

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 882**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2012 E 16183076 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 3106176**

54 Título: **Compuestos de aluminio para su uso en productos terapéuticos y vacunas**

30 Prioridad:

06.12.2011 EP 11192230
13.03.2012 WO PCT/EP2012/054387

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2017

73 Titular/es:

VALNEVA AUSTRIA GMBH (100.0%)
Campus Vienna Biocenter 3
1030 Vienna, AT

72 Inventor/es:

MÖHLEN, MICHAEL;
WEBER, MICHAEL;
WRUSS, JÜRGEN y
SCHLEGL, ROBERT

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 647 882 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

Compuestos de aluminio para su uso en productos terapéuticos y vacunas

5 La invención se refiere a los campos de productos farmacéuticos y vacunas. Más en particular, la invención se refiere al campo de compuestos y composiciones que se administran conjuntamente con el medicamento y/o antígeno.

10 Los compuestos de aluminio (en el presente documento también denominados "aluminio"), incluyendo fosfato de aluminio (AlPO₄), hidróxido de aluminio (Al(OH)₃), y otras vacunas precipitadas con aluminio, son actualmente los adyuvantes utilizados más comúnmente con vacunas para seres humanos y veterinarias. Los adyuvantes a menudo se denominan "alumbre" en la bibliografía.

15 Los adyuvantes de aluminio se han usado en la vacunación práctica durante más de medio siglo. Inducen una inmunidad protectora temprana, de alto título y de larga duración. Se han administrado billones de dosis de vacunas adyuvantes de aluminio a lo largo de los años. Su seguridad y eficacia los han convertido en los adyuvantes más populares en vacunas hasta la fecha. En general, los adyuvantes de aluminio se consideran seguros cuando se usan de acuerdo con los calendarios de vacunación actuales.

20 En las vacunaciones humanas, se han usado adyuvantes de aluminio antiguos en vacunas contra el tétanos, la difteria, la tos ferina y la poliomielitis como parte de los programas estándar de vacunación infantil. También se han introducido adyuvantes de aluminio en vacunas contra el virus de la hepatitis A y hepatitis B y vacunas contra el virus de la encefalitis japonesa (también denominada en el presente documento como "JEV"). Una vacuna contra el JEV con un adyuvante de aluminio se encuentra entre otras descritas en Srivastava et al. Vaccine (2001) vol 19: págs.

25 4557-4565. Otras vacunas adsorbidas en aluminio contra, por ejemplo, ántrax, están disponibles para grupos de riesgo especiales. En medicina veterinaria, se han usado adyuvantes de aluminio en un gran número de formulaciones de vacunas contra enfermedades víricas y bacterianas, y en intentos de fabricar vacunas antiparasitarias.

30 Los adyuvantes típicamente sirven para poner el antígeno, la sustancia que estimula la respuesta inmunoprotectora específica, en contacto con el sistema inmune e influir en el tipo de inmunidad producida, así como la calidad de la respuesta inmune (magnitud o duración); los adyuvantes también pueden disminuir la toxicidad de ciertos antígenos; y proporcionar solubilidad a algunos componentes de vacunas. Los estudios han demostrado que muchas vacunas que contienen aluminio causan respuestas de anticuerpos más altas y más prolongadas que las vacunas comparables sin el adyuvante. El beneficio de los adyuvantes se ha observado generalmente durante la serie de
35 inmunización inicial en lugar de con dosis de refuerzo.

Existen tres tipos generales de adyuvantes que contienen aluminio:

40 Hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de potasio y aluminio (denominado colectivamente "alumbre")

La eficacia de cada sal como adyuvante depende de las características de la vacuna específica y de cómo el fabricante prepara la vacuna. Para trabajar como adyuvante, el antígeno típicamente se adsorbe en aluminio; es
45 decir, está aglomerado con la sal de aluminio para mantener el antígeno en el sitio de inyección.

No todas las vacunas contienen sales de aluminio. En ocasiones, es posible que no se haya necesitado un adyuvante o que se haya seleccionado otro adyuvante. Los ejemplos de vacunas comerciales que no contienen sales de aluminio son la vacuna inactivada contra el virus de la polio (IPV), la vacuna contra el sarampión, las
50 paperas y la rubéola (MMR), la vacuna contra la varicela, la vacuna conjugada meningocócica (MCV4) y las vacunas antigripales. Que las vacunas comerciales no contengan sales de aluminio no significa que una sal de aluminio no funcione. Simplemente significa que, por alguna razón, se seleccionó otro adyuvante.

Los ejemplos de vacunas con licencia de los Estados Unidos para niños que contienen adyuvantes de aluminio son:
55 DTP (vacuna contra difteria-tétanos-tos ferina); DTaP (vacuna contra difteria-tétanos-tos ferina acelular); algunas, pero no todas, las vacunas conjugadas con Hib (Haemophilus influenzae tipo b); vacuna pneumocócica conjugada; vacunas contra la hepatitis B; vacunas contra la hepatitis A; vacuna contra el virus del papiloma humano; vacuna contra el ántrax; y la vacuna contra la rabia.

El aluminio es un elemento muy abundante en nuestro entorno. Se encuentra en muchos alimentos que comemos, en muchos productos de higiene personal que aplicamos en nuestra piel (desodorantes, por ejemplo) y en muchos medicamentos que ingerimos. Diversas agencias gubernamentales establecen pautas para la exposición a sustancias potencialmente tóxicas. Estas pautas se denominan "niveles mínimos de riesgo": la cantidad máxima de exposición a lo largo del tiempo, generalmente a diario, sin esperar daño.

La US Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) estimó estos niveles para bebés teniendo en cuenta la cantidad de aluminio (por ejemplo, en forma de una sal) que un niño comería y recibiría mediante inyección de vacunas. La carga corporal de aluminio de ambas fuentes está por debajo del nivel de riesgo mínimo, excepto por las siguientes vacunas transitorias; dado que el 50-70 % del aluminio inyectado se excreta en 24 horas, se cree que esto no tiene ningún efecto negativo.

Los adyuvantes de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio se preparan generalmente exponiendo soluciones acuosas de iones de aluminio a condiciones normalmente ligeramente alcalinas en un entorno químico bien definido y controlado. Se pueden usar diversas sales solubles de aluminio para la producción de hidróxido de aluminio. Los aniones presentes en el momento de la precipitación pueden coprecipitar (para una revisión, véase Lindblad, EB (2004) Immunol. and Cell Biol. Vol 82: 497-505).

La sal de aluminio también se usa en la fabricación y composición de medicamentos. Por ejemplo, el factor VIII se purifica a partir de crioprecipitado de plasma. El precipitado se solubiliza, se absorbe en hidróxido de aluminio y después se trata para inactivar los virus con envoltura lipídica. Después de varias etapas de procesamiento diferentes, el concentrado se usa para tratar pacientes con hemofilia A (Burnouf T, (1991) Vox Sang. Vol 60: págs. 8-15).

La invención proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y una sal de aluminio, comprendiendo dicha composición menos de 350 ppb de metal pesado y menos de 1,25 ppb de Cu basado en el peso de la composición acuosa, y en la que dicha proteína es una proteína dentro de partículas de virus inactivados con formaldehído.

La invención proporciona además un método para preparar una composición acuosa, en el que dicho método comprende

- seleccionar una sal de aluminio que sea capaz de proporcionar una composición acuosa que tenga menos de 350 ppb de metal pesado y que tenga menos de 1,25 ppb de Cu basado en el peso de la composición acuosa y
- combinar dicha sal de aluminio, un compuesto reactivo, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa; y

en el que la proteína es una proteína dentro de partículas de virus inactivado con formaldehído; y en el que el compuesto reactivo se selecciona del grupo que consiste en un compuesto activo redox, un compuesto de formación de radicales, un compuesto estabilizante y una combinación de cualquiera de los mismos.

En la presente invención, se ha demostrado que la estabilidad de un compuesto biológico en una composición que también comprende una sal de aluminio no es siempre la misma. La presente invención, por ejemplo, muestra que la estabilidad de un componente de proteína (por ejemplo, como tal o dentro de un complejo tal como, por ejemplo, un virus u otro patógeno) en el contexto de una composición acuosa que también comprende sal de aluminio, depende del contenido de metales pesados. Para estimar a priori si la proteína será estable en esta composición, la presente invención establece que es necesario determinar el contenido de metal pesado residual en la composición (de lo contrario, la composición acuosa que comprende una proteína corre el riesgo de degradarse con el tiempo, en particular la invención establece que este riesgo es considerable cuando el contenido de metal pesado residual es superior a 350 ppb (es decir, aproximadamente 350 ng por ml) en dicha composición acuosa). Además, la invención también reveló que este contenido de metal pesado residual no puede eliminarse fácilmente del compuesto de aluminio. Para este fin, se describe un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio y una proteína, comprendiendo dicho método

- combinar una sal de aluminio, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa y
- determinar el nivel de un metal pesado en la composición acuosa y/o la sal de aluminio. Las composiciones que comprenden menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa, se pueden almacenar en una fase líquida a una temperatura de entre 0 y 30 grados Celsius,

durante al menos 1 mes, tal como, por ejemplo, 20 meses a 2-8 °C. El componente de proteína en dicha composición es estable durante al menos 1 mes en dicha fase líquida. Las composiciones que comprenden más de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa no pueden almacenarse durante un período prolongado en dichas condiciones ya que el componente de proteína en dicha composición cambia en al menos un aspecto durante el período de tiempo indicado. Por lo tanto, un mililitro o un gramo de composición acuosa contiene preferiblemente no más de 350 nanogramos de metal pesado. La composición acuosa comprende preferiblemente entre 0,1 mg/ml y 2,5 mg/ml de aluminio. La dosis promedio de aluminio por administración es preferiblemente de no más de 1,25 miligramos (mg). En una realización particularmente preferida, la dosis de aluminio por administración no es superior a 0,25 mg de aluminio. Típicamente, una dosis comprende entre 0,5 y 1 ml de la composición acuosa.

En un aspecto adicional de la presente invención, se ha demostrado que la estabilidad de un compuesto biológico en una composición que comprende una sal de aluminio y un compuesto reactivo no es siempre la misma. La presente invención, por ejemplo, muestra que la estabilidad de un componente de proteína (por ejemplo, como tal o dentro de un complejo tal como, por ejemplo, un virus u otro patógeno) en el contexto de una composición acuosa que también comprende sal de aluminio y un compuesto reactivo, tal como, por ejemplo, un sulfito, es críticamente dependiente del contenido de metales pesados. Para estimar a priori si el componente de proteína (tal como, por ejemplo, el componente de proteína dentro de un complejo tal como, por ejemplo, una partícula vírica; denominado también simplemente en el presente documento proteína) será estable en esta composición, es necesario determinar el contenido de metal pesado en la composición. Para este fin, se describe un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio y una proteína, comprendiendo dicho método

- combinar una sal de aluminio, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa y
- determinar el nivel de un metal pesado en la composición acuosa y/o la sal de aluminio. Las composiciones que comprenden menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa, se pueden almacenar en una fase líquida a una temperatura de entre 0 y 30 grados Celsius, durante al menos 1 mes, tal como, por ejemplo, 20 meses a 2-8 °C. El componente de proteína en dicha composición es estable durante al menos 1 mes en dicha fase líquida, tal como, por ejemplo, 20 meses a 2-8 °C. Las composiciones que comprenden más de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa no pueden almacenarse durante un período prolongado en dichas condiciones ya que el componente de proteína en dicha composición cambia en al menos un aspecto durante el período de tiempo indicado. Por lo tanto, un mililitro o un gramo de composición acuosa contiene preferiblemente no más de 350 nanogramos de metal pesado. La composición acuosa comprende preferiblemente entre 0,1 mg/ml (miligramo por mililitro) y 2,5 mg/ml de aluminio. La dosis promedio de aluminio por administración es preferiblemente de no más de 1,25 miligramos (mg). En una realización particularmente preferida, la dosis de aluminio por administración no es superior a 0,25 mg de aluminio. Típicamente, una dosis comprende entre 0,5 y 1 ml de la composición acuosa. Una composición acuosa que comprende una proteína, una sal de aluminio, y opcionalmente un compuesto reactivo, comprendiendo dicha composición menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa, se denomina en el presente documento también como "una composición acuosa que comprende una proteína de acuerdo con la invención" o "una composición que comprende una proteína de acuerdo con la invención".

El contenido de aluminio de la composición acuosa es habitualmente de aproximadamente 0,1 mg/ml a 2,5 mg/ml, comprendiendo la vacuna promedio aproximadamente de 0,5 a 1,5 mg/ml del adyuvante de aluminio. Con este fin, se describe una composición acuosa, una composición acuosa farmacéutica o de vacuna que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, que comprende entre 5 mcg/ml y 50 mg/ml de aluminio y que comprende no más de 700 ppm de un metal pesado en comparación con el contenido de aluminio (gramo/gramo). En este contexto, 700 ppm de un metal pesado equivale a 700 mcg de metal pesado por gramo de aluminio.

En una realización preferida, la composición acuosa, la composición acuosa farmacéutica o de vacuna que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, comprende entre 5 mcg/ml y 50 mg/ml de aluminio y comprende no más de 450 ppm de un metal pesado en comparación con el contenido de aluminio (gramo/gramo). En este contexto, 450 ppm de un metal pesado equivale a 450 mcg de metal pesado por gramo de aluminio. En una realización preferida, la composición acuosa, la composición acuosa farmacéutica o de vacuna que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, comprende entre 5 mcg/ml y 50 mg/ml de aluminio y comprende no más de 700 ppm de Fe en comparación con el contenido de aluminio (gramo/gramo). Preferiblemente, el contenido de Fe es menor de 420 ppm de Fe en comparación con el contenido de aluminio. Preferiblemente, el contenido de Fe es menor de 350 ppm, preferiblemente menor de 100 y más preferiblemente menor de 50 ppm en comparación con el contenido de aluminio (1 ppm = 1 mcg/gramo de Al). En una realización particularmente preferida, el

contenido de Fe de la composición acuosa, el producto farmacéutico acuoso o la vacuna es menor de 420 ppm en comparación con el contenido de aluminio. En una realización preferida, la composición acuosa, el producto farmacéutico acuoso o vacuna comprende más de 10 ppm de Fe en comparación con el contenido de aluminio.

5 En una realización preferida, la composición acuosa, la composición acuosa farmacéutica o de vacuna que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, comprende entre 5 mcg/ml y 50 mg/ml de aluminio y comprende no más de 35 ppm de Ni en comparación con el contenido de aluminio (gramo/gramo). Preferiblemente, el contenido de Ni es menor de 18 ppm de Ni en comparación con el contenido de aluminio. Preferiblemente, el contenido de Ni es menor de 9 ppm, preferiblemente menor de 3 y más preferiblemente menor de 1 ppm en
10 comparación con el contenido de aluminio (1 ppm = 1 mcg/gramo de Al). En una realización particularmente preferida, el contenido de Ni de la composición acuosa, el producto farmacéutico acuoso o la vacuna es menor de 18 ppm en comparación con el contenido de aluminio. En una realización preferida, la composición acuosa, un producto farmacéutico acuoso o composición de vacuna comprende al menos 200 ppm de Ni en comparación con el contenido de aluminio.

15 En una realización preferida, la composición acuosa, la composición acuosa farmacéutica o de vacuna que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, comprende entre 5 mcg/ml y 50 mg/ml de aluminio y comprende no más de 5 ppm de Cu en comparación con el contenido de aluminio (gramo/gramo). Preferiblemente, el contenido de Cu es menor de 2,5 ppm de Cu en comparación con el contenido de aluminio. Preferiblemente, el
20 contenido de Cu es menor de 1 ppm, preferiblemente menor de 0,5 y más preferiblemente menor de 0,25 ppm en comparación con el contenido de aluminio (1 ppm = 1 mcg/gramo de Al). En una realización particularmente preferida, el contenido de Cu de la composición acuosa, el producto farmacéutico acuoso o la vacuna es menor de 2,5 ppm en comparación con el contenido de aluminio. En una realización preferida, la composición acuosa, el producto farmacéutico acuoso o composición de vacuna comprende al menos 50 ppm de Cu en comparación con el
25 contenido de aluminio.

En una realización particularmente preferida, el contenido de Fe de la composición acuosa, el producto farmacéutico acuoso o la vacuna es menor de 420 ppm en comparación con el contenido de aluminio, el contenido de Ni de la composición acuosa, el producto farmacéutico acuoso o la vacuna es menor que 18 ppm en comparación con el
30 contenido de aluminio, y el contenido de Cu de la composición acuosa, el producto farmacéutico acuoso o vacuna es menor de 2,5 ppm en comparación con el contenido de aluminio. En una realización preferida, la composición acuosa, el producto farmacéutico o vacuna acuosa comprende más de 10 ppm de Fe en comparación con el contenido de aluminio, al menos 200 ppb de Ni en comparación con el contenido de aluminio, y al menos 50 ppb de Cu en comparación con el contenido de aluminio.

35 En un método para preparar una composición acuosa, una composición acuosa farmacéutica o de vacuna que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína de acuerdo con la invención, o un método para preparar o seleccionar una sal de aluminio de acuerdo con la invención, o un método para preparar un precipitado de sal de aluminio de calidad clínica de acuerdo con la invención, se prefiere que el contenido de metal pesado en relación
40 con el contenido de aluminio esté como se indica anteriormente en el presente documento. Por lo tanto, la invención describe un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, comprendiendo dicho método

45 - preparar o seleccionar una sal de aluminio que sea capaz de proporcionar una composición acuosa que tenga menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa y
- combinar dicha sal de aluminio, dicho compuesto reactivo, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa,

50 por lo que la composición acuosa comprende entre 5 mcg/ml y 50 mg/ml de aluminio, preferiblemente entre 0,1 mg/ml y 2,5 mg/ml; y no más de 700 ppm de metal pesado y preferiblemente no más de 450 ppm de metal pesado en comparación con el contenido de aluminio; en el que dicha composición acuosa comprende no más de 420 ppm de Fe, preferiblemente no más de 100 ppm, en comparación con el contenido de aluminio; no más de 18 ppm, preferiblemente no más de 3 ppm de Ni en comparación con el contenido de aluminio; y/o no más de 2,5 ppm de Cu, preferiblemente no más de 0,5 ppm, en comparación con el contenido de aluminio. En una realización preferida,
55 dicha composición acuosa comprende no más de 700 ppm de metal pesado y preferiblemente no más de 450 ppm de metal pesado en comparación con el contenido de aluminio; no más de 420 ppm de Fe, preferiblemente no más de 100 ppm, en comparación con el contenido de aluminio; no más de 18 ppm, preferiblemente no más de 3 ppm de Ni en comparación con el contenido de aluminio; y no más de 2,5 ppm de Cu, preferiblemente no más de 0,5 ppm, en comparación con el contenido de aluminio.

Se ha observado que el componente de aluminio es una fuente importante para el metal pesado en la composición acuosa. Por lo tanto, una forma de controlar la cantidad de metal pesado en la composición acuosa es controlar la cantidad de metal pesado en la fuente de aluminio utilizada para generar la composición acuosa. Por lo tanto, la invención describe además un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio y una proteína, comprendiendo dicho método

- 10 - preparar o seleccionar una solución de sal de aluminio (tal como, por ejemplo, 10 mg/ml de hidróxido de aluminio líquido (tal como, por ejemplo, alhydrogel® al 2 % de Brenntag Biosector, número de catálogo 843261) que en la formulación de proteína final no comprenda más de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa (por ejemplo, para el Alhydrogel® al 2 % y la cantidad final de 0,25 mg de hidróxido de aluminio en la composición acuosa de 0,5 ml (= dosis), la solución de sal de aluminio seleccionada o preparada no debe contener más de 7 microgramos de metal pesado por mililitro de la solución al 2 % de alhydrogel®, aproximadamente 7 ppm de contenido de metales pesados), y
- 15 - combinar dicha solución de sal de aluminio, dicha proteína, agua y opcionalmente un compuesto reactivo para producir dicha composición acuosa (con no más de 350 ppb de metal pesado en la composición acuosa).

Por ejemplo, la solución de sal de aluminio, por ejemplo, el líquido de hidróxido de aluminio (usado como componente a mezclar para dar como resultado la composición acuosa final) no debe tener un contenido de metales pesados superior a 7 ppm (dado como ejemplo en el presente documento, donde los 10 mg/ml de hidróxido de aluminio se diluirán hasta 0,5 mg/ml para dar como resultado aproximadamente 350 ppb de contenido de metales pesados en relación con la composición acuosa, suponiendo 1 ppm = aproximadamente 1 mg/ml) sobre la base del peso del líquido de hidróxido de aluminio. El límite de contenido aceptable de metales pesados también se puede expresar en relación con el peso de la sal de aluminio tal como el hidróxido de aluminio en solución (denominado también "compuesto de aluminio de partida"). El contenido aceptable de metales pesados en este ejemplo no puede exceder entonces de 7 microgramos de metal pesado por cada gramo de solución de hidróxido de aluminio (es decir, aproximadamente 7 ppm), es decir, la solución al 2 % de alhydrogel®. Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, la composición acuosa que comprende la proteína (tal como, por ejemplo, si se usa como una vacuna) comprende preferiblemente entre 0,1 y 2,5 mg/ml del compuesto de aluminio. Sin embargo, la concentración de metal pesado en la composición acuosa de acuerdo con la invención no debe exceder de 350 ppb, es decir, aproximadamente 350 ng por ml de la composición final y, por lo tanto, la selección o preparación del compuesto de aluminio de partida debe realizarse en consecuencia. Para ilustrar mejor la selección de una solución apropiada de compuesto de partida de aluminio (por ejemplo, en forma de una solución concentrada (véase anteriormente Alhydrogel® al 2 % = 10 mg/ml), se muestra que una solución de compuesto de aluminio de 10 mg/ml de hidróxido de aluminio que tiene aproximadamente 7 ppm de impurezas de metales pesados corresponde a una concentración de metal pesado en la composición de proteínas cuando la concentración de aluminio es de aproximadamente 0,1 mg/ml de aproximadamente 70 nanogramos/ml o 70 ppb (muy por debajo de los 350 ppb proporcionados como límite del contenido de metal pesado como se indica en la invención). Una concentración de 2,5 mg/ml del hidróxido de aluminio en la composición acuosa final que parte de una solución de aluminio de 10 mg/ml de hidróxido de aluminio que tiene aproximadamente 7 ppm de impurezas de metales pesados, dará como resultado un contenido de metal pesado en la composición de proteína acuosa que corresponde a una concentración de metal pesado de aproximadamente 1,75 microgramos/ml o aproximadamente 1,750 ppm (muy por encima de los 350 ppb proporcionados como límite del contenido de metales pesados como se indica por la invención). Por lo tanto, la solución de aluminio de 10 mg/ml de hidróxido de aluminio en este caso (el contenido final de hidróxido de aluminio es de 2,5 mg/ml) no debería tener entonces más de 1,4 ppm de impurezas de metales pesados.

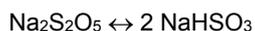
Un método para preparar una composición acuosa que comprende una proteína preferiblemente comprende además empaquetar alícuotas de dicha composición acuosa que tienen menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa en recipientes de almacenamiento herméticos por separado. La proteína en los contenedores de almacenamiento herméticos es estable y puede almacenarse durante al menos tres meses, tal como, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 meses, preferiblemente 20 o 24 meses, más preferiblemente 20 meses a una temperatura de entre 2 y 8 °C grados Celsius.

55 Sin desear quedar ligado por la teoría, la degradación del antígeno en composiciones acuosas, tal como una composición inmunogénica, que comprende iones de metales pesados presentes en una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio, podría explicarse con una ruta de degradación subyacente asumiendo radicales libres tales como, por ejemplo, radicales libres de sulfito. La formación de radicales libres puede catalizarse por iones de metales pesados presentes, por ejemplo, en hidróxido de aluminio, y este efecto (en el caso de una cierta cantidad

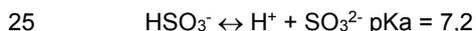
de metal pesado como se indica de acuerdo con la invención) podría ser el mecanismo de causa raíz subyacente para problemas de estabilidad según se identifican como parte de la contribución inventiva. La parte experimental de esta solicitud muestra en gran detalle la evidencia de esta causa raíz para la vacuna contra la encefalitis japonesa (también conocida como "JEV"), y muestra de manera similar una composición de polipéptido con adyuvante de aluminio simple que comprende un compuesto reactivo, tal como sulfito. Por lo tanto, es evidente que puede tener lugar una reacción similar también en otra composición acuosa que comprende aluminio (con alto contenido de metal pesado, por ejemplo, más de 350 ppb basado en el peso de la composición), proteína y posiblemente un componente reactivo, tal como sulfito y/o otras partículas formadoras de radicales. La oxidación catalizada por metales pesados es una ruta de degradación que da como resultado una modificación covalente de proteínas. Las propiedades fisicoquímicas modificadas de la proteína oxidada/modificada o antígeno pueden dar como resultado la pérdida de la actividad biológica (Li et al., 1995, Mayo et al., 2003, Stadtman, 1990).

Los siguientes esquemas de reacción (que posiblemente se producen en el producto JEV como se describe en la parte experimental) son indicativos de composiciones de la invención que comprenden además de la proteína y el metal pesado, también sulfito y/u otro compuesto reactivo tal como, por ejemplo, sulfito y/o formaldehído.

El metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) en solución se disuelve en bisulfito ($\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$), en una solución alcalina, el bisulfito en equilibrio va hacia sulfito (SO_3^{2-}) y en una solución ácida, hacia $\text{H}_2\text{SO}_3/\text{SO}_2$. Después de la disolución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ en agua, se hidroliza en NaHSO_3 como se indica a continuación



A pH neutro, se puede asumir el siguiente equilibrio:

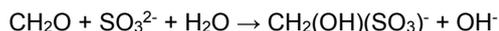


Esto significa que a pH 7, el equilibrio se desvía hacia HSO_3^- y en condiciones más básicas (por ejemplo, pH 8), hacia SO_3^{2-} .

El formaldehído forma un aducto de bisulfito durante la neutralización de acuerdo con la siguiente ecuación:



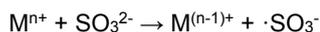
Después de usar el bisulfato, la reacción avanza hasta que se alcanza el equilibrio como se indica a continuación:



El formaldehído y el sulfito reaccionan entre sí, sin embargo, se ha encontrado que el formaldehído y el sulfito todavía están presentes en equilibrio en la vacuna contra JEV y se pueden detectar en el siguiente intervalo (n = 49):

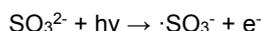
Resultados de liberación en DS	Sulfito libre	Formaldehído libre
Promedio (ppm)	113,9	41,9
Promedio (mM)	1,41	1,36
Desviación estándar (ppm)	24	14,3
Mín (ppm)	66	10,6
Máx (ppm)	174	78,7

De acuerdo con la bibliografía (Ranguelova et al., 2010), los iones de metales de transición catalizan la auto-oxidación de (bi)sulfito a través de la formación del radical de anión de trióxido de azufre ($\cdot\text{SO}_3^-$):



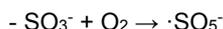
donde M puede ser anión de cobre (Cu^{2+}), hierro (Fe^{3+}), oxivanadio (VO^{2+}), manganeso (Mn^{2+}), níquel (Ni^{2+}) o cromato (CrO_4^{2-}) (Alipazaga et al. 2004; Berglund et al. 1993; Brandt y Elding 1998; Lima et al. 2002; Shi 1994).

Se demostró que dichos radicales de sulfito son altamente reactivos y pueden oxidar diversas sustancias, tales como ascorbato, hidroquinona e histidina (Huie et al., 1985). Neta y Huie, 1985, publicaron una reseña de la química de los radicales libres de sulfito. Los autores también muestran que la formación de radicales también puede ser catalizada por la fotoionización del sulfito como se indica a continuación:

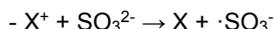
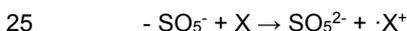
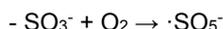


La formación de radicales catalizada por la luz también podría explicar las diferencias observadas en la potencia y los resultados de ELISA de jeringas descubiertas sin etiqueta (usadas para pruebas de liberación y propósitos de referencia) y muestras de lotes de vacunas finales totalmente empaquetadas para el producto JEV. Las muestras completamente empaquetadas están completamente protegidas de la luz, mientras que las jeringas sin etiqueta pueden exponerse a la luz durante el almacenamiento y la manipulación.

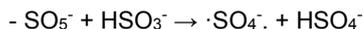
10 Una reacción importante del radical sulfito en sistemas de auto-oxidación es con oxígeno molecular para formar un radical peroxilo que es mucho más reactivo:



15 La solubilidad de O_2 en agua a 0°C y a 20°C es de 0,4 mM y 0,25 mM, respectivamente. Suponiendo que la solubilidad de O_2 en una composición de la invención se encuentra en un intervalo similar, está presente una cantidad considerable de oxígeno para formar el radical peroxilo. Este radical es un oxidante mucho más fuerte en comparación con $\cdot\text{SO}_3^-$ y puede oxidar ciertos sustratos que no están unidos por $\cdot\text{SO}_3^-$ en absoluto y que, de hecho, pueden formar radicales que oxidan los iones sulfito. En tales casos, cuando el potencial redox del sustrato es intermedio entre los de $\cdot\text{SO}_3^-$ y $\cdot\text{SO}_5^-$, es probable que se desarrolle una cadena de reacciones en presencia de O_2 siguiendo el patrón general:



La intermediación de un sustrato X puede mejorar el proceso en cadena de la oxidación de sulfito por oxígeno. La reducción de un electrón de $\cdot\text{SO}_5^-$ produce HSO_5^- (peroximonosulfato), un oxidante muy fuerte que es capaz de oxidar muchos compuestos orgánicos (Lambeth et al., 1973; Ito & Kawanashi, 1991). El peroximonosulfato es también un radical de anión sulfato precursor $\cdot\text{SO}_4^-$.



35 El radical $\cdot\text{SO}_4^-$ es un oxidante muy fuerte, casi tan fuerte como el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), y es muy probable que oxide otras biomoléculas por oxidación de un electrón.

En una realización preferida, la composición que comprende una proteína de acuerdo con la invención es una composición terapéutica o una composición inmunogénica, tal como una vacuna. Las composiciones terapéuticas se administran a individuos, tales como seres humanos o animales. En particular para dichas composiciones, es importante que la proteína dentro de la composición todavía tenga su efecto terapéutico en el momento en que se administra a dicho individuo. La degradación de la proteína o los cambios en la proteína en su estructura pueden hacer que la proteína pierda su actividad terapéutica. De forma similar, la degradación o los cambios estructurales de la composición inmunogénica también conducirán a una reducción en la eficacia de la composición para inducir y/o potenciar una respuesta inmune en un individuo. Una composición inmunogénica se administra preferiblemente a un individuo para contrarrestar o prevenir una infección vírica. La proteína contenida dentro de la composición inmunogénica acuosa puede ser una única proteína o una proteína multimérica o parte de un complejo que comprende dicha proteína (por ejemplo, tal como parte de un virus o una célula).

50 Una proteína o complejo de proteínas puede comprender un virus o bacteria viva atenuada, inactivada o mutada una proteína vírica o bacteriana inmunogénica o una parte inmunogénica de dicha proteína (por ejemplo, un péptido inmunogénico), virus o bacteria fraccionados, o células bacterianas enteras. Si dicha composición inmunogénica se administra para proporcionar protección contra una infección vírica o bacteriana, la degradación de la proteína puede dar como resultado la pérdida de la capacidad protectora de la composición inmunogénica. Como se usa en el presente documento, un virus o bacteria "viva atenuada" es un virus o bacteria que es menos patógena que el virus o bacteria de tipo silvestre, pero que ha mantenido propiedades inmunogénicas. Como se usa en el presente documento, un virus o bacteria "inactivada" se refiere a un virus o bacteria que se han inactivado para que ya no sean infecciosos, mientras que las propiedades inmunogénicas se han mantenido, al menos en parte. Un virus o

bacteria inactivada puede estar en forma de virus entero inactivado o células bacterianas. Sin embargo, la inactivación puede provocar la alteración de virus o células bacterianas. Por lo tanto, el virus o bacteria inactivados también pueden estar en forma alterada. Como se usa en el presente documento, un virus o bacteria "fragmentada" se refiere a un virus o bacteria que se altera usando, por ejemplo, un detergente.

5 La composición acuosa de la invención puede comprender un compuesto reactivo, tal como formaldehído, que generalmente está presente para inactivar un virus o bacteria. También puede estar presente un compuesto reactivo adicional o alternativo para inactivar cualquier formaldehído residual en la solución acuosa, tal como el sulfito del compuesto reactivo. Como se detalla anteriormente, se cree que los metales pesados catalizan la oxidación de (bi)sulfito y la formación de radicales sulfito presentes en la composición acuosa, lo que a su vez puede inducir la
10 degradación de la proteína presente en la composición. Por lo tanto, es probable que las composiciones que comprenden virus o bacterias inactivadas o partes inmunogénicas de las mismas comprendan uno o más compuestos reactivos. Por lo tanto, la ausencia de metales pesados o la presencia por debajo de los niveles identificados por la presente invención, es de particular relevancia cuando la composición acuosa de la invención comprende un virus inactivado o una parte inmunogénica del mismo. En una realización particularmente preferida,
15 una composición inmunogénica de acuerdo con la invención comprende, por lo tanto, un virus inactivado. En una realización preferida, la composición acuosa, preferiblemente la composición inmunogénica de acuerdo con la invención, comprende un virus inactivado. Dicho virus, por ejemplo, está inactivado por un compuesto reactivo tal como formaldehído como se describe en la presente invención.

20 En otra realización preferida, la composición acuosa, composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con la invención comprende un toxoide. Como se usa en el presente documento, un "toxoides" se refiere a una toxina bacteriana inactivada, tal como una exotoxina, como resultado de lo cual la toxicidad se reduce o se anula mientras que las propiedades inmunogénicas se mantienen al menos en parte. Dicha toxina, por ejemplo, está inactivada por un compuesto reactivo tal como formaldehído como se describe en la presente invención. Los ejemplos de toxoides
25 presentes en una composición inmunogénica de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, toxinas de difteria, tétanos y botulismo.

La expresión "proteína vírica o bacteriana inmunogénica" se refiere a una proteína vírica o bacteriana que es capaz de provocar una respuesta inmune. La expresión "parte inmunogénica" como se usa en el presente documento, se refiere a una parte de una proteína vírica o bacteriana que es capaz de provocar una respuesta inmune.

30 Preferiblemente, la respuesta inmune desencadenada reconoce tanto dicha parte de la proteína como la proteína completa. Por lo tanto, en una realización, una composición acuosa que comprende una proteína de acuerdo con la invención es una composición inmunogénica. Dicha composición es preferiblemente una composición terapéutica y/o una composición profiláctica tal como una vacuna. También se proporciona una vacuna que es una composición acuosa que comprende una proteína de acuerdo con la invención.

35 Una "composición inmunogénica" se define en el presente documento como una composición que es capaz de provocar una respuesta inmune cuando se administra a un individuo. La respuesta inmune desencadenada puede ser humoral, celular o una combinación de las mismas e incluye, pero sin limitación, la producción de anticuerpos, linfocitos B tales como linfocitos B activados, y linfocitos T tales como linfocitos T activados. Una respuesta inmune
40 como se usa en el presente documento se dirige preferiblemente de manera específica a uno o más inmunógenos dentro de una composición que comprende una proteína de acuerdo con la invención. Una composición inmunogénica de la presente invención se puede administrar a un individuo mediante cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID), subcutánea (SC), intracraneal (IC), intraperitoneal (IP), o intravenosa (IV), administración transdérmica, oral, intranasal o rectal, y
45 combinaciones de las mismas, se prefieren inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID), subcutánea (SC), intracraneal (IC), intraperitoneal (IP), o intravenosa (IV). En una realización preferida, se usa una composición inmunogénica que comprende una proteína de acuerdo con la invención para provocar una respuesta inmune que puede ser útil en un contexto crónico (tal como el tratamiento del cáncer) o el establecimiento profiláctico (tal como una vacuna típica). Se prefiere que la composición inmunogénica se use como vacuna, es decir, uso profiláctico. En
50 esta realización, el aluminio está típicamente presente como el adyuvante.

Un "adyuvante" como se usa en el presente documento, se refiere a un agente farmacológico o inmunológico que modifica el efecto de otros agentes, tal como un agente inmunológico que aumenta la respuesta antigénica. Los adyuvantes típicamente sirven para poner el antígeno -la sustancia que estimula la respuesta inmune protectora específica- en contacto con el sistema inmune e influir en el tipo de inmunidad producida, así como en la calidad de
55 la respuesta inmune (magnitud o duración); disminuir la toxicidad de ciertos antígenos; y proporcionar solubilidad a algunos componentes de vacuna.

Un "individuo" se define en el presente documento como un ser humano o un animal. Los individuos incluyen, pero sin limitación, no pollos, patos, gansos, pavos, cisnes, emúes, pintadas y faisanes, seres humanos, cerdos, hurones,

focas, conejos, gatos, perros y caballos. En una realización preferida de la invención, un individuo es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

El "micro" en microgramo o microlitro u otra unidad se denomina a veces mc, el símbolo μ o la letra u. Un valor de 3 mcg es, por lo tanto, 3 microgramos, 3 μ l es 3 microlitros y 3 ug es 3 microgramos.

Se prepara a menudo un adyuvante de aluminio mediante exposición controlada de una solución acuosa de iones aluminio, a condiciones alcalinas (para una revisión, véase Lindblad, EB (2004) Immunol. and Cell Biol. Vol 82: 497-505). En la presente invención, se ha encontrado para el producto JEV (véase la parte experimental) que una gran cantidad del metal pesado en esta solución acuosa de iones de aluminio termina en el precipitado de sal de aluminio para el adyuvante de aluminio. Se ha encontrado además que la cantidad de metal pesado en el precipitado de aluminio afecta a la estabilidad de la vacuna durante el almacenamiento de la vacuna. Por lo tanto, la cantidad de metal pesado que está presente en la sal de aluminio puede controlarse determinando la cantidad de metal pesado en la sal pero también, y preferiblemente, controlando la cantidad de metal pesado en la solución acuosa de iones de aluminio. También se describe un método para preparar un precipitado de sal de aluminio de calidad clínica para su incorporación en un medicamento y/o vacuna, comprendiendo dicho método preparar una solución acuosa de ión de aluminio y precipitar dichos iones de aluminio en dicha solución, y determinar el nivel de una metal pesado en la solución y/o el precipitado de sal de aluminio, preferiblemente donde se determina que dicha solución y/o el precipitado de sal de aluminio comprenden una cantidad que da como resultado menos de 350 ppb de metal pesado en la composición final, por ejemplo, cuando se vuelve a suspender en la composición final. También se describe un método para preparar un precipitado de sal de aluminio de calidad clínica para su incorporación en un medicamento y/o vacuna, comprendiendo dicho método preparar una solución acuosa de iones de aluminio y precipitar dichos iones aluminio en dicha solución, y determinar el nivel de una metal pesado en la solución y/o el precipitado de sal de aluminio, en el que el precipitado que se selecciona es capaz de proporcionar una composición acuosa que comprende entre 5 mcg/ml y 50 mg/ml de aluminio, preferiblemente entre 0,1 mg/ml y 2,5 mg/ml, y que comprende no más de 700 ppm de metal pesado y preferiblemente no más de 450 ppm de metal pesado en comparación con el contenido de aluminio, en el que dicha composición comprende no más de 420 ppm de Fe, preferiblemente no más de 100 ppm, en comparación con el contenido de aluminio, no más de 18 ppm, preferiblemente no más de 3 ppm de Ni en comparación con el contenido de aluminio, y/o no más de 2,5 ppm de Cu, preferiblemente no más de 0,5 ppm, en comparación con el contenido de aluminio el contenido de aluminio. En una realización preferida, dicho precipitado comprende no más de 700 ppm de metal pesado y preferiblemente no más de 450 ppm de metal pesado en comparación con el contenido de aluminio; no más de 420 ppm de Fe, preferiblemente no más de 100 ppm, en comparación con el contenido de aluminio, no más de 18 ppm, preferiblemente no más de 3 ppm de Ni en comparación con el contenido de aluminio, y no más de 2,5 ppm de Cu, preferiblemente no más de 0,5 ppm, en comparación con el contenido de aluminio.

También se describe una composición farmacéutica que comprende una proteína de acuerdo con la invención, que comprende opcionalmente además un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. "Un diluyente farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento se define como cualquier solución, sustancia o combinación de las mismas que no tiene actividad biológica o cualquier otra actividad no deseada, lo que significa que puede administrarse a un individuo junto con otros componentes de una composición inmunológica sin causar una reacción adversa sustancial. Los ejemplos de vehículos adecuados, por ejemplo, comprenden hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica (por ejemplo, BSA o RSA) y ovoalbúmina. En una realización preferida, dicho vehículo adecuado comprende una solución, como por ejemplo, solución salina.

En un aspecto, se usa un método de acuerdo con la invención para prolongar la vida en almacenamiento o la vida útil de una composición acuosa que comprende una proteína de acuerdo con la invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "vida útil" se define como el período de tiempo en que una composición que comprende una proteína de acuerdo con la invención puede almacenarse sin ser inadecuada para su uso, por ejemplo, debido a la degradación de la proteína (por ejemplo, está dentro de la especificación de potencia de la composición, por ejemplo, vacuna, según lo requiera la agencia reguladora que aprobó o aprobará la vacuna). Durante el almacenamiento de las composiciones acuosas como se describe en el presente documento, puede producirse la degradación de la proteína, en particular cuando se supera un cierto nivel (como se describe en el presente documento) de metales pesados. La degradación generalmente aumenta con el tiempo cuando tales composiciones acuosas se almacenan. Ahora que se encuentra que la degradación de proteína se reduce en una composición acuosa que comprende además de dicha proteína una sal de aluminio, si dicha composición comprende menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa, ha sido posible contrarrestar la degradación de la proteína en composiciones acuosas. Al contrarrestar la degradación de la proteína con un método de acuerdo con la invención, la estabilidad de dicha proteína dentro de dicha composición aumenta, y la vida de almacenamiento de una composición acuosa que comprende dicha proteína se prolonga. Una

composición acuosa de acuerdo con la presente invención proporciona la ventaja de que es estable y no experimenta degradación de la proteína durante un período prolongado. Dicha composición acuosa que comprende una proteína de acuerdo con la invención es estable durante al menos un mes a temperatura elevada, tal como, por ejemplo, 20 o 37 °C, preferiblemente durante al menos tres meses a temperatura elevada tal como, por ejemplo, 20 o 37 °C. Una composición acuosa que comprende una proteína de acuerdo con la invención se almacena preferiblemente a una temperatura de entre 0 °C y 20 °C para contribuir a una mayor vida útil, más preferiblemente entre 2 °C y 15 °C, más preferiblemente entre 2° C y 10 °C, mucho más preferiblemente entre 2 °C y 8 °C. La vida útil a una temperatura entre 2 °C y 8 °C es estable preferiblemente durante al menos tres meses, tal como, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 meses, preferiblemente 20 o 24 meses, más preferiblemente 20 meses a una temperatura de entre 2 y 8 °C grados Celsius. Por lo tanto, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína de acuerdo con la invención que tiene una vida útil de aproximadamente 12 a 24 meses. La invención proporciona además una solución acuosa de acuerdo con la invención que se ha almacenado durante al menos un mes, preferiblemente durante al menos dos meses, más preferiblemente durante al menos tres meses, más preferiblemente durante al menos seis meses. Una composición acuosa comprende preferiblemente una proteína y una sal de aluminio, comprendiendo dicha composición menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa, entre 5 mcg/ml y 50 mg/ml de aluminio, preferiblemente entre 0,1 mg/ml y 2,5 mg/ml, y no más de 700 ppm de metal pesado y preferiblemente no más de 450 ppm de metal pesado en comparación con el contenido de aluminio, en la que dicha composición comprende no más de 420 ppm de Fe, preferiblemente no más de 100 ppm, en comparación con el contenido de aluminio, no más de 18 ppm, preferiblemente no más de 3 ppm, de Ni en comparación con el contenido de aluminio, y/o no más de 2,5 ppm de Cu, preferiblemente no más de 0,5 ppm, en comparación con el contenido de aluminio. En una realización preferida, dicha composición comprende no más de 700 ppm de metal pesado y preferiblemente no más de 450 ppm de metal pesado en comparación con el contenido de aluminio; no más de 420 ppm de Fe, preferiblemente no más de 100 ppm, en comparación con el contenido de aluminio, no más de 18 ppm, preferiblemente no más de 3 ppm de Ni en comparación con el contenido de aluminio, y no más de 2,5 ppm de Cu, preferiblemente no más de 0,5 ppm, en comparación con el contenido de aluminio.

Como se usa en el presente documento, una "composición de proteína estable" significa que, en comparación con una composición de partida, no más del 50 %, preferiblemente no más del 40 %, incluso más preferiblemente no más del 30 %, incluso más preferiblemente no más del 20 %, incluso más preferiblemente no más del 10, incluso más preferiblemente no más del 5 % de la proteína en dicha composición se degrada. "Degradado" en este contexto se refiere a cualquier modificación detectable de la proteína en comparación con la proteína en la composición de partida. Por ejemplo, una disminución en la detección de la proteína con un anticuerpo monoclonal, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que reconoce un epítipo neutralizante, es adecuada y puede medirse con cualquier método conocido en la técnica, tal como ELISA (véase el Ejemplo 4). El nivel detectado se puede comparar, por ejemplo, con el nivel detectado con un policlonal específico para la misma proteína, tal como, por ejemplo, que representa la cantidad de proteína total (cambiada o sin cambios). También se describe un método para prolongar la vida útil de una composición acuosa que comprende una proteína y una sal de aluminio, comprendiendo dicho método seleccionar y/o preparar una sal de aluminio que da como resultado una composición acuosa con un contenido de metal pesado de menos de 350 ppb sobre la base del peso de la composición acuosa, y combinar dicha sal de aluminio, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa. Se describe adicionalmente un método para mejorar la reproducibilidad de la vida útil de preparaciones de composiciones acuosas que comprenden una proteína y una sal de aluminio, comprendiendo dicho método obtener al menos dos preparaciones diferentes de sal de aluminio, determinando la cantidad de al menos un metal pesado en dichas preparaciones de sal de aluminio, seleccionar de dichas preparaciones de sal de aluminio, preparaciones de sal de aluminio que comprenden menos de 350 ppb de dicho al menos un metal pesado; y combinar sal de aluminio de dichas preparaciones seleccionadas con dicha proteína y agua para producir dichas composiciones acuosas. Preferiblemente, se selecciona una composición que comprende entre 5 mcg/ml y 50 mg/ml de aluminio, preferiblemente entre 0,1 mg/ml y 2,5 mg/ml, y que comprende no más de 700 ppm de metal pesado y preferiblemente no más de 450 ppm de metal pesado en comparación con el contenido de aluminio, en la que dicha composición comprende no más de 420 ppm de Fe, preferiblemente no más de 100 ppm, en comparación con el contenido de aluminio; no más de 18 ppm, preferiblemente no más de 3 ppm, de Ni en comparación con el contenido de aluminio; y/o no más de 2,5 ppm de Cu, preferiblemente no más de 0,5 ppm, en comparación con el contenido de aluminio. Más preferiblemente, dicha composición comprende no más de 700 ppm de metal pesado y preferiblemente no más de 450 ppm de metal pesado en comparación con el contenido de aluminio, en la que dicha composición comprende no más de 420 ppm de Fe, preferiblemente no más de 100 ppm, en comparación al contenido de aluminio; no más de 18 ppm, preferiblemente no más de 3 ppm, de Ni en comparación con el contenido de aluminio; y no más de 2,5 ppm de Cu, preferiblemente no más de 0,5 ppm, en comparación con el contenido de aluminio.

En otro aspecto, la invención describe un método para analizar la estabilidad de almacenamiento de una composición que comprende aluminio y un compuesto terapéutico o profiláctico, comprendiendo dicho método combinar en una composición una cantidad predeterminada de agente terapéutico o vacuna y una cantidad predeterminada de una sal de aluminio, comprendiendo dicho método además almacenar dicha composición durante 5 al menos 2 semanas, preferiblemente al menos 4 semanas y preferiblemente al menos un mes, a una temperatura de más de 20 °C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 22 °C, y determinar la estabilidad y/o la cantidad de proteína, preferiblemente el compuesto terapéutico o profiláctico, en dicha composición. Como se demuestra en los Ejemplos 1 y 2, una temperatura de 22 °C, que es una temperatura más alta en comparación con las condiciones de almacenamiento normales o aproximadamente 2-8 °C, da como resultado la degradación 10 acelerada de proteína en una composición acuosa que comprende proteína, una sal de aluminio y más de 350 ppb de dicho metal pesado basado en el peso con respecto a dicha composición. Por lo tanto, una temperatura de aproximadamente 22 °C y una duración de almacenamiento de al menos 2 semanas, preferiblemente al menos 4 semanas, son adecuadas para determinar la estabilidad de almacenamiento de las composiciones acuosas que comprenden una proteína de acuerdo con la invención. La estabilidad de almacenamiento se puede determinar 15 mediante cualquier método conocido en la técnica. La estabilidad de almacenamiento de una composición acuosa que comprende una proteína de acuerdo con la invención se analiza preferiblemente determinando la estabilidad de almacenamiento de dicha proteína, preferiblemente determinando un epítipo sensible al almacenamiento en dicha proteína. Por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 1 y 2, la estabilidad de una proteína, preferiblemente un antígeno, se determina determinando la relación de epítipo sensible al almacenamiento intacto, tal como el contenido de epítipo antigénico intacto (por ejemplo, epítipo de un epítipo neutralizante), y el contenido total de 20 proteínas. "Epítipo sensible al almacenamiento intacto" o "epítipo antigénico intacto" como se usa en el presente documento significa que la degradación no se ha producido dentro de dicho epítipo. El contenido de epítipo antigénico intacto se mide, por ejemplo, determinando la proteína unida a un anticuerpo monoclonal específicamente dirigido contra dicho epítipo en, por ejemplo, un ELISA. El contenido de proteína total se mide, por ejemplo, 25 determinando la proteína unida al anticuerpo policlonal que se dirige contra diversos epítipos dentro de la proteína, por ejemplo, mediante ELISA. El contenido de epítipo específico relativo puede expresarse entonces como la proporción del contenido de antígeno total determinada por unión a un anticuerpo monoclonal dividido por el contenido de antígeno total determinado por unión a anticuerpo policlonal. Una relación alta indica un alto contenido de epítipo antigénico y una baja relación indica un bajo contenido de epítipo antigénico. Una baja relación medida 30 para una composición acuosa después del almacenamiento al menos a 20 °C, preferiblemente 22 °C, durante al menos 2 semanas, preferiblemente 4 semanas, en comparación con la relación medida para dicha composición acuosa antes del almacenamiento, indica que han tenido lugar cambios estructurales dentro del epítipo antigénico. Los cambios estructurales dentro de dicho epítipo antigénico indican estabilidad de almacenamiento reducida de la composición acuosa.

35 El contenido de metales pesados de una composición acuosa preparada de acuerdo con la invención es inferior a 350 ppb basado en el peso de la composición acuosa. En general, cuanto menos metal pesado contiene dicha composición acuosa, menos degradación proteica se produce. Preferiblemente, por lo tanto, el contenido de metales pesados es menor de 325 ppb basado en el peso de la composición acuosa, más preferiblemente menor de 300 40 ppb, más preferiblemente menor de 275, más preferiblemente menor de 250 ppb, y más preferiblemente menor de 235 ppb basado en el peso de la composición acuosa.

Como se usa en el presente documento, la expresión "metal pesado" se refiere a la cantidad total de elementos que exhiben propiedades metálicas e incluye los metales de transición, metaloides, lantánidos y actínidos. Los metales de transición son elementos cuyo átomo tiene una subcorteza en d incompleta, o que pueden dar lugar a cationes 45 con una subcorteza en d incompleta, e incluyen cinc, molibdeno, cadmio, escandio, titanio, tecnecio, paladio, vanadio, cromo y manganeso, hierro, cobalto, rodio, hafnio, cobre, níquel, itrio, niobio, zirconio, rutenio, plata, tántalo, renio, tungsteno, osmio, meitnerio, platino, iridio, mercurio, boro, seaborgio, hassio. Los metaloides son Boro (B), Silicio (Si), Germanio (Ge), Arsénico (As), Antimonio (Sb), Telurio (Te), Polonio (Po). Los lantánidos son los quince elementos químicos metálicos con números atómicos de 57 a 71, es decir, lantano, cerio, praseodimio, 50 neodimio, praseodimio, neodimio, prometio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio y lutecio. Los actínidos son los quince elementos químicos metálicos con números atómicos de 89 a 103, actinio, torio, protactinio, uranio, neptunio, plutonio, americio, curio, berkelio, californio, einstenio, fermio, mendelevio, nobelio y lawrencio. El metal pesado es preferiblemente un metal del bloque D de la tabla periódica. El metal pesado es preferiblemente un metal del grupo 3-12 de la tabla periódica que incluye los lantánidos y los actínidos. En una 55 realización particularmente preferida, el metal pesado es un metal del bloque D, o grupo 3-12 de la tabla periódica y que no incluye los lantánidos y los actínidos. Preferiblemente, dicho metal pesado es un elemento seleccionado de los metales de transición. En otra realización preferida, el metal pesado se selecciona de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V, Cr, Pb, Rb y Mo. En otra realización preferida, dicho metal pesado es un metal que tiene una masa molar de entre 21 y 83, preferiblemente dicho metal pesado es un metal del bloque D de la tabla periódica con una masa

molecular de entre 21 y 83, más preferiblemente de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V, Cr y Mo. Preferiblemente, dicho metal pesado es un metal del bloque D de la tabla periódica con una masa molecular de entre 21-30 y 39-48, más preferiblemente de Cu, Ni, Co, Ru, Cd, Ag, Fe, V, Cr y Mo. En un aspecto aún más preferido, el metal pesado se selecciona de los metales pesados Cu, Ni y Fe.

5

Como se demuestra en los Ejemplos, se identificó que el lote de hidróxido de aluminio (alumbre) 4230 contribuye significativamente a la degradación del antígeno en la vacuna contra JEV FVL09L37. En el ejemplo 3, se muestra que este lote de alumbre comprende al menos los siguientes metales: Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V. Se observaron niveles más altos de iones de Fe, Ni y Cu en el lote de alumbre 4230 en comparación con otros lotes investigados. El lote 4230 fue el único en el que se detectaron iones Cu residuales. Por lo tanto, preferiblemente dicho metal pesado se selecciona del grupo que consiste en Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V, más preferiblemente de Fe, Ni y Cu.

La cantidad de metal pesado en la composición acuosa es preferiblemente menor de 350 ppb basado en el peso de la composición acuosa. Preferiblemente, la cantidad de metal pesado en la composición acuosa es inferior a 250 ppb, preferiblemente inferior a 225, más preferiblemente inferior a 200, más preferiblemente inferior a 150, más preferiblemente inferior a 100, más preferiblemente inferior a 50, más preferiblemente inferior a 25 ppb basado en el peso de la composición acuosa. La cantidad de metal pesado en una composición acuosa de la invención se ha definido anteriormente en el presente documento. Esta cantidad es típicamente para el total de metales pesados determinados, o para los metales pesados Fe, Cr y Ni, o una combinación de los mismos, que constituyen los metales pesados principales en peso en la composición acuosa de la invención. Para los metales pesados específicos, pueden preferirse cantidades de máximos diferentes. Por ejemplo, se prefiere que la cantidad de Fe en la composición acuosa de la invención sea inferior a 350 ppb en base al peso de la composición acuosa. En una realización preferida, la cantidad de Fe es menor de 250 ppb, preferiblemente menor de 210 ppb Fe en base al peso de la composición acuosa.

25

Existe una fuerte evidencia de que muchos de los efectos proinflamatorios de los adyuvantes de aluminio están mediados por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El aluminio puede promover, en condiciones fisiológicas, la reducción de Fe(III) a Fe(II) y la oxidación de esta última. Por lo tanto, la combinación de Fe y Al en el adyuvante potenciará la formación y las actividades de ROS (Exley, C (2010). Trends in Immunol. Vol. 31: págs. 103-109). En la presente invención, se ha descubierto que Fe puede estar presente en una composición acuosa de la invención sin afectar significativamente a la estabilidad de almacenamiento de la composición. En esta realización de la invención, se prefiere que la composición acuosa de la invención comprenda entre 5 ppb y 250 ppb de Fe en base al peso de la composición acuosa. En estas cantidades, la formación de ROS durante el almacenamiento debido a la presencia de dicha cantidad de Fe (si hubiera ROS) no afecta significativamente a la estabilidad de almacenamiento de la composición acuosa como se define en otra parte en el presente documento. Sin embargo, las cantidades son suficientes para permitir efectos proinflamatorios después de la administración de la vacuna *in vivo*.

En la presente invención, se ha descubierto que particularmente la presencia del metal pesado Cu afecta seriamente a la estabilidad de almacenamiento de la composición de la invención. La cantidad de Cu en una composición o método que contiene proteína para producir la composición de proteína de la invención es inferior a 1,25 ppb basado en el peso de la composición acuosa. En una realización particularmente preferida, dicha composición acuosa comprende Cu a un nivel que está por debajo del límite de detección del método para la detección de cobre como se describe en los Ejemplos.

45

En la presente invención, se ha descubierto que particularmente el metal pesado Ni afecta a la estabilidad de almacenamiento de la composición de la invención. La cantidad de Ni en una composición o método de la invención es preferiblemente menor de 200 ppb. Preferiblemente menor de 40 ppb, preferiblemente menor de 9 ppb y preferiblemente menor de 2 ppb en base al peso de la composición acuosa. En una realización particularmente preferida, por lo tanto, una composición acuosa de la invención comprende menos de 40 ppb de Ni en base al peso de la composición acuosa. Preferiblemente menos de 30 ppb, más preferiblemente menos de 20 ppb y más preferiblemente menos de 15 ppb Ni en base al peso de la composición acuosa. En una realización particularmente preferida, dicha composición acuosa comprende Ni a un nivel que está por debajo del límite de detección del método para la detección de níquel como se describe en los Ejemplos.

50

El metal pesado puede estar presente de forma neutra electrónica o puede estar ionizado. Típicamente y preferiblemente, el metal pesado está presente de forma iónica en una composición acuosa de la invención.

El contenido de metal de una composición se puede determinar de diversas maneras. En un aspecto, un método de

acuerdo con la invención comprende determinar el nivel de un metal pesado en una composición acuosa y/o la sal de aluminio presente en dicha composición acuosa. Los métodos para medir el nivel de uno o más metales pesados en una solución acuosa se conocen en la técnica. Los ejemplos de dichos métodos incluyen espectrometría de masas, tal como espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), espectrometría de absorción atómica de llama (F-AAS), y/o espectrometría de absorción atómica de horno de grafito (GF-AAS).

Un ejemplo de un ensayo que puede usarse para determinar el contenido de metales pesados se describe en el Ejemplo 3. El ensayo implica tratar una muestra de una solución acuosa que contiene una sal de aluminio con HNO₃ concentrado bajo calor hasta que obtener una solución transparente. La solución transparente puede luego diluirse y analizarse adicionalmente, por ejemplo mediante ICP-MS, F-AAS y/o GF-AAS, para determinar la presencia y el contenido de iones metálicos, incluyendo Pb, Cd, Cr, Co, Fe, Cu, Ni, Ag, W y Al.

Los Ejemplos 1 y 2 demuestran que el antígeno de JEV muestra una mayor estabilidad a pH 7,5-8 en comparación con pH 7. En los ejemplos, la estabilidad del antígeno se expresa como la relación de ELISA monoclonal/policlonal. Se demostró que el anticuerpo monoclonal utilizado (clon 52-2-5) reconoce un epítipo neutralizante en la vacuna contra la encefalitis japonesa (JEV). El contenido de epítipo específico relativo puede expresarse como la relación del contenido de antígeno total determinado por "ELISA monoclonal" dividido por el contenido de antígeno total determinado por "ELISA policlonal". Sin quedar ligado por la teoría, el efecto de una mayor estabilidad del antígeno a pH 7,5-8 puede explicarse en base a la química de reacción compleja supuesta subyacente de los sulfitos. El pH puede influir en las condiciones de reacción en equilibrio de la reacción de sulfito/formaldehído y la carga superficial de ciertas proteínas/cadenas laterales de aminoácidos accesibles para su modificación. El pH puede afectar a la oxidación por influencia directa sobre los potenciales redox de los residuos de aminoácidos y los agentes oxidantes, por ejemplo, radicales libres. Por lo tanto, en una realización, un método de acuerdo con la invención comprende tamponar dicha composición acuosa a un pH de entre 7,5 y 8,5.

Se están usando diversas sales de aluminio en composiciones para la administración de un individuo. El adyuvante de aluminio contiene típicamente un óxido o sulfato de aluminio o una combinación de los mismos. En una realización preferida, la sal de aluminio comprende óxido de aluminio (Al₂O₃), hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) o fosfato de aluminio (AlPO₄).

En una realización preferida, la composición acuosa de la invención comprende además un compuesto reactivo. Típicamente, aunque no necesariamente, el compuesto reactivo está presente como resultado de una manipulación de la composición acuosa, por ejemplo, para tratar o inactivar un agente infeccioso, si lo hubiera en la composición. El compuesto reactivo también puede estar presente por otra razón. El sulfito, por ejemplo, a veces está presente para inactivar cualquier formaldehído residual en la solución acuosa. El formaldehído es típicamente un producto químico que a menudo se usa para inactivar cualquier agente infeccioso.

El compuesto reactivo es preferiblemente un compuesto activo redox, un compuesto para la formación de radicales y/o un compuesto estabilizante. En una realización preferida, dicha composición acuosa de la invención comprende formaldehído, etanol, cloroformo, tricloroetileno, acetona, triton-X-100, desoxicolato, pirocarbonato de dietilo, sulfito, Na₂S₂O₅, beta-propio-lactona, polisorbato tal como Tween 20®, Tween 80®, O₂, fenol, copolímeros de tipo pluronic, o una combinación de los mismos.

El sulfito está presente preferiblemente en una cantidad de entre 0,1 mM y 5 mM, o preferiblemente entre 0,5-2 mM. La formalina está presente preferiblemente en una cantidad entre 0,1 mM y 5 mM, más preferiblemente entre 0,5 mM y 2 mM. El oxígeno está presente preferiblemente en una cantidad que es equivalente a la solubilidad de O₂ a la temperatura medida, el O₂ está presente preferiblemente en una cantidad de entre 10 y 250 μM cuando se mide a 20 grados Celsius. Cuando se mide a una temperatura de 0 grados Celsius, el O₂ está presente preferiblemente en una cantidad de entre 10 y 400 μM. Un compuesto estabilizante está presente preferiblemente en una cantidad de entre 10 y 400 μM. De manera similar, está presente un compuesto activo redox en una cantidad entre 0,1 mM y 5 mM, o preferiblemente entre 0,5-2 mM. Un compuesto de formación de radicales está presente preferiblemente en una cantidad de entre 0,1 mM y 5 mM, o preferiblemente entre 0,5-2 mM. En este contexto, y en aras de la claridad, es importante señalar que el compuesto activo redox, el compuesto de construcción radical y/o el compuesto estabilizante se consume en la producción de un radical, mientras que el metal pesado que se indica anteriormente en el presente documento, es un catalizador en la producción de un radical y no se consume, como tal. El compuesto activo redox, el compuesto de formación de radicales y/o el compuesto estabilizante, por lo tanto, no es un metal pesado.

La cantidad total de compuesto activo redox, el compuesto de formación de radicales y/o el compuesto de estabilización, aunque pequeño en cantidades absolutas, puede ser aún significativo en relación con el antígeno o proteína en la composición acuosa de la invención. El antígeno/proteína está presente preferiblemente en una

cantidad de entre 0,1 nmol y 1 umol, más preferiblemente entre 1 nmol y 100 nmol.

La concentración de proteína, preferiblemente una proteína terapéutica o de vacuna, en una composición acuosa que comprende una proteína de acuerdo con la invención, está preferiblemente entre 1 ng/ml y 10 mg/ml, 5 preferiblemente entre 10 ng/ml y 1 mg/ml, más preferiblemente entre 100 ng/ml y 100 mcg/ml, tal como entre 1 mcg/ml y 100 mcg/ml. La concentración es preferiblemente de al menos 1 ng/ml para asegurar que la proteína terapéutica o de vacuna esté en una concentración suficiente para ejercer su efecto terapéutico cuando se administra a un individuo. Sin embargo, la concentración preferiblemente no debe exceder 10 mg/ml con el fin de prevenir o reducir la aparición de posibles efectos secundarios asociados con la administración de dicha proteína a un individuo. En particular, la concentración de proteína vírica en una composición acuosa de acuerdo con la invención que comprende JEV está preferiblemente entre 0,01 µg/ml y 1 mg/ml, más preferiblemente entre 0,1 mcg/ml y 100 mcg/ml. En una realización ejemplar de la invención, una composición acuosa de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 10 mcg/ml de JEV. La dosis de una única administración de una composición acuosa que comprende una proteína, preferiblemente una proteína terapéutica o de vacuna, de 10 acuerdo con la invención está preferiblemente entre 0,1 ml y 10 ml, preferiblemente entre 0,5 ml y 5 ml, tal como 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml, 2,5 ml, porque tal dosis permite la administración conveniente a un individuo, tal como un ser humano.

La composición acuosa de acuerdo con la invención puede comprender además una molécula de ácido nucleico. El 20 ácido nucleico se puede administrar con fines terapéuticos. En ese caso, la composición acuosa de acuerdo con la invención preferiblemente comprende una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno o antígenos o virus o bacteria o parte inmunogénica de los mismos contra la que se busca una respuesta inmune. La incorporación de dicha molécula de ácido nucleico se basa en la producción *in situ* del antígeno, virus, bacteria diana o parte inmunogénica de los mismos. En otra 25 realización preferida, la composición acuosa de acuerdo con la invención comprende un ácido nucleico en forma de un ARN antisentido, ARNi o imitación del mismo. En otra realización más, la composición acuosa de acuerdo con la invención comprende el ácido nucleico en forma de un agente infeccioso como tal, un virus o un virus modificado, como es el caso en muchos enfoques de terapia génica. La concentración de ácido nucleico en la composición acuosa, composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con la invención está preferiblemente en el intervalo de 30 aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mcg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, más preferiblemente aproximadamente 1 mcg/ml a aproximadamente 100 mcg/ml. La dosificación adecuada dependerá del sujeto al que se administra la composición y del tamaño de las secuencias de ácido nucleico presentes en la composición.

Una composición acuosa de acuerdo con la invención puede comprender además un polisacárido y/o un oligosacárido, preferiblemente la cápsula de polisacárido y/u oligosacárido de bacterias encapsuladas contra las que se busca una respuesta inmune. Los ejemplos de polisacáridos y oligosacáridos que pueden estar presentes en una composición acuosa de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, polisacáridos pneumocócicos, polisacáridos meningocócicos, polisacáridos *Haemophilus influenzae* de tipo b, polisacáridos estreptocócicos del 40 grupo B, polisacáridos de *Salmonella typhi* Vi, polisacáridos u oligosacáridos derivados del estreptococo del grupo A, *Staphylococci*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococci*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Bacillus anthracis*. Dicho polisacárido y/o un oligosacárido pueden estar presentes en la composición acuosa de acuerdo con la invención como tal o, como alternativa, el polisacárido y/o un oligosacárido pueden conjugarse con una proteína. La concentración de polisacáridos y/u oligosacáridos en la composición acuosa, composición 45 inmunogénica o vacuna de acuerdo con la invención está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 500 mcg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mcg/ml a aproximadamente 500 mcg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1 mcg/ml a aproximadamente 50 mcg/ml. La dosificación adecuada dependerá del sujeto al que se administra la composición.

Un método de acuerdo con la invención se usa preferiblemente para aumentar la estabilidad de una composición inmunogénica, preferiblemente una vacuna, que comprende un adyuvante a base de sal de aluminio. Los ejemplos de dichas vacunas son las dirigidas contra la infección por *Bacillus anthracis* (causante de ántrax), *Corynebacterium diphtheriae* (causante de la difteria), *Clostridium tetani* (causante del tétanos), *Pseudomonas* tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* tales como *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*, 55 bacterias de *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus del papiloma humano, virus de la influenza, virus de la encefalitis japonesa, Rotavirus, bacterias de *Rickettsiae* (causantes del tifus), virus de la fiebre amarilla, virus de varicela zoster, Meningococcus, o combinaciones de los mismos, tal como, pero sin limitación, DTP (difteria, tétanos, polio). Una composición acuosa que comprende una proteína de acuerdo con la invención comprende preferiblemente una proteína que es una proteína vírica,

preferiblemente una proteína de *Haemophilus influenzae*, virus de la polio, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus del papiloma humano, virus de la influenza, virus de la encefalitis japonesa, rotavirus, virus de la fiebre amarilla y/o virus de *Varicella Zoster*. En una realización preferida, dicha proteína contenida en una composición que comprende una proteína de acuerdo con la invención es una proteína vírica de un virus de la familia *Flaviviridae*,
 5 preferiblemente de un virus de encefalitis japonesa (JEV). Como se demuestra en los Ejemplos, la estabilidad de composiciones acuosas que comprende una proteína JEV, una sal de aluminio y que comprende menos de 350 ppb de metales pesados en base al peso de la composición acuosa, y en particular en la que la cantidad de Cu es menor de 3 ppb basada en el peso de la composición acuosa, se aumenta en comparación con la composición acuosa que comprende más de 350 ppb de metal pesado y más de 3 ppb de Cu. Por lo tanto, un método de acuerdo con la
 10 invención es particularmente adecuado para aumentar la estabilidad de una composición acuosa que comprende una proteína JEV. En las tablas 25 y 26, se proporciona una lista no limitante de ejemplos de vacunas a base de aluminio, tanto para uso humano como para uso veterinario. También se describe un método particularmente adecuado para aumentar la estabilidad de una vacuna enumerada en la tabla 25 y/o la tabla 26. Por lo tanto, una vacuna enumerada en la tabla 25 y/o tabla 26 se prepara preferiblemente usando un método como se describe en el
 15 presente documento.

También se describe una proteína bacteriana de una bacteria de la familia *Pseudomonas*, preferiblemente de *Pseudomonas aeruginosa*. Como se demuestra en los Ejemplos, la estabilidad de las composiciones acuosas que comprenden la proteína de fusión de *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 1) y una sal de aluminio se reduce
 20 cuando está presente más de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa.

Una composición acuosa que comprende una proteína de acuerdo con la invención es particularmente adecuada para su uso como una composición inmunogénica o vacuna. Por ejemplo, tales composiciones son particularmente
 25 útiles para inmunizar a un individuo para tratar o prevenir una infección vírica. También se describe un método para el tratamiento de un individuo que comprende obtener una composición acuosa inmunogénica que comprende una proteína y una sal de aluminio, teniendo dicha sal de aluminio menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa, preferiblemente menos de 3 ppb de Cu, y administrar la composición acuosa inmunogénica a un individuo que lo necesite. También se describe un método para el tratamiento profiláctico de un
 30 individuo que comprende obtener una composición acuosa inmunogénica que comprende una proteína y una sal de aluminio, teniendo dicha sal de aluminio menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa, preferiblemente menos de 3 ppb de Cu, y administrar la composición acuosa inmunogénica a un individuo que lo necesite. Se describe adicionalmente un método para inducir y/o reforzar una respuesta inmune hacia a un antígeno en un individuo, comprendiendo dicho método obtener una composición acuosa que comprende una
 35 proteína que comprende dicho antígeno y una sal de aluminio, teniendo dicha sal de aluminio menos de 350 ppb de metal basado en el peso de la composición acuosa, preferiblemente menos de 3 ppb de Cu, y administrar la composición acuosa a un individuo que lo necesite. En otro aspecto, la invención describe un método para inmunizar un individuo que comprende administrar a dicho individuo al menos dos composiciones inmunogénicas en un intervalo de al menos dos semanas entre cada administración, y en el que cada una de dichas al menos dos
 40 composiciones inmunogénicas comprende el mismo antígeno, y en el que al menos una de dichas composiciones inmunogénicas comprende además una sal de aluminio que tiene menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa, preferiblemente menos de 3 ppb de Cu, y la administración de la composición acuosa inmunogénica a un individuo que lo necesite. Las composiciones de ácido nucleico a veces también se administran junto con aluminio. Es posible reemplazar la "proteína" en una composición acuosa de la invención con
 45 ácido nucleico. También se describe un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio y

- combinar una sal de aluminio, dicho ácido nucleico y agua para producir dicha composición acuosa y
- determinar el nivel de un metal pesado en la composición acuosa y/o la sal de aluminio.

50 La invención describe además un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio y un ácido nucleico, comprendiendo dicho método

- preparar o seleccionar una sal de aluminio que tenga menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa final, preferiblemente menos de 3 ppb de Cu, y administrar la composición
 55 acuosa inmunogénica a un individuo que lo necesite y
- combinar dicha sal de aluminio, dicho ácido nucleico y agua para producir dicha composición acuosa.

En una realización preferida, dichos métodos comprenden además tamponar dicha composición acuosa a un pH de entre 7,5 y 8,5. En una realización particularmente preferida, dichos métodos comprenden además empaquetar

alícuotas de dicha composición acuosa que tiene menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa en recipientes de almacenamiento herméticos por separado. El ácido nucleico se puede administrar con fines terapéuticos. Por ejemplo, en forma de un ARN antisentido, ARNi o imitación de los mismos. El ácido nucleico también se puede administrar en forma de un agente infeccioso, típicamente un virus o un virus modificado, como es el caso en muchos enfoques de terapia génica. En ese caso, el ácido nucleico está encerrado en una partícula que comprende proteína. Por lo tanto, la invención describe además una composición acuosa que comprende un ácido nucleico y una sal de aluminio, comprendiendo dicha composición menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa. La concentración de ácido nucleico en la composición acuosa, composición inmunogénica o vacuna está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mcg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, más preferiblemente aproximadamente 1 mcg/ml a aproximadamente 100 mcg/ml. La dosificación apropiada dependerá del sujeto al que se administra la composición y del tamaño de las secuencias de ácido nucleico presentes en la composición.

15 Las composiciones que comprenden conjugados de polisacárido, oligosacárido o polisacárido-polipéptido a veces también se administran junto con aluminio. Es posible reemplazar la "proteína" en una composición acuosa de la invención con un conjugado de polisacárido, oligosacárido o polisacárido-polipéptido o una combinación de los mismos. Dicho polisacárido u, oligosacárido es preferiblemente el polisacárido u oligosacárido de la cápsula de bacterias encapsuladas contra las que se busca una respuesta inmune. Los ejemplos de polisacáridos y oligosacáridos que pueden estar presentes en una composición acuosa de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, polisacáridos pneumocócicos, polisacáridos meningocócicos, polisacáridos *Haemophilus influenzae* de tipo b, polisacáridos estreptocócicos del grupo B, polisacáridos de *Salmonella typhi* Vi, polisacáridos u oligosacáridos derivados del estreptococo del grupo A, *Staphylococci*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococci*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Bacillus anthracis*. Dicho polisacárido y/o un oligosacárido pueden estar presentes en la composición acuosa de acuerdo con la invención como tal o, como alternativa, el polisacárido y/o un oligosacárido pueden conjugarse con una proteína. Por lo tanto, en una realización, la invención describe un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio y un polisacárido u oligosacárido, comprendiendo el método

30 - combinar una sal de aluminio, dicho polisacárido u oligosacárido y agua para producir dicha composición acuosa y
 - determinar el nivel de un metal pesado en la composición acuosa y/o la sal de aluminio.

La invención también describe un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio y un polisacárido u oligosacárido, comprendiendo dicho método

40 - preparar o seleccionar una sal de aluminio que tenga menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa final, preferiblemente menos de 3 ppb de Cu, y administrar la composición acuosa inmunogénica a un individuo que lo necesite y
 - combinar dicha sal de aluminio, dicho polisacárido u oligosacárido y agua para producir dicha composición acuosa.

La concentración de polisacárido y/u oligosacárido en la composición acuosa, composición inmunogénica o vacuna está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 500 µg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mcg/ml a aproximadamente 500 mcg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1 mcg/ml a aproximadamente 50 mcg/ml. La dosificación apropiada dependerá del sujeto al que se administra la composición.

El conjugado de polisacárido-polipéptido comprende al menos un polisacárido y al menos un polipéptido.
 50 El polisacárido es preferiblemente un polisacárido capsular bacteriano. Los polisacáridos capsulares se pueden preparar mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

En una realización, el polisacárido es un polisacárido capsular de *S. pneumoniae*. En otra realización, el polisacárido capsular de *S. pneumoniae* se selecciona del grupo que consiste en los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, HA, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 3F, que representan los 23 serotipos pneumocócicos que causan la gran mayoría de enfermedades pneumocócicas en todos los grupos de edad, de los más de 90 serotipos conocidos hasta ahora.

El término "polisacárido" como se usa en el presente documento, se refiere a polisacáridos y/u oligosacáridos. Los

polisacáridos se aíslan de las bacterias y se pueden despolimerizar a un intervalo de tamaños preferido mediante métodos conocidos (véanse, por ejemplo, los documentos EP 497524 y EP 497525). Los oligosacáridos tienen un número bajo de unidades de repetición (típicamente 5-30 unidades de repetición) y típicamente son polisacáridos hidrolizados.

- 5 Los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* comprenden unidades de repetición de oligosacáridos que pueden contener hasta 8 residuos de azúcar. Para una revisión de las unidades de oligosacáridos para los serotipos clave de *Streptococcus pneumoniae*, véase Jones et al, An. Acad. Bras. Cienc, 2005, 77(2): 293-324. En una realización, un antígeno de sacárido capsular puede ser un polisacárido de longitud completa, sin embargo, en
- 10 otros puede ser una unidad oligosacárida o una cadena sacárida más corta que la longitud nativa de unidades de repetición oligosacáridas. Los polisacáridos de longitud completa pueden ser "dimensionados" o "despolimerizados", es decir, su tamaño puede reducirse por diversos métodos conocidos en la técnica (como se ha descrito anteriormente). El término "despolimerización" incluye la despolimerización parcial.
- 15 La despolimerización de los polisacáridos puede ir seguida de una etapa de activación antes de la conjugación con un polipéptido transportador. Por "activación" se entiende el tratamiento químico del polisacárido para proporcionar grupos químicos capaces de reaccionar con el polipéptido transportador. Se conocen métodos apropiados en la técnica.
- 20 Por "polipéptido" o "proteína" se entiende cualquier cadena de aminoácidos que tiene al menos 10 y preferiblemente al menos 100 aminoácidos en unión peptídica entre sí, independientemente de la modificación postraduccional. Los portadores polipeptídicos adecuados incluyen, pero sin limitación, toxina diftérica, toxoide diftérico, CRM 197, toxoide tetánico, toxoide pertussis, LT de *E. coli*, ST de *E. coli*, exotoxina A, complejo de membrana externa c (OMPC), porina, proteína de unión a transferrina, neumólisis, proteína de superficie pneumocócica A (PspA), proteína de
- 25 adhesina pneumocócica (PsaA), ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) o derivado proteínico purificado de tuberculina (PPD), y similares. Los polipéptidos portadores son preferiblemente polipéptidos que no son tóxicos y no reactogénicos y que se pueden obtener en cantidad y pureza suficientes. En una realización particularmente preferida, el polipéptido transportador comprende un toxoide tetánico. En otra realización preferida, el polipéptido transportador comprende un derivado de cualquiera de los polipéptidos
- 30 transportadores mencionados anteriormente, por ejemplo, una subunidad o una versión mutada de LT de *E. coli*, tal como LT o la subunidad A de LT (LTA) que tiene una sustitución de aminoácido en la posición de aa 192 (por ejemplo, LTG 192, LTT 192, LTS 192, LTA 192), LTK 63 LTR 72, u otros mutantes, como se describe, por ejemplo en los documentos WO 98/42375, WO 02/64162, US 4.761.372, US 5.308.835. Los polipéptidos también pueden
- 35 contener elongaciones en el extremo carboxi o en el extremo amino del polipéptido que facilitan la interacción con el compuesto o compuestos policatiónicos o el compuesto o compuestos inmunoestimuladores.

Además, los polipéptidos también pueden derivatizarse para incluir moléculas que potencian la presentación de antígenos y el direccionamiento de antígenos a células que presentan antígenos.

- 40 El polipéptido se puede activar antes de la conjugación.

La naturaleza y el tamaño del sacárido, la naturaleza y el tamaño de la proteína o polipéptido, la relación del sacárido y la proteína/polipéptido, así como otros factores y condiciones para la preparación de un conjugado, pueden determinarse por un experto, como se describe, por ejemplo, en Robbins et al, JAMA, 1996, 276(14): 1181-

45 5. Por ejemplo, para un polisacárido pneumocócico y un toxoide tetánico, una relación preferida es aproximadamente 2:1.

- Por "conjugado" se entiende un compuesto en el que el polisacárido está unido covalentemente a un polipéptido transportador. Existen muchas reacciones de conjugación conocidas en la técnica anterior que se han empleado
- 50 para unir de manera covalente polisacáridos a polipéptidos con el fin de producir un conjugado polisacárido-polipéptido. Tres de los métodos empleados más comúnmente incluyen: 1) aminación reductora, en la que el grupo aldehído o cetona en un componente de la reacción reacciona con el grupo amino o hidrazida en el otro componente, y el doble enlace C-N formado se reduce posteriormente a único enlace C-N por un agente reductor; 2) conjugación de cianilación, en la que el polisacárido se activa mediante bromuro de cianógeno (CNBr) o
- 55 tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamoniopiridinio (CDAP) para introducir un grupo cianato en el grupo hidroxilo, que forma un enlace covalente al grupo amino o hidrazida después de la adición del componente de proteína; y 3) una reacción de carbodiimida, en la que la carbodiimida activa el grupo carboxilo en un componente de la reacción de conjugación, y el grupo carbonilo activado reacciona con el grupo amino o hidrazida en el otro componente. Estas reacciones también se emplean frecuentemente para activar los componentes del conjugado antes de la reacción de

conjugación. El polisacárido puede conjugarse con el polipéptido directamente o mediante un enlazador. El enlace a través de un grupo enlazador puede realizarse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en los documentos US 4.882.317 y US 4.695.624. Los enlazadores adecuados incluyen carbonilo, ácido adípico, B-propionamido (documento WO 00/10599), nitrofenil-etilamina (Gever et al., Med. Microbiol. Immunol, 1979, 165:171-288), haluros de haloacilo (documento US 4.057.685), enlaces glicosídicos (documentos US 4.673.574; US 4.761.283; US 4.808.700), ácido 6-aminocaproico (documento US 4.459.286), ADH (US 4.965.338), restos de C4 a C12 (documento US 4.663.160), etc.

Después de la conjugación del polisacárido con el polipéptido portador, el conjugado polisacárido-polipéptido puede purificarse (enriquecido con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-polipéptido) mediante una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Un objetivo de la etapa de purificación es eliminar el polisacárido y/o polipéptido no unido del conjugado polisacárido-polipéptido. Los métodos para la purificación incluyen, por ejemplo, ultrafiltración en presencia de sulfato de amonio, cromatografía por exclusión de tamaño, centrifugación en gradiente de densidad, y cromatografía de interacción hidrófoba.

El adyuvante de aluminio, tal como adyuvantes de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, se preparan generalmente exponiendo soluciones acuosas de iones de aluminio a condiciones normalmente ligeramente alcalinas en un entorno químico bien definido y controlado. Se pueden usar diversas sales solubles de aluminio para la producción de hidróxido de aluminio. Los aniones presentes en el momento de la precipitación pueden coprecipitar con el hidróxido o sulfato de aluminio. Después de la precipitación de la sal de amonio mediante cambio de pH usando, por ejemplo, NaOH, no es posible eliminar ningún metal pesado presente en el adyuvante de aluminio. Ni siquiera un lavado extenso da como resultado una reducción suficiente del contenido de metales pesados. Por lo tanto, es importante controlar el metal pesado antes de la precipitación de la sal de aluminio, es decir, mediante la selección de las materias primas apropiadas, el control de las condiciones del proceso, por ejemplo, dado que las fuentes de aluminio están en solución, no debería haber metal añadido, por ejemplo, otras sales, tales como CuSO_3 . Como alternativa o adicionalmente, cualquier metal pesado presente en solución se elimina antes de la precipitación del adyuvante de aluminio. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante cristalización o intercambio iónico (catiónico), que son métodos bien conocidos en la técnica. El intercambio iónico se refiere a un proceso a través del cual los iones (metálicos) en solución se transfieren a una matriz sólida que, a su vez, libera iones de un tipo diferente pero de la misma polaridad en la solución. Por lo tanto, los iones en solución se reemplazan por diferentes iones presentes originalmente en la matriz sólida. La cristalización de metales se refiere a la precipitación de cristales metálicos insolubles en iones metálicos en solución. Por lo tanto, se describe un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, comprendiendo dicho método

- preparar una sal de aluminio que sea capaz de proporcionar una composición acuosa que tenga menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa y
- combinar dicha sal de aluminio, dicho compuesto reactivo, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa,

por lo que dicha sal de aluminio se prepara preparando una solución acuosa de iones aluminio, eliminando metales pesados de dicha solución acuosa tal como por cristalización o intercambio iónico, preferiblemente intercambio catiónico, y precipitando dichos iones de aluminio en dicha solución, preferiblemente usando una base.

Se describe adicionalmente un método para preparar una precipitado de sal de aluminio de calidad clínica para su incorporación en un medicamento y/o vacuna, comprendiendo dicho método preparar una solución acuosa de iones de aluminio, eliminar metales pesados de dicha solución acuosa tal como mediante cristalización o intercambio iónico, preferiblemente intercambio catiónico, y precipitar dichos iones de aluminio en dicha solución, y determinar el nivel de un metal pesado en la solución y/o el precipitado de sal de aluminio, en el que el precipitado que se selecciona es capaz de proporcionar una composición acuosa que comprende menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa.

La preparación de hidróxido de aluminio a partir de materias primas se describe, entre otros, en los documentos CN101734698 y WO98/14401.

Se describe adicionalmente un método para preparar una composición acuosa farmacéutica o de vacuna que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, comprendiendo dicho método

- seleccionar una sal de aluminio que sea capaz de proporcionar una composición acuosa que tenga menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa y

- combinar dicha sal de aluminio, dicho compuesto reactivo, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa (i) que tiene menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa y (ii) que comprende entre 5 µg/ml y 50 mg/ml de aluminio;

5 en el que el compuesto reactivo se selecciona del grupo que consiste en un compuesto activo redox, un compuesto de formación de radicales, un compuesto estabilizante y una combinación de cualquiera de los mismos.

El método preferiblemente comprende además tamponar dicha composición acuosa a un pH de entre 6,5 y 8,5.

10 El método comprende preferiblemente además empaquetar alícuotas de dicha composición acuosa que tienen menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa en recipientes de almacenamiento herméticos por separado.

La invención describe además un método para seleccionar un precipitado de sal de aluminio de calidad clínica para la incorporación en un medicamento y/o vacuna, comprendiendo dicho método preparar una solución acuosa de 15 iones de aluminio y precipitar dichos iones aluminio de dicha solución, y determinar el nivel de un metal pesado en la solución y/o el precipitado de sal de aluminio, en el que el precipitado que se selecciona es capaz de proporcionar una composición acuosa que comprende (i) menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa y (ii) entre 5 µg/ml y 50 mg/ml de aluminio.

20 También se describe una composición acuosa farmacéutica o de vacuna que comprende una proteína, un compuesto reactivo y una sal de aluminio, comprendiendo dicha composición (i) menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa y (ii) entre 5 µg/ml y 50 mg/ml de aluminio, en la que el compuesto reactivo se selecciona del grupo que consiste en un compuesto activo redox, un compuesto de formación de 25 radicales, un compuesto estabilizante y una combinación de cualquiera de los mismos. En una realización preferida, dicho metal pesado se selecciona de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V, Cr, Pb, Rb y Mo. El metal pesado se selecciona preferiblemente de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V. En una realización particularmente preferida, el metal pesado se selecciona de Cu o Ni. El metal pesado está presente preferiblemente de forma iónica. La sal de aluminio es preferiblemente hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) o fosfato de aluminio (AlPO₄). La sal de aluminio es preferiblemente hidróxido de aluminio (Al(OH)₃). El compuesto reactivo se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en formaldehído, etanol, cloroformo, tricloroetileno, acetona, 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol, desoxicolato, pirocarbonato de dietilo, sulfito, Na₂S₂O₅, beta-propio-lactona, polisorbato tal como monolaurato de polietilenglicol sorbitán, monooleato de polietilenglicol sorbitán, O₂, fenol, copolímeros de tipo pluronic, y una combinación de cualquiera de los mismos. La composición acuosa farmacéutica de vacuna comprende 30 preferiblemente entre 50 µg/ml y 5 mg/ml de aluminio. La composición acuosa farmacéutica o de vacuna preferiblemente comprende entre 5 ppb y 250 ppb de Fe en base al peso de la composición acuosa. La composición acuosa farmacéutica o de vacuna preferiblemente comprende menos de 3 ppb de Cu en base al peso de la composición acuosa. La composición acuosa farmacéutica o de vacuna preferiblemente comprende menos de 40 ppb de Ni en base al peso de la composición acuosa. La proteína en dicha composición acuosa farmacéutica o de 40 vacuna preferiblemente es un producto terapéutico y/o una vacuna. La proteína es preferiblemente una proteína vírica. La proteína vírica preferiblemente es una proteína del virus de la encefalitis japonesa. La proteína es preferiblemente una proteína dentro de una partícula vírica inactivada con formaldehído. La composición acuosa farmacéutica o de vacuna comprende preferiblemente además sulfito.

La invención proporciona además una vacuna que comprende una composición de vacuna acuosa de acuerdo con 45 la invención.

Cuando en el presente documento se indica un intervalo entre el valor X e Y, el intervalo incluye los valores X e Y.

La invención describe además un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio, un 50 compuesto reactivo y una proteína, comprendiendo dicho método

- preparar o seleccionar una sal de aluminio que sea capaz de proporcionar una composición acuosa que tenga menos de 450 ppm de metal pesado basado en el peso del aluminio (gramo/gramo) y

55 - combinar dicha sal de aluminio, dicho compuesto reactivo, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa. Preferiblemente, el contenido de Fe de la composición acuosa es menor de 700 ppm basado en el peso del aluminio en la composición; el contenido de Ni es inferior a 18 ppm basado en el peso del aluminio en la composición; o el contenido de Cu es inferior a 2,5 ppm basado en el peso del aluminio en la composición acuosa, o una combinación de los mismos. Preferiblemente, el método comprende además tamponar dicha composición acuosa a un pH de entre 6,5 y 8,5. Preferiblemente, el

método comprende además empaquetar alícuotas de dicha composición acuosa que tiene menos de 450 ppm de metal pesado basado en el peso del aluminio en la composición en recipientes de almacenamiento herméticos por separado.

- 5 La invención describe además un método para preparar un precipitado de sal de aluminio de calidad clínica para su incorporación en un medicamento y/o vacuna, comprendiendo dicho método preparar una solución acuosa de iones de aluminio y precipitar dichos iones aluminio en dicha solución, y determinar el nivel de un metal pesado en la solución y/o el precipitado de sal de aluminio, en el que el precipitado que se selecciona es capaz de proporcionar una composición acuosa que comprende menos de 450 ppm de metal pesado basado en el peso de los iones de aluminio (gramo/gramo) en el solución.

Se describe además una composición acuosa que comprende una proteína y una sal de aluminio, comprendiendo dicha composición menos de 450 ppm de metal pesado basado en el peso del aluminio en la composición. La composición acuosa preferiblemente se ha almacenado a temperaturas superiores a 20 °C durante al menos 1 mes.

- 15 El metal pesado se selecciona preferiblemente de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V, Cr y Mo. Preferiblemente, el metal pesado se selecciona de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V. En una realización particularmente preferida, el metal pesado se selecciona de Cu o Ni. Preferiblemente, el metal pesado es Cu.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que sirven simplemente para aclarar la invención.

Bibliografía

- 25 Alipazaga MV, Moreno RGM, Coichev N. 2004. Synergistic effect of Ni(II) and Co(II) ions on the sulphite induced autoxidation of Cu(II)/tetraglycine complex. *Dalton Trans* 13:2036-2040.
- Arunee Wittayanukulluk, Dongping Jiang, Fred E. Regnier, Stanley L. Hem, "Effect of microenvironment pH of aluminum hydroxide adjuvant on the chemical stability of adsorbed antigen", *Vaccine* 22 (2004) 1172-1176
- 30 Berglund J, Fronaeus S, Elding LI. 1993. Kinetics and mechanism for manganese-catalyzed oxidation of sulfur(IV) by oxygen in aqueous solution. *Inorg Chem* 32:4527-4538.
- Brandt C, Elding LI. 1998. Role of chromium and vanadium in the atmospheric oxidation of sulfur (IV). *Atmos Environ* 32(4):797-800.
- Exley, C (2010). *Trends in Immunol.* Vol. 31: pp 103-109.
- 35 Ito, Kimiko and Kawanashi, Shosuke. Site-specific fragmentation and modification of Albumin by sulphite in presence of metal ions or peroxidase/H₂O₂: Role of Sulphate radical. *Biochem and Biophys Res Comm.*, 1991, 176, 1306-1312
- Huie R.E., Neta P. One-electron redox reaction in aqueous solutions of sulphite with hydroquinone and other hydroxyphenols. *J. Phys. Chem.*, 1985, 89 (18), 3918-3921
- 40 Kalina Ranguelova, Marcelo G. Bonini, and Ronald P. Mason: (Bi)sulphite Oxidation by Copper, Zinc-Superoxide Dismutase: Sulphite- Derived, Radical-Initiated Protein Radical Formation. *Environmental Health Perspectives* 2010, 118 (7), 970-975
- Lambeth D.O., Palmer G. The kinetics and mechanism of reduction of electron transfer proteins and other compounds of biological interest by dithionite. *J.Biochem. Chem.* 1973, 248, 6095-6103
- 45 Li S, Schöneich C, Borchardt RT. Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. *Biotechnol Bioeng.* 1995 Dec 5;48(5):490-500
- Lindblad, EB (2004) *Immunol. and Cell Biol.* Vol 82: 497-505.
- Lima S, Bonifacio RL, Azzellini GC, Coichev N. 2002. Ruthenium(II) tris(bipyridyl) ion as a luminescent probe for oxygen uptake on the catalyzed oxidation of HSO₃⁻. *Talanta* 56:547-556.
- 50 Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Natarajan M, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxyl radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Mar 17;1620(1-3):139-50.
- Neta P., Huie R.E.: *Free Radical Chemistry of Sulphite.* *Environmental Health Perspectives* 1985, 64, 209-217
- 55 Shi X. 1994. Generation of ·SO₃⁻ and OH radicals in SO₂⁻ reactions with inorganic environmental pollutants and its implications to SO₂⁻ toxicity. *J Inorg Biochem* 56(3):155-165.
- Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(4):315-25.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Perfiles de elución de RP-HPLC de extracto de tapón de clorobutilo (diluido 1:4) y SN de JEV09L37.

Figura 2: Perfiles de elución de SEC HPLC de PS (2 mg/ml) antes y después de la escisión de tripsina.

Figura 3: Perfiles de elución de SEC HPLC de PS tratado con tripsina y PS degradado tal como está presente en NIV11A74. Ha de apreciarse que los perfiles de elución se normalizaron a una altura de pico similar para permitir una mejor comparación.

Figura 4: Evaluación de DOE de la relación ELISA monoclonal/policlonal mediante análisis de diagrama de Pareto y gráficos de efectos principales (4 semanas a 22 °C).

Figura 5: Evaluación de DOE de la relación ELISA monoclonal/policlonal mediante análisis de diagrama de Pareto y gráficos de efectos principales (8 semanas a 22 °C).

Figura 6: Gráfico de contorno de la respuesta estimada

Figura 7: Gráfico residual de la respuesta estimada

Figura 8: Relación ELISA (monoclonal/policlonal) para formulaciones de JEV a pH 7 en presencia de Ni, Cu y Cr. Las muestras se almacenaron a 22 °C durante 5 semanas

Figura 9: Resumen de los resultados obtenidos después de 7 semanas a 22 °C. Se muestran los datos brutos de la relación en función del pH y el tipo de iones metálicos y los resultados combinados para cada parámetro.

Figura 10: Relación media de formulaciones de DP preparadas con diferentes lotes de alumbre. Las muestras se almacenaron durante 6 semanas a 22 °C. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95 % calculado en función de la desviación estándar combinada. Muestras de izquierda a derecha: Alumbre 3877, Alumbre 4074, Alumbre 4230 no GI, Alumbre 4230 GI, Alumbre 4470, Alumbre 4563, Alumbre 4621, Mezcla de alumbre 4074_4230.

Figura 11: Distribución del tamaño de partícula de las muestras de Alhydrogel®.

Figura 12: Curvas de titulación de Alhydrogel® en PBS. ■ AIOH sin irradiar (RQCS0890), ▲ AIOH de GI (RQCS1200), ◆ AIOH de GI (RQCS1342), + AIOH de GI (RQCS0448)

Figura 13: Resumen de los lotes de Alhydrogel® ensayados. Se muestra la concentración total de iones metálicos contaminantes en ng/ml y la proporción de los iones metálicos principales Fe, Cr y Ni.

Figura 14: Secuencia de aminoácidos de Ala-(His)6-OprF190-342-OprI21-83 (SEQ ID NO: 1), en el presente documento también denominada "proteína A".

Ejemplos

Ejemplo 1

Se identificó previamente que el lote 4230 de hidróxido de aluminio (alumbre), contribuye significativamente a la degradación del antígeno en FVL09L37. En este lote particular de alumbre se observó un contenido mucho mayor de iones metálicos residuales en comparación con otros lotes de alumbre utilizados para la formulación del antígeno de JEV inactivado. Este Ejemplo demuestra estudios adicionales realizados para identificar adicionalmente el mecanismo subyacente de causa raíz y la influencia de iones metálicos en la ruta de degradación de JEV. El diseño de experimentos (DOE) se realizó para determinar la influencia de los parámetros individuales sobre la estabilidad del antígeno.

Los parámetros ensayados en un DOE de 25 factoriales completos fueron

- Lote 4230 de hidróxido de aluminio frente al Lote 4074 de hidróxido de aluminio
- Presencia de exceso de fragmentos de sulfato de protamina
- Presencia de lixiviables del tapón de caucho de clorobutilo
- pH intervalo de 7 a 8
- Contenido residual de formaldehído

El lote 4230 de alumbre contiene niveles mucho más altos de impurezas de iones metálicos residuales en comparación con otros lotes de alumbre usados para la formulación de JEV. Se seleccionó un "diseño de experimento" (DOE) para investigar adicionalmente el potencial mecanismo de causa raíz y la interacción de múltiples factores simultáneamente durante el ensayo. Como en diseños de un factor, se pueden considerar factores cualitativos y/o cuantitativos. El objetivo de estos diseños es identificar los factores que tienen un efecto significativo en la respuesta, así como investigar el efecto de las interacciones (dependiendo del diseño del experimento utilizado). Las predicciones también pueden realizarse cuando existen factores cuantitativos, pero se debe tener

cuidado ya que ciertos diseños son muy limitados en la elección del modelo predictivo. Para obtener información sobre el DOE en general, véase (Siebertz, Karl; van Bebber, David, Hochkirchen, Thomas: Statistische Versuchsplanung: Design of Experiments (DoE). Editorial: Springer Berlin Heidelberg; 1ª Edición (2010), ISBN-10: 3642054927).

5

1.1 Diseño de estudio DOE

1.1.1 Definición de parámetros y niveles para el diseño DOE

10 Se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros y niveles para diseñar un experimento DOE apropiado:

15 - **Contenido residual de iones metálicos de alumbre:** El lote 4230 y el lote 4074 de hidróxido de aluminio se seleccionaron como representativos de la calidad de los dos extremos con respecto al contenido residual de iones metálicos del hidróxido de aluminio. El punto central fue una mezcla del 50/50 % de ambos lotes de alumbre. El análisis inicial para las impurezas restantes de iones metálicos en solución madre al 2 % de hidróxido de aluminio por ICP-MS mostró diferencias significativas en el contenido de iones de Cr, Fe, Ni y Cu entre estos dos lotes (véase la Tabla 1).

20 - **Fragmentos de sulfato de protamina:** Los fragmentos de sulfato de protamina (PS) están presentes en una cantidad baja (<5 µg/ml) en el lote de vacuna final. Se ensayó si los fragmentos de PS podían contribuir a la modificación de la superficie del virus (por ejemplo, interacción/enlace covalente con las proteínas de la superficie del virus) en combinación con Alumbre y otros factores utilizados en este estudio. Por lo tanto, se preparó una solución madre de fragmentos de PS por digestión con tripsina seguido de inactivación por calor y ultrafiltración usando una membrana de 5 kDa para la inactivación de proteasa y la eliminación de la enzima. Esta solución madre se usó para agregar fragmentos de PS adicionales a las formulaciones respectivas al alto nivel de 50 µg/ml. En muestras de bajo nivel, no se añadieron fragmentos de PS adicionales y el nivel real en las formulaciones fue <5 µg/ml según el análisis por HPLC.

25 - **pH:** El nivel de pH inferior y superior en las formulaciones fue de 7 y 8 con el punto central a pH 7,5.

30 - **Lixiviables/extraíbles del émbolo de la jeringa:** Émbolo de la jeringa (fabricado de clorobutilo PH701/50 negro) que se utiliza actualmente en el sistema de cierre del recipiente. Se ensayó si los lixiviados del caucho de clorobutilo en la formulación podrían contribuir a la modificación del antígeno. Por lo tanto, se preparó una solución madre de lixiviables y se usó para experimentos de enriquecimiento. Se estimó que el alto nivel de lixiviados añadidos en la formulación es, en promedio, 1,4 veces mayor en comparación con el Lote de vacuna final (FVL) comercial. Debido a las duras condiciones de extracción, se detectaron picos adicionales que no estaban presentes en las muestras de FVL. Por lo tanto, las formulaciones enriquecidas representan un "peor caso" con respecto a los productos lixiviados y extraíbles. Las formulaciones al nivel bajo no contienen ningún lixiviado del caucho de clorobutilo.

35 - **Formaldehído residual:** Para las formulaciones de bajo nivel, no se añadió formaldehído adicional a las muestras de formulación. El nivel más bajo era el formaldehído residual que todavía estaba presente en la muestra diluida de NIV después de la inactivación/neutralización y la dilución de 2 veces estaba en el intervalo de aprox. 37 ppm (recalculado a partir del certificado analítico comercial de GMP de liberación de DS). Para el alto nivel, se añadieron 40 ppm de formaldehído a la formulación correspondiente (contenido final total aproximadamente 77 ppm). Se ensayó si el formaldehído residual junto con un mayor nivel de iones metálicos presentes en el Alumbre 4230 y otros posibles factores podrían reaccionar adicionalmente con el virus conduciendo a la hiper-reticulación de las proteínas de superficie y la pérdida de epítomos relevantes.

45

Determinación de otras impurezas relacionadas con un proceso residual:

50 Se calculó el formaldehído residual, el sulfito y la sacarosa en las formulaciones finales en base a los certificados de GMP para la sustancia farmacológica comercial JEV11A74. Los resultados se volvieron a calcular mediante la dilución real de 2 veces de NIV con respecto a DS utilizada en los experimentos DOE.

Sulfito residual: La concentración de sulfito residual fue constante en todas las formulaciones con aprox. 93 ppm.

55 **Sacarosa residual:** La concentración de sacarosa residual fue constante en todas las formulaciones con aprox. el 1 % v/p.

1.1.2 Diseño DOE

Estos 5 factores se combinaron en un plan de 25 DOE dando como resultado un número total de 34 experimentos incluyendo 2 puntos centrales con el siguiente diseño base. La planificación y evaluación del DOE se realizaron con un software apropiado (Statgraphic Plus 3.0)

- 5 Diseño base: Factorial 25
 Número de factores experimentales: 5
 Número de bloques: 1
 Número de respuestas: 1
 Número de puntos centrales por bloque: 2
 10 Número de realizaciones: 34
 Grados de error de libertad: 18
 Aleatorizado: Sí

Factores continuos ¹⁾	Bajo	Alto	Unidades
pH	7,0	8,0	
Sí			
Alumbre ²⁾	0,0	100,0	Alumbre 4230 %
Sí			
Fragmentos de PS enriquecidos ³⁾	0	50	µg/ml
No			
Lixiviables enriquecidos ⁴⁾	0	1,4	contenido relativo en comparación con FVL No
Formaldehído enriquecido ⁵⁾	0	40	ppm
No			

Respuestas	Unidades
ELISA (monoclonal, policlonal) de antígeno desorbido	AU/ml

1) Continuo significa que un punto central (valor medio del nivel alto y bajo) está presente en el diseño del estudio. Ningún punto central significa que solamente niveles bajos y altos están presentes en el diseño del estudio.

2) Bajo nivel (0 %) significa que la formulación se preparó con el Lote 4074 de alumbre. Alto nivel (100 %) significa que la formulación se preparó con el Lote 4230 de alumbre. Para formulaciones de punto central, se usó una mezcla igual (50/50 %) de ambos lotes de alumbre.

3) Dado que PS está presente en NIV usado para la preparación de muestras de productos farmacológicos, la concentración real de PS en las formulaciones no enriquecidas fue de <5 µg/ml y ~50-55 µg/ml para las formulaciones enriquecidas con PS.

4) No se asumieron lixiviables en formulaciones no enriquecidas ya que las muestras se prepararon/almacenaron en tubos Eppendorf de baja unión. El contenido total de lixiviables del émbolo de jeringa de caucho de clorobutilo en muestras enriquecidas fue de aprox. 1,4 veces mayor en comparación con FVL.

5) La concentración real de formaldehído en muestras de DP no enriquecidas fue de aprox. 37 ppm, la concentración total de formaldehído en las muestras enriquecidas fue de aproximadamente 77 ppm.

2 Definiciones y abreviaturas

- 15 AcCN Acetonitrilo
 DOE Diseño de experimentos
 DS Sustancia farmacológica
 FVL Lote de vacuna final
 HPLC Cromatografía líquida de alto rendimiento
 ICP-MS Espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente
 PS Sulfato de protamina
 RP Fase inversa
 SEC Cromatografía de exclusión por tamaño
 SN Sobrenadante
 TFA Ácido trifluoroacético
 w/o sin

3 Materiales y métodos

3.1 Estudios DOE

- 20 3.1.1 Materiales

- Tapones de émbolo de jeringa: PH701/50/C negro Sil6 7002-1051 (obtenido de West, Orden n.º 2116)
- Botella de vidrio de 100 ml (Schott) + Tapón de rosca recubierto de Teflon
- Papel de aluminio
- 5 - Agua HQ
- Baño de agua eléctrico (IKA, HBR 4 digital)
- LoBind Eppis 2 ml (Eppendorf, Cat. N.º 0030 108.132)
- Speed Vac (Christ, RVC-2-25)
- 10 - Viales para HPLC, vidrio transparente, 900 µl, Chromacol (VWR, Cat. n.º: 548-1124)
- Viales para HPLC, PP, 900 µl, (Agilent, Artículo n.º 5182-0567)
- Tapones para viales para HPLC, precortados (VWR, Cat. n.º: 548-1260)
- Tubos de 15 ml (Greiner, Cat. N.º 188724)
- Lote 4470 de alumbre (RQCS 1342); Lote 4230 de alumbre (RQCS 1200)
- 10 x PBS (Gibco, Orden n.º 14200-091)
- 15 - Parafilm
- Columna Waters Atlantis T3; diámetro de partícula de 3 µm; diámetro de columna/longitud de 2,1 x 100 mm (Pedido N.º 186003718; Lote 0107372331)
- Acetonitrilo (Merck, Cat. N.º 1.13358.2500)
- TFA (Sigma, Orden n.º 302031)
- 20 - Sistema HPLC Dionex 3000
- Soporte de disolventes SR-3000
- Bomba UltiMate-3000, bomba de gradiente de baja presión analítica
- Automuestreador WPS-3000 TSL, automuestreador analítico - temperatura controlada
- Compartimento de columna TCC-3200, temperatura controlada
- 25 - PDA-Detector PDA-3000
- Solución de formaldehído al 37 % (Merck, Cat. N.º 1.040031000)
- Sulfato de protamina (Intercell Biomedical Ltd, Lote n.º 086056)
- Dispositivo de ultrafiltración (Amicon® Ultra 3 kDa) (Millipore, Cat. N.º UFC900324)
- Incubadora Infors HT Multitron Standard (InforsAG)
- 30 - Tripsina (Sigma, Orden N.º: T0303)

3.1.2 Procedimiento para la preparación de extraíbles de émbolo de jeringa

Los émbolos de la jeringa (fabricados de clorobutilo PH701/50 negro) que se utilizan actualmente en el sistema de
 35 cierre del recipiente de FVL se obtuvieron en West (Alemania). Por lo tanto, se preparó una solución madre de
 lixiviables por tratamiento térmico del émbolo de la jeringa en agua (90 °C/2 h) seguido de la concentración en un
 speed-vac. El contenido relativo de lixiviables en esta solución madre se estimó mediante RP-HPLC utilizando una
 columna C18 (columna Atlantis T3) y se comparó con el sobrenadante de FVL JEV09L37.

40 Método de extracción

Una botella de vidrio Schott de 100 ml con una tapa de rosca recubierta con Teflon y un trozo de papel de aluminio
 se lavaron con agua caliente y se aclararon a fondo con agua HQ. Se llenaron 30 tapones en la botella y se
 añadieron 30 ml de agua HQ. La botella se cerró con la lámina de aluminio ajustada entre botella y la rosca y se
 45 selló adicionalmente con Parafilm. La botella se calentó en el baño de agua a 90 °C durante 2 horas y se dejó enfriar
 a temperatura ambiente. El extracto se transfirió a 14 tubos Eppendorf de baja unión (se recuperó un total de 28 ml
 de extracto). Doce viales (un total de 24 ml) se concentraron en una Speed Vac durante aproximadamente 44 horas
 y se combinaron en un tubo falcon para obtener 6 ml de extracto de tapón concentrado 4x. Se preparó una muestra
 50 de control que contenía 30 ml de agua HQ sin tapón de la misma manera para evaluar cualquier posible
 contaminación.

Método RP-HPLC C18

Los lixiviables se separaron por columna RP-HPLC C18 (Atlantis T3) operada a 40 °C y 0,25 ml/min. El solvente A
 55 fue TFA al 0,1 % en H₂O, el solvente B fue TFA al 0,1 % en AcCN. La separación se realizó por gradiente lineal que
 variaba del 0 al 95 % de B en 30 min. La detección se realizó a 214 nm, 254 nm y 280 nm. La concentración relativa
 total de extracto de tapón concentrado se estimó que era 80 veces mayor en comparación con los picos detectados
 en el sobrenadante del lote de vacuna final (FVL SN, obtenido por eliminación de partículas de alumbre por
 centrifugación a 5000 g/5 min) como se detectó a 254 nm. Por lo tanto, se asignó un contenido relativo total de 80

U/ml (unidades arbitrarias U) para la solución madre, mientras que la concentración relativa total de lixiviables en el FVL SN se ajustó a 1 U/ml. Para los estudios DOE, la solución madre se diluyó 16 veces en las respectivas formulaciones produciendo aprox. 5 U/ml de extraíbles totales

5 3.1.3 Preparación de fragmentos de sulfato de protamina

Se preparó una solución stock de fragmentos de PS digiriendo una solución de PS (2 mg/ml en PBS) con tripsina (200 ng/ml durante 60 min a 37 °C). La enzima se inactivó posteriormente por calor (90 °C durante 10 minutos) seguido de ultrafiltración usando una membrana de 3 kDa (filtro centrífugo Amicon® Ultra). Debido al corte de la membrana, la tripsina permaneció en el retenido, mientras que los fragmentos de PS estaban presentes en el permeado. La inactivación completa de la enzima se evaluó añadiendo 500 µg/ml de PS de longitud completa en una alícuota del fragmento de PS obtenido seguido de incubación a 37 °C durante 18 h. No se observó degradación del PS de longitud completa indicando la inactivación/eliminación completa de tripsina. La degradación se controló mediante PS-SEC HPLC.

15 3.1.4 Plan DOE

Se prepararon muestras de acuerdo con el esquema de pipeteo como se muestra en la Tabla 2. Se usó el lote NIV JEV11A74 obtenido de una serie de producción comercial como muestra de partida. El NIV se diluyó 2 veces en DS usando tampón PBS seguido de ajuste del pH. Se eliminaron alícuotas de 5 ml y se les administró un adyuvante con el correspondiente lote de alumbre 4230, 4074 o una mezcla al 50/50 % de ambos. La cantidad final de reserva de alumbre (Al₂O₃ al 2 %) añadida fue de 500 µg/ml de aluminio (Al₂O₃ al 0,1 %). Cada formulación (5 ml) se dividió en dos partes (2 x 2,5 ml) usando tubos Eppendorf de baja unión. Una alícuota se almacenó a 2-8 °C, otra alícuota se almacenó a 22 ± 1 °C (incubadora Infors HT) en agitación suave (20 rpm).

25 3.2 ELISA de JEV inactivado (policlonal)

La desorción del antígeno del análisis de alumbre y ELISA se realizó usando anticuerpos policlonales de oveja anti-JEV para recubrir las placas de ELISA de 96 pocillos como se describe en el Ejemplo 4.

30 3.3 ELISA de JEV inactivado (monoclonal)

Se desarrolló un ELISA de JEV con base monoclonal (mAb). El ensayo se basa principalmente en el formato de ensayo "ELISA de JEV policlonal", solo se usa un anticuerpo monoclonal anti-JEV (clon 52-2-5) para el recubrimiento. Se mostró que el mab 52-2-5 empleado era específico para el JEV y para reconocer un epítipo neutralizante. El clon de mab 52-2-5 se obtuvo por inmunización subcutánea de ratones BALB/c con el lote de vacuna comercialmente disponible JEV08J14B. Las células esplénicas de los ratones se fusionaron con las células de mieloma. A partir de células de hibridoma resultantes, se seleccionaron clones individuales y se subclonaron. Los clones se cribaron negativamente frente a albúmina sérica bovina, sulfato de protamina y un extracto de la línea celular de producción de la vacuna contra JE (células Vero). Se realizó un cribado positivo contra el virus inactivado neutralizado (NIV) del lote de vacuna JEV08M20. Para el cribado, se recubrieron placas de microtitulación con el antígeno relevante y se hicieron reaccionar con sobrenadante de cultivos de los clones seleccionados. Para la detección, se utilizó un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina. Se demostró que el clon de mab 52-2-5 reconoce un epítipo neutralizante en el dominio III de la proteína de envoltura (E) de JEV que contiene Ser331 y Asp332 (Lin C.-W. y Wu W.-C. J Virol. 2003; 77(4): 2600-6). La unión del mab al epítipo neutralizante indicado se determina, por ejemplo, como se describe en Lin y Wu (2003) mediante mutagénesis dirigida a sitio del dominio III en la posición 331 (por ejemplo: S→R), y/o mediante mutaciones de alanina en o cerca de la posición 331 del dominio III, por ejemplo, de los residuos Ser 331 y Asp332, seguido de inmunotransferencias para determinar la unión del mab a las proteínas mutadas. Los resultados de unión negativa indican que el epítipo del mAb es el epítipo neutralizante identificado por Lin y Wu (2003). La característica neutralizante del epítipo da lugar a la suposición de que el epítipo podría ser importante para que el antígeno provoque una respuesta inmune protectora.

Las muestras de JEV se analizaron mediante ambos ensayos ELISA, policlonal y monoclonal. El contenido de epítipo específico relativo puede expresarse como la relación del contenido de antígeno total determinado por "ELISA monoclonal" (clon 52-2-5) dividido por el contenido de antígeno total determinado por "ELISA policlonal". Cualquier diferencia en la relación puede indicar diferencias en el contenido específico del epítipo 52-2-5. Los resultados cercanos a 1 corresponderán a contenidos elevados de epítipos, y los resultados próximos a 0 corresponderán a un bajo contenido relativo de epítipos. Una baja relación indica la presencia de cambios

estructurales del epítipo neutralizante.

En el transcurso del desarrollo de este "ELISA mAb", se detectaron diferencias entre los lotes de vacunas, que podrían correlacionarse con los resultados de potencia de estos lotes.

5

3.4 SEC-HPLC de sulfato de protamina

El PS (longitud completa) y sus fragmentos se analizaron por HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) usando un péptido Superdex 10/300 GL, 10 x 300 mm, 13 µm (GE Healthcare) usando ácido trifluoroacético al 0,1 % (v/v) (TFA) en acetonitrilo al 30 % (CAN) como fase móvil a un caudal de 0,6 ml/min. Las muestras que contenían PS se prepararon por duplicado, es decir, se diluyeron con fase móvil antes de la inyección.

10

4 Resultados

15 4.1 Análisis de los lixiviables de tapón usados para los experimentos de enriquecimiento

Los perfiles de elución de RP-HPLC de la solución madre concentrada obtenida después de la extracción de los tapones bajo calor en comparación con el FVL SN, se muestran en la figura 1. Patrón de pico similar al observado para ambas muestras. Debido a las duras condiciones de extracción, se detectaron picos adicionales en el concentrado que no estaban presentes en muestras de FVL o que estaban presentes solamente en un contenido relativo mucho más bajo. Por lo tanto, las formulaciones enriquecidas representan un "peor caso" con respecto a los productos lixiviables y extraíbles. El contenido relativo total de los picos individuales en concentrado de extracto y formulación enriquecida en comparación con FVL SN se resume en la Tabla 3. La cantidad total de lixiviables en la solución madre se calculó como la suma de todos los picos detectados y expresados en unidades arbitrarias como 25 67 U/ml. Dado que la solución madre se diluyó 16 veces en la formulación respectiva, el contenido total resultante de los lixiviables se estimó en 4,2 U/ml. Esto corresponde a un aumento promedio de 1,4 veces en comparación con el sobrenadante de FVL JEV09L37 (3,0 U/ml).

20

25

30 4.2 Análisis de fragmentos de sulfato de protamina

30

Los fragmentos de PS obtenidos después de la escisión de PS de longitud completa por Tripsina se muestran en la figura 2. Se obtuvieron perfiles de pico similares de PS tratado con tripsina y PS ya degradado presentes en NIV11A74 por HPLC (véase la figura 3).

35 4.3 Evaluación de DOE

Se analizaron las formulaciones preparadas para este DOE después de 4 semanas y 8 semanas de incubación en condiciones aceleradas (22 °C). Se consideró que cualquier reacción de degradación se acelerará al almacenarse a una temperatura más alta en comparación con las condiciones de almacenamiento normales (2-8 °C). Sin embargo, 40 las muestras aún se almacenan a 2-8 °C y se analizarán en un momento posterior (~4-6 meses). El primer análisis de muestras almacenadas a 22 °C durante 4 y 8 semanas se muestra en la Tabla 4.

4.3.1 Evaluación de DOE después de 4 semanas a 22 °C

45 La evaluación estadística de los resultados de la matriz DOE obtenidos después de 4 semanas a 22 °C mostró que el contenido de epítipo específico 52-2-5 (expresado como la relación de antígeno desorbido analizado por ELISA monoclonal/policlonal) se vio afectado de forma estadísticamente significativa (95 % de nivel de confianza, véase la Tabla 5) por los siguientes factores:

50

- contenido de epítipo específico inferior 52-2-5 en presencia del lote de alumbre 4230
- contenido de epítipo específico inferior 52-2-5 a pH inferior a 7
- Contenido de epítipo específico superior 52-2-5 a una concentración aumentada de formaldehído

La presencia de una concentración más alta de fragmentos de PS y lixiviables de caucho de clorobutilo no mostró 55 ninguna influencia sobre el contenido específico del epítipo. No se detectaron interacciones de segundo o mayor orden entre los parámetros individuales.

La tabla ANOVA divide la variabilidad en "Relación 4 semanas" en piezas separadas para cada uno de los efectos. Después, prueba la significación estadística de cada efecto comparando la media cuadrática contra una estimación

del error experimental. En este caso, 3 efectos (Alumbre, pH, Formaldehído) tienen valores de P inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero al nivel de confianza del 95,0 %. La estadística R al cuadrado indica que el modelo tal como está ajustado explica el 74,85 % de la variabilidad en la Relación 4 semanas. La estadística ajustada de R al cuadrado, que es más adecuada para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, es del 51,27 %. El error estándar de la estimación muestra que la desviación estándar de los residuos es de 0,063. El error absoluto medio (MAE) de 0,0353 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si existe alguna correlación significativa basada en el orden en el que se producen en su archivo de datos. Dado que el valor de DW es mayor de 1,4, probablemente no exista una autocorrelación seria en los residuos. Los efectos también se muestran mediante el diagrama de Pareto estandarizado y gráficos de efectos principales, como se muestra en la figura 4.

4.3.2 Evaluación de DOE después de 8 semanas a 22 °C

La evaluación estadística de los resultados de la matriz DOE obtenidos después de 8 semanas a 22 °C fue similar a los resultados obtenidos después de 4 semanas. La evaluación muestra que el contenido de epítipo específico 52-2-5 (expresado como la relación de antígeno desorbido analizado por ELSIA monoclonal/policlonal) se vio afectado de forma estadísticamente significativa (95 % de nivel de confianza, véase la Tabla 6) por los siguientes factores:

- contenido de epítipo específico inferior 52-2-5 en presencia del lote de alumbre 4230
- contenido de epítipo específico inferior 52-2-5 a pH inferior a 7

La presencia de una mayor concentración de fragmentos de PS, lixiviables de caucho de clorobutilo y formaldehído no mostró ninguna influencia sobre el contenido específico de epítipo. Se ha de apreciar que el valor de P para formaldehído (P = 0,08) es bastante cercano a ser significativo. No se detectaron interacciones de segundo o mayor orden entre los parámetros individuales.

La tabla ANOVA divide la variabilidad en "Relación 8 semanas" en piezas separadas para cada uno de los efectos. Después, prueba la significación estadística de cada efecto comparando la media cuadrática contra una estimación del error experimental. En este caso, 2 efectos (Alumbre y pH) tienen valores de P inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero al nivel de confianza del 95,0 %. La estadística R al cuadrado indica que el modelo tal como está ajustado explica el 75,9 % de la variabilidad en la "Relación 8 semanas". La estadística ajustada de R al cuadrado, que es más adecuada para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, es del 53,3 %. El error estándar de la estimación muestra que la desviación estándar de los residuos es de 0,095. El error absoluto medio (MAE) de 0,057 es el valor promedio de los residuos. Los efectos también se muestran mediante el diagrama de Pareto estandarizado y gráficos de efectos principales, como se muestra en la figura 5.

El análisis de regresión también se realizó con respecto a los datos ajustados y los coeficientes de regresión calculados se muestran en la Tabla 7. La ecuación de regresión que se muestra a continuación se ha ajustado a los datos que incluyen pH, alumbre y formaldehído. La ecuación del modelo ajustado es "Relación 8 semanas" = $0,0228125 + 0,113125 * \text{pH} - 0,00185625 * \text{Alumbre} + 0,0315625 * \text{Formaldehído}$ donde los valores de las variables se especifican en sus unidades originales, a excepción de los factores categóricos que toman los valores -1 para el nivel bajo y +1 para el nivel alto. El contorno de la respuesta estimada y la gráfica residual se muestran en la figura 6 y la figura 7. La relación aumenta cuando disminuye el contenido relativo de alumbre del Lote 4230 y aumenta el pH.

La Tabla 8 contiene información sobre los valores de "Relación 8 semanas" generados usando el modelo ajustado. La tabla incluye:

- (1) el valor observado de "Relación 8 semanas"
- (2) el valor predicho de "Relación 8 semanas" usando el modelo ajustado
- (3) límites de confianza del 95,0 % para la respuesta media

Como se muestra, los resultados experimentales están bien predichos por el modelo de regresión.

5. Resumen

Fuera de los parámetros evaluados, el lote de alumbre 4230 demostró contribuir significativamente a la degradación del antígeno según se analizó mediante ELISA monoclonal/policlonal en condiciones aceleradas (22 °C, puntos de

tiempo de ensayo 4 y 8 semanas). Los resultados del DOE obtenidos después de 4 y 8 semanas a 22 °C muestran que el Alumbre 4230 es el factor más significativo con respecto a la degradación del antígeno según se detecta mediante la relación de ELISA monoclonal/policlonal. Las formulaciones hechas con Alumbre 4074 (pureza mucho mayor con respecto a los iones metálicos residuales) muestran en general un contenido de epítipo específico

5 mucho más alto.

El formaldehído y el pH también contribuyeron a la estabilidad del antígeno, pero en menor medida. El efecto de una mayor estabilidad del antígeno en las muestras formuladas con el Alumbre 4230 a un nivel de formaldehído más elevado se demostró bien (por ejemplo, muestras n.º 19 y 29). Sin embargo, la influencia del formaldehído fue menos pronunciada después de un período de almacenamiento prolongado (8 semanas a 22 °C).

10 Se observó una mejor estabilidad del antígeno a pH 8 en comparación con pH 7. El sulfato de protamina y los lixiviables del tapón de caucho de clorobutilo no contribuyeron a la degradación del antígeno.

Ejemplo 2

15 En estudios anteriores (véase el Ejemplo 1), se identificó el lote de hidróxido de aluminio 4230 como un factor contribuyente significativo en la degradación del antígeno observada en FVL09L37. En este lote particular de hidróxido de aluminio (Alumbre), se observó un contenido mucho mayor de iones metálicos residuales en comparación con otros lotes de alumbre utilizados para la formulación del antígeno de JEV inactivado. Este Ejemplo resume estudios adicionales realizados para evaluar la influencia de iones metálicos en la estabilidad del JEV

20 inactivado. Los estudios de adición se realizaron con el antígeno presente en una solución de virus inactivado neutralizado (NIV) o en suspensión de producto farmacológico (DP) después de la formulación del antígeno con hidróxido de aluminio.

1 Descripción del estudio

25

Se mostró previamente que el lote 4230 de alumbre contiene niveles mucho más altos de impurezas de iones metálicos residuales en comparación con otros lotes de alumbre usados para la formulación de JEV (véase también el Ejemplo 3). Se realizaron estudios adicionales para evaluar la influencia de los iones metálicos en la estabilidad y en una posible modificación de la superficie de JEV. El antígeno inactivado estaba presente en una solución de virus

30 inactivado neutralizado (NIV) o en una suspensión de producto farmacológico (DP) después de una dilución adicional de NIV y la formulación con hidróxido de aluminio. En otro conjunto de experimentos, se usaron diferentes lotes de alumbre que cubrían un amplio rango de contenido de iones metálicos residuales y se formularon con un solo lote de NIV definido. Todas estas formulaciones aún contenían formaldehído y bisulfito residuales a concentraciones representativas en comparación con el producto comercial. La solución madre de sales metálicas

35 se disolvió en agua y se añadió a las muestras hasta la concentración final deseada.

2 Definiciones y abreviaturas

AcCN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de varianza
DOE	Diseño de experimentos
DP	Producto farmacológico
DS	Sustancia farmacológica
FBV	Vacuna a granel final
FVL	Lote de vacuna final
GI	Gamma irradiado
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
LSD	Diferencia mínima significativa de Fisher
mAb	Anticuerpo monoclonal
NIV	Virus inactivado neutralizado
PS	Sulfato de protamina
RP	Fase inversa
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
SN	Sobrenadante
TFA	Ácido trifluoroacético
w/o	sin

40 3 Materiales y métodos

3.1 Materiales

- Cloruro de hierro (II) (Sigma, Orden n.º 44939)
- Cloruro de hierro (III) hexahidrato (Sigma, Orden n.º 31232)
- 5 - Sulfato de níquel (II) hexahidrato (Sigma, Orden n.º N4882)
- Cloruro de cobalto (II) hexahidrato (Sigma, Orden n.º 31277)
- Cloruro de cobre (II) deshidrato (Sigma, Orden n.º 807483)
- Sulfato de cinc heptahidrato (Sigma, Orden n.º 24750)
- Cloruro de cromo (III) hexahidrato (AlfaAesar, Orden n.º 42114)
- 10 - Sal disódica del ácido etilendiaminatetracético deshidrato (EDTA) (Sigma, E5134)
- Agua bidest. (Fresenius Kabi, Art. n.º 0712221/01 A)
- 10 x PBS (Gibco, Orden n.º 14200-091)
- Solución de formaldehído al 37 % (Merck, Cat. N.º 1.040031000)
- Sulfato de protamina (Intercell Biomedical Ltd, Lote n.º 086056)
- 15 - LoBind Eppis 2 ml (Eppendorf, Cat. N.º 0030 108.132)
- Tubos de 15 ml (Greiner, Cat. N.º 188724)
- Incubadora Infors HT Multitron Standard (InforsAG)
- Filtro de 0,2 µm Mini Kleenpak 25 mm (Pall)
- NIV11A74 y vacuna final a granel (FBV, formulada con el lote de alumbre 4539) JEV 11D87 de series de producción comerciales se obtuvo de Intercell Biomedical (Livingston, Reino Unido) y se almacenó a 2-8 °C hasta su procesamiento posterior.
- 20 - Se prepararon soluciones madre de sales metálicas en agua (concentración final 1 mM) utilizadas para experimentos de enriquecimiento y se almacenaron a 2-8 °C hasta su uso.
- Las muestras de hidróxido de aluminio (Al₂O₃ al 2 %, Brenntag Biosector) eran muestras de retención obtenidas en Intercell Biomedical o adquiridas directamente en Brenntag. Las muestras de alumbre se almacenaron a 2-8 °C. Los siguientes lotes de alumbre se usaron en este estudio: 4470, 4563, 4621, 3877, 4230 (no irradiados con radiación gamma e irradiados con radiación gamma)
- 25

3.2 Preparación de soluciones madre de metal

30

3.2.1 Solución madre de hierro (II)

Se preparó una solución madre de hierro (II) 20 mM disolviendo 397 mg de cloruro de hierro (II) tetrahidrato en 100 ml de agua bidestilada.

35

3.2.2 Solución madre de hierro (III)

Se preparó una solución madre de hierro (III) 20 mM disolviendo 540 mg de cloruro de hierro (III) hexahidrato en 100 ml de agua bidestilada.

40

3.2.3 Solución madre de níquel (II)

Se preparó una solución madre de níquel (II) 20 mM disolviendo 525 mg de sulfato de níquel (II) hexahidrato en 100 ml de agua bidestilada.

45

3.2.4 Solución madre de cobalto (II)

Se preparó una solución madre de cobalto (II) 20 mM disolviendo 476 mg de cloruro de cobalto (II) hexahidrato en 100 ml de agua bidestilada.

50

3.2.5 Solución madre de cobre (II)

Se preparó una solución madre de cobre (II) 20 mM disolviendo 341 mg de cloruro de cobre (II) dihidrato en 100 ml de agua bidestilada.

55

3.2.6 Solución madre de cinc

Se preparó una solución madre de cinc 20 mM disolviendo 575 mg de sulfato de cinc heptahidrato en 100 ml de agua bidestilada.

3.2.7 Solución madre de cromo (III)

Se preparó una solución madre de cromo (III) 20 mM disolviendo 533 mg de cloruro de cromo (III) hexahidrato en 5 100 ml de agua bidestilada.

3.3 Preparación de soluciones de trabajo

Se prepararon soluciones de trabajo de iones metálicos (concentración final 1 mM si no se indica otra cosa) 10 mediante dilución de soluciones madre de iones metálicos con agua bidestilada y filtración estéril mediante un filtro de jeringa de 0,2 µm.

3.4 Preparación de la formulación

15 Todas las formulaciones se prepararon en condiciones estériles. La NIV y la FBV obtenidas a partir de las series de producción comerciales se ajustaron al pH deseado y se añadieron alícuotas de una solución madre de metal. Todas las muestras se almacenaron en tubos de plástico si no se indicó otra cosa. En todas las formulaciones que utilizan alumbre, el contenido final de Al fue de 500 µg/ml, que corresponde a Al₂O₃ al 0,1 %. Se ha de apreciar que los iones metálicos, especialmente hierro (II), hierro (III) y hasta cierto punto Cr (III), formaron un precipitado con los 20 iones de fosfato presentes en el tampón que dieron como resultado la coprecipitación parcial del virus inactivado representada por la baja recuperación determinada por HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC).

3.4.1 Experimento 20110913(NIV): Formulación de NIV a diferentes concentraciones de iones metálicos de Ni (II), Cu (II), Cr (III) con o sin presencia de fragmentos de PS

25 Se ajustó NIV 11A74 a pH 7 y pH 8 seguido de adición de iones metálicos (Ni (II), Cu (II), Cr (III)) a 100/500/1000 ng/ml de concentración final. Todas las formulaciones se almacenaron en tubos Eppendorf de baja unión a 22 °C. También se prepararon alícuotas de toda la formulación en presencia de fragmentos de sulfato de protamina (50 µg/ml). Esto se hizo para evaluar cualquier efecto de los fragmentos de PS sobre la estabilidad de JEV en presencia 30 de metales. La preparación de fragmentos de sulfato de protamina (PS) se describe en el Ejemplo 1. Las muestras se prepararon el mismo día (véase la Tabla 9) y se analizaron tres semanas después. Todas las muestras se analizaron mediante SEC-HPLC, pero solamente las muestras a pH 8 (n.º 21-40) se analizaron mediante ELISA.

3.4.2 Experimento 20110913 (DP): Formulación de DP a diferentes concentraciones de iones metálicos de Ni (II), Cu (II), Cr (III)

35 En este estudio se usó FBV 11D87 (formulada con el lote de alumbre 4539). La FBV se ajustó a pH 7 y pH 8 y se enriqueció con Ni(II)/Cu(II)/Cr(III) a 100, 500 y 1000 ng/ml para evaluar cualquier concentración iónica de metal/efecto dependiente del pH. La Tabla 10 muestra el diseño experimental de este experimento. Todas las 40 formulaciones se almacenaron en tubos Falcon a 2-8 °C y 22 °C. Las muestras almacenadas a 22 °C se analizaron por SEC-HPLC y ELISA después de 5 semanas.

3.4.3 Experimento 20110812-DP enriquecido con metal

45 Se obtuvo la vacuna a granel final 11D87 (formulada con el lote de alumbre 4539) a partir de una serie de producción comercial y se usó en este estudio. La formalina residual en DS se analizó como 28,1 ppm, los sulfitos residuales eran 92,2 ppm. El contenido real en DP se puede considerar en el mismo intervalo. FBV JEV11D87 se ajustó a pH 7,0/7,4/7,8 y se enriqueció con 500 ng/ml (concentración final) de Fe (II), Fe (III), Ni (II), Co (II), Cu (II), Zn (II). También se preparó una formulación de mezcla de iones metálicos que contenía todos los iones metálicos 50 individuales juntos en solución. Las formulaciones con Cr (III) se prepararon más tarde y no se incluyó Cr (III) en la mezcla de iones metálicos. Las formulaciones de control solamente se ajustaron al pH deseado, pero no se enriquecieron con metales. Todas las formulaciones (n.º 1-24) se prepararon el mismo día y se almacenaron en tubos Falcon a 2-8 °C y 22 °C.

Se prepararon muestras enriquecidas con Cr (III) adicionales (n.º 25-27) tomando alícuotas de las muestras de 55 control almacenadas a 2-8 °C y se enriquecieron con Cr (III) a una concentración final de 500 ng/ml. Las formulaciones se almacenaron en condiciones aceleradas (22 °C) solamente. La Tabla 11 muestra la configuración experimental de este experimento. Todas las muestras almacenadas a 22 °C se analizaron mediante ELISA (monoclonal y policlonal) después de 4 semanas y 7 semanas.

3.4.4 Experimento 20110819: Formulación de DP usando varios lotes de alumbre

Los estudios de enriquecimiento como se ha descrito anteriormente pueden dar la primera evidencia de la posible inestabilidad del antígeno formulado en presencia de ciertos metales, pero pueden no ser completamente representativos de las condiciones reales donde los metales presentes en el hidróxido de aluminio se incorporan a la estructura tridimensional del gel resultante en diferentes concentraciones locales y orientación/accesibilidad. Para superar estas limitaciones, se inició un estudio inicial para simular las condiciones reales. Se formuló un único lote de NIV (11A74) obtenido de una serie de producción comercial con varios lotes de alumbre producidos por Brenntag que incluían una amplia gama de metales residuales. Se mezclaron 4,75 ml de NIV con 0,25 ml de alumbre (2 %) en tubos Falcon. La concentración final de hidróxido de aluminio fue de 500 µg/ml (= Al₂O₃ al 0,1 %). Las muestras de vacunas formuladas se almacenaron a 2-8 °C y en condiciones aceleradas a 22 °C. Todos estos lotes de alumbre contenían iones metálicos residuales a diferentes concentraciones. El lote de alumbre 4230 tiene el nivel más alto para Fe, Cu, Ni y V (véase el Ejemplo 3). Ha de apreciarse que las valencias de los iones metálicos no pueden ser especificadas por ICP-MS. También se preparó una muestra de alumbre mixta que contenía cantidades iguales de 4230 y 4074 para obtener un nivel "intermedio" para Ni (II) y Cu (II). Las muestras se analizaron después de 6 semanas de almacenamiento a 22 °C. La cantidad residual de formaldehído y sulfito estimada mediante el recálculo a partir de los resultados de análisis de DS disponibles corregidos por el factor de dilución de NIV con respecto a DS fue de 76 ppm de formaldehído y 192 ppm de sulfito, respectivamente.

20 3.1 Desorción del antígeno del hidróxido de aluminio para el análisis SEC-MALLS

Las partículas víricas se desorbieron del hidróxido de aluminio. Se centrifugaron ~625 µl de DP (8 °C, 5 min, 3300 x g) y el sobrenadante se descartó si no se indicaba ni se analizaba de otro modo por JEV-SEC-MALLS para detectar la concentración de antígeno no unido. Las partículas víricas se desorbieron suspendiendo las partículas de hidróxido de aluminio con 62,5 µl de tampón de fosfato de potasio 0,8 M (pH 8) que contenía BSA (50 µg/ml). Se añadió BSA al tampón de desorción para el análisis SEC-MALLS para minimizar las pérdidas causadas por la adsorción inespecífica del antígeno. Después de agitar (500 rpm) las partículas de hidróxido de aluminio durante 10 minutos a temperatura ambiente, las partículas se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se recogió en un tubo Eppendorf de baja unión y el procedimiento de desorción se repitió en la muestra restante. El antígeno desorbido agrupado (~5 x muestra concentrada, volumen final 125 µl, volumen inicial ~625 µl) se analizó entonces por SEC-MALLS.

3.2 Método de HPLC SEC-MALLS

El antígeno desorbido se analizó por SEC-MALLS. En resumen, después de la desorción del antígeno del hidróxido de aluminio, se cargaron posteriormente 100 µl del material desorbido agrupado (~5 x concentrado) en una columna Superose 6 10/300 GL SEC. Se utilizó 1 x PBS + NaCl 250 mM como fase móvil. Las señales ultravioleta (UV) a 214 nm y MALLS de partículas víricas se registraron y se analizaron usando los paquetes de software Chromeleon y ASTRA.

3.3 ELISA de JEV inactivado (policlonal)

La desorción del antígeno del análisis de alumbre y ELISA se realizó usando anticuerpos policlonales de oveja anti-JEV para recubrir las placas de ELISA de 96 pocillos como se describe en el Ejemplo 4.

3.4 ELISA de JEV inactivado (monoclonal)

Durante el transcurso de esta prueba de investigación, se desarrolló un ELISA de JEV con base monoclonal (mAb). El ensayo se basa principalmente en el formato de ensayo "ELISA de JEV policlonal", solamente se usa un anticuerpo monoclonal anti-JEV (clon 52-2-5) para el recubrimiento, y el anticuerpo policlonal actual para la detección. Se mostró que el mab 52-2-5 empleado era específico para el JEV y para reconocer un epítipo neutralizante. El clon de mab 52-2-5 se obtuvo por inmunización subcutánea de ratones BALB/c con el lote de vacuna comercialmente disponible JEV08J14B. Las células esplénicas de los ratones se fusionaron con las células de mieloma. A partir de células de hibridoma resultantes, se seleccionaron clones individuales y se subclonaron. Los clones se cribaron negativamente frente a albúmina sérica bovina, sulfato de protamina y un extracto de la línea celular de producción de la vacuna contra JE (células Vero). Se realizó un cribado positivo contra el virus inactivado neutralizado (NIV) del lote de vacuna JEV08M20. Para el cribado, se recubrieron placas de microtitulación con el antígeno relevante y se hicieron reaccionar con sobrenadante de cultivos de los clones seleccionados. Para la detección, se utilizó un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina. Se demostró que

el clon de mAb 52-2-5 reconoce un epítipo neutralizante en el dominio III de la proteína de envoltura (E) de JEV que contiene Ser331 y Asp332 (Lin C.-W. y Wu W.-C. J Virol. 2003; 77(4): 2600-6). La unión del mAb al epítipo neutralizante indicado se determina, por ejemplo, como se describe en Lin y Wu (2003) mediante mutagénesis dirigida a sitio del dominio III en la posición 331 (por ejemplo: S → R), y/o mediante mutaciones de alanina en o
 5 cerca de la posición 331 del dominio III, por ejemplo, de los residuos Ser 331 y Asp332, seguido de inmunotransferencias para determinar la unión del mAb a las proteínas mutadas. Los resultados de unión negativa indican que el epítipo del mAb es el epítipo neutralizante identificado por Lin y Wu (2003). La característica neutralizante del epítipo da lugar a la suposición de que el epítipo podría ser importante para que el antígeno provoque una respuesta inmune protectora. Las muestras de JEV se analizaron mediante ambos ensayos ELISA,
 10 policlonal y monoclonal. El contenido de epítipo específico relativo puede expresarse como la relación del contenido de antígeno total determinado por "ELISA monoclonal" (clon 52-2-5) dividido por el contenido de antígeno total determinado por "ELISA policlonal". Cualquier diferencia en la relación puede indicar diferencias en el contenido específico del epítipo 52-2-5. Los resultados cercanos a 1 corresponderán a contenidos elevados de epítopos, y los resultados próximos a 0 corresponderán a un bajo contenido relativo de epítopos. Una baja relación indica la
 15 presencia de cambios estructurales del epítipo neutralizante.

En el transcurso del desarrollo de este "ELISA mAb", se detectaron diferencias entre los lotes de vacunas, que podrían correlacionarse con los resultados de potencia de estos lotes.

20 3.5 Evaluación estadística

La evaluación estadística se hizo con Statgraphic Plus 3.0.

4 Resultados

25

4.1 Experimento 20110913 (NIV): Formulación de NIV a diferentes concentraciones de iones metálicos de Ni (II), Cu (II), Cr (III) con o sin presencia de fragmentos de PS

Los resultados de SEC-HPLC de las formulaciones de NIV (pH 7 y pH 8) que contenían iones metálicos [Ni (II), Cu
 30 (II), Cr (III)] con y sin fragmentos de PS se resumen en la Tabla 12. Los resultados de SEC-HPLC muestran que la recuperación de antígenos de la mayoría de las muestras fue >80 %. Algunas muestras (n.º 7, n.º 36, n.º 38) mostraron recuperaciones ligeramente reducidas en el intervalo del 70-80 %. Se ha de apreciar que el contenido del virus real es bastante bajo y la precisión de los resultados de HPLC se puede estimar como de aproximadamente ± 20 %. Dado que para las muestras n.º 36 y n.º 38, las recuperaciones para las siguientes formulaciones (n.º 37, n.º
 35 39) en el siguiente nivel de contenido de iones metálicos individuales volvieron a aumentar, estas diferencias podrían deberse a la variabilidad del ensayo y no se consideraron significativas. En base a los resultados obtenidos, no fue posible aclarar la influencia de los iones metálicos con respecto a la recuperación de JEV inactivado soluble. Sin embargo, SEC-HPLC solamente brinda información sobre el contenido del virus soluble, pero no información sobre ninguna posible modificación de la superficie. Solamente las formulaciones preparadas a pH 8 se analizaron también
 40 mediante ELISA (análisis por duplicado). La relación de ELISA monoclonal/policlonal se calculó y se puede usar con propósitos comparativos de los resultados. El análisis de las muestras por ELISA (véase la Tabla 13) no muestra ninguna influencia significativa de los metales ensayados sobre la degradación del JEV inactivado a pH 8 después de tres semanas a 22 °C. Puede haber una tendencia de la relación decreciente en presencia de Cu(II), pero en general, parece que un tiempo de incubación de tres semanas a 22 °C parece no ser suficiente para detectar
 45 cualquier degradación significativa. Como también se muestra en el experimento DOE (Ejemplo 1), el JEV inactivado parece tener una mayor estabilidad a pH 8 cuando se almacena en condiciones aceleradas a 22 °C, y esto también contribuirá a que no se observen efectos significativos. En este experimento, también se demostró que los fragmentos de PS no tienen ninguna influencia sobre la estabilidad de JEV. Esto también está de acuerdo con los resultados del DOE. Las muestras de NIV 1-20 formuladas a pH 7 mostraron una reducción significativa en el
 50 contenido de epítopos monoclonales en presencia de Cu(II). A la concentración más alta probada (1000 ng/ml), la relación era cercana a cero, indicando cambios estructurales significativos del antígeno.

4.2 Experimento 20110913(DP): Formulación de DP con diferente concentración de iones metálicos de Ni (II), Cu (II), Cr (III)

55

El análisis del antígeno de JEV desorbido se resume en la Tabla 14 (SEC-HPLC) y la Tabla 15 (ELISA). Las recuperaciones de antígenos para todas las muestras según se determinó por SEC-HPLC fueron >80 % después de 5 semanas a 22 °C, lo que indica que no hubo una influencia significativa de los iones metálicos evaluados sobre la recuperación de la desorción. Como se muestra en la Figura 8, existe una tendencia de la relación decreciente

según se analiza mediante ELISA en presencia de Cu(II) y Cr(III) a pH 7. Las formulaciones a pH 8 parecen ser más estables.

4.3 Experimento 20110812(DP): DP enriquecido con ión metálico

5 En este experimento, se usó FBV11D87 como material de partida. El valor del pH de la formulación se ajustó en un intervalo más estrecho (pH 7,0, 7,4, 7,8) y se usaron iones metálicos adicionales para el enriquecimiento, cada uno a 500 ng/ml (concentración final). La mezcla de iones metálicos contenía todos los iones metálicos individuales con la excepción de Cr(III) en formulaciones individuales (cada metal a 500 ng/ml). Los resultados de ELISA obtenidos
10 después de 4 semanas y 7 semanas a 22 °C se resumen en la Tabla 16. Los resultados también se muestran como gráficos en la figura 9.

Se realizó una evaluación estadística de muestras de estabilidad almacenadas a 22 °C durante 7 semanas. El ANOVA (análisis de varianza) mostró efectos significativos de los parámetros (pH y tipo de metal) sobre la
15 estabilidad del antígeno, que se expresa como la relación de ELISA monoclonal/policlonal (véase la Tabla 17). La tabla ANOVA descompone la variabilidad de la Relación en contribuciones debido a diversos factores. Dado que se han elegido sumas de cuadrados Tipo III, la contribución de cada factor se mide habiendo eliminado los efectos de todos los demás factores. Los valores P evalúan la significación estadística de cada uno de los factores. Dado que los valores de P para el pH y el tipo de ión metálico son inferiores a 0,05, estos factores tienen un efecto
20 estadísticamente significativo sobre la Relación en el nivel de confianza del 95,0 %.

En la Tabla 18 se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar la significación de las diferencias observadas con respecto a los medios. Se demostró un efecto significativo sobre la relación para Cu (II) y la mezcla de metal en comparación con las formulaciones de control no enriquecidas. La mitad inferior del resultado muestra la
25 diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 7 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95,0 %. En la parte superior de la página, se identifican 3 grupos homogéneos usando columnas de X. En cada columna, los niveles que contienen X forman un grupo de medias dentro del cual no hay diferencias estadísticamente significativas. El método que se usa actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa
30 (LSD) de Fisher. Con este método, existe un riesgo del 5,0 % de llamar a cada par de medias significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

Se demostró un efecto significativo en la relación para Cu (II) y la mezcla de iones metálicos. La influencia de otros iones metálicos puede llegar a ser significativa en un período de almacenamiento más largo. La mezcla de iones metálicos contenía la mayor concentración total y podría representar el peor de los casos. Sin embargo, se concluyó
35 que varios iones metálicos presentes en el alumbre podrían contribuir a la degradación, cada uno en diferente medida. Estos resultados apoyan la causa raíz propuesta de la degradación del antígeno catalizado por iones metálicos. Se ha de apreciar que los experimentos de enriquecimiento pueden no simular completamente las condiciones reales de las impurezas de iones metálicos residuales presentes en el alumbre 4230. Los iones metálicos se incorporan en la estructura del alumbre y la concentración y orientación local pueden ser diferentes de
40 los iones metálicos utilizados en los experimentos de enriquecimiento. También se sabe que los iones metálicos (por ejemplo, Fe) tienen baja solubilidad en presencia de ión fosfato (PO₄³⁻). Por lo tanto, se desconoce la concentración real de iones metálicos solubles y la contribución de los metales presentes como complejo metal-fosfato sobre la degradación del JEV.

45 4.4 Experimento 20110819: Preparación de muestras de DP con diferentes lotes de alumbre

Los estudios de adición como se ha descrito anteriormente pueden proporcionar la primera evidencia de la posible inestabilidad del antígeno formulado en presencia de algunos iones metálicos, pero podrían no ser completamente representativos de las condiciones reales en las que se espera que estos iones metálicos presentes en el hidróxido
50 de aluminio se incorporen en la estructura tridimensional del gel de hidróxido de aluminio que da como resultado diferentes concentraciones locales y orientación/accesibilidad. Para superar estas limitaciones, se inició un estudio inicial para simular las condiciones reales. Se formuló un único NIV (11A74) con varios lotes de alumbre obtenidos por Brenntag que incluían una amplia gama de metales residuales. Las muestras de vacunas formuladas se almacenaron a 2-8 °C y en condiciones aceleradas a 22 °C. Todos estos lotes de alumbre contenían iones metálicos residuales a diferentes niveles. El lote 4230 tenía el nivel más alto para Fe, Cu, Ni y V (véase la Tabla 19). Se ha de apreciar que el contenido real de iones metálicos presente en el producto formulado es solamente 1/20 de la concentración en solución madre de alumbre (2 %). Ha de apreciarse que las valencias de los iones metálicos no pueden ser especificadas por ICP-MS. El análisis del antígeno desorbido por ELISA de muestras almacenadas a 22 °C durante 6 semanas se muestra en la Tabla 20.

Se calculó la desviación estándar combinada de todas las muestras (agregado ~0,075) como una medida de la incertidumbre experimental. Los valores medios para la relación y los intervalos de confianza del 95 % (calculados en base al agregado) se representaron frente a las formulaciones individuales (véase la figura 10). Las muestras formuladas con alumbre 4230 mostraron una tendencia con respecto a una relación menor en comparación con otras muestras. Sin embargo, las diferencias no fueron tan grandes como para mostrar diferencias estadísticamente significativas entre las diversas formulaciones.

5 Resumen

10

Se demostró que los iones metálicos contribuyen a la degradación del JEV inactivado en condiciones de almacenamiento acelerado (22 °). En los estudios de enriquecimiento, se usaron concentraciones más altas de iones metálicos residuales (intervalo 100-1000 ng/ml) que las presentes en FVL formulado con el lote de alumbre 4230 (por ejemplo, Fe ~310 ng/ml; Cr ~64 ng/ml; Ni ~52 ng/ml). El contenido de Cu en FVL solamente se puede estimar como 3 ng/ml en función de los datos de ICP-MS de la solución madre de alumbre al 2 %, ya que el LOD es de 25 ng/ml. Se escogió una mayor concentración de metal y temperatura de almacenamiento para aumentar la velocidad de cualquier reacción de degradación potencial. De hecho, para el FVL JEV09L37, la pérdida de potencia se produjo después de 11 meses almacenado a 2-8 °C. También se demostró que los metales pueden formar complejos insolubles con iones fosfato, lo que dificulta la estimación de los niveles reales de metales presentes.

20

En experimentos de enriquecimiento, los resultados de ELISA mostraron cambios estructurales estadísticamente significativos de la superficie del virus en tan solo 4 semanas a 22 °C en presencia de iones metálicos. Se demostró que las relaciones de ELISA para las formulaciones que contenían Cu(II) y la mezcla de iones metálicos (que contenía Fe (II), Fe (III), Co (II), Cu (II) y Zn (II)) fueron inferiores estadísticamente significativas en comparación con la formulación de control no enriquecida. También se encontró Cu (II) en el lote de alumbre 4230 (solución madre al 2 %) a 64 ng/ml, que corresponde a ~3 ng/ml en FVL. En todos los demás lotes de alumbre (2 %), el contenido de Cu (II) fue <25 ng/ml (por debajo del límite de detección).

Para los experimentos de formulación del antígeno usando diferentes lotes de alumbre, se requiere un tiempo de almacenamiento más prolongado (>6 semanas a 22 °C) en condiciones aceleradas. Existe una tendencia a que las formulaciones preparadas con Alumbre 4230 muestren relaciones de ELISA inferiores en comparación con otros lotes. Una velocidad de degradación más lenta en comparación con la formulación enriquecida podría estar contribuyendo a un menor contenido de iones metálicos en los lotes comerciales de alumbre. También se observó que el antígeno muestra una mayor estabilidad a pH 7,5-8 en comparación con pH 7 y que los fragmentos de PS no contribuyen a ninguna reacción de degradación. Estos resultados concuerdan bien con los resultados del DOE descritos en el Ejemplo 1.

35

Ejemplo 3

Como parte de la investigación fuera de especificación con respecto a FVL JEV09L37, se determinó que el lote de hidróxido de aluminio usado (lote 4230) era la causa raíz más probable de la pérdida de potencia observada. El hidróxido de aluminio (denominado alumbre durante el proceso de fabricación de JE-PIV) se adquiere en Brenntag Biosector en forma de suspensión en autoclave denominada "adyuvante de gel de hidróxido de aluminio Alhydrogel®". Cada lote se esteriliza por radiación antes de su uso en el proceso de producción de JEV.

45

Se analizaron varios extractos de Alhydrogel® diferentes para determinar su aspecto, contenido de iones metálicos y propiedades físicas.

1 Introducción

50

1.1 Hidróxido de aluminio

El Alhydrogel® de Brenntag Biosector tiene un contenido específico de aluminio de 10 mg/ml que se traduce en Al₂O₃ al 2 % y Al(OH)₃ al 3 %, respectivamente. Otras especificaciones son Nitrógeno (máx. 0,005 %), Sulfato libre (máximo 0,05 %), Sulfato total (máximo 0,1 %) y pH (6,5 ± 0,5). Tiene una vida útil de 26 meses cuando se almacena a temperatura ambiente.

55

1.2 Generación de hidróxido de aluminio

Se fabrica Alhydrogel® al 2 % (denominado hidróxido de aluminio) por Brenntag (CAS n.º 21645-51-2).

1.3 Uso de lotes de hidróxido de aluminio en la fabricación de JEV

- 5 Para la producción de lotes de vacunas contra JEV comerciales, hasta el momento se han usado un total de 5 lotes diferentes de Alhydrogel® al 2 % de Brenntag.

2 Definiciones y abreviaturas

Alhydrogel	Solución al 2 % de hidróxido de aluminio (también denominado alumbre)
DS/DP	Sustancia farmacológica/Producto farmacológico
ESG	Grupo de científicos ambientales
F-AAS	Espectrometría de absorción atómica de llama
FVL	Lote de vacuna final
GF-AAS	Espectrometría de absorción atómica de horno de grafito
ICP-MS	Espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
JE-PIV	Virus inactivado purificado de la encefalitis japonesa
LOQ	Límite de cuantificación
P&TD	Proyecto y desarrollo técnico
PSD	Distribución del tamaño de partícula
PZC	Punto de carga cero
QCI	Control de calidad de inmunología

10

3 Materiales y métodos

3.1 Lotes de Alhydrogel®

- 15 Lotes de Alhydrogel® al 2 %: 3877, 4074, 4187, 4230, 4414, 4470, 4539, 4563, 4587, 4621 (no todos los lotes de alumbre enumerados se usaron en la formulación de JE-PIV) Alhydrogel® al 2 % 7 x lotes lavados: 4577, 4580, 4596 (suministrado por Brenntag, no típico del alumbre al 2 % recibido para la formulación)

3.2 Mediciones de PSD de Alhydrogel®

20

Se analizó la distribución del tamaño de partícula (PSD) de hidróxido de aluminio en un sistema Malvern Mastersizer 2000 µP con una celda de muestra de 20 ml. La sustancia a granel de Alhydrogel® al 2 % se diluyó 1:20 en agua y se añadió 1 ml a la celda de muestra. La dilución final de la muestra en la celda de muestra fue, por lo tanto, de 400 veces (hidróxido de aluminio al 0,005 %).

25

3.3 Mediciones de potencial zeta de Alhydrogel®

- 30 Se midió el potencial zeta y punto de carga cero (PZC) en un sistema Malvern Zetasizer ZS equipado con un autotitulado MPT-2. La sustancia a granel de Alhydrogel® al 2 % se diluyó 1:20 en PBS y se equilibró durante una noche a temperatura ambiente. Para el registro de la curva de titulación de carga, el pH se ajustó usando HCl 100 mM y soluciones de NaOH 100 mM. El PZC se determinó mediante la extrapolación de la carga cero en la gráfica de titulación (intersección de la curva de titulación y el eje x). El punto de carga cero corresponde al valor de pH donde la superficie de la muestra no tiene carga neta.

35 3.4 Análisis de iones metálicos en hidróxido de aluminio

- Los iones metálicos seleccionados se analizaron mediante espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), espectrometría de absorción atómica de llama (F-AAS) y espectrometría de absorción atómica de horno de grafito (GF-AAS) en el Medical Laboratory Bremen (Alemania). En resumen, las muestras que
40 contienen hidróxido de aluminio se trataron con HNO₃ conc. bajo calor hasta que se obtuvo una solución transparente. Después, la solución transparente se diluye y analiza adicionalmente. Se determinaron la presencia y el contenido de los siguientes iones metálicos: Pb, Cd, Cr, Co, Fe, Cu, Ni, Ag, W y Al. Dependiendo de la dilución de la muestra, el límite de cuantificación (LOQ) fue de 5 a 25 ng/ml.

- 45 Además, se realizó una exploración de 70 elementos semicuantitativa por ESG (Reino Unido) usando una

combinación de ICP-MS (Agilent 7500ce) e ICP-AES (Perkin Elmer Optima 4300DV), que se calibraron usando estándares certificados. La exploración de elementos es un método de cribado y no es tan sensible como el análisis de metales traza para los metales seleccionados según se realiza por el Medical Laboratory Bremen. Sin embargo, un cribado de este tipo ofrece una buena visión general de la presencia y los niveles de ciertos metales.

5

4 Resultados

4.1 Determinación de la distribución del tamaño de partículas de Alhydrogel®

10 La Tabla 21 resume los datos de PSD de dos sublotes, cada uno de los lotes de Alhydrogel® 4230 y 4740. Los resultados de distribución se muestran en la figura 11. La partícula media fue ~2-4 µm estando presentes poblaciones de partículas más pequeñas (<1 µm) y más grandes (>20 µm) en las cuatro muestras. Las cuatro muestras de Alhydrogel® ensayadas no mostraron diferencias significativas en la distribución del tamaño de partícula media.

15

4.2 Mediciones de potencial zeta

Se analizaron dos sublotes, cada uno de los lotes 4230 y 4740 de Alhydrogel® (solución madre al 2 % diluida 20 veces en PBS y equilibrada durante una noche a TA antes del análisis) para determinar el punto de carga cero. La Tabla 22 resume los resultados del PZC para las cuatro muestras que muestran PZC muy similares en tampón PBS. Las curvas de titulación se muestran en la figura 12. No se observaron diferencias en las curvas de titulación y PZC entre las cuatro muestras analizadas.

4.3 Determinación del contenido residual de iones metálicos en lotes de Alhydrogel®

25

Los límites actuales para Fe en soluciones de hidróxido de aluminio al 2 % de acuerdo con Ph. Eur. son 15 ppm (= 15 µg/ml) y un máximo total de 20 ppm (= 20 µg/ml) para otros metales pesados (tal como Pb). Sin embargo, una concentración de 15 ppm de Fe corresponderá a Fe 0,27 mM en solución. Teniendo en cuenta que incluso cantidades traza de iones metálicos residuales pueden catalizar una diversidad de reacciones de degradación para proteínas (por ejemplo, oxidación, activación de proteasas, etc.) y que los metales permanecen estables en la solución, las diferencias en el contenido de iones metálicos entre lotes de hidróxido de aluminio pueden causar diferencias en la estabilidad del antígeno a lo largo del tiempo.

35 Se analizaron las concentraciones de varios iones metálicos en lotes de hidróxido de aluminio disponibles comercialmente usando ICP-MS. Los resultados de estos análisis se resumen en la Tabla 23. Los lotes 4074, 4230, 4470, 4414 y 4539 se usaron en la producción de lotes comerciales de JEV. Dado que una solución madre al 2 % de Alhydrogel® equivale a una concentración de Al de 10 mg/ml, la cuantificación del contenido de Al en las diferentes muestras puede utilizarse como referencia para los resultados obtenidos para los otros iones metálicos. De hecho, se pudo medir un contenido promedio de aluminio de 10,3 mg/ml que muestra la precisión y reproducibilidad del método.

40

Al comparar los diferentes lotes de Alhydrogel®, se pueden observar grandes variaciones en la cantidad de iones metálicos contaminantes. Los iones metálicos contaminantes más notables son Fe, Cr y Ni que se detectaron en todos los lotes. Además, el lote 4230 contenía cantidades detectables de Cu que estaba por debajo del LOQ en todos los demás lotes.

45

Sin embargo, se ha de apreciar que ninguno de estos metales se detectó en cantidades cercanas a las especificaciones de Alhydrogel® mencionadas anteriormente. Por ejemplo, la mayor concentración de hierro encontrada en el lote 4230 fue de 5,6 µg/ml o aproximadamente el 40 % de la concentración permitida.

50 Un Alhydrogel® "mejorado" se lava 7 veces con agua durante la etapa de purificación en lugar de solamente 4 veces con Alhydrogel® estándar. Para ensayar si estas etapas de lavado adicionales darán como resultado una contaminación reducida de iones metálicos, se analizaron tres lotes diferentes (4580, 4596 y 4577). Los resultados se incluyen en la Tabla 23. No se pudo observar ninguna diferencia en iones metálicos comparada con Alhydrogel® de grado estándar, lo que sugiere que los iones metálicos están fuertemente unidos a la superficie de las partículas de hidróxido de aluminio o coprecipitan realmente durante el proceso de producción.

55

La figura 13 muestra una comparación de los diferentes lotes de Alhydrogel® analizados. El contenido total de iones metálicos contaminantes para todos los elementos contaminantes ensayados se muestra con las partes absolutas para los tres metales principales Fe, Cr y Ni representados en diferentes colores. Como se puede ver, el lote 4074

tiene muy pocos iones metálicos contaminantes en comparación con la mayoría de los otros lotes analizados. Solamente el lote 3877 mostró una contaminación de lote similar, mientras que el lote 4230 muestra con mucho la contaminación más alta de todos los lotes analizados durante esta investigación.

- 5 Durante la prueba de investigación, se observó una gran variación en el contenido de iones metálicos entre diferentes lotes de Alhydrogel® (véase la figura 13). Para probar si estos iones metálicos contaminantes se encuentran en la fracción de hidróxido de aluminio o en el sobrenadante, el lote 4230 se separó en un sobrenadante y una fracción de sedimento (véase la Tabla 24). Como puede verse, menos del 2 % de los iones metálicos podrían detectarse en el sobrenadante, lo que indica que todos los iones metálicos contaminantes están unidos a la
- 10 superficie de la partícula de hidróxido de aluminio o al interior de las estructuras de partículas. Por lo tanto, se puede estimar que la concentración local de iones metálicos es al menos 50-100 veces mayor dado que la fracción de volumen sólido (volumen de alúmina-sedimento después de la centrifugación) de Al₂O₃ al 0,1 % (correspondiente a 0,5 mg/ml de Al) utilizada en la formulación de la vacuna contra JEV es de aprox. 10-20 µl por 1000 µl de FVL.

15 5 Resumen

Se usa Alhydrogel® en una concentración final al 0,1 % como adyuvante en la formulación de vacuna contra JEV actual. Durante la investigación de un resultado de potencia fuera de especificación (OOS) para la producción de FVL JEV09L37, se inició una evaluación del proceso de producción de Alhydrogel®. Se analizaron 13 lotes

20 diferentes de Alhydrogel® para detectar la presencia de iones metálicos contaminantes que podrían reducir la estabilidad de la proteína.

Se observaron grandes variaciones en la concentración de varios iones metálicos para diferentes lotes de Alhydrogel®. Al analizar las materias primas, se demostró que estas contaminaciones estaban presentes a la misma

25 concentración que se encuentra dentro del Alhydrogel.

Se observaron niveles más altos de iones de Fe, Ni y Cu en el lote 4230 de Alhydrogel® en comparación con los otros lotes investigados. El lote 4230 fue el único en el que se detectaron iones Cu residuales. Este lote 4230 se usó

30 para la formulación de FVL JEV09L37.

Al analizar el sobrenadante y la fracción insoluble de un lote de Alhydrogel®, estos iones metálicos contaminantes solo podrían encontrarse en el precipitado, lo que indica que estos iones están unidos a la superficie de la partícula de hidróxido de aluminio o son realmente parte de la partícula.

35 Aunque macroscópico y en composición diferente de otros lotes de Alhydrogel® usados para la producción de JEV, el lote 4230 cumplía todos los requisitos detallados por el Ph. Eur. Además, la caracterización física (distribución de tamaño de partícula y punto de carga cero) no mostró diferencias entre el lote 4230 y otros lotes de Alhydrogel® que no mostraban estas altas contaminaciones de iones metálicos.

40 Ejemplo 4

1.1. Materiales, equipo y métodos

1.2. Equipo

- 45 Balanza analítica (legibilidad de 0,1 mg, por ejemplo, Mettler Toledo XP205DR/M)
Balanza de precisión (legibilidad de 0,1 g, por ejemplo, Mettler Toledo, modelo N.º XS6002S Delta Range)
Unidades de filtro de 0,22 µm (por ejemplo, Stericup Cat. N.º SCGPV01RE) o sistema de filtro de 0,2 µm
(por ejemplo, 50 ml de Millipore Steriflip)
- 50 Congelador (-20 °C) y ultracongelador (-80 °C)
Frigorífico (+2 a 8 °C)
Agitador magnético (por ejemplo, KIKA Labortechnik RCT basic) y barras de agitación magnéticas
Lavador de microplacas: por ejemplo, BioTek ELx405
Lector de microplacas: por ejemplo, Software BioTek Synergy 2 y Gen5 Secure
- 55 Incubadora de microplacas (37 °C)
Cinta selladora de microtitulación (por ejemplo, Thermo Electron 9503130)
Pipetas y puntas multicanal (por ejemplo, Eppendorf Research Pro 50-1200 µl, Eppendorf Research, 10-100 µl)
medido de pH (por ejemplo, WTW Series ino Lab, Terminal 740 y pH/Cond. 740)

- Pipetas y puntas (por ejemplo, Eppendorf Research, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl)
 Pipeta (por ejemplo, IBS Biosciences Pipetboy)
 Tubos de PP 15 ml (por ejemplo, Sarstedt 62.515.006) o tubos de PP 50 ml (por ejemplo, Greiner 227261)
 Depósito de reactivo 50 ml (por ejemplo, Corning Incorporated 4870)
 5 Pipetas serológicas (por ejemplo, Falcon, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)
 Microtubos Titerube - A granel (BioRad 223-9391)
 Mezclador vorticial (por ejemplo, mezclador vorticial analógico VWR, modelo N.º 945304)
 Tubos Eppendorf de baja unión de 1,5 ml o 2,0 ml (Cat. N.º 0030 108.116, Cat. N.º 0030 108.132, respectivamente)
 10 Microplacas de 96 pocillos (F96 Cert. Maxisorp Nunc-Inmunoplasmas)

Para el análisis de muestras de DP además:

- 15 Centrífuga de sobremesa (por ejemplo, reja de Beckman, centrífuga de microfuga 16, Cat. n.º A46473)
 Agitador orbital (por ejemplo, Eppendorfer Thermomixer compact)
 Tubos de PP de 50 ml (por ejemplo, Greiner 227261)

1.3. Reactivos

- 20 PBS 10x (por ejemplo, Gibco, Cat. N.º 14200-083)
 Tween 20 (por ejemplo, Sigma Cat. N.º P7949)
 Ácido sulfúrico 2 M (solución volumétrica, por ejemplo, Fisher, Cat. N.º J/8410/17) Agua desionizada, por ejemplo (Milli-Q, 18.2Ω)
 25 Cápsulas de carbonato sódico - bicarbonato (por ejemplo, Sigma, Cat. N.º C3041) Ácido clorhídrico (HCl) 1 mol/l (por ejemplo, Merck, Cat. N.º 1.09057.1000)
 Hidróxido sódico (NaOH) 1 mol/l (por ejemplo, Merck, Cat. N.º 1.09132.1000) Glicerol (por ejemplo, Sigma)

Para el análisis de muestras de DP además:

- 30 Hidrogenofosfato dipotásico trihidrato (por ejemplo, Sigma, Cat. N.º P5504)
 Dihidrogenofosfato potásico (por ejemplo, VWR, AnalaR Normapur, Cat. N.º 26936.260)
 Albúmina sérica bovina (BSA), calidad ELISA (por ejemplo, Sigma, Cat. N.º A3059) Sustrato de TMB (por ejemplo, BioFX, TMBW-1000-01)
 35 Conjugado de HRP de IgG de burro anti conejo (Jackson Immuno Research, Cat. N.º 711-035-152)

Reconstitución:

- El contenido de 1 vial (0,4 mg) se reconstituye en 0,5 ml de agua desionizada y se mezcla vigorosamente hasta una disolución total. Añadir 0,5 ml de glicerol y mezclarlo adicionalmente hasta homogeneidad. Las alícuotas se
 40 almacenan a -20 °C hasta su uso.
 Estándar de referencia de JEV inactivado (Intercell Biomedical Ltd.)
 anti-JEV de oveja purificado (Intercell Biomedical Ltd.)
 anti-JEV de conejo purificado (Intercell Biomedical Ltd.)

45 1.4. Soluciones

a) Tampón carbonato 0,05 M a pH 9,6 (usado para el recubrimiento de placas ELISA)

- Para el tampón de 100 ml, disolver una cápsula de tampón de bi-carbonato/carbonato en 100 ml de agua
 50 desionizada. Comprobar el pH y ajustar a $9,6 \pm 0,1$ con HCl o NaOH si es necesario. Usar solamente el día de la preparación. Mantener el tampón de recubrimiento ELISA a TA durante el día del uso, después desechar.

b) Tampón de lavado ELISA y parte del bloque/diluyente de muestra (PBS-T)

- 55 Preparar aproximadamente 1 litro para cada placa usada. Diluir 10 x reserva de PBS 1 + 9 en agua desionizada, mezclar bien y comprobar el pH ($7,4 \pm 0,1$), ajuste con HCl 1 M o NaOH 1 M según sea necesario. Añadir Tween20 al 0,05 % (v/v), mezclar bien.
 por ejemplo, tampón de lavado ELISA (PBS-T) [1L]:

100 ml 10 x PBS
900 ml agua desionizada

Mezclar bien, comprobar/ajustar el pH (7,4 +/- 0,1).

0,5 ml de Tween 20

Mezclar bien.

5

Usar el día de la preparación solamente; mantener el tampón de lavado ELISA a TA durante el día de uso, después desechar.

c) Solución de bloqueo: BSA al 5 % en PBS-T

10

Preparar aproximadamente 25 ml para cada placa. Medir la cantidad requerida de PBS-T en una botella de vidrio limpia usando una pipeta serológica. Añadir una barra de agitación magnética limpia. Pesar la cantidad necesaria de BSA, añadir a la superficie del PBS-T y mezclar suavemente en un agitador magnético hasta que todo el BSA se haya disuelto. Filtrar la solución usando un filtro de 0,2 µm (ya sea un sistema de filtro Steriflip o un filtro de jeringa).

15 por ejemplo, solución de bloqueo [100 ml]

5 g BSA
100 ml PBS-T

Usar el día de la preparación solamente; mantener la solución de bloqueo a TA durante el día de uso, después desechar.

20

d) Diluyente de muestra: BSA al 1 % en PBS-T

Preparar como anteriormente, pero usando 1 g de BSA por 100 ml de PBS-T, se requieren aproximadamente 25 ml por placa.

25 por ejemplo, diluyente de muestra [100 ml]

1 g BSA
100 ml PBS-T

Usar el día de la preparación solamente; mantener el diluyente de muestra a TA durante el día de uso, después desechar.

30

Para el análisis de muestras de DP además:

e) 1x PBS

35 Preparar 1 parte de 10x PBS con 9 partes de agua desionizada
por ejemplo, 1x PBS [100 ml]

10 ml de 10x PBS

90 ml de agua desionizada

40 Usar el día de la preparación solamente; mantener 1x PBS a TA durante el día de uso, después desechar.

f) tampón ELISA 20x

45 Pese una cantidad apropiada de BSA en un recipiente adecuado para hacer una solución 20x. Añadir el volumen apropiado de 1x PBS. Añadir Tween20 a una concentración final de mezcla al 0,05 % en el agitador magnético hasta que la BSA se disuelva por completo. Filtrar la solución a través de un filtro de 0,2 µm (utilizando un sistema de filtro Steriflip o un filtro de jeringa) en un recipiente estéril (y alícuota según sea necesario).

por ejemplo, tampón ELISA 20x [25 ml]

5 g BSA

25 ml de 1 x PBS

12,5 µl Tween20

50

La solución puede almacenarse a +2-8 °C durante 1 semana.

g) 2x tampón ELISA

Se prepara por dilución del 20x tampón ELISA con 1x PBS (1 parte de 20x tampón ELISA y 9 parte de 1x PBS).
5 por ejemplo, 2x tampón ELISA [20 ml]

2 ml	20x tampón ELISA
18 ml	1 x PBS

Usar el día de la preparación solamente; mantener 2x tampón ELISA a TA durante el día de uso, después desechar.

10 h) Tampón de desorción

- Solución madre de fosfato potásico: Preparar una solución madre 3x de fosfato potásico (2,4 M) disolviendo el volumen apropiado de fosfato dipotásico trihidrato y de dihidrogenofosfato potásico en agua desionizada. Colocar en un agitador magnético y una vez disuelto preparar el volumen requerido, comprobar que el pH de la solución es
15 8,0+/- 0,1. Filtrar a través de un filtro de 0,2 µm.
por ejemplo, solución madre 3x de fosfato potásico (2,4 M) [50 ml]

23,963 g	Fosfato dipotásico trihidrato
2,041 g	Dihidrogenofosfato potásico
Preparar hasta 50 ml	Agua desionizada

Almacenar a +2 °-8 °C durante hasta 1 mes.

20 - Hacer un tampón de desorción de fuerza de trabajo (tampón de fosfato potásico 0,8 M que contiene BSA al 1 % y Tween 20 al 0,05 %) mediante la adición del volumen apropiado de reserva de fosfato de potasio (2,4 M), de Tween20 y de BSA al volumen requerido de agua desionizada. Mezclar bien y usar el día de la preparación.
por ejemplo, tampón de desorción de fuerza de trabajo [15 ml]

5 ml	Fosfato potásico (2,4 M)
7,5 µl	Tween20
0,15 g	BSA
10 ml	Agua desionizada

25

Mantener el tampón de desorción de fuerza de trabajo a TA durante el día de uso.

1.5. Muestras de ensayo y anticuerpos

30 Muestras de ensayo:

- Sustancia farmacológica y/o NIV (varios lotes)
- Muestras de vacuna contra JEV (vacuna final a granel y lote final de vacuna) Estándar de referencia de JEV inactivado (virus inactivado neutralizado - NIV) (Intercell Biomedical Ltd.)

35

Anticuerpos policlonales:

- Anticuerpo de revestimiento: Anti-JEV de oveja purificado (Intercell Biomedical Ltd.)
- Anticuerpo de detección primario: Anti-JEV de conejo purificado (Intercell Biomedical Ltd.)

40

Anticuerpo conjugado secundario: Conjugado de HRP anti-conejo de burro (Jackson Immuno Research Cat. N.º 711-035-152)

2 Procedimiento

45

2.1. Revestimiento de placas

- Marcar la placa con el número de placa, la fecha y el analista.
- Preparar un tampón de carbonato 0,05 M nuevo (pH 9,6) el día del recubrimiento de la placa. Dejar
50 aproximadamente 12 ml para cada placa recubierta.

- Retirar el número requerido de alícuotas del anticuerpo de recubrimiento del congelador y permitir la descongelación a TA. Preparar una dilución de anti-JEV de oveja purificada en tampón de carbonato. Mezclar bien por inversión del tubo.
- Usando la pipeta multicanal, aplicar 100 µl/pocillo a una placa Maxisorp de 96 pocillos dentro de los 15 min de la preparación de la dilución de anticuerpo.
- Cubrir con cinta de sellado de microtitulación e incubar de 17 a 72 horas a +2-8 °C.

2.2. Lavado

- Retirar la placa del refrigerador y permitir el calentamiento a temperatura ambiente.
- Lavar la placa/s con el lavador de placas de microtitulación 3 veces usando el programa de lavado respectivo (300 µl por pocillo, tres veces, dispensar al final). Después de eso: eliminar cualquier resto de tampón de lavado mediante decantación. Invertir el plato y secarlo contra una toalla de papel limpia. No permitir que la placa de microtitulación se seque entre las etapas de lavado y la adición de reactivo.

2.3. Bloqueo

- Preparar una solución de bloqueo al 5 % (p/v) de BSA en PBS-T como anteriormente.
- Aplicar 200 µl de solución de bloqueo por pocillo, cubrir la placa o las placas con una placa protectora e incubar a 37 °C durante 1 hora durante +/- 10 min.

2.4. Preparación de diluciones de curva estándar

- Sacar el estándar de referencia de NIV del congelador, permitir la descongelación a TA, mezclar bien. Preparar una dilución madre de 1 UA/ml del estándar de referencia actual; usar al menos 20 µl de estándar de referencia de NIV para la dilución, por ejemplo, pre-dilución del estándar de referencia de NIV:

Concentración: 235 UA/ml (lote N.º 03/2009)

Para preparar una solución estándar de trabajo de 1 UA/ml, diluirla de 1 a 235 en diluyente de muestra:

4680 µl	Diluyente de muestra
20 µl	Estándar de referencia de NIV

- Preparar entonces las siguientes soluciones estándar de trabajo a partir de la predilución de 1 U/ml: 0,8 AU/ml, 0,6 AU/ml, 0,4 AU/ml, 0,2 AU/ml, 0,1 AU/ml y 0,05 AU/ml en diluyente de muestra.

2.5. Muestras de control de calidad

- a) Las muestras de control de calidad (QC) (por ejemplo, a 0,75, 0,30 y 0,18 UA/ml) se deben preparar a partir de la predilución de estándar de referencia de NIV recién preparada en el momento del ensayo y después descartarse una vez utilizadas.
- b) Estos controles son parte de los criterios de idoneidad del sistema y permiten controlar el rendimiento del ensayo a lo largo del tiempo.

2.6. Preparación de las muestras de ensayo

Preparación de sustancias farmacológicas

Se reciben muestras de ensayo de sustancia farmacológica para los ensayos a concentraciones desconocidas. Estas se ensayarán en seis diluciones por triplicado. Las diluciones se harán independientemente en el rango de la curva estándar, por ejemplo, predilución de 1 en 15 u otra dilución adecuada, después seis diluciones con tampón de muestra.

Preparación de la muestra de NIV

Se recibirán muestras de NIV para el ensayo a concentraciones desconocidas y se diluirán previamente en el rango de la curva estándar (por ejemplo, 1 en 30 u otra dilución adecuada), y después se diluirán seis veces de la misma manera que las muestras de DS.

Preparación del sobrenadante del producto farmacológico

a) Para el análisis de muestras de DP a granel, mezclar bien la muestra mediante agitación vorticial. Transferir exactamente 1 ml a un tubo Eppendorf de baja unión de 1,5 ml.

5 Para el análisis de las muestras del recipiente de producto final, transferir el contenido de 2 jeringas (0,6 ml por jeringa) del mismo lote a un tubo Eppendorf de baja unión de 1,5 ml. Mezclar el contenido del tubo vigorosamente por inversión para asegurar la homogeneidad del DP y transferir exactamente 1 ml al tubo Eppendorf de baja unión de 1,5 ml nuevo.

b) Centrifugar los tubos que contienen 1 ml de DP cada uno a 3300xg durante 5 minutos.

c) Para cada muestra, pipetear 25 µl de tampón ELISA 20x en un tubo Eppendorf de baja unión nuevo.

10 d) Retirar cuidadosamente 475 µl del sobrenadante sin alterar el sedimento de alumbre y transferirlo al tubo que contiene el tampón ELISA 20x. Mezclar suavemente por inversión. Volver a centrifugar durante 2 min a 16.000xg. Almacenar la muestra a +2-8 °C antes del análisis.

NOTA: Las muestras de sobrenadante de DP preparadas de esta manera se deben medir puras por triplicado en el ELISA de JEV inactivado.

15 e) Retirar cuidadosamente la mayor parte del sobrenadante residual del tubo centrifugado utilizando una pipeta de 10-200 µl sin alterar el sedimento de alumbre y desechar el sobrenadante.

f) El sedimento obtenido se somete al procedimiento de desorción como se describe a continuación.

Procedimiento de desorción de productos farmacéuticos

20 a) Añadir 158 µl de tampón de desorción de fuerza de trabajo a cada sedimento que quede en el tubo de baja unión.

b) Resuspender el sedimento por pipeteo ascendente y descendente varias veces para asegurar la resuspensión completa del sedimento y la homogeneización de la muestra.

25 c) Incubar las muestras durante 10 minutos a TA en un agitador orbital a 500 rpm.

d) Después de la incubación, centrifugar las muestras a 3300xg durante 5 minutos.

e) Para cada muestra, pipetear 250 µl de tampón ELISA 2x en un tubo Eppendorf de baja unión nuevo.

30 f) Retirar con cuidado 83,3 µl de la parte superior del sobrenadante que contiene el producto desorbido sin alterar el sedimento y transferirlo al tubo que contiene el tampón ELISA 2x. Eliminar el sobrenadante restante usando una pipeta de 20-200 µl sin alterar el sedimento y descartar el sobrenadante.

g) Añadir 158 µl más de tampón de desorción de fuerza de trabajo a cada sedimento.

h) Realizar 2 ciclos más de desorción (3 en total) reuniendo los 3x 83,3 µl del material desorbido + 250 µl de tampón ELISA en el tubo apropiado. Después de la última etapa, se puede desechar el sedimento restante.

35 i) La concentración final del antígeno vírico en el grupo o grupos desorbidos debería ser ahora la misma que la del DP original del que se desorbió. Por lo tanto, la concentración de contenido de antígeno de JEV inactivado medida en el grupo desorbido puede estar directamente relacionada con el DP original.

Nota: Analizar las muestras desorbidas por ELISA el día de la desorción.

j) Dilución de las muestras de DP desorbidas:

40 Estas se ensayarán en seis diluciones por triplicado. Se realizará una predilución apropiada en el rango de la curva estándar, por ejemplo, 1 en 15 (diluyente de 100 µl a 1400 µl) u otra dilución adecuada, después se harán seis diluciones de predilución 1 en 15 de forma independiente utilizando diluyente de muestra.

2.7. Carga de muestra y plan de placas

45 **Preparar muestras y estándares antes del análisis.**

Después del bloqueo, lavar la placa usando el lavador de placas empleando el programa ELISA de JEV. Después de eso, eliminar cualquier resto de tampón de lavado mediante decantación. Invertir el plato y secarlo contra una toalla de papel limpia. No permitir que la placa de microtitulación se seque entre las etapas de lavado y la adición de reactivo.

50 Añadir 100 µl/pocillo de estándares/controles/muestras y cubrir con una placa protectora e incubar durante 1 hora durante +/- 10 min a 37 °C.

Añadir 100 µl de diluyente de muestra a todos los pocillos no requeridos para la prueba.

55 **2.8. Preparación de anticuerpo primario**

Eliminar el número requerido de alícuotas del anticuerpo primario del congelador y dejar descongelar a TA. Preparar un máximo de 15 minutos antes de usar el anti-JEV de conejo en diluyente de muestra a una dilución adecuada.

Después de la incubación de la muestra, lavar la placa usando el lavador de placas empleando el programa ELISA de JEV. Después de eso, eliminar cualquier resto de tampón de lavado mediante decantación. Invertir el plato y secarlo contra una toalla de papel limpia. No permitir que la placa de microtitulación se seque entre las etapas de lavado y la adición de reactivo.

- 5 Añadir 100 µl/pocillo de anticuerpo primario diluido, cubrir con una placa protectora e incubar durante 1 hora +/- 10 min a 37 °C.

2.9. Preparación del conjugado de anticuerpo secundario

- 10 Retirar el número requerido de alícuotas del conjugado de anticuerpo secundario del congelador y dejar descongelar a temperatura ambiente. Preparar un máximo de 15 minutos antes de usar una dilución de HRP de burro anti-conejo en diluyente de muestra; por ejemplo, para una dilución de 1 en 10.000 para hacer una predilución de 1 en 100, después hacer una segunda dilución de 1 en 100.

- 15 Después de la incubación del anticuerpo primario, lavar la placa usando el lavador de placas empleando el programa ELISA de JEV. Después de eso, eliminar cualquier resto de tampón de lavado mediante decantación. Invertir el plato y secarlo contra una toalla de papel limpia. No permitir que la placa de microtitulación se seque entre las etapas de lavado y la adición de reactivo. Añadir 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario diluido, cubrir con una placa protectora e incubar durante 1 hora +/- 10 min a 37 °C.

20

2.10. Incubación de sustrato

Cuando se ha añadido el conjugado, retirar el TMB del refrigerador a 2-8 °C. Pipetear el volumen requerido (12 ml de TMB por placa) en un tubo de centrifuga de 50 ml, utilizando una pipeta serológica. Permitir que el TMB alcance la temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación del conjugado, lavar la placa 3 veces con el lavador de placas empleando el programa ELISA de JEV. Después de eso: eliminar cualquier resto de tampón de lavado mediante decantación. Invertir el plato y secarlo contra una toalla de papel limpia. No permitir que la placa de microtitulación se seque entre las etapas de lavado y la adición de reactivo. Añadir 100 µl/pocillo de TMB y desarrollar la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos.

30

2.11. Detención y lectura

- Después de 10 minutos de incubación con TMB, detener el desarrollo añadiendo 100 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2 M. Leer la placa a 450 nm (filtro de referencia a 630 nm) en 10 minutos de detención usando el lector BioTek y el software Gen5 Secure.

35

2.12. Análisis de datos

Análisis de datos de NIV/DS:

40

El software Gen5Secure se usará para calcular el % de recuperación de los QC, concentración x diluciones, la concentración media de las muestras corregida para las diluciones y este valor multiplicado por 1,05 para corregir la adición de tampón ELISA.

45 Análisis de datos de DP:

Se usará el software Gen5Secure para calcular el % de recuperación de los QC, la concentración x diluciones, y la concentración media de las diluciones para las muestras.

50 Para muestras de sobrenadante de DP:

Si la concentración de la muestra sobrenadante está por debajo del LLOQ del ensayo (es decir, 0,05 AU/ml), entonces la muestra del sobrenadante debe registrarse como <0,05 AU/ml

- 55 Si la concentración de la muestra de sobrenadante está dentro de los LOQ del ensayo (es decir, de 0,05 UA/ml a 1,25 UA/ml), entonces el valor de la concentración se registra para la muestra sobrenadante.

Si la concentración de la muestra de sobrenadante está por encima del ULOQ del ensayo (es decir, 1,25 UA/ml), entonces debe repetirse la preparación del sobrenadante del producto farmacológico. La muestra sobrenadante se

volverá a ensayar realizando una predilución adecuada en el rango de la curva estándar seguida de 6 diluciones de muestra. (No es necesario repetir la muestra del producto farmacológico desorbido). La concentración media para las diluciones que están dentro de los LOQ del ensayo (LLOQ 0,05 UA/ml a 1,25 UA/ml) será el valor de concentración registrado para la muestra de sobrenadante, siempre que se satisfaga la idoneidad del sistema y al menos 4 de las 6 diluciones de muestra estén dentro de los LOQ.

2.13. Criterios de aceptación del ensayo

- 10 a) El coeficiente de correlación para la curva de calibración debe ser $>0,980$.
- b) % de VC ≤ 15 % para estándares y muestras (excepto sobrenadante de DP) para las cuatro concentraciones más altas de las diluciones, % de VC ≤ 15 % para controles
- c) Las DO de blanco individuales deben ser $\leq 0,2$.
- 15 d) Los controles del ensayo deben estar dentro de los límites definidos especificados (para los controles recién preparados 2 de cada 3 QC deben haber observado concentraciones dentro de ± 30 % de los valores nominales, O los niveles establecidos durante la calificación de QC) para superar el ensayo.
- e) La validez del ensayo se registrará en la impresión Gen5. Si la placa no cumple con los criterios de aceptación definidos, el ensayo se considerará no válido.

2.14. Informes de datos

20

NIV

a) Contenido de antígeno

25 El valor informado para AU/ml inactivado es la media de las concentraciones (que están dentro de los LOQ de 0,04 a 1,25 AU/ml) calculadas para las diluciones de muestra única corregidas por los factores de dilución respectivos, y la media multiplicada por un factor de corrección de 1,05 para tener en cuenta el volumen del 5 % del tampón ELISA 20x que se añadió a cada muestra cuando se tomó. El contenido de antígeno se registrará en la impresión Gen5.

30

DS:

a) Identidad

35 Si las absorbancias de las muestras a la dilución más baja (concentración más alta) son superiores a 3 desviaciones estándar por encima del valor medio del blanco, el resultado será informado como positivo

b) Contenido de antígeno

40 El valor informado para AU/ml inactivado es la media de las concentraciones (que están dentro de los LOQ de 0,04 a 1,25 AU/ml) calculadas para las diluciones de muestra única corregidas por los factores de dilución respectivos, y la media multiplicada por un factor de corrección de 1,05 para tener en cuenta el volumen del 5 % del tampón ELISA 20x que se añadió a cada muestra cuando se tomó. El contenido de antígeno se registrará en la impresión Gen5.

DP desorbido

45

a) Identidad:

Si las absorbancias de las muestras a la dilución más baja (concentración más alta) son superiores a 3 desviaciones estándar por encima del valor medio del blanco, el resultado será informado como positivo.

50

b) Contenido de antígeno

55 El valor informado para AU/ml inactivado es la media de las concentraciones (que están dentro de los LOQ de 0,05 a 0,8 UA/ml) calculadas para las diluciones de muestra única corregidas por los factores de dilución respectivos. El contenido de antígeno se registrará en la impresión Gen5.

Sobrenadante de DP (grado de adsorción/grado de no adsorción):

Se informa el grado de adsorción en relación con la posterior filtración de la sustancia farmacológica formulada con

hidróxido de aluminio.

5 a) Para el cálculo del valor informado, el contenido de antígeno informado (AU/ml) para la muestra de DS respectiva (postfiltración) corregido para la dilución con hidróxido de aluminio (5 %) se ajustará en el 100 % y el porcentaje de la concentración medido en el sobrenadante (corregido para la adición de tampón ELISA al 5 %) se calculará con respecto a esto. El valor reportable será la diferencia entre el 100 % y el porcentaje calculado para el sobrenadante. Los resultados serán informados con 2 decimales.

Sobrenadante de DP (AU/ml) * 1,05

Grado de adsorción (%) = 100% - * 100%

DS (AU/ml) * 0,95

10 El grado de no adsorción se calculará como se detalla a continuación y los resultados se informarán con dos decimales:

Sobrenadante de DP (AU/ml) * 1,05

Grado de adsorción (%) = * 100%

DS (AU/ml) * 0,95

15 b) En caso de que el sobrenadante puro no contenga ningún antígeno medible (es decir, concentración de sobrenadante observada menor de LLOQ, donde LLOQ = 0,05 AU/ml), el LLOQ se usará para el cálculo del resultado. El resultado en este caso se informa como "mayor que x %". Por ejemplo, si la muestra de DS se mide como 12,00 AU/ml y no se midió ninguna señal en el sobrenadante; con el LLOQ de 0,05 AU/ml, entonces la cantidad en el sobrenadante es <0,05 * 1,05 = <0,0525 AU/ml. La cantidad de DS después de la corrección del tampón es 12,00 * 0,95 = 11,40 AU/ml, y el resultado informado para el grado de adsorción es <100-0,0525/11,4 * 100 => 99,54 %. También se informará el grado de no adsorción (es decir, 100 - el % del grado de adsorción).

Ejemplo 5

Introducción:

25 Para investigar adicionalmente el modo de acción que conduce a la inestabilidad del producto/pérdida de potencia de la vacuna contra JEV, se usó Ala-(His)6-OprF190-342-OprI21-83 (SEQ ID NO: 1, figura 14) - en el presente documento también denominada "proteína A", en un ensayo de cribado preliminar que incorporaba lotes de alhydrogel con diferente contenido de metal y enriquecimiento con iones cobre y sulfito.

Material:

- Cloruro de cobre (II) dihidrato (Sigma, Orden n.º 807483)
- 10 x PBS (Gibco, Orden n.º 14200-091)
- 35 - Tubos Falcon de 15 ml (Greiner, Cat. N.º 188724)
- Incubadora Infors HT Multitron Standard (InforsAG)
- Agua bidest. (Fresenius Kabi, Art. n.º 0712221/01 A)

Preparación de soluciones madre:

- 40 - Solución madre de cobre (II)
- Se preparó una solución madre de cobre (II) 20 mM disolviendo 341 mg de cloruro de cobre (II) dihidrato en 100 ml de agua bidestilada.
- Solución madre de metabisulfito sódico
- 45 - Se preparó una solución madre de metabisulfito sódico 200 mM disolviendo 1,52 g de metabisulfito sódico en 35 ml de PBS. Esta solución se ajustó el pH a 7,3 con NaOH y se llenó hasta un volumen de 40 ml con PBS. La solución se filtró entonces a través de un filtro de jeringa de 0,2 µ.

Preparación de soluciones de trabajo

50

Las soluciones de trabajo se prepararon por dilución de soluciones madre de metal con agua bidest. y filtración estéril a través de un filtro de jeringa de 0,2 µ. (Mini Kleenpak 25 mm- Pall)

Preparación de soluciones de tampón

5

· 1/3 de PBS + NaCl al 0,9 %

Se preparó 1 x solución de tampón PBS mediante dilución 1:10 de 10 x PBS con agua bidest. El pH de esta solución de tampón fue 7,5. Se prepararon soluciones de tampón PBS ajustadas a pH 7,3 y 8,0 ajustando el pH con HCl o

10

NaOH, respectivamente. Se disolvieron 9 g de NaCl en 333 ml de pH 7,3 de solución tampón de pH 8,0, y después se llevaron a 1000 ml con agua de bidest. seguido de filtración a través de filtro de botella de 0,2 µ.

Preparación de muestra:

15

Se prepararon formulaciones de Proteína A y diferentes lotes de alhydrogel (lote 4230 y lote 4074) en 1/3 de PBS + NaCl al 0,9 % a dos valores de pH diferentes y se enriquecieron con sulfito de acuerdo con el siguiente esquema:

N.º	Muestra			Enriquecimiento	
	Nombre	pH	Lote de alumbre	Cu(II) [ng/ml]	Sulfito [mM]
1	17112011_PROTEIN A_4074_ref 4°_pH7.3	7,3	4074		
2	17112011_PROTEIN A_4074_ref 37°_pH7.3	7,3	4074		
3	17112011_PROTEIN A_4074_Sulfit 37°_pH7.3	7,3	4074		1
4	17112011_PROTEIN A_4230_ref 4°_pH7.3	7,3	4230		
5	17112011_PROTEIN A_4230_ref 37°_pH7.3	7,3	4230		
6	17112011_PROTEIN A_4230_Sulfit 37°_pH7.3	7,3	4230		1
7	17112011_PROTEIN A_4074_ref 4°_pH8	8	4074		
8	17112011_PROTEIN A_4074_ref 37°_pH8	8	4074		
9	17112011_PROTEIN A_4074_Sulfit 37°_pH8	8	4074		1
10	17112011_PROTEIN A_4230_ref 4°_pH8	8	4230		
11	17112011_PROTEIN A_4230_ref 37°_pH8	8	4230		
12	17112011_PROTEIN A_4230_Sulfit 37°_pH8	8	4230		1

Las muestras 1, 6, 11 y 16 se almacenaron a 4 °C (muestras de referencia). Todas las demás muestras se

20

incubaron a 37 °C durante 96 horas. Después de 96 horas, todas las muestras se sometieron a un procedimiento de desorción para separar el antígeno del alhydrogel. El antígeno desorbido se analizó por RPC.

25 Resultados:

Los resultados mostraron una degradación grave de la Proteína A del antígeno en presencia de sulfito. La degradación fue más pronunciada en las muestras formuladas con alhydrogel de mayor contenido de impurezas metálicas.

30

Tabla 1. Contenido de iones metálicos en el lote de hidróxido de aluminio 4230 y 4074 analizados por ICP-MS.

Lote de alumbre (solución al 2 %)	Al µg/ml	Cr ng/ml	Fe ng/ml	Co ng/ml	Ni ng/ml	Cu ng/ml	Ag ng/ml	Cd ng/ml	W ng/ml	Pb ng/ml	V ng/ml	Rb ng/ml	Mo ng/ml
Lote de alumbre 4230 RQCS 0890	9570	1139	5640	7	816	64	<5	<5	<25	24	13	<5	11
Lote de alumbre 4074 RQCS0013	9130	20	266	<5	15	<25	<5	<5	<25	19	<5	<5	<5
Mezcla 50/50 % de ambos lotes*	9130	579	2952	<5,8	415	<45	<5	<5	<25	21,6	<9	<5	<8

*Contenido de metal residual calculado

Tabla 2: Esquema de pipeteo de DOE

N.º	Muestra		pH	NIV dil	%	Alumbre 4230	%	Alumbre 4074	µg/ml	Reserva PS Frag.	U	ppm
	Nombre	Reserva de extralibles										
1	20110819_DOE_spl_1		7	2	100		0	50	4,2	0		0
2	20110819_DOE_spl_2		7	2	0		100	0	4,2	0		0
3	20110819_DOE_spl_3		7	2	0		100	0	0	0		40
4	20110819_DOE_spl_4		8	2	0		100	50	4,2	0		0
5	20110819_DOE_spl_5		7,5	2	50		50	50	0	0		0
6	20110819_DOE_spl_6		7	2	0		100	50	0	0		40
7	20110819_DOE_spl_7		7	2	100		0	50	0	0		0
8	20110819_DOE_spl_8		8	2	0		100	50	0	0		0
9	20110819_DOE_spl_9		8	2	100		0	0	0	0		0
10	20110819_DOE_spl_10		8	2	100		0	50	0	0		0
11	20110819_DOE_spl_11		8	2	0		100	50	4,2	40		40
12	20110819_DOE_spl_12		7	2	100		0	0	4,2	0		0
13	20110819_DOE_spl_13		8	2	0		100	0	0	0		40
14	20110819_DOE_spl_14		7	2	100		0	0	0	0		40
15	20110819_DOE_spl_15		8	2	0		100	0	4,2	0		0

Tabla 2 Continuación

16	20110819 DOE Spl_16	8	2	100	0	50	0	40
17	20110819 DOE Spl_17	7	2	0	100	50	4,2	0
18	20110819 DOE Spl_18	7	2	0	100	50	4,2	40
19	20110819 DOE Spl_19	8	2	100	0	0	4,2	40
20	20110819 DOE Spl_20	8	2	0	100	0	4,2	40
21	20110819 DOE Spl_21	8	2	0	100	50	0	40
22	20110819 DOE Spl_22	8	2	100	0	0	4,2	0
23	20110819 DOE Spl_23	7	2	0	100	0	4,2	40
24	20110819 DOE Spl_24	7	2	100	0	50	0	40
25	20110819 DOE Spl_25	7	2	0	100	50	0	0
26	20110819 DOE Spl_26	7	2	0	100	0	0	0
27	20110819 DOE Spl_27	8	2	100	0	50	4,2	0
28	20110819 DOE Spl_28	8	2	100	0	0	0	40
29	20110819 DOE Spl_29	8	2	100	0	50	4,2	40
30	20110819 DOE Spl_30	7	2	100	0	0	0	0
31	20110819 DOE Spl_31	7,5	2	50	50	0	0	0
32	20110819 DOE Spl_32	8	2	0	100	0	0	0
33	20110819 DOE Spl_33	7	2	100	0	50	4,2	40
34	20110819 DOE Spl_34	7	2	100	0	0	4,2	40

Tabla 2 continuación

N.º	Muestra		pH	NIV	Tampón	Volumen [µl]					Reserva de extraíbles	CH2O	Total
	Nombre					Alumbre 4230	Alumbre 4074	Reserva de PS Frag.					
1	20110819_DOE_spl_1		7	2500	1812	250	0	125	313	0	5000		
2	20110819_DOE_spl_2		7	2500	1937	0	250	0	313	0	5000		
3	20110819_DOE_spl_3		7	2500	2228	0	250	0	0	22	5000		
4	20110819_DOE_spl_4		8	2500	1812	0	250	125	313	0	5000		
5	20110819_DOE_spl_5		7.5	2500	2125	125	125	125	0	0	5000		
6	20110819_DOE_spl_6		7	2500	2103	0	250	125	0	22	5000		
7	20110819_DOE_spl_7		7	2500	2125	250	0	125	0	0	5000		
8	20110819_DOE_spl_8		8	2500	2125	0	250	125	0	0	5000		
9	20110819_DOE_spl_9		8	2500	2250	250	0	0	0	0	5000		
10	20110819_DOE_spl_10		8	2500	2125	250	0	125	0	0	5000		
11	20110819_DOE_spl_11		8	2500	1790	0	250	125	313	22	5000		
12	20110819_DOE_spl_12		7	2500	1937	250	0	0	313	0	5000		
13	20110819_DOE_spl_13		8	2500	2228	0	250	0	0	22	5000		
14	20110819_DOE_spl_14		7	2500	2228	250	0	0	0	22	5000		
15	20110819_DOE_spl_15		8	2500	1937	0	250	0	313	0	5000		
16	20110819_DOE_spl_16		8	2500	2103	250	0	125	0	22	5000		

Tabla 2 continuación

17	20110819_DOE_spl_17	7	2500	1812	0	250	125	313	0	5000
18	20110819_DOE_spl_18	7	2500	1790	0	250	125	313	22	5000
19	20110819_DOE_spl_19	8	2500	1915	250	0	0	313	22	5000
20	20110819_DOE_spl_20	8	2500	1915	0	250	0	313	22	5000
21	20110819_DOE_spl_21	8	2500	2103	0	250	125	0	22	5000
22	20110819_DOE_spl_22	8	2500	1937	250	0	0	313	0	5000
23	20110819_DOE_spl_23	7	2500	1915	0	250	0	313	22	5000
24	20110819_DOE_spl_24	7	2500	2103	250	0	125	0	22	5000
25	20110819_DOE_spl_25	7	2500	2125	0	250	125	0	0	5000
26	20110819_DOE_spl_26	7	2500	2250	0	250	0	0	0	5000
27	20110819_DOE_spl_27	8	2500	1812	250	0	125	313	0	5000
28	20110819_DOE_spl_28	8	2500	2228	250	0	0	0	22	5000
29	20110819_DOE_spl_29	8	2500	1790	250	0	125	313	22	5000
30	20110819_DOE_spl_30	7	2500	2250	250	0	0	0	0	5000
31	20110819_DOE_spl_31	7.5	2500	2250	125	125	0	0	0	5000
32	20110819_DOE_spl_32	8	2500	2250	0	250	0	0	0	5000
33	20110819_DOE_spl_33	7	2500	1790	250	0	125	313	22	5000
34	20110819_DOE_spl_34	7	2500	1915	250	0	0	313	22	5000
		suma:	85000	69014	4250	4250	2125	5015	346	170000

Tabla 3: Comparación de lixiviables del extracto de tapón y JEV09L37 SN. Todos los picos con un área de >0.1 mAU.min están incluidos en esta tabla.

Tiempo de retención	Concentrado de extracto de tapón	Concentrado de extracto de tapón 1:16 diluido en la formulación	FVL L37 SN	Concentración relativa en comparación con FVL
(min)	Área pico (mAU.min)			(%)
12,40	0,79	0,05	0,10	47
13,14	1,91	0,12	n.d.	pico adicional comparado con FVL
13,48	0,81	0,05	n.d.	pico adicional comparado con FVL
13,74	0,43	0,03	n.d.	pico adicional comparado con FVL
14,10	0,75	0,05	n.d.	pico adicional comparado con FVL
14,41	0,49	0,03	0,25	12
16,12	29,64	1,85	0,45	414
16,71	2,75	0,17	n.d.	pico adicional comparado con FVL
17,15	14,68	0,92	0,11	815
18,68	0,90	0,06	0,57	10
20,08	0,70	0,04	0,25	18
20,75	0,42	0,03	n.d.	pico adicional comparado con FVL
21,27	0,54	0,03	n.d.	pico adicional comparado con FVL
22,13	2,84	0,18	0,15	122
22,74	0,55	0,03	0,17	20
23,74	1,74	0,11	0,27	41
24,88	0,98	0,06	0,12	51
27,63	0,84	0,05	0,16	32
29,46	0,72	0,04	n.d.	pico adicional comparado con FVL
31,40	0,39	0,02	n.d.	pico adicional comparado con FVL
35,23	4,70	0,29	0,41	72
SUMA	67,59	4,2	3,0	140

Tabla 4: Resultados de DOE obtenidos después de 4 y 8 semanas a 22 °C. Se desorbió antígeno de alumbre y se analizó por ELISA (monoclonal y policlonal). * (aumento de x veces en comparación con FVL)

Muestra	pH	Alumbre 4230 (%)	Frag. de PS añadidos (µg/ml)	Lixiviables añadidos*	Formalina añadida (ppm)	4 semanas a 22 °C			8 semanas a 22 °C		
						ELISA Mono. (AU/ml)	ELISA Poli (AU/ml)	Relación	ELISA Mono. (AU/ml)	ELISA Poli (AU/ml)	Relación
1	7	100	50	1,4	0	9,725	12,814	0,76	6,342	3,649	0,575
2	7	0	0	1,4	0	15,254	16,331	0,93	9,865	8,039	0,815
3	7	0	0	0	40	12,457	12,614	0,99	9,037	8,176	0,905
4	8	0	50	1,4	0	13,513	12,971	1,04	10,328	9,533	0,923
5	7.5	50	50	0	0	13,592	14,924	0,91	10,358	8,032	0,775
6	7	0	50	0	40	12,942	13,878	0,93	10,008	9,896	0,989
7	7	100	50	0	0	9,649	12,608	0,77	6,089	4,092	0,672
8	8	0	50	0	0	11,184	11,902	0,94	9,113	9,048	0,993
9	8	100	0	0	0	11,436	12,883	0,89	8,858	7,409	0,836
10	8	100	50	0	0	13,361	15,516	0,86	10,525	8,158	0,775
11	8	0	50	1,4	40	13,209	13,608	0,97	9,349	9,201	0,984
12	7	100	0	1,4	0	8,4	11,913	0,71	5,001	2,951	0,590
13	8	0	0	0	40	10,294	10,483	0,98	8,019	8,284	1,033
14	7	100	0	0	40	9,972	12,015	0,83	7,435	5,802	0,780
15	8	0	0	1,4	0	14,096	15,618	0,9	10,192	9,531	0,935

Tabla 4 continuación

16	8	100	50	0	40	9,78	13,514	0,72	11,011	8,947	0,813
17	7	0	50	1,4	0	11,213	14,285	0,78	10,246	8,377	0,818
18	7	0	50	1,4	40	11,183	11,499	0,97	10,539	9,217	0,875
19	8	100	0	1,4	40	10,536	10,935	0,96	10,151	8,341	0,822
20	8	0	0	1,4	40	10,026	9,654	1,04	11,306	9,281	0,821
21	8	0	50	0	40	10,149	9,986	1,02	11,213	9,205	0,821
22	8	100	0	1,4	0	10,051	12,193	0,82	10,918	6,841	0,627
23	7	0	0	1,4	40	10,024	10,74	0,93	10,711	7,963	0,743
24	7	100	50	0	40	9,535	10,254	0,93	10,642	6,991	0,657
25	7	0	50	0	0	11,143	11,765	0,95	13,054	8,684	0,665
26	7	0	0	0	0	11,431	11,796	0,97	13,753	10,391	0,756
27	8	100	50	1,4	0	10,09	11,953	0,84	11,506	7,334	0,637
28	8	100	0	0	40	10,137	11,223	0,9	11	8,131	0,739
29	8	100	50	1,4	40	9,605	10,535	0,91	10,848	7,939	0,732
30	7	100	0	0	0	6,485	8,379	0,77	7,957	3,523	0,443
31	7,5	50	0	0	0	11,081	12,229	0,91	12,377	9,535	0,770
32	8	0	0	0	0	11,421	12,002	0,95	11,36	9,859	0,868
33	7	100	50	1,4	40	9,03	10,583	0,85	9,753	6,571	0,674
34	7	100	0	1,4	40	9,05	10,927	0,83	11,715	6,872	0,587

Tabla 5: Análisis de varianza para la relación ELISA monoclonal/policlonal después del almacenamiento 4 semanas a 22 °C

Análisis de varianza para la relación 4 semanas					
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	Relación F	Valor de p
A:pH	0,02205	1	0,02205	5,48	0,0326
B:Alumbre	0,117612	1	0,117612	29,20	0,0001
C:Fragmentos de PS	0,0008	1	0,0008	0,20	0,6618
D:Extraíbles	0,0008	1	0,0008	0,20	0,6618
E:Formalina	0,0242	1	0,0242	6,01	0,0261
AB	0,0001125	1	0,0001125	0,03	0,8694
AC	0,00045	1	0,00045	0,11	0,7425
AD	0,01125	1	0,01125	2,79	0,1141
AE	0,00405	1	0,00405	1,01	0,3309
BC	0,0000125	1	0,0000125	0,00	0,9563
BD	0,0010125	1	0,0010125	0,25	0,6229
BE	0,0006125	1	0,0006125	0,15	0,7017
CD	0,0008	1	0,0008	0,20	0,6618
CE	0,0008	1	0,0008	0,20	0,6618
DE	0,0072	1	0,0072	1,79	0,1999
Error total	0,0644375	16	0,00402734		
Total (corr.)	0,2562	31			

R al cuadrado = 74,8488 por ciento
R al cuadrado (ajustado para d.f.) = 51,2695 por ciento
Error estándar de Est. = 0,0634614
Error absoluto medio = 0,0352734
Estadístico de Durbin-Watson = 1,47556

5

Tabla 6: Análisis de varianza para la relación ELISA monoclonal/policlonal después del almacenamiento a 22 °C durante 8 semanas.

Análisis de varianza para la Relación 8 semanas					
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	Relación F	Valor de p
A:pH	0,102378	1	0,102378	11,19	0,0041
B:Alumbre	0,275653	1	0,275653	30,13	0,0000
C:Fragmentos de PS	0,00300312	1	0,00300312	0,33	0,5747
D:Extraíbles	0,0108781	1	0,0108781	1,19	0,2917
E:Formalina	0,0318781	1	0,0318781	3,48	0,0804
AB	0,00137813	1	0,00137813	0,15	0,7031
AC	0,00382812	1	0,00382812	0,42	0,5269
AD	0,00137813	1	0,00137813	0,15	0,7031
AE	0,0166531	1	0,0166531	1,82	0,1961
BC	0,000253125	1	0,000253125	0,03	0,8700
BD	0,00382813	1	0,00382813	0,42	0,5269
BE	0,00195313	1	0,00195313	0,21	0,6503
CD	0,00195313	1	0,00195313	0,21	0,6503
CE	0,000153125	1	0,000153125	0,02	0,8987
DE	0,00525313	1	0,00525313	0,57	0,4596
Error total	0,1464	16	0,00915		
Total (corr.)	0,606822	31			

R al cuadrado = 75,8743 por ciento
R al cuadrado (ajustado para d.f.) = 53,2565 por ciento
Error estándar de Est. = 0,0956556
Error absoluto medio = 0,0571484
Estadístico de Durbin-Watson = 0,88586

Tabla 7: Análisis de regresión para la "Relación 8 semanas" incluyendo pH, alumbre y formaldehído.

Coeficientes de regresión para la relación de 8 semanas	
constante	= 0,0228125
A:pH	= 0,113125

ES 2 647 882 T3

B:Alumbre = -0,00185625
 E:Formalina = 0,0315625

Tabla 8: Estimación de resultados de la "Relación 8 semanas" generados usando el modelo ajustado.
 Resultados de estimación para la relación de 8 semanas

Fila	Valor observado	Valor ajustado	CL al 95,0 % inferior para la media	CL al 95,0 % superior para la media
1	0,58	0,5975	0,536766	0,658234
2	0,81	0,783125	0,722391	0,843859
3	0,9	0,84625	0,785516	0,906984
4	0,92	0,89625	0,835516	0,956984
6	0,99	0,84625	0,785516	0,906984
7	0,67	0,5975	0,536766	0,658234
8	0,99	0,89625	0,835516	0,956984
9	0,84	0,710625	0,649891	0,771359
10	0,78	0,710625	0,649891	0,771359
11	0,98	0,959375	0,898641	1,02011
12	0,59	0,5975	0,536766	0,658234
13	1,03	0,959375	0,898641	1,02011
14	0,78	0,660625	0,599891	0,721359
15	0,94	0,89625	0,835516	0,956984
16	0,81	0,77375	0,713016	0,834484
17	0,82	0,783125	0,722391	0,843859
18	0,88	0,84625	0,785516	0,906984
19	0,82	0,77375	0,713016	0,834484
20	0,82	0,959375	0,898641	1,02011
21	0,82	0,959375	0,898641	1,02011
22	0,63	0,710625	0,649891	0,771359
23	0,74	0,84625	0,785516	0,906984
24	0,66	0,660625	0,599891	0,721359
25	0,67	0,783125	0,722391	0,843859
26	0,76	0,783125	0,722391	0,843859
27	0,64	0,710625	0,649891	0,771359
28	0,74	0,77375	0,713016	0,834484
29	0,73	0,77375	0,713016	0,834484
30	0,44	0,5975	0,536766	0,658234
32	0,87	0,89625	0,835516	0,956984
33	0,67	0,660625	0,599891	0,721359
34	0,59	0,660625	0,599891	0,721359

Tabla 9: Plan para el experimento 20110913(NIV)

Plan de pipeteo		Sol. madre [mM]			
Volumen total:	2000 µl	Ni(II)SO4	1		
Material NIV:	11A74	Cu(II)Cl2	1		
		Cr(III)Cl	1		
Muestra		µg/l		Cr(III)	PS fragmentado
N.º	Nombre	Ni(II)SO4	Cu(II)Cl2		
1	NIV_unspiked_pH7_22°C				
2	NIV_Ni(II)_100_pH7_22°C	100			
3	NIV_Ni(II)_500_pH7_22°C	500			
4	NIV_Ni(II)_1000_pH7_22°C	1000			
5	NIV_Cu(II)_100_pH7_22°C		100		
6	NIV_Cu(II)_500_pH7_22°C		500		
7	NIV_Cu(II)_1000_pH7_22°C		1000		
8	NIV_CR(III)_100_pH7_22°C			100	
9	NIV_CR(III)_500_pH7_22°C			500	
10	NIV_CR(III)_1000_pH7_22°C			1000	
11	NIV_PS_spike_pH7_22°C				50
12	NIV_Ni(II)_100_PSSpike_pH7_22°C	100			50
13	NIV_Ni(II)_500_PSSpike_pH7_22°C	500			50
14	NIV_Ni(II)_1000_PSSpike_pH7_22°C	1000			50
15	NIV_Cu(II)_100_PSSpike_pH7_22°C		100		50

Tabla 9 continuación

16	NIV_Cu(II)_500_PSSpike_pH7_22°C	7		500		50
17	NIV_Cu(II)_1000_PSSpike_pH7_22°C	7		1000		50
18	NIV_CR(III)_100_PSSpike_pH7_22°C	7			100	50
19	NIV_CR(III)_500_PSSpike_pH7_22°C	7			500	50
20	NIV_CR(III)_1000_PSSpike_pH7_22°C	7			1000	50
21	NIV_unspiked_pH8_22°C	8				
22	NIV_Ni(II)_100_pH8_22°C	8	100			
23	NIV_Ni(II)_500_pH8_22°C	8	500			
24	NIV_Ni(II)_1000_pH8_22°C	8	1000			
25	NIV_Cu(II)_100_pH8_22°C	8		100		
26	NIV_Cu(II)_500_pH8_22°C	8		500		
27	NIV_Cu(II)_1000_pH8_22°C	8		1000		
28	NIV_CR(III)_100_pH8_22°C	8			100	
29	NIV_CR(III)_500_pH8_22°C	8			500	
30	NIV_CR(III)_1000_pH8_22°C	8			1000	
31	NIV_PS_spike_pH8_22°C	8				50
32	NIV_Ni(II)_100_PSSpike_pH8_22°C	8	100			50
33	NIV_Ni(II)_500_PSSpike_pH8_22°C	8	500			50
34	NIV_Ni(II)_1000_PSSpike_pH8_22°C	8	1000			50
35	NIV_Cu(II)_100_PSSpike_pH8_22°C	8		100		50
36	NIV_Cu(II)_500_PSSpike_pH8_22°C	8		500		50
37	NIV_Cu(II)_1000_PSSpike_pH8_22°C	8		1000		50
38	NIV_CR(III)_100_PSSpike_pH8_22°C	8			100	50
39	NIV_CR(III)_500_PSSpike_pH8_22°C	8			500	50
40	NIV_CR(III)_1000_PSSpike_pH8_22°C	8			1000	50

Tabla 9 continuación

		PM [gr/Mol]		otros aditivos:															
Ni		58,7		Sol. madre															
Cu		63,6		frag PS	2 mg/ml														
Cr		52,0																	
Muestra																			
N.º	Nombre	pH	NIV	PBS	Ni(II)SO4	Cu(II)Cl2	Cr(III)	PS fragmentado	Total										
1	NIV_unspiked_pH7_22°C	7	1800	200	0	0	0	0	2000										
2	NIV_Ni(II)_100_pH7_22°C	7	1800	197	3	0	0	0	2000										
3	NIV_Ni(II)_500_pH7_22°C	7	1800	183	17	0	0	0	2000										
4	NIV_Ni(II)_1000_pH7_22°C	7	1800	166	34	0	0	0	2000										
5	NIV_Cu(II)_100_pH7_22°C	7	1800	197	0	3	0	0	2000										
6	NIV_Cu(II)_500_pH7_22°C	7	1800	184	0	16	0	0	2000										
7	NIV_Cu(II)_1000_pH7_22°C	7	1800	169	0	31	0	0	2000										
8	NIV_CR(III)_100_pH7_22°C	7	1800	196	0	0	4	0	2000										
9	NIV_CR(III)_500_pH7_22°C	7	1800	181	0	0	19	0	2000										
10	NIV_CR(III)_1000_pH7_22°C	7	1800	162	0	0	38	0	2000										
11	NIV_PS_spike_pH7_22°C	7	1800	150	0	0	0	50	2000										
12	NIV_Ni(II)_100_PSSpike_pH7_22°C	7	1800	147	3	0	0	50	2000										
13	NIV_Ni(II)_500_PSSpike_pH7_22°C	7	1800	133	17	0	0	50	2000										
14	NIV_Ni(II)_1000_PSSpike_pH7_22°C	7	1800	116	34	0	0	50	2000										
15	NIV_Cu(II)_100_PSSpike_pH7_22°C	7	1800	147	0	3	0	50	2000										

Tabla 9 continuación

16	NIV_Cu(II)_500_PSpIke_pH7_22°C	7	1800	134	0	16	0	50	2000
17	NIV_Cu(II)_100_PSpIke_pH7_22°C	7	1800	119	0	31	0	50	2000
18	NIV_CR(III)_100_PSpIke_pH7_22°C	7	1800	146	0	0	4	50	2000
19	NIV_CR(III)_500_PSpIke_pH7_22°C	7	1800	131	0	0	19	50	2000
20	NIV_CR(III)_1000_PSpIke_pH7_22°C	7	1800	112	0	0	38	50	2000
21	NIV_unspiked_pH8_22°C	8	1800	200	0	0	0	0	2000
22	NIV_Ni(II)_100_pH8_22°C	8	1800	197	3	0	0	0	2000
23	NIV_Ni(II)_500_pH8_22°C	8	1800	183	17	0	0	0	2000
24	NIV_Ni(II)_1000_pH8_22°C	8	1800	166	34	0	0	0	2000
25	NIV_Cu(II)_100_pH8_22°C	8	1800	197	0	3	0	0	2000
26	NIV_Cu(II)_500_pH8_22°C	8	1800	184	0	16	0	0	2000
27	NIV_Cu(II)_1000_pH8_22°C	8	1800	169	0	31	0	0	2000
28	NIV_CR(III)_100_pH8_22°C	8	1800	196	0	0	4	0	2000
29	NIV_CR(III)_500_pH8_22°C	8	1800	181	0	0	19	0	2000
30	NIV_CR(III)_1000_pH8_22°C	8	1800	162	0	0	38	0	2000
31	NIV_PS_spike_pH8_22°C	8	1800	150	0	0	0	50	2000
32	NIV_Ni(II)_100_PSpIke_pH8_22°C	8	1800	147	3	0	0	50	2000
33	NIV_Ni(II)_500_PSpIke_pH8_22°C	8	1800	133	17	0	0	50	2000
34	NIV_Ni(II)_1000_PSpIke_pH8_22°C	8	1800	116	34	0	0	50	2000
35	NIV_Cu(II)_100_PSpIke_pH8_22°C	8	1800	147	0	3	0	50	2000
36	NIV_Cu(II)_500_PSpIke_pH8_22°C	8	1800	134	0	16	0	50	2000
37	NIV_Cu(II)_1000_PSpIke_pH8_22°C	8	1800	119	0	31	0	50	2000
38	NIV_CR(III)_100_PSpIke_pH8_22°C	8	1800	146	0	0	4	50	2000
39	NIV_CR(III)_500_PSpIke_pH8_22°C	8	1800	131	0	0	19	50	2000
40	NIV_CR(III)_1000_PSpIke_pH8_22°C	8	1800	112	0	0	38	50	2000

Tabla 10: Plan para el experimento 20110913(DP)

Plan de pipeteo		Sol. madre [mM]	
Volumen total:	10000 µl	Ni(II)SO4	1
DP:	11D87 a granel	Cu(II)Cl2	1
		Cr(III)Cl3	1

Muestra		µg/l			
N.º	Nombre	Ni(II)SO4	Cu(II)Cl2	Cr(III)	PS fragmentado
1	DP_unspiked_pH7				
2	DP_Ni(II)_100_pH7	100			
3	DP_Ni(II)_500_pH7	500			
4	DP_Ni(II)_1000_pH7	1000			
5	DP_Cu(II)_100_pH7		100		
6	DP_Cu(II)_500_pH7		500		
7	DP_Cu(II)_1000_pH7		1000		
8	DP_Cr(III)_100_pH7			100	
9	DP_Cr(III)_500_pH7			500	
10	DP_Cr(III)_1000_pH7			1000	
11	DP_unspiked_pH8				
12	DP_Ni(II)_100_pH8	100			
13	DP_Ni(II)_500_pH8	500			
14	DP_Ni(II)_1000_pH8	1000			
15	DP_Cu(II)_100_pH8		100		
16	DP_Cu(II)_500_pH8		500		
17	DP_Cu(II)_1000_pH8		1000		
18	DP_Cr(III)_100_pH8			100	
19	DP_Cr(III)_500_pH8			500	
20	DP_Cr(III)_1000_pH8			1000	

Tabla 10 continuación

PM [g/Mol]			otros aditivos:			Volumen [µl]						
Ni	Cu	Cr	Sol. madre	PS frag	2 mg/ml	Tampón	Ni(II)SO4	Cu(II)Cl2	Cr(III)	PS fragmentado	Total	
58,7	63,6	52,0										
Muestra												
N.º	Nombre	pH	DP	Tampón	Ni(II)SO4	Cu(II)Cl2	Cr(III)	PS fragmentado	Total			
1	DP_unspiked_pH7	7	9500	500	0	0	0	0	10000			
2	DP_Ni(II)_100_pH7	7	9500	483	17	0	0	0	10000			
3	DP_Ni(II)_500_pH7	7	9500	415	85	0	0	0	10000			
4	DP_Ni(II)_1000_pH7	7	9500	330	170	0	0	0	10000			
5	DP_Cu(II)_100_pH7	7	9500	484	0	16	0	0	10000			
6	DP_Cu(II)_500_pH7	7	9500	421	0	79	0	0	10000			
7	DP_Cu(II)_1000_pH7	7	9500	343	0	157	0	0	10000			
8	DP_Cr(III)_100_pH7	7	9500	481	0	0	19	0	10000			
9	DP_Cr(III)_500_pH7	7	9500	404	0	0	96	0	10000			
10	DP_Cr(III)_1000_pH7	7	9500	308	0	0	192	0	10000			
11	DP_unspiked_pH8	8	9500	500	0	0	0	0	10000			
12	DP_Ni(II)_100_pH8	8	9500	483	17	0	0	0	10000			
13	DP_Ni(II)_500_pH8	8	9500	415	85	0	0	0	10000			
14	DP_Ni(II)_1000_pH8	8	9500	330	170	0	0	0	10000			
15	DP_Cu(II)_100_pH8	8	9500	484	0	16	0	0	10000			
16	DP_Cu(II)_500_pH8	8	9500	421	0	79	0	0	10000			
17	DP_Cu(II)_1000_pH8	8	9500	343	0	157	0	0	10000			
18	DP_Cr(III)_100_pH8	8	9500	481	0	0	19	0	10000			
19	DP_Cr(III)_500_pH8	8	9500	404	0	0	96	0	10000			
20	DP_Cr(III)_1000_pH8	8	9500	308	0	0	192	0	10000			

Tabla 11: Plan para el experimento 20110812-DP enriquecido con ión metálico

Plan de pipeteo		Sol. madre [mM]		PM [g/Mol]		FVL ng/ml		µM	
Volumen total: 30000 µl		Fe(II)Cl3		55,9		282		5,049	
DP: 11D87 a granel		Fe(III)Cl3		55,9		282		5,045	
		Ni(II)SO4		58,7		41		0,688	
		Co(II)Cl2		58,9		0,33		0,006	
		Cu(II)Cl2		63,6		3		0,047	
		Zn(II)SO4		65,4					
		Cr(III)Cl3		52,0					

Muestra		µg/l									
N.º	Nombre	pH	DP dil	Fe(II)Cl3	Fe(III)Cl3	Ni(II)SO4	Co(II)Cl2	Cu(II)Cl2	Zn(II)SO4		
1	DP_Fe(II)_pH7	7	1	500							
2	DP_Fe(III)_pH7	7	1		500						
3	DP_Ni(II)_pH7	7	1			500					
4	DP_Co(II)_pH7	7	1				500				
5	DP_Cu(II)_pH7	7	1					500			
6	DP_Zn_pH7	7	1						500		
7	DP_metalmix_pH7	7	1	500	500	500	500	500	500		
8	DP_unspiked_pH7	7	1								
9	DP_Fe(II)_pH7.4	7,4	1	500							
10	DP_Fe(III)_pH7.4	7,4	1		500						
11	DP_Ni(II)_pH7.4	7,4	1			500					
12	DP_Co(II)_pH7.4	7,4	1				500				
13	DP_Cu(II)_pH7.4	7,4	1					500			
14	DP_Zn_pH7.4	7,4	1						500		
15	DP_metalmix_pH7.4	7,4	1	500	500	500	500	500	500		
16	DP_unspiked_pH7.4	7,4	1								
17	DP_Fe(II)_pH7.8	7,8	1	500							
18	DP_Fe(III)_pH7.8	7,8	1		500						
19	DP_Ni(II)_pH7.8	7,8	1			500					
20	DP_Co(II)_pH7.8	7,8	1				500				
21	DP_Cu(II)_pH7.8	7,8	1					500			
22	DP_Zn_pH7.8	7,8	1						500		
23	DP_metalmix_pH7.8	7,8	1	500	500	500	500	500	500		
24	DP_unspiked_pH7.8	7,8	1								

Tabla 11 continuación

Muestra				µg/l			
N.º	Nombre	pH	DP dil	Cr(III)			
25	DP_CR(III)_pH7	7	1	500			
26	DP_CR(III)_pH7.4	7.4	1	500			
27	DP_CR(III)_pH7.8	7.8	1	500			

Muestra				Volumen [µl]							
N.º	Nombre	pH	NIV dil	Tampón	Fe(II)Cl3	Fe(III)Cl3	Ni(II)SO4	Co(II)Cl2	Cu(II)Cl2	Zn(II)SO4	Total
1	DP_Fe(II)_pH7	7	27750	1981	269	0	0	0	0	0	30000
2	DP_Fe(II)_pH7	7	27750	1982	0	268	0	0	0	0	30000
3	DP_Ni(II)_pH7	7	27750	1981	0	0	269	0	0	0	30000
4	DP_Co(II)_pH7	7	27750	1994	0	0	0	256	0	0	30000
5	DP_Cu(II)_pH7	7	27750	1995	0	0	0	0	255	0	30000
6	DP_Zn_pH7	7	27750	2014	0	0	0	0	0	236	30000
7	DP_metalmix_pH7	7	27750	698	269	268	269	256	255	236	30000
8	DP_unspiked_pH7	7	27750	2250	0	0	0	0	0	0	30000
9	DP_Fe(II)_pH7.4	7.4	27750	1981	269	0	0	0	0	0	30000
10	DP_Fe(III)_pH7.4	7.4	27750	1982	0	268	0	0	0	0	30000
11	DP_Ni(II)_pH7.4	7.4	27750	1981	0	0	269	0	0	0	30000
12	DP_Co(II)_pH7.4	7.4	27750	1994	0	0	0	256	0	0	30000
13	DP_Cu(II)_pH7.4	7.4	27750	1995	0	0	0	0	255	0	30000
14	DP_Zn_pH7.4	7.4	27750	2014	0	0	0	0	0	236	30000
15	DP_metalmix_pH7.4	7.4	27750	698	269	268	269	256	255	236	30000
16	DP_unspiked_pH7.4	7.4	27750	2250	0	0	0	0	0	0	30000
17	DP_Fe(II)_pH7.8	7.8	27750	1981	269	0	0	0	0	0	30000
18	DP_Fe(III)_pH7.8	7.8	27750	1982	0	268	0	0	0	0	30000
19	DP_Ni(II)_pH7.8	7.8	27750	1981	0	0	269	0	0	0	30000
20	DP_Co(II)_pH7.8	7.8	27750	1994	0	0	0	256	0	0	30000
21	DP_Cu(II)_pH7.8	7.8	27750	1995	0	0	0	0	255	0	30000
22	DP_Zn_pH7.8	7.8	27750	2014	0	0	0	0	0	236	30000
23	DP_metalmix_pH7.8	7.8	27750	698	269	268	269	256	255	236	30000
24	DP_unspiked_pH7.8	7.8	27750	2250	0	0	0	0	0	0	30000

Tabla 11 continuación

Muestra		Volumen [μ l]				
N ^o	Nombre	pH	Cr(III)C13			
8	DP_Cr(III)_pH7	7	48			
16	DP_Cr(III)_pH7.4	7.4	48			
24	DP_Cr(III)_pH7.8	7.8	48			

Tabla 12: Recuperación de antígeno determinada por SEC-HPLC del exp. 20110913(NIV). Para pH 7 y pH 8, las recuperaciones se basan en las muestras de control de NIV no enriquecidas n.º 1 y n.º 21, respectivamente. Las muestras se almacenaron a 22 °C durante 3 semanas. Las muestras marcadas con "n.a." no se analizaron debido a la priorización de muestras.

Muestra		Resultados	
		mAU*s de área	Recuperación (%)
1	NIV_unspiked_pH7_22°C	4,054	100,0
2	NIV_Ni(II)_100_pH7_22°C	3,972	98,0
3	NIV_Ni(II)_500_pH7_22°C	4,454	109,9
4	NIV_Ni(II)_1000_pH7_22°C	4,185	103,2
5	NIV_Cu(II)_100_pH7_22°C	3,913	96,5
6	NIV_Cu(II)_500_pH7_22°C	3,733	92,1
7	NIV_Cu(II)_1000_pH7_22°C	3,115	76,8
8	NIV_CR(III)_100_pH7_22°C	3,957	97,6
9	NIV_CR(III)_500_pH7_22°C	4,000	98,7
10	NIV_CR(III)_1000_pH7_22°C	3,611	89,1
11	NIV_PS spike_pH7_22°C	4,068	100,3
12	NIV_Ni(II)_100_PSspike_pH7_22°C	3,884	95,8
13	NIV_Ni(II)_500_PSspike_pH7_22°C	3,688	91,0
14	NIV_Ni(II)_1000_PSspike_pH7_22°C	3,971	98,0
15	NIV_Cu(II)_100_PSspike_pH7_22°C	3,568	88,0
16	NIV_Cu(II)_500_PSspike_pH7_22°C	3,325	82,0
17	NIV_Cu(II)_1000_PSspike_pH7_22°C	3,486	86,0
18	NIV_CR(III)_100_PSspike_pH7_22°C	3,747	92,4
19	NIV_CR(III)_500_PSspike_pH7_22°C	3,904	96,3
20	NIV_CR(III)_1000_PSspike_pH7_22°C	3,685	90,9
21	NIV_unspiked_pH8_22°C	4,213	100,0
22	NIV_Ni(II)_100_pH8_22°C	4,181	99,2
23	NIV_Ni(II)_500_pH8_22°C	4,150	98,5
24	NIV_Ni(II)_1000_pH8_22°C	3,772	89,5
25	NIV_Cu(II)_100_pH8_22°C	4,146	98,4
26	NIV_Cu(II)_500_pH8_22°C	4,212	100,0
27	NIV_Cu(II)_1000_pH8_22°C	4,152	98,6
28	NIV_CR(III)_100_pH8_22°C	4,213	100,0
29	NIV_CR(III)_500_pH8_22°C	3,997	94,9

30	NIV_CR(III)_1000_pH8_22°C	4,231	100,4
31	NIV_PS spike_pH8_22°C	4,150	98,5
32	NIV_Ni(II)_100_PSspike_pH8_22°C	3,623	86,0
33	NIV_Ni(II)_500_PSspike_pH8_22°C	3,725	88,4
34	NIV_Ni(II)_1000_PSspike_pH8_22°C	4,079	96,8
35	NIV_Cu(II)_100_PSspike_pH8_22°C	3,473	82,4
36	NIV_Cu(II)_500_PSspike_pH8_22°C	3,180	75,5
37	NIV_Cu(II)_1000_PSspike_pH8_22°C	4,056	96,3
38	NIV_CR(III)_100_PSspike_pH8_22°C	3,042	72,2
39	NIV_CR(III)_500_PSspike_pH8_22°C	4,113	97,6
40	NIV_CR(III)_1000_PSspike_pH8_22°C	n.a.	n.a.

Tabla 13: Resultados de ELISA del exp. 20110913(NIV) obtenidos después de 3 semanas a pH 8 (muestra 21-40) y 7 semanas a pH 7 (muestra 1-20) a 22 °C. Las muestras marcadas con "n.a." no se analizaron debido a la priorización de muestras.

20110913_metal spiked_NIV_22°C 7 semanas a pH 7				
N.º	Nombre	poli	mono	relación
1	NIV_unspiked_pH7_22°C CONTROL	20,699	17,512	0,846
2	NIV_Ni(II)_100_pH7_22°C	17,243	14,787	0,858
3	NIV_Ni(II)_500_pH7_22°C	18,877	16,215	0,859
4	NIV_Ni(II)_1000_pH7_22°C	16,9	14,522	0,859
5	NIV_Cu(II)_100_pH7_22°C	16,718	13,278	0,794
6	NIV_Cu(II)_500_pH7_22°C	14,664	5,459	0,372
7	NIV_Cu(II)_1000_pH7_22°C	7,112	0,421	0,059
8	NIV_CR(III)_100_pH7_22°C	19,207	16,602	0,864
9	NIV_CR(III)_500_pH7_22°C	20,313	17,84	0,878
10	NIV_CR(III)_1000_pH7_22°C	16,762	13,128	0,783
11	NIV_PS spike_pH7_22°C CONTROL	19,907	16,994	0,854
12	NIV_Ni(II)_100_PSspike_pH7_22°C	19,546	16,534	0,846
13	NIV_Ni(II)_500_PSspike_pH7_22°C	18,337	15,2	0,829
14	NIV_Ni(II)_1000_PSspike_pH7_22°C	20,759	16,934	0,816
15	NIV_Cu(II)_100_PSspike_pH7_22°C	18,249	13,348	0,731
16	NIV_Cu(II)_500_PSspike_pH7_22°C	19,201	7,733	0,403
17	NIV_Cu(II)_1000_PSspike_pH7_22°C	8,515	0,711	0,083
18	NIV_CR(III)_100_PSspike_pH7_22°C	18,377	16,521	0,899
19	NIV_CR(III)_500_PSspike_pH7_22°C	19,678	17,119	0,870
20	NIV_CR(III)_1000_PSspike_pH7_22°C	20,505	18,219	0,889

20110913_metal spiked_NIV_22°C 3semanas a pH 8							
N.º		1 ^{er} Análisis			2 ^o Análisis		
		poli	mono	relación	poli	mono	relación
21	NIV_unspiked_pH8_22°C CONTROL	22,729	20,679	0,910	24,687	24,806	1,005
22	NIV_Ni(II)_100_pH8_22°C	23,732	23,572	0,993	24,179	22,148	0,916
23	NIV_Ni(II)_500_pH8_22°C	20,086	19,793	0,985	22,411	22,207	0,991
24	NIV_Ni(II)_1000_pH8_22°C	16,553	15,402	0,930	23,841	21,645	0,908
25	NIV_Cu(II)_100_pH8_22°C	18,736	18,175	0,970	28,024	24,714	0,882
26	NIV_Cu(II)_500_pH8_22°C	21,173	19,109	0,903	25,774	23,983	0,931
27	NIV_Cu(II)_1000_pH8_22°C	19,709	16,406	0,832	24,799	21,580	0,870
28	NIV_CR(III)_100_pH8_22°C	22,464	20,687	0,921	22,782	21,156	0,929
29	NIV_CR(III)_500_pH8_22°C	20,527	20,247	0,986	23,040	21,649	0,940
30	NIV_CR(III)_1000_pH8_22°C	20,838	19,094	0,916	25,676	24,047	0,937
31	NIV_PS_spike_pH8_22°C CONTROL	19,051	20,112	1,056	25,413	25,991	1,023
32	NIV_Ni(II)_100_PSspike_pH8_22°C	18,729	19,250	1,028	n.a.	n.a.	n.a.
33	NIV_Ni(II)_500_PSspike_pH8_22°C	20,923	20,516	0,981	n.a.	n.a.	n.a.
34	NIV_Ni(II)_1000_PSspike_pH8_22°C	21,734	19,794	0,911	25,164	24,899	0,989
35	NIV_Cu(II)_100_PSspike_pH8_22°C	21,526	19,852	0,922	n.a.	n.a.	n.a.
36	NIV_Cu(II)_500_PSspike_pH8_22°C	21,914	19,449	0,888	n.a.	n.a.	n.a.
37	NIV_Cu(II)_1000_PSspike_pH8_22°C	18,646	16,259	0,872	25,371	24,275	0,957
38	NIV_CR(III)_100_PSspike_pH8_22°C	20,292	18,667	0,920	n.a.	n.a.	n.a.
39	NIV_CR(III)_500_PSspike_pH8_22°C	22,835	21,558	0,944	25,561	24,480	0,958
40	NIV_CR(III)_1000_PSspike_pH8_22°C	27,862	25,291	0,908	n.a.	n.a.	n.a.

Tabla 14: Recuperaciones de antígeno después de 5 semanas a 22 °C de JEV desorbido obtenido por SEC-HPLC. Las recuperaciones se basaron en muestras de control DP no enriquecidas almacenadas a pH 7 o pH 8

N.º	Muestra	Área de JEV	
		mAU.min	recuperación
1	DP_unspiked_pH7 22°C	3,710	100 %
2	DP_Ni(II)_100_pH7 22°C	3,656	99 %
3	DP_Ni(II)_500_pH7 22°C	3,705	100 %
4	DP_Ni(II)_1000_pH7 22°C	3,444	93 %
5	DP_Cu(II)_100_pH7 22°C	3,565	96 %
6	DP_Cu(II)_500_pH7 22°C	3,313	89 %
7	DP_Cu(II)_1000_pH7 22°C	3,367	91 %
8	DP_Cr(III)_100_pH7 22°C	3,562	96 %
9	DP_Cr(III)_500_pH7 22°C	3,422	92 %
10	DP_Cr(III)_1000_pH7 22°C	3,148	85 %
11	DP_unspiked_pH8 22°C	4,297	100 %
12	DP_Ni(II)_100_pH8 22°C	4,029	94 %
13	DP_Ni(II)_500_pH8 22°C	4,306	100 %
14	DP_Ni(II)_1000_pH8 22°C	4,065	95 %
15	DP_Cu(II)_100_pH8 22°C	3,751	87 %
16	DP_Cu(II)_500_pH8 22°C	3,698	86 %
17	DP_Cu(II)_1000_pH8 22°C	3,511	82 %
18	DP_Cr(III)_100_pH8 22°C	3,805	89 %
19	DP_Cr(III)_500_pH8 22°C	3,843	89 %
20	DP_Cr(III)_1000_pH8 22°C	4,212	98 %

5

Tabla 15: Resultados de ELISA de antígeno de JEV desorbido después de 5 semanas a 22 °C

N.º	Nombre	pH	Poli ELISA	Mono. ELISA	Relación	% de relación en comparación con control no enriquecido
1	DP_unspiked_pH7	7	14,203	13,13	0,924	100

N.º	Nombre	pH	Poli ELISA	Mono. ELISA	Relación	% de relación en comparación con control no enriquecido
2	DP Ni(II) 100 pH7	7	13,089	12,623	0,964	104
3	DP Ni(II) 500 pH7	7	12,640	12,572	0,995	108
4	DP Ni(II) 1000 pH7	7	15,051	11,757	0,781	84
5	DP Cu(II) 100 pH7	7	13,420	10,792	0,804	87
6	DP Cu(II) 500 pH7	7	13,247	10,079	0,761	82
7	DP Cu(II) 1000 pH7	7	12,981	9,654	0,744	80
8	DP Cr(III) 100 pH7	7	16,936	11,886	0,702	76
9	DP Cr(III) 500 pH7	7	13,991	11,219	0,802	87
10	DP Cr(III) 1000 pH7	7	13,061	10,438	0,799	86
11	DP unspiked pH8	8	12,647	11,287	0,892	100
12	DP Ni(II) 100 pH8	8	12,308	10,689	0,868	97
13	DP Ni(II) 500 pH8	8	14,300	12,623	0,883	99
14	DP Ni(II) 1000 pH8	8	12,082	10,930	0,905	101
15	DP Cu(II) 100 pH8	8	11,041	9,937	0,900	101
16	DP Cu(II) 500 pH8	8	9,869	9,176	0,930	104
17	DP Cu(II) 1000 pH8	8	9,379	8,802	0,938	105
18	DP Cr(III) 100 pH8	8	10,164	9,545	0,939	105
19	DP Cr(III) 500 pH8	8	11,241	10,057	0,895	100
20	DP Cr(III) 1000 pH8	8	12,400	11,183	0,902	101

Tabla 16: Resultados de ELISA del antígeno de JEV desorbido después de 4 semanas y 7 semanas almacenado a 22 °C. Las muestras marcadas con "n.a" no se analizaron debido a la priorización de la muestra

N.º	Nombre	pH	4 semanas a 22 °C			7 semanas a 22 °C		
			poli	mono	relación	poli	mono	relación m/p
1	DP Fe(II) pH7	7	14,285	11,213	0,785	14,181	11,378	0,802
2	DP Fe(III) pH7	7	14,879	11,552	0,776	14,323	11,765	0,821
3	DP Ni(II) pH7	7	16,572	11,862	0,716	14,231	11,666	0,820
4	DP Co(II) pH7	7	12,81	12,629	0,986	14,246	11,244	0,789
5	DP Cu(II) pH7	7	12,474	9,747	0,781	11,464	7,654	0,668
6	DP Zn(II) pH7	7	13,131	11,186	0,852	15,122	11,514	0,761
25	DP Cr(III) pH7	7	12,144	11,598	0,955	13,543	10,73	0,792
7	DP metalmix pH7	7	11,078	8,366	0,755	8,617	5,392	0,626
8	DP unspiked pH7	7	16,159	13,224	0,818	14,158	11,559	0,816
9	DP Fe(II) pH7.4	7,4	15,096	12,649	0,838	14,417	11,239	0,780
10	DP Fe(III) pH7.4	7,4	13,509	12,029	0,890	16,948	12,344	0,728
11	DP Ni(II) pH7.4	7,4	13,036	11,306	0,867	13,293	12,571	0,946
12	DP Co(II) pH7.4	7,4	13,715	11,714	0,854	13,079	11,96	0,914
13	DP Cu(II) pH7.4	7,4	14,235	11,748	0,825	10,843	9,276	0,855
14	DP Zn(II) pH7.4	7,4	13,815	12,882	0,932	13,28	12,619	0,950
26	DP Cr(III) pH7.4	7,4	12,324	11,659	0,946	13,312	10,804	0,812
15	DP metalmix pH7.4	7,4	n.a.			9,74	6,551	0,673
16	DP unspiked pH7.4	7,4	13,951	13,225	0,948	11,97	12,672	1,059
17	DP Fe(II) pH7.8	7,8	14,356	13,102	0,913	12,625	13,304	1,054
18	DP Fe(III) pH7.8	7,8	13,554	12,388	0,914	13,003	10,811	0,831
19	DP Ni(II) pH7.8	7,8	13,949	12,496	0,896	13,106	11,757	0,897
20	DP Co(II) pH7.8	7,8	12,826	11,931	0,930	13,333	11,059	0,829
21	DP Cu(II) pH7.8	7,8	12,593	11,268	0,895	12,538	9,872	0,787
22	DP Zn(II) pH7.8	7,8	15,217	14,204	0,933	15,55	13,217	0,850
27	DP Cr(III) pH7.8	7,8	12,977	13,228	1,019	14,642	11,975	0,818
23	DP metalmix pH7.8	7,8	11,196	9,811	0,876	10,771	7,539	0,700
24	DP unspiked pH7.8	7,8	11,906	11,819	0,993	12,472	11,034	0,885

Tabla 17: ANOVA para muestras de estabilidad almacenadas a 22 °C durante 7 semanas.
Análisis de varianza para Relación - Sumas de cuadrados de tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	Relación F	Valor de p
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de metal	0,139643	8	0,0174554	3,00	0,0293
B:pH	0,0462028	2	0,0231014	3,97	0,0398
RESIDUAL	0,0931046	16	0,00581904		
TOTAL (CORREGIDO)	0,27895	26			

Todas las relaciones de F se basan en el error cuadrático medio residual.

Tabla 18: Prueba de rango múltiple para la relación por tipo de ión metálico. 1 = Fe(II); 2 = Fe(III); 3 = Ni(II); 4 = Co(II); 5 = Cu(II); 6 = Zn(II); 7 = Cr(III); 8 = Mezcla[1-6]; 9 = control no enriquecido
Pruebas de rango múltiple para la relación por tipo de ión metálico

Método: 95,0 por ciento de LSD			
Tipo de metal	Recuento	Media LS	Grupos homogéneos
8	3	0,666087	X
5	3	0,770168	XX
2	3	0,793725	XXX
7	3	0,807248	XX
4	3	0,844388	XX
6	3	0,853867	XX
1	3	0,878563	XX
3	3	0,887505	XX
9	3	0,919926	X

Contraste	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	0,084838	0,132037
1 - 3	-0,0089421	0,132037
1 - 4	0,0341754	0,132037
1 - 5	0,108395	0,132037
1 - 6	0,0246961	0,132037
1 - 7	0,0713155	0,132037
1 - 8	*0,212476	0,132037
1 - 9	-0,0413627	0,132037
2 - 3	-0,0937801	0,132037
2 - 4	-0,0506626	0,132037
2 - 5	0,0235569	0,132037
2 - 6	-0,0601419	0,132037
2 - 7	-0,0135225	0,132037
2 - 8	0,127638	0,132037
2 - 9	-0,126201	0,132037
3 - 4	0,0431175	0,132037
3 - 5	0,117337	0,132037
3 - 6	0,0336382	0,132037
3 - 7	0,0802576	0,132037
3 - 8	*0,221418	0,132037
3 - 9	-0,0324206	0,132037
4 - 5	0,0742195	0,132037
4 - 6	-0,00947935	0,132037
4 - 7	0,0371401	0,132037
4 - 8	*0,1783	0,132037
4 - 9	-0,0755381	0,132037
5 - 6	-0,0836988	0,132037
5 - 7	-0,0370794	0,132037
5 - 8	0,104081	0,132037
5 - 9	*-0,149758	0,132037
6 - 7	0,0466195	0,132037
6 - 8	*0,18778	0,132037

6 - 9	-0,0660588	0,132037
7 - 8	*0,14116	0,132037
7 - 9	-0,112678	0,132037
8 - 9	*-0,253838	0,132037

* representa una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 19: Resultados de ICP-MS de impurezas de iones metálicos residuales presentes en diversos lotes de alambre (2 %)

Lote de alambre (2 %)	Contenido de metal residual (ng/ml)					
	Cr	Fe	Ni	Cu	V	Co
4074	19,8	266	14,8	<25	<5	<5
4470	1637	1179	17,5	<25	<5	<5
4563	1874	2485	8,9	<25	<5	<5
4621	1333	1183	7,6	<25	<5	<5
3877	48,2	183	12,2	<25	<5	<5
4230 (no GI**, GI***)	1139	5640	816	64	12,6	7
Mezcla* 4074/4230	579,4	2953	415,4	<44,5	<6	<6

*Contenido calculado de metales residuales basados en el Lote de alambre 4230 y 4074
 **no GI: sin irradiación gamma
 ***GI: irradiación gamma

Tabla 20: Resumen del contenido de iones metálicos y análisis de muestras de DP formuladas con diversos lotes de alumbre. Las muestras se analizaron por duplicado mediante ELISA y se informa la relación de ELISA monoclonal/policonal. Las formulaciones se almacenaron a 22 °C durante 6 semanas.

N.º	Lote de alumbre (Solución madre al 2 %)	1º análisis monoclonal	2º análisis policonal	2º análisis monoclonal	2º análisis policonal	Relación 1º análisis	Relación 2º análisis	Relación media (Mono/polí)	Relación del rango*
1	4470	23,584	26,397	21,666	22,948	0,893	0,944	0,918	0,025
2	4563	23,027	23,397	19,051	18,862	0,984	1,010	0,997	0,013
3	4621	22,758	24,056	19,041	19,196	0,946	0,991	0,968	0,023
4	3877	23,5	23,85	21,186	21,24	0,985	0,997	0,991	0,006
5	4230 (sin irradiación gamma)	21,85	25,155	20,682	23,792	0,868	0,869	0,869	0,000
6	4230 (irradiación gamma)	20,509	22,904	18,002	23,512	0,895	0,765	0,830	0,065
7	4074	23,022	24,047	16,695	19,866	0,957	0,840	0,898	0,058
8	Mezcla (50 %/50 %) de 4074 y 4230	20,833	22,954	22,473	21,217	0,908	1,059	0,983	0,076

*El rango es la diferencia absoluta entre el 1º y el 2º análisis.

Tabla 21: Resultados del análisis de PSD de la solución madre de Alhydrogel® (2 %) en agua.

N.º	Nombre de muestra	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)	Oscurecimiento (%)
1	AIOH RQCS0890 No irradiado Lote 4230	0,70	2,13	46,53	1,51
2	AIOH RQCS1200 GI Lote 4230	0,71	4,14	69,64	1,98
3	AIOH RQCS1342 GI Lote 4740	0,78	2,23	53,44	2,11
4	AIOH RQCS0448 GI Lote 4074	0,73	4,49	78,58	1,96

d(0,1): El 10 % de todas las partículas medidas tienen un diámetro por debajo de este valor
d(0,5): El 50 % de todas las partículas medidas tienen un diámetro por debajo de este valor
d(0,9): El 90 % de todas las partículas medidas tienen un diámetro por debajo de este valor
Oscurecimiento: Cantidad de reducción de luz láser por muestra; corresponde a la concentración de muestra en la cámara de medición

Tabla 22: Resultados de las curvas de titulación de Alhydrogel® para la determinación de POZ. Las muestras se analizaron en PBS (dilución 1:20).

ID de muestra	PZC (pH)
AIOH RQCS0890 No irradiado Lote 4230	4,58
AIOH RQCS1200 GI Lote 4230	4,62
AIOH RQCS1342 GI Lote 4740	4,49
AIOH RQCS0448 GI Lote 4074	4,48

Tabla 23: Resumen de análisis de iones metálicos para diversas soluciones madre de hidróxido de aluminio; Nota: Una solución madre al 2 % equivale a 10 mg/ml de Al

Alhydrogel® (Solución al 2%)	Al	Fe	Ni	Cu	Co	Cr	Ag	Cd	W	Pb	V	Rb	Mo
	µg/ml	ng/ml											
Lote 4074 (RQCS0013)	9130	266	15	<25	<5	20	<5	<5	<25	19	<5	<5	<5
Lote 4230 (RQCS 0890)	9570	5640	816	64	7	1139	<5	<5	<25	24	13	<5	11
Lote 4470 (RQCS1254)	9560	1179	18	<25	<5	1637	<5	<5	<25	20	<5	<5	22
Lote 4414 (RQCS1220)	10272	2790	36	<25	<5	1710	<5	<5	35	<25	<7	n.a.	n.a.
Lote 4539	n.a.	943	119	<25	<5	276	<5	<5	<25	27	<5	<5	<5
Lote 3877	10766	183	12	<25	<5	48	<5	<5	<25	10	<5	<5	<5
Lote 4187	14100	3617	172	<25	<5	2333	<5	<5	<25	18	<5	<5	<5
Lote 4287	9800	2047	296	<25	<5	620	<5	<5	<25	30	10	<5	<5
Lote 4563	9360	2485	9	<25	<5	1874	<5	<5	<25	8	<5	<5	<5
Lote 4621	9760	1183	8	<25	<5	1333	<5	<5	<25	8	<5	<5	<5
Lote 4580 (lavado 7x)	10497	2610	27	<25	<5	1470	<5	<5	<25	<25	<5	n.a.	n.a.
Lote 4596 (lavado 7x)	10776	3530	27	<25	<5	1710	<5	<5	<25	<25	<5	n.a.	n.a.
Lote 4577 (lavado 7x)	10720	3060	24	<25	<5	1650	<5	<5	<25	<25	<5	n.a.	n.a.
Promedio	10359	2272	121	n.a.**	<5	1217	<5	<5	n.a.**	18*	11*	<5	16*
desv.est.	1312	1538	225			745				8	2		8
min	9130	183	8	<25	<5	20	<5	<5	<25	8	10	<5	<5
máx	14100	5640	816	64	7	2333	<5	<5	35	30	13	<5	22
RSD (%)	13	68	186			61				44	14		47

*Los resultados por debajo de LOQ no se usaron para el cálculo promedio; ** no es posible un cálculo promedio debido a resultados por debajo de LOQ

Tabla 24: El análisis del sobrenadante y la fracción de gel de hidróxido de aluminio (Lote 4230) para iones metálicos contaminantes muestra que los iones metálicos se encuentran en el gel, no el sobrenadante

Muestra	Fe	Ni	Cu	Co	Cr	Ag	Cd	W	Pb	V
	ng/ml									
Sobrenadante del Lote 4230	82	12	<25	<5	7	<5	<5	<25	70	<5
Sedimento del Lote 4230	6200	920	<25	<5	1200	<5	<5	<25	45	13
% de sobrenadante en comparación con el sedimento	1,3	1,3	n.a.	n.a.	0,6	n.a.	n.a.	n.a.	155,6	n.a.

Tabla 25: Vacunas a base de aluminio para uso humano

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
Ambirix	Vacuna contra hepatitis A (inactivada) y hepatitis B (rDNA) (HAB) (adsorbida).	GlaxoSmithKline
	Adsorbida sobre hidróxido de aluminio, hidratada	
Cervarix	Vacuna para el virus del papiloma humano [Tipos 16, 18] (Recombinante, con adyuvante, adsorbida)	GlaxoSmithKline
	Adsorbida sobre hidróxido de aluminio, hidratada (Al(OH) ₃)	
Engerix-B	Vacuna para Hepatitis B (rDNA), adsorbida (VHB)	GlaxoSmithKline
	Adsorbida sobre hidróxido de aluminio, hidratada	
Havrix	Vacuna monodosis Havrix Junior: Excipientes - Gel de hidróxido de aluminio (3 % p/p)	GlaxoSmithKline
	Vacuna monodosis Havrix: Excipientes - Gel de hidróxido de aluminio (3 % p/p)	
Hepatyrix	Vacuna contra la Hepatitis A (inactivada) y polisacárido tifoideo (adsorbida).	GlaxoSmithKline
	Adsorbida sobre hidróxido de aluminio, hidratada	
Infanrix	Los toxoides diftéricos y tetánicos y antígenos de tos ferina (PT, FHA y pertactina) se adsorben individualmente sobre hidróxido de aluminio.	GlaxoSmithKline
Infanrix-IPV	Vacuna contra la difteria, el tétanos, la tos ferina (acelular, componente) y la poliomiелitis (inactivada) (adsorbida)	GlaxoSmithKline
	Adsorbida sobre hidróxido de aluminio, hidratada	
inrix	Los toxoides diftéricos y tetánicos y antígenos de tos ferina (inactivados, PT, FHA y pertactina) se adsorben individualmente sobre hidróxido de aluminio.	GlaxoSmithKline
Pediarix	Los toxoides diftéricos y tetánicos y antígenos de tos ferina (inactivados, PT, FHA y pertactina) se adsorben individualmente sobre hidróxido de aluminio. El componente de la hepatitis B se adsorbe en fosfato de aluminio.	GlaxoSmithKline
Twinrix	Vacuna para adultos Twinrix: Vacuna contra hepatitis A (inactivada) y hepatitis B (rDNA) (HAB) (adsorbida). Adsorbida sobre hidróxido de aluminio, hidrato	GlaxoSmithKline
	Suspensión de vacuna pediátrica Twinrix: Vacuna contra hepatitis A (inactivada) y hepatitis B (rDNA) (HAB) (adsorbida).	
	Adsorbida sobre hidróxido de aluminio, hidratada	
Infanrix Hexa	Difteria, tétanos, tos ferina acelular, hepatitis B, poliomiелitis inactivada (DTPa-HBV-IPV), HiB adsorbido en hidróxido de aluminio, hidratado	GlaxoSmithKline
Infanrix HiB	Difteria (toxoides)/Tétanos (toxoides)/Antígenos de tos ferina: PT/FHA/PN/Haemophilus influenza tipo B (polisacárido) adsorbida en hidróxido de aluminio	GlaxoSmithKline
Boostrix	Adyuvante de aluminio (como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio), cloruro sódico y agua para inyección.	GlaxoSmithKline
Boostrix-Polio	Toxide diftérico, toxide tetánico, toxide de tos ferina, antígenos del virus de la polio	GlaxoSmithKline

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
	Adyuvante de aluminio (como sales de aluminio), cloruro sódico y agua para inyección.	
Fendrix	Vacuna contra Hepatitis B (rDNA) (con adyuvante, adsorbida). Adsorbida en fosfato de aluminio (0,5 miligramos de Al ₃ + en total) También contiene alumbre como adyuvante	GlaxoSmithKline
Synflorix	Vacuna de conjugado de polisacárido pneumocócico (adsorbida), adsorbida en fosfato de aluminio	GlaxoSmithKline
Infanrix Penta	Toxoide diftérico adsorbido sobre hidróxido de aluminio (Al(OH) ₃), toxoide tetánico, antígenos de Bordetella pertussis (toxoide de tos ferina, hemaglutinina filamentosa, pertactina), antígeno de superficie de la hepatitis B, poliovirus (inactivado) (tipo 1 (cepa Mahoney), tipo 2 (cepa MEF-1), tipo 3 (cepa Saukett))	GlaxoSmithKline
Daronix	Virión entero, inactivado, que contiene antígeno*: A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) en adyuvante con hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio	GlaxoSmithKline - Titular de la autorización de comercialización Sächsisches Serumwerk Dresden (SSW) - Fabricante
Infanrix-IPV+HIB	HIBERIX® reconstituido con INFANRIX™-IPV. Difteria combinada, tétanos, tos ferina acelular, poliomielitis inactivada, vacuna contra Haemophilus influenzae de tipo b. Adyuvante de aluminio (como 0,5 mg de sales de aluminio).	GlaxoSmithKline
Avaxim®	Excipientes: 2-fenoxietanol, formaldehído, hidróxido de aluminio (expresado como aluminio) AVAXIM® [Vacuna contra la hepatitis A inactivada] es una suspensión estéril, blanquecina y turbia. El principio activo es un virus de hepatitis A (HAV) inactivado y purificado con formaldehído obtenido de la cepa GBM, cultivado en células diploides humanas MRC-5. HAV está adsorbido en aluminio.	Sanofi
Avaxim®-Pediátrico	Hidróxido de aluminio (expresado como aluminio)	
VIVAXIM®	Excipientes: cloruro sódico, fosfato disódico dihidrato, dihidrogenofosfato sódico dihidrato, hidróxido de aluminio (expresado como aluminio), 2-fenoxietanol, formaldehído, polisorbato 80, Medio 199 Hanks Esta vacuna es una solución tamponada (sin fenol) de polisacárido capsular de Salmonella typhi Vi (cepa Ty2) y una suspensión de HAV purificado e inactivado con formaldehído, obtenido de la cepa GBM, cultivado en células diploides humanas MRC-5. HAV se adsorbe en aluminio.	Sanofi

Tabla 26: Vacunas a base de aluminio para uso veterinario +

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
CattleMaster 4+ VL5	CattleMaster® 4 es una preparación liofilizada de cepas químicamente alteradas de virus IBR y PI3 y BRSV vivo modificado más una preparación líquida, con adyuvante de cepas de virus BVD citopáticos y no citopáticos inactivados. El componente líquido se usa para rehidratar el componente liofilizado. Las fracciones víricas se propagan en una línea celular establecida. El producto tiene un adyuvante con hidróxido de aluminio para mejorar la respuesta inmune.	Pfizer
Ingelvac® DART/AR4	Ingelvac® DART/AR4 son vacunas con adyuvante a base de sulfato de aluminio y potasio contra la rinitis atrófica progresiva (PAR), que consisten en una combinación bacterina-toxoide de 4 vías de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida tipo D.	BOEHRINGER INGELHEIM

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
	Las vacunas proporcionan protección cruzada contra PAR causada por Bb y Pm toxigénicos tipo A y tienen un amplio margen de seguridad.	
Resvac® 4/Somubac®	Somubac se prepara a partir de cepas seleccionadas de Haemophilus somnus que crecen sin suero en un sistema de fermentación controlado ambientalmente y se inactivan de tal manera que se mantiene su integridad inmunogénica. La bacterina tiene un adyuvante de hidróxido de aluminio.	Pfizer
Pestorin Mormyx	Enfermedad hemorrágica de conejo, vacuna de tipo inactivo. Adyuvante - Hidróxido de aluminio	Bioveta
Pestorin	Enfermedad hemorrágica de conejo Adyuvante - Hidróxido de aluminio	Bioveta
MORIN	Enfermedad hemorrágica de conejo De tipo inactivo Adyuvante - Hidróxido de aluminio	Dyntec
Hemoragivac	Enfermedad hemorrágica de conejo Adyuvante - Hidróxido de aluminio	Institutul Pasteur
ARVILAP	Enfermedad hemorrágica de conejo De tipo inactivo Cepa/subtipo - LO1 Adyuvante - Hidróxido de aluminio	Laboratorios Ovejero
BTVPUR Alsap™ 1-8	Enfermedad de la lengua azul De tipo inactivo Cepa/Subtipo - Serotipo 1, 8 Adyuvante - Hidróxido de aluminio, saponina	Sanofi (Merial SAS (Francia))
BTVPUR Alsap™ 2-4	Enfermedad de la lengua azul De tipo inactivo Adyuvante - Hidróxido de aluminio, saponina	Sanofi (Merial SAS (Francia))
BTVPUR Alsap™ 1	Enfermedad de la lengua azul De tipo inactivo Adyuvante - Hidróxido de aluminio, saponina	Sanofi (Merial SAS (Francia))
BTVPUR Alsap™ 2	Enfermedad de la lengua azul De tipo inactivo Adyuvante - Hidróxido de aluminio, saponina	Sanofi (Merial SAS (Francia))
BTVPUR Alsap™ 4	Enfermedad de la lengua azul De tipo inactivo Adyuvante - Hidróxido de aluminio, saponina	Sanofi (Merial SAS (Francia))
BTVPUR Alsap™ 9	Enfermedad de la lengua azul De tipo inactivo Adyuvante - Hidróxido de aluminio, saponina	Sanofi (Merial SAS (Francia))
BOVILIS® BTv8	Enfermedad de la lengua azul De tipo inactivo Adyuvante - Hidróxido de aluminio, saponina	MSD Animal Health (Merck)
Clotisol®	Esta suspensión de coagulación sanguínea de fórmula original se utiliza como una ayuda para detener el sangrado en los animales causado por cortes y heridas menores. Se puede utilizar Clotisol eficazmente en recortes de uña, sección de la cola, cultivo de oreja y en otros sitios de hemorragia menores. Ingredientes: Sulfato férrico, sulfato de aluminio, proteína de colágeno y cloroxilenol en suspensión.	Ceva Animal Health
Sal Bac®	Prevención de la infección paratifoidea atribuida a Salmonella typhimurium en palomas.	Ceva Animal Health

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
	Sal Bac® es una vacuna bacteriana inactivada con adyuvante de hidróxido de aluminio. También contiene un adyuvante biológico patentado que actúa como un potenciador inmune para garantizar el nivel de respuesta a la vacunación y proporcionar inmunidad de larga duración	
CEVAC® CORYMUNE4K	CEVAC® CORYMUNE 4K contiene una combinación inactivada de los serotipos A, B y C de Avibacterium paragallinarum, y la cepa Salmonella Enteritidis, homogeneizada con adyuvante de hidróxido de aluminio y Thiomersal como conservante.	Ceva Animal Health
Hepatovax	Hepatitis vírica del pato	Sanofi (Merial SAS (Francia))
	Tipo - Vivo	
	Cepa/subtipo - E52	
Septivac	Adyuvante - Hidróxido de aluminio	Institutul Pasteur
	Septicemia hemorrágica	
	De tipo inactivo	
ITA-ND+IB+EDS	Adyuvante - Hidróxido de aluminio	Laprovect
	Síndrome de caída de la postura	
	De tipo inactivo	
Lohmann Animal Health International	Cepa/Subtipo - B8/78	Lohmann Animal Health International
	Enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa, síndrome de caída de la postura	
	Tipo - Inactivo	
SCOURGUARD® 4KC	Cepa/Subtipo - EDS 76	Pfizer
	ScourGuard 4K es para la vacunación de vacas y vaquillas preñadas sanas preñadas como ayuda para prevenir la diarrea en sus terneros causada por el rotavirus bovino (serotipos G6 y G10), coronavirus bovino y cepas enterotoxigénicas de Escherichia coli que tienen el factor de adherencia pili K99.	
	ScourGuard 4K contiene una preparación líquida de rotavirus bovino inactivado (serotipos G6 y G10) y coronavirus propagado en líneas celulares establecidas y E. colibacterina K99. La vacuna tiene adyuvante para mejorar la respuesta inmune.	
Vacuna contra extracto bacteriano de Salmonella Newport con tecnología SRP®	Se ha demostrado que los anticuerpos SRP generados por la vacunación con vacuna de extracto bacteriano de Salmonella Newport demostrado reconocen los SRP de varios serotipos comunes de Salmonella. Contiene un adyuvante emulsionado	Pfizer
ULTRABAC® 8	Para su uso en ganado bovino y ovino sano como ayuda en la prevención del pie negro causado por Clostridium chauvoei, edema maligno causado por Cl septicum, hemoglobinuria bacilar causada por Cl. hemolyticum, enfermedad negra causada por Cl. novyi, gangrena gaseosa causada por Cl. sordellii, y enterotoxemia y enteritis causada por Cl. perfringens Tipos B, C y D. Aunque Cl. perfringens tipo B no es un problema significativo en América del Norte, se proporciona inmunidad por el toxoide beta de tipo C y el toxoide épsilon de tipo D. Ultrabac 8 consiste en cultivos estandarizados inactivos de Cl, chauvoei, Cl. septicum, Cl haemolyticum, Cl. novyi, Cl. sordellii, y Cl. perfringens de Tipos C y D, con un adyuvante.	Pfizer

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
ULTRABAC® 7/SOMUBAC	Para su uso en reses adultas y terneros sanos de tres meses de edad o mayores, como una ayuda para prevenir el pie negro causado por <i>Clostridium chauvoei</i> , edema maligno causado por <i>Cl. septicum</i> , enfermedad negra causada por <i>Cl. novyi</i> , gangrena gaseosa causada por <i>Cl. sordellii</i> , enterotoxemia y enteritis causada por <i>Cl. perfringens</i> Tipos B, C y D, y enfermedad causada por <i>Histophilus somni</i> (<i>Haemophilus somnus</i>). Aunque <i>Cl. perfringens</i> tipo B no es un problema significativo en América del Norte, se proporciona inmunidad por el toxoide beta de tipo C y el toxoide épsilon de tipo D. Ultrabac 7/Somubac consiste en cultivos estandarizados inactivos de <i>Cl. chauvoei</i> , <i>Cl. septicum</i> , <i>Cl. novyi</i> , <i>Cl. sordellii</i> , <i>Cl. perfringens</i> Tipos C y D, y <i>H. somni</i> , con un adyuvante	Pfizer
Litterguard	La bacterina se prepara a partir de cepas químicamente inactivadas de <i>E. coli</i> . Se usa un adyuvante estéril para mejorar la respuesta inmune.	Pfizer
DISTOX®-PLUS	Esta vacuna se compone de dos componentes: una vacuna liofilizada que contiene un virus del moquillo vivo modificado cultivado en cultivo tisular y combinado con agentes estabilizantes; y una fracción líquida que contiene virus de enteritis de visón inactivado cultivado en una línea celular felina, bacterina-toxoide de <i>Clostridium botulinum</i> tipo C, y serotipos inactivados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5, 6, 7-8 y 9 con un adyuvante de aluminio	Merck Animal Health
COVEXIN® 8	Antígenos de inmunización de <i>Cl. chauvoei</i> , <i>Cl. haemolyticum</i> , <i>Cl. novyi</i> Tipo B, <i>Cl. perfringens</i> Tipos B, C y D, <i>Cl. septicum</i> y <i>Cl. tetani</i> , con adyuvante de alumbre potásico	Merck Animal Health
MaxiVac Excell® 5.0	Vacuna inactivada que contiene tres cepas de virus de la influenza porcina tipo A, subtipo H1N1 y dos cepas de virus de la influenza porcina tipo A, subtipo H3N2, en un adyuvante patentado de doble acción (Emunade®).	Merck Animal Health
M+PAC®	La bacterina <i>Mycoplasma Hypopneumoniae</i> , contiene el adyuvante dual patentado Emunade®	Merck Animal Health
M+RHUSIGEN®	Bacterina de <i>Erysipelothrix Rhusiopathiae</i> - <i>Mycoplasma Hypopneumoniae</i> , contiene el adyuvante dual patentado Emunade®	Merck Animal Health
SCOURMUNE®	Bacterina de <i>Escherichia Coli</i> pili tipos K88, K99, 987P y Tipo 1, Hidróxido de aluminio adsorbido	Merck Animal Health
SCOURMUNE®-C	<i>Clostridium Perfringens</i> Tipo C - Bacterina de <i>Escherichia Coli</i> - Toxoide, pili tipos K88, K99, 987P y Tipo 1, Hidróxido de aluminio adsorbido	Merck Animal Health
TASVAX® 8	Antígenos de <i>Cl. chauvoei</i> , <i>Cl. haemolyticum</i> , <i>Cl. novyi</i> Tipo B, <i>Cl. perfringens</i> Tipos B, C y D, <i>Cl. septicum</i> y <i>Cl. tetani</i> , con adyuvante de alumbre potásico	Merck Animal Health
MaxiVac Excell®3	Vacuna de gripe porcina, H1N1 y H3N2, Virus inactivo, adyuvante Emunade®	Merck Animal Health
Quantum Cat FeLV	Antígenos víricos de la leucemia felina con adyuvante inactivados derivados de los subtipos A, B y C, incluyendo el antígeno de membrana celular asociado a oncornavirus felino, Alhydrogel al 2 %, Al ₂ O ₃ como adyuvante	Merck Animal Health
Toxoide tetánico concentrado	El toxoide tetánico concentrado es una vacuna inactivada que contiene ≥150 UI. por dosis (1 ml) de toxoide tetánico purificado. Para mejorar la inmunogenicidad, el toxoide se adsorbe en hidróxido de aluminio	Merck Animal Health

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
Vacuna para la pierna negra	Suspensión para inyección que contiene cinco cepas de células inactivadas con formaldehído/dosis de Clostridium chauvoei, y toxoide equivalente que induce $\geq 0,5$ PD90 de cobaya por cepa.	Merck Animal Health
	También contiene hidróxido de aluminio como adyuvante y 0,26 mg/dosis de Thiomersal como conservante.	
Bovilis™ Bovipast RSP	Una suspensión acuosa para inyección subcutánea. Una dosis (5 ml) de la vacuna contiene al menos 105,5 del virus sincitial Respiratorio bovino inactivado TCID50 (cepa EV 908) y al menos 107,3 del virus de parainfluenza-3 TCID50 (cepa SF-4 Reisinger), junto con 9×10^9 células de bacterias hemolíticas inactivadas de Mannheimia (Pasteurella) (serotipo A1) propagadas en condiciones de restricción de hierro.	Merck Animal Health
	El hidróxido de aluminio y Quil A se incluyen como adyuvantes. El timerfonato sódico se incluye como conservante.	
Bovilis BTV8	Una dosis de 1 ml de sustancia activa contiene: Virus de la lengua azul Serotipo 8 (antes de la inactivación): 500 unidades antígenicas*.	Merck Animal Health
	(* inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes del virus en pollos de $\geq 5,0$ log2).	
	Adyuvantes Hidróxido de aluminio (como 100 %) 16,7 mg y Saponina 0,31 mg	
Bovilis BVD	Bovilis BVD es una vacuna inactivada que contiene 50 unidades de ELISA (UE) e induce al menos 4,6 unidades log2 VN por dosis de la cepa C86 del virus BVD citopatógeno. El virus se cultiva en cultivo celular, se inactiva con beta-propiolactona, y se adsorbe sobre un adyuvante de sales de aluminio	Merck Animal Health
Bovivac S	Bovivac S es una suspensión inyectable que contiene células inactivadas de Salmonella dublin, cepa S342/70 (1×10^9 células/ml) y células inactivadas de Salmonella typhimurium, cepa S341/70 (1×10^9 células/ml). Bovivac S contiene hidróxido de aluminio como adyuvante y Thiomersal como conservante.	Merck Animal Health
Bravoxin 10	Bravoxin 10 es una vacuna líquida para inyección que contiene antígenos clostridiales inactivados con un adyuvante de sulfato de aluminio y potasio (alumbre)	Merck Animal Health
Lambivac	Suspensión para inyección que contiene por ml toxoide beta de Clostridium perfringens que induce ≥ 10 UI; toxoide épsilon de Clostridium perfringens que induce ≥ 5 UI; y toxoide de Clostridium tetani que induce $\geq 2,5$ UI. También contiene hidróxido de aluminio como adyuvante y 0,13 mg/dosis de Thiomersal como conservante.	Merck Animal Health
Leptavoid™ - H	Leptospira interrogans serovar hardjo 204 (inactivado), Adyuvante (alumbre al 10 %)	Merck Animal Health
Rotavec Corona	Rotavirus bovino, cepa UK-Compton, serotipo G6 P5 (inactivado), coronavirus bovino, cepa Mebus (inactivada), adhesina de E. coli F5 (K99), también contiene 1,5 ml de aceite mineral ligero/emulsionante y 2,45 - 3,32 mg de aluminio hidróxido como adyuvantes y 0,051 - 0,069 mg de Thiomersal como conservante.	Merck Animal Health

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
Heptavac-P Plus	Combinado 7 en 1 Clostridial más vacuna de Pasteurella. Una vacuna fluida opaca que contiene por ml: Toxide beta de Clostridium perfringens: que induce ≥ 10 UI; Toxide epsilon de Clostridium perfringens: que induce ≥ 5 UI; Toxide de Clostridium septicum: que induce $\geq 2,5$ UI; Toxide de Clostridium tetani: que induce $\geq 2,5$ UI; Toxide de Clostridium novyi: que induce $\geq 3,5$ UI; células de Clostridium chauvoei y toxide equivalente: que induce $\geq 0,5$ de cobaya PD90, células inactivas de formalina de los serotipos epidemiológicamente más importantes de Mannheimia haemolytica y Pasteurella trehalosi cultivadas en condiciones restringidas de hierro: 5×10^8 células por cepa en solución salina fisiológica tamponada adsorbida sobre hidróxido de aluminio.	Merck Animal Health
Ovipast Plus	Por 1 ml: 5×10^8 células inactivadas con formalina cada una de las cepas de M. haemolytica A1 (S1006/77), A2 (S1126/92), A6 (S1084/81), A7 (S1078/81), A9 (S994/77) y cepas de P. trehalosi T3 (S1109/84), T4 (S1085/81), T10 (S1075/81), T15 (S1105/84) Alhydrogel, Thiomersal.	Merck Animal Health
Ovivac-P Plus	Cl. perfringens tipo D, toxide cepa 603 epsilon, Cl. septicum, toxide cepa S1110/85, Cl. tetani, toxide cepa 51123/91, Cl. chauvoei, células cepas 655, 656, 657, 658, 1048 y toxide equivalente, M. haemolytica, cepas A1, A2, A6, A7, A9, P.trehalosi, cepas T3, T4, T10, T15 Adyuvante: Hidróxido de aluminio	Merck Animal Health
Porcilis Coli 6C	Porcilis Coli 6C es una vacuna líquida con un precipitado que resuspende en agitación. Cada 5 ml de dosis contiene antígenos de pilus libres de células de E. coli, cepas K88ab (100-135 unidades); K88ac (100-135 unidades); K99 (190-250 unidades); 987P (2900-3100 unidades) y toxide purificado de C. perfringens Tipos B, C y D (contribuyendo juntos no menos de 300 equivalentes de unidades internacionales de toxide beta y no menos de 200 equivalentes de unidades internacionales de toxide epsilon), todos absorbidos en hidróxido de aluminio (≤ 15 mg de AL3+)	Merck Animal Health
Nobilis Salenvac T	Células inactivadas de Salmonella Enteritidis, cepa PT 4, células inactivadas de Salmonella Typhimurium, cepa DT104, Adyuvante: hidróxido de aluminio	Merck Animal Health
Parvo Shield L5E	Parvo Shield L5E proporciona protección sólida contra parvovirus, cinco cepas de leptospirosis y erisipelas, hidróxido de aluminio como adyuvante	Novartis Animal Health
Prefarrow Shield 9	Para su uso en cerdas preñadas sanas como ayuda en el control de enfermedades en lechones causadas por Bordetella bronchiseptica, Clostridium perfringens tipo C, Erysipelothrix rhusiopathiae, Escherichia coli de pili K88, K99, 987P y F41, y la toxina de Pasteurella multocida Tipos A y D. Adyuvante: Hidróxido de aluminio.	Novartis Animal Health
Rhini Shield™ TX4	Rhini Shield TX4 ayuda a proteger a los cerdos contra la rinitis atrófica causada por Bordetella bronchiseptica o la toxina de Pasteurella multocida Tipos A y D, erisipela y neumonía causada por P. multocida Tipo A. Adyuvante: Hidróxido de aluminio	Novartis Animal Health
Canigen Rabies	Vacuna inactivada que contiene >2 U.I. Cepa del virus de la rabia Pasteur RIV por dosis. También contiene fosfato de aluminio como adyuvante.	Virbac

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
Leucofeligen FeLV/RCP	Calicivirus felino vivo (cepa F9), virus de la rinotraqueítis vírica felina vivo (cepa F2), virus de la panleucopenia felina vivo (cepa LR 72), cantidad mínima de antígeno de envoltura de p45 FeLV purificado 102 microgramos, Adyuvantes: Gel de hidróxido de aluminio al 3 %	Virbac
Leucogen	La vacuna contiene el antígeno de envoltura de p45 FeLV purificado, obtenido por recombinación genética del E. Cepa de Coli. La suspensión antigénica tiene como adyuvante un gel de hidróxido de aluminio	Virbac
COLIVAC	VACUNA CON ADYUVANTE, INACTIVADA CONTRA LA DIARREA COLOTAXIGÉNICA COLIBACILLAR EN LECHONES, Adyuvante: Hidróxido de aluminio	Insitut Pastuer Romania
EMFIVAC	VACUNA INACTIVA CONTRA LA PIERNA NEGRA, Adyuvante: Hidróxido de aluminio	Insitut Pastuer Romania
LEPTOVAC	VACUNA INACTIVA CONTRA <i>LEPTOSPIRA SPP.</i> INFECCIONES EN GANADO, CABALLOS, OVEJAS Y CERDOS, Adyuvante: Hidróxido de aluminio	Insitut Pastuer Romania
MAMIVAC	VACUNA INACTIVADA CONTRA MASTITIS GANGRENOSA EN OVEJAS Y CABRAS, Adyuvante: Hidróxido de aluminio	Insitut Pastuer Romania
ROMPERVAC ABCD	VACUNA INACTIVA CONTRA <i>CL.</i> ENTEROTOXEMIA DE <i>PERFRINGENS</i> EN GANADO Y OVEJAS, Adyuvante: Hidróxido de aluminio	Insitut Pastuer Romania
SALMOVIN	VACUNA CONTRA <i>SALMONELLA</i> ABORTO EN OVEJAS, Adyuvante: Hidróxido de aluminio	Insitut Pastuer Romania
ARVILAP	Inmunización activa contra la enfermedad vírica hemorrágica de los conejos, adsorbida en hidróxido de aluminio	Ovejero Laboratorios
DOG-VAC R	Inmunización activa contra la rabia en perros, gatos y ganado, adsorbida en hidróxido de aluminio	Ovejero Laboratorios
INMUBOV INACTIVADO	Virus de rinotraqueítis/Vulvovaginitis (IBR/IPV), Virus de Parainfluenza-3 (PI-3), Virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVD). Adsorbido sobre hidróxido de aluminio.	Ovejero Laboratorios
NEO-VAKY MR	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , Adsorbido sobre hidróxido de aluminio.	Ovejero Laboratorios
COVEXIN® PLUS	Bacterina-Toxoide de <i>Clostridium Chauvoei-Septicum-Haemolyticum-Novyi-Sordellii-Tetani-Perfringens</i> Tipos C y D	Merck Animal Health
NOBIVAC® Gripe canina H3N8	Nobivac® Gripe canina Flu H3N8 se recomienda para la vacunación de perros sanos a las 6 semanas de edad o más como una ayuda en el control de la enfermedad asociada con la infección por el virus de la influenza canina. El virus tipo A, subtipo H3N8 ha sido inactivado químicamente y combinado con un adyuvante diseñado para mejorar la respuesta inmune.	Merck Animal Health
NOBIVAC® 1-HCP felino + FeLV	La vacuna Nobivac® 1-HCP felino + FeLV es una vacuna de combinación que une los beneficios de Nobivac® 1-HCP felino y Nobivac® FeLV en una vacuna. La vacuna Nobivac® 1-HCP felino es una vacuna de virus vivo modificada para la vacunación de gatos sanos como ayuda en la prevención de enfermedades causadas por la rinotraqueítis felina, los calicis y los virus de panleucopenia. La vacuna Nobivac® FeLV se recomienda para la vacunación de gatos sanos como ayuda en la prevención de tumores linfoides causados por, y enfermedades asociadas con, la infección por el virus de la leucemia felina (FeLV). El virus ha sido inactivado químicamente y combinado con un adyuvante patentado diseñado para mejorar la respuesta inmune.	Merck Animal Health

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
CAV-VAC®	CAV-VAC es una vacuna de virus vivo, preparada a partir de un aislado de campo de Estados Unidos modificado. La vacuna se produce utilizando sustratos libres de patógenos específicos (SPF), y contiene el virus de la vacuna contra la anemia de pollo vivo suspendido en un diluyente de banda de ala.	Merck Animal Health
CONTINUUM™ DAP-R DOI de 3 AÑOS	CONTINUUM™ DAP-R es una vacuna de virus vivo modificado que contiene cepas atenuadas de virus del moquillo canino (CDV), adenovirus tipo-2 (CAV-2), parvovirus (CPV) y virus inactivo de la rabia. CONTINUUM™ DAP-R se presenta en una forma desecada con diluyente para la rabia proporcionado para la reconstitución.	Merck Animal Health
CONTINUUM™ P DOI de 3 AÑOS	CONTINUUM™ P es una vacuna de virus vivo modificada que contiene una cepa atenuada de parvovirus canino (CPV). CONTINUUM™ P se presenta en una forma desecada con diluyente estéril proporcionado para la reconstitución.	Merck Animal Health
FLU AVERT® I.N. VACUNA	Esta es una preparación liofilizada que contiene un virus de influenza A equina-2, atenuado, adaptado al frío y viable. No contiene conservantes.	Merck Animal Health
FVR® C	La vacuna FVR® C es una vacuna de virus vivo modificado para la vacunación de gatos sanos de 8 a 9 semanas de edad o más como una ayuda en la prevención de la enfermedad causada por la rinotraqueitis felina y los virus calici.	Merck Animal Health
FVR® C-P	La vacuna VR® C-P es una combinación de antígenos para su uso conveniente en gatos sanos de 8 a 9 semanas de edad o mayores como ayuda en la prevención de enfermedades causadas por rinotraqueitis felina, virus calici felino y panleucopenia felina. El componente de la rinotraqueitis-calici felina es una suspensión liofilizada de virus vivos modificados propagada en una línea celular estable de origen felino y rellena con un gas inerte. El virus panleucopenia felino se propaga en una línea celular estable de origen felino. El virus ha sido inactivado químicamente y se ha determinado que no es viricida cuando se usa como diluyente para rehidratar la vacuna de la rinotraqueitis calici felina.	Merck Animal Health
Galaxy™ D	La vacuna Galaxy™ D es una vacuna de virus vivo modificado para la vacunación de perros sanos como ayuda en la prevención de enfermedades causadas por el moquillo canino.	Merck Animal Health
Galaxy™ Pv	La vacuna Galaxy™ Pv es una vacuna de virus vivo modificado que contiene una cepa de tipo 2b de CPV para la vacunación de perros sanos como ayuda en la prevención de la enfermedad causada por el parvovirus canino.	Merck Animal Health
Intra-Trac®-II ADT	Vacuna contra Parainfluenza canina-Bordetella Bronchiseptica (virus vivo modificado, cultivo vivo avirulento)	Merck Animal Health
JENCINE® ERC	Vacuna contra Rotavirus bovino-Coronavirus, Virus inactivo, bacterina-toxoide de Clostridium Perfringens Tipos C y D- Escherichia Coli	Merck Animal Health
LT-IVAX®	Vacuna contra laringotraqueitis aviar	Merck Animal Health
NOBIVAC® Canino 1- DAPPv	Nobivac® Canino 1-DAPPv es una vacuna de virus vivo modificado para la vacunación de perros sanos como ayuda en la prevención de enfermedades causadas por el virus del moquillo canino, adenovirus tipo 1 (hepatitis) y adenovirus tipo 2 (enfermedad respiratoria), virus de parainfluenza canina, y parvovirus canino	Merck Animal Health

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
NOBIVAC® Canino 1-DAPPv +Cv	<p>La vacuna Nobivac® Canino 1-DAPPv + Cv es una vacuna de combinación que combina los beneficios de Nobivac® Canino 1-DAPPv y Nobivac® Canino 1-Cv en una única vacuna. Nobivac® Canino 1-DAPPv es una vacuna de virus vivo modificado para la vacunación de perros sanos como ayuda en la prevención de enfermedades causadas por el virus del moquillo canino, adenovirus tipo 1 (hepatitis), adenovirus tipo 2 (enfermedad respiratoria), virus de parainfluenza canina, y parvovirus canino. La vacuna Nobivac® Canino 1-Cv (coronavirus felino entérico) es una vacuna de virus inactivo para la vacunación de perros sanos como ayuda en la prevención de la enfermedad causada por la infección por coronavirus canino. El coronavirus se ha inactivado químicamente y se ha combinado con un adyuvante diseñado para mejorar la respuesta inmune.</p>	Merck Animal Health
NOBIVAC® Canino 1-DAPPvL2	<p>La vacuna Nobivac® Canino 1-DAPPvL2 es una vacuna de virus vivo modificado que se combina con una bacteria inactivada de <i>Leptospira canicola</i> y <i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i> para la vacunación de perros sanos como ayuda en la prevención de enfermedades causadas por el virus del moquillo canino, adenovirus canino tipo 1 (hepatitis), adenovirus canino tipo 2 (enfermedad respiratoria), virus de parainfluenza canino, y parvovirus canino y contra la enfermedad por <i>Leptospira</i> debida a <i>L. canicola</i> o <i>L. icterohaemorrhagiae</i>.</p>	Merck Animal Health
NOBIVAC® Canino 1-DAPPvL2+Cv	<p>La vacuna Nobivac® Canino 1-DAPPvL2 + Cv es una vacuna de combinación que combina los beneficios de Nobivac® Canino 1-DAPPvL2 y Nobivac® Canino 1-Cv en una única vacuna. La vacuna Nobivac® Canino 1-DAPPvL2 es una vacuna de virus vivo modificado que se combina con una bacteria inactivada de <i>Leptospira canicola</i> y <i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i> para la vacunación de perros sanos como ayuda en la prevención de enfermedades causadas por el virus del moquillo canino, adenovirus canino tipo 1 (hepatitis), adenovirus canino tipo 2 (enfermedad respiratoria), virus de parainfluenza canino, y parvovirus canino y contra la enfermedad por <i>Leptospira</i> debida a <i>L. canicola</i> o <i>L. icterohaemorrhagiae</i>. La vacuna Nobivac® Canino 1-Cv (coronavirus entérico felino) es una vacuna de virus inactivo para la vacunación de perros sanos como ayuda en la prevención de la enfermedad causada por la infección por coronavirus canino. El coronavirus se ha inactivado químicamente y se ha combinado con un adyuvante diseñado para mejorar la respuesta inmune.</p>	Merck Animal Health
Nobivac® Canino 1-DAPPv+L4	<p>La vacuna Nobivac® Canino 1-DAPPv+L4 es una vacuna de combinación que combina los beneficios de Nobivac® Canino 1-DAPPv y Nobivac® Lepto4 en una única vacuna. Nobivac® Canino 1-DAPPv es una vacuna de virus vivo modificado para la vacunación de perros sanos como ayuda en la prevención de enfermedades causadas por el virus del moquillo canino, adenovirus tipo 1 (hepatitis), virus de parainfluenza canina, y parvovirus canino. La bacteria Nobivac® Lepto4 se recomienda para la vacunación de perros sanos como ayuda en la prevención de enfermedades y mortalidad causadas por <i>L. canicola</i>, <i>L. icterohaemorrhagiae</i>, <i>L. pomona</i> o <i>L. grippotyphosa</i>.</p>	Merck Animal Health

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
NOBIVAC® Canino 3-DA	Nobivac® Canino 3-DA es una vacuna de virus vivo modificada que contiene cepas atenuadas de virus del moquillo canino (CDV) y adenovirus tipo 2 (CAV-2)	Merck Animal Health
NOBIVAC® Canino 3-DAPv	Nobivac® Canino 3-DAPv es una vacuna de virus vivo modificada que contiene cepas atenuadas del virus del moquillo canino (CDV), adenovirus tipo 2 (CAV-2) y parvovirus (CPV)	Merck Animal Health
NOBIVAC® Canino 3-Pv	Nobivac® Canino 3-Pv es una vacuna de virus vivo modificada que contiene una cepa atenuada de parvovirus canino (CPV)	Merck Animal Health
NOBIVAC® Felino 1-HCP	La vacuna de Nobivac® Felino 1-HCP es una vacuna de virus vivo modificado	Merck Animal Health
NOBIVAC® 1-HCP felino + FeLV	La vacuna Nobivac® 1-HCP felino + FeLV es una vacuna de combinación que une los beneficios de Nobivac® 1-HCP felino y Nobivac® FeLV en una vacuna. La vacuna Nobivac® 1-HCP felino es una vacuna de virus vivo modificada para la vacunación de gatos sanos como ayuda en la prevención de enfermedades causadas por la rinotraqueitis felina, los calicis y los virus de panleucopenia. La vacuna Nobivac® FeLV se recomienda para la vacunación de gatos sanos como ayuda en la prevención de tumores linfoides causados por, y enfermedades asociadas con, la infección por el virus de la leucemia felina (FeLV). El virus ha sido inactivado químicamente y combinado con un adyuvante patentado diseñado para mejorar la respuesta inmune.	Merck Animal Health
NOBIVAC® Felino 1-HCPCh	La vacuna Nobivac® Felino 1-HCPCh es un virus vivo modificado y la vacuna contra <i>chlamydia</i> para la vacunación de gatos sanos como una ayuda en la prevención de enfermedades causadas por rinotraqueitis felina, los calicis y los virus de panleucopenia y <i>Chlamydia psittaci</i> .	Merck Animal Health
NOBIVAC® Felino 1-HCPCh + FeLV	La vacuna Nobivac® Felino 1-HCPCh + FeLV es una vacuna de combinación que une los beneficios de Nobivac® 1-HCPCh felino y Nobivac® FeLV en una vacuna. La vacuna Nobivac® Felino 1-HCPCh es un virus vivo modificado y la vacuna contra <i>chlamydia</i> para la vacunación de gatos sanos como una ayuda en la prevención de enfermedades causadas por rinotraqueitis felina, los calicis y los virus de panleucopenia y <i>Chlamydia psittaci</i> . La vacuna Nobivac® FeLV se recomienda para la vacunación de gatos sanos como ayuda en la prevención de tumores linfoides causados por, y enfermedades asociadas con, la infección por el virus de la leucemia felina (FeLV). El virus ha sido inactivado químicamente y combinado con un adyuvante patentado diseñado para mejorar la respuesta inmune.	Merck Animal Health
NOBIVAC® Felino 3-HC	La vacuna Nobivac® Felino 3-HC es un virus vivo modificado que contiene cepas atenuadas de rinotraqueitis felina (FRV) y calicivirus (FCV)	Merck Animal Health
NOBIVAC® Felino 3-HCP	La vacuna Nobivac® Felino 3-HCP es un virus vivo modificado que contiene cepas atenuadas del virus de la rinotraqueitis felina (FRV), calicivirus (FCV), y virus de panleucopenia (FPV)	Merck Animal Health
NOBIVAC® Felino 3-P	Nobivac® Felino 3-P es una vacuna de virus vivo modificado que contiene una cepa atenuada del virus de la panleucopenia felina (FPV).	Merck Animal Health

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
Nobivac® FeLV	La vacuna Nobivac® FeLV se recomienda para la vacunación de gatos sanos como ayuda en la prevención de tumores linfoides causados por, y enfermedades asociadas con, la infección por el virus de la leucemia felina (FeLV). El virus ha sido inactivado químicamente y combinado con un adyuvante patentado diseñado para mejorar la respuesta inmune.	Merck Animal Health
NOBIVAC® Intra-Trac®3 ADT	La vacuna Nobivac® Intra-Trac®3 ADT† es para su uso como una ayuda en la prevención de enfermedades asociadas con el adenovirus canino tipo 2, el virus parainfluenza canino y la infección por Bordetella bronchiseptica en perros sanos de 3 semanas de edad o mayores	Merck Animal Health
NOBIVAC® Intra-Trac® KC	Nobivac® Intra-Trac® KC es una vacuna intranasal viva modificada que contiene virus de parainfluenza canino atenuado y cultivo vivo avirulento de Bordetella bronchiseptica para la vacunación de cachorros y perros susceptibles sanos para la prevención de la traqueobronquitis infecciosa canina ("tos de las perreras") debido a la parainfluenza canina y B. bronchiseptica	Merck Animal Health
NOBIVAC® Lepto4	La bacterina Nobivac® Lepto4 se recomienda para la vacunación de perros sanos como una ayuda en la prevención de enfermedades y la mortalidad causada por L. canicola, L. icterohaemorrhagiae, L. pomona, y L. grippityphosa; la prevención de la leptospiruria (desprendimiento de Leptospira en la orina) causada por L. canicola, L. icterohaemorrhagiae, y L. grippityphosa; y como una ayuda en la prevención de leptospiruria causada por L. pomona.	Merck Animal Health
NOBIVAC® LYME	La bacterina Nobivac® Lyme contiene dos aislados inactivados de Borrelia burgdorferi	Merck Animal Health
NOBIVAC® Puppy-DPv	Nobivac® Puppy-DPv es una vacuna de virus vivo modificado que contiene cepas atenuadas del virus del moquillo canino (CDV) y parvovirus (CPV)	Merck Animal Health
PARAPAC®	Contiene cultivos de Haemophilus parasuis químicamente inactivados y con adyuvantes.	Merck Animal Health
PROGARD®-5	PROGARD®-5 es una vacuna de virus vivo modificado que contiene cepas atenuadas del virus del moquillo canino, adenovirus tipo 2, virus de parainfluenza y parvovirus cultivados en PRO-CELL STABLE CELL LINE™	Merck Animal Health
PROGARD®-6	PROGARD®-6 está compuesto por una vacuna de virus vivo modificado liofilizada (Progard®-5) que contiene cepas atenuadas de virus del moquillo canino, adenovirus tipo 2, virus de parainfluenza y parvovirus cultivados en Pro-Cell Stable Cell Line™, y de un componente con vacuna de coronavirus canino inactivado como diluyente.	Merck Animal Health
PROSYSTEM® RCE	La vacuna contra el rotavirus porcino contiene dos serotipos G vivos modificados 5 y 4 del rotavirus de Serogrupo A, en forma desecada. La bacterina-toxoide de C. perfringens-E. coli es un producto líquido purificado y con adyuvante que contiene el toxoide tipo C de C. perfringens y cuatro antígenos principales de pilus de E. coli: K88, K99, F41 y 987P. Cada serie de ProSystem® CE (bacterina-toxoide de C. perfringens - E. coli) ha demostrado ser compatible (no viricida) con ProSystem® Rota (vacuna contra rotavirus porcino) y, por lo tanto, se puede usar como diluyente cuando se empaqueta con la vacuna vírica.	Merck Animal Health
RHINOGEN® BPE	Un cultivo con adyuvante químicamente inactivado de B. bronchiseptica, E. rhusiopathiae y P. multocida no toxigénico tipo A y toxigénico tipo D.	Merck Animal Health

Vacuna	Detalles de la vacuna	Fabricante/Proveedor
SOW BAC® CE II	Un producto químicamente inactivado, con adyuvante que contiene toxoide de B. bronchiseptica, C. perfringens tipo C, E. rhusiopathiae, cuatro antígenos principales de E. coli (K88, K99, F41 y 987P) y P. multocida no toxigénico tipo A y toxigénico tipo D.	Merck Animal Health
VISTA® 5 L5 SQ	El producto de vacuna-bacterina reconstituido contiene cultivos vivos modificados de virus de la rinotraqueitis bovina (IBRV), virus de la diarrea vírica bovina (BVD) (Tipos 1 y 2), virus de parainfluenza3 (PI3) y virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) y cultivos inactivados de Leptospira canicola, L. grippotyphosa, L. hardjo, L. icterohaemorrhagiae, y L. pomona con un adyuvante patentado.	Merck Animal Health
VISTA® 5 SQ	El producto de vacuna reconstituida contiene cultivos vivos modificados de virus de la rinotraqueitis bovina (IBRV), virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) (Tipos 1 y 2); virus parainfluenza3 (PI3) y virus sincitial respiratorio bovino (BRSV).	Merck Animal Health
VISTA® 5 VL5 SQ	El producto de vacuna-bacterina reconstituido contiene cultivos vivos modificados de virus de la rinotraqueitis bovina (IBRV), virus de la diarrea vírica bovina (BVD) (Tipos 1 y 2), virus de parainfluenza3 (PI3) y virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) y cultivos inactivados de Campylobacter fetus y Leptospira canicola, L. grippotyphosa, L. hardjo, L. icterohaemorrhagiae, y L. pomona con un adyuvante patentado	Merck Animal Health
L5 SQ	El producto de bacterina contiene cultivos inactivados de Leptospira canicola, L. grippotyphosa, L. hardjo, L. icterohaemorrhagiae, y L. pomona con un adyuvante patentado.	Merck Animal Health
PROSYSTEM® CE	Un producto purificado, con adyuvante que contiene cuatro antígenos principales de E. coli (K88, K99, F41 y 987P) y toxoide de C. perfringens tipo C.	Merck Animal Health
PROSYSTEM® RCE	La vacuna contra el rotavirus porcino contiene dos serotipos G vivos modificados 5 y 4 del rotavirus de Serogrupo A, en forma desecada. La bacterina-toxoide de C. perfringens-E. coli es un producto líquido purificado y con adyuvante que contiene el toxoide tipo C de C. perfringens y cuatro antígenos principales de pilus de E. coli: K88, K99, F41 y 987P.	Merck Animal Health
PROSYSTEM® TREC	El diluyente de bacterina-toxina (ProSystem® CE) es un producto líquido purificado y con adyuvante que contiene cuatro antígenos de pilus de E. coli principales: K88, K99, F41 y 987P, y toxoide de C. perfringens tipo C	Merck Animal Health
Clostri Shield® 7	Clostri Shield 7 ha demostrado su eficacia contra las bacterias clostridiales causantes de enfermedades. Sistema de adyuvante de doble componente patentado para una respuesta inmune óptima. Altamente aplicable a jeringa/resuspendido fácilmente	Novartis Animal Health
Toxoide de Clostridium Perfringens Tipo A	Toxoide de Clostridium Perfringens Tipo A, contiene un sistema de adyuvante de doble componente patentado	Novartis Animal Health

Los siguientes términos usados en esta memoria descriptiva se reconocen como Marcas registradas:

- 5 "Triton", "Falcon", "UltiMate", "Infors", "Multitron", "LoBind", "Kleenpak", "Eppendorf", "Superose", "Millipore", "Steriflip", "BioTek" y "Tween".

Aspectos descritos

Aspecto 1. Un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio y una proteína,

comprendiendo dicho método

- combinar una sal de aluminio, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa y
- determinar el nivel de un metal pesado en la composición acuosa y/o la sal de aluminio.

5

Aspecto 2. Un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio y una proteína, comprendiendo dicho método

10

- preparar o seleccionar una sal de aluminio que sea capaz de proporcionar una composición acuosa que tenga menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa y
- combinar dicha sal de aluminio, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa.

15

Aspecto 3. Un método de acuerdo con el aspecto 1-2, que comprende además tamponar dicha composición acuosa a un pH de entre 6,5 y 8,5, preferiblemente a un pH entre 7,5 y 8,5.

Aspecto 4. Un método de acuerdo con el aspecto 1-3, que comprende además empaquetar alícuotas de dicha composición acuosa que tiene menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa en recipientes de almacenamiento herméticos por separado.

20

Aspecto 5. Un método para preparar un precipitado de sal de aluminio de calidad clínica para su incorporación en un medicamento y/o vacuna, comprendiendo dicho método preparar una solución acuosa de iones de aluminio y precipitar dichos iones aluminio en dicha solución, y determinar el nivel de un metal pesado en la solución y/o el precipitado de sal de aluminio.

Aspecto 6. Un método de acuerdo con el aspecto 5, en el que se selecciona el precipitado que puede proporcionar una composición acuosa que comprende menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa.

25

Aspecto 7. Una composición acuosa que comprende una proteína y una sal de aluminio, comprendiendo dicha composición menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa.

Aspecto 8. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7, que se ha almacenado a temperaturas superiores a 20 °C durante al menos 1 mes.

30

Aspecto 9. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7 que tiene una vida útil de al menos 20 meses.

Aspecto 10. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-9, en la que dicho metal pesado se selecciona de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V, Cr, Pb, Rb y Mo.

Aspecto 11. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-10, en la que dicho metal pesado se selecciona de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V.

35

Aspecto 12. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-11, en la que dicho metal pesado se selecciona de Cu o Ni.

Aspecto 13. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-12, en la que dicho metal pesado está presente en forma iónica.

40

Aspecto 14. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-13, en la que la sal de aluminio es hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) o fosfato de aluminio (AlPO₄).

Aspecto 15. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-14, que comprende además un compuesto reactivo.

45

Aspecto 16. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 15, en la que el compuesto reactivo se selecciona del grupo que consiste en un compuesto activo redox, un compuesto de formación de radicales, un compuesto estabilizante y una combinación de cualquiera de los mismos.

Aspecto 17. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 15-16, en la que el compuesto reactivo se selecciona del grupo que consiste en formaldehído, etanol, cloroformo, tricloroetileno, acetona, triton-X-100, desoxicolato, pirocarbonato de dietilo, sulfito, Na₂S₂O₅, beta-proprilo-lactona, polisorbato tal como Tween 20®, Tween 80®, O₂, fenol, copolímeros de tipo pluronic, y una combinación de los mismos.

50

Aspecto 18. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-17, que comprende entre 5 µg/ml y 50 mg/ml de aluminio.

Aspecto 19. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-18, que comprende entre 50 µg/ml y 5 mg/ml de aluminio.

55

Aspecto 20. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-19, que comprende entre 5 ppb y 250 ppb de Fe en base al peso de la composición acuosa.

Aspecto 21. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-20, que comprende menos de 3 ppb de Cu en base al peso de la composición acuosa.

Aspecto 22. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-21, que comprende menos de 40 ppb de Ni en base al peso de la composición acuosa.

Aspecto 23. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-22, en la que dicha proteína es un producto terapéutico y/o una vacuna.

Aspecto 24. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-23, en la que dicha proteína es una proteína vírica o bacteriana.

5 Aspecto 25. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-24, en la que dicha proteína vírica es una proteína del virus de la encefalitis japonesa o una proteína de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Aspecto 26. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-25, en la que dicha proteína es proteína dentro de partículas de virus inactivado con formaldehído.

Aspecto 27. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-26, que comprende además sulfito.

10 Aspecto 28. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-27, obtenida por un método de acuerdo con el aspecto 1-6.

Aspecto 29. Una vacuna que comprende una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 7-28.

Aspecto 30. Un concentrado de hidróxido de aluminio que a) comprende 10 mg/ml de dicho hidróxido de aluminio y b) menos de 7 microgramos de metal pesado, para su uso en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para su uso en la fabricación de una vacuna.

15 Aspecto 31. Un concentrado de hidróxido de aluminio que comprende 10 mg/ml de dicho hidróxido de aluminio y menos de 7 microgramos de metal pesado, para su uso en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para su uso en la fabricación de una vacuna.

20 Aspecto 32. Un concentrado de sal de aluminio que comprende menos de 7 ppm de metal pesado basado en el peso del concentrado, para su uso en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para su uso en la fabricación de una vacuna.

Aspecto 33. Un concentrado de sal de aluminio que comprende menos de 700 ppm de metal pesado basado en el peso de la sal de aluminio, para su uso en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para su uso en la fabricación de una vacuna.

25 Aspecto 34. Un concentrado de hidróxido de aluminio que comprende menos de 700 ppm de metal pesado basado en el peso del hidróxido de aluminio, para su uso en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para su uso en la fabricación de una vacuna.

Aspecto 35. Un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, comprendiendo dicho método

30 - preparar o seleccionar una sal de aluminio que sea capaz de proporcionar una composición acuosa que tenga menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa y
- combinar dicha sal de aluminio, dicha proteína, el compuesto reactivo y agua para producir dicha composición acuosa.

35 Aspecto 36. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35, en el que dicho metal pesado se selecciona de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V, Cr, Pb, Rb y Mo.

Aspecto 37. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-36, en el que dicho metal pesado se selecciona de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V.

40 Aspecto 38. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-37, en el que dicho metal pesado se selecciona de Cu o Ni.

Aspecto 39. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-38, en el que dicho metal pesado está presente en forma iónica.

45 Aspecto 40. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-39, en el que la sal de aluminio es hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) o fosfato de aluminio (AlPO₄).

Aspecto 41. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-40, en el que el compuesto reactivo se selecciona del grupo que consiste en un compuesto activo redox, un compuesto de formación de radicales, un compuesto estabilizante y una combinación de cualquiera de los mismos.

50 Aspecto 42. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-41, en el que el compuesto reactivo se selecciona del grupo que consiste en formaldehído, etanol, cloroformo, tricloroetileno, acetona, triton-X-100, desoxicolato, pirocarbonato de dietilo, sulfito, Na₂S₂O₅, beta-propiolactona, polisorbato tal como Tween 20®, Tween 80®, O₂, fenol, copolímeros de tipo pluronic, y una combinación de los mismos.

55 Aspecto 43. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-42, que comprende entre 5 µg/ml y 50 mg/ml de aluminio.

Aspecto 44. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-43, que comprende entre 50 µg/ml y 5 mg/ml de aluminio.

Aspecto 45. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-44, que comprende entre 5 ppb y 250 ppb de Fe en base al peso de la composición acuosa.

Aspecto 46. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-45, que comprende menos de 3 ppb de Cu en base al peso de la composición acuosa.

Aspecto 47. El método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-46, que comprende menos de 40 ppb de Ni en base al peso de la composición acuosa.

5 Aspecto 48. Un método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-47, que comprende además tamponar dicha composición acuosa a un pH de entre 6,5 y 8,5, preferiblemente 7,5 y 8,5.

10 Aspecto 49. Un método para preparar una composición acuosa de acuerdo con el aspecto 35-48, que comprende además empaquetar alícuotas de dicha composición acuosa en recipientes de almacenamiento herméticos por separado.

Aspecto 50. Un método para la prevención y/o el tratamiento de un sujeto que lo necesite que comprende la administración de una composición acuosa que comprende una dosis eficaz de un antígeno, un compuesto de aluminio, un compuesto reactivo y menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa.

15 Aspecto 51. Un método para la prevención y/o el tratamiento de un sujeto que lo necesite que comprende la administración de una dosis eficaz de una composición de acuerdo con el aspecto 7-29.

Un concentrado de hidróxido de aluminio que a) comprende 10 mg/ml de dicho hidróxido de aluminio y b) menos de 7 microgramos de metal pesado, para su uso en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para su uso en la fabricación de una vacuna.

20 Aspecto 52. Un concentrado de hidróxido de aluminio que comprende 10 menos de 1,4 microgramos de metal pesado, para su uso en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para su uso en la fabricación de una vacuna.

Aspecto 53. Un concentrado de sal de aluminio que comprende menos de 1,4 ppm de metal pesado basado en el peso del concentrado, para su uso en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para su uso en la fabricación de una vacuna.

25 Aspecto 54. Un concentrado de sal de aluminio que comprende menos de 140 ppm de metal pesado basado en el peso de la sal de aluminio, para su uso en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para su uso en la fabricación de una vacuna.

30 Aspecto 55. Un concentrado de hidróxido de aluminio que comprende menos de 140 ppm de metal pesado basado en el peso del hidróxido de aluminio, para su uso en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para su uso en la fabricación de una vacuna.

Aspectos adicionales

35 Aspecto adicional 1. Un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, comprendiendo dicho método

- preparar o seleccionar una sal de aluminio que sea capaz de proporcionar una composición acuosa que tenga menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa y

40 - combinar dicha sal de aluminio, dicho compuesto reactivo, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa.

Aspecto adicional 2. Un método de acuerdo con el aspecto adicional 1, que comprende además tamponar dicha composición acuosa a un pH de entre 6,5 y 8,5.

45 Aspecto adicional 3. Un método de acuerdo con el aspecto adicional 1-2, que comprende además empaquetar alícuotas de dicha composición acuosa que tiene menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa en recipientes de almacenamiento herméticos por separado.

50 Aspecto adicional 4. Un método para preparar un precipitado de sal de aluminio de calidad clínica para su incorporación en un medicamento y/o vacuna, comprendiendo dicho método preparar una solución acuosa de iones de aluminio y precipitar dichos iones aluminio en dicha solución, y determinar el nivel de un metal pesado en la solución y/o el precipitado de sal de aluminio, en el que el precipitado que se selecciona es capaz de proporcionar una composición acuosa que comprende menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa.

55 Aspecto adicional 5. Una composición acuosa que comprende una proteína y una sal de aluminio, comprendiendo dicha composición menos de 350 ppb de metal pesado basado en el peso de la composición acuosa.

Aspecto adicional 6. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5, que se ha almacenado a temperaturas superiores a 20 °C durante al menos 1 mes.

Aspecto adicional 7. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-6, en la que dicho

metal pesado se selecciona de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V, Cr, Pb, Rb y Mo.

Aspecto adicional 8. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-7, en la que dicho metal pesado se selecciona de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V.

5 Aspecto adicional 9. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-8, en la que dicho metal pesado se selecciona de Cu o Ni.

Aspecto adicional 10. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-9, en la que dicho metal pesado está presente en forma iónica.

Aspecto adicional 11. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-10, en la que la sal de aluminio es hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) o fosfato de aluminio (AlPO₄).

10 Aspecto adicional 12. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-11, en la que la sal de aluminio es hidróxido de aluminio (Al(OH)₃).

Aspecto adicional 13. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-12, en la que el compuesto reactivo se selecciona del grupo que consiste en un compuesto activo redox, un compuesto de formación de radicales, un compuesto estabilizante y una combinación de cualquiera de los mismos.

15 Aspecto adicional 14. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-13, en la que el compuesto reactivo se selecciona del grupo que consiste en formaldehído, etanol, cloroformo, tricloroetileno, acetona, triton-X-100, desoxicolato, pirocarbonato de dietilo, sulfito, Na₂S₂O₅, beta-propiolactona, polisorbato tal como Tween 20®, Tween 80®, O₂, fenol, copolímeros de tipo pluronic, y una combinación de los mismos.

20 Aspecto adicional 15. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-14, que comprende entre 5 µg/ml y 50 mg/ml de aluminio.

Aspecto adicional 16. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-15, que comprende entre 50 µg/ml y 5 mg/ml de aluminio.

25 Aspecto adicional 17. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-16, que comprende entre 5 ppb y 250 ppb de Fe en base al peso de la composición acuosa.

Aspecto adicional 18. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-17, que comprende menos de 3 ppb de Cu en base al peso de la composición acuosa.

Aspecto adicional 19. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-18, que comprende menos de 40 ppb de Ni en base al peso de la composición acuosa.

30 Aspecto adicional 20. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-19, en la que dicha proteína es un producto terapéutico y/o una vacuna.

Aspecto adicional 21. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-20, en la que dicha proteína es una proteína vírica o bacteriana.

35 Aspecto adicional 22. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-21, en la que dicha proteína vírica es una proteína del virus de la encefalitis japonesa o una proteína de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Aspecto adicional 23. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-22, en la que dicha proteína es proteína dentro de partículas de virus inactivado con formaldehído.

40 Aspecto adicional 24. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-23, que comprende además sulfito.

Aspecto adicional 25. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-24, obtenida por un método de acuerdo con el aspecto adicional 1.

Aspecto adicional 26. Una vacuna que comprende una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 5-24.

45 Aspecto adicional 27. Un método, composición acuosa o vacuna de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos adicionales 1-26, en el que el contenido de metales pesados es menor que 450 ppm basado en el peso del aluminio (gramo/gramo) en la composición acuosa.

50 Aspecto adicional 28. Un método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos adicionales 1-27, en el que el contenido de Fe de la composición acuosa es menor de 700 ppm basado en el peso del aluminio en la composición; el contenido de Ni es inferior a 18 ppm basado en el peso del aluminio en la composición; o el contenido de Cu es inferior a 2,5 ppm basado en el peso del aluminio en la composición acuosa, o una combinación de los mismos.

Aspecto adicional 29. Un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, comprendiendo dicho método

55

- preparar o seleccionar una sal de aluminio que sea capaz de proporcionar una composición acuosa que tenga menos de 450 ppm de metal pesado basado en el peso del aluminio (gramo/gramo) y
- combinar dicha sal de aluminio, dicho compuesto reactivo, dicha proteína y agua para producir dicha composición acuosa.

Aspecto adicional 30. Un método de acuerdo con el aspecto adicional 29, que comprende además tamponar dicha composición acuosa a un pH de entre 6,5 y 8,5.

5 Aspecto adicional 31. Un método de acuerdo con el aspecto adicional 29 o 30, que comprende además empaquetar alícuotas de dicha composición acuosa que tiene menos de 450 ppm de metal pesado basado en el peso del aluminio en la composición en recipientes de almacenamiento herméticos por separado.

10 Aspecto adicional 32. Un método para preparar un precipitado de sal de aluminio de calidad clínica para su incorporación en un medicamento y/o vacuna, comprendiendo dicho método preparar una solución acuosa de iones de aluminio y precipitar dichos iones aluminio en dicha solución, y determinar el nivel de un metal pesado en la solución y/o el precipitado de sal de aluminio, en el que el precipitado que se selecciona es capaz de proporcionar una composición acuosa que comprende menos de 450 ppm de metal pesado basado en el peso de los iones de aluminio (gramo/gramo) en el solución.

15 Aspecto adicional 33. Una composición acuosa que comprende una proteína y una sal de aluminio, comprendiendo dicha composición menos de 450 ppm de metal pesado basado en el peso del aluminio en la composición.

Aspecto adicional 34. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 33, que se ha almacenado a temperaturas superiores a 20 °C durante al menos 1 mes.

Aspecto adicional 35. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 33 o 34, en la que dicho metal pesado se selecciona de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V, Cr y Mo.

20 Aspecto adicional 36. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 33-35, en la que dicho metal pesado se selecciona de Cu, Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V.

Aspecto adicional 37. Una composición acuosa de acuerdo con el aspecto adicional 33-36, en la que dicho metal pesado se selecciona de Cu o Ni.

25 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Valneva Austria GmbH
Möhlen, Michael
Weber, Michael
30 Wruss, Jürgen
Schlegl, Robert

<120> Compuestos de aluminio para su uso en productos terapéuticos y vacunas

35 <130> P96654EP20

<150> EP 11192230.8

<151> 06-12-2011

40 <150> PCT/EP2012/054387

<151> 13-03-2012

<150> EP 12795830.4

<151> 06-12-2012

45 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1

<211> 223

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Proteína de fusión OprF-OprI de pseudomonas ae.

<400> 1

Tabla 21: Resultados del análisis de PSD de la solución madre de Alhydrogel® (2 %) en agua.

N.º	Nombre de muestra	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)	Oscurecimiento (%)
1	AIOH RQCS0890 No irradiado Lote 4230	0,70	2,13	46,53	1,51
2	AIOH RQCS1200 GI Lote 4230	0,71	4,14	69,64	1,98
3	AIOH RQCS1342 GI Lote 4740	0,78	2,23	53,44	2,11
4	AIOH RQCS0448 GI Lote 4074	0,73	4,49	78,58	1,96

d(0,1): El 10 % de todas las partículas medidas tienen un diámetro por debajo de este valor
d(0,5): El 50 % de todas las partículas medidas tienen un diámetro por debajo de este valor
d(0,9): El 90 % de todas las partículas medidas tienen un diámetro por debajo de este valor
Oscurecimiento: Cantidad de reducción de luz láser por muestra; corresponde a la concentración de muestra en la cámara de medición

Tabla 22: Resultados de las curvas de titulación de Alhydrogel® para la determinación de POZ. Las muestras se analizaron en PBS (dilución 1:20).

ID de muestra	PZC (pH)
AIOH RQCS0890 No irradiado Lote 4230	4,58
AIOH RQCS1200 GI Lote 4230	4,62
AIOH RQCS1342 GI Lote 4740	4,49
AIOH RQCS0448 GI Lote 4074	4,48

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa que comprende una proteína y una sal de aluminio, comprendiendo dicha composición menos de 350 ppb de metal pesado y menos de 1,25 ppb de Cu basado en el peso de la composición acuosa, y en la que dicha proteína es una proteína dentro de partículas de virus inactivados con formaldehído.
2. Una composición acuosa de acuerdo con la reivindicación 1, que se ha almacenado a temperaturas superiores a 20 °C durante al menos 1 mes.
- 10 3. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, que comprende menos de 350 ppb de metal pesado, en la que dicho metal pesado se selecciona de Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V, Cr, Pb, Rb y Mo.
4. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, que comprende menos de 350
15 ppb de metal pesado, en la que dicho metal pesado se selecciona de Ni, W, Co, Os, Ru, Cd, Ag, Fe, V.
5. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, que comprende menos de 350 ppb de metal pesado, en la que dicho metal pesado se selecciona de Ni.
- 20 6. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, que comprende menos de 350 ppb de metal pesado, en la que dicho metal pesado está presente en forma iónica.
7. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en la que la sal de aluminio es hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) o fosfato de aluminio (AlPO₄).
25
8. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en la que la sal de aluminio es hidróxido de aluminio (Al(OH)₃).
9. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además un
30 compuesto reactivo seleccionado del grupo que consiste en un compuesto activo redox, un compuesto de formación de radicales, un compuesto estabilizante y una combinación de cualquiera de los mismos.
10. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además un
35 compuesto reactivo seleccionado del grupo que consiste en formaldehído, etanol, cloroformo, tricloroetileno, acetona, polietilenglicol terc-octilfenil éter, desoxicolato, pirocarbonato de dietilo, sulfito, Na₂S₂O₅, beta-propionolactona, polisorbato, opcionalmente Polisorbato 20 o Polisorbato 80, O₂, fenol, copolímeros de tipo pluronic, y una combinación de cualquiera de los mismos.
11. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, que comprende entre 5 µg/ml y
40 50 mg/ml de aluminio.
12. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11, que comprende entre 50 µg/ml y 5 mg/ml de aluminio.
- 45 13. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, que comprende entre 5 ppb y 250 ppb de Fe en base al peso de la composición acuosa.
14. Una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13, que comprende menos de 40
50 ppb de Ni en base al peso de la composición acuosa.
15. Una vacuna que comprende una composición acuosa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14.
16. Un método para preparar una composición acuosa que comprende aluminio, un compuesto reactivo y una proteína, en el que dicho método comprende
55
 - seleccionar una sal de aluminio que sea capaz de proporcionar una composición acuosa que tenga menos de 350 ppb de metal pesado y que tenga menos de 1,25 ppb de Cu basado en el peso de la composición acuosa y
 - combinar dicha sal de aluminio, dicho compuesto reactivo, dicha proteína dentro de partículas de virus

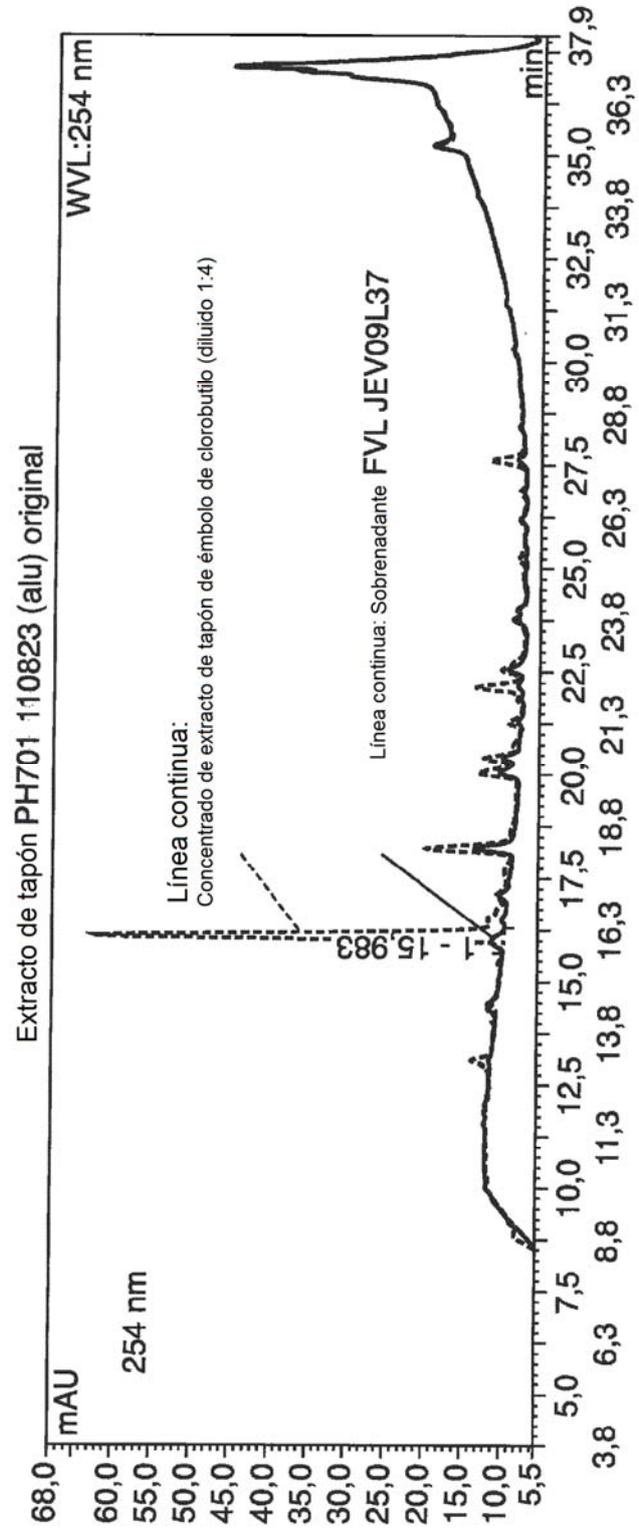
inactivado con formaldehído y agua para producir dicha composición acuosa; y

en el que el compuesto reactivo se selecciona del grupo que consiste en un compuesto activo redox, un compuesto de formación de radicales, un compuesto estabilizante y una combinación de cualquiera de los mismos.

5

17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende además tamponar dicha composición acuosa a un pH de entre 6,5 y 8,5.

Figura 1



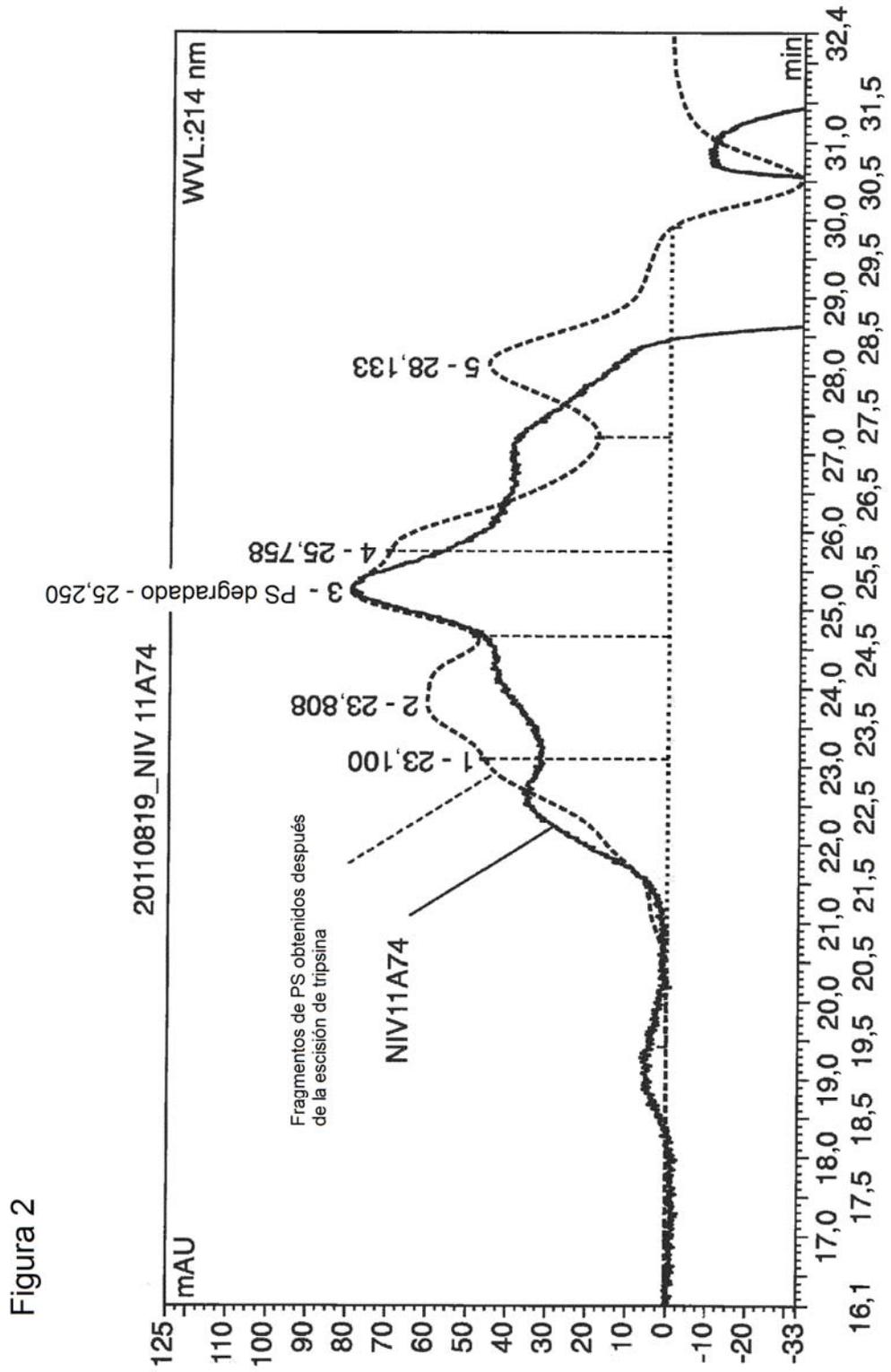


Figura 2

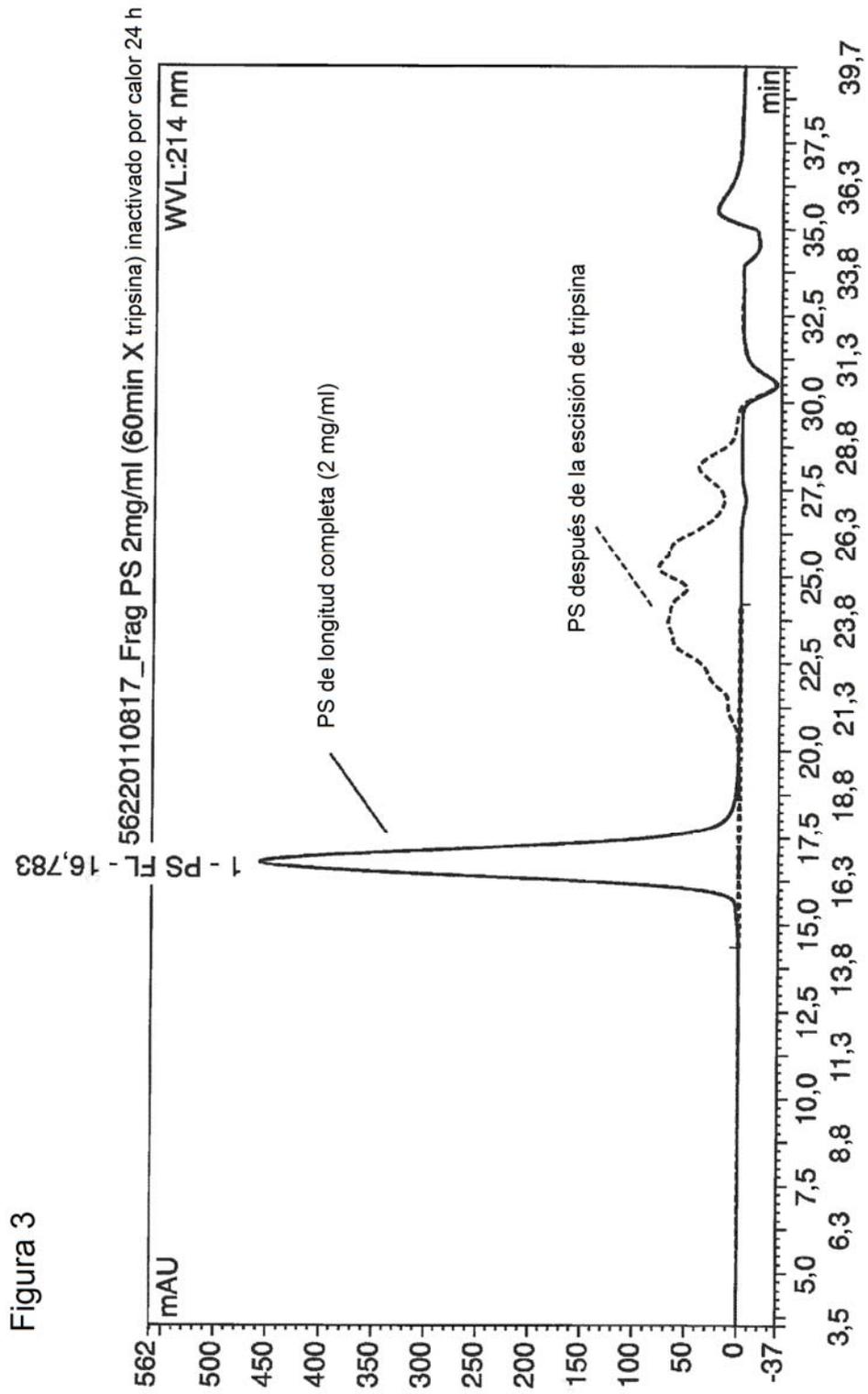


Figura 3

Figura 4

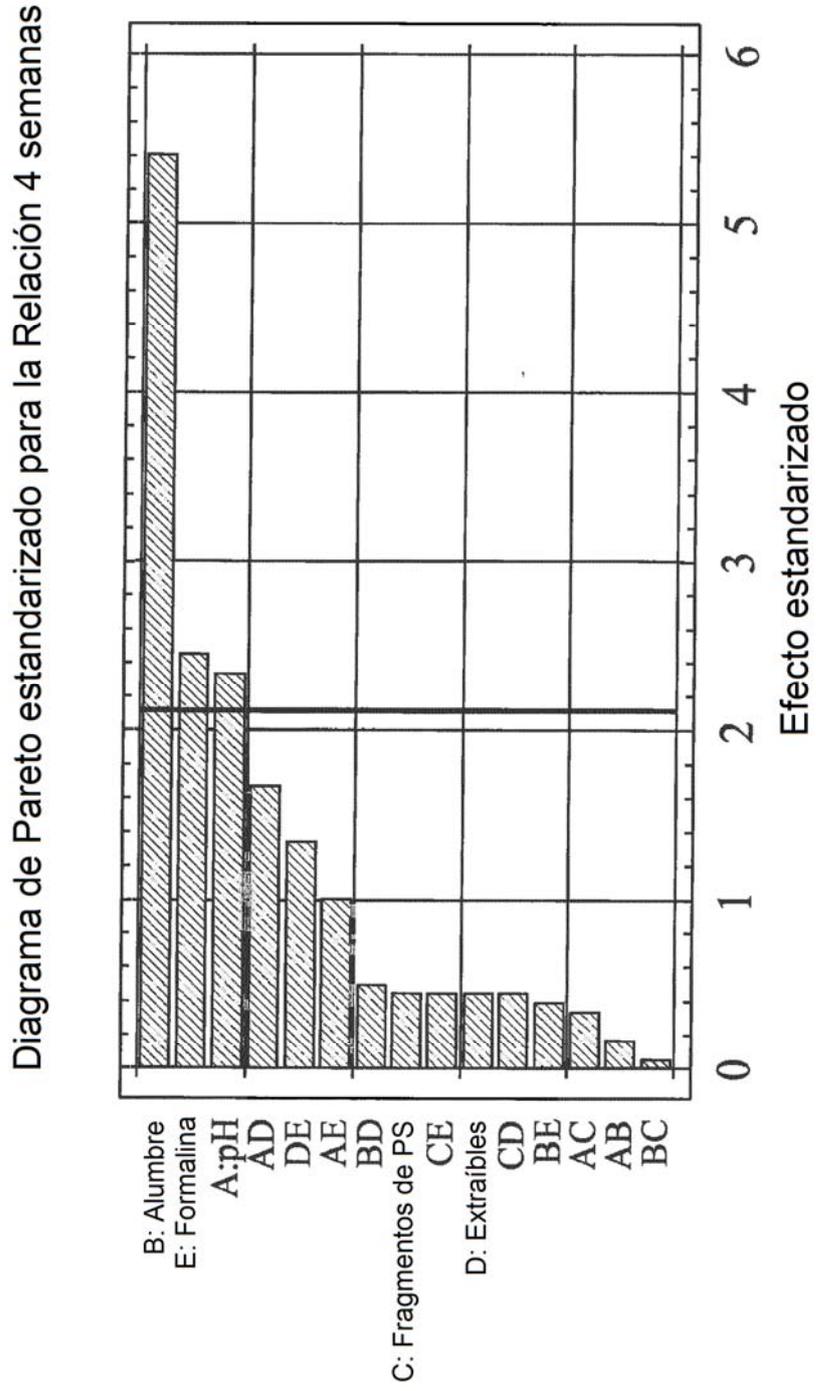
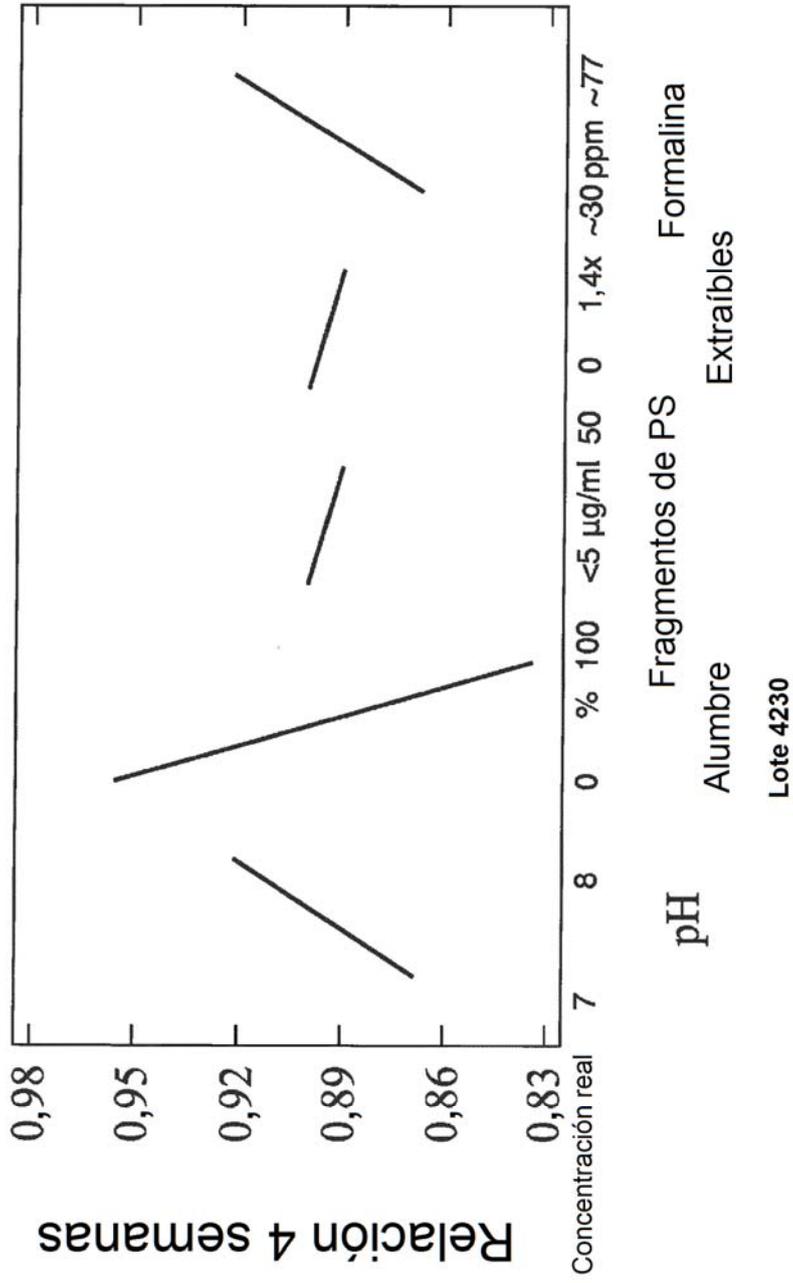


Figura 4 continuación
 Gráfico de efectos principales para la Relación 4 semanas



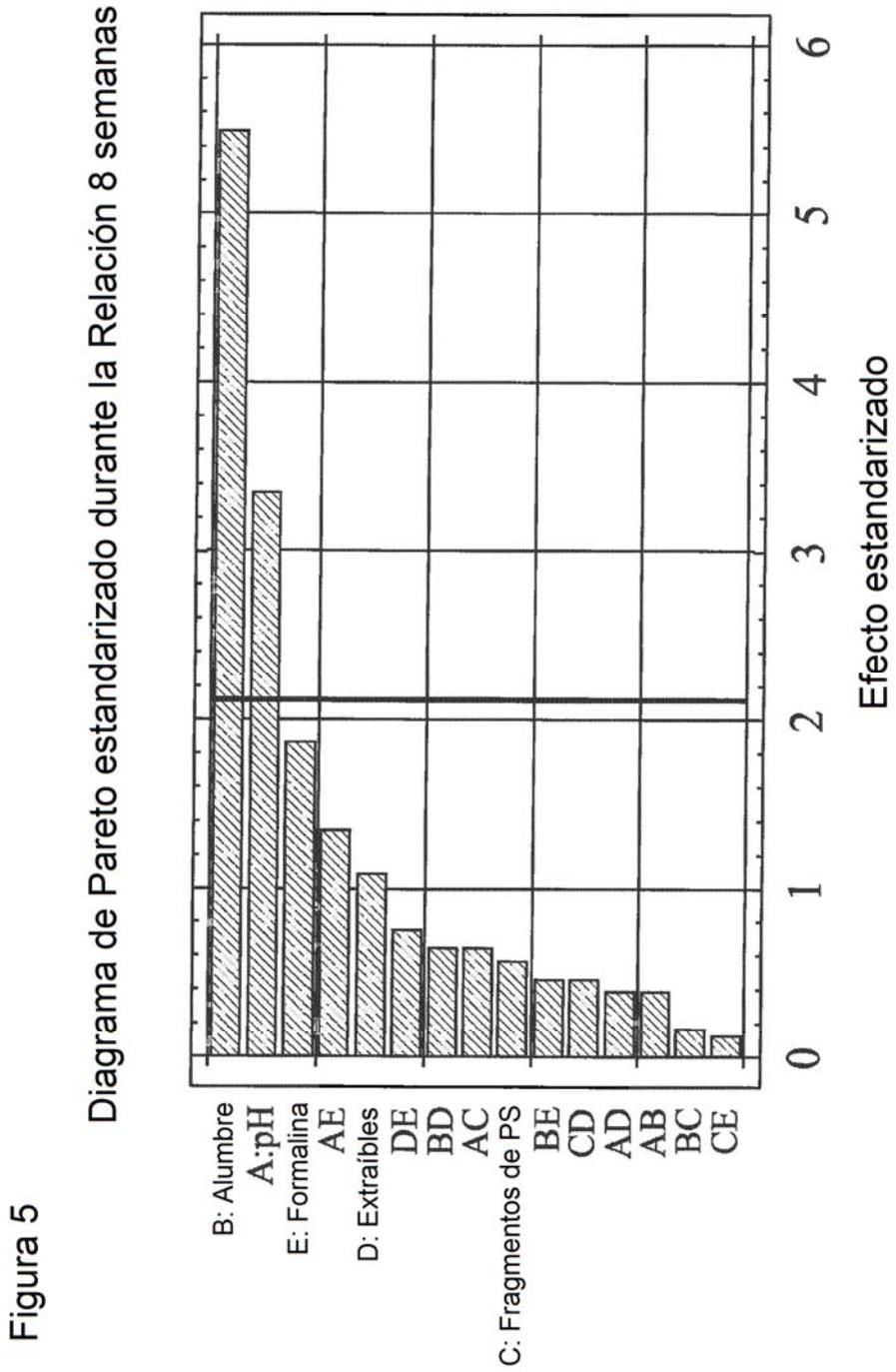
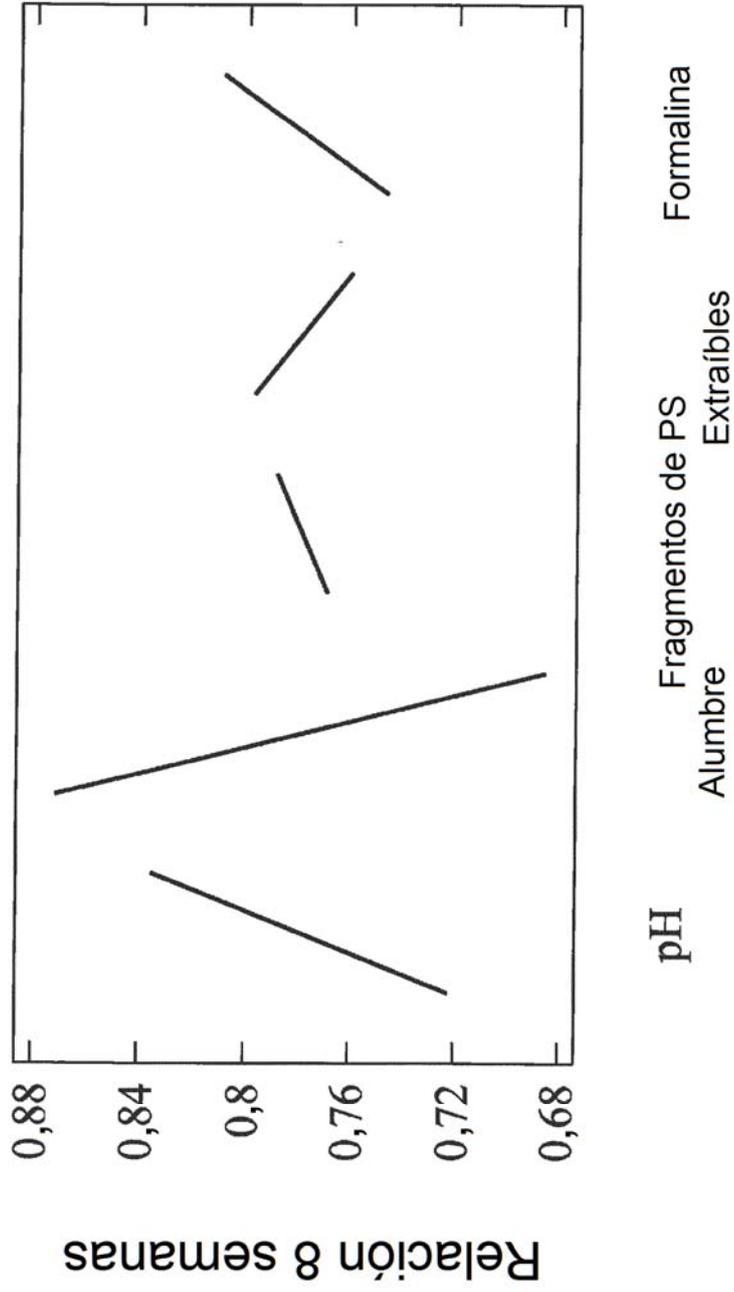


Figura 5 continuación

Gráfico de efectos principales para la Relación 8 semanas



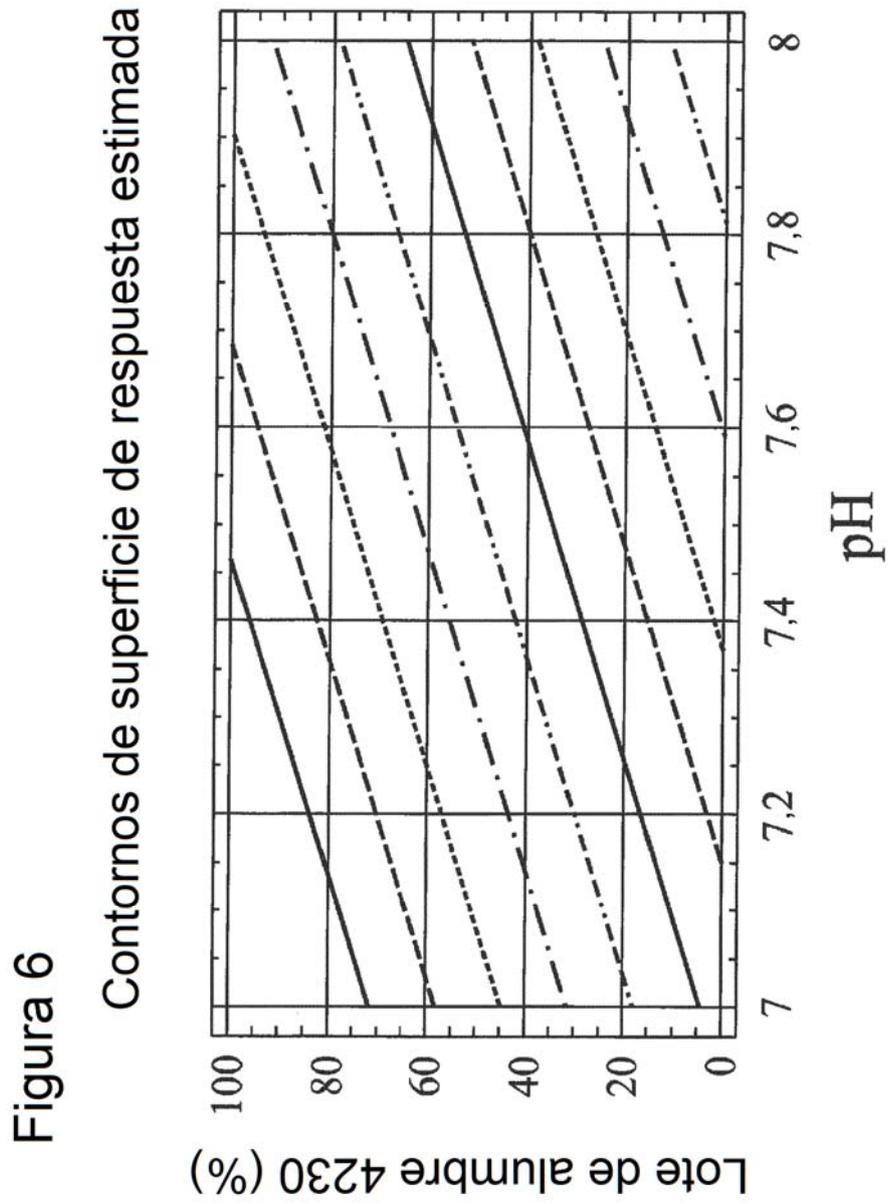


Figura 7

Gráfico residual para la Relación 8 semanas

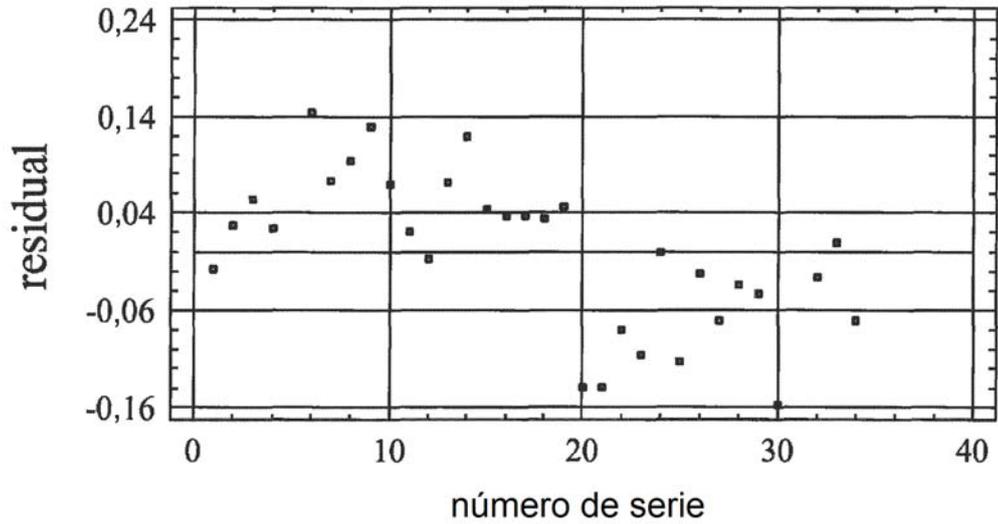
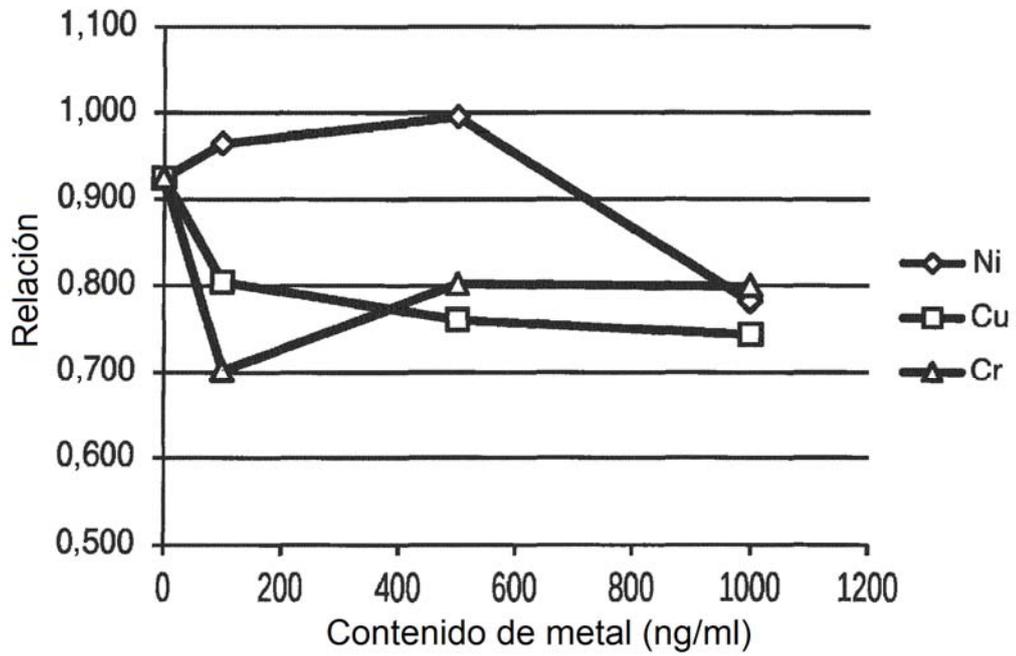


Figura 8



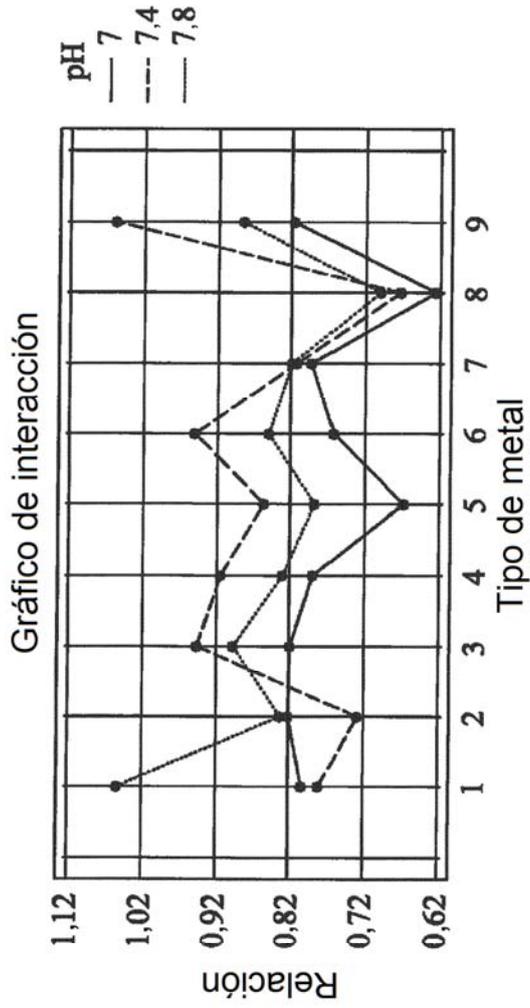


Figura 9

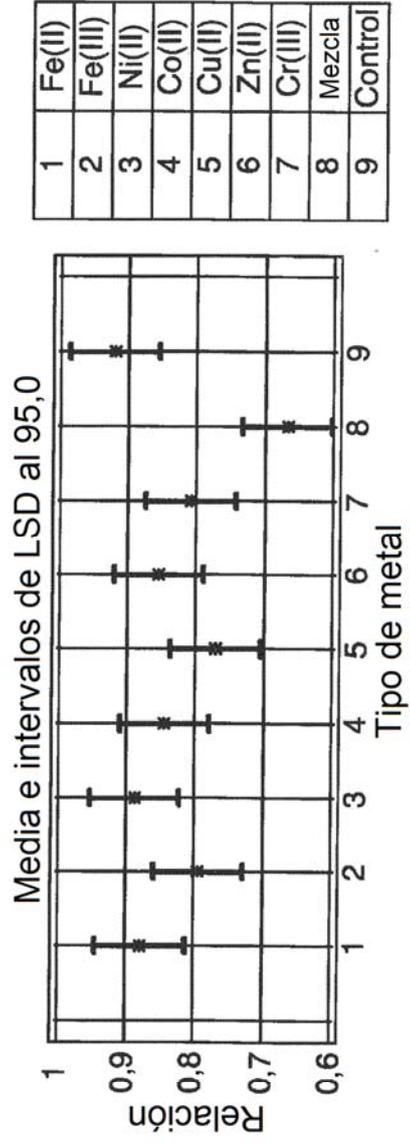


Figura 9 continuación

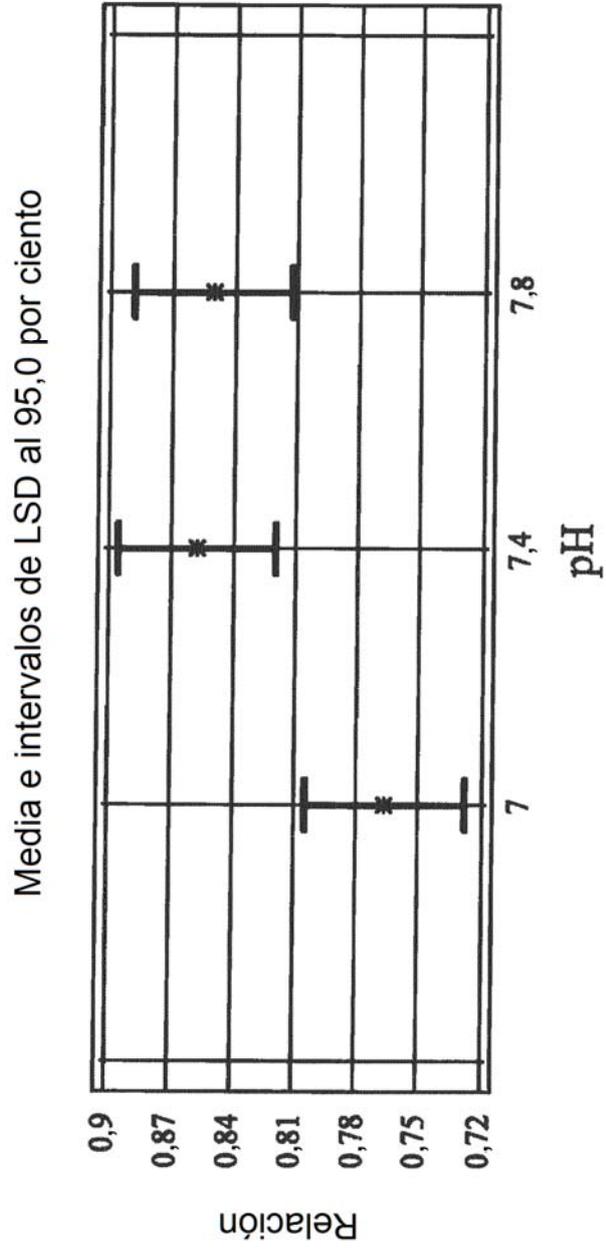
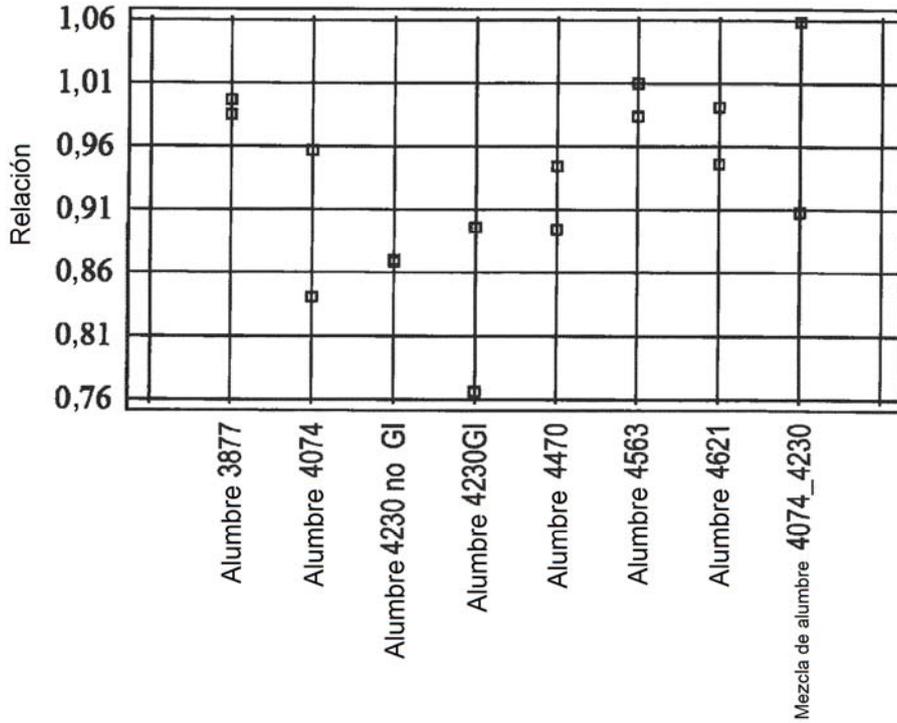


Figura 10 Gráfico de dispersión por muestra



Media y intervalos de confianza al 95,0 por ciento (agrupado)

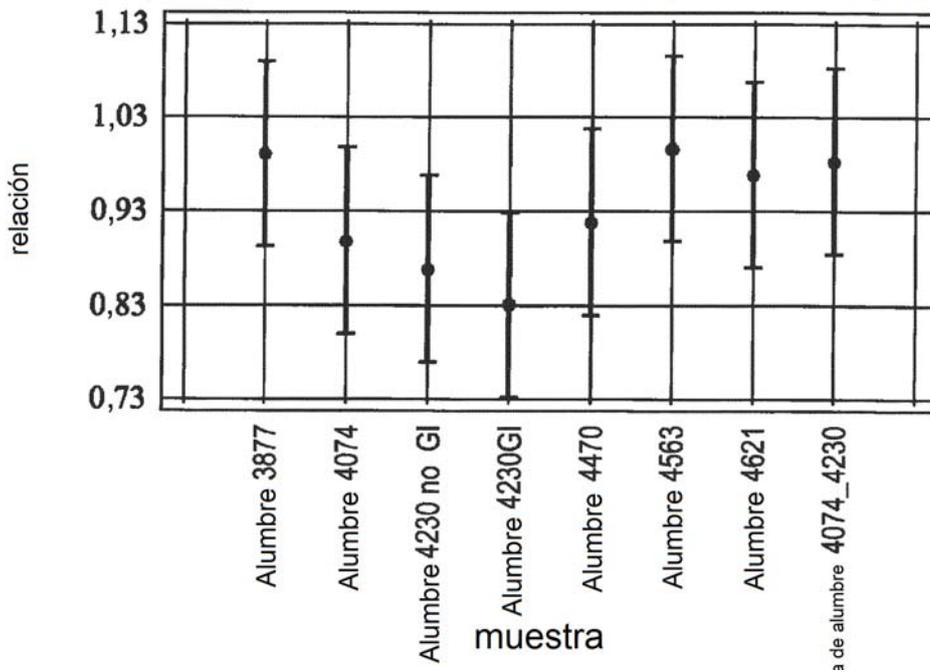
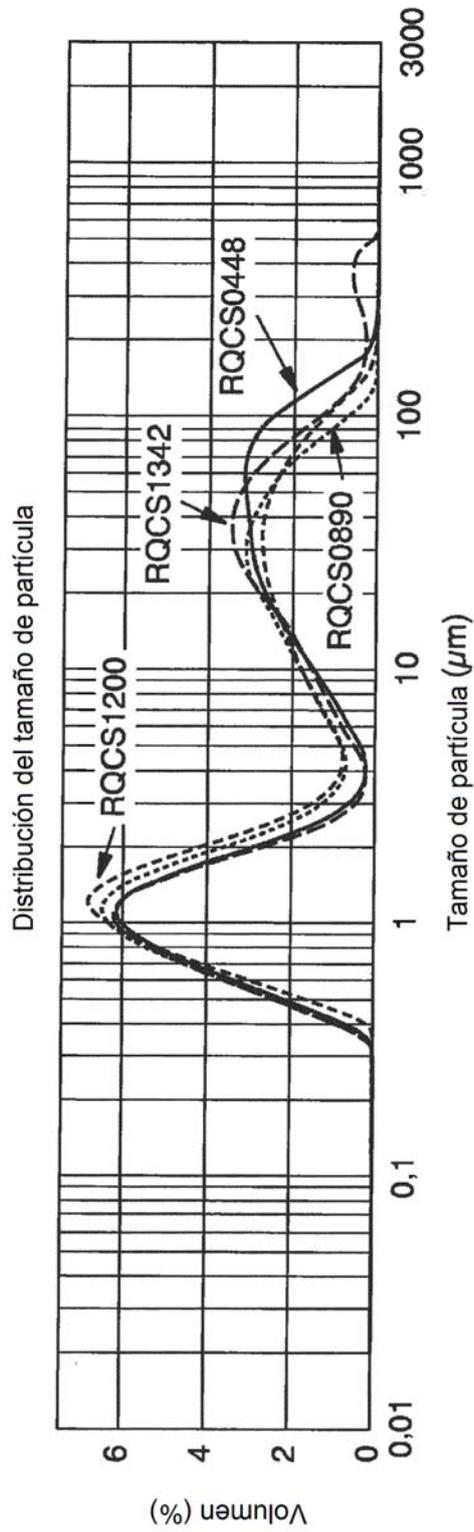


Figura 11



- AIOH no irradiado (RQCS0890), Martes, 14 de junio de 2001, 16:02:14
- GI AIOH (RQCS1200), Martes, 14 de junio de 2001, 16:10:57
- GI AIOH (RQCS1342), Martes, 14 de junio de 2001, 16:06:52
- GI AIOH (RQCS0448), Martes, 14 de junio de 2001, 16:15:18

Gráfico de titulación de pH

Figura 12

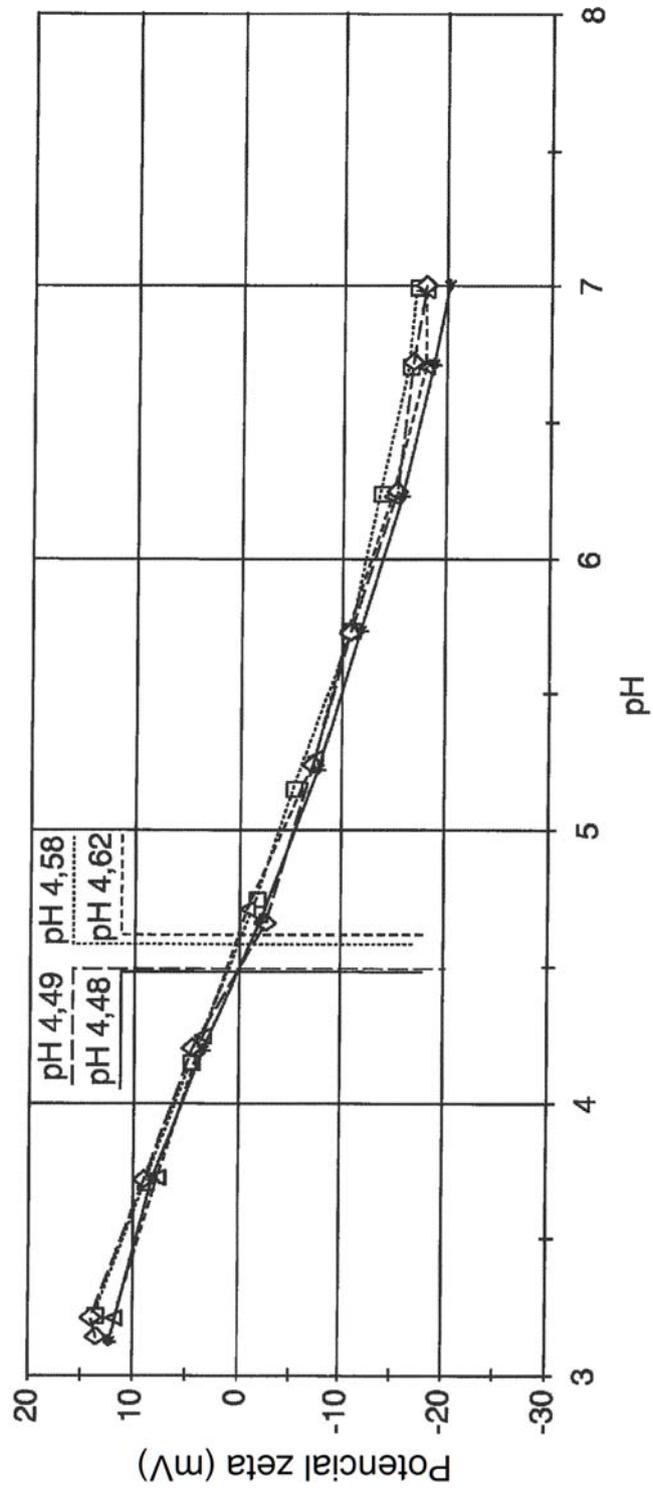


Figura 13

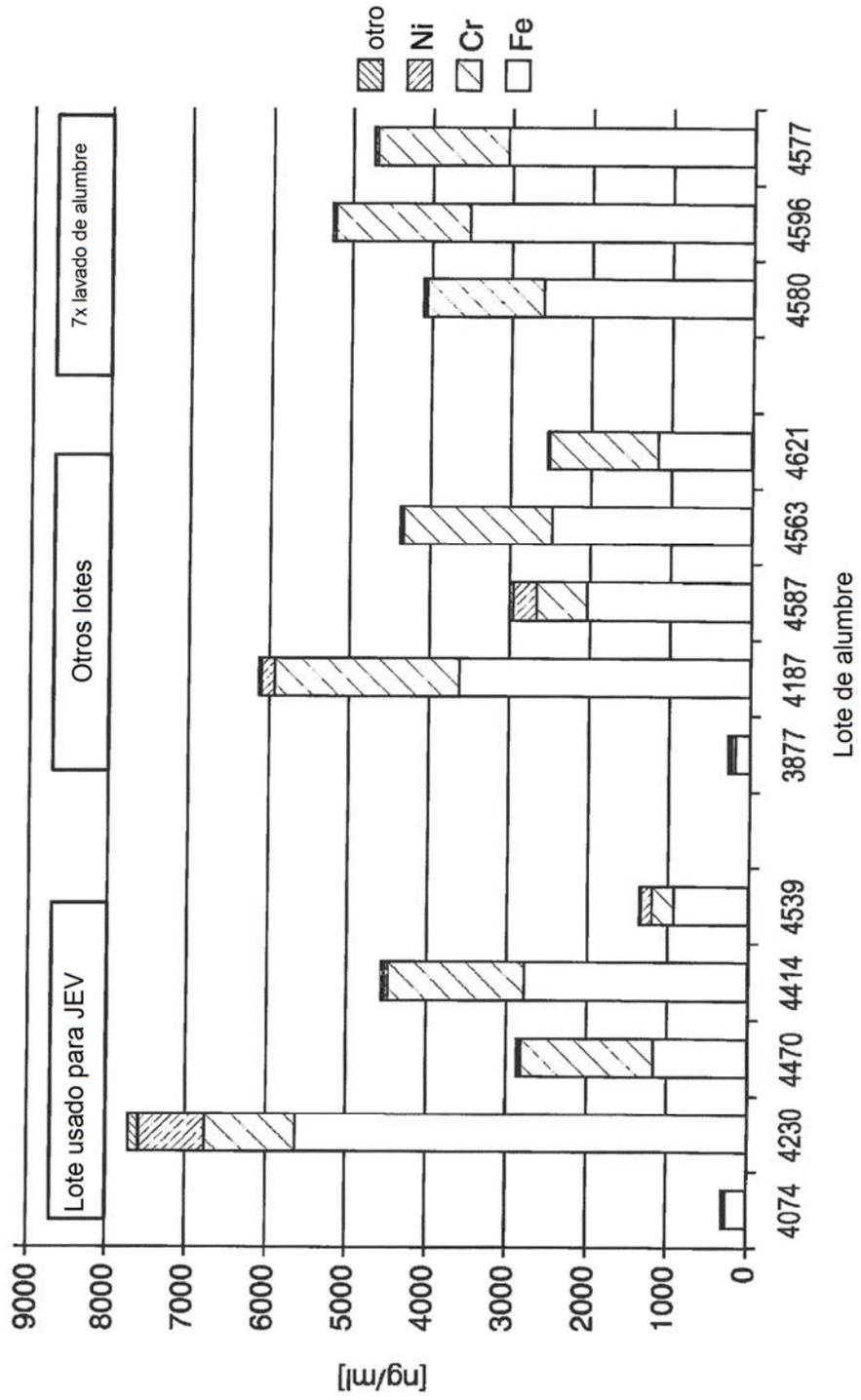


Figura 14

AHHHHHHPAPEPVADVCSDSNDGVCDNVKCPDTPANVTVDANGCPVAEVRVQ
LDVKFDFDKSIKVKENSYADIKNLADFMKQYPSTSTTVEGHTDSVGTDAYNQKLSERRAN
AVRDVLVNEYGVEGGRVNAVGYGESRPVADNATAEGRAINRRVESSHKETEARLTAT
EDAAARAQARADEAYRKADEALGAAQKAQQTADANERALRMLEKASRK