

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 911**

51 Int. Cl.:

F26B 5/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2007 E 16176394 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3136030**

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:
18.03.2020

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:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 748 911 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 congelación de 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 objeto de inducir la nucleación de congelación en el material.

Antecedentes de la invención

10 Controlar el proceso generalmente aleatorio de nucleación en la etapa de congelación de un proceso de liofilización o secado por congelación, sería altamente deseable en la técnica, tanto para disminuir el tiempo de procesamiento necesario para completar el secado por congelación como para aumentar la uniformidad del producto de vial a vial en el producto terminado. En un proceso de secado por congelación farmacéutico típico, se colocan múltiples viales que contienen una solución acuosa común en estantes que se enfrían, generalmente a una tasa controlada, a bajas temperaturas. La solución acuosa en cada vial se enfría por debajo de la temperatura de congelación termodinámica de la solución y permanece en un estado líquido metaestable sub-enfriado hasta que ocurre la nucleación.

15 El rango de temperaturas de nucleación a través de los viales se distribuye aleatoriamente entre una temperatura cercana a la temperatura de congelación termodinámica y algún valor significativamente (por ejemplo, hasta aproximadamente 30°C) más bajo que la temperatura de congelación termodinámica. Esta distribución de temperaturas de nucleación causa una variación de vial a vial en la estructura del cristal de hielo y, en última instancia, las propiedades físicas del producto liofilizado. Además, la etapa de secado del proceso de secado por congelación debe ser excesivamente larga para acomodar el rango de tamaños y estructuras de cristales de hielo que se producen mediante el fenómeno de nucleación natural del estocástico.

20 Se han usado aditivos para aumentar la temperatura de nucleación de las soluciones sub-enfriadas. Estos aditivos pueden tomar muchas formas. Se sabe bien que ciertas bacterias (por ejemplo, *Pseudomonas syringae*) sintetizan proteínas que ayudan a nuclear la formación de hielo en soluciones acuosas sub-enfriadas. Las bacterias o sus proteínas aisladas se pueden agregar a las soluciones para aumentar la temperatura de nucleación. Varios aditivos inorgánicos demuestran también un efecto nucleante; el aditivo más común es el yoduro de plata, AgI. En general, cualquier aditivo o contaminante tiene el potencial de servir como agente nucleante. Los viales de liofilización que se preparan en ambientes que contienen altos niveles de partículas se nuclearán y congelarán generalmente a un menor grado de sub-enfriamiento que los viales que se preparan en ambientes de bajas partículas.

25 Todos los agentes nucleantes que se describieron anteriormente se rotulan como "aditivos", porque cambian la composición del medio en el que nuclean una transición de fase. Estos aditivos no son generalmente aceptables para productos farmacéuticos que se secan por congelación regulados y aprobados por la FDA. Estos aditivos tampoco proporcionan control sobre el tiempo y la temperatura cuando los viales se nuclean y congelan. Por el contrario, los aditivos solo funcionan para aumentar la temperatura promedio de nucleación de los viales.

30 Los cristales de hielo pueden actuar como agentes nucleantes para la formación de hielo en soluciones acuosas sub-enfriadas. En el método de "niebla de hielo", un secador por congelación húmedo se llena con un gas frío para producir una suspensión de vapor de pequeñas partículas de hielo. Las partículas de hielo se transportan a los viales e inician la nucleación cuando entran en contacto con la interfaz del 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 ocurre concurrente o instantáneamente dentro de todos los viales tras la introducción del vapor frío en el secador por congelación. Los cristales de hielo tardarán un tiempo en llegar a cada uno de los viales para iniciar la nucleación, y es probable que los tiempos de transporte sean diferentes para los viales en diferentes ubicaciones dentro del secador por congelación. Para los secadores por congelación industriales a gran escala, la implementación del método de "niebla de hielo" requeriría cambios del sistema de diseño ya que se requieren dispositivos de convección interna para ayudar a una distribución más uniforme de la "niebla de hielo" en todo el secador por congelación. Cuando los estantes del secador por congelación se enfrían continuamente, la diferencia de tiempo entre cuando el primer vial se congela y el último vial se congela creará una diferencia de temperatura entre los viales, lo que aumentará la no uniformidad de vial a vial en productos que se secan por congelación.

40 El tratamiento previo de los viales mediante puntuación, rascado o raspado se ha usado también para reducir el grado de subenfriamiento que se requiere para la nucleación. Al igual que con los otros métodos de la técnica anterior, el tratamiento previo del vial tampoco imparte ningún grado de control sobre el tiempo y la temperatura cuando los viales individuales se nuclean y congelan, sino que solo aumenta la temperatura promedio de nucleación de todos los viales.

45 La vibración se ha usado también para nuclear una transición de fase en un material metaestable. La vibración suficiente para inducir la nucleación se produce a frecuencias superiores a 10 kHz y se puede producir usando una

variedad de equipos. A menudo, las vibraciones en este rango de frecuencia se denominan "ultrasónicas", aunque las frecuencias en el rango de 10 kHz a 20 kHz están típicamente dentro del rango audible de los humanos. La vibración ultrasónica produce a menudo cavitación, o la formación de pequeñas burbujas de gas, en una solución subenfriada. En el régimen de cavitación transitoria o inercial, las burbujas de gas crecen y colapsan rápidamente, causando fluctuaciones de temperatura y presión localizadas muy altas. La capacidad de la vibración ultrasónica para inducir la nucleación en un material metaestable se atribuye a menudo a las perturbaciones que se causan mediante la cavitación transitoria. El otro régimen de cavitación, que se denomina estable o no inercial, se caracteriza por burbujas que muestran un volumen estable u oscilaciones de forma sin colapso. La Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20020031577 A1 divulga que la vibración ultrasónica puede inducir la nucleación incluso en el régimen de cavitación estable, pero no se ofrece ninguna explicación del fenómeno. La Solicitud de Patente de Gran Bretaña 2400901A divulga también que la probabilidad de causar cavitación, y por lo tanto nucleación, en una solución que usa vibraciones con frecuencias superiores a 10 kHz se puede aumentar al reducir la presión ambiental alrededor de la solución o disolver un fluido volátil en la solución.

Se ha usado también en el pasado un método de electrocongelación para inducir la nucleación en líquidos subenfriados. La electrocongelación se logra generalmente mediante el suministro de campos eléctricos relativamente altos (~ 1 V/nm) de manera continua o pulsada entre electrodos espaciados estrechamente que se sumergen en un líquido o solución subenfriados. Los inconvenientes que se asocian con un proceso de electrocongelación en aplicaciones de liofilización típicas incluyen la complejidad relativa y el coste de implementación y mantenimiento, particularmente para aplicaciones de liofilización que usan múltiples viales o contenedores. Además, la electrocongelación no se puede aplicar directamente a soluciones que contienen especies iónicas (por ejemplo, NaCl). Recientemente, hay estudios que examinan el concepto de "congelación de la superficie inducida por vacío" (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 6,684,524). En tal "congelación de superficie inducida por vacío", los viales que contienen una solución acuosa se cargan en un estante con temperatura controlada en un secador por congelación y se mantienen inicialmente a aproximadamente 10 grados Celsius. La cámara del secador por congelación se vacía luego a una presión cercana al vacío (por ejemplo, 1 mbar), lo que causa la congelación de la superficie de las soluciones acuosas a profundidades de unos pocos milímetros. La liberación posterior de vacío y la disminución de la temperatura del estante por debajo del punto de congelación de la solución permite el crecimiento de cristales de hielo desde la capa superficial que se congelada previamente a través del resto de la solución. Una desventaja importante para implementar este proceso de "congelación de superficie inducida por vacío" en una aplicación típica de liofilización es el alto riesgo de hacer hervir violentamente o gasificar la solución bajo las condiciones establecidas.

El documento DE 199 36 281 A1 divulga un método para liofilizar un material dentro de una cámara de un secador por congelación. El material se enfría a una temperatura entre el ambiente y el punto de congelación del material, estando la cámara a la misma temperatura. Posteriormente, se induce la nucleación mediante una reducción de presión, seguida de la congelación del material a través de la disminución de la temperatura de la cámara por debajo del punto de congelación. Finalmente, el material se seca por congelación. El control mejorado del proceso de nucleación puede permitir la congelación de todos los viales de solución farmacéutica no congelada en un secador por congelación para que ocurra dentro de un rango de temperatura y tiempo más estrecho, produciendo de este modo un producto liofilizado con mayor uniformidad de vial a vial. El control de la temperatura mínima de nucleación puede afectar la estructura del cristal de hielo que se forma dentro del vial y permitir un proceso de secado por congelación muy acelerado.

Por lo tanto, existe una necesidad de controlar el proceso aleatorio de nucleación en varios procesos de congelación, incluida la etapa de congelación de un proceso de secado por congelación o liofilización para disminuir tanto el tiempo de procesamiento necesario para completar el secado por congelación así como mejorar la uniformidad del producto de vial a vial en el producto terminado. Por lo tanto, sería deseable proporcionar un proceso que posea algunas, o preferiblemente todas, las características anteriores.

Resumen de la Invención

La presente invención es un método para liofilizar un material dentro de una cámara de un secador por congelación como se define en la reivindicación 1.

Las realizaciones preferidas de este método se definen en las reivindicaciones dependientes.

Breve Descripción de las Figuras

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

La Figura 1 es un gráfico que representa el gráfico de temperatura versus tiempo de una solución que se somete a un proceso de congelación estocástica y que muestra además el intervalo de temperaturas de nucleación de la solución;

La Figura 2 es un gráfico que representa el gráfico de temperatura versus tiempo de una solución que se somete a un proceso de congelación equilibrado con nucleación despresurizada de acuerdo con los métodos presentes;

La Figura 3 es un gráfico que representa el gráfico de temperatura versus tiempo de una solución que se somete a un proceso de congelación dinámica con nucleación despresurizada de acuerdo con los métodos presentes; y

La Figura 4 es una representación esquemática de un sistema de liofilización de acuerdo con la presente invención.

Descripción Detallada de la Invención

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

10 En el proceso de cristalización, la nucleación es el paso donde las moléculas seleccionadas dispersas en la solución u otro material comienzan a reunirse para crear grupos en la escala nanométrica para estabilizarse en las condiciones de operación actuales. Estos grupos estables constituyen los núcleos. Los grupos deben alcanzar un tamaño crítico para convertirse en núcleos estables. Tal tamaño crítico se dicta generalmente mediante las condiciones de operación tales como temperatura, contaminantes, grado de sobresaturación, etc. y puede variar de una muestra de la solución a otra. Es durante el evento de nucleación que los átomos en la solución se organizan de una manera definida y
15 periódica que define la estructura cristalina.

El crecimiento cristalino es el crecimiento posterior de los núcleos que logran alcanzar el tamaño crítico del grupo. Dependiendo de las condiciones, la nucleación o el crecimiento cristalino pueden predominar sobre el otro, y como resultado, se obtienen cristales con diferentes tamaños y formas. El control del tamaño y la forma del cristal constituye uno de los principales desafíos en la fabricación industrial, tal como para los productos farmacéuticos.

20 El método presente se refiere a un proceso para controlar el tiempo y/o temperatura a la que ocurre una transición de fase nucleada en un material. En aplicaciones de congelación, la probabilidad de que un material se nucleee espontáneamente y comience a cambiar de fase se relaciona con el grado de subenfriamiento del material y la ausencia o presencia de contaminantes, aditivos, estructuras o perturbaciones que proporcionan un sitio o superficie para la nucleación.

25 El paso de congelación o solidificación es particularmente importante en el proceso de secado por congelación donde las técnicas existentes dan como resultado diferencias de temperatura de nucleación en una multitud de viales o contenedores. Las diferencias de temperatura de nucleación tienden a producir un producto no uniforme y un tiempo de secado excesivamente largo. Los métodos presentes, por otro lado, proporcionan un mayor grado de control del proceso en procesos de solidificación por lotes (por ejemplo, secado por congelación) y producen un producto con una
30 estructura y propiedades más uniformes. A diferencia de algunas de las técnicas de la técnica anterior para inducir la nucleación, los métodos presentes requieren un equipo y cambios operativos mínimos para su implementación.

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

40 El método que se divulga actualmente representa una mejora en los procesos actuales de liofilización farmacéutica. Por ejemplo, dentro de un gran secador por congelación industrial puede haber más de 100.000 viales que contienen un producto farmacéutico que se necesita congelar y secar. La práctica actual en la industria es enfriar la solución en un grado muy alto para garantizar que la solución en todos los viales o contenedores en el secador por congelación se congele. Sin embargo, el contenido de cada vial o contenedor se congela aleatoriamente en un rango de temperaturas por debajo del punto de congelación, porque el proceso de nucleación no está controlado.

45 Volviendo ahora a las Figuras, y en particular a la Fig. 1, se representa un gráfico de temperatura versus tiempo de seis viales de una solución acuosa que se somete a un proceso de nucleación estocástico convencional que muestra el rango típico de temperaturas de nucleación de la solución dentro de los viales (11, 12, 13, 14, 15 y 16). Como se ve allí, los contenidos del vial tienen una temperatura de congelación termodinámica de aproximadamente 0°C, pero la solución dentro de cada vial se nuclea naturalmente en el rango amplio de temperatura de aproximadamente -7°C a -
50 20°C o más, como se destaca en el área 18. La gráfica 19 representa la temperatura del estante dentro de la cámara de secado por congelación.

Por el contrario, la Fig. 2 y la Fig. 3 representan gráficos de temperatura versus tiempo de una solución que se somete a un proceso de congelación con nucleación despresurizada de acuerdo con los métodos presentes. En particular, la Fig. 2 muestra el gráfico de temperatura versus tiempo de seis viales de una solución acuosa que se somete a un
55 proceso de enfriamiento equilibrado (Véase el Ejemplo 2) con nucleación que se induce mediante despresurización de la cámara (21, 22, 23, 24, 25 y 26) Los contenidos del vial tienen una temperatura de congelación termodinámica de aproximadamente 0°C, pero la solución dentro de cada vial se nuclea al mismo tiempo tras la despresurización y

dentro de un rango de temperatura muy estrecho (es decir, -4°C a -5°C) como se ve en el área 28. La gráfica 29 representa la temperatura del estante dentro de la cámara de secado por congelación y representa un proceso de congelación equilibrado, uno en el que la temperatura de los estantes se mantiene más o menos estable antes de la despresurización.

- 5 De manera similar, la Fig. 3 muestra el gráfico de temperatura versus tiempo de tres viales de una solución acuosa que se somete a un proceso de enfriamiento dinámico (Véase el Ejemplo 7) con nucleación que se induce mediante despresurización de la cámara (31, 32 y 33). Nuevamente, los contenidos del vial tienen una temperatura de congelación termodinámica de aproximadamente 0°C , pero la solución dentro de cada vial se nuclea al mismo tiempo tras la despresurización en un rango de temperatura de aproximadamente -7°C a -10°C como se ve en el área 38. La gráfica 39 representa la temperatura del estante dentro de la cámara de secado por congelación y representa generalmente un proceso de enfriamiento dinámico, uno en el que la temperatura de los estantes se reduce activamente durante o antes de la despresurización.

- 15 Como se ilustra en las Figuras, los métodos presentes proporcionan un control mejorado del proceso de nucleación al permitir que la congelación de soluciones farmacéuticas en un secador por congelación ocurra dentro de un rango de temperatura más estrecho (por ejemplo, aproximadamente 0°C a -10°C) y/o al mismo tiempo, produciendo de este modo un producto liofilizado con mayor uniformidad de vial a vial. Aunque no se ha demostrado, es previsible que el rango de temperatura de nucleación inducida se pueda extender incluso ligeramente por encima de la temperatura de transición de fase y se puede extender también a aproximadamente 40°C de subenfriamiento.

- 20 Otro beneficio que se asocia con los métodos presentes es que al controlar la temperatura mínima de nucleación y/o el tiempo preciso de nucleación se puede afectar la estructura de cristal de hielo que se forma dentro de los viales o contenedores congelados. La estructura del cristal de hielo es una variable que afecta el tiempo que tarda el hielo en sublimarse. Por lo tanto, al controlar la estructura del cristal de hielo, es posible acelerar en gran medida el proceso general de secado por congelación.

- 25 Volviendo ahora a la Fig. 4, la unidad (200) del secador por congelación ilustrada tiene varios componentes principales más sistemas auxiliares adicionales para llevar a cabo el ciclo de liofilización. En particular, la unidad (200) del secador por congelación incluye una cámara (202) de liofilización que contiene los estantes (204) que se adaptan para contener viales o contenedores de la solución a liofilizar (no se muestra). La solución a liofilizar se formula especialmente y contiene típicamente el ingrediente activo, un sistema solvente y varios agentes de estabilización u otros vehículos o aditivos farmacéuticamente aceptables. La liofilización de esta formulación se realiza a partir de contenedores especializados que se ubican en estantes huecos. Estos contenedores pueden incluir viales con tapones, ampollas, jeringas o, en el caso de liofilización a granel, recipientes.

- 30 La unidad (200) del secador por congelación ilustrada incluye también un condensador (206) que se adapta para eliminar el solvente sublimado y desorbido de la fase de vapor al condensarlo o congelarlo como hielo para mantener un vacío adecuado dentro del secador por congelación. El condensador (206) se puede ubicar internamente en la cámara (202) de liofilización o como una unidad externa separada en comunicación con la cámara (202) de liofilización a través de una denominada válvula de aislamiento. La unidad (200) del secador por congelación incluye también preferiblemente una bomba (208) de vacío que se acopla operativamente al condensador (206) y se adapta para extraer un vacío en la cámara (202) de liofilización y el condensador (206).

- 35 El sistema (210) de refrigeración criogénica proporciona los medios de control de temperatura para la unidad (200) del secador por congelación al enfriar un fluido de transferencia de calor prescrito que circula a los estantes (204) dentro de la cámara (202) de liofilización y el condensador (206). Como se ilustra, el sistema (210) de refrigeración criogénica comprende una fuente de criógeno (218), tal como nitrógeno líquido, un intercambiador (220) de calor criogénico y un circuito (222) de fluido de transferencia de calor, un respiradero (224), un calentador (226) y bombas (227, 228).

- 40 El intercambiador (220) de calor criogénico es preferiblemente un sistema de intercambio de calor criogénico no congelante NCOOL™ disponible en Praxair, Inc. Un aspecto importante del intercambiador (220) de calor criogénico es la vaporización del nitrógeno líquido dentro de o al interior del intercambiador de calor, pero de una manera que evita el contacto directo del nitrógeno líquido sobre las superficies de enfriamiento que se exponen al fluido de transferencia de calor. Los detalles de la estructura y el funcionamiento de dicho intercambiador de calor se pueden encontrar en la Patente de los Estados Unidos No. 5,937,656 (Cheng et al.).

- 45 El circuito (222) de fluido de transferencia de calor prescrito se adapta para hacer circular un fluido de transferencia de calor y se acopla operativamente tanto a la cámara (202) de liofilización como al condensador (206). Más específicamente, el fluido de transferencia de calor circula dentro de los estantes (204) huecos dentro de la cámara (202) de liofilización para comunicar con precisión el enfriamiento o calentamiento a través de los estantes (204) a la solución según sea necesario. Además, el fluido de transferencia de calor prescrito fluye también a través del condensador (206) para proporcionar los medios de enfriamiento necesarios para sublimar el hielo y desorber aún más el solvente.

La bomba (227) y el calentador (226) se disponen a lo largo del circuito (222) de fluido de transferencia de calor aguas arriba de la cámara (202) de liofilización y aguas abajo del intercambiador (220) de calor criogénico. La bomba (227)

se dimensiona para mover el fluido de transferencia de calor a través del circuito (222) de transferencia de calor a los flujos requeridos. El calentador (226) es preferiblemente un calentador eléctrico que se adapta para proporcionar, durante los procesos de secado, calor suplementario al fluido de transferencia de calor y la cámara (202) de liofilización según sea necesario.

5 Como se ve en la realización de la Fig. 4, el condensador (206) se enfría también mediante un fluido de transferencia de calor de baja temperatura de recirculación. La refrigeración del fluido de transferencia de calor que fluye a través del condensador (206) se proporciona también mediante un intercambiador (220) de calor criogénico. El intercambiador (220) de calor criogénico es capaz de enfriar el fluido de transferencia de calor continuamente sin congelarlo. Durante las fases de secado, el intercambiador (220) de calor criogénico se configura o adapta para
10 alcanzar la temperatura más baja que se requiere para el condensador (206). Como se describió anteriormente, el intercambiador (220) de calor criogénico evapora previamente el nitrógeno líquido en un gas frío criogénico para la transferencia de calor al fluido de transferencia de calor. A través de la evaporación previa del nitrógeno líquido se asegura que el nitrógeno líquido evite la ebullición directamente sobre una superficie de intercambio de calor donde el fluido de transferencia de calor se dispone en el otro lado. Tal disposición evita la congelación del intercambiador (220)
15 de calor criogénico ya que el nitrógeno líquido hierve a aproximadamente -195 grados centígrados a presión atmosférica.

La realización ilustrada de la figura 4 incluye también un medio para controlar la atmósfera de gas de la cámara (250) de liofilización, y en particular la composición y la presión del gas dentro de la cámara (202). Controlar la presión de la cámara (202) permite la presurización y la despresurización rápidas de la cámara para inducir la nucleación de la
20 solución. La realización que se divulga usa preferiblemente una o más válvulas (252) de control de flujo que se adaptan de manera controlable para facilitar la introducción de una atmósfera de gas presurizado a la cámara (202) desde una fuente de gas (no se muestra) y para despresurizar la cámara al ventilar la atmósfera de gas presurizado fuera de la cámara (202) de manera controlada y preferiblemente rápida, induciendo de este modo la nucleación de la solución en los diversos contenedores o viales.

25 Aunque no se muestra, la unidad (200) del secador por congelación incluye también varios sistemas de hardware y software de control que se adaptan para ordenar y coordinar las diversas partes del equipo del secador por congelación, y llevar a cabo el ciclo de liofilización que se programa previamente. Los diversos sistemas de hardware y software de control pueden proporcionar también documentación, registro de datos, alarmas y capacidades de seguridad del sistema también. Además, los sistemas auxiliares de la unidad (200) del secador por congelación
30 pueden incluir varios subsistemas para limpiar y esterilizar la cámara (202) de liofilización, autocargar y descargar el producto en la cámara (202) de liofilización; y accesorios del sistema criogénico asociados, tales como plataformas de refrigeración, tanques de nitrógeno líquido, tuberías, válvulas, sensores, etc.

En un sentido amplio, los métodos que se divulgan actualmente para inducir la nucleación de una transición de fase dentro de un material comprenden los pasos de: (i) enfriar el material a una temperatura cercana o inferior a 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 uno de estos pasos importantes se discutirá con más detalle a continuación.
35

Paso 1 – Enfriar el material

Los materiales ilustrativos útiles en el método presente incluyen sustancias puras, gases, suspensiones, geles, líquidos, soluciones, mezclas o componentes dentro de una solución o mezcla. Los materiales adecuados para su uso
40 en el método presente pueden incluir, por ejemplo, materiales farmacéuticos, materiales biofarmacéuticos, alimentos, materiales químicos, y pueden incluir productos tales como productos para el cuidado de heridas, cosméticos, productos veterinarios y productos que se relacionan con el diagnóstico *in vivo/in vitro* y similares. Cuando el material es un líquido, puede ser deseable disolver gases en el líquido. Los líquidos en un ambiente de gas controlado tendrán generalmente gases disueltos en ellos.

45 Otros materiales ilustrativos útiles en el método presente incluyen material biológico o biofarmacéutico tales como tejidos, órganos y estructuras multicelulares. Para ciertas aplicaciones biológicas y farmacéuticas, el material puede ser una solución o mezcla que incluye: virus vivos o atenuados; ácidos nucleicos; anticuerpos monoclonales; anticuerpos policlonales; biomoléculas; análogos no peptídicos; péptidos, incluidos polipéptidos, péptidos miméticos y péptidos modificados; proteínas, que incluyen proteínas de fusión y modificadas; ARN, ADN y subclases de los mismos; oligonucleótidos; partículas virales; y similares de tales materiales o componentes de los mismos.
50

Las soluciones farmacéuticas o biofarmacéuticas que se contienen en viales o contenedores para secado por congelación serían un buen ejemplo de un material que se beneficiaría del método presente. Las soluciones son principalmente agua y son sustancialmente incompresibles.

55 Estas soluciones farmacéuticas o biofarmacéuticas son también altamente puras y están generalmente libres de partículas que pueden formar sitios para la nucleación. La temperatura de nucleación uniforme es importante para crear una estructura de cristal de hielo consistente y uniforme de vial a vial o de contenedor a contenedor. La estructura de cristal de hielo que se desarrolla afecta también en gran medida el tiempo que se requiere para el secado.

5 Cuando se aplica a un proceso desecado por congelación, el material se coloca preferiblemente en una cámara, tal como una cámara de secado por congelación. Preferiblemente, la cámara se configura para permitir el control de la temperatura, la presión y la atmósfera de gas dentro de la cámara. La atmósfera de gas puede incluir, entre otros: argón, nitrógeno, helio, aire, vapor de agua, oxígeno, dióxido de carbono, monóxido de carbono, óxido nítrico, óxido nítrico, neón, xenón, criptón, metano, hidrógeno, propano, butano y similares, incluidas las mezclas que se permiten de los mismos. La atmósfera de gas preferida comprende un gas inerte, tal como el argón, a una presión entre aproximadamente 7 y aproximadamente 50 psig o más. Las temperaturas dentro de la cámara del secador por congelación se dictan a menudo mediante el proceso de secado por congelación y se controlan fácilmente por medio del uso de un fluido de transferencia de calor que enfría o calienta los estantes dentro de la cámara para controlar la temperatura de los viales o contenedores y el material dentro cada vial o contenedor.

10 De acuerdo con los métodos presentes, el material se enfría a una temperatura cercana o inferior a su temperatura de transición de fase. En el caso de una solución acuosa que se somete a un proceso de secado por congelación, la temperatura de transición de fase es el punto de congelación termodinámico de la solución. Cuando la solución alcanza temperaturas por debajo del punto de congelación termodinámica de la solución, se dice que está subenfriada. Cuando se aplica a un proceso de congelación de una solución acuosa, el método presente es efectivo cuando el grado de subenfriamiento varía desde cerca o por debajo de la temperatura de transición de fase hasta aproximadamente 40°C de subenfriamiento, y más preferiblemente entre aproximadamente 3°C de subenfriamiento y 10°C de subenfriamiento. En algunos de los ejemplos que se describen a continuación, el método presente para inducir la nucleación funciona deseablemente incluso cuando la solución tiene solo aproximadamente 1°C de subenfriamiento por debajo de su punto de congelación termodinámica.

15 Cuando el material está a una temperatura por debajo de su temperatura de transición de fase, se lo denomina a menudo estado metaestable. Un estado metaestable es un estado inestable y transitorio, pero relativamente longevo, de un sistema químico o biológico. Un material metaestable existe temporalmente en una fase o estado que no es su fase o estado de equilibrio. En ausencia de cualquier cambio en el material o su ambiente, un material metaestable pasará eventualmente de su estado de no equilibrio a su estado de equilibrio. Los materiales metaestables ilustrativos incluyen soluciones sobresaturadas y líquidos subenfriados.

20 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 de hielo. El agua extremadamente pura se puede enfriar a temperaturas muy bajas (-30°C a -40°C) a presión atmosférica y aún permanecer en estado líquido. Dicha agua subenfriada se encuentra en un estado termodinámicamente metaestable no equilibrado. Solo le falta un evento de nucleación para causar que comience la transición de fase por la cual volverá al equilibrio.

25 Como se discutió anteriormente, los métodos presentes para inducir la nucleación de una transición de fase dentro de un material o congelar un material se pueden usar con varios perfiles de enfriamiento, que incluyen, por ejemplo, un ambiente de enfriamiento equilibrado o un ambiente de enfriamiento dinámico (Véase las Figuras 2 y 3).

Paso 2 – Disminuir rápidamente la presión

30 Cuando el material ha alcanzado la temperatura deseada cerca o por debajo de la temperatura de transición de fase, la cámara se despresuriza rápida o velozmente. Esta despresurización desencadena la nucleación y la transición de fase de la solución dentro de los viales o contenedores. En la realización preferida, la despresurización de la cámara se logra al abrir o abrir parcialmente una válvula de control grande que separa la cámara de alta presión del ambiente o de una cámara o ambiente de baja presión. La presión elevada se reduce rápidamente mediante el flujo de masa de la atmósfera de gas fuera de la cámara. La despresurización debe ser bastante rápida para inducir la nucleación. La despresurización se debe terminar en varios segundos o menos, preferiblemente 40 segundos o menos, más preferiblemente 20 segundos o menos, y lo más preferiblemente 10 segundos o menos.

35 En aplicaciones típicas de secado por congelación, la diferencia de presión entre la presión inicial de la cámara y la presión final de la cámara, después de la despresurización, debe ser mayor de aproximadamente 7 psi, aunque las caídas de presión más pequeñas pueden inducir la nucleación en algunas situaciones. La mayoría de los secadores por congelación comerciales pueden acomodar fácilmente el rango de caídas de presión necesarias para controlar la nucleación. Muchos secadores por congelación se diseñan con valores de presión superiores a 25 psig para soportar los procedimientos de esterilización convencionales que emplean vapor saturado a 121°C. Tales clasificaciones de equipo proporcionan una ventana amplia para inducir la nucleación siguiendo protocolos que despresurizan desde presiones iniciales por encima de la presión ambiental o la presión en el ambiente circundante. La presión elevada y la despresurización posterior se pueden lograr a través de cualquier medio conocido (por ejemplo, neumático, hidráulico o mecánico). En las realizaciones preferidas, las presiones operativas para los métodos presentes deben permanecer por debajo de la presión supercrítica de cualquier gas que se aplica, y se debe evitar someter el material a presiones extremadamente bajas (es decir, aproximadamente 10 mTorr o menos) durante la nucleación del material.

Mientras que no se desee vincularse a ningún mecanismo en particular, un posible mecanismo para explicar la nucleación controlada que se observa en la práctica del método presente es que los gases en solución en el material

salen de la solución tras la despresurización y forman burbujas que nuclean el material. Una presión elevada inicial aumenta la concentración de gas que se disuelve en la solución. La disminución veloz de la presión después del enfriamiento reduce la solubilidad del gas, y la liberación posterior de gas de la solución subenfriada desencadena la nucleación de la transición de fase.

- 5 Otro posible mecanismo es que la disminución de la temperatura del gas cercano al material durante la despresurización causa un punto frío en la superficie del material que inicia la nucleación. Otro posible mecanismo es que la despresurización causa la evaporación de algún líquido en el material y el enfriamiento resultante del proceso de evaporación endotérmica puede iniciar la nucleación. Otro mecanismo posible es que el gas frío despresurizado cercano al material congele algo de vapor en equilibrio con el material antes de la despresurización o se libere del material mediante evaporación durante la despresurización; las partículas sólidas resultantes vuelven a entrar en el material y actúan como semillas o superficies para iniciar la nucleación. Uno o más de estos mecanismos pueden contribuir al inicio de la nucleación de congelación o solidificación en diferentes grados dependiendo de la naturaleza del material, su ambiente y la transición de fase que se nuclea.

- 15 El proceso se puede llevar a cabo completamente a una presión mayor que la presión ambiental o en un rango de presiones que abarcan la presión ambiental. Por ejemplo, la presión inicial de la cámara puede estar por encima de la presión ambiental y la presión final de la cámara, después de la despresurización, puede estar por encima de la presión ambiental pero 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 final de la cámara, después de la despresurización, puede estar aproximadamente a la presión ambiental o ligeramente por debajo de la presión ambiental.

- 20 Se cree también que la tasa y la magnitud de la caída de presión son un aspecto importante de los métodos presentes. Los experimentos han demostrado que se inducirá la nucleación cuando la caída de presión (ΔP) sea mayor que aproximadamente 7 psi. Alternativamente, la magnitud de la caída de presión se puede expresar como una relación de presión absoluta, $R = P_i / P_f$, donde P_i es la presión absoluta inicial y P_f es la presión absoluta final. Se cree que la nucleación se puede inducir mediante la despresurización donde la relación de presión absoluta, R , es mayor que aproximadamente 1,2 en muchas aplicaciones prácticas de los métodos presentes. La tasa de caída de presión juega también un papel importante en los métodos presentes. Un método para caracterizar la tasa de caída de presión es a través del uso de un parámetro, A , donde $A = \Delta P / \Delta t$. Nuevamente, se supone que se inducirá la nucleación para valores de A mayores que un valor prescrito, tal como aproximadamente 0,2 psi/seg. Los datos empíricos a través de la experimentación deberían ayudar a determinar la caída de presión preferida y la tasa de caída de presión.

- 30 Los siguientes ejemplos resaltan varios aspectos y características de los métodos que se describen actualmente para inducir la nucleación en un material y no se deben tomar en un sentido limitante. Por el contrario, estos ejemplos son solo ilustrativos y el alcance de la invención se debe determinar solo con respecto a las reivindicaciones adjuntas a la presente.

Ejemplos

- 35 Todos los ejemplos que se describen en este documento se realizaron en un secador por congelación VirTis 51-SRC a escala piloto que tiene cuatro estantes con aproximadamente 1,0 m² de espacio total en estantes y un condensador interno. Esta unidad se adaptó para mantener presiones positivas de hasta aproximadamente 15 psig. Se agregó también una abertura circular de 1,5" de diámetro a la pared posterior de la cámara de secado por congelación con tubería de acero inoxidable de 1,5" de diámetro que se extiende desde el orificio a través del aislamiento de la pared posterior para salir de la parte posterior del secador por congelación. Dos válvulas de bola que se accionan mediante aire de puerto completo de 1,5" se unieron a esta tubería a través de accesorios sanitarios. Una válvula de bola permitió que el gas fluyera hacia la cámara de secado por congelación y por lo tanto proporcionara presiones positivas de hasta 15 psig. La segunda válvula de bola permitió que el gas saliera de la cámara de secado por congelación y, por lo tanto, redujera la presión de la cámara a las condiciones atmosféricas (0 psig). Toda la refrigeración de los estantes del secador por congelación y el condensador se realizó a través de la circulación del fluido de transferencia de calor Dynalene MV que se enfría mediante nitrógeno líquido usando el Sistema Praxair NCool™-HX.

- 50 Todas las soluciones se prepararon en una sala blanca de clase 100. El secador por congelación se colocó con la puerta, los estantes y los controles accesibles desde la sala blanca, mientras que los otros componentes (bombas, calentadores, etc.) se ubicaron en un ambiente de sala no limpia. Todas las soluciones se prepararon con agua de grado HPLC (Fisher Scientific, que se filtró a través de membrana de 0,10 μm). Las soluciones finales se filtraron a través de una membrana de 0,22 μm antes de llenar los viales o los contenedores de liofilización. Todos los gases se suministraron a través de cilindros y se filtraron a través de filtros de 0,22 μm para eliminar las partículas. Se obtuvieron contenedores de vidrio (viales de 5 ml y botellas de 60 ml) limpios previamente de partículas, de Wheaton Science Products. Se usaron vehículos farmacéuticamente aceptables cuando fue apropiado. Los pasos anteriores se tomaron para garantizar que los materiales y métodos cumplieran con los estándares convencionales de fabricación farmacéutica de partículas, que actúan como agentes nucleantes.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, antioxidantes, sales, recubrimientos, tensioactivos, conservantes (por ejemplo, el p-hidroxibenzoato de metilo o propilo, el ácido sórbico, los agentes antibacterianos, los agentes antifúngicos), agentes

isotónicos, agentes retardantes de la solución (por ejemplo, la parafina), absorbentes (por ejemplo, la arcilla de caolín, la arcilla de bentonita), estabilizadores de fármacos (por ejemplo, el laurilsulfato de sodio), geles, aglutinantes (por ejemplo, el jarabe, la acacia, la gelatina, el sorbitol, el tragacanto, la polivinilpirrolidona, la carboximetilcelulosa, los alginatos), excipientes (por ejemplo, la lactosa, el azúcar de la leche, el polietilenglicol), agente de desintegración (por ejemplo, el agar-agar, el almidón, la lactosa, el fosfato de calcio, el carbonato de calcio, el ácido algínico, el sorbitol, el glicina), agentes humectantes (por ejemplo, el alcohol cetílico, el monoestearato de glicerol), lubricantes, aceleradores de absorción (por ejemplo, las sales de amonio cuaternario), aceites comestibles (por ejemplo, el aceite de almendras, el aceite de coco, los ésteres oleosos o el propilenglicol), agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes, rellenos (por ejemplo, el almidón, la lactosa, la sacarosa, la glucosa, el manitol), lubricantes para tabletas (por ejemplo, el estearato de magnesio, el almidón, la glucosa, la lactosa, la flor de arroz, la tiza), vehículos para inhalación (por ejemplo, los propulsores de hidrocarburos), agentes reguladores, o tales materiales similares y combinaciones de los mismos, como un experto en la materia los conociera.

Para las condiciones experimentales que se describen en este documento y todas las formulaciones de liofilización que se estudiaron, se observó típicamente que la nucleación estocástica ocurre a temperaturas del contenedor entre aproximadamente -8°C y -20°C y ocasionalmente tan cálida como -5°C. Los contenedores se pueden mantener generalmente a temperaturas más altas que -8°C durante largos períodos de tiempo sin nucleación. El inicio de la nucleación y el crecimiento posterior de los cristales (es decir, congelación) se determinó mediante medición de temperatura como el punto en el que la temperatura del contenedor aumentó rápidamente en respuesta al calor de fusión latente exotérmico. El inicio de la congelación se podría determinar también visualmente a través de una mirilla en la puerta de la cámara del secador por congelación.

Ejemplo 1 – Controlar la Temperatura de Nucleación

Se llenaron cuatro viales separados con 2,5 ml de solución de manitol al 5% p/p. El punto de congelación termodinámico previsto de la solución de manitol al 5% p/p es aproximadamente -0,5°C. Los cuatro viales se colocaron en un estante de un secador por congelación muy cerca uno del otro. Las temperaturas de los cuatro viales se monitorearon usando termopares montados en la superficie. El secador por congelación se presurizó con argón a 14 psig.

El estante del secador por congelación se enfrió para obtener temperaturas del vial de entre aproximadamente -1,3°C y aproximadamente -2,3°C (precisión de medición de +/- 1°C de los termopares). El secador por congelación se despresurizó luego desde aproximadamente 14 psig a aproximadamente la presión atmosférica en menos de cinco segundos para inducir la nucleación de la solución 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 a continuación.

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

Tabla 1. Controlar la Temperatura de Nucleación

Vial #	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Caída de presión [psi]	Resultado de la Despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-2,3	14	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-1,3	14	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-2,1	14	Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-1,7	14	Nucleación

Ejemplo 2 – Controlar la Temperatura de Nucleación

En este ejemplo, se llenaron noventa y cinco viales con 2,5 ml de solución de manitol al 5% p/p. El punto de congelación termodinámico de la solución de manitol al 5% p/p es aproximadamente -0,5°C. Los noventa y cinco viales se colocaron en un estante de un secador por congelación muy cerca uno del otro. La temperatura de seis viales que se colocaron en diferentes lugares en el estante del secador por congelación se monitoreó continuamente usando termopares montados en la superficie. El secador por congelación se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente

14 psig. El estante del secador por congelación se enfrió luego para obtener temperaturas del vial cercanas a -5°C. El secador por congelación se despresurizó luego desde aproximadamente 14 psig a aproximadamente la presión atmosférica en menos de cinco segundos para inducir la nucleación de la solución dentro de los viales. Se observó visualmente que todos los noventa y cinco viales se nuclearon y comenzaron a congelarse inmediatamente después de la despresurización. Los datos del termopar para los seis viales que se monitorearon confirmaron la observación visual. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Como se ve en el presente documento, las temperaturas de nucleación controladas en este ejemplo (es decir, las temperaturas iniciales del vial) están algo por debajo del punto de congelación termodinámico previsto de la solución. Por lo tanto, el método presente permite el control de la nucleación en soluciones que tienen un grado moderado de subenfriamiento. Este ejemplo demuestra también la escalabilidad del método presente para una aplicación de múltiples viales.

Tabla 2. Controlar la Temperatura de Nucleación

Vial #	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Caída de presión [psi]	Resultado de la Despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-4,2	14	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-4,4	14	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-4,6	14	Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-4,4	14	Nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-4,6	14	Nucleación
6	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,1	14	Nucleación

Ejemplo 3 – Controlar la Magnitud de Despresurización

En este ejemplo, se llenaron múltiples viales con 2,5 ml de solución de manitol al 5% p/p. Nuevamente, el punto de congelación termodinámico previsto de la solución de manitol al 5% p/p es aproximadamente -0,5°C. Para cada ensayo, los viales se colocaron en un estante de un secador por congelación muy cerca uno del otro. Al igual que con los ejemplos que se describieron anteriormente, las temperaturas de los viales se monitorearon usando termopares montados en la superficie. La atmósfera de argón en el secador por congelación se presurizó a diferentes presiones y el estante del secador por congelación se enfrió para obtener temperaturas del vial de aproximadamente -5°C. En cada ensayo, el secador por congelación se despresurizó velozmente (es decir, en menos de cinco segundos) desde la presión que se seleccionó a la presión atmosférica en un esfuerzo por inducir la nucleación de la solución dentro de los viales. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Como se ve en la Tabla 3, la nucleación controlada ocurrió cuando la caída de presión fue de aproximadamente 7 psi o mayor y la temperatura de nucleación (es decir, la temperatura inicial del vial) estuvo entre aproximadamente -4,7°C y -5,8°C.

Tabla 3. Efecto de la Magnitud de Despresurización

Vial #	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Caída de presión [psi]	Resultado de la Despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-4,7	7	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,1	7	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,3	7	Nucleación

ES 2 748 911 T3

4	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,6	7	Sin Nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,6	7	Nucleación
6	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,8	7	Nucleación
7	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,4	6	Sin Nucleación
8	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,7	6	Sin Nucleación
9	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,8	6	Sin Nucleación
10	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,1	5	Sin Nucleación
11	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,4	5	Sin Nucleación
12	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,5	5	Sin Nucleación
13	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-4,7	4	Sin Nucleación
14	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,1	4	Sin Nucleación
15	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,3	4	Sin Nucleación

Ejemplo 4 – Controlar las Tasas de Despresurización

5 Para este ejemplo, se llenaron múltiples viales con aproximadamente 2,5 ml de solución de manitol al 5% p/p que tienen un punto de congelación termodinámico previsto de aproximadamente -0,5°C. Para cada ensayo de tiempo de despresurización variable, los viales se colocaron en un estante de un secador por congelación muy cerca uno del otro. Al igual que con los ejemplos que se describieron anteriormente, las temperaturas de los viales se monitorearon usando termopares montados en la superficie. Al igual que los ejemplos que se describieron anteriormente, la atmósfera de argón en el secador por congelación se presurizó a aproximadamente 14 psig y el estante se enfrió para obtener temperaturas del vial de aproximadamente -5°C. En cada ensayo, el secador por congelación se despresurizó a diferentes tasas de despresurización desde 14 psig a presión atmosférica en un esfuerzo por inducir la nucleación de la solución dentro de los viales.

10 Para estudiar el efecto de la tasa de despresurización o el tiempo de despresurización, se colocó una válvula de bola de restricción en la salida de la válvula de control de despresurización en la parte trasera del calentador por congelación. Cuando la válvula de restricción está completamente abierta, se logra la despresurización desde aproximadamente 14 psig a aproximadamente 0 psig en aproximadamente 2,5 segundos. Al cerrar solo parcialmente la válvula de restricción, es posible aumentar de forma variable el tiempo de despresurización de la cámara. Al usar la válvula de bola de restricción, se realizaron varios ensayos con la cámara del calentador por congelación que se despresurizó a diferentes tasas para comprobar o determinar el efecto de la tasa de despresurización en la nucleación. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

20 Tabla 4. Efecto del Tiempo de Despresurización

Vial #	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Caída de presión [psi]	Tiempo [seg]	Resultado de la Despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,6	14	300	Sin nucleación

ES 2 748 911 T3

Vial #	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Caída de presión [psi]	Tiempo [seg]	Resultado de la Despresurización
2	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4	14	300	Sin nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,8	14	300	Sin nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,6	14	200	Sin nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4	14	200	Sin nucleación
6	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4	14	200	Sin nucleación
7	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,6	14	100	Sin nucleación
8	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,2	14	100	Sin nucleación
9	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,2	14	100	Sin nucleación
10	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,7	14	60	Sin nucleación
11	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	14	60	Sin nucleación
12	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	14	60	Sin nucleación
13	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	14	50	Sin nucleación
14	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,3	14	50	Sin nucleación
15	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,9	14	50	Sin nucleación
16	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,4	14	42	Sin nucleación
17	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,5	14	42	Sin nucleación
18	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,0	14	42	Sin nucleación
19	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,1	14	32	Nucleación

ES 2 748 911 T3

Vial #	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Caída de presión [psi]	Tiempo [seg]	Resultado de la Despresurización
20	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,7	14	32	Nucleación
21	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,6	14	32	Nucleación
22	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-4,7	14	13	Nucleación
23	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,3	14	13	Nucleación
24	2,5 ml de manitol al 5% en peso	Argón	-5,5	14	13	Nucleación

5 Como se ve en la Tabla 4, la nucleación solo ocurrió cuando el tiempo de despresurización fue inferior a 42 segundos, la caída de presión fue de aproximadamente 14 psi o mayor y la temperatura de nucleación (es decir, la temperatura inicial del vial) estuvo entre aproximadamente -4,6°C y aproximadamente -5,8°C. Estos resultados indican que la despresurización se debe realizar relativamente rápido para que el método sea efectivo.

Ejemplo 5 – Controlar la Atmósfera de Gas

10 Nuevamente, se llenaron múltiples viales con aproximadamente 2,5 ml de solución de manitol al 5% p/p y se colocaron en un estante de un secador por congelación muy cerca uno del otro. Al igual que con los ejemplos que se describieron anteriormente, la temperatura de los viales de prueba se monitoreó usando termopares montados en la superficie. Para los diferentes ensayos, la atmósfera de gas en el secador por congelación se varió siempre manteniendo una presión positiva de aproximadamente 14 psig. En este ejemplo, el estante del secador por congelación se enfrió para obtener temperaturas del vial de aproximadamente -5°C a -7°C. En cada ensayo, el secador por congelación se despresurizó velozmente desde aproximadamente 14 psig a la presión atmosférica en un esfuerzo por inducir la nucleación de la solución dentro de los viales. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

15 Como se ve en el presente documento, la nucleación controlada ocurrió en todas las atmósferas de gas, excepto en la atmósfera de gas helio, donde la caída de presión fue de aproximadamente 14 psi y la temperatura de nucleación (es decir, la temperatura inicial del vial) estuvo entre aproximadamente -4,7 C y aproximadamente -7,4°C. Aunque no se muestra en los ejemplos, se cree que las condiciones alternativas probablemente permitirán la nucleación controlada en una atmósfera de helio.

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

Vial #	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Caída de presión [psi]	Resultado de la Despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-4,9	14	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,2	14	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Nitrógeno	-4,7	14	Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Nitrógeno	-5,1	14	Nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Xenón	-4,8	14	Nucleación

6	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Xenón	-5,0	14	Nucleación
7	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Aire	-7,4	14	Nucleación
8	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Aire	-7,2	14	Nucleación
9	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Helio	-5,8	14	Sin Nucleación
10	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Helio	-5,5	14	Sin Nucleación

Ejemplo 6 – Soluciones de Gran Volumen

5 En este ejemplo, se llenaron seis botellas de liofilización (capacidad de 60 ml) con aproximadamente 30 ml de solución de manitol al 5% p/p que tienen un punto de congelación termodinámico previsto de aproximadamente -0,5°C. Las seis botellas de liofilización se ubicaron en un estante de un secador por congelación muy cerca unas de otras. La temperatura de las seis botellas que se colocaron en diferentes lugares en el estante del secador por congelación se monitoreó usando termopares montados en la superficie. El secador por congelación se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 14 psig. El estante del secador por congelación se enfrió luego para obtener 10 temperaturas de botella cercanas a -5°C. El secador por congelación se despresurizó luego desde 14 psig a aproximadamente la presión atmosférica en menos de cinco segundos para inducir la nucleación de la solución dentro de las botellas. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

15 En un experimento separado, se llenó una bandeja plástica de secado por congelación a granel (Gore LYOGUARD, 1800 ml de capacidad) con aproximadamente 1000 ml de solución de manitol al 5% p/p. Se obtuvo la bandeja previamente limpia para cumplir con los requerimientos USP de partículas bajas. La bandeja se colocó en un estante de un secador por congelación, y la temperatura de la bandeja se controló mediante un termopar montado en la superficie exterior de la bandeja cerca del centro de un lado. El estante del secador por congelación se enfrió luego para obtener una temperatura de la bandeja cercana a -7°C. El secador por congelación se despresurizó luego desde 14 psig a aproximadamente la presión atmosférica en menos de cinco segundos para inducir la nucleación de la solución dentro de la bandeja. Los resultados se resumen también en la Tabla 6.

20 Como los ejemplos que se describen anteriormente, todos los contenedores se nuclearon y comenzaron a congelarse inmediatamente después de la despresurización. También, como los ejemplos que se describieron anteriormente, las temperaturas de nucleación (es decir, las temperaturas del contenedor) en este ejemplo eran muy controlables para estar algo cerca de la temperatura de congelación termodinámica de la solución.

25 Más importante aún, este ejemplo ilustra que el método presente permite que el control de la nucleación ocurra en soluciones de mayor volumen y varios formatos de contenedor. Se debe notar que uno esperaría que la eficacia del método de despresurización mejore a medida que aumenta el volumen de la formulación, porque es más probable que ocurra el evento de nucleación cuando hay más moléculas presentes para agregarse y formar núcleos críticos.

Tabla 6. Efecto del Volumen de la Solución y el Tipo de Contenedor

Contenedor	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Caída de presión [psi]	Resultado de la Despresurización
Botella #1	30 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,3	14	Nucleación
Botella #2	30 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,1	14	Nucleación
Botella #3	30 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,9	14	Nucleación
Botella #4	30 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,2	14	Nucleación
Botella #5	30 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-5,9	14	Nucleación

ES 2 748 911 T3

Botella #6	30 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-6,1	14	Nucleación
Bandeja	1000 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-6,9	14	Nucleación

Ejemplo 7 – Enfriamiento Dinámico vs. Enfriamiento Equilibrado

5 Los métodos presentes para controlar la nucleación se pueden usar de varios modos. Los ejemplos 1-6, que se describen anteriormente, demuestran el aspecto de controlar la temperatura de nucleación de una solución 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 puede ocurrir también a una temperatura por debajo del punto de congelación termodinámica en un ambiente de enfriamiento dinámico (es decir, la solución experimenta cambios veloces de temperatura).

10 En este ejemplo, los viales 1 a 6 representan las muestras que se describieron anteriormente con referencia al Ejemplo 2. Además, tres viales separados (Viales 7-9) se llenaron también con 2,5 ml de solución de manitol al 5% p/p. En una prueba separada, los tres viales adicionales se ubicaron en un estante de un secador por congelación muy cerca uno del otro. El estante del secador por congelación se enfrió velozmente hacia una temperatura final del estante de -45°C. Cuando uno de los viales alcanzó una temperatura de aproximadamente -5°C, que se midió mediante los termopares montados en la superficie, el secador por congelación se despresurizó velozmente desde aproximadamente 14 psig a 0 psig en un esfuerzo por inducir la nucleación. Los tres viales se nuclearon y comenzaron a congelarse inmediatamente después de la despresurización. Las temperaturas del vial disminuyeron significativamente entre -6,8°C y -9,9°C antes de la nucleación como resultado del ambiente de enfriamiento dinámico. Los resultados comparativos se resumen en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7. Resultados de la Prueba – Efecto del Enfriamiento Dinámico sobre la Nucleación

Vial #	Solución	Modo	Temperatura de Nucleación [°C]	Caída de presión [psi]	Resultado de la Despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Equilibrado	-4,2	14	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Equilibrado	-4,4	14	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Equilibrado	-4,6	14	Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Equilibrado	-4,4	14	Nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Equilibrado	-4,6	14	Nucleación
6	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Equilibrado	-5,1	14	Nucleación
7	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Dinámico	-6,8	14	Nucleación
8	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Dinámico	-7,2	14	Nucleación
9	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Dinámico	-9,9	14	Nucleación

20 La eficacia de los métodos presentes para controlar la nucleación en soluciones de liofilización equilibradas en un rango de temperatura dado o en soluciones de liofilización que se enfrían dinámicamente, proporciona al usuario final dos modos potenciales de aplicación con diferentes beneficios y compensaciones. Al permitir que las soluciones de liofilización se equilibren, el rango de temperaturas de nucleación será estrecho o se minimizará a los límites de rendimiento del propio secador por congelación. El paso de equilibrado puede requerir un tiempo adicional para lograr en relación con los protocolos de congelación convencionales o dinámicos en los que las temperaturas de la cámara

25

y el vial se reducen a menos de aproximadamente -40°C en un solo paso. Sin embargo, el empleo del paso de equilibrado debería producir una uniformidad de nucleación mucho mejor en todos los viales o contenedores, así como la realización de los otros beneficios que se asocian con controlar precisamente la temperatura de nucleación del material.

- 5 Alternativamente, si no se desea equilibrar las temperaturas del material o de la solución de liofilización, se puede implementar simplemente el paso de despresurización en un momento apropiado durante el protocolo normal de congelación o enfriamiento dinámico. La despresurización durante un enfriamiento dinámico producirá una propagación más amplia en las temperaturas de nucleación para el material dentro de los contenedores de liofilización, pero agregará un tiempo mínimo al protocolo de congelación y aún permitirá mitigar los problemas de subenfriamiento extremo.

Ejemplo 8 – Efecto de Diferentes Excipientes

15 El método presente para controlar o inducir la nucleación en un material se puede usar para controlar la temperatura de nucleación de soluciones subenfriadas que contienen diferentes excipientes de liofilización. Este ejemplo demuestra el uso de los métodos presentes con los siguientes excipientes: manitol; hidroxietilalmidón (HES); polietilenglicol (PEG); polivinilpirrolidona (PVP); dextrano; glicina; sorbitol; sacarosa y trehalosa. Para cada excipiente, se llenaron dos viales con 2,5 ml de una solución que contenía 5% p/p del excipiente. Los viales se ubicaron en un estante de un secador por congelación muy cerca uno del otro. El secador por congelación se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 14 psig. El estante del secador por congelación se enfrió para obtener temperaturas del vial cercanas a -3°C y luego se despresurizó velozmente para inducir la nucleación. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Efecto de Diferentes Excipientes de Liofilización

Vial #	Solución/Excipiente	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [$^{\circ}\text{C}$]	Caída de presión [psi]	Resultado de la Despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-3,3	14	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-3,0	14	Nucleación
3	2,5 ml de HES al 5% p/p	Argón	-3,1	14	Nucleación
4	2,5 ml de HES al 5% p/p	Argón	-3,7	14	Nucleación
5	2,5 ml de PEG al 5% p/p	Argón	-3,8	14	Nucleación
6	2,5 ml de PEG al 5% p/p	Argón	-3,4	14	Nucleación
7	2,5 ml de PVP al 5% p/p	Argón	-3,5	14	Nucleación
8	2,5 ml de PVP al 5% p/p	Argón	-3,3	14	Nucleación
9	2,5 ml de dextrano al 5% p/p	Argón	-4,0	14	Nucleación
10	2,5 ml de dextrano al 5% p/p	Argón	-3,1	14	Nucleación
11	2,5 ml de glicina al 5% p/p	Argón	-3,8	14	Nucleación
12	2,5 ml de glicina al 5% p/p	Argón	-3,9	14	Nucleación
13	2,5 ml de sorbitol al 5% p/p	Argón	-3,6	14	Nucleación

Vial #	Solución/Excipiente	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Caída de presión [psi]	Resultado de la Despresurización
14	2,5 ml de sorbitol al 5% p/p	Argón	-3,4	14	Nucleación
15	2,5 ml de sacarosa al 5% p/p	Argón	-3,3	14	Nucleación
16	2,5 ml de sacarosa al 5% p/p	Argón	-3,4	14	Nucleación
17	2,5 ml de trehalosa al 5% p/p	Argón	-3,7	14	Nucleación
18	2,5 ml de trehalosa al 5% p/p	Argón	-3,1	14	Nucleación

Ejemplo 9 – Controlar la Nucleación de Soluciones de Proteína

5 Los métodos presentes y el sistema que se describen en este documento se pueden usar para controlar la temperatura de nucleación de soluciones de proteínas subenfriadas sin efectos negativos o adversos sobre la solubilidad de las proteínas o la actividad enzimática. En este ejemplo se usaron dos proteínas, la albúmina de suero bovino (BSA) y la lactato deshidrogenasa (LDH).

10 Se disolvió la BSA en 5% p/p de manitol a una concentración de 10 mg/ml. Se llenaron tres viales de liofilización con 2,5 ml de la solución de BSA-manitol y se ubicaron en un estante de un secador por congelación muy cerca uno del otro. El secador por congelación se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 14 psig. El estante del secador por congelación se enfrió para obtener temperaturas del vial cercanas a -5°C. El secador por congelación se despresurizó velozmente para inducir la nucleación. Todos los viales de solución de BSA se nuclearon y comenzaron a congelarse inmediatamente después de la despresurización. No se observó precipitación de la proteína tras descongelar.

15 Las proteínas LDH se obtuvieron de dos proveedores diferentes y, para propósitos de claridad, se designan como LDH1 o LDH-2 para distinguir los dos lotes distintos. La LDH-1 se disolvió en 5% p/p de manitol a una concentración de 1 mg/ml. Se llenaron seis viales de liofilización con 2,5 ml de la solución de LDH-1/manitol y se ubicaron en un estante de un secador por congelación muy cerca uno del otro. El secador por congelación se presurizó en una atmósfera de argón a aproximadamente 14 psig. El estante del secador por congelación se enfrió a partir de la temperatura ambiente para obtener temperaturas del vial cercanas a -4°C. El secador por congelación se despresurizó velozmente 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. El estante del secador por congelación se enfrió luego a una tasa de aproximadamente 1°C/min para obtener temperaturas del vial cercanas a -45°C y se mantuvo durante 15 minutos adicionales para garantizar la finalización del proceso de congelación. Después del paso de congelación, el estante del secador por congelación se calentó a una tasa de aproximadamente 1°C/min para elevar las temperaturas del vial a cerca de 5°C. No se observó precipitación de la proteína tras descongelar. Se analizaron los contenidos del vial para determinar la actividad enzimática, y los resultados se compararon con una muestra de control de una solución no congelada de LDH-1/manitol.

30 Como parte del Ejemplo 9, las muestras nucleadas despresurizadas de la solución de LDH-1/manitol se compararon con muestras nucleadas estocásticamente. En las muestras nucleadas estocásticamente de LDH-1, el procedimiento de congelación se repitió sin presurización y despresurización y sin la atmósfera de argón. Específicamente, la LDH-1 se disolvió en 5% p/p de manitol a una concentración de 1 mg/ml. Se llenaron seis viales de liofilización con 2,5 ml de la solución de LDH-1/manitol y se ubicaron en un estante de un secador por congelación muy cerca uno del otro. El estante del secador por congelación se enfrió a partir de la temperatura ambiente a una tasa de aproximadamente 1°C/min para obtener temperaturas del vial cercanas a -45°C y se mantuvo durante 15 minutos para garantizar la finalización del proceso de congelación. Después del paso de congelación, el estante del secador por congelación se calentó a una tasa de aproximadamente 1°C/min para elevar las temperaturas del vial a cerca de 5°C. No se observó precipitación de la proteína tras descongelar. Se analizaron los contenidos del vial para determinar la actividad enzimática, y los resultados se compararon con la misma muestra de control de una solución no congelada de LDH1/manitol.

También como parte del Ejemplo 9, los experimentos que se describieron anteriormente para LDH-1 se repitieron usando LDH-2. La única diferencia fue una temperatura de nucleación controlada cercana a -3°C para la LDH-2 en lugar de -4°C para la LDH-1.

Tabla 9. Controlar la Temperatura de Nucleación de Soluciones de Proteína Subenfriadas

ES 2 748 911 T3

Vial #	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Caída de presión [psi]	Pérdida de la Actividad Enzimática [%]	Resultado de la Despresurización
1	2,5 ml de solución de BSA	Argón	-4,9	14	-	Nucleación
2	2,5 ml de solución de BSA	Argón	-4,3	14	-	Nucleación
3	2,5 ml de solución de BSA	Argón	-5,3	14	-	Nucleación
4	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-3,8	14	9,0	Nucleación
5	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-4,0	14	16,2	Nucleación
6	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-3,7	14	18,4	Nucleación
7	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-4,0	14	23,4	Nucleación
8	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-3,9	14	18,5	Nucleación
9	2,5 ml de solución de LDH-1	Argón	-4,0	14	21,2	Nucleación
10	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-10,4	0	35,7	Nucleación
11	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-16,5	0	35,4	Nucleación
12	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-15,5	0	36,1	Nucleación
13	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-10,5	0	43,9	Nucleación
14	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-9,8	0	24,9	Nucleación
15	2,5 ml de solución de LDH-1	Aire	-11,0	0	39,2	Nucleación
16	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-3,1	14	29,9	Nucleación
17	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-2,9	14	18,9	Nucleación

18	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-3,1	14	23,3	Nucleación
19	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-2,7	14	19,6	Nucleación
20	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-3,1	14	32,1	Nucleación
21	2,5 ml de solución de LDH-2	Argón	-2,6	14	35,2	Nucleación
22	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-5,0	0	38,3	Nucleación
23	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-5,5	0	40,0	Nucleación
24	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-2,3	0	36,5	Nucleación
25	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-3,8	0	42,2	Nucleación
26	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-5,1	0	50,2	Nucleación
27	2,5 ml de solución de LDH-2	Aire	-5,9	0	40,6	Nucleación

5 Como se ve en la Tabla 9, el proceso controlado de nucleación y congelación que se logra a través de la despresurización claramente no disminuye la actividad enzimática en relación con un protocolo de congelación y nucleación estocástica comparable. De hecho, el proceso de nucleación controlada que se logra a través de la despresurización parece preservar mejor la actividad enzimática con una pérdida de actividad media de solo el 17,8% para la LDH-1 y el 26,5% para la LDH-2 en comparación con la pérdida de actividad media de 35,9% para la LDH-1 y 41,3% para la LDH-2 después de la nucleación estocástica.

10 Se debe notar que las temperaturas de nucleación estocástica que se observan para la LDH-2 fueron sustancialmente más cálidas que las temperaturas de nucleación estocástica para la LDH-1. Esta diferencia se puede deber a que algún contaminante actúa como agente nucleante en la LDH-2. Las temperaturas de nucleación estocástica están mucho más cerca de las temperaturas de nucleación controladas para la LDH-2 en comparación con la LDH-1, sin embargo, las mejoras en la retención de la actividad enzimática que se obtiene a través de la nucleación controlada para la LDH-1 y la LDH-2 son similares al 18,1% y 14,8%, respectivamente. Este resultado sugiere que las mejoras en la retención de la actividad enzimática se pueden atribuir parcialmente a las características del proceso de nucleación controlado en sí, no solo a las temperaturas de nucleación más cálidas prescritas que se obtienen a través de la despresurización.

Ejemplo 10 – Reducir el Tiempo de Secado Primario

20 Se preparó una solución de manitol al 5% p/p al mezclar aproximadamente 10,01 gramos de manitol con aproximadamente 190,07 gramos de agua. Los viales se llenaron con 2,5 ml de la solución de manitol al 5% p/p. Los viales se pesaron vacíos y con la solución para determinar la masa de agua que se añade a los viales. Los veinte viales se ubicaron en una bandeja para tubos de ensayo en un estante de un secador por congelación muy cerca uno del otro. Las temperaturas de seis viales se monitorearon usando termopares montados en la superficie; todos los viales que se monitorearon se rodearon por otros viales para mejorar la uniformidad del comportamiento del vial. El secador por congelación se presurizó a aproximadamente 14 psig en una atmósfera de gas controlada de gas argón.

5 El estante del secador por congelación se enfrió desde la temperatura ambiente hasta aproximadamente -6°C para obtener temperaturas del vial de entre aproximadamente -1°C y -2°C. El secador por congelación se despresurizó luego desde aproximadamente 14 psig a aproximadamente la presión atmosférica en menos de cinco segundos para inducir la nucleación de la solución dentro de los viales. Todos los viales que se observaron visualmente o monitorearon a través de termopares se nuclearon y comenzaron a congelarse inmediatamente después de la despresurización.

10 La temperatura del estante se redujo velozmente a aproximadamente -45°C para completar el proceso de congelación. Una vez que todas las temperaturas del vial fueron de aproximadamente -40°C o menos, se vació la cámara del secador por congelación y se inició el proceso de secado primario (es decir, sublimación). Durante este proceso de secado, el estante del secador por congelación 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 durante todo el proceso de secado. El secado primario se detuvo al apagar la bomba de vacío y rellenar la cámara con argón a presión atmosférica. Los viales se retiraron inmediatamente del secador por congelación y se pesaron para determinar cuánta agua se perdió durante el proceso de secado primario.

15 En un experimento separado como parte del Ejemplo 10, se llenaron otros viales con 2,5 ml de la misma solución de manitol al 5% p/p. Los viales se pesaron vacíos y con la solución para determinar la masa de agua que se añade a los viales. Los viales se cargaron en el secador por congelación de la misma manera como se describió anteriormente, y las temperaturas de seis viales se monitorearon nuevamente usando termopares montados en la superficie. El estante del secador por congelación se enfrió velozmente desde la temperatura ambiente hasta aproximadamente -45°C para congelar los viales. La nucleación se produjo estocásticamente entre aproximadamente -15°C y aproximadamente -18°C durante el paso de enfriamiento. Una vez que todas las temperaturas de los viales fueron de aproximadamente -40°C o menos, los viales se secaron de una manera idéntica al método que se describió anteriormente. Tras la conclusión del secado primario, las muestras se retiraron inmediatamente del secador por congelación y se pesaron para determinar cuánta agua se perdió durante el proceso de secado primario.

25 Tabla 10. Aumentar la Temperatura de Nucleación Mejora el Secado Primario

Vial #	Solución	Atmósfera	Temperatura inicial del vial [°C]	Caída de presión [psi]	Pérdida de agua [%]	Resultado de la Despresurización
1	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-1,3	14	89,9	Nucleación
2	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-1,9	14	85,2	Nucleación
3	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-1,3	14	87,1	Nucleación
4	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-2,3	14	88,8	Nucleación
5	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-2,1	14	85,0	Nucleación
6	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Argón	-1,1	14	80,7	Nucleación
7	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Aire	-15,7	0	65,7	-
8	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Aire	-16,7	0	66,9	-
9	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Aire	-14,5	0	64,6	-
10	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Aire	-15,6	0	64,7	-
11	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Aire	-16,5	0	64,1	-

12	2,5 ml de manitol al 5% p/p	Aire	-17,9	0	65,7	-
----	--------------------------------	------	-------	---	------	---

Los resultados del proceso de secado por congelación con nucleación controlada y nucleación estocástica se resumen en la Tabla 10 a continuación. Se debe notar que estos dos experimentos solo difieren en la adición a un experimento de la nucleación controlada a través del paso de despresurización. Como se ve en la Tabla 10, el proceso de nucleación controlada que se logra a través de la despresurización permite la 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 cálidas para el caso de nucleación controlada en comparación con el caso de nucleación estocástica producen una estructura de hielo y una torta liofilizada resultante con propiedades de secado mejoradas dramáticamente. Para la misma cantidad de tiempo de secado, los viales que se nuclearon usando los métodos de despresurización divulgados entre aproximadamente $-1,1^{\circ}\text{C}$ y $-2,3^{\circ}\text{C}$ perdieron un promedio de 86,1% de su agua, mientras que los viales que se nuclearon estocásticamente entre aproximadamente $-14,5^{\circ}\text{C}$ y $-17,9^{\circ}\text{C}$ solo perdieron un promedio de 65,3%. Por lo tanto, los viales que se nuclearon estocásticamente requerirían mucho más tiempo de secado primario para lograr el mismo grado de pérdida de agua que los viales que se nuclearon de manera controlada de acuerdo con los métodos que se divulgan actualmente. La mejora en el tiempo de secado se atribuye probablemente a la formación de cristales de hielo más grandes a temperaturas de nucleación más cálidas. Estos cristales de hielo más grandes dejan poros más grandes tras la sublimación, y los poros más grandes ofrecen menos resistencia al flujo de vapor de agua durante la sublimación adicional.

Aplicabilidad Industrial

El método presente proporciona un método mejorado para controlar la temperatura y/o el tiempo en que los materiales subenfriados, concretamente líquidos o soluciones, se nuclean y luego se congelan. Aunque esta aplicación se centra en parte en el secado por congelación, ocurre un problema similar para cualquier paso 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 fundidos, cristalización de materiales a partir de soluciones sobresaturadas, cristalización de proteínas, producción de nieve artificial, congelación de alimentos, concentración de congelación, cristalización fraccionada, criopreservación o condensación de vapores en líquidos.

El beneficio más inmediato de controlar la temperatura de nucleación de un líquido o solución es la capacidad de controlar el número y el tamaño de los dominios sólidos que se producen mediante la transición de fase. En agua congelada, por ejemplo, la temperatura de nucleación controla directamente el tamaño y el número de cristales de hielo que se forman. En términos generales, los cristales de hielo son menos numerosos y de mayor tamaño cuando la temperatura de nucleación es más cálida.

La capacidad de controlar el número y el tamaño de los dominios sólidos que se producen mediante una transición de fase puede proporcionar beneficios adicionales. En un proceso de secado por congelación, por ejemplo, el número y el tamaño de los cristales de hielo influyen fuertemente en las propiedades de secado de la torta liofilizada. Los cristales de hielo más grandes que se producen mediante temperaturas de nucleación más cálidas dejan poros más grandes tras la sublimación, y los poros más grandes ofrecen menos resistencia al flujo de vapor de agua durante la sublimación posterior. Por lo tanto, el sistema y los métodos que se divulgan proporcionan un medio para aumentar las tasas de secado primario (es decir, sublimación) en los procesos de secado por congelación al aumentar la temperatura de nucleación.

Se puede comprender otro beneficio posible en aplicaciones donde los materiales sensibles se conservan a través de procesos de congelación (es decir, criopreservados). Por ejemplo, un material biológico que incluye, entre otros, muestras de tejido de mamíferos (por ejemplo, sangre de cordón umbilical, biopsia de tejido, óvulos y células espermáticas, etc.), líneas celulares (por ejemplo, mamíferos, levaduras, procariotas, hongos, etc.) y moléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ADN, ARN y subclases de las mismas) congelados en una solución acuosa pueden experimentar diversas tensiones durante el proceso de congelación que pueden afectar la función o actividad del material. La formación de hielo puede alterar físicamente el material o crear cambios severos en la unión interfacial, fuerzas osmóticas, concentraciones de solutos, etc. que el material experimenta. Dado que la nucleación controla la estructura y la cinética de la formación de hielo, puede influir significativamente en estas tensiones. Por lo tanto, el sistema y los métodos presentes proporcionan medios únicos para mitigar las tensiones que se asocian con los procesos de criopreservación y mejorar la recuperación de la función o actividad de los materiales que se criopreservan. Esto representa una mejora con respecto a los métodos convencionales de control de nucleación (por ejemplo, siembra o contacto con superficies frías) que se usan para iniciar la formación de hielo extracelular en algoritmos de criopreservación de dos pasos que se diseñan para células vivas.

Los métodos presentes se pueden aplicar también a soluciones o mezclas complejas que contienen varios constituyentes tanto en aplicaciones de criopreservación como de liofilización. Estas formulaciones son a menudo soluciones con un solvente acuoso-orgánico acuoso, orgánico o mixto que contiene un ingrediente farmacéuticamente activo (por ejemplo, un químico sintético, proteína, péptido o vacuna) y opcionalmente, uno o más constituyentes mitigantes, incluidos los agentes de carga que ayudan prevenir la pérdida física del ingrediente activo durante el

5 secado (por ejemplo, dextrosa, glucosa, glicina, lactosa, maltosa, manitol, polivinilpirrolidona, cloruro de sodio y sorbitol); agentes reguladores o modificadores de toxicidad que ayudan a mantener el pH ambiental o la toxicidad apropiados para el constituyente activo (por ejemplo, ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido láctico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido tartárico y las sales de sodio de los ácidos que se mencionaron antes); agentes estabilizadores que ayudan a preservar la estructura y función del constituyente activo durante el procesamiento o en su forma líquida o seca final (por ejemplo, alanina, dimetilsulfóxido, glicerol, glicina, albúmina sérica humana, polietilenglicol, lisina, polisorbato, sorbitol, sacarosa y trehalosa); agentes que modifican el comportamiento de transición vítrea de la formulación (por ejemplo, polietilenglicol y azúcares) y antioxidantes que protegen el constituyente activo de la degradación (por ejemplo, ascorbato, bisulfito de sodio, formaldehído de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, sulfoxilato y tioglicerol).

10 Dado que la nucleación es típicamente un proceso aleatorio, una pluralidad del mismo material que se somete a condiciones de procesamiento idénticas se podría nuclear a diferentes temperaturas. Como resultado, las propiedades de esos materiales que dependen del comportamiento de nucleación diferirán probablemente a pesar de las condiciones de procesamiento idénticas. El sistema y los métodos que se divulgan proporcionan un medio para controlar las temperaturas de nucleación de una pluralidad de materiales simultáneamente 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 solución en viales separados se puede nuclear estocásticamente en un amplio rango de temperaturas, y como resultado, los productos finales que se secaron por congelación pueden poseer una variabilidad significativa en propiedades críticas como humedad residual, actividad y tiempo de reconstitución. Al controlar la temperatura de nucleación a través del proceso que se divulga actualmente, se puede mejorar dramáticamente la uniformidad de vial a vial de las propiedades del producto de un proceso de secado por congelación.

15 La capacidad de controlar el comportamiento de nucleación de un material puede proporcionar también un beneficio sustancial al reducir el tiempo necesario para desarrollar un proceso industrial que depende de un evento de nucleación no controlado normalmente. Por ejemplo, lleva a menudo muchos meses desarrollar un ciclo exitoso de secado por congelación que se pueda lograr en un período de tiempo razonable, que produzca las propiedades deseadas del producto dentro de la uniformidad especificada y que mantenga una actividad suficiente del ingrediente farmacéutico activo (API). Al proporcionar un medio para controlar la nucleación y, por lo tanto, mejorar potencialmente el tiempo de secado primario, la uniformidad del producto y la actividad API, se debería reducir drásticamente el tiempo necesario para desarrollar protocolos de secado por congelación exitosos.

20 En particular, los beneficios potenciales del proceso de nucleación controlada proporcionarán una mayor flexibilidad para especificar la composición de la formulación a secarse por congelación. Dado que la nucleación controlada puede preservar mejor la API durante el paso de congelación, los usuarios deberían poder minimizar la adición de constituyentes mitigantes (por ejemplo, agentes estabilizadores) a la formulación o elegir combinaciones más simples de constituyentes de formulación para lograr objetivos combinados de estabilidad y procesamiento. Pueden surgir beneficios sinérgicos en los casos en que la nucleación controlada minimiza el uso de agentes estabilizadores u otros componentes atenuantes que alargan inherentemente los tiempos de secado primarios (por ejemplo, al disminuir las temperaturas de transición vítrea de las soluciones acuosas).

25 Los métodos que se divulgan son particularmente adecuados para operaciones de producción o fabricación a gran escala, dado que se pueden realizar usando el mismo equipo y parámetros de proceso que se pueden escalar o adaptar fácilmente para fabricar una amplia gama de productos. El proceso proporciona la nucleación de materiales usando un proceso en el que todas las manipulaciones se pueden llevar a cabo en una sola cámara (por ejemplo, un secador por congelación) y en el que el proceso no requiere el uso de vacío, el uso de aditivos, vibraciones, electrocongelación o similares para inducir la nucleación.

30 A diferencia de la técnica anterior, el método presente no agrega nada al producto liofilizado. Solo requiere que los materiales (por ejemplo, líquidos en los viales) se mantengan inicialmente a una presión específica bajo un ambiente de gas y que la presión se reduzca velozmente a una presión más baja. Cualquier gas que se aplica se eliminará de los viales durante el ciclo de liofilización. Los viales o sus contenidos no entran en contacto ni se tocan con nada excepto el gas. La simple manipulación de la presión ambiental y el ambiente de gas es suficiente por sí sola para lograr ese objetivo. Al confiar únicamente en el cambio de presión ambiental para inducir la nucleación, el método presente que se divulga en el presente documento afecta de manera uniforme y simultánea a todos los viales dentro de un secador por congelación.

35 La realización presente es también menos costosa y más fácil de implementar y mantener que los métodos de la técnica anterior para influir la nucleación en materiales en aplicaciones de liofilización. El método presente permite un secado primario significativamente más rápido en los procesos de liofilización, lo que reduce, de ese modo, los costes de procesamiento de productos farmacéuticos que se secan por congelación. El método presente produce productos liofilizados mucho más uniformes que los métodos de la técnica anterior, reduciendo de este modo las pérdidas de producto y creando barreras de entrada para los procesadores que no pueden cumplir con las especificaciones de uniformidad más estrictas. Este método logra estos beneficios sin contaminar el producto liofilizado. Un mayor control del proceso debería conducir a un producto mejorado y tiempos de proceso más cortos.

5 De lo anterior, se debe apreciar que la presente invención proporciona por lo tanto un sistema y método de liofilización. Diversas modificaciones, cambios y variaciones de los métodos presentes serán evidentes para un experto en la técnica. Por ejemplo, los medios para controlar la temperatura pueden ser sistemas de enfriamiento alternativos que se basan en criogenia o sistemas de refrigeración mecánica convencionales o avanzados. Asimismo, los medios para controlar la presión y la atmósfera de gas en la cámara se contemplan específicamente para incluir técnicas que se conocen de presurización y despresurización. Se debe entender que tales configuraciones alternativas, modificaciones, cambios y variaciones se deben incluir dentro del ámbito de esta solicitud y el alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para liofilizar un material dentro de una cámara de un secador por congelación que comprende los pasos de:
 - 5 presurizar la atmósfera de gas dentro de la cámara del secador por congelación a un nivel de presión por encima de la presión ambiental, siendo el nivel de presión como máximo 172 kPa (25 psi) por encima de la presión ambiental;
 - enfriar el material a una temperatura cercana o inferior a una temperatura de transición de fase en la atmósfera de gas presurizado;
 - disminuyendo velozmente la presión para inducir la nucleación de congelación en el material;
 - enfriar adicionalmente el material nucleado a o por debajo de una temperatura final para congelar el material; y
 - 10 secar el material para producir un producto seco que tiene humedad o solvente reducidos.
2. El método de liofilización como se establece en la reivindicación 1, en el que el material se selecciona del grupo que consiste en: un material biofarmacéutico, un material farmacéutico, un material biológico o combinaciones de los mismos.
3. El método de liofilización como se establece en la reivindicación 1, en el que la atmósfera de gas a presión comprende un gas inerte.
4. El método de liofilización como se establece en la reivindicación 1, en el que la atmósfera de gas a presión comprende un gas que se selecciona del grupo que consiste en:
 - 15 argón, nitrógeno, helio, xenón, aire o mezclas de los mismos.
5. El método de liofilización como se establece en la reivindicación 1, en el que el paso de disminuir rápidamente la presión para inducir la nucleación de congelación en el material comprende además disminuir rápidamente la presión en 48 kPa (7 psi) o más.
6. El método de liofilización como se establece en la reivindicación 1, en el que el paso de disminuir rápidamente la presión para inducir la nucleación de congelación en el material comprende además disminuir rápidamente la presión de modo que una relación de presión absoluta, P_i / P_f , sea 1.2 o mayor.
7. El método de liofilización como se establece en la reivindicación 1, en el que el paso de disminuir rápidamente la presión para inducir la nucleación de congelación en el material comprende además disminuir rápidamente la presión a una caída de la tasa de presión, $\Delta P / \Delta t$, mayor que 1,38 kPa (0,2 psi) por segundo.
8. El método de liofilización como se establece en la reivindicación 1, en el que el paso de disminuir rápidamente la presión para inducir la nucleación de congelación en el material comprende además disminuir rápidamente la presión en 10 segundos o menos.
- 30

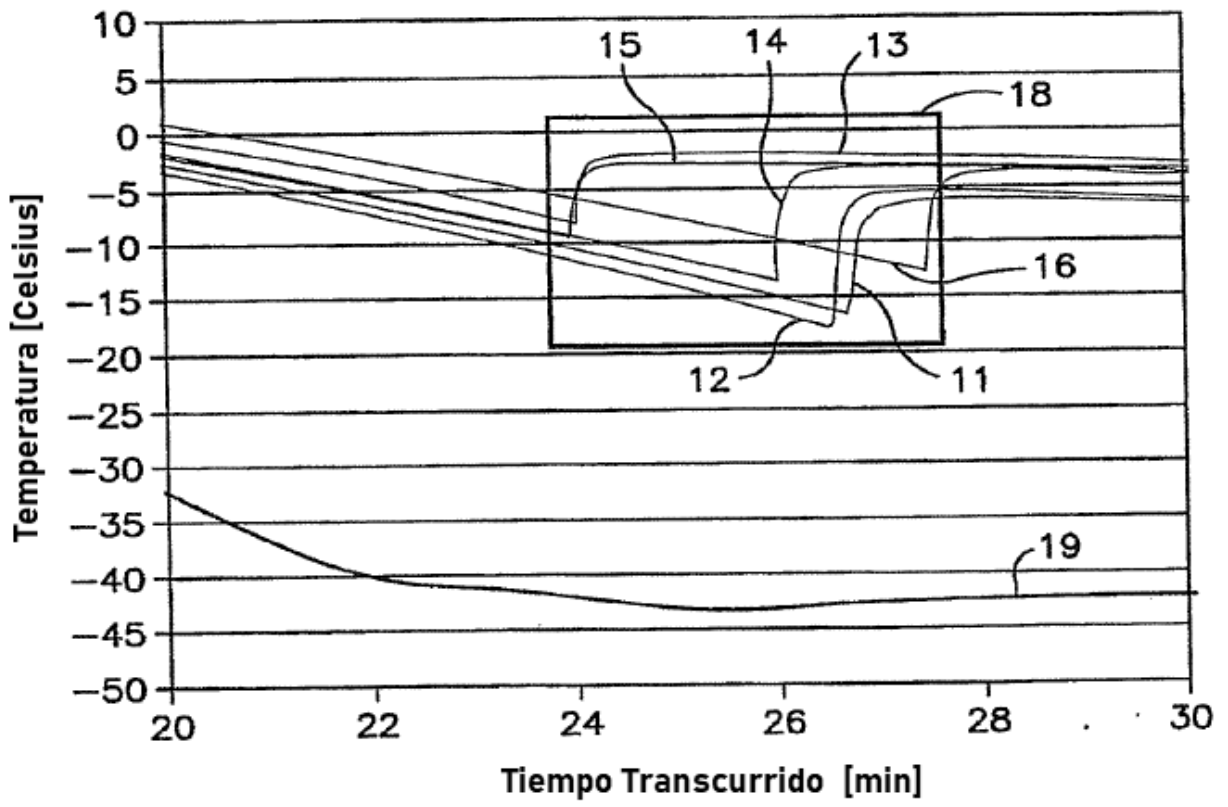


FIG. 1

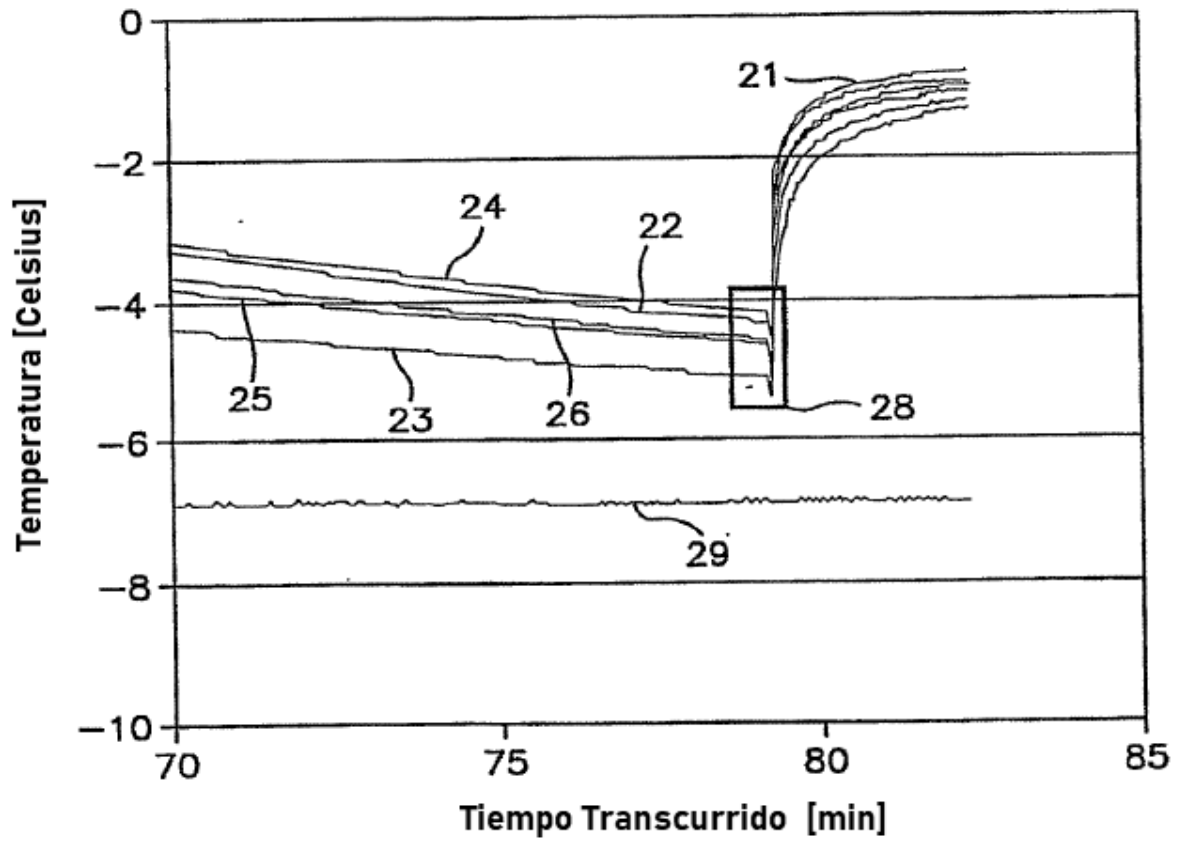


FIG. 2

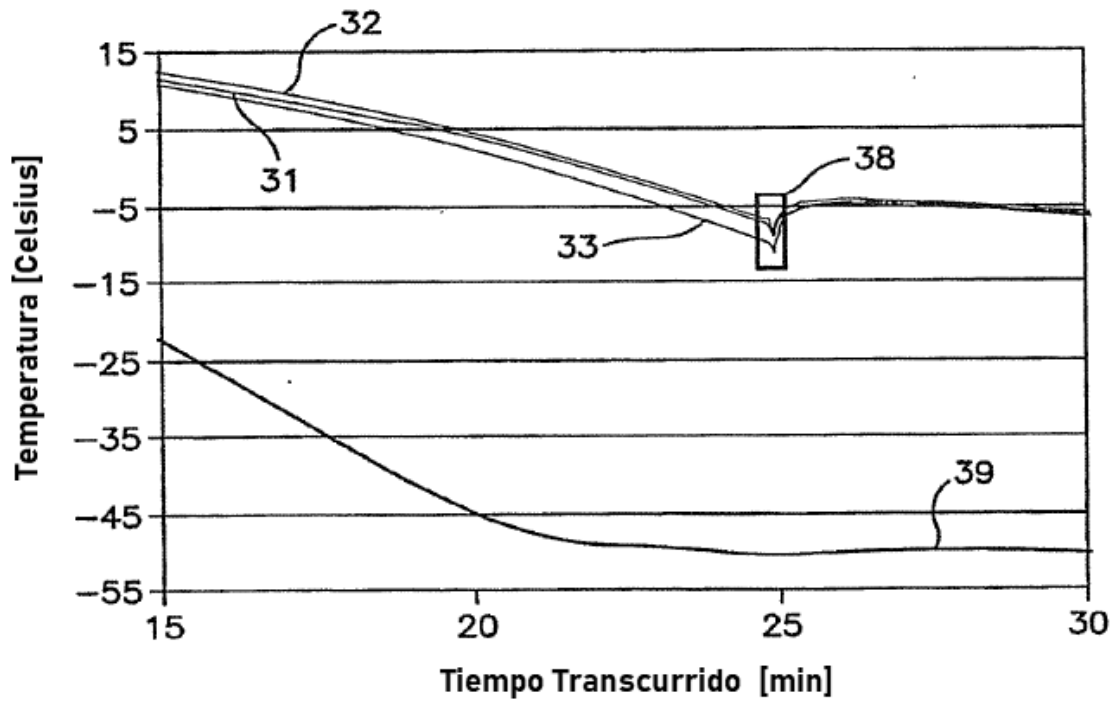


FIG. 3

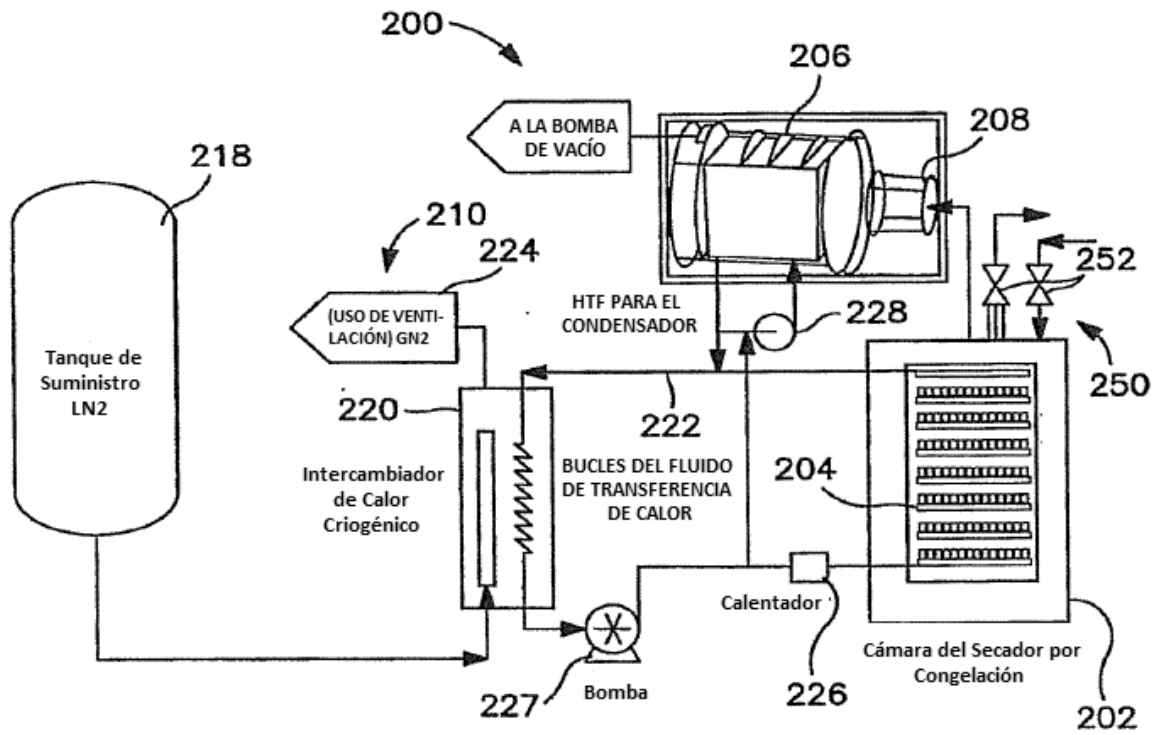


FIG. 4