta, la despresurización de aproximadamente 197,9 kPa (14 psig) a aproximadamente 101,3 kPa (0 psig) se consigue en aproximadamente 2,5 segundos. Solamente cerrando parcialmente la válvula de restricción, es posible aumentar de forma variable el tiempo de despresurización en la cámara. Utilizando la válvula de bola de restricción, se realizaron varias pruebas de funcionamiento con la cámara del liofilizador despresurizada a diferentes tasas para averiguar o determinar el efecto de la tasa de despresurización sobre la nucleación. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto del Tiempo de Despresurización

Vial N°	Disolución	Atmós.	Temperatura del Vial [°C]	Inicial	Caída Presión (psi)	de [kPa]	Tiempo [s]	Resultado de Despresurización	de la
1	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-4,6		96,5 (14)		300	Sin nucleación	
2	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4		96,5 (14)		300	Sin nucleación	
3	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,8		96,5 (14)		300	Sin nucleación	
4	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-4,6		96,5 (14)		200	Sin nucleación	
5	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4		96,5 (14)		200	Sin nucleación	
6	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4		96,5 (14)		200	Sin nucleación	
7	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-4,6		96,5 (14)		100	Sin nucleación	
8	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,2		96,5 (14)		100	Sin nucleación	
9	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,2		96,5 (14)		100	Sin nucleación	
10	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-4,7		96,5 (14)		60	Sin nucleación	
11	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1		96,5 (14)		60	Sin nucleación	
12	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1		96,5 (14)		60	Sin nucleación	
13	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1		96,5 (14)		50	Sin nucleación	
14	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,3		96,5 (14)		50	Sin nucleación	
15	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-4,9		96,5 (14)		50	Sin nucleación	
16	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4		96,5 (14)		42	Sin nucleación	
17	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,5		96,5 (14)		42	Sin nucleación	
18	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,0		96,5 (14)		42	Sin 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	Argón	-5,6		96,5 (14)		32	Nucleación	

ES 2 602 501 T3

Vial N°	Disolución	Atmós.	Temperatura del Vial [°C]	Inicial Caída de Presión (psi)	de [kPa] Tiempo [s]	Resultado de la Despresurización
	al 5% en peso					
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

Como se ve en la Tabla 4, la nucleación sólo se produjo en los casos en los que el tiempo de despresurización era menor que 42 segundos, la caída de presión era de aproximadamente 96,5 kPa (14 psi) 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 la despresurización necesita ser realizada de forma relativamente rápida para que el método sea eficaz.

Ejemplo 5 - Control de la Atmósfera de Gas

Una vez más, múltiples viales se llenaron cada uno con aproximadamente 2,5 mL de disolución de manitol al 5% en peso y se colocaron en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. Al igual que con los ejemplos descritos anteriormente, la temperatura de los viales de ensayo se monitorizó mediante termopares montados en superficie. Para las diferentes operaciones del ensayo, la atmósfera de gas en el liofilizador se varió manteniendo siempre una presión positiva de aproximadamente 197,9 kPa (14 psig). En este ejemplo, el estante del liofilizador se enfrió para obtener temperaturas del vial de aproximadamente -5°C a -7°C. En cada una de las operaciones del ensayo, el liofilizador se despresurizó luego rápidamente desde aproximadamente de 197,9 kPa (14 psig) a la presión atmosférica en un esfuerzo para inducir la nucleación de la disolución dentro de los viales. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Como se ve en la misma, la nucleación controlada se produjo en todas las atmósferas de gas, a excepción de la atmósfera del gas helio, en donde la caída de presión fue de 96,5 kPa (14 psi) y la temperatura de nucleación (es decir, la temperatura inicial del vial) era entre aproximadamente -4,7°C y aproximadamente -7,4°C. Aunque no se muestra en los ejemplos, se cree que las condiciones alternativas permitirán probablemente una nucleación controlada en una atmósfera de helio.

Tabla 5. Efecto de la Composición de la Atmósfera de Gas

Vial N°	Disolución	Atmós.	Temperatura del Vial [°C]	Inicial Caída 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

Vial N°	Disolución	Atmós.	Temperatura del Vial [°C]	Inicial Caída de Presión [kPa (psi)]	Resultado de la Despresurización
9	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Helio	-5,8	96,5 (14)	Sin nucleación
10	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Helio	-5,5	96,5 (14)	Sin nucleación

Ejemplo 6 - Disoluciones de Gran Volumen

5 En este ejemplo, seis frascos de liofilización (60 mL de capacidad) se llenaron con aproximadamente 30 mL de disolución de manitol al 5% en peso que tiene un punto de congelación termodinámica predicho de aproximadamente - 0,5°C. Los seis frascos de liofilización fueron colocados en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. La temperatura de los seis frascos situados en diferentes lugares en el estante del liofilizador se controló utilizando termopares montados en superficie. El liofilizador se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 197,9 kPa (14 psig). El estante del liofilizador se enfrió a continuación para obtener temperaturas de los frascos de cerca de -5°C. A continuación, el liofilizador se despresurizó de 197,9 kPa (14 psig) a aproximadamente la presión atmosférica en menos de cinco segundos para inducir la nucleación de la disolución dentro de los frascos. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

15 En un experimento separado, una bandeja de secado por congelación a granel de plástico (Gore LYOGUARD, 1800 mL de capacidad) se llenó con aproximadamente 1000 mL de disolución de manitol al 5% en peso. La bandeja se obtuvo pre-limpiada para satisfacer los bajos requisitos del material en partículas de la USP. La bandeja se colocó en un estante del liofilizador, y la temperatura de la bandeja se monitorizó mediante un termopar montado en la superficie exterior de la bandeja cerca del centro de uno de los lados. El estante del liofilizador se enfrió a continuación para obtener una temperatura de la bandeja próxima a -7°C. A continuación, el liofilizador se despresurizó de 197,9 kPa (14 psig) a aproximadamente la presión atmosférica en menos de cinco segundos para inducir la nucleación de la disolución dentro de la bandeja. Los resultados también se resumen en la Tabla 6.

20 Al igual que los ejemplos descritos anteriormente, todos los recipientes nucleados comenzaron a congelarse inmediatamente después de la despresurización. También, al igual que los ejemplos descritos anteriormente, las temperaturas de nucleación (es decir, las Temperaturas de los Recipientes) en este ejemplo se controlaron mucho para ser algo próximas a la temperatura de congelación termodinámica de la disolución. Más importante aún, este ejemplo ilustra que el presente método permite que se produzca el control de la nucleación en las disoluciones de mayor volumen y diversos formatos de recipiente. Cabe señalar que se podría esperar que la eficacia del método de despresurización mejore a medida que aumente el volumen de la formulación, porque es más probable que el evento de nucleación ocurra cuando están presentes más moléculas para agregarse y formar núcleos críticos.

Tabla 6. Efecto del Volumen de la Disolución y Tipo de Recipientes

Recipiente	Disolución	Atmós	Temperatura Recipiente [°C]	del Caída de Presión (psi)]	de Resultado de la Despresurización
Frasco 1	n° 30 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,3	96,5 (14)	Nucleación
Frasco 2	n° 30 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	96,5 (14)	Nucleación
Frasco 3	n° 30 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,9	96,5 (14)	Nucleación
Frasco 4	n° 30 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,2	96,5 (14)	Nucleación
Frasco 5	n° 30 mL de manitol al 5% en peso	Argón	-5,9	96,5 (14)	Nucleación
Frasco 6	n° 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

Ejemplo 7 - Enfriamiento Dinámico frente Enfriamiento Equilibrado

5 Los métodos actuales de control de la nucleación se pueden utilizar en diversos modos. Los Ejemplos 1-6, descritos anteriormente, demuestran cada uno el aspecto de control de la temperatura de nucleación de una disolución de liofilización que se equilibra esencialmente a una temperatura por debajo de su punto de congelación termodinámica (es decir, temperatura que cambia muy lentamente). Este ejemplo demuestra que la nucleación también se puede producir a una temperatura por debajo del punto de congelación termodinámica en un entorno de enfriamiento dinámico (es decir, la disolución está experimentando cambios rápidos de temperatura).

10 En este ejemplo, los viales 1 a 6 representan las muestras descritas anteriormente con referencia al Ejemplo 2. Además, tres viales separados (Viales 7-9) también se llenaron con 2,5 mL de disolución de manitol al 5% en peso. En una operación de ensayo separada, los tres viales adicionales fueron colocados en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. El estante del liofilizador se enfrió rápidamente hacia una temperatura final del estante de -45°C. Cuando uno de los viales alcanzado una temperatura de aproximadamente -5°C, medida por los termopares montados en superficie, el liofilizador se despresurizó rápidamente desde aproximadamente 14 psig a 0 psig en un esfuerzo para inducir la nucleación. Los tres viales se nuclearon y comenzaron a congelarse 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 Tabla 7 que figura a continuación.

Tabla 7. Resultados del Ensayo - Efecto del Enfriamiento Dinámico sobre la Nucleación

vial N°	Disolución	Modo	Temp. Nucleación [°C]	de Caída 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

20 La eficacia de los métodos actuales para el control de la nucleación en disoluciones de liofilización equilibrada en un intervalo de temperaturas determinado o siendo enfriadas dinámicamente disoluciones de liofilización, proporciona al usuario final dos modos potenciales de aplicación con diferentes beneficios y compensaciones. Al permitir que las disoluciones de liofilización se equilibren, el intervalo de temperaturas de nucleación será estrecho o se minimizará a los límites de comportamiento del propia liofilizador. La etapa de equilibrado puede requerir un tiempo extra para lograr protocolos de congelación relativos a convencionales o dinámicos, en que las temperaturas de la cámara y de los viales se dejan caer a menos de aproximadamente - 40°C en un solo paso. Sin embargo, el empleo de la etapa de equilibrado debería proporcionar una uniformidad nucleación más mejorada a lo largo de todos los viales o recipientes, así como la realización de los otros beneficios asociados con el control con precisión la temperatura de nucleación del material. Alternativamente, si no desea equilibrar las temperaturas del material o de la disolución de liofilización, se puede simplemente implementar la etapa de despresurización en un momento apropiado durante el protocolo de congelación normal o de enfriamiento dinámico. La despresurización durante un enfriamiento dinámico producirá una difusión más amplia de las temperaturas de nucleación para el material dentro de los recipientes de

liofilización, pero añadirá un tiempo mínimo al protocolo de congelación y todavía permitirá que se mitiguen los problemas de la sub-refrigeración extrema.

Ejemplo 8 - Efecto de Diferentes Excipientes

5 El presente método de controlar o inducir la nucleación en un material se puede utilizar para controlar la temperatura de nucleación de disoluciones sub-enfriadas que contienen diferentes excipientes de liofilización. Este ejemplo demuestra el uso de los presentes métodos con los siguientes excipientes: manitol; hidroxietil-almidón (HES); polietilenglicol (PEG); polivinilpirrolidona (PVP); dextrano; glicina; sorbitol; sacarosa; y trehalosa. Para cada uno de los excipientes, dos viales se llenaron con 2,5 mL de una disolución que contiene 5% en peso del excipiente. Los viales se colocaron en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. El liofilizador se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 197,9 kPa (14 psig). El estante del liofilizador se enfrió para obtener 10 temperaturas de los viales próximas a -3°C y luego se despresurizó rápidamente para inducir la nucleación. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Efecto de Diferentes Excipientes de Liofilización

Vial n°	Disolución/Excipiente	Atmós.	Temperatura del Vial [°C]	Inicial	Caída de Presión [kPa (psi)]	Resultado de Despresurización	la
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%	Argón					

ES 2 602 501 T3

Vial n°	Disolución/Excipiente en peso	Atmós.	Temperatura del Vial [°C]	Inicial	Caída de Presión [kPa (psi)]	Resultado de Despresurización	de la
			-3,1		96,5 (14)	Nucleación	

Ejemplo 9 - Control de la Nucleación de Disoluciones de Proteínas

5 Los presentes métodos y el sistema descritos en esta memoria se pueden utilizar para controlar la temperatura de nucleación de disoluciones de proteínas sub-enfriadas sin efectos negativos o adversos sobre la solubilidad de la proteína o la actividad enzimática. En este ejemplo se utilizaron dos proteínas, albúmina de suero bovino (BSA) y lactato deshidrogenasa (LDH).

10 BSA se disolvió en manitol al 5% en peso a una concentración de 10 mg/mL. Tres viales de liofilización se llenaron con 2,5 mL de la disolución de BSA-manitol y se colocaron en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. El liofilizador se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 197,9 kPa (14 psig). El estante del liofilizador se enfrió para obtener temperaturas de los viales próximas a -5°C. El liofilizador se despresurizó rápidamente para inducir la nucleación. Todos los viales de disolución de BSA se nuclearon y comenzaron a congelarse inmediatamente después de la despresurización. No se observó precipitación alguna de la proteína después de la descongelación.

15 Las proteínas LDH se obtuvieron de dos proveedores diferentes y por motivos de claridad se designan como LDH-1 o LDH-2 para distinguir los dos lotes distintos. LDH-1 se disolvió en manitol al 5% en peso a una concentración de 1 mg/mL. Seis viales de liofilización se llenaron con 2,5 mL de la solución de LDH-1/manitol y se colocaron en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. El liofilizador se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 197,9 kPa (14 psig). El estante del liofilizador se enfrió empezando desde la temperatura ambiente para obtener las temperaturas de los viales próximas a -4°C. A continuación, el liofilizador se despresurizó rápidamente para inducir la nucleación. Todos los viales se nuclearon y comenzaron a congelarse inmediatamente después de la despresurización. Los viales se mantuvieron en este estado durante aproximadamente 15 minutos. A continuación, el estante del liofilizador se enfrió a una velocidad de aproximadamente 1°C/min para obtener temperaturas de los viales próximas a -45°C y se mantuvo durante otros 15 minutos para asegurar la compleción del proceso de congelación. Después de la etapa de congelación, el estante del liofilizador se calentó después a una velocidad de aproximadamente 1°C/min para elevar las temperaturas de los viales a cerca de 5°C. No se observó precipitación alguna de la proteína después de la descongelación. El contenido del vial se sometió a ensayo en cuanto a la actividad enzimática, y los resultados se compararon con una muestra control de la disolución de LDH-1/manitol no congelada.

30 Como parte del Ejemplo 9, las muestras nucleadas despresurizadas de la disolución de LDH-1/manitol se compararon con muestras estocásticamente nucleadas. En las muestras estocásticamente nucleadas de LDH-1, el procedimiento de congelación se repitió sin presurización y despresurización y sin la atmósfera de argón. En concreto, LDH-1 se disolvió en manitol al 5% en peso a una concentración de 1 mg/mL. Seis viales de liofilización se llenaron con 2,5 mL de la disolución de LDH-1/manitol y se colocaron en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. El estante del liofilizador se enfrió a partir de la temperatura ambiente a una velocidad de aproximadamente 1°C/min para obtener temperaturas de los viales próximas a -45°C y se mantuvo durante 15 minutos para asegurar la compleción del 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 hasta cerca de 5°C. No se observó precipitación alguna de la proteína después de la descongelación. El contenido del vial se ensayó en cuanto a la actividad enzimática, y los resultados se compararon con la misma muestra de control de disolución de LDH-1/manitol no congelada.

40 También como parte del Ejemplo 9, los experimentos descritos anteriormente para LDH-1 se repitieron utilizando LDH-2. La única diferencia era una temperatura de nucleación controlada próxima a -3°C para LDH-2 en lugar de -4°C para LDH-1.

ES 2 602 501 T3

Tabla 9. Control de la Temperatura de Nucleación de Disoluciones de Proteínas Sub-Refrigeradas

Vial n°	Disolución	Atmós.-	Temperatura Inicial del Vial [°C]	Caída Presión (psi)	de Actividad Enzimática Pérdida [%]	Resultado de la Despresurización
1	2,5 mL disolución BSA	de Argón	-4,9	96,5 (14)	-	Nucleación
2	2,5 mL disolución BSA	de Argón	-4,3	96,5 (14)	-	Nucleación
3	2,5 mL disolución BSA	de Argón	-5,3	96,5 (14)	-	Nucleación
4	2,5 mL disolución LDH-1	de Argón	-3,8	96,5 (14)	9,0	Nucleación
5	2,5 mL disolución LDH-1	de Argón	-4,0	96,5 (14)	16,2	Nucleación
6	2,5 mL disolución LDH-1	de Argón	-3,7	96,5 (14)	18,4	Nucleación
7	2,5 mL disolución LDH-1	de Argón	-4,0	96,5 (14)	23,4	Nucleación
8	2,5 mL disolución LDH-1	de Argón	-3,9	96,5 (14)	18,5	Nucleación
9	2,5 mL disolución LDH-1	de Argón	-4,0	96,5 (14)	21,2	Nucleación
10	2,5 mL disolución LDH-1	de Aire	-10,4	101,3 (0)	35,7	Nucleación
11	2,5 mL disolución LDH-1	de Aire	-16,5	101,3 (0)	35,4	Nucleación
12	2,5 mL disolución LDH-1	de Aire	-15,5	101,3 (0)	36,1	Nucleación
13	2,5 mL disolución LDH-1	de Aire	-10,5	101,3 (0)	43,9	Nucleación
14	2,5 mL disolución LDH-1	de Aire	-9,8	101,3 (0)	24,9	Nucleación
15	2,5 mL disolución LDH-1	de Aire	-11,0	101,3 (0)	39,2	Nucleación
16	2,5 mL disolución LDH-2	de Argón	-3,1	96,5 (14)	29,9	Nucleación
17	2,5 mL disolución LDH-2	de Argón	-2,9	96,5 (14)	18,9	Nucleación

ES 2 602 501 T3

Vial n°	Disolución	Atmós.-	Temperatura Inicial del Vial [°C]	Caída Presión (psi)	de Actividad Enzimática Pérdida [%]	Resultado de la Despresurización
18	2,5 mL disolución LDH-2	de Argón	-3,1	96,5 (14)	23,3	Nucleación
19	2,5 mL disolución LDH-2	de Argón	-2,7	96,5 (14)	19,6	Nucleación
20	2,5 mL disolución LDH-2	de Argón	-3,1	96,5 (14)	32,1	Nucleación
21	2,5 mL disolución LDH-2	de Argón	-2,6	96,5 (14)	35,2	Nucleación
22	2,5 mL disolución LDH-2	de Aire	-5,0	101,3 (0)	38,3	Nucleación
23	2,5 mL disolución LDH-2	de Aire	-5,5	101,3 (0)	40,0	Nucleación
24	2,5 mL disolución LDH-2	de Aire	2,3	101,3 (0)	36,5	Nucleación
25	2,5 mL disolución LDH-2	de Aire	-3,8	101,3 (0)	42,0	Nucleación
26	2,5 mL disolución LDH-2	de Aire	-5,1	101,3 (0)	50,2	Nucleación
27	2,5 mL disolución LDH-2	de Aire	-5,9	101,3 (0)	40,6	Nucleación

5 Tal como se ve en la Tabla 9, el proceso de nucleación y congelación controladas logrado a través de despresurización claramente no disminuye la actividad enzimática con respecto a un protocolo de nucleación estocástica y congelación comparables. De hecho, el proceso de nucleación controlada logrado a través de la despresurización parece preservar mejor la actividad de la enzima con una pérdida media de actividad de sólo 17,8% para LDH-1 y 26,5% para LDH-2 en comparación con la pérdida de actividad media de 35,9 % para LDH-1 y 41,3% para LDH-2 después de la nucleación estocástica.

10 Debe señalarse que las temperaturas de nucleación estocástica observadas para LDH-2 eran sustancialmente más cálidas que las temperaturas de nucleación estocástica para LDH-1. Esta diferencia puede deberse a algún contaminante que actúa en calidad de un agente de nucleación en la LDH-2. Las temperaturas de nucleación estocástica están mucho más cerca de las temperaturas de nucleación controlada para LDH-2 en comparación con LDH-1, sin embargo, las mejoras en la retención de la actividad enzimática obtenida a través de la nucleación controlada para LDH-1 y LDH-2 son similares en 18,1% y 14,8%, respectivamente. Este resultado sugiere que las mejoras en la retención de la actividad enzimática pueden ser atribuidas en parte a las características del proceso de nucleación controlada en sí, no sólo a las temperaturas de nucleación más cálidas prescritas obtenidas a través de la despresurización.

Ejemplo 10 - Reducción del Tiempo de Secado Primario

20 Una disolución de manitol al 5% en peso se preparó mezclando aproximadamente 10,01 gramos de manitol con aproximadamente 190,07 gramos de agua. Los viales se llenaron con 2,5 mL de la disolución de manitol al 5% en peso. Los viales se pesaron en vacío y con la disolución para determinar la masa de agua añadida a los viales. Los veinte viales se colocaron en un soporte en un estante del liofilizador en estrecha proximidad entre sí. Las

- temperaturas de seis viales se monitorizaron mediante termopares montados en superficie; todos los viales monitorizados fueron rodeados por otros viales para mejorar la uniformidad del comportamiento del vial. El liofilizador se presurizó a aproximadamente 197,9 kPa (14 psig) en una atmósfera de gas controlada de gas argón. El estante del liofilizador se enfrió desde la temperatura ambiente a aproximadamente -6°C para obtener temperaturas de los viales de entre aproximadamente -1°C y -2°C. A continuación, el liofilizador se despresurizó desde aproximadamente 197,9 kPa (14 psig) a aproximadamente la presión atmosférica en menos de cinco segundos para inducir la nucleación de la disolución dentro de los viales. Todos los viales observados visualmente o monitorizados a través de termopares se nuclearon y comenzaron a congelarse inmediatamente después de la despresurización.
- 10 A continuación, se redujo rápidamente la temperatura del estante 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 hizo el vacío en la cámara de liofilización y se inició el proceso de secado primario (es decir, la sublimación). Durante este proceso de secado, el estante del liofilizador se calentó a aproximadamente -14°C a través de una rampa de una hora y se mantuvo a esa temperatura durante 16 horas. El condensador se mantuvo a aproximadamente -60°C a lo largo de todo el proceso de secado. El secado primario se detuvo apagando la bomba de vacío y rellenando la cámara con argón a presión atmosférica. Los viales se retiraron rápidamente del liofilizador y se pesaron para determinar la cantidad de agua que se había perdido durante el proceso de secado primario.

- En un experimento separado, como parte del Ejemplo 10, otros viales se llenaron con 2,5 mL de la misma disolución de manitol al 5% en peso. Los viales se pesaron en vacío y con la disolución para determinar la masa de agua añadida a los viales. Los viales fueron cargados en el liofilizador de la misma manera a la descrita anteriormente, y las temperaturas de los seis viales se monitorizaron una vez más utilizando termopares montados en superficie. El estante del liofilizador se enfrió rápidamente desde la temperatura ambiente a aproximadamente -45°C para congelar los viales. La nucleación se produjo estocásticamente 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 manera idéntica al método descrito anteriormente. Tras concluir el secado primario, las muestras se retiraron rápidamente del liofilizador y se pesaron para determinar la cantidad de agua que se había perdido durante el proceso de secado primario.

Tabla 10. El Aumento de la Temperatura de Nucleación mejora el Secado Primario

Vial nº	Disolución	Atmós.	Temperatura Inicial del Vial [°C]	Caída de Presión [kPa (psi)]	Perdida de Agua [%]	Resultado de la Despresurizado
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	101,3 (0)	65,7	-
8	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Aire	-16,7	101,3 (0)	66,9	-
9	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Aire	-14,5	101,3 (0)	64,6	-
10	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Aire	-15,6	101,3 (0)	64,7	-
11	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Aire	-16,5	101,3 (0)	64,1	-
12	2,5 mL de manitol al 5% en peso	Aire	-17,9	101,3 (0)	65,7	-

Los resultados del proceso de secado por congelación con nucleación controlada y nucleación estocástica se resumen en la Tabla 10. Hay que señalar que estos dos experimentos sólo difieren en la adición de la nucleación controlada a través de la etapa de despresurización a un experimento. Tal como se ve en la Tabla 10, el proceso de nucleación controlada logrado a través de la despresurización permite una nucleación a muy bajos grados 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 la nucleación controlada en comparación con el caso de nucleación estocástica proporcionan una estructura de hielo y la torta liofilizada resultante con propiedades de secado mejorado drásticamente. Para la misma cantidad de tiempo de secado, los viales nucleados utilizando 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 nucleados estocásticamente entre aproximadamente $-14,5^{\circ}\text{C}$ y $-17,9^{\circ}\text{C}$ solamente perdieron una media de 65,3%. Por lo tanto, los viales nucleados estocásticamente requerirían mucho más tiempo de secado primario para lograr el mismo grado de pérdida de agua que los viales nucleados de una manera controlada de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria. La mejora en el tiempo de secado es probable que se atribuya a la formación de cristales de hielo más grandes a temperaturas de nucleación más altas. Estos cristales de hielo más grandes dejan tras de sí poros más grandes tras la sublimación, y los poros más grandes ofrecen menos resistencia al flujo de vapor de agua durante la sublimación ulterior.

Aplicabilidad Industrial

El presente método proporciona un método mejorado para controlar la temperatura y/o el tiempo en el que los materiales sub-enfriados, a saber, líquidos o disoluciones, nuclean y luego se congelan. Aunque esta solicitud se centra en parte en el secado por congelación, un problema similar se produce para cualquier etapa de procesamiento de material que implique una transición de fase nucleada. Ejemplos de tales procesos incluyen la cristalización de polímeros y metales a partir de masas fundidas, la cristalización de los materiales a partir de disoluciones sobresaturadas, la cristalización de proteínas, la producción de nieve artificial, la congelación de alimentos, la concentración por congelación, la cristalización fraccionada, la crio-conservación o la condensación de vapores en líquidos.

El beneficio más inmediato de controlar la temperatura de nucleación de un líquido o disolución es la capacidad de controlar el número y tamaño de los dominios de sólidos producidos por la transición de fase. En la congelación del agua, por ejemplo, la temperatura de nucleación controla directamente el tamaño y número de cristales de hielo formados. En términos generales, los cristales de hielo son menores en número y de mayor tamaño cuando la temperatura de nucleación es más alta.

La capacidad de controlar el número y tamaño de los dominios sólidos producidos por una transición de fase puede proporcionar beneficios adicionales. En un proceso de secado por congelación, por ejemplo, el número y tamaño de los cristales de hielo influye fuertemente sobre las propiedades de secado de la torta liofilizada. Cristales de hielo grandes producidos por temperaturas de nucleación más altas dejan tras de sí poros más grandes tras la sublimación, y los poros más grandes ofrecen menos resistencia al flujo de vapor de agua durante la sublimación subsiguiente. Por lo tanto, el sistema y los métodos descritos proporcionan medios de aumentar las tasas de secado primario (es decir, la sublimación) en los procesos de secado por congelación mediante el aumento de la temperatura de nucleación.

Otro posible beneficio se puede conseguir en aplicaciones en las que materiales sensibles se conservan a través de procesos de congelación (es decir, se crio-conservan). Por ejemplo, un material biológico que incluye, pero no se limita a muestras de tejidos de mamíferos (p. ej., sangre del cordón umbilical, biopsia de tejidos, células del huevo y del esperma, etc.), líneas celulares (p. ej., de mamífero, levadura, procariontas, hongos, etc.) y moléculas biológicas (p. ej., proteínas, ADN, ARN y subclases de los mismos) congelados en una disolución acuosa pueden experimentar diversas tensiones durante el proceso de congelación que pueden poner en peligro la función o actividad del material. La formación de hielo puede alterar físicamente el material o puede crear cambios serios en la unión interfacial, las fuerzas osmóticas, las concentraciones de soluto, etc. experimentadas por el material. Dado que la nucleación controla la estructura y la cinética de la formación de hielo, se puede influir significativamente en estas tensiones. El presente sistema y métodos, por lo tanto, proporcionan medios únicos de mitigar las tensiones asociadas con los procesos de crio-conservación y la mejora de la recuperación de la función o actividad de materiales crio-conservados. Esto representa una mejora frente a los métodos de control de la nucleación convencionales (p. ej., la siembra o el contacto con superficies frías) utilizados para iniciar la formación de hielo extracelular en los algoritmos de crio-conservación de dos etapas diseñados para las células vivas.

Los presentes métodos pueden ser también aplicados a disoluciones de complejos o mezclas que contienen varios constituyentes, tanto en aplicaciones de crio-conservación como de liofilización. Estas formulaciones son a menudo disoluciones con un disolvente acuoso, orgánico o acuoso-orgánico mixto que contiene un ingrediente farmacéuticamente activo (p. ej., un producto químico sintético, proteína, péptido o vacuna) y opcionalmente, uno o más constituyentes mitigantes, incluyendo agentes de carga que ayudan a evitar la pérdida física del ingrediente activo durante el secado (p. ej., dextrosa, glucosa, glicina, lactosa, maltosa, manitol, polivinilpirrolidona, cloruro de sodio y sorbitol); agentes de tamponamiento o modificadores de la toxicidad que ayudan a mantener el pH del entorno o la toxicidad del componente activo apropiado (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 anteriormente mencionados); agentes estabilizantes que ayudan a preservar la estructura y función del constituyente activo durante el procesamiento o en su forma líquida o seca final de estabilización (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., polietilenglicol y azúcares), y antioxidantes que protegen el componente activo frente a la degradación (p. ej., ascorbato, bisulfito de sodio, formaldehído sódico, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, sulfoxilato y tioglicerol).

Dado que la nucleación es típicamente un proceso aleatorio, una pluralidad del mismo material sometido a las condiciones de procesamiento idénticas podría nuclearse a diferentes temperaturas. Como resultado, las propiedades de los materiales que dependen del comportamiento de nucleación probablemente difieren, a pesar de las condiciones de procesamiento idénticas. El sistema y los métodos descritos proporcionan medios para el control de las temperaturas de nucleación de una pluralidad de materiales de forma simultánea y, por lo tanto, ofrecen una manera de aumentar la uniformidad de las propiedades del producto que dependen del comportamiento de nucleación. En un proceso típico de secado por congelación, por ejemplo, la misma disolución en viales separados puede nuclearse estocásticamente a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas y, como resultado, los productos finales liofilizados pueden poseer una variabilidad significativa en las propiedades críticas tales como la humedad residual, la actividad y el tiempo de reconstitución. Al controlar la temperatura de nucleación mediante el proceso descrito en esta memoria, la uniformidad de un vial a otro de las propiedades del producto de un proceso de secado por congelación puede mejorar drásticamente. Así, cuando el material se mantiene en una pluralidad de recipientes o viales, mediante el uso del procedimiento descrito en esta memoria el producto seco obtenido a partir de la pluralidad de recipientes o viales puede exhibir tiempos de reconstitución relativamente uniformes y/o una humedad residual o niveles de disolvente relativamente uniformes. Además de ello, el tiempo requerido para el secado del material congelado puede ser menor que el tiempo requerido para el secado del material congelado que es estocásticamente nucleado.

La capacidad de controlar el comportamiento de la nucleación de un material también puede proporcionar un beneficio considerable en la reducción del tiempo necesario para desarrollar un proceso industrial que gira en torno a un evento de nucleación normalmente no controlado. Por ejemplo, a menudo se requieren muchos meses para desarrollar con éxito un ciclo de secado por congelación que se puede lograr en un período razonable de tiempo, proporciona propiedades deseadas del producto dentro de la uniformidad especificada, y conserva una suficiente actividad del ingrediente farmacéutico activo (API). Al proporcionar medios de controlar la nucleación y, por lo tanto, mejorar potencialmente el tiempo de secado primario, la uniformidad del producto y la actividad de API, el tiempo necesario para el desarrollo con éxito de protocolos de secado por congelación deberían reducirse drásticamente.

En particular, los beneficios potenciales del proceso de nucleación controlada proporcionarán una mayor flexibilidad en la especificación de la composición de la formulación a ser secada por congelación. Dado que la nucleación controlada puede preservar mejor el API durante la etapa de congelación, los usuarios deberían ser capaces de minimizar la adición de los constituyentes mitigantes (p. ej., agentes estabilizantes) a la formulación o elegir combinaciones más simples de constituyentes de la formulación para lograr los objetivos de estabilidad y de procesamiento combinados. Beneficios sinérgicos pueden surgir en los casos en los que la nucleación controlada minimiza el uso de agentes estabilizantes u otros componentes mitigantes que inherentemente alargan los tiempos de secado primario (p. ej., por la disminución de las temperaturas de transición vítrea de disoluciones acuosas).

Los métodos descritos son particularmente bien adecuados para operaciones de producción o de fabricación a gran escala, ya que pueden llevarse a cabo utilizando el mismo equipo y los mismos parámetros del proceso que se pueden aumentar fácilmente o adaptar para la fabricación de una amplia gama de productos. El proceso proporciona la nucleación de materiales utilizando un proceso en el que todas las manipulaciones se pueden llevar a cabo en una sola cámara (p. ej., un liofilizador) y en el que el proceso no requiere el uso de un vacío, el uso de aditivos, vibración, electrocongelación o similares para inducir la nucleación. En contraste con la técnica anterior, el presente método no añade nada al producto liofilizado. Sólo requiere que los materiales, (p. ej., líquidos en los viales) se mantengan inicialmente a una presión especificada bajo un entorno de gas y que la presión se reduzca rápidamente

5 a una presión más baja. Cualquier gas aplicado será separado de los viales durante el ciclo de liofilización. Los viales o sus contenidos no se ponen en contacto ni tocan con nada, excepto el gas. La simple manipulación de la presión ambiente y el entorno del gas son suficientes por sí sola para lograr ese objetivo. Al confiar sólo en el cambio de presión ambiente para inducir la nucleación, el presente método descrito en esta memoria afecta de manera uniforme y simultáneamente a todos los viales en un liofilizador. La presente realización también es menos costosa y más fácil de implementar y mantener que los métodos de la técnica anterior de influir en la nucleación en materiales en aplicaciones de liofilización. El presente método permite un secado primario significativamente más rápido en los procesos de liofilización, reduciendo así los costes de procesamiento de los productos farmacéuticos liofilizados. El presente método produce productos liofilizados mucho más uniformes que los métodos de la técnica anterior, reduciendo así las pérdidas de producto y creando barreras de entrada para los procesadores que no puedan cumplir las especificaciones más estrictas de uniformidad. Este método logra estas ventajas sin contaminar el producto liofilizado. Un mayor control del proceso debería conducir a un producto mejorado y a tiempos de proceso más cortos.

10 De lo anterior, se debe apreciar que la presente invención proporciona, por lo tanto, un sistema y un método de liofilización. Diversas modificaciones, cambios y variaciones de los presentes métodos resultarán evidentes para una persona experta en la técnica. Por ejemplo, los medios para controlar la temperatura pueden ser sistemas de enfriamiento basados en materiales criogénicos alternativos o sistemas de refrigeración mecánicos convencionales o avanzados. Del mismo modo, los medios para controlar la presión y la atmósfera de gas en la cámara se contemplan específicamente para incluir técnicas de presurización y despresurización conocidas.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método de liofilizar un material, que comprende las etapas de:
5 presurizar la atmósfera de gas dentro de una cámara (202) a una presión entre la presión ambiente y 172,4 kPa (25 psi) por encima de la presión ambiente y enfriar el material en la cámara presurizada a una tasa de enfriamiento prescrita a una temperatura de nucleación deseada;
rápidamente disminuir la presión en la cámara (202) en 40 segundos o menos o a una tasa de caída de presión, $\Delta P/\Delta t$, mayor que 1,4 kPa (0,2 psi) por segundo para inducir la nucleación de congelación en el material a la temperatura de nucleación deseada;
10 enfriar adicionalmente el material nucleado hasta o por debajo de una temperatura final para congelar el material; y
secar el material congelado para producir un producto secado que tiene una humedad reducida o disolvente.
2. El método de liofilizar según la reivindicación 1, en el que el material se enfría inicialmente a una temperatura que oscila entre la temperatura de transición de fase y 20°C por debajo de la temperatura de transición de fase antes de la despresurización.
15
3. El método de liofilizar según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la presión se disminuye en aproximadamente 48,3 kPa (7 psi) o más.
4. El método de liofilizar según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la presión se disminuye de manera que una relación de presión absoluta, P_i/P_f , es de aproximadamente 1,2 o mayor.
- 20 5. El método de liofilizar según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material comprende, además, uno o más componentes que comprenden un virus vivo o atenuado; ácido nucleico; anticuerpo monoclonal; anticuerpo policlonal; proteína; péptido; o polipéptido.
6. El método de liofilizar según la reivindicación 5, en el que componentes del material reconstituido exhiben una función o actividad mejorada frente a la función o actividad asociada con componentes de material reconstituido de un material nucleado estocásticamente.
25

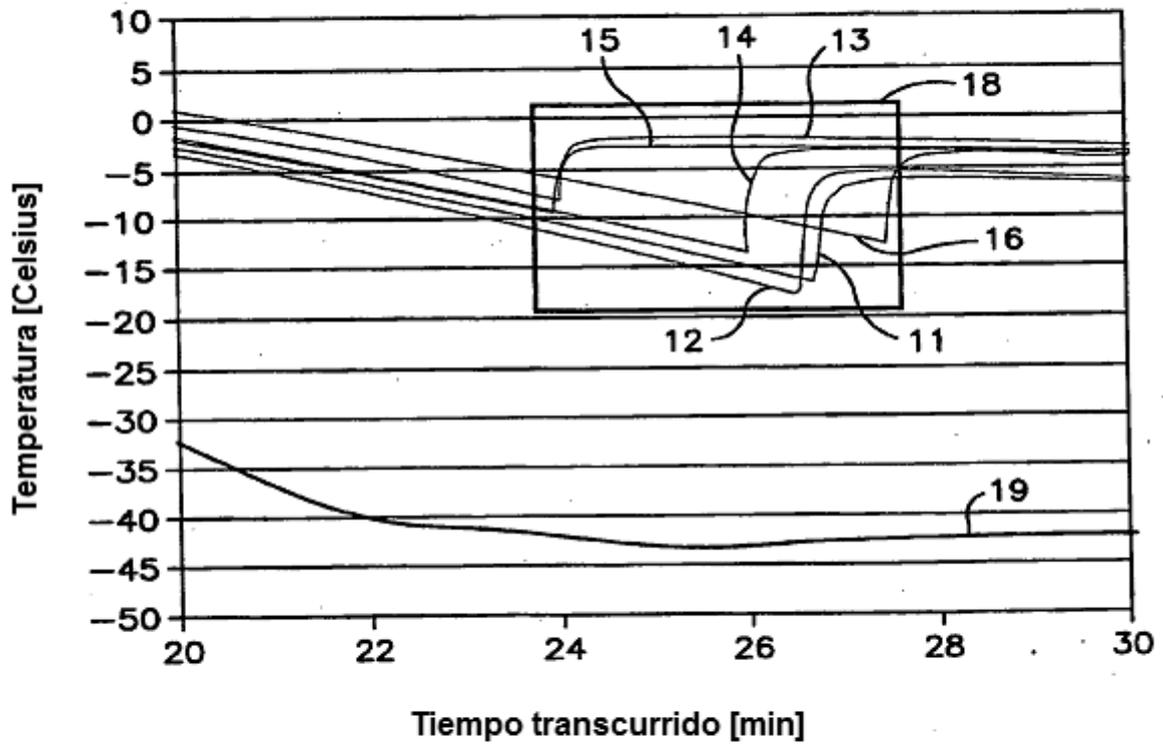


FIG. 1

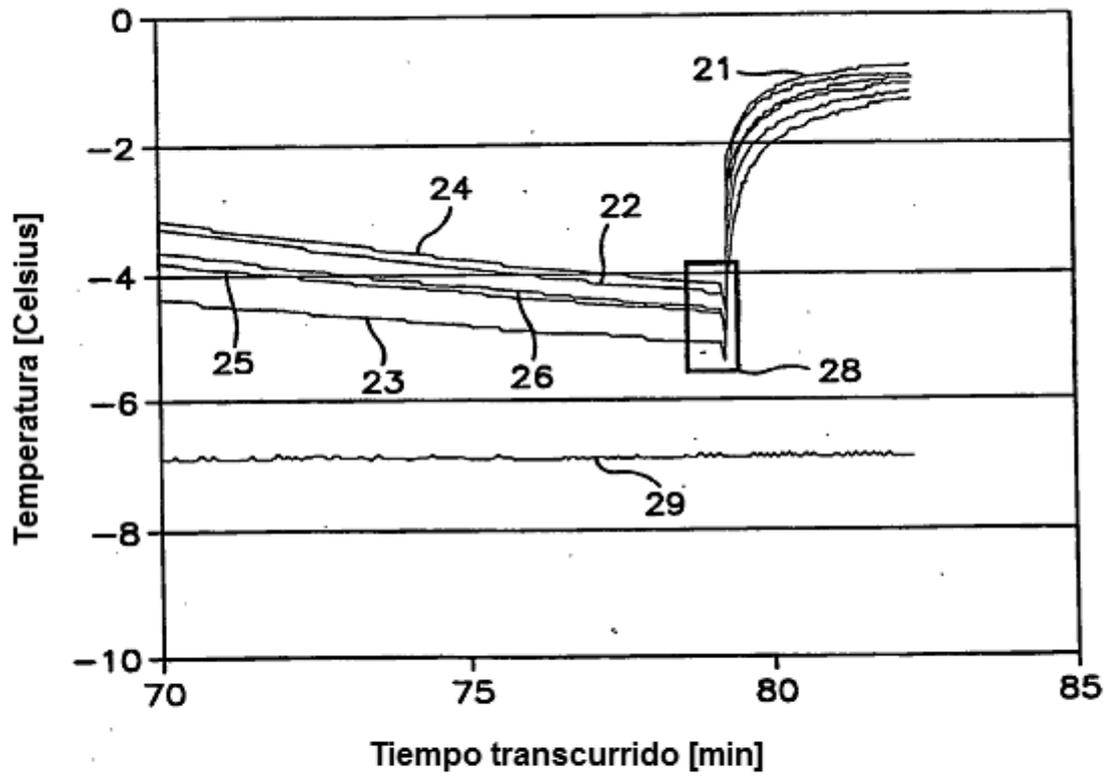


FIG. 2

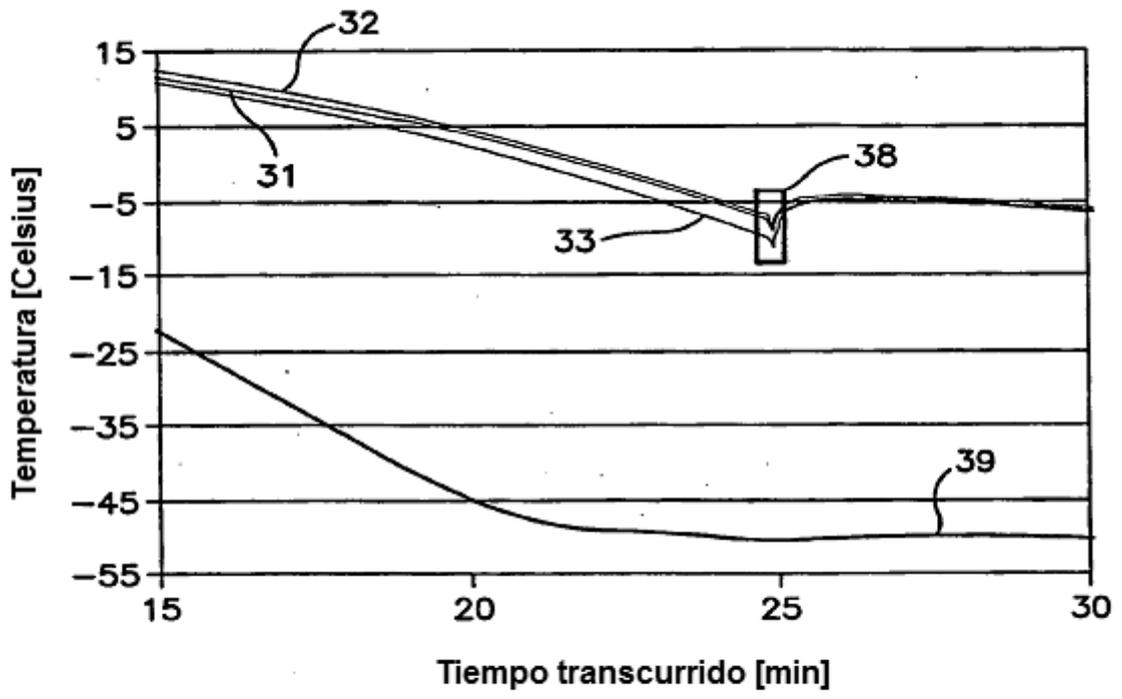


FIG. 3

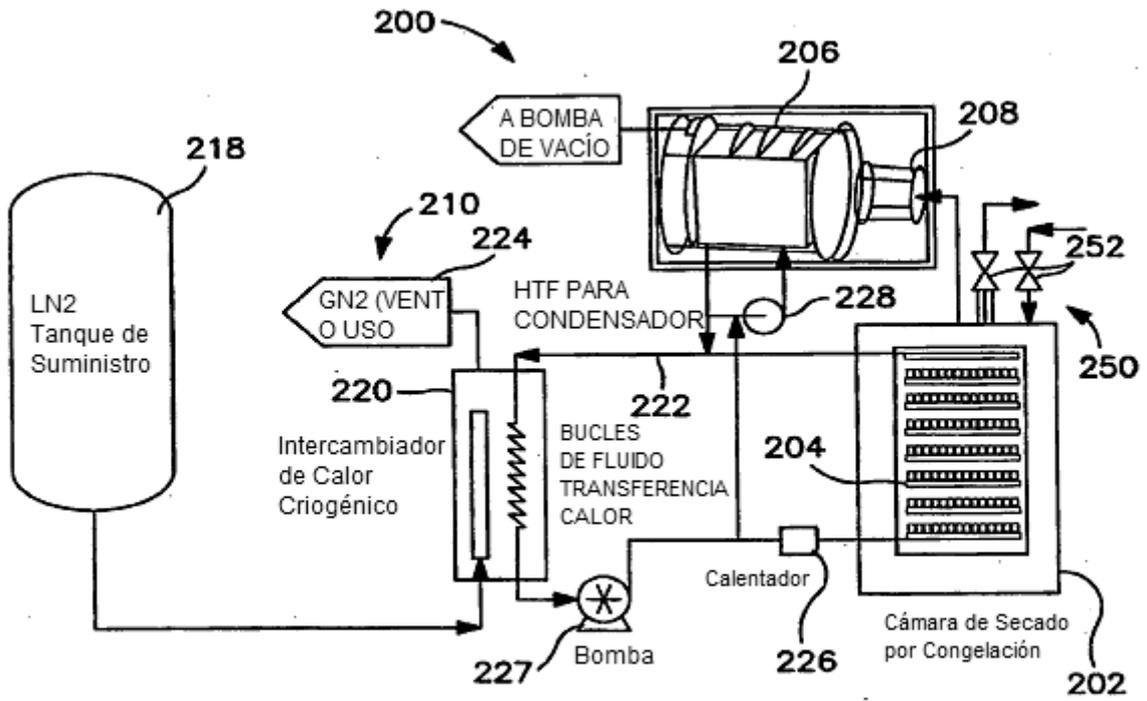


FIG. 4