

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 111**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2012 PCT/US2012/065741**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13078102**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2012 E 12851733 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2782594**

54 Título: **Método para la preparación de adyuvante de hidroxifosfato de aluminio**

30 Prioridad:

23.11.2011 US 201161563213 P

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

30.10.2019

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065-0907, US**

72 Inventor/es:

**THIRIOT, DAVID, S.;
AHL, PATRICK, L.;
CANNON, JAYME y
LOBEL, GABRIEL, M.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 729 111 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la preparación de adyuvante de hidroxifosfato de aluminio

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para preparar hidroxifosfato de aluminio amorfo manteniendo una relación molar constante de fosfato/aluminio (P/Al) y pH a lo largo de toda la reacción. Los métodos son particularmente aplicables para la fabricación a gran escala de adyuvante de hidroxifosfato de aluminio. El hidroxifosfato de aluminio se usa habitualmente como adyuvante en las formulaciones de vacunas, particularmente aquellas que incluyen antígenos de proteínas o sacáridos.

Antecedentes de la invención

15 Las vacunas han usado tradicionalmente inmunógenos complejos tales como virus o bacterias inactivados para inducir una respuesta inmune. Dichas vacunas a menudo se asociaban con efectos secundarios adversos que incluyen hipersensibilidad y el riesgo asociado con la inactivación incompleta. El uso de vacunas de subunidades, como las vacunas basadas en antígenos, ha reducido el número y la gravedad de los efectos secundarios no deseados asociados con las vacunas producidas con inmunógenos más complejos. Las vacunas de subunidades generalmente están compuestas de una o pocas proteínas o polisacáridos del patógeno objetivo. Algunas vacunas pueden tener un mayor número de proteínas o polisacáridos para proporcionar inmunidad contra un gran número de serotipos relacionados. Debido a su pequeño tamaño y número limitado de epítomos, por sí mismas, las vacunas de subunidades tienden a ser solo débilmente inmunogénicas, a menudo no induciendo una respuesta inmune satisfactoria. Para ser efectivas, el uso de vacunas de subunidades requiere estrategias para mejorar la inmunogenicidad.

Un medio para mejorar la inmunogenicidad de la vacuna es mediante el uso de adyuvantes específicos. Los adyuvantes inmunológicos son el componente o componentes de una vacuna que aumenta la respuesta inmune al antígeno. Las sales de aluminio precipitadas, referidas genéricamente, en singular, en el campo de los adyuvantes de vacunas como adyuvante de aluminio o "alumbre", son los adyuvantes más utilizados en las vacunas humanas. Sin querer limitarse a la teoría, se han propuesto varias teorías sobre cómo los adyuvantes de aluminio estimulan el sistema inmunológico. Una de esas teorías es que el adyuvante de aluminio proporciona un depósito de antígeno en el sitio de administración, lo que proporciona una liberación gradual y continua de antígeno para estimular la producción de anticuerpos. Los adyuvantes de aluminio también pueden funcionar al inducir una reacción de inflamación leve en el lugar de la inyección que estimula principalmente las células IL-4 y T-helper-2 que mejoran la producción de IgG1 e IgE. Un adyuvante de aluminio común es el hidróxido de aluminio (Al(OH)) que es Al⁺³ precipitado con OH⁻. Otro adyuvante de aluminio común es el hidroxifosfato de aluminio que se forma precipitando Al⁺³ con PO₄⁻ y OH⁻. El hidroxifosfato de aluminio (Al(OH)_x(PO₄)_y) no tiene una estequiometría fija. La relación molar de P/Al en el adyuvante de aluminio puede variar desde poco más de 0 (similar al hidróxido de aluminio) hasta aproximadamente 1 (similar al fosfato de aluminio). El grado y la fuerza de la unión del antígeno al adyuvante de aluminio están influenciados por las propiedades del adyuvante de aluminio, particularmente la composición química que se define habitualmente por la relación molar de P/Al junto con la carga superficial y el tamaño de la partícula de adyuvante primario de aluminio.

45 El hidroxifosfato de aluminio se prepara más comúnmente mediante un método de precipitación por lotes con tres reactivos: cloruro de aluminio (u otra fuente de aluminio, como el sulfato de potasio y aluminio), fosfato de sodio y una base como el hidróxido de sodio. Durante el transcurso de una precipitación por lotes, la composición de la mezcla de reacción puede cambiar drásticamente, lo que lleva a una producción de adyuvante que es algo diferente desde el inicio del lote hasta el final del lote. El resultado puede ser una mezcla heterogénea con algún tipo de "promedio" de propiedades. Ver Klein et al., 2000, J. Pharmaceutical Sciences 89: 311-321. No es sorprendente que entre los fosfatos de aluminio disponibles en el mercado de diferentes proveedores, las propiedades puedan variar significativamente. Por ejemplo, los hidroxifosfatos de aluminio pueden tener relaciones molares de fosfato a aluminio en los sólidos precipitados desde significativamente menos de 0,9 a más de 1. Otros demuestran una baja uniformidad en el tamaño de las partículas. Estas variaciones pueden presentar problemas de consistencia para la venta comercial de vacunas.

La precipitación del lote de alimentación a un pH constante mejora esta situación, pero requiere un circuito de retroalimentación de control de pH activo. Ver Burrell et al., 2001, Vaccine 19: 275-281 y Burrell et al., 2001, Vaccine 19: 282-287.

60 El documento WO2009/009629 describe un proceso en el que se produjo una solución de cloruro de aluminio. Esta solución se transfirió a un recipiente. Se produjo otra solución de fosfato de sodio tribásico. La solución tribásica de fosfato de sodio también se transfirió al recipiente y ambas soluciones se mezclaron. Los valores de pH se ajustaron al pH objetivo de 5,2 mediante la adición de más fosfato sódico tribásico. Lo que se necesita son métodos más robustos y reproducibles para la fabricación de fosfato de aluminio para su uso como adyuvante.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para la preparación de adyuvante de hidroxifosfato de aluminio de una manera que mantenga unas condiciones de reacción relativamente constantes durante el transcurso del proceso combinando simultánea y continuamente los reactivos durante el proceso, es decir, mezclando conjuntamente los reactivos. Por consiguiente, la presente invención comprende las siguientes etapas para la producción de adyuvante de hidroxifosfato de aluminio:

(a) mezclar conjuntamente una solución de sal de aluminio disuelta (1) con una solución de fosfato (2) en una relación molar de P/Al definida para precipitar adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, en presencia de un tampón (3) que mantiene un pH constante en el que dicha mezcla conjunta implica la combinación simultánea y continua de la solución de la sal de aluminio y la solución del fosfato en una relación de reactivo constante; en el que la relación de P/Al definida está en el intervalo de 2,0-3,5; en el que la solución de fosfato tiene un pH de 7,4 a 12,4, de 8,0 a 10,0, o de 8,5 a 9,5; y en el que el tampón es el mismo que la solución de fosfato; y

(b) intercambio de tampón con una solución de intercambio de tampón (4) para eliminar al menos el 80 % del exceso de fosfato (2), tampón (3) u otras sales residuales de los reactivos originales.

En ciertas realizaciones de la invención, la solución de fosfato se selecciona entre ácido fosfórico y formas de fosfato de sodio, fosfato de potasio o fosfato de amonio, y una combinación de los mismos. Por ejemplo, la solución de fosfato puede ser fosfato sódico monobásico, fosfato sódico dibásico, fosfato sódico tribásico, ácido fosfórico, fosfato potásico monobásico, fosfato potásico dibásico, fosfato potásico tribásico, fosfato amónico monobásico, fosfato amónico dibásico, fosfato amónico tribásico, fosfato de sodio y amonio, y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, la solución de fosfato comprende fosfato sódico dibásico.

En ciertas realizaciones de la invención, la sal de aluminio se selecciona entre cloruro de aluminio, sulfato de potasio y aluminio, sulfato de aluminio y amonio, nitrato de aluminio, bromuro de aluminio, bromato de aluminio, clorato de aluminio o yoduro de aluminio, y diferentes formas de hidratos de estos. Una sal de aluminio a modo de ejemplo es cloruro de aluminio hexahidratado.

En ciertas realizaciones para producir hidroxifosfato de aluminio, la mezcla conjunta implica una relación molar de fosfato a aluminio (condiciones de reacción iniciales) de 2,0-3,5. En estas realizaciones, se puede imponer un límite superior de 4,0, 5,0, 5,5 o 6,0.

En ciertas realizaciones de la invención, el adyuvante de hidroxifosfato de aluminio tiene una o más de las siguientes propiedades:

Potencial Zeta del punto de carga cero (PZC) de 4,2 a 6,9, de 4,7 a 6,4, o de 4,7 a 5,4;

Diámetro medio del volumen del tamaño de partícula agregado ($d(v,0,5)$ medido, por ejemplo, por dispersión de luz estática) inferior a 40 micrómetros, y más preferiblemente de 2 a 10 micrómetros, especialmente en el intervalo de 3 a 6 micrómetros;

pH en el intervalo de 3,0 a 8,0, más preferiblemente de 4,5 a 7,2 y especialmente de 4,5 a 5,5; o

La relación molar de P/Al medida en el sólido precipitado final de 0,6-1,2; en ciertas realizaciones, se prefiere de 0,8-1,2 y especialmente el intervalo de 0,9-1,1.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además realizar una reducción de tamaño antes de la etapa (b) para reducir el diámetro medio del volumen ($d(v,0,5)$) de los agregados de adyuvantes de aluminio de aproximadamente 10 a 40 micrómetros a aproximadamente 2 a 10 micrómetros o de 3 a 6 micrómetros, según lo determinado por la dispersión de la luz estática. El diámetro medio del volumen, $d(v,0,5)$, es el diámetro al que el 50 % de la distribución está por encima y el 50 % está por debajo de este diámetro. A menos que se indique lo contrario, la referencia al tamaño de partícula agregado se refiere al diámetro medio del volumen medido por Dispersión de luz estática (SLS).

El intervalo de tamaño de partícula típico de los agregados adyuvantes después de la precipitación es de 2 a 40 micrómetros. Este tamaño de partícula depende de las condiciones de precipitación, como la concentración de reactivo y las condiciones de mezcla. Si es necesario, la reducción del tamaño puede realizarse mediante métodos como el uso de un mezclador de rotor-estator, una mezcla vigorosa con un impulsor o la recirculación a través de una bomba. La etapa de reducción de tamaño también garantiza un tamaño de partícula agregado consistente entre lotes.

La etapa final de intercambio de tampón ajustará las concentraciones finales de osmolitos a los valores finales deseados (los de la solución de intercambio de tampón (4)). Las soluciones de intercambio de tampón preferidas incluyen solución salina e histidina. En una realización, la solución de intercambio de tampón para el intercambio de tampón (4) es solución salina. En una realización, la concentración de sal (cloruro de sodio) se ajusta al 0,9 % en

p/v. Este intercambio de tampón se puede llevar a cabo mediante un método de sedimentación/decantación o mediante ultrafiltración. Por lo general, se prefiere la ultrafiltración, ya que es mucho más rápida que la sedimentación/decantación. En ciertas realizaciones, el grado de intercambio de tampón de ultrafiltración es de 4 a 15 diavolumenes o de 5 a 7 diavolumenes

5 Además, el método puede comprender además esterilizar la solución después de la etapa (b). La esterilización se puede realizar mediante métodos como el autoclave o la esterilización *in situ* en el tanque de procesamiento. Un método para realizar la esterilización *in situ* es calentar el producto a una temperatura controlada durante un tiempo específico vaporizando la camisa del tanque y/o el espacio de cabeza. El producto se enfría rápidamente recirculando agua fría, glicol u otro medio de enfriamiento a través de la camisa.

Breve descripción de los dibujos

15 **FIGURA 1.** El pH del adyuvante de fosfato de aluminio (después del intercambio de tampón, sin autoclavado) en función del pH del reactivo de fosfato de sodio y la relación molar de P/Al de las dos soluciones de reactivo. Las posiciones del espacio de reacción de los puntos de datos medidos se indican mediante los símbolos **x**. La superficie del contorno se ajustó utilizando 22 puntos de datos de los conjuntos de muestras A y B.

20 **FIGURA 2.** El pH del adyuvante de fosfato de aluminio (después del intercambio de tampón, después del autoclavado) en función del pH del reactivo de fosfato de sodio y la relación molar de P/Al de las dos soluciones de reactivo. Las posiciones del espacio de reacción de los puntos de datos medidos se indican mediante los símbolos **x**. La superficie del contorno se ajustó utilizando 19 puntos de datos de los conjuntos de muestras A, B y C.

25 **FIGURA 3.** El PZC de adyuvante de fosfato de aluminio (después del intercambio de tampón, sin autoclavado) en función del pH del reactivo de fosfato de sodio y la relación molar de P/Al de las dos soluciones de reactivo. Las posiciones del espacio de reacción de los puntos de datos medidos se indican mediante los símbolos **x**. La superficie del contorno se ajustó utilizando 22 puntos de datos de los conjuntos de muestras A y B.

30 **FIGURA 4.** El **PZC** de adyuvante de fosfato de aluminio (después del intercambio de tampón, después del autoclavado) en función del pH del reactivo de fosfato de sodio y la relación molar de P/Al de las dos soluciones de reactivo. Las posiciones del espacio de reacción de los puntos de datos medidos se indican mediante los símbolos **x**. La superficie del contorno se ajustó utilizando 24 puntos de datos de los conjuntos de muestras A, B y C.

35 **FIGURA 5.** La relación molar de P/Al en los sólidos adyuvantes de aluminio precipitados en función del pH del reactivo de fosfato de sodio y la relación molar de P/Al de las dos soluciones de reactivo. Las posiciones del espacio de reacción de los puntos de datos medidos se indican mediante los símbolos **x**. La superficie del contorno se ajustó utilizando 34 puntos de datos de los conjuntos de muestras A, B, C, D y E.

40 **FIGURA 6.** Comparación de mediciones de pH para muestras de adyuvantes fabricadas en "en lotes" y "mezcla conjunta".

45 **FIGURAS 7A-B.** Comparación de las mediciones del potencial zeta de PZC (punto de carga cero) para (A) "en lotes" y (B) "mezcla conjunta" de muestras de adyuvantes fabricadas

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se refiere a métodos para la preparación de adyuvante de hidroxifosfato de aluminio. La invención se basa, en parte, en cómo se controlan ciertos parámetros durante la reacción de precipitación con hidroxifosfato de aluminio, que incluyen la relación molar de fosfato a aluminio en la reacción y el pH al que tiene lugar la reacción de precipitación. Para un caso general, el pH al que tiene lugar la reacción se controla mediante la relación molar de fosfato a aluminio en la reacción, el pH y la capacidad del tampón de una solución tamponada de fosfato. Como el fosfato se usa sin un tampón o tampones adicionales, la invención se basa, en parte, en el control de dos parámetros de reacción: (1) la relación molar de solución de reactivo de fosfato a solución de reactivo de sal de aluminio; y (2) el pH de la solución de reactivo de fosfato. Se usaron mapas espaciales de reacción para predecir cómo la elección de estos dos parámetros da como resultado las propiedades finales del adyuvante. Los métodos de la invención también usan la "mezcla conjunta" como método de mezcla de reactivos que mejora la reproducibilidad y robustez de la fabricación. Los métodos de la invención son particularmente adecuados para la fabricación a gran escala.

65 Algunas ventajas del presente método sobre otros métodos incluyen, (1) el uso de solo dos corrientes de reactivos (una sal de aluminio y una solución de fosfato o solución de fosfato tamponada), (2) el mantenimiento constante del pH durante la precipitación por medios pasivos, (3) el control y la consistencia del tamaño de partícula agregado, y (4) la concentración e intercambio de tampón mediante ultrafiltración.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención para la preparación de adyuvante de hidroxifosfato de aluminio proporcionan un medio conveniente para fabricar adyuvante de fosfato de aluminio con las propiedades físico-químicas deseadas, y un medio conveniente para optimizar estas propiedades para diferentes usos previstos, basado en la elección de la relación molar de fosfato a aluminio en la reacción, y el pH de la solución de reactivo de fosfato. Por ejemplo, cuando la mezcla conjunta implica una relación molar de fosfato a aluminio en las soluciones de reactivo en el intervalo de 1,5 a 4,0 y un pH del reactivo de fosfato de 7,4 a 12,4, los valores de ciertos parámetros físico-químicos para el adyuvante de fosfato de aluminio podrían controlarse dentro de los siguientes intervalos:

- Relación molar de P/Al en el sólido precipitado: 0,6 a 1,2 (téngase en cuenta que la relación molar de P/Al en el sólido precipitado es diferente a la relación molar de P/Al en las soluciones de reacción iniciales);
- potencial zeta del punto de carga cero (PZC): 4,2 a 6,9; y
- pH de los sólidos precipitados en agua o solución salina (sin tampón adicional): 3,0 a 8,0. Téngase en cuenta que el pH del adyuvante final podría ajustarse posteriormente si se desea.

Una razón para modular las propiedades físico-químicas del adyuvante sería mejorar la adsorción del antígeno a las partículas de adyuvante. Puede desearse una mayor adsorción para mejorar la estabilidad o inmunogenicidad de la vacuna. En los casos en que el mecanismo de adsorción es electrostático, el punto de carga cero del adyuvante ayuda a predecir el grado de adsorción a un pH dado. Por lo tanto, el control del punto de carga cero permite la optimización de la adsorción de antígenos.

Otro parámetro que podría optimizarse a través de este método sería el pH. Dependiendo de los detalles del proceso de formulación de la vacuna posterior, puede ser deseable un cierto pH del adyuvante. Es posible usar los métodos descritos para apuntar a un pH adyuvante específico sin hacer un ajuste de pH separado más adelante en el proceso.

Como se usa en este documento, "mantiene un pH constante" se refiere al pH que se mantiene dentro de un intervalo estrecho, por ejemplo, $\pm 0,10$, $\pm 0,20$, o $\pm 0,50$ unidades de pH a lo largo del tiempo después de que el pH se haya equilibrado después de la adición inicial de aluminio y la solución de fosfato. El pH se mantiene sin ningún ajuste de pH con, por ejemplo, NaOH.

Para una elección dada de las condiciones de reacción (por ejemplo, la elección de la relación de P/Al en las soluciones de reactivo y la elección del pH de la solución de fosfato), también se espera que el adyuvante de fosfato de aluminio producido por los métodos de la invención tenga una reproducibilidad superior (desviación típica entre lotes) en comparación con los métodos anteriores. La evidencia de una consistencia mejorada en el producto final para pH y PZC se detalla en el Ejemplo 2. Esta mejora en la reproducibilidad puede deberse al hecho de que un producto más homogéneo se precipita durante la mezcla conjunta en comparación con un producto precipitado durante un proceso por lotes.

Si bien el adyuvante de hidroxifosfato de aluminio es el término preciso, un término comúnmente utilizado en la técnica para este adyuvante es adyuvante de fosfato de aluminio. Como se usa en este documento, fosfato de aluminio se refiere a adyuvante de hidroxifosfato de aluminio.

Reactivos

La preparación del adyuvante de fosfato de aluminio requiere una fuente de aluminio, una fuente de fosfato y suficiente base para permitir que la reacción continúe. La relación final de fosfato/aluminio (P/Al) de los sólidos adyuvantes de fosfato de aluminio controla las características físico-químicas y de unión al antígeno del adyuvante. Los métodos de la presente invención permiten la preparación de hidroxifosfato de aluminio en la relación molar de P/Al deseada. En una realización de la invención que pretende producir una relación de P/Al deseada típica, el adyuvante de fosfato de aluminio puede tener una relación de P/Al final de 0,8 a 1,2. Preferiblemente, la relación de P/Al final está en el intervalo de 0,9 a 1,1. Para muchas aplicaciones de vacunas, la relación molar deseada de P/Al objetivo típica será de aproximadamente 1; sin embargo, este objetivo dependerá de las propiedades del antígeno y del grado deseado de adsorción del antígeno al adyuvante. La variabilidad aceptable incluiría $\pm 0,10$, $\pm 0,15$ y $\pm 0,20$ dependiendo de la aplicación y la precisión del ensayo utilizado para medir esta relación molar.

Para producir un adyuvante de fosfato de aluminio con una alta relación de P/Al consistente, se debe minimizar la competencia de ligandos de aluminio distintos al fosfato durante la reacción de precipitación. La otra competencia relevante a tener en cuenta es entre el fosfato y el hidróxido para unirse al aluminio. La relación de P/Al se maximiza al realizar la precipitación a concentraciones más bajas de hidróxido en competencia (en otras palabras, a un pH más bajo) y también se ve aumentada por concentraciones más altas de fosfato. La cantidad de fosfato se selecciona preferiblemente para proporcionar un exceso de fosfato sobre el aluminio. Por ejemplo, la relación molar inicial de fosfato a aluminio en los reactivos es de 2,0 a 3,5. En ciertas realizaciones, las relaciones molares especialmente preferidas son de 2,0, 2,5, 3,0 y 3,5. La variabilidad aceptable incluiría $\pm 0,05$, $\pm 0,10$, $\pm 0,15$ y $\pm 0,20$. La relación molar del reactivo objetivo se logra habitualmente ajustando las concentraciones de solución de aluminio y fosfato y los caudales volumétricos durante la mezcla conjunta de las soluciones. En una realización preferida de la

invención, los caudales volumétricos de los reactivos se encuentran a una relación igual de 1:1.

La fuente de aluminio se selecciona entre sales de aluminio, incluyendo, pero no limitado a, cloruro de aluminio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato de potasio y aluminio ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$) y sus hidratos, nitrato de aluminio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), bromuro de aluminio ($\text{AlBr}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), bromato de aluminio ($\text{Al}(\text{BrO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), clorato de aluminio ($\text{Al}(\text{ClO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), o hidrato de yoduro de aluminio ($\text{AlI}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Una sal de aluminio preferida es el cloruro de aluminio (hexahidratado). La sal de aluminio seleccionada se disuelve en un volumen apropiado de agua.

Si bien se puede usar cualquier forma de fosfato (de H_3PO_4 a PO_4^{3-}) si también se suministra una base suficiente, puede ser conveniente y ventajoso usar un exceso de tampón fosfato predominantemente en forma dibásica, como fuente única de fosfato y base, en lugar de un tampón separado. El uso de la mezcla conjunta con un tampón de fosfato elimina el requisito de monitorizar el pH con un circuito de retroalimentación activo para el control del pH (por ejemplo, tener una corriente de flujo de reactivo de hidróxido de sodio, tomar mediciones de pH durante la reacción y realizar ajustes controlados a la corriente de reactivo de hidróxido de sodio), proporcionando un proceso de fabricación más simple y robusto. Los compuestos de fosfato se disuelven en agua y, en algunas realizaciones, el pH de la solución de fosfato se ajusta a un pH objetivo que dará las características deseadas en el producto final. Por ejemplo, se podría añadir una cantidad adecuada de fosfato de sodio monobásico al fosfato de sodio dibásico para obtener el pH deseado. Los tampones de fosfato adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido ortofosfórico (H_3PO_4), fosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), fosfato de amonio, dibásico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) u otros fosfatos alcalinos solubles. Un pH adecuado incluiría cualquier pH de 7,4 a 12,4; sin embargo, en ciertas realizaciones se prefiere el intervalo de 8,0 a 10,0. Por ejemplo, pH 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 o 10,0. La variabilidad aceptable incluiría $\pm 0,10$, $\pm 0,15$, $\pm 0,20$ y $\pm 0,30$. En ciertas realizaciones, se prefiere especialmente un pH de entre 8,5 y 9,5.

En una realización preferida, el adyuvante de fosfato de aluminio se puede preparar mezclando concentraciones apropiadas de soluciones acuosas de cloruro de aluminio (hexahidratado) y fosfato de sodio, a pH 9.

Precipitación

En los métodos de la invención, la mezcla conjunta se usa para proporcionar una relación constante de reactivos agregados a la reacción. Como se usa en este documento, "mezcla conjunta" se refiere a cualquier método en el que se añade una relación constante de reactivos al recipiente de reacción. Por el contrario, en la precipitación por lotes, uno o más reactivos se añaden a uno o más reactivos que ya están en el recipiente de reacción. Así, en la precipitación por lotes, la relación de los reactivos cambia a lo largo del transcurso de la reacción. La precipitación por lotes habitualmente implica una solución de una sal de aluminio, fosfato de sodio y una base tal como hidróxido de sodio; uno o dos de los cuales son constantes a lo largo de la reacción con el resto añadido a la reacción.

La mezcla conjunta se logra al unir las dos soluciones de reacción de la sal de aluminio y el tampón fosfato a una velocidad constante con una mezcla adecuada. Dado que los reactivos se añaden a un proceso de mezcla conjunta en una relación constante fija a lo largo del tiempo, una reacción de mezcla conjunta se puede aproximar en términos simples mediante parámetros independientes del tiempo. Las condiciones iniciales para la mezcla de las reacciones de fosfato de aluminio se pueden describir en dos dimensiones: la relación molar de fosfato a aluminio para las soluciones de reactivo y el pH de la solución de reactivo de fosfato de sodio. Además, la mezcla conjunta con un tampón de fosfato proporciona un control intrínseco del pH. Mediante la elección adecuada de una solución de fosfato que administra simultáneamente la cantidad correcta de fosfato y base para conseguir el resultado deseado, la reacción se produce de principio a fin con un pH aproximadamente constante.

El principio de la mezcla conjunta se puede implementar de muchas maneras diferentes, con varios equipos diferentes. A escala de laboratorio, los volúmenes definidos de las dos soluciones que reaccionan se pueden combinar utilizando bombas de jeringa o bombas peristálticas. Se podría hacer con un par de buretas de flujo por gravedad o por cualquier otro medio de administración de dos flujos a caudales definidos y mezclarlas. Mientras se añaden los dos reactivos a caudales definidos y constantes a un recipiente de reacción, la mezcla rápida se realiza utilizando medios conocidos en la técnica, como una barra de agitación magnética. A gran escala, se pueden usar muchos mecanismos de administración de dos flujos definidos (por ejemplo, bombas emparejadas, tanques emparejados de alimentación por gravedad, etc.) y mezcla (por ejemplo, mezcla en T, mezclador en línea estático, tanque agitado, circuito de recirculación, etc.).

En una realización, la reacción de mezcla conjunta tiene lugar a temperatura ambiente controlada (17 °C-33 °C). Podrían emplearse otros medios de control de la temperatura, que incluyen, entre otros, camisas y baños de agua.

Un medio preferido para conseguir la mezcla conjunta es mediante precipitación a través de la mezcla en T. La mezcla en T implica tubos o tuberías colocados en forma de "T". Las dos soluciones de reactivo se bombean a lo largo del eje horizontal. Los caudales están controlados. Las soluciones "se encuentran" en el eje vertical y fluyen hacia el recipiente del producto. Por ejemplo, una configuración de mezcla en T puede consistir en un tubo de silicona curado con platino de un DI de 3/8" que va desde cada uno de los recipientes de reactivos a través de bombas peristálticas hasta un conector en forma de "T" que combina las soluciones. El aparato de mezcla en T

también puede consistir en una tubería de metal rígido o de plástico desechable en una configuración similar.

5 Durante la mezcla en T, los caudales de reactivos pueden estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 300 ml/min a 5,0 l/min o de 300 ml/min a 2,0 l/min. El caudal preferido depende del tamaño del lote que se está ejecutando y de los materiales, tal como la longitud de la tubería o el diámetro de la tubería. Para lotes a escala piloto, por ejemplo de 5-15 l, los caudales preferidos están en el intervalo de 300 ml/min-1,2 l/min. A gran escala, por ejemplo de 100-500 l, se prefieren caudales más rápidos en el intervalo de 2,0-5,0 l/min. Los caudales, el diámetro y la longitud adecuados de los tubos permitirán una mezcla completa de flujo turbulento de las dos corrientes antes de ingresar al recipiente del producto. En el caso específico de la mezcla en T, la mezcla en el tubo es más crítica que
10 la mezcla en el recipiente del producto, ya que la reacción de precipitación ocurre casi instantáneamente. El número de Reynolds se puede usar como aproximación de las condiciones de flujo en la corriente T-mixta para asegurar un flujo turbulento. Además, el tiempo de micromezcla característico es otro parámetro útil para el aumento y la reducción de dicha etapa de precipitación con mezcla en T. Se puede hacer referencia a Mahajan et al., 1996, AIChE Journal 7: 1801-1814 y Johnson et al., 2003, AIChE Journal 9: 2264-2282 para la discusión del número de
15 Reynolds y el tiempo de micromezcla característico como parámetros de escala para aplicaciones similares a la mezcla en T.

En una realización preferida, los caudales de los reactivos deben controlarse de manera exacta y precisa, de modo que el volumen total de los reactivos de cloruro de aluminio y fosfato de sodio transferidos al tanque sea tan próximo a 1:1 como se pueda conseguir razonablemente. Generalmente son aceptables caudales promedio dentro de $\pm 5\%$, $\pm 2,5\%$ o $\pm 1\%$ entre sí dependiendo de la aplicación. Esta precisión se relacionará directamente con la concentración de aluminio en el producto precipitado, el pH del producto precipitado y la consistencia general del proceso.

25 Para la precipitación a gran escala con un mezclador en T, el impulsor en el recipiente del producto debe encenderse al comienzo del proceso de precipitación, si es posible, para garantizar la mejor mezcla posible del producto durante esta etapa. Si el impulsor no se puede encender de inmediato, debe encenderse lo antes posible (por ejemplo, cuando la altura del líquido en el tanque alcanza el fondo de las palas del impulsor). El intermedio precipitado se mezcla continuamente durante la transferencia de los reactivos a través del mezclador en T. Una vez
30 completada la transferencia de reactivo y la mezcla en T, la mezcla se continúa preferiblemente en el tanque durante al menos 10 a 15 minutos para asegurar la finalización de la precipitación y un intermedio homogéneo antes de la siguiente etapa de procesamiento.

Reducción del tamaño de partícula

35 El adyuvante de hidróxido de fosfato de aluminio consiste en partículas primarias relativamente pequeñas (discos de 10 a 120 nm) que forman agregados más grandes que pueden variar de aproximadamente 2 a 40 micrómetros ($d(v,0,5)$) según se mide por dispersión de luz estática (SLS). El control del tamaño de partícula de los agregados adyuvantes a menudo es importante para la consistencia de la calidad del producto y puede ser importante para la
40 eficacia de la vacuna. Las partículas de agregados adyuvantes por debajo de 10 micrómetros generalmente se consideran óptimas para la formulación de vacunas. Dado que el tamaño de partícula agregado se considera importante, se prefiere un procedimiento para ajustar este atributo y asegurar la consistencia del método.

En una realización, el tamaño de partícula del agregado de fosfato de aluminio se reduce a través de la recirculación a través de un mezclador de estator y rotor de alto cizallamiento. El tamaño de partícula ($d(v,0,5)$) medido por la dispersión de luz estática (SLS) puede comenzar con $>10\ \mu\text{m}$ después de la precipitación y podría ser tan grande como aproximadamente $40\ \mu\text{m}$. La operación de la unidad de reducción de tamaño molerá las partículas a aproximadamente $2\text{-}10\ \mu\text{m}$ y más habitualmente $3\text{-}6\ \mu\text{m}$. Por ejemplo, para un proceso a gran escala, se puede utilizar un mezclador Silverson 275UHS High Shear Mixer con un estator de alto cizallamiento con orificio cuadrado.
50 Para un proceso a pequeña escala, se puede utilizar el Silverson L4RT-A con un estator de alto cizallamiento con orificio cuadrado. Los siguientes párrafos describen el proceso en más detalle.

La mezcla en el recipiente del producto se continúa a lo largo del proceso de reducción del tamaño de partícula. El producto se mezcla bien durante esta etapa para asegurar la homogeneidad. El producto se recircula desde el
55 tanque a través del mezclador de alto cizallamiento. A escala completa, se hace funcionar una bomba de lóbulo rotatorio durante la recirculación a un caudal objetivo que proporciona la presión deseada en la entrada del mezclador de alto cizallamiento. En una realización, este caudal es de aproximadamente 90 l/min. A pequeña escala, utilizando un L4RT-A, el mezclador de alto cizallamiento genera suficiente flujo de modo que no se requiere una bomba secundaria para facilitar la recirculación. El mezclador modelo 275UHS que se puede usar para esta aplicación funciona a una velocidad convencional de 3000 RPM a 3600 RPM, según los estándares de energía locales. Si es factible, se recomienda un controlador de frecuencia variable (VFD) para aumentar la velocidad del mezclador a 3600 RPM desde 3000 RPM para reducir el tiempo total necesario para la reducción del tamaño de partículas. Velocidades más altas de la punta del rotor generalmente resultan en una eficiencia de reducción de
60 tamaño significativamente mejor sin afectar el tamaño de partícula del producto final. El L4RT-A a pequeña escala normalmente se hace funcionar a 8000 RPM para aproximarse a la velocidad de la punta del rotor a escala completa.

La temperatura debe controlarse próxima a temperatura ambiente mediante una camisa del producto o un baño de agua con temperatura controlada para mitigar el aumento de temperatura que, de otra manera, se produciría debido a la entrada de energía de la mezcla de alto cizallamiento. El intervalo de temperatura aceptable durante la reducción de tamaño es de 17 °C a 33 °C.

5 Intercambio de tampón

Se puede utilizar una etapa de concentración/ultrafiltración por diafiltración para concentrar el producto y eliminar el exceso de fosfato y otras sales residuales de la solución que queda de la etapa de precipitación con hidroxifosfato de aluminio. Antes de la diafiltración, el producto se concentra para mejorar la eficiencia de la diafiltración y reducir el volumen total del producto que se esterilizará y dispensará. El producto generalmente se concentra entre 1,25x y 2,0x durante esta etapa, y preferiblemente entre 1,4x y 1,6x para asegurar la robustez del proceso de diafiltración mientras se minimiza el volumen del producto. El producto se somete entonces a una diafiltración de 4-15 diavolumenes contra el tampón de diafiltración seleccionado. Se ha encontrado que un objetivo de 6 diavolumenes dentro de este intervalo minimiza el intercambio excesivo de tampón mientras se logra la eliminación consistente de fosfato libre del objetivo. Para esta ultrafiltración se puede usar una membrana compatible con un producto con un tamaño de poro entre 10 kD y 300 kD. Las membranas representativas que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, Ultrafiltros de pantalla en V de Pellicon 2 Biomax (PES) Millipore de 10 kD y 300 kD. Si utiliza los filtros de pantalla en V de Pellicon 2 Biomax (PES) Millipore de 300 kD, se recomienda controlar la presión del retenido, el flujo de permeado y el flujo cruzado (caudal del retenido). El flujo cruzado debe estar en el intervalo de 710 a 750 litros/(metro² · hora). Flujo de permeado en el intervalo de 25 a 38 litros/(m² · hora) y presión de retenido controlada entre 5 y 15 psig (34-103 kPag). La caída de presión (ΔP) en el cartucho del filtro y la presión transmembrana (TMP) se deben monitorizar durante el proceso pero no se controlan.

25 Se podría utilizar varios tampones para la etapa de intercambio de tampón dependiendo del fondo deseado para las partículas de adyuvante de hidroxifosfato de aluminio. Los tampones preferidos incluyen solución salina e histidina. En una realización preferida, la solución para el intercambio de tampón es solución salina. En una realización, la concentración de sal (cloruro de sodio) es del 0,9 % en p/v. Se pueden incluir excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables adicionales durante esta etapa.

30 Se observa que también se puede utilizar un proceso de sedimentación/decantación para el intercambio de tampón; sin embargo, se prefiere la ultrafiltración ya que es un proceso mucho más rápido.

35 Esterilización por vapor

Después de completar la diafiltración, el producto puede esterilizarse con vapor por medios bien conocidos en la técnica, incluidos los frascos de autoclavado del producto o la esterilización *in situ* en el recipiente del producto. La esterilización del producto de fosfato de aluminio afectará los atributos de calidad del producto, especialmente el pH, el punto de carga cero (PZC), la concentración de fosfato (libre) en solución y la relación molar de P/Al en los sólidos adyuvantes. En algunos casos (relación molar de P/Al en los sólidos próxima a 1), la exposición a alto calor (121-130 °C) que se observa durante la esterilización por vapor hace que el pH del producto disminuya, el PZC descienda y el fosfato se libere de los sólidos, por lo que aumenta la solución de fosfato en el sobrenadante y disminuye la relación de P/Al en los sólidos adyuvantes. El alcance de estos cambios depende de los parámetros originales utilizados para los reactivos iniciales, el grado de intercambio de tampones, y el tiempo de esterilización. Como ejemplo, el pH puede caer 0,5 unidades de pH, el PZC puede caer 0,5 unidades de pH, la solución fosfato puede aumentar de aproximadamente 3-8 mM a aproximadamente 13-22 mM, y la relación de P/Al puede disminuir de aproximadamente 1,1 a 1,0. El cambio en la solución (libre) de fosfato tras la esterilización depende de la concentración de adyuvante, mientras que el cambio en el pH, PZC y P/Al es mucho menor o no depende en absoluto de la concentración de adyuvante.

50 En general, la esterilización no cambia el tamaño de los agregados adyuvantes durante un ciclo de esterilización en autoclave típico. Sin embargo, se ha encontrado que el tamaño del agregado de adyuvante aumenta significativamente si la suspensión de adyuvante se deja enfriar demasiado lentamente después de la esterilización, por ejemplo, durante un período de 12 horas. En este caso, se ha observado que el tamaño del agregado aumenta de 3,9 μm (d(0,5) por SLS) antes de la esterilización a 11,6 μm después de la esterilización.

60 La comprensión de los cambios en el producto durante la esterilización es importante, ya que las condiciones iniciales del reactivo pueden ajustarse para tener en cuenta estos cambios para cumplir con éxito las características finales del producto final. La experiencia ha demostrado que el producto puede esterilizarse por vapor en vidrio a temperaturas de 122 °C a 130 °C durante 4,3 horas y aún cumplir con los atributos aceptables de calidad del producto, dado que esta duración de la esterilización se tiene en cuenta en el diseño de las condiciones del reactivo. Aunque el producto puede resistir un ciclo de esterilización tan largo, se recomienda minimizar la exposición al calor cuando sea posible. Una vez optimizado, se puede esperar que un ciclo típico de esterilización por vapor *in situ* caliente el producto entre 122 °C y 127 °C en 35 minutos, "permanezca" en el punto de ajuste de esterilización durante entre 24 y 30 minutos, y enfríe el producto a menos de 30 °C en 30 minutos.

Propiedades adyuvantes**pH**

- 5 El pH del adyuvante se puede ajustar según la aplicación del adyuvante y el antígeno en uso (la estabilidad de ciertos antígenos se ve afectada por el pH). Este ajuste se puede hacer manipulando la relación molar de P/Al en los reactivos, modulando el pH del tampón de fosfato entrante, o realizando un ajuste final del pH del producto antes de la formulación de la vacuna. En general, el pH adyuvante puede ser de 3,0 a aproximadamente 8,0; en ciertas realizaciones preferidas, los valores de pH son de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,2. Una realización especialmente preferida de la invención da como resultado un pH de entre 4,5 y 5,5.

Punto de carga cero

- 15 El potencial Zeta del adyuvante de aluminio está relacionado con la carga superficial en las partículas del adyuvante, e influirá en la adsorción de antígenos que se unen al adyuvante de aluminio a través de interacciones electrostáticas. Un parámetro utilizado para cuantificar la carga superficial de un adyuvante de aluminio es el punto de carga cero (PZC), que es el pH al cual el potencial zeta de la partícula es cero. El PZC se mide utilizando métodos convencional conocidos en la técnica.
- 20 Generalmente, el PZC del adyuvante está entre 4,2 y 6,9; en ciertas realizaciones preferidas, los valores de PZC son de aproximadamente 4,7 a 6,4. Una realización especialmente preferida de la invención da como resultado un PZC de entre 4,7 y 5,4.

Tamaño de partícula

- 25 El tamaño de partícula del agregado adyuvante puede ser importante para los productos de vacunas. Por ejemplo, el tamaño de partícula agregado influye en la captación celular y también puede afectar la respuesta inmunogénica, pero este efecto es probablemente variable dependiendo del antígeno. En la aplicación particular de la invención, el tamaño de partícula agregado objetivo es de 2 a 10 μM , y más preferiblemente de 3-6 μM .

Relación molar fosfato/aluminio

- 30 La relación molar de Fosfato a Aluminio (relación molar de P/Al) en los sólidos adyuvantes define la composición del adyuvante y afecta la mayoría de las características físicas, como el PZC y la forma/tamaño de las partículas primarias. En particular, el efecto sobre el PZC del adyuvante puede afectar las propiedades de unión del antígeno. La relación de P/Al también está relacionada con la cantidad de hidroxilo que se coordina con los sólidos de aluminio. A medida que aumenta la relación de fosfato, se espera que la cantidad de hidroxilo unido a Al disminuya. Generalmente, utilizando los métodos descritos en la presente invención, la relación molar de P/Al está entre 0,6 y 1,2. Una realización de esta invención se dirige a una relación molar de P/Al de 0,8 a 1,2 y preferiblemente de 0,9 a 1,1. La relación de P/Al puede cambiarse para adaptarse a la aplicación específica ajustando las condiciones del reactivo como se ha descrito anteriormente.

Adsorción de antígenos

- 45 El adyuvante de fosfato de aluminio de la invención se puede combinar con uno o más agentes activos, por ejemplo, antígenos, así como adyuvantes adicionales. En una realización, el agente activo se mezcla con y posiblemente se adsorbe en adyuvante de hidroxifosfato de aluminio en presencia de un sistema de tamponamiento compatible con el agente activo específico durante el proceso de formulación de la vacuna. Se pueden encontrar más instrucciones para adsorber agentes activos en las patentes de EE.UU. n.º 3.925.545 y 4.016.252, y Relyveld, 1986, Dev Biol Stand 65: 131-136.

- 50 En los casos en que el agente activo es un antígeno, el antígeno es preferiblemente un antígeno proteico o un antígeno sacárido (opcionalmente conjugado). Los antígenos preferidos incluyen, pero no se limitan a los antígenos de las siguientes bacterias: *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus influenzae* B, *Helicobacter pylori*, *N. gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B), *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) y *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos preferidos también incluyen, entre otros, antígenos de los siguientes virus: flavivirus (como el virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del Nilo Occidental), virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B virus de la hepatitis C, virus del papiloma humano, un parvovirus (por ejemplo, parvovirus B19), virus de la polio (inactivado) y virus de Chikungunya. Los antígenos preferidos también incluyen toxoide diftérico y toxoide tetánico. Todos los antígenos pueden producirse de forma recombinante en otros organismos por métodos conocidos en la técnica.

- 65 Los antígenos en la composición habitualmente estarán presentes en una concentración de al menos 1 $\mu\text{g/ml}$ cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para provocar una respuesta inmune contra ese antígeno.

5 Cuando se usa un antígeno sacárido o carbohidrato, preferiblemente se conjuga con una proteína transportadora para mejorar la inmunogenicidad. Las proteínas portadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como los toxoides diftérico y tetánico. El toxoide diftérico CRM₁₉₇ es particularmente preferido. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis*, proteínas pertussis, proteína D de *H. influenzae*, toxina A o B de *C. difficile*, etc.

Composiciones de vacuna

10 El adyuvante de hidroxifosfato de aluminio preparado por los métodos de la presente invención puede usarse según como está o adsorbido en un antígeno, para formular vacunas de acuerdo con prácticas y composiciones bien conocidas en la técnica.

15 La formulación de composiciones de vacunas generalmente es conocida en la técnica y se puede hacer referencia convenientemente a Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, EE. UU.

Ejemplos

Ejemplo 1

20 DETECCIÓN DEL "ESPACIO DE REACCIÓN" DEL FOSFATO DE ALUMINIO A ESCALA DE LABORATORIO PARA IDENTIFICAR LAS CONDICIONES DE REACCIÓN QUE RESULTAN EN LAS PROPIEDADES ADECUADAS DEL AJUSTE DEL FOSFATO DE ALUMINIO

25 Se prepararon muchas muestras de adyuvante de fosfato de aluminio mediante un método de mezcla conjunta a escala de laboratorio para seleccionar el espacio de reacción y comprender qué condiciones de reacción dan lugar a las propiedades deseables de adyuvante de fosfato de aluminio. Las muestras no se prepararon todas en la misma ocasión. Las principales variables que se cambiaron entre las muestras fueron 1) la relación molar inicial de fosfato/aluminio (P/Al) de las dos soluciones de reactivo (una solución de fosfato de sodio y una solución de cloruro de aluminio hexahidratado), y 2) el pH de la solución reactiva de fosfato de sodio. (Otros detalles de las preparaciones variaron ligeramente de una preparación a otra, como se describirá más adelante, pero estas diferencias se consideraron de menor importancia, y los resultados de las muestras preparadas en diferentes ocasiones se consideraron juntos durante el análisis como un solo grupo).

35 El análisis de las muestras incluyó 1) medición del pH, después del intercambio de tampón pero antes del autoclavado; 2) medición del pH, después del intercambio de tampón y después del autoclavado; 3) el potencial zeta del punto de carga cero (PZC), después del intercambio de tampón pero antes del autoclavado; 4) el potencial zeta del punto de carga cero después del intercambio de tampón y después del autoclavado; 5) la relación molar de P/Al en los sólidos precipitados, por ICP (espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo). (La mayoría o todas las muestras medidas por ICP fueron después del intercambio de tampón y después del autoclavado). No se analizaron todas las muestras mediante los cinco métodos anteriores.

Tabla 1: Preparaciones a escala de laboratorio de adyuvante de fosfato de aluminio preparadas para detectar el espacio de reacción de precipitación.

Conjunto de muestras	Relación molar de P/Al inicial de las soluciones de reactivo	pH de la solución de reactivo de fosfato de sodio	pH después del intercambio de tampón, antes del autoclavado	pH después del intercambio de tampón, después del autoclavado	PZC después del intercambio de tampón, antes del autoclavado	PZC después del intercambio de tampón, después del autoclavado	Relación molar de P/Al en los sólidos precipitados
A	1,50	12,28	7,24		5,00	4,90	0,72
A	1,75	12,33	7,96		4,97	4,94	0,63
A	2,00	12,38	8,45		5,24	5,13	0,51
A	2,50	8,97	5,56	5,04	6,03	5,57	0,88
A	2,75	8,96	5,88	5,39	5,89	5,36	0,84
A	3,00	8,96	6,02	5,56	5,80	5,25	0,86
A	3,20	8,95	6,10	5,66	5,73	5,22	0,89
A	1,40	11,39	5,21		6,21	5,81	0,90
A	1,70	11,38	6,13		5,68	5,29	0,86
A	2,40	11,34	6,83		5,21	4,98	0,83
A	2,70	11,32	7,17		4,98	4,83	0,80

45

(continuación)

Conjunto de muestras	Relación molar de P/Al inicial de las soluciones de reactivo	pH de la solución de reactivo de fosfato de sodio	pH después del intercambio de tampón, antes del autoclavado	pH después del intercambio de tampón, después del autoclavado	PZC después del intercambio de tampón, antes del autoclavado	PZC después del intercambio de tampón, después del autoclavado	Relación molar de P/Al en los sólidos precipitados
B	3,00	7,4 [†] (7,40) [‡]	5,63	5,12	6,05	5,41	0,94
B	3,00	8,2 [†] (8,23) [‡]	6,00	5,53	5,83	5,28	1,00
B	3,00	9,0 [†] (8,99) [‡]	6,02	5,62	5,85	5,22	1,01
B	3,50	7,4 [†] (7,40) [‡]	5,83	5,38	5,94	5,30	1,03
B	3,50	8,2 [†] (8,24) [‡]	6,13	5,76	5,81	5,20	0,85
B	3,50	9,0 [†] (8,95) [‡]	6,17	5,81	5,81	5,18	0,98
B	4,00	7,4 [†] (7,41) [‡]	6,06	5,67	5,86	5,24	1,01
B	4,00	8,2 [†] (8,24) [‡]	6,20	5,83	5,77	5,19	1,00
B	4,00	9,0 [†] (8,95) [‡]	6,27	5,89	5,71	5,15	0,96
B	2,50	9,0 [†] (8,98) [‡]	5,51	5,00	6,07	5,57	1,00
B	3,00	9,8 [†] (9,91) [‡]	6,01	5,59	5,87	5,33	0,87
C	1,80	9,00	4,02	2,90			0,97
C	2,00	8,99	4,18	3,17			1,01
C	2,20	8,98	4,96	4,12		6,25	1,00
C	2,50	8,97	5,56	4,88		5,77	1,00
D	1,00	12,18	4,92	4,18			0,81
D	1,20	12,22	5,91	5,56			0,72
D	2,00	11,36	6,06	5,71			0,81
E	2,20	8,98	4,82				0,93
E	2,20	8,98	4,83				0,93
E	2,20	8,98	4,82				0,95
E	2,20	8,98	4,82				0,95
E	2,20	8,98	4,80				0,97

† Valor objetivo, usado para las Figuras 1-5 a continuación.
‡ Valor medido.

5 Con el fin de comprender el espacio de reacción y cómo conseguir las propiedades deseadas en el adyuvante de fosfato de aluminio, fue conveniente visualizar los datos ajustándolos con superficies calculadas matemáticamente y mostrándolos como gráficos de contorno (ver Figuras 1-5).

Los detalles de preparación para cada uno de los 5 conjuntos de muestras (A, B, C, D y E) son los siguientes.

10 Conjunto A

15 Las muestras del conjunto A se prepararon mezclando volúmenes iguales de solución de cloruro de aluminio hexahidratado y solución de fosfato de sodio, de modo que la concentración final de aluminio después de la mezcla fuera de 1,8 mg de aluminio/ml. Esto requirió la preparación de una solución de aluminio de 3,6 mg/ml a partir de cloruro de aluminio hexahidratado. (El aluminio tiene un peso de 26,98 gramos/mol, y el del cloruro de aluminio hexahidratado es de 241,43 gramos/mol). La solución de cloruro de aluminio hexahidratado se preparó disolviendo primero 115,99 gramos de cloruro de aluminio hexahidratado en agua (dando como resultado una solución que era

ES 2 729 111 T3

de 12,96 mg/ml en aluminio), y a continuación mezclando 278 ml de esa solución con 722 ml de agua para dar 1 l de una solución de 3,6 mg/ml de aluminio. La solución de cloruro de aluminio hexahidratado fue la misma para las 11 muestras, mientras que la solución de fosfato de sodio fue diferente para las 11 muestras. Las soluciones de fosfato de sodio se hicieron haciendo diluciones y mezclas de soluciones madre más concentradas de fosfato de sodio dibásico y fosfato de sodio tribásico. La solución madre dibásica de fosfato de sodio era 0,5 M. La solución tribásica de fosfato de sodio usada para algunas de las muestras era 0,25 M, y para otra de las muestras se usó una solución madre diferente de fosfato de sodio tribásico que era 0,333 M. Se prepararon 70 ml de cada una de las 11 soluciones diferentes de fosfato, como se describe en la tabla a continuación.

10

Tabla 2: Detalles de preparación para el conjunto de muestra "A".

Relación molar de P:Al para las soluciones de reactivo	Conc. objetivo (M) de fosfato para la solución de reactivo de fosfato	Contribución a la conc. (M) de fosfato de sodio tribásico	Contribución a la conc. (M) de fosfato de sodio dibásico	Conc. (M) de fosfato tribásico madre	Conc. (M) de fosfato de sodio dibásico madre	Volumen (ml) de sodio tribásico madre	Volumen (ml) de fosfato de sodio madre	Volumen (ml) de agua
1,5	0,200	0,200	0	0,25		56,0	0	14,0
1,75	0,233	0,233	0	0,25		65,4	0	4,6
2	0,267	0,267	0	0,3333		56,0	0	14,0
2,5	0,334	0	0,334		0,5	0	46,7	23,3
2,75	0,367	0	0,367		0,5	0	51,4	18,6
3	0,400	0	0,400		0,5	0	56,0	14,0
3,2	0,427	0	0,427		0,5	0	59,8	10,2
1,4	0,187	0,093	0,093	0,25	0,5	26,2	13,1	30,8
1,7	0,227	0,113	0,113	0,25	0,5	31,8	15,9	22,4
2,4	0,320	0,160	0,160	0,25	0,5	44,8	22,4	2,8
2,7	0,360	0,180	0,180	0,3333	0,5	37,8	25,2	7,0

La solución de cloruro de aluminio hexahidratado se extrajo en una jeringa de plástico desechable de 60 ml. La solución de fosfato de sodio se extrajo en una jeringa de plástico desechable diferente de 60 ml. Se colocó un tubo corto de silicona en el extremo de cada una de las jeringas. El otro extremo de cada pieza de tubo se unió a una u otra de las dos entradas en la parte superior de un mezclador en línea estático corto de plástico (Conprotec MB6.5-16S). Después de pasar a través del mezclador en línea, la mezcla se recogió en un vaso de precipitados, que se agitó con una barra de agitación magnética. Las dos jeringas de 60 ml fueron expulsadas en la misma relación de volumen 1:1 colocándolas en una bomba de jeringa que aceptaba 2 jeringas, y que empujó los dos émbolos de jeringa a la misma velocidad con una sola barra metálica móvil. Con 60 ml en cada jeringa, el volumen final de la mezcla fue de 120 ml. Los contenidos de las jeringas se mezclaron a través del mezclador en línea estático y en el vaso agitado en menos de 6 minutos.

El proceso de intercambio de tampón a escala de laboratorio se realizó añadiendo aproximadamente 1 litro de solución de cloruro de sodio al 0,9 % a aproximadamente 100 ml de adyuvante de aluminio precipitado, mezclando a mano para resuspender el adyuvante de aluminio, permitiendo que los sólidos sedimenten (a menudo durante la noche), eliminando aproximadamente 1 litro de sobrenadante (dejando los sólidos adyuvantes de aluminio) y repitiendo ese proceso varias veces. Se realizaron cinco rondas de este procedimiento de "sedimentación/decantación" durante un período de aproximadamente una semana para intercambiar las muestras en una solución de cloruro de sodio al 0,9 %.

Después del intercambio de tampón, cada muestra se dividió en dos alícuotas para permitir que las mediciones se hicieran en muestras antes y después del autoclavado. El autoclave utilizó un ciclo de líquidos durante 60 minutos a 121 °C.

Conjunto B

Las muestras del conjunto B se prepararon de manera similar (pero no idéntica) a las muestras del conjunto A. La misma solución de cloruro de aluminio hexahidratado que se usó para las muestras del Conjunto A se usó para las muestras del Conjunto B. Se diluyó de la misma manera. Se prepararon soluciones madre de fosfato de sodio dibásico 0,6 M y fosfato de sodio monobásico 0,6 M. Para el fosfato de sodio dibásico (FW 141,96 g/mol), se disolvieron 85,172 gramos en 1 litro de agua y, por separado, se disolvieron 42,591 gramos en 0,5 litros de agua, dando dos soluciones de 0,6 M. Para el fosfato de sodio monobásico monohidratado (FW 137,99) se disolvieron 82,793 gramos en agua, dando una solución de 0,6 M. Los cuatro objetivos de pH para el tampón fosfato fueron 9,0, 8,2, 7,4 y 9,8. Se alcanzó el objetivo de pH 9 utilizando una solución dibásica de fosfato de sodio sola, que dio un pH medido de 8,95 a 8,99. Los objetivos de pH de 8,2 y 7,4 se consiguieron mediante la adición de fosfato de sodio monobásico 0,6 M al fosfato de sodio dibásico 0,6 M. El objetivo de pH de 9,8 se logró comenzando con una solución dibásica de fosfato de sodio 0,6 M, y añadiendo un volumen pequeño (aproximadamente el 2 %, se ignora la pequeña dilución de fosfato) de solución de hidróxido de sodio 1 N. Utilizando las soluciones madre de fosfato de sodio 0,6 M ajustadas a pH, se prepararon 11 soluciones de fosfato diferentes (cada una con un volumen de 140 ml) por dilución con agua, como se describe en la tabla a continuación.

Tabla 3: Detalles de preparación para el conjunto de muestra "B".

Relación molar objetivo de P:Al para las soluciones de reactivo	pH objetivo para la solución de reactivo de fosfato	Volumen de fosfato de sodio 0,6 M a pH ajustado	Cantidad de agua	Concentración resultante (M) de solución de reactivo de fosfato de sodio
3,00	7,4	93,4	46,6	0,400
3,00	8,2	93,4	46,6	0,400
3,00	9,0	93,4	46,6	0,400
3,50	7,4	109,0	31,0	0,467
3,50	8,2	109,0	31,0	0,467
3,50	9,0	109,0	31,0	0,467
4,00	7,4	124,5	15,5	0,534
4,00	8,2	124,5	15,5	0,534
4,00	9,0	124,5	15,5	0,534
2,50	9,0	77,8	62,2	0,333
3,00	9,8	93,4	46,6	0,400

En cuanto a las muestras del Conjunto A, las dos soluciones de reactivo se extrajeron en jeringas de 60 ml y se expulsaron a la misma velocidad en una relación de 1:1 en el vaso de precipitados de reacción. La reacción para el Conjunto B difería del Conjunto A en que no se usó mezclador en línea "T" o estático. Una pequeña longitud de tubo de silicona se unió al extremo de cada una de las jeringas de solución reactiva, y se logró la mezcla conjunta cuando las dos soluciones de sustancia reaccionante se gotearon en un vaso de precipitados. Dentro del vaso de precipitados había una barra de agitación magnética, que proporcionaba mezcla mientras los reactivos se añadían al vaso de precipitados, y durante un breve tiempo (minutos) después. Para cada muestra, las jeringas de solución reactiva se cargaron y expulsaron dos veces, lo que duplicó el volumen preparado sobre lo que se había preparado

para el Conjunto de muestras A.

El intercambio de tampón en solución salina al 0,9 % se realizó de una manera similar a la realizada para las muestras del Conjunto A, excepto por que se realizaron 6 rondas de "sedimentación/decantación". Después del intercambio de tampón, cada muestra se dividió en dos alícuotas para permitir que las mediciones se hicieran en muestras antes y después del autoclavado. El autoclave utilizó un ciclo de líquidos durante 60 minutos a 121 °C.

Conjunto C

Se preparó una única solución de cloruro de aluminio hexahidratado (FW 241,43 g/mol) disolviendo 19,33 gramos en 600 ml de agua. Esto dio lugar a una solución con la concentración de 3,6 gramos de aluminio/ml. Se prepararon cuatro soluciones de fosfato de sodio dibásico (FW 141,98 g/mol), a cuatro concentraciones diferentes de fosfato de sodio dibásico, pero sin ajuste de pH. El pH de las cuatro soluciones dibásicas de fosfato de sodio resultantes se midió en un intervalo de 9,00 a 8,97. Las soluciones de fosfato se prepararon como se describe en la tabla a continuación.

Tabla 4: Soluciones de fosfato utilizadas para preparar el conjunto de muestras "C"

Relación molar objetivo de P:Al para las soluciones de reactivo	Cantidad de fosfato de sodio dibásico disuelto en 150 ml de agua
1,8	5,1223 gramos
2,0	5,6858 gramos
2,2	6,2549 gramos
2,5	7,1087 gramos

Las dos soluciones de reactivo se cargaron en jeringas de 60 ml. Como en el caso del Conjunto de muestra A, las soluciones de reactivo fluyeron a través de un pequeño mezclador en línea estático de plástico, antes de que la mezcla se goteara en un vaso de precipitados agitado. Como en el caso del Conjunto de muestras B, para cada una de las 4 muestras, las jeringas reactivas se cargaron y expulsaron dos veces, produciendo aproximadamente 220 ml para cada una de las cuatro muestras. El caudal fue de 1 ml/segundo para ambas jeringas (0,5 ml/segundo/jeringa). La agitación rápida continuó durante 5 minutos después de que el segundo par de jeringas reactivas hubiera sido expulsado. El intercambio de tampón incluyó 4 ciclos de sedimentación/decantación e incluyó una etapa de dilución para el adyuvante de 1,8 mg de aluminio/ml a 0,9 mg de aluminio/ml. Las mediciones se realizaron en la muestra antes del autoclavado y después del autoclavado con un ciclo de líquidos durante 60 minutos a 121 °C.

Conjunto D

Se preparó una solución única de cloruro de aluminio hexahidratado (FW 241,43 g/mol) disolviendo 16,1054 gramos en 1 litro de agua. Esto dio lugar a una solución con la concentración de 1,8 gramos de aluminio/ml. Se preparó una solución madre (0,5 M) de fosfato sódico dibásico (PF 141,96 g/mol) disolviendo 70,98 gramos de fosfato sódico dibásico en 1 litro de agua. Se preparó una solución madre (0,25 M) de dodecahidrato tribásico de fosfato de sodio (FW 380,13) disolviendo 95,03 gramos en 1 litro de agua. Para preparar las soluciones de reactivo de fosfato de sodio, las soluciones madre de fosfato de sodio se diluyeron y combinaron como se indica en la tabla a continuación.

Tabla 5: Detalles de preparación para el conjunto de muestra "D".

Relación molar objetivo de P/Al para las soluciones de reactivo	Concentración de aluminio en la solución de reactivo de cloruro de aluminio	Concentración (mM) de fosfato de sodio tribásico en la solución de reactivo de fosfato	Concentración (mM) de fosfato de sodio dibásico en la solución de reactivo de fosfato
1,00	66,7 mM	66,7 mM	0 mM
1,20	66,7 mM	80 mM	0 mM
2,00	66,7 mM	66,7 mM	66,7 mM

Las reacciones tuvieron lugar de una manera similar a la descrita anteriormente. La concentración de los reactivos fue la mitad de la utilizada para los Conjuntos de muestras A, B y C. Se realizaron cuatro rondas de sedimentación/decantación durante el intercambio de tampón en solución salina al 0,9 %. Cada ronda de sedimentación/decantación implicó la dilución de 50 ml de suspensión de adyuvante de aluminio precipitado con aproximadamente 1 litro de solución salina al 0,9 %, mezclando, esperando que la suspensión sedimente y a continuación eliminando aproximadamente 1 litro de sobrenadante transparente. El intercambio de tampón para el Conjunto de muestras D se realizó a temperatura ambiente durante un período de más de un mes. El autoclave se realizó con un ciclo de líquidos durante 60 minutos a 121 °C.

Conjunto E

La reacción de precipitación con adyuvante de fosfato de aluminio mediante un método de mezcla conjunta se

realizó 5 veces independientemente con los mismos parámetros de reacción objetivo. La relación molar fosfato/aluminio de las soluciones de reactivo fue de 2,2, y la solución de fosfato era fosfato de sodio dibásico, a pH 9 (no ajustado). La concentración objetivo de aluminio en la solución de reactivo de cloruro de aluminio fue de 1,8 mg de aluminio/ml. La siguiente tabla describe cómo se prepararon las 5 soluciones de reactivo de cloruro de aluminio hexahidratado y las 5 soluciones de reactivo dibásico de fosfato de sodio.

Tabla 6: Detalles de preparación para el conjunto de muestra "E".

Gramos de fosfato de sodio dibásico (FW 141,96 g/mol) disueltos en 1 litro de agua para preparar una solución de reactivo de fosfato	Gramos de cloruro de aluminio hexahidratado (FW 241,43 g/mol) disueltos en 600 ml de agua para preparar una solución de reactivo de aluminio
20,8470	9,6752
20,8316	9,6791
20,8484	9,6655
20,8420	9,6684
20,8308	9,6598

Se cargaron jeringas de 60 ml con las soluciones de reactivo y se mezclaron conjuntamente en un pequeño mezclador estático en línea de plástico, en un recipiente agitado rápidamente. El caudal total en el recipiente fue de 1 ml/segundo. La agitación continuó durante 5 minutos después de que se hubo completado la adición. El intercambio de tampón fue similar al realizado para los Conjuntos de muestras A, B, C y D. El autoclavado se realizó con un ciclo de líquidos durante 60 minutos a una temperatura promedio de 123 °C, dos grados más que en los otros conjuntos de muestras.

Para las reacciones de precipitación, en resumen, un procedimiento general empleado durante este análisis de espacio de reacción a escala de laboratorio fue mezclar la solución de cloruro de aluminio hexahidratado (1,8 mg/ml a 3,6 mg/ml) con un volumen 1:1 de una solución de fosfato de sodio. La relación molar de fosfato en la solución de reactivo de fosfato, a aluminio en la solución de reactivo de aluminio, varió de 1,0 a 4,0. El pH de las soluciones de fosfato de sodio varió de >12 a 7,4. Las soluciones de fosfato se prepararon a partir de compuestos individuales de fosfato de sodio (fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio tribásico), o de mezclas de compuestos de fosfato de sodio (fosfato de sodio monobásico + fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio dibásico + fosfato de sodio tribásico), o de compuestos de fosfato de sodio con base adicional (hidróxido de sodio) añadida. Los reactivos se mezclaron conjuntamente corriendo los dos flujos de reactivos juntos (es decir, a través de un mezclador en línea estático), o no corriendo los dos flujos de reactivos directamente juntos, sino añadiéndolos por separado al mismo recipiente agitado. El intercambio de tampón en cloruro de sodio al 0,9 % se logró mediante diferentes números de ciclos de "sedimentación/decantación". Las muestras se analizaron antes y después del autoclavado. Cuando se autoclavaron, las condiciones fueron de 60 minutos a una temperatura promedio de 121-123 °C.

Las mediciones de pH se realizaron en medidores de pH IQ240 utilizando sondas de acero inoxidable. En general, se realizaron dos mediciones de pH utilizando dos medidores/sondas diferentes, y se informó el promedio de las dos mediciones de pH.

Las mediciones de PZC se realizaron diluyendo el adyuvante que contiene aluminio a aproximadamente 15 µg/ml en un tampón de TRIS:acetato 20 mM. Se utilizaron varios tampones TRIS:acetato separados para cubrir un intervalo de pH de 4,0-8,0, habitualmente en incrementos de 1,0 unidades de pH. A continuación se midió el potencial zeta usando un instrumento Zetasizer. Los datos se representaron como pH (eje x) frente a potencial zeta (eje y), y se calculó la intersección x, que dio el punto de carga cero.

Las mediciones de la ICP se realizaron tanto en el sobrenadante como en la fracción de sólidos de los adyuvantes que contienen aluminio para obtener las concentraciones de fósforo y aluminio. Diez mililitros de cada muestra se pusieron en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a aproximadamente 2000 rcf. Se eliminó el sobrenadante y se analizó la concentración de fósforo y aluminio. El sedimento de adyuvante que contiene aluminio a continuación se resuspendió a 10 ml con una solución de cloruro de sodio al 0,9 % y se analizó la concentración de fósforo y aluminio. Las concentraciones de sobrenadante se usaron para ver si la reacción se iba a completar y la cantidad de fosfato en exceso en la solución. Se utilizó el análisis del sedimento para calcular la relación molar de P/Al (fosfato a aluminio) en los sólidos que resultaron de las condiciones de reacción específicas.

Las Figuras 1-5 son gráficas del espacio de reacción en los que los contornos se generaron a partir de un ajuste de superficie a los datos. Según los resultados de muchas muestras, estas gráficas muestran valores predichos para el pH, el PZC y la relación de P/Al en función de dos parámetros de reacción (relación molar de fosfato:aluminio de las soluciones de reactivo y pH de la solución que contiene fosfato). Estas gráficas permiten la predicción de cómo conseguir las propiedades objetivo de un adyuvante de aluminio producido por los métodos de esta invención, y sirvió como guía durante el aumento de escala del proceso de producción. El trabajo a escala de laboratorio sugirió que este método de producción de fosfato de aluminio sería adecuado para el diseño y control en un entorno de fabricación.

Ejemplo 2

COMPARACIÓN DEL AJUSTE DEL FOSFATO DE ALUMINIO REALIZADO POR MEZCLA CONJUNTA O POR UN MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR LOTES

5 La mezcla conjunta tiene ciertas ventajas teóricas sobre la precipitación por lotes del adyuvante de fosfato de aluminio. Para comprender qué diferencias se pueden encontrar en comparación con un proceso por lotes, se realizaron estudios comparativos a escala de laboratorio entre los métodos de mezcla conjunta y precipitación por lotes.

10 Se prepararon seis muestras de fosfato de aluminio mediante un método de mezcla conjunta y seis muestras se prepararon mediante un método por lotes. El método por lotes consistía en llenar un recipiente de mezcla con toda la solución de reactivo de cloruro de aluminio y añadir la solución de reactivo de fosfato de sodio al recipiente con el tiempo. Se tomaron numerosas precauciones para garantizar la validez de la comparación. Estas incluyeron la toma de las correspondientes muestras de "mezcla conjunta" y "en lotes" en la misma ocasión, las muestras con los mismos reactivos, las muestras con el mismo equipo, el análisis de ambos conjuntos de muestras realizadas en la misma ocasión y el uso de los mismos instrumentos y métodos.

20 La solución de reactivo de aluminio se preparó a 4,2 gramos de aluminio/ml disolviendo cloruro de aluminio hexahidratado en agua (37,58 gramos de cloruro de aluminio hexahidratado/litro). La relación molar objetivo de fosfato a aluminio para las soluciones de reactivo fue de 3:1. El pH objetivo de las soluciones de reactivo de fosfato fue de 8,0. Para conseguir esa relación molar y ese pH objetivo, se prepararon soluciones de fosfato de sodio dibásico 0,467 M (66,3 gramos/litro) y fosfato de sodio monobásico monohidratado 0,467 M (64,4 gramos/litro). Mientras se monitorizaba el pH con un medidor de pH, se añadió un volumen más pequeño de solución monobásica de fosfato de sodio a un mayor volumen de solución dibásica de fosfato de sodio hasta que se alcanzó un pH de 8,0. La solución monobásica de fosfato de sodio contribuyó con menos del 5 % del volumen final de las soluciones de reactivo de fosfato. Después de la reacción en una relación en volumen 1:1 de las soluciones de reactivo de aluminio y fosfato, la concentración final de aluminio en la suspensión de adyuvante de fosfato de aluminio fue de 2,1 gramos de aluminio/ml.

30 Para preparar muestras mediante el método de mezcla conjunta, dos bombas peristálticas que funcionaban al mismo caudal suministraron las soluciones de reactivo en un vaso de precipitados de 2 l, que se agitó a velocidad media con una barra de agitación de 7,2 cm. El caudal para cada bomba fue de 10,7 ml/min y el bombeo se realizó durante 20 minutos (con agitación completa), dando como resultado aproximadamente 428 ml de suspensión adyuvante. La agitación se continuó durante aproximadamente 10 minutos después de que se detuvo el bombeo.

40 Para preparar las muestras por el método de precipitación por lotes, la única modificación del método de mezcla conjunta fue que se añadió el volumen total de solución de cloruro de aluminio que se habría dispensado durante 20 minutos (214 ml) al vaso de precipitados al comienzo del experimento, y solo la bomba que suministró la solución de fosfato de sodio estuvo funcionando durante el periodo de dispensación de 20 minutos. La mezcla continuó aproximadamente 10 minutos después de completar el bombeo, como se ha indicado anteriormente.

45 Las muestras de los métodos de preparación de "mezcla conjunta" y "en lotes" se intercambiaron en solución de cloruro de sodio al 0,9 % mediante ciclos repetidos de resuspensión en solución salina, sedimentación de los sólidos adyuvantes de aluminio y eliminación del sobrenadante sin sólidos ("sedimentación/decantación"). Las mediciones se realizaron en las muestras antes y después del autoclavado. El autoclavado siguió nuestra condición típica a escala de laboratorio de usar un ciclo de líquidos durante 1 hora a 121 °C.

50 Las 12 muestras resultantes (6 de mezcla conjunta, 6 por lotes) se analizaron para determinar el pH, el potencial Zeta del PZC y la relación de P/Al final, para caracterizar la consistencia de cada método y las diferencias entre los dos métodos. El método de mezcla conjunta parece tener una ventaja de consistencia sobre el método por lotes analizado, como se observa al comparar la desviación típica de los resultados medios de cada método.

Tabla 7: Mediciones de pH para muestras de mezcla conjunta y por lotes, promedio ± desviación típica.

	Antes del intercambio de tampón	Después del intercambio de tampón, sin autoclavado	Después del intercambio de tampón y después del autoclavado
Método por lotes	6,23 ± 0,04	5,85 ± 0,15	5,24 ± 0,16
Método de mezcla conjunta	5,97 ± 0,03	5,91 ± 0,02	5,41 ± 0,05
N =	5	6	6

55 La Figura 6 es una comparación gráfica de las mediciones de pH para muestras por lotes y de mezcla conjunta. Se encontró que el pH de las muestras preparadas por el método discontinuo se desplazaba hacia abajo entre la preparación y el autoclavado a un grado mucho mayor que las muestras de mezcla conjunta. Por lo tanto, parece que hay una estabilidad de pH y una ventaja de consistencia de pH con el uso del método de mezcla conjunta.

El potencial zeta del PZC de las 12 muestras se midió antes y después del autoclavado. Al igual que en el caso del pH, las muestras preparadas por el método de mezcla conjunta fueron más consistentes que las preparadas mediante el método por lotes.

- 5 Las Figuras 7A-B son una comparación gráfica de las mediciones del potencial zeta de PZC (punto de carga cero) para las muestras por lote y de mezcla conjunta, incluida la media y la desviación típica para los resultados obtenidos de cada método.

- 10 La relación molar de fósforo a aluminio en los sólidos precipitados tiene un cambio mayor tras el autoclavado para las muestras de lotes que para las muestras de mezcla conjunta. Las muestras de mezcla conjunta parecen ser ligeramente más consistentes según la medida de este ensayo. La Tabla 8 enumera la relación molar de P/Al promedio de 6 muestras por cada método, \pm desviación típica.

Tabla 8: Relaciones molares de P/Al de sólidos de fosfato de aluminio producidos por diferentes métodos.

	Después del intercambio de tampón, antes del autoclavado	Después del intercambio de tampón, después de autoclavado
Método por lotes	1,03 \pm 0,04	0,85 \pm 0,06
Método de mezcla conjunta	1,03 \pm 0,03	0,94 \pm 0,01
N =	6	6

- 15 Los datos de esta comparación a escala de laboratorio apoyan la idea de que el método de mezcla conjunta es mejor que el método por lotes para preparar adyuvante de fosfato de aluminio con una relación molar consistente de pH, PZC y P/Al en los sólidos precipitados.

20 **Ejemplo 3**

FABRICACIÓN DE ADYUVANTE DE FOSFATO DE ALUMINIO A ESCALA PILOTO

- 25 Este ejemplo describe un proceso a escala piloto para la fabricación rutinaria de pequeños lotes de adyuvante de fosfato de aluminio (APA).

(1) Las materias primas utilizadas en este proceso se resumen en la Tabla 9 a continuación:

Tabla 9: Materias primas y soluciones utilizadas para la fabricación de APA

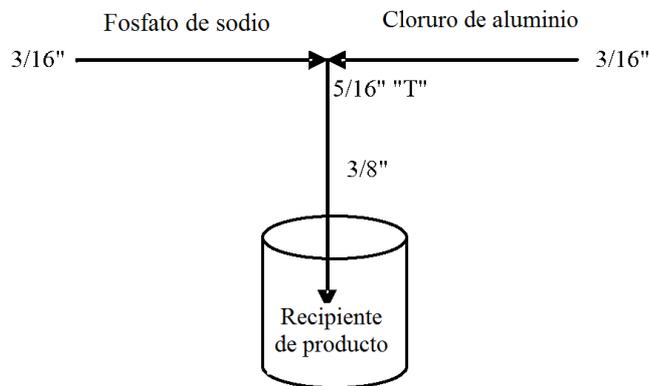
Materia prima/solución	Propósito
Cloruro de aluminio (hexahidratado)	Reactivo
Fosfato de sodio dibásico (anhidro)	Reactivo
Agua destilada estéril	Disolvente, diluyente
Agua para inyección (WFI)	Lavado del filtro UF
Hidróxido de sodio 0,5 N	Desinfección del filtro UF
Cloruro de sodio al 0,9 %	Tampón de diafiltración

- 30 (2) El reactivo de cloruro de aluminio (Al 156 mM) se preparó de la siguiente manera. Un frasco de vidrio limpio de 5 l con barra de agitación magnética de 3 pulgadas se taró en una balanza de mesa con placa de agitación magnética. Se cargaron aproximadamente 4000 g de agua destilada estéril en el frasco. Se cargó un blanco de 187,9 g de cloruro de aluminio (hexahidratado) en el recipiente y se mezcló hasta que se disolvieron los sólidos. Mientras se agitaba, se añadió agua destilada estéril para alcanzar un peso neto objetivo de 5050 g. La solución de cloruro de aluminio se almacenó a temperatura ambiente hasta su posterior procesamiento.

- 35 (3) El reactivo de fosfato de sodio (fosfato 390 mM) se preparó de la siguiente manera. Un frasco de vidrio limpio de 10 l con barra de agitación magnética de 3 pulgadas se taró en una balanza de mesa con placa de agitación magnética. En el frasco se cargaron aproximadamente 5000 g de agua destilada estéril. Se cargó un blanco de 331,5 g de fosfato sódico dibásico (anhidro) en el recipiente y se mezcló hasta que se disolvieron los sólidos. Mientras se agitaba, se añadió agua destilada estéril para alcanzar un peso neto objetivo de 6251 g. La solución de fosfato de sodio se filtró a través de un filtro de grado de esterilización Millipak-60 de 0,22 μ m para eliminar las partículas y asegurar una baja carga biológica. La solución de fosfato de sodio se almacenó a temperatura ambiente hasta su posterior procesamiento.

- 40 (4) Se construyó una configuración de mezcla en T conectando dos longitudes de tubería de silicona de 3/16" y una longitud de tubería de silicona de 3/8" a una "T" de 5/16" como se muestra a continuación. Cada longitud del tubo de 3/16" se enroscó a través de una bomba peristáltica del tamaño adecuado. Un recipiente de vidrio limpio de 10 l con barra de agitación de 3 pulgadas se taró en una balanza de mesa con una placa de agitación magnética. La salida del tubo de 3/8" se dirigió hacia el frasco de vidrio limpio, mientras que las entradas de los tubos de 3/16" se pusieron en las soluciones de reactivo de cloruro de aluminio y fosfato de sodio como se muestra en el esquema a continuación.
- 50

Configuración de mezcla en T para precipitación



- 5 (5) Cada una de las bombas peristálticas se ajustó a 600 ml/min y las líneas se cebaron hasta la "T" de 5/16". Al finalizar el cebado, las dos bombas se encendieron simultáneamente para comenzar la precipitación de la mezcla en T. Una vez que la altura del fluido en el recipiente de recolección estuvo por encima de la barra de agitación, se inició la mezcla en el recipiente de recolección. Las bombas se apagaron simultáneamente cuando el recipiente de recolección alcanzó un peso neto objetivo de 7070 g. El intermedio precipitado se mezcló durante aproximadamente
- 10 10 minutos después de la mezcla en T y se tomaron muestras antes de la siguiente etapa.
- (6) Se usó un mezclador Silverson L4RT-A de alto cizallamiento con un rotor de 1,25" de diámetro y un estator de alto cizallamiento con orificio cuadrado para la etapa de reducción de tamaño. El propósito de la etapa de reducción de tamaño es garantizar una distribución de tamaño de partícula agregada consistente y uniforme dentro del intervalo de tamaño objetivo. La etapa de reducción de tamaño se realizó recirculando el producto a través del mezclador Silverson durante 120 minutos a una velocidad de mezcla de 8000 RPM. La mezcla en el recipiente del
- 15 producto se mantuvo con una barra de agitación durante todo el proceso y se usó un tubo de silicona de 1/2" para todas las conexiones entre el mezclador Silverson y el recipiente del producto. Se tomaron muestras del producto intermedio de tamaño reducido y se almacenó a 2-8 °C hasta su posterior procesamiento.
- (7) El peso neto de la entrada intermedia de tamaño reducido a la etapa de ultrafiltración (UF) fue de 6923 g. Después de retirarlo del almacenamiento en frío, el producto se mezcló durante 90 minutos para volver a suspender el producto y permitir el equilibrio a temperatura ambiente. Un sistema de UF se configuró usando una carcasa de filtro Millipore Pellicon-2 Miniholder (n.º de cat. XX42PMINI) y filtros Millipore 300 kD Biomax de PES de 2 x 0,1 m² (n.º de cat. P2B300V01) para un área de filtro total de 0,2 m². Se instalaron medidores de presión de 3/4" en los puertos de permeado, alimentación y retenido del portafiltros para monitorizar la presión transmembrana (TMP) y la caída de presión (ΔP) durante todo el proceso. Se instaló una válvula de control de retenido manual aguas abajo del manómetro de retenido. Se usó un tubo sanitario del tamaño adecuado para conectar el portafiltros al producto, permeado, tampón de UF y recipientes de descarga según sea necesario. Las bombas peristálticas se utilizaron para controlar el caudal de alimentación y el caudal de permeado.
- 20 (8) Después de la instalación, el sistema de UF se lavó con WFI según los procedimientos convencionales y se probó la integridad del sistema para garantizar la ausencia de fugas en el sistema. A continuación, los filtros se desinfectaron con NaOH 0,5 N lavando primero aproximadamente 2 l a través del retenido y el permeado a un caudal de alimentación de aproximadamente 1000 ml/min y una presión de retenido de aproximadamente 1 psig (6,9 kPag). A continuación, se recircularon otros 2 l a través del retenido y del permeado a un caudal de alimentación de 1000 ml/min y una presión del retenido de aproximadamente 1 psig (6,9 kPag) durante 30 minutos. Después de la desinfección, los filtros se lavaron nuevamente con WFI utilizando procedimientos convencionales hasta que el efluente del retenido y del permeado alcanzaron un pH aproximadamente neutro.
- 25 (9) Después de la preparación del filtro, el producto se concentró aproximadamente 2x dirigiendo el permeado a un recipiente de recolección y ajustando el caudal de alimentación a 2400 ml/min y el flujo de permeado a 83 ml/min. La presión del retenido se controló consistentemente a aproximadamente 5 psig (34 kPag) usando la válvula de control de presión del retenido. Después de la concentración, se inició la diafiltración al comenzar la adición de tampón de UF (cloruro de sodio al 0,9 %) al recipiente del producto al mismo caudal a la salida del permeado del sistema. Se completó un intercambio de tampón de 6 diavolumenes controlando el peso neto del permeado recogido y deteniendo el proceso en el peso apropiado. El recipiente del producto se mezcló con una barra de agitación durante toda la concentración y la diafiltración.
- 30 (10) La retención del producto se recuperó de los filtros realizando un lavado con tampón de UF al finalizar la diafiltración. Esto se hizo enjuagando 1250 g de cloruro de sodio al 0,9 % a través de la alimentación/retenido en el recipiente del producto a aproximadamente 1000 ml/min con la línea de permeado sujeta. El producto intermedio diafiltrado se mezcló durante 5 minutos antes de tomar muestras y pasar a la siguiente etapa. El peso neto del intermedio diafiltrado fue de 4265 g.
- 35 (11) El intermedio diafiltrado se resuspendió y se dispensó en alícuotas de 200 ml en frascos de vidrio limpios de 1 l para la esterilización por vapor. El lote produjo 21 frascos de aproximadamente 200 ml de producto diafiltrado por
- 40
- 45
- 50

frasco de salida de la etapa de dispensación.

(12) Los frascos de 21 x 1 l del producto se esterizaron en un ciclo de autoclave de vapor de "recipiente abierto" durante 62 minutos a 123 °C. Los frascos del producto se retiraron del autoclave inmediatamente después de completar el ciclo, se dejaron equilibrar a temperatura ambiente y a continuación se almacenaron a 2-8 °C.

5 Después de la fabricación de adyuvante de fosfato de aluminio (APA) a escala piloto, el material se caracterizó por varios métodos analíticos. La tabla 10 es un resumen de estos resultados.

Tabla 10: Propiedades del APA a escala piloto

Propiedad	Método	Resultado
Concentración de aluminio	Espectroscopía de plasma acoplado por inducción (ICP)	2,9 mg/ml como aluminio
Relación molar de fosfato a aluminio (P/Al, solo sólidos adyuvantes)	ICP	1,02
pH	pH	5,39
Punto de carga cero (PZC)	Potencial zeta	5,23
Tamaño de partícula agregado	d(v,0,5) por dispersión de luz estática (SLS)	3,97 µm
Fosfato libre	Ensayo de fosfato verde de malaquita	18,0 mM
Cloruro de sodio	Cloruro por titulación de nitrato de plata convertido a % de cloruro de sodio	0,97 %

10 Todos los resultados estuvieron dentro de los intervalos deseados.

Ejemplo 4

15 FABRICACIÓN DE ADYUVANTE DE FOSFATO DE ALUMINIO A ESCALA COMERCIAL

Este ejemplo describe un proceso a escala comercial para la fabricación rutinaria de adyuvante de fosfato de aluminio (APA).

20 (1) Las materias primas utilizadas en este proceso se resumen en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11: Materias primas y soluciones utilizadas para la fabricación de APA

Materia prima/solución	Propósito
Cloruro de aluminio (hexahidratado)	Reactivo
Fosfato de sodio dibásico (anhidro)	Reactivo
Agua para inyección (WFI)	Disolvente, diluyente, lavado de filtro UF
Cloruro de sodio	Tampón de diafiltración

(2) Los equipos/materiales principales utilizados en este proceso se resumen en la Tabla 12.

25 Tabla 12: Equipos y materiales utilizados para la fabricación de APA

Equipos/Materiales	Propósito
Sistema de mezcla ATMI Newmix Pad-Drive 1000 con recipientes Q-mix de acero inoxidable y bolsas desechables de 200 l y 1000 l	Fabricación de reactivo y tampón de UF
Tanque revestido de 250 l con filtro de aire entrante y filtro de ventilación	Recipiente del producto, esterilización <i>in situ</i>
Bomba de lóbulo rotatorio	Recirculación durante la ultrafiltración y reducción de tamaño
Mezclador de alto cizallamiento Silverson 275UHS	Reducción del tamaño de partícula
Portafilos y carro Millipore CUF-1	Ultrafiltración
Ultrafiltros Millipore Pellicon 2 Biomax PES, 300 kD	Ultrafiltración
Bombas peristálticas	Mezcla en T de reactivo, adición de tampón de UF, flujo de permeado UF
Báscula de suelo	Medición de la cantidad de producto dispensado
Frascos de vidrio de 45 l	Almacenamiento de productos

30 (3) El reactivo de cloruro de aluminio (Al 156 mM) se preparó como sigue. Para este proceso se utilizó un sistema de mezcla ATMI Newmix Pad-Drive 1000 equipado con un dispositivo de agitación de mezcla de paletas. Se cargó una bolsa desechable limpia de 200 l en un recipiente de acero inoxidable Q-mix de 200 l. Se cargaron aproximadamente 145,9 kg de WFI en la bolsa. Se cargó un blanco de 5,65 kg de cloruro de aluminio (hexahidratado) en la bolsa y se mezcló durante aproximadamente 60 minutos a una velocidad de rotación de 65 con la alternancia de las paletas activada (intervalos de 30 segundos) utilizando un ángulo de paletas de 20 grados. La disolución del cloruro de

aluminio se confirmó visualmente al completar la mezcla. Se tomaron muestras de la solución de cloruro de aluminio antes del procesamiento posterior. El pH de la solución de reactivo de cloruro de aluminio medía 3,02 y la conductividad medía 35,6 mS/cm.

5 (4) El reactivo de fosfato de sodio (fosfato 390 mM) se preparó de la siguiente manera. Para este proceso se utilizó un sistema de mezcla ATMI Newmix Pad-Drive 1000 equipado con un dispositivo de agitación de mezcla de paletas. Se cargó una bolsa desechable limpia de 200 l en un recipiente de acero inoxidable Q-mix de 200 l. Se cargaron aproximadamente 148,3 kg de WFI en la bolsa. Se cargó un blanco de fosfato de sodio dibásico (anhidro) en la bolsa y se mezcló durante aproximadamente 60 minutos a una velocidad de rotación de 65 con la alternancia de las paletas activada (intervalos de 30 segundos) utilizando un ángulo de paleta de 20 grados. La disolución del fosfato de sodio se confirmó visualmente al completar la mezcla. Se tomaron muestras de la solución de fosfato de sodio antes de continuar con el procesamiento. El pH de la solución de fosfato de sodio medía 8,96 y la conductividad medía 36,8 mS/cm.

10 (5) El tampón de ultrafiltración de cloruro de sodio (0,9 % en p/v) se preparó de la siguiente manera. Para este proceso se utilizó un sistema de mezcla ATMI Newmix Pad-Drive 1000 equipado con un dispositivo de agitación de mezcla de paletas. Se cargó una bolsa desechable de 1000 l limpia en un recipiente de acero inoxidable Q-mix de 1000 l. Se cargó cerca de 996 l de WFI en la bolsa. Se cargó 9,00 kg de un blanco de cloruro de sodio en la bolsa y se mezcló durante aproximadamente 60 minutos a una velocidad de rotación de 65 con la alternancia de las paletas activada (intervalos de 30 segundos) utilizando un ángulo de paleta de 20 grados. La disolución del cloruro de sodio se confirmó visualmente al completar la mezcla. El pH de la solución de cloruro de sodio medía 5,85 y la conductividad medía 15,67 mS/cm. La solución de cloruro de sodio se almacenó a temperatura ambiente hasta su posterior procesamiento.

15 (6) La mezcla en T de los reactivos de cloruro de aluminio y fosfato de sodio se realizó bombeando cada una de las soluciones a través de bombas peristálticas a un caudal de 3,0 l/min por solución. La mezcla en T se llevó a cabo bajo condiciones de temperatura ambiente controladas, asegurando que los reactivos del producto inicial estuvieran entre 17 y 33 °C antes de comenzar el proceso. Cada una de las soluciones se filtró a través de filtros de 0,22 µm para la carga biológica y la reducción de partículas y a continuación se impactaron directamente una contra otra en una tubería en "T" de ½" (nominales) con un diámetro interior de 0,37". El proceso se automatizó de manera que el producto inicial mezclado en T se dirigió al drenaje hasta que se confirmó que los caudales de los reactivos estaban bien controlados y eran estables. El intermedio de hidroxifosfato de aluminio precipitado resultante se recogió a continuación en un tanque de 250 l. El agitador del tanque se encendió a una velocidad de 50 RPM cuando el producto en el tanque alcanzó un peso de 25 kg. La velocidad del agitador se incrementó a una velocidad de 140 RPM cuando el producto en el tanque alcanzó un peso de 50 kg. Las bombas peristálticas se detuvieron cuando el peso neto del tanque alcanzó los 200 kg. La cantidad de fosfato de sodio y cloruro de aluminio que se había mezclado en T y añadido al recipiente del producto fue de 99,0 l y 99,1 l, respectivamente. La relación volumétrica de fosfato de sodio a cloruro de aluminio que reaccionó por lo tanto fue de 0,999. El agitador del tanque permaneció encendido durante 10 minutos después de la mezcla en T para garantizar que el producto intermedio fuera homogéneo antes de continuar con la siguiente etapa del proceso. Las muestras del producto se tomaron al completar esta etapa. El producto intermedio se mantuvo durante aproximadamente 25,5 horas con el agitador apagado antes de continuar con la siguiente etapa.

20 (7) Se usó un mezclador de alto cizallamiento Silverson 275UHS con un rotor de 2.75 "y un estator de orificio cuadrado de alto cizallamiento. El producto se resuspendió primero durante 45 minutos a una velocidad del agitador de 140 RPM. A continuación se llevó a cabo la etapa de reducción de tamaño recirculando el producto a través del mezclador Silverson durante 125 renovaciones volumétricas a una velocidad de 3600 RPM. Se utilizó un caudal de recirculación de aproximadamente 90 l/min para asegurar la presión adecuada en la entrada [aproximadamente 0,48-0,52 barg (48-52 kPag)] y la salida [aproximadamente 0,59-0,64 barg (59-64 kPag)] del mezclador de alto cizallamiento. La bomba de lóbulo rotatorio se ejecutó a aproximadamente 128 RPM para obtener este caudal, lo que resultó en un tiempo de procesamiento de aproximadamente 4 horas y 20 minutos para alcanzar el número objetivo de renovaciones para este lote en particular. La mezcla en el recipiente del producto se mantuvo durante la operación de reducción de tamaño corriendo el agitador a 140 RPM. La temperatura del producto se controló a 17-33 °C durante la etapa de reducción de tamaño mediante la entrada de agua fría a la camisa del tanque para mitigar cualquier aumento de temperatura debido a la entrada de energía del mezclador de alto cizallamiento y la bomba de lóbulo rotatorio. Se tomaron muestras de productos durante esta etapa y al finalizar esta etapa. El producto intermedio se mantuvo durante aproximadamente 24 horas con el agitador apagado antes de continuar con la siguiente etapa.

25 (8) El equipo UF consistió en un portafiltros/carro Millipore CUF-1 con filtros Pellicon 2 300 kD Biomax PES de 4 x 2 m² (n.º de cat. P2B300V20) para un área de filtro total de 8 m². Los transmisores de presión en las corrientes de permeado, alimentación y retenido se usaron para monitorizar la presión transmembrana (TMP) y la caída de presión (ΔP) durante todo el proceso. Se usó una bomba de lóbulo rotatorio para controlar el caudal de retenido y se usaron bombas peristálticas para controlar los permeados y los caudales de adición de tampón.

30 (9) El sistema de UF se lavó con WFI según los procedimientos convencionales antes de su uso. Dado que este lote en particular no estaba destinado para uso humano, no se requirió la desinfección de los filtros de UF. Para un lote destinado a uso humano, se utilizará una solución de NaOH 0,1 N o 0,5 N para la desinfección según los procedimientos convencionales.

35 (10) El peso neto de la entrada intermedia de tamaño reducido a la etapa de ultrafiltración (UF) fue de 183,0 kg. Antes de la UF, el producto se resuspendió primero durante 45 minutos utilizando una velocidad de agitador de 140 RPM. El producto se agitó continuamente durante el proceso de UF a 140 RPM para mantener la homogeneidad.

Tras el lavado del filtro, el producto se concentró aproximadamente 1,5 veces. El proceso comenzó al iniciar la recirculación a través de los filtros con un flujo de retenido a 97,3 l/min (730 l/(m² · h)) con la válvula de permeado cerrada. La presión de retención fue consistentemente de aproximadamente 0,70-0,73 barg (70-73 kPag) durante el proceso y no requirió control. Una vez que el retenido alcanzó el caudal objetivo, la válvula de permeado se abrió y el caudal del permeado se incrementó lentamente a 4,0 l/min en el transcurso de aproximadamente 10 minutos. El punto final de la concentración se determinó por el peso neto del producto. En ese momento, se inició la diafiltración al comenzar la adición de tampón de UF (cloruro de sodio al 0,9 %) al recipiente del producto al mismo caudal que la salida del permeado del sistema (4,0 l/min). Se completó un intercambio de tampón de un diavolumen de 6,0 utilizando el caudal de permeado totalizado para determinar el punto final. La TMP osciló entre 0,04 y 0,14 barg (4-14 kPag) durante la concentración y entre 0,14 y 0,26 barg (14-26 kPag) durante la diafiltración. La caída de presión (ΔP) osciló entre 1,04 y 1,12 barg (104-112 kPag) durante la concentración y entre 1,12 y 1,20 barg (112-120 kPag) durante la diafiltración. La temperatura del producto se controló a 17-33 °C durante la etapa de ultrafiltración mediante la entrada de agua fría en la camisa del tanque para mitigar cualquier aumento de temperatura debido a la entrada de energía de la bomba de lóbulo rotatorio.

(11) La retención del producto se recuperó de los filtros realizando una descarga de tampón de UF al finalizar la diafiltración. Esto se hizo enjuagando 10 l de cloruro de sodio al 0,9 % a través de la alimentación/retenido en el recipiente del producto a aproximadamente 5,7 l/min con la línea de permeado cerrada. Se tomó una muestra del producto intermedio diafiltrado al finalizar esta etapa. El peso neto del producto intermedio diafiltrado fue de 130,6 kg. El producto intermedio se mantuvo durante aproximadamente 24,5 horas con el agitador apagado antes de continuar con la siguiente etapa.

(12) El intermedio diafiltrado se resuspendió durante 45 minutos utilizando una velocidad de agitador de 140 RPM. El producto se esterilizó con vapor de la siguiente manera. Se aplicó vapor a la camisa del recipiente para calentar el producto a aproximadamente 121 °C. En ese momento, también se inyectó vapor en el espacio de cabeza del recipiente para facilitar el calentamiento restante, ayudar a eliminar el aire del espacio de cabeza y asegurar la esterilización completa de los componentes internos del tanque. El producto se calentó a continuación a una temperatura objetivo de 124 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 24 minutos. El tiempo total de calentamiento desde temperatura ambiente hasta la temperatura de reposo fue de 32 minutos. Una vez completado el tiempo de espera, el producto se enfrió a aproximadamente 22 °C recirculando agua fría a través de la camisa del tanque. El enfriamiento del producto desde 124 °C a menos de 30 °C requirió aproximadamente 30 minutos. El producto se mezcló durante todo el ciclo de esterilización a un punto de ajuste del agitador de 140 RPM. Tras la esterilización, el peso neto del producto fue de 124,8 kg. Se tomó una muestra del producto a granel esterilizado al completar esta etapa. El producto esterilizado se mantuvo durante aproximadamente 72,5 horas con el agitador apagado antes de continuar con la siguiente etapa.

(13) El producto esterilizado se resuspendió durante 45 minutos utilizando una velocidad de agitador de 140 RPM. El producto se dispensó en frascos de vidrio de 4 x 45 l para su almacenamiento. Se tomaron muestras del producto final de cada uno de los frascos del producto inmediatamente después de llenar los frascos.

Después de la fabricación de adyuvante de fosfato de aluminio (APA) a escala comercial, el material se caracterizó por varios métodos analíticos. La tabla 13 es un resumen de estos resultados.

Tabla 13: Propiedades de APA a escala comercial

Propiedad	Método	Resultado
Concentración de aluminio	Espectroscopía de plasma acoplado por inducción (ICP)	2,8 mg/ml como Aluminio
Relación molar de fosfato a aluminio (P/Al, solo sólidos adyuvantes)	ICP	0,95
pH	pH	5,26
Punto de carga cero (PZC)	Potencial zeta	5,15
Tamaño de partícula agregado	d(v,0,5) por dispersión de luz estática (SLS)	6,98 μm
Fosfato libre	Ensayo de fosfato verde de malaquita	13,1 mM
Cloruro de sodio	Cloruro por electroforesis capilar (EC) convertido en % de cloruro de sodio	0,92 %

Todos los resultados estuvieron dentro de los intervalos deseados.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de adyuvante de hidroxifosfato de aluminio que comprende las etapas de:
- 5 (a) mezclar conjuntamente una solución de una sal de aluminio con una solución de un fosfato en una relación molar de P/Al definida y en presencia de un tampón que mantiene un pH constante, en donde dicha mezcla implica la combinación simultánea y continua de la solución de la sal de aluminio y la solución del fosfato en una relación de reactivo constante; en donde la relación de P/Al definida está en el intervalo de 2,0-3,5; en donde la solución de fosfato tiene un pH de 7,4 a 12,4, de 8,0 a 10,0, o de 8,5 a 9,5; y en donde el tampón es el mismo
- 10 que la solución de fosfato; y
(b) intercambiar el tampón con una solución de intercambio de tampón para eliminar al menos el 80 % de cualquier exceso de fosfato, tampón u otras sales residuales de los reactivos originales.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la solución de fosfato se selecciona del grupo que consiste en fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio tribásico, ácido fosfórico, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio tribásico, fosfato de amonio monobásico, fosfato de amonio dibásico, fosfato de amonio tribásico, fosfato de sodio y amonio y combinaciones de los mismos.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la solución de fosfato comprende fosfato de sodio dibásico.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la sal de aluminio se selecciona del grupo que consiste en cloruro de aluminio, sulfato de potasio y aluminio, sulfato de aluminio y amonio, nitrato de aluminio, bromuro de aluminio, bromato de aluminio, clorato de aluminio, yoduro de aluminio y diferentes formas hidratadas de estos.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que la sal de aluminio es cloruro de aluminio hexahidratado.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el adyuvante de hidroxifosfato de aluminio tiene una o más de las siguientes propiedades:
- 30 potencial zeta de del punto de carga cero (PZC) de 4,2 a 6,9, de 4,7 a 6,4, o de 4,7 a 5,4;
diámetro medio del volumen del tamaño de partícula agregado ($d(v,0,5)$) inferior a 40 micrómetros, de 2 a 10 micrómetros, o de 3 a 6 micrómetros;
- 35 pH en el intervalo de 3,0 a 8,0, 4,5 a 7,2 o 4,5 a 5,5; o
relación molar de P/Al medida en el sólido precipitado final de 0,6-1,2; 0,8-1,2 o 0,9-1,1.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además realizar una reducción de tamaño antes de la etapa (b) para reducir el tamaño de partícula promedio ($d(0,5)$) de aproximadamente 10 a 40 micrómetros a aproximadamente 2 a 10 micrómetros o 3 a 6 micrómetros.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, en el que la reducción de tamaño se realiza mediante el uso de un mezclador rotor-estator de alto cizallamiento, mezclando vigorosamente con un impulsor, recirculando a través de una bomba u otros medios para exponer el producto a esfuerzos de cizallamiento significativos.
- 45 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la solución de intercambio de tampón para el intercambio de tampón es solución salina o histidina.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la etapa de intercambio de tampón se lleva a cabo mediante ultrafiltración.
- 50 11. El método de la reivindicación 10, en el que el grado de intercambio del tampón de ultrafiltración es de 4 a 15 diavolumenes o de 5 a 7 diavolumenes.
- 55 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además esterilizar la solución después de la etapa (b).
13. El método de la reivindicación 12, en el que dicha esterilización se realiza mediante autoclavado o esterilización por vapor *in situ*.
- 60

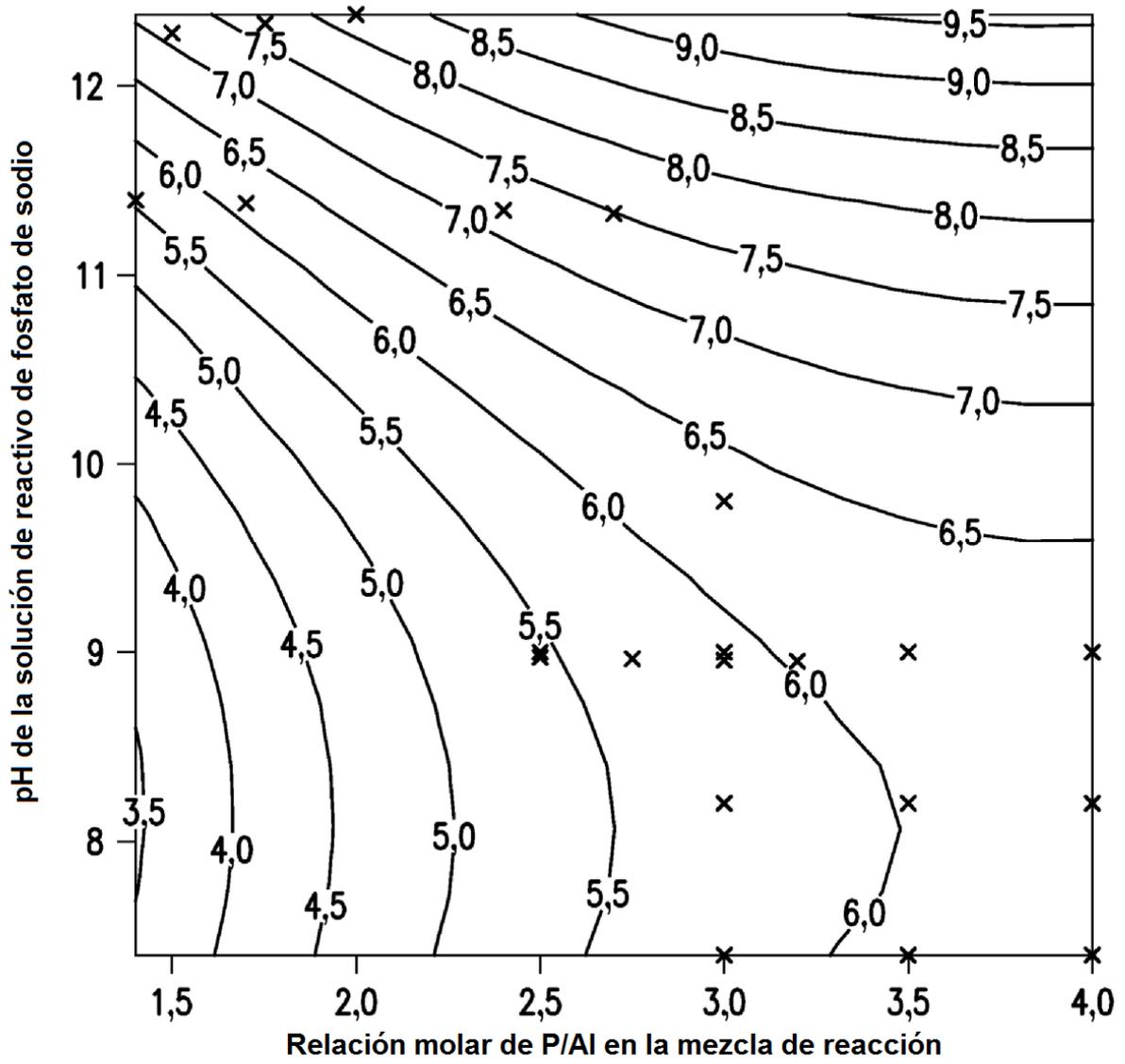


FIG. 1

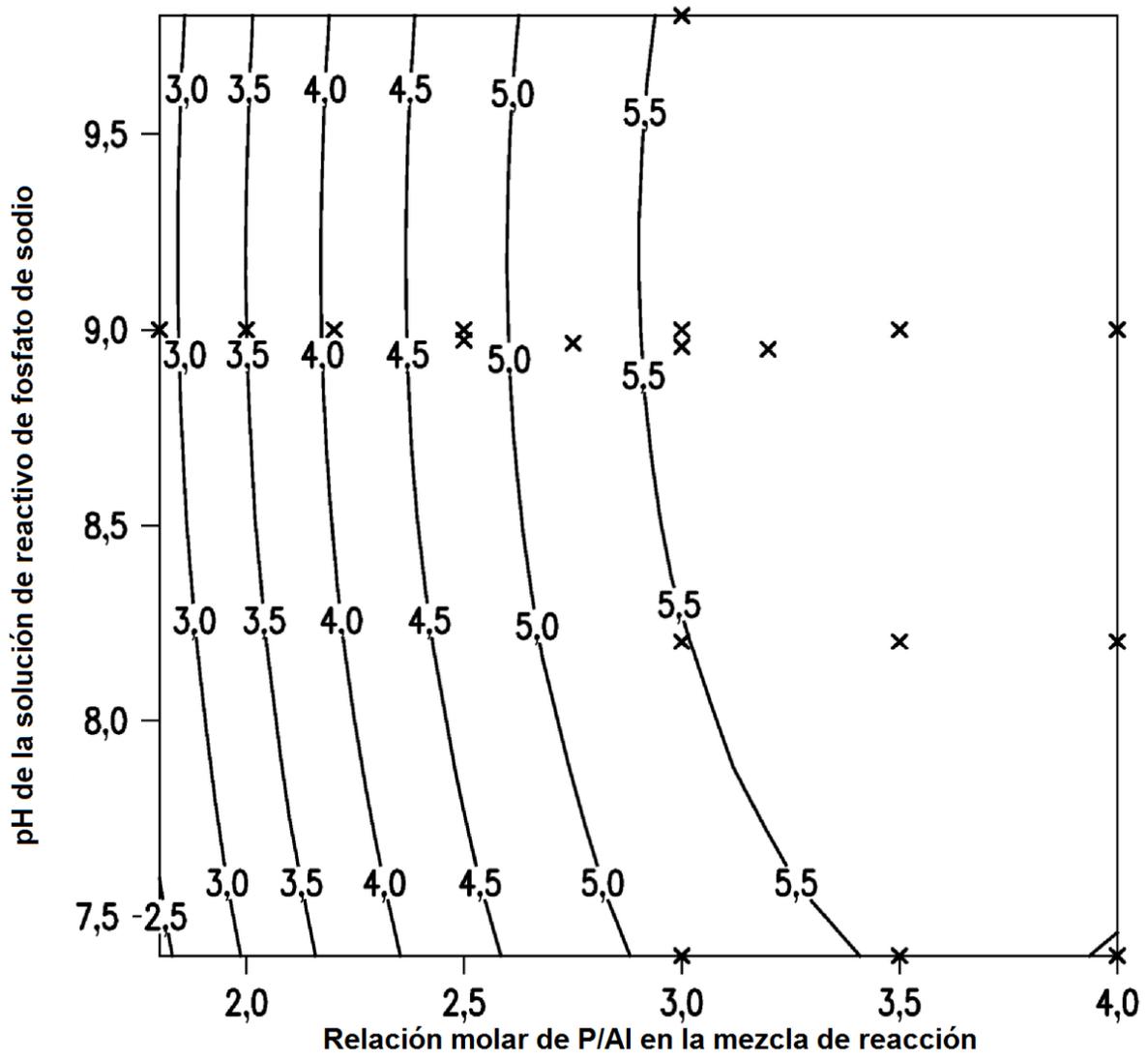


FIG.2

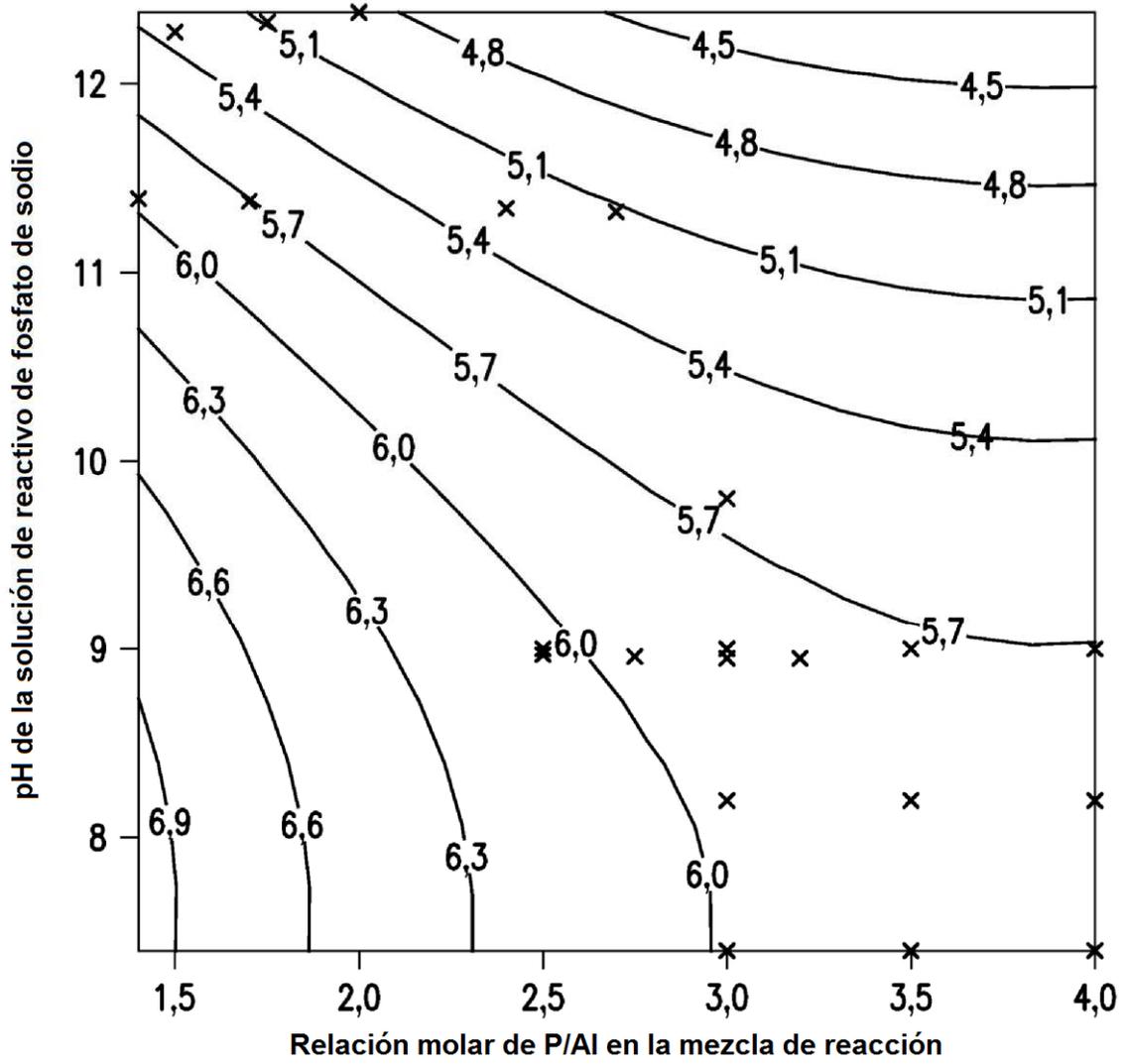


FIG.3

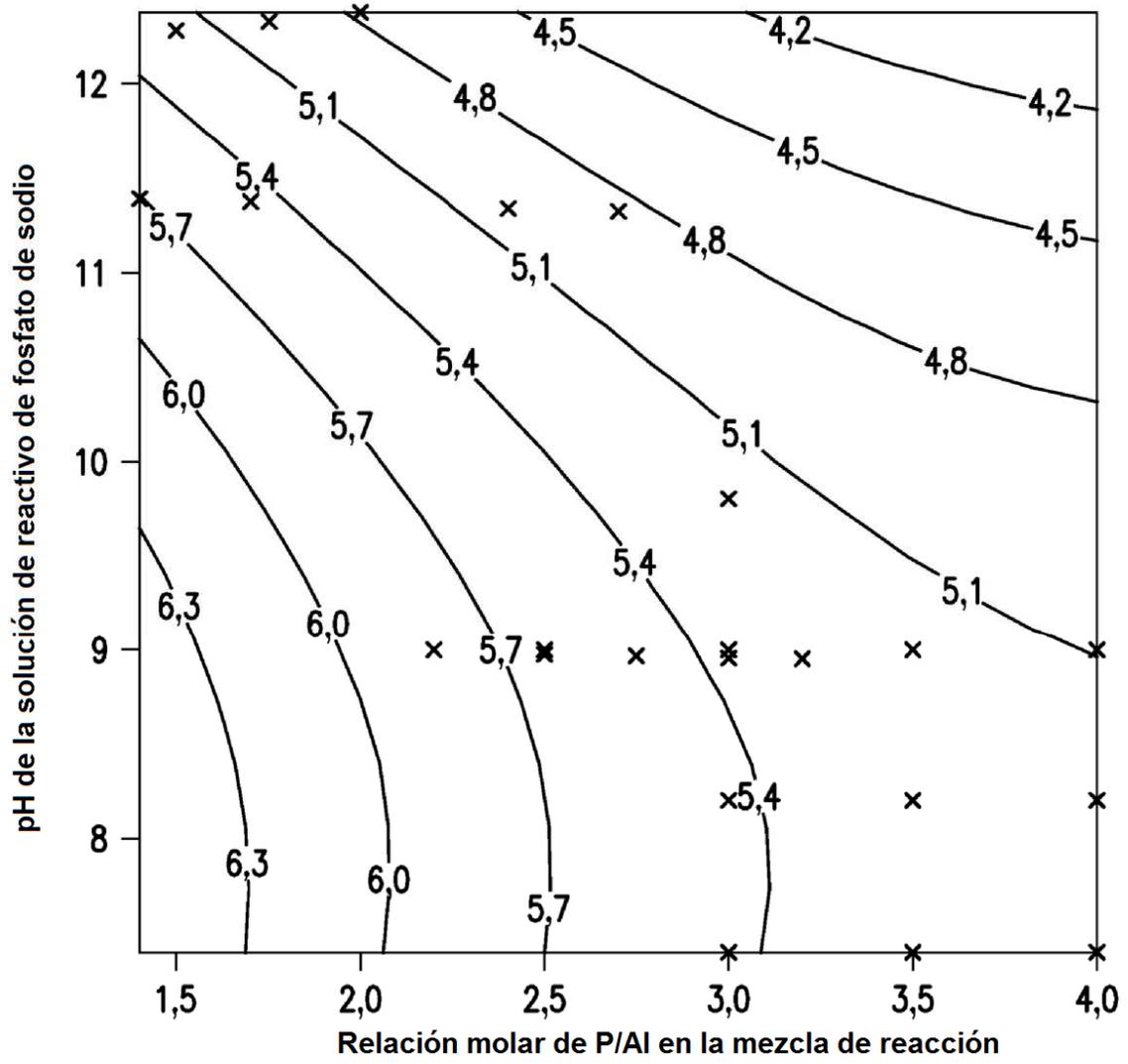


FIG.4

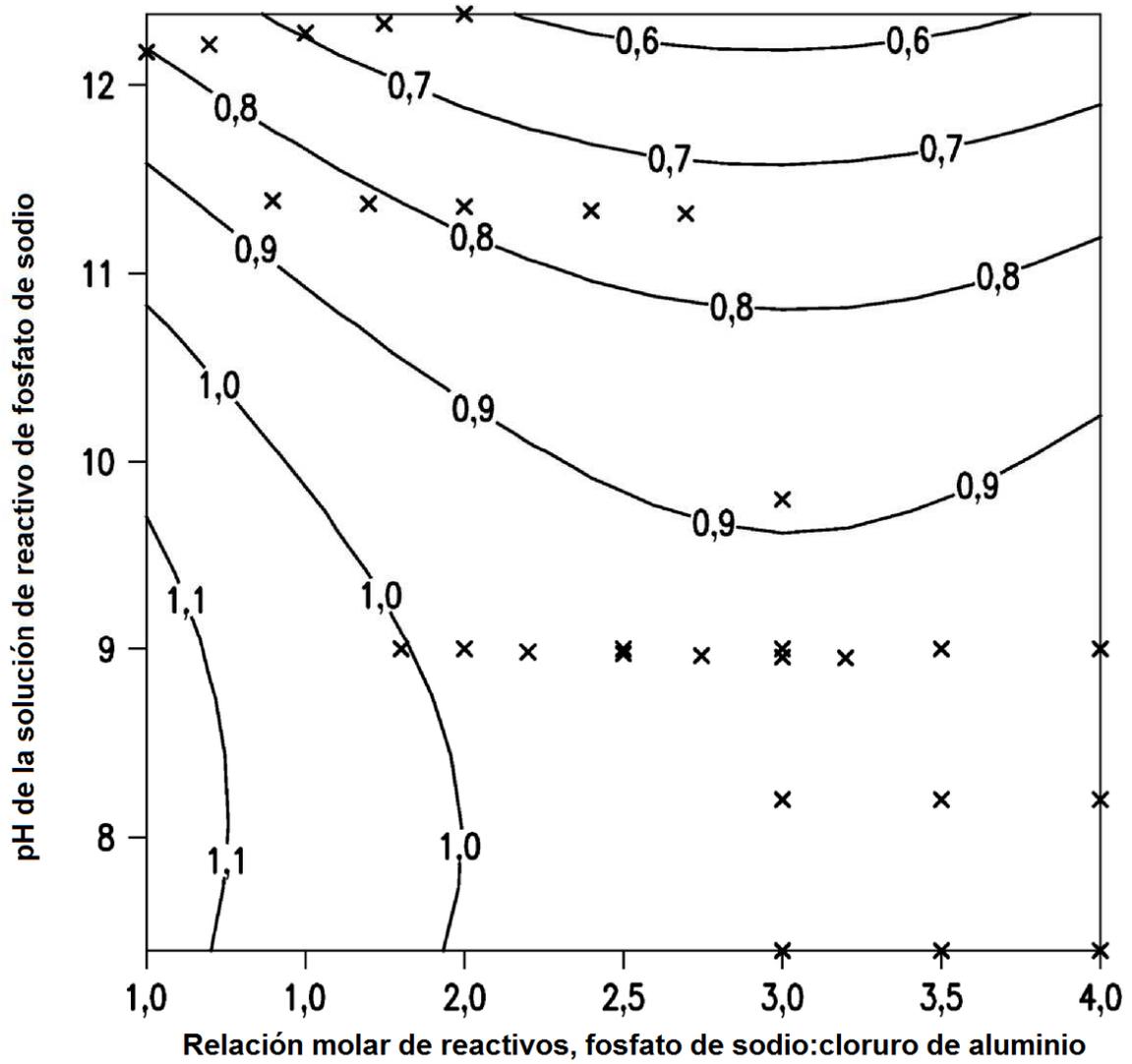


FIG.5

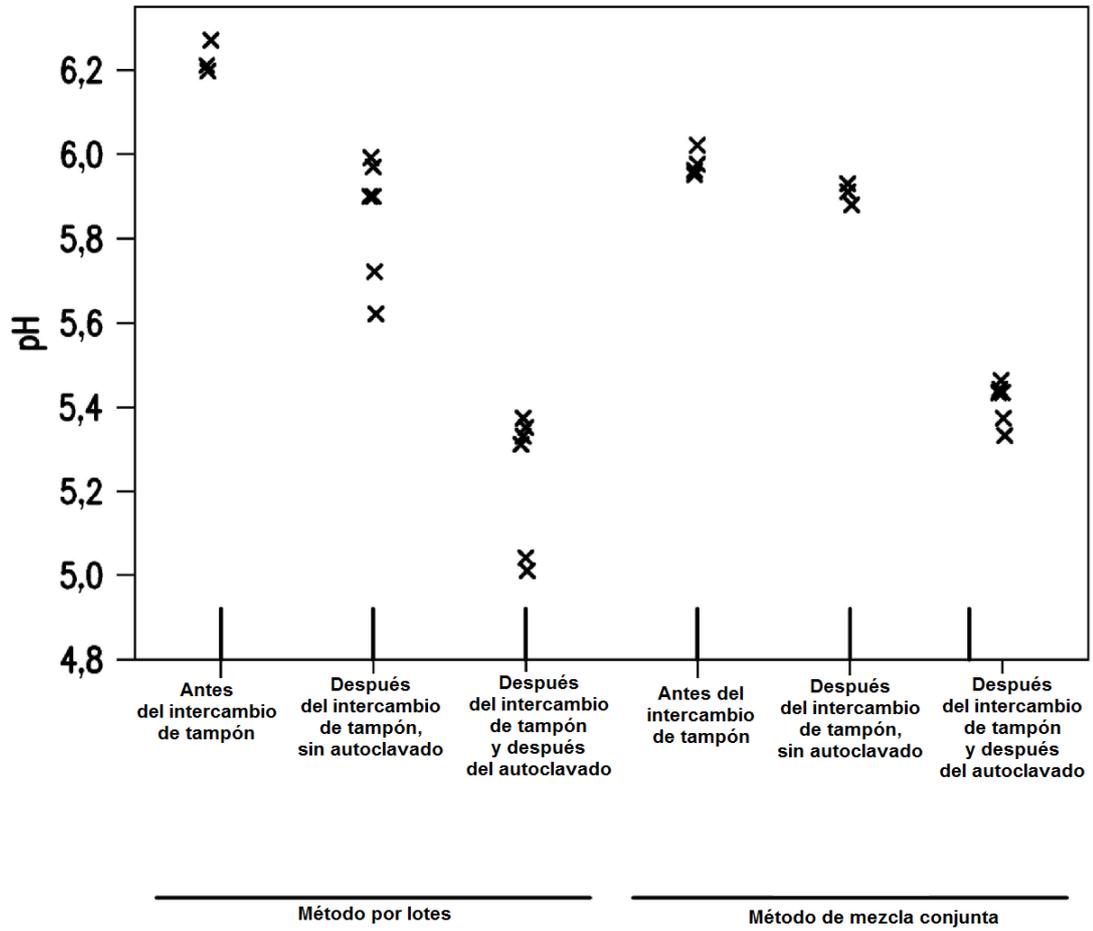


FIG.6

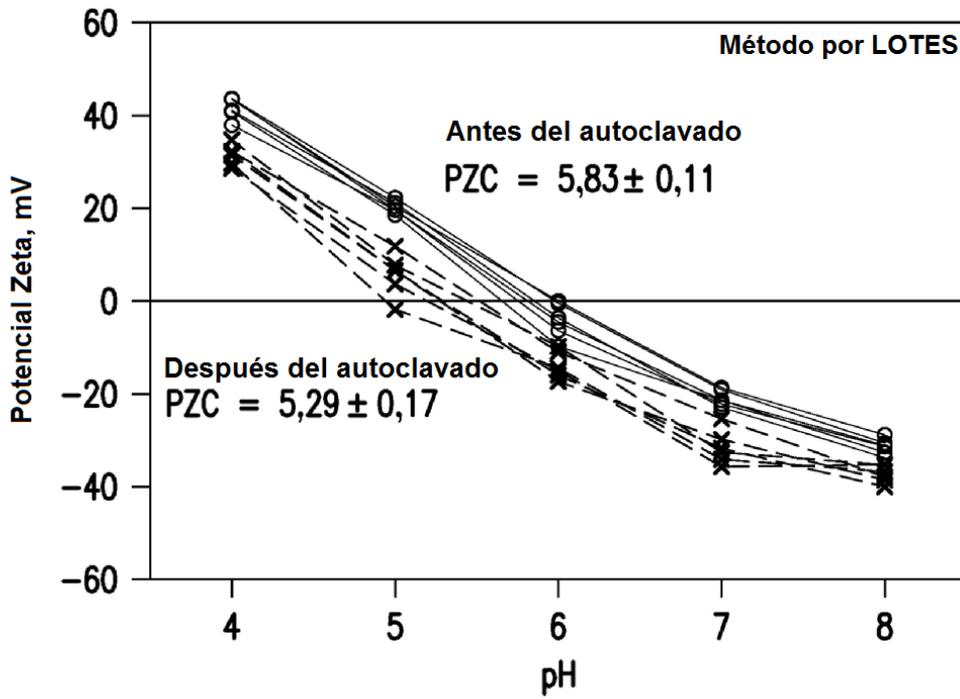


FIG.7A

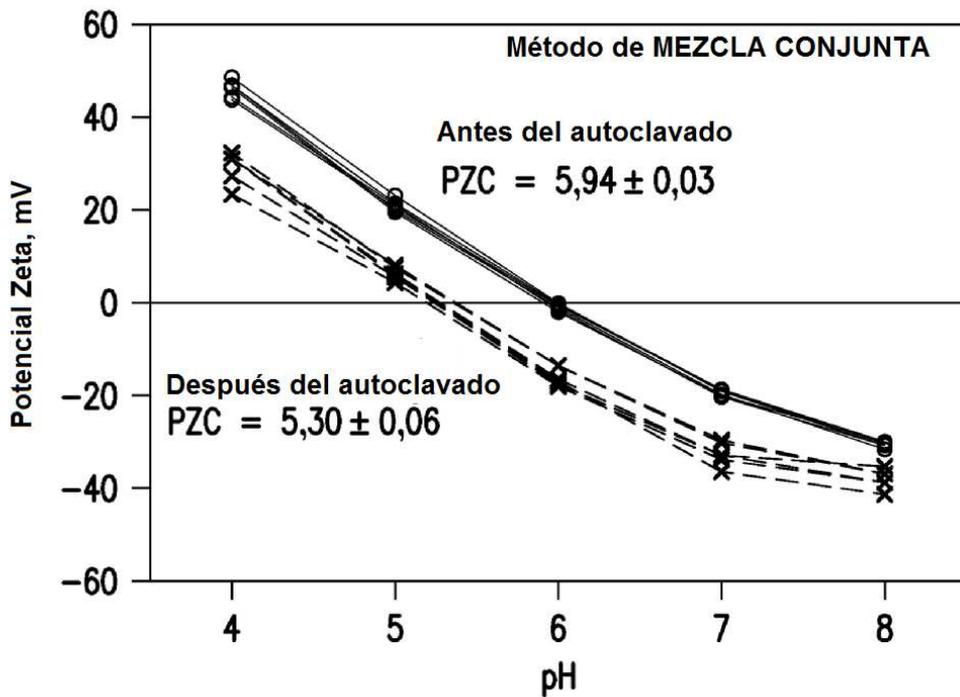


FIG.7B