

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 776**

51 Int. Cl.:

C01B 25/36 (2006.01)

A61K 33/06 (2006.01)

A61K 33/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2008 E 17198364 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3301074**

54 Título: **Procedimiento de producción de fosfato de aluminio**

30 Prioridad:

10.07.2007 US 958958 P
09.07.2008 US 169665

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.04.2020

73 Titular/es:

WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US

72 Inventor/es:

KHANDKE, LAKSHMI y
PEREZ, JOSEPH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 753 776 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

Procedimiento de producción de fosfato de aluminio

Antecedentes

5 Algunas vacunas y otros medicamentos contienen uno o más componentes llamados adyuvantes que sirven para mejorar la inmunogenicidad de los antígenos de vacuna, lo que hace que la vacuna sea más efectiva. Los estudios han demostrado que muchas vacunas que contienen aluminio provocan respuestas de anticuerpos más altas y más prolongadas que las mismas vacunas formuladas sin el adyuvante. Existen varios tipos de sales que contienen aluminio (también denominadas alumbre) que funcionan como adyuvantes de vacunas: (i) fosfato de aluminio o AlPO_4 , (ii) hidróxido de aluminio o $\text{Al}(\text{OH})_3$ y (iii) sulfato de aluminio potasio de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$. La efectividad de cada adyuvante que contiene aluminio a menudo depende de las características de la vacuna específica y de cómo el fabricante prepara la vacuna (Baylor et al., "Aluminum salts in vaccines-US perspective", Vaccine 20:S18-23, 2002). Para trabajar como un adyuvante, el antígeno normalmente necesita ser adsorbido en el aluminio para mantener el antígeno en el sitio de la inyección.

15 Las vacunas autorizadas en los Estados Unidos para niños que contienen adyuvantes de aluminio incluyen, sin limitación, la vacuna difteria-tétanos-pertussis acelular (DTaP), algunas vacunas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), vacuna antineumocócica conjugada, vacunas contra la hepatitis B, DTaP combinada, Tdap, Vacunas contra la Hepatitis A y vacuna contra el virus del papiloma humano.

20 Pevnar®, comercializado y vendido por Wyeth, es una vacuna antineumocócica conjugada que contiene fosfato de aluminio como adyuvante. Los antígenos en Pevnar® son una mezcla de polisacáridos de siete serotipos diferentes de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, cada uno conjugado con la proteína transportadora CRM₁₉₇. Pevnar® está formulado como un líquido acuoso transparente que contiene una suspensión coloidal del antígeno, la sustancia que estimula la respuesta inmune protectora específica, adsorbida en el adyuvante de aluminio AlPO_4 .

25 El documento GB777018 divulga un procedimiento para producir fosfato de aluminio. Una solución acuosa de fosfato de sodio tribásica se agrega a una solución acuosa agitada que contiene cloruro de aluminio. Después de ajustar el pH de 6,4 a 6,6 con una solución de hidróxido de sodio, la suspensión se sedimenta a temperatura ambiente para producir el precipitado del fosfato de aluminio. Después de cinco a siete días el sobrenadante se decanta y descarta. El gel resultante se lava y se vuelve a suspender en agua. La suspensión de gel se puede esterilizar mediante autoclave.

30 Aunque se han descrito procedimientos para producir adyuvante de fosfato de aluminio, sigue existiendo la necesidad en la técnica de procedimientos que sean más eficaces y/o estériles, especialmente a escala industrial. Además, es deseable que cualquier procedimiento nuevo produzca adyuvante de fosfato de aluminio con características físicas, químicas y funcionales similares a las del adyuvante de fosfato de aluminio que ya se usa comercialmente, por ejemplo, en Pevnar®.

Sumario

35 La presente invención proporciona procedimientos mejorados para producir el adyuvante de aluminio AlPO_4 . Estos procedimientos de fabricación mejorados se benefician de una mayor eficacia y/o esterilidad incrementada en comparación con otros procedimientos y son particularmente útiles a escala industrial.

40 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir fosfato de aluminio que comprende las etapas de mezclar una solución de cloruro de aluminio y una solución de fosfato de sodio tribásico para producir un precipitado de fosfato de aluminio, en el que la mejora comprende sedimentar el precipitado de fosfato de aluminio a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C.

45 En otro aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento para producir fosfato de aluminio que comprende los pasos de: (i) mezclar una solución de cloruro de aluminio y una solución de fosfato de sodio tribásico para producir una suspensión de fosfato de aluminio y un sobrenadante; (ii) sedimentar la suspensión de fosfato de aluminio para producir un precipitado de fosfato de aluminio; y (iii) retirar el sobrenadante, en el que los pasos de mezclar, sedimentar y retirar se realizan dentro de un sistema cerrado.

Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 representa un diagrama de flujo para un procedimiento de producción de AlPO_4 (no de acuerdo con la invención).
La Figura 2 representa un diagrama de flujo para un procedimiento mejorado de producción de AlPO_4 (de acuerdo con la invención).

Descripción detallada de ciertas realizaciones

La presente invención proporciona procedimientos mejorados para la fabricación del adyuvante de aluminio AlPO_4 . Estos procedimientos son especialmente útiles en la fabricación a escala industrial de AlPO_4 .

La Figura 1 representa un procedimiento de la técnica anterior para producir fosfato de aluminio en el que el cloruro de aluminio (AlCl_3) y el fosfato de sodio tribásico (Na_3PO_4) se preparan primero por separado. El cloruro de aluminio puede estar en forma de cloruro de aluminio hexahidratado. Estos reactivos se transfieren asépticamente a un recipiente de formulación y se combinan con agua (por ejemplo, Water-for-Injection™ o WFI™). La reacción entre estos reactivos da como resultado la formación de una suspensión de AlPO_4 . La suspensión se transfiere luego a depósitos para sedimentar a 25 °C. El tiempo de sedimentación para este procedimiento (es decir, el tiempo requerido para permitir que el precipitado AlPO_4 se sedimente en los tambores) es de aproximadamente 7 a 10 días, lo que representa el paso más lento en el procedimiento general. Después de la sedimentación, el sobrenadante se elimina de cada depósito y el AlPO_4 precipitado se transfiere a un recipiente de formulación para la esterilización in situ (por ejemplo, ≥ 121 °C, 45 min) y el ajuste del pH. El AlPO_4 final se transfiere luego a depósitos para su almacenamiento. El tiempo total de ciclo del lote de este procedimiento a escala industrial es de aproximadamente 10 a 12 días. Además, la naturaleza abierta de este procedimiento requiere que las múltiples manipulaciones asépticas se realicen en un entorno de aire limpio (por ejemplo, Clase 100). Esto es costoso y también requiere pruebas de esterilidad.

La eficacia del procedimiento representado en la Figura 1 se mejora significativamente, entre otras cosas, realizando el paso de sedimentación a temperaturas más altas. En este procedimiento mejorado de acuerdo con la invención que se representa en la Figura 2, después de mezclar el cloruro de aluminio, el fosfato de sodio tribásico y el agua para formar una suspensión de AlPO_4 , la suspensión se deja sedimentar a aproximadamente 50 °C a 70 °C (por ejemplo, 60 °C). El tiempo de asentamiento a estas temperaturas más altas se reduce de aproximadamente 7 a 10 días a entre aproximadamente 2 y 5 días.

Otra mejora en comparación con el procedimiento de la Figura 1 implica realizar todos los pasos del procedimiento dentro de un sistema cerrado. Esto tiene la ventaja de reducir el riesgo de contaminación (por ejemplo, de bacterias, etc.) aumentando así la garantía de esterilidad del producto final y reduciendo la necesidad de pruebas de esterilidad. Por lo tanto, en la Figura 2, el sobrenadante se elimina del recipiente de formulación (por ejemplo, usando un tubo de sifón) y la suspensión de AlPO_4 restante (todavía en el mismo recipiente de reacción) se esteriliza en el lugar (por ejemplo, $\geq 121,1$ °C, 30 minutos) antes el pH está ajustado. El producto AlPO_4 final puede luego transferirse a depósitos para su almacenamiento. El tiempo de ciclo de lote total de este procedimiento a escala industrial es de aproximadamente 3 a 6 días (es decir, la mitad del tiempo de ciclo del procedimiento en la Figura 1). Un tiempo de ciclo reducido proporciona una ventaja en eficiencia. La Tabla 2 proporciona una comparación lado a lado de algunas de las diferencias entre los procedimientos representados en las Figuras 1 y 2.

Basándose en parte en estos hallazgos, la presente invención proporciona un procedimiento para producir fosfato de aluminio que comprende las etapas de mezclar una solución de cloruro de aluminio y una solución de fosfato sódico tribásico para producir un precipitado de fosfato de aluminio, donde la mejora comprende sedimentar el fosfato de aluminio. Precipitar a una temperatura en el rango de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. En ciertas realizaciones, la mejora comprende sedimentar el precipitado de fosfato de aluminio a una temperatura en el rango de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En otra realización, la mejora comprende sedimentar el precipitado de fosfato de aluminio a una temperatura de aproximadamente 62 °C. En otra realización más, la mejora comprende sedimentar el precipitado de fosfato de aluminio a una temperatura de aproximadamente 60 °C.

Como se discutió anteriormente, estas mejoras reducen significativamente e inesperadamente el tiempo de sedimentación del fosfato de aluminio. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el paso de sedimentación puede realizarse entre aproximadamente 2 y 5 días en comparación con entre aproximadamente 7 y 10 días a temperaturas más bajas. En un conjunto de realizaciones, el paso de sedimentación puede realizarse entre aproximadamente 2 y 4 días, por ejemplo, entre aproximadamente 2 y 3 días o entre aproximadamente 3 y 4 días. Se apreciará que el paso de sedimentación puede realizarse durante el tiempo que se desee dentro de estos rangos o incluso durante períodos más largos (por ejemplo, 5 o más días) o más cortos (por ejemplo, menos de 2 días). Períodos de sedimentación más largos generalmente producirán mayores rendimientos en comparación con períodos de sedimentación más cortos; sin embargo, también habrá una compensación de eficiencia como resultado de la mayor duración del procedimiento de fabricación general. En consecuencia, el tiempo de asentamiento óptimo tendrá que tener en cuenta ambos factores y también dependerá de la temperatura de sedimentación exacta.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento para producir fosfato de aluminio dentro de un sistema cerrado. El uso del sistema cerrado mejora significativamente la garantía de esterilidad del procedimiento. Esto hace que el procedimiento general sea más eficiente ya que reduce la cantidad de pruebas de esterilidad que se deben realizar y ya no requiere que el procedimiento se realice dentro de un entorno de aire limpio. Como se usa en el presente documento, el término "sistema cerrado" significa un sistema en el que la exposición de la mezcla de reacción contenida dentro de uno o más recipientes al entorno exterior (por ejemplo, aire, oxígeno, microbios y similares) se reduce o previene. De acuerdo con este aspecto, el procedimiento de la invención comprende los pasos de (i) mezclar una solución de cloruro de aluminio y una solución de fosfato de sodio tribásico para producir una suspensión de fosfato de aluminio y un sobrenadante; (ii) sedimentación de la suspensión de fosfato de aluminio para producir un precipitado de fosfato de aluminio; y (iii) eliminar el sobrenadante, en el que los pasos de mezclar, sedimentar y eliminar se llevan a cabo dentro de un sistema cerrado.

- 5 En ciertas realizaciones, en el paso de mezclado del procedimiento anterior, la solución de fosfato de sodio tribásico se agrega a la solución de cloruro de aluminio. La solución de fosfato de sodio tribásico se agrega típicamente a la solución de cloruro de aluminio hasta que el pH está en el rango de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,4 (es decir, aproximadamente $5,2 \pm 0,2$). En ciertas realizaciones, la solución de fosfato de sodio tribásico se agrega a la solución de cloruro de aluminio hasta que el pH está en el rango de aproximadamente 5,1 a aproximadamente 5,3.
- En ciertas realizaciones, el paso de mezclado del procedimiento anterior se realiza a una temperatura en el rango de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C. En ciertas realizaciones, el paso de mezclado se realiza a una temperatura de aproximadamente 25 °C.
- 10 En ciertas realizaciones, el paso de mezclado del procedimiento anterior comprende mezclar la solución de cloruro de aluminio y la solución de fosfato de sodio tribásico con un impulsor que gira a aproximadamente 150 rpm a aproximadamente 350 rpm. En ciertas realizaciones, el paso de mezclado del procedimiento anterior comprende mezclar la solución de cloruro de aluminio y la solución de fosfato de sodio tribásico con un impulsor que gira a aproximadamente 200 rpm a aproximadamente 300 rpm. En otras realizaciones más, el paso de mezclado del procedimiento anterior comprende mezclar la solución de cloruro de aluminio y la solución de fosfato de sodio tribásico
- 15 con un impulsor que gira a aproximadamente 250 rpm.
- En ciertas realizaciones, el paso de sedimentación del procedimiento anterior se realiza a una temperatura en el rango de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C, es decir, como se describe en el primer aspecto de la invención. En ciertas realizaciones, el paso de sedimentación del procedimiento anterior se realiza a una temperatura en el rango de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. En otra realización, el paso de sedimentación se realiza a una
- 20 temperatura de aproximadamente 62 °C. Aún otras realizaciones, el paso de sedimentación se realiza a una temperatura de aproximadamente 60 °C.
- En ciertas realizaciones, el paso de sedimentación puede realizarse durante entre aproximadamente 2 y 5 días. Por ejemplo, el paso de sedimentación puede realizarse entre aproximadamente 2 y 4 días, por ejemplo, entre aproximadamente 2 y 3 días o entre aproximadamente 3 y 4 días. Se apreciará que el paso de sedimentación puede
- 25 realizarse durante el tiempo que se desee dentro de estos rangos o incluso durante periodos más largos (por ejemplo, 5 días o más) o más cortos (por ejemplo, menos de 2 días).
- En ciertas realizaciones, el paso de eliminación comprende decantar el sobrenadante. En ciertas realizaciones, el paso de eliminación comprende eliminar el sobrenadante usando un tubo de sifón.
- 30 En ciertas realizaciones, el procedimiento anterior comprende además esterilizar el precipitado de fosfato de aluminio, en el que las etapas de mezclar, sedimentar, eliminar y esterilizar se realizan todas dentro de un sistema cerrado. En ciertas realizaciones, el paso de esterilización comprende calentar el precipitado de fosfato de aluminio a una temperatura superior a aproximadamente 110 °C. En ciertas realizaciones, el paso de esterilización comprende calentar el precipitado de fosfato de aluminio a una temperatura superior a aproximadamente 121 °C.
- En ciertas realizaciones, el procedimiento anterior comprende además ajustar el pH del precipitado de fosfato de
- 35 aluminio, donde los pasos de mezcla, sedimentación, eliminación, esterilización y ajuste se realizan todas dentro de un sistema cerrado. En ciertas realizaciones, el paso de ajuste comprende ajustar el pH del precipitado de fosfato de aluminio para que esté en el rango de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,0. En ciertas realizaciones, el paso de ajuste comprende ajustar el pH del precipitado de fosfato de aluminio para que esté en el rango de
- 40 aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,0. En ciertas realizaciones, el paso de ajuste comprende ajustar el pH del precipitado de fosfato de aluminio para que esté en el rango de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,0. En ciertas realizaciones, el paso de ajuste comprende ajustar el pH del precipitado de fosfato de aluminio para que esté en el rango de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,0.
- Los procedimientos de la invención se pueden usar para producir fosfato de aluminio que tiene una variedad de
- 45 concentraciones; sin embargo, en ciertas realizaciones, la concentración de fosfato de aluminio después del paso de mezcla anterior está en el rango de aproximadamente 9,0 a 16,5 mg/ml.
- En ciertas realizaciones, después del paso anterior de ajuste del pH, el precipitado de fosfato de aluminio incluye partículas con una distribución de tamaño que tiene un $D[v, 0,5]$ (las definiciones de los valores de distribución de tamaño particulares se exponen en el Ejemplo 1 a continuación) en el rango de aproximadamente 3,0 μm a
- 50 aproximadamente 9,0 μm , o de aproximadamente 4,5 μm a aproximadamente 6,5 μm . En ciertas realizaciones, después del paso anterior de ajuste del pH, el precipitado de fosfato de aluminio incluye partículas con una distribución de tamaño que tiene una $D[v, 0,1]$ de más de aproximadamente 1,5 μm , o de más de aproximadamente 2,0 μm . En ciertas realizaciones, después del paso anterior de ajuste del pH, el precipitado de fosfato de aluminio incluye partículas con una distribución de tamaño que tiene una $D[v, 0,9]$ de menos de aproximadamente 25 μm , de menos de
- 55 de aproximadamente 24 μm , de menos de aproximadamente 23 μm , de menos de aproximadamente 22 μm , de menos de aproximadamente 21 μm , o de menos de aproximadamente 20 μm .
- Las realizaciones particulares de la invención se exponen en las reivindicaciones 1-16.
- La presente invención se ilustrará más específicamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe

entenderse que la presente invención no está limitada por estos ejemplos de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Descripción del sistema/procedimiento

5 Este ejemplo describe un sistema de ejemplo y un procedimiento para realizar algunos de los procedimientos que se describen en la presente memoria, tales como el representado en la Figura 2. En este ejemplo, la preparación y el procesamiento por lotes del procedimiento de fabricación de AlPO_4 se controlan a través de un sistema de preparación de medios (MPS o "Skid" de Preparación de Medios). El MPS consta de 3 recipientes de procesamiento por lotes (50-l, 200-l y 800-l), carcasas de filtros y tuberías con conexiones sanitarias. El procedimiento de fabricación utiliza recipientes de 200-l (V12) y 800-l (V13). Por lo tanto, el AlPO_4 se produce en lotes de 800-l (volumen total) que producen 350 Kg de precipitado de fosfato de aluminio. El precipitado final se descarga en depósitos de 50-l.

Las materias primas utilizadas en este procedimiento incluyen:

- fosfato de sodio tribásico (20,4 Kg)
- WFI™ (para disolución tribásica de fosfato de sodio) (107,4 l)
- hexahidrato de cloruro de aluminio (10,1 Kg)
- 15 • WFI™ (para disolución de hexahidrato de cloruro de aluminio) (91,6 l)
- hidróxido de Sodio 5N (para ajustar el pH)

El primer paso en el procedimiento fue pesar 20,4 kg de fosfato de sodio tribásico en el contenedor de materias primas y dejarlo a un lado. A continuación, se pesaron 10,1 kg de hexahidrato de cloruro de aluminio en un contenedor de materias primas y se dejaron de lado.

20 La receta automatizada para fosfato de aluminio se inició y el sistema se sometió a una prueba de presión. Los recipientes V12, V13 y las líneas de transferencia asociadas se enjuagaron previamente con WFI™. Después del enjuague con WFI™, los filtros de control de partículas se colocaron en línea tanto en el "lado de filtración" como en el "lado de clarificación" de la línea de transferencia entre V12 y V13. Antes de tomar muestras a granel, se conectó un puerto de muestra preesterilizado con C-Flex al recipiente V13.

25 El sistema luego se sometió a otra prueba de retención de presión. Una vez completada la retención de presión, el sistema se purgó con vapor limpio. Después del lavado con vapor, los filtros previamente instalados se limpiaron con un total de 50-l de WFI.

30 Luego se agregó un objetivo de 162,0-l de WFI a V12. El WFI fue luego transferido a V13. Se añadieron 100-l adicionales de WFI a V12 y luego se transfirieron a V13. La temperatura de reacción crítica final de 25 °C se estableció en V13.

35 Se añadió un objetivo de 63,0-l de WFI al recipiente V12. El agitador asociado con V12 se inició y se controló a un objetivo de 350 rpm. El cloruro de aluminio previamente pesado se añadió a V12 (después de que se alcanzó una temperatura de disolución de 35-45 °C). Después de la disolución inicial del cloruro de aluminio, V12 se llevó a un objetivo de 91,6-l de WFI y se mezcló durante 5-35 minutos antes de la verificación visual de que el cloruro de aluminio se había disuelto. El recipiente V13 comenzó a agitar el WFI con un punto de referencia de 250 rpm. El cloruro de aluminio se transfirió después de V12 a V13.

Se agregó un objetivo de 150-l de WFI a V12. El WFI se transfirió luego a V13 y se añadieron 150-l adicionales de WFI a V12 y nuevamente se transfirieron a V13. La temperatura de reacción crítica final de 25 °C se estableció en V13.

40 Se agregó un objetivo de 70-l de WFI a V12. El agitador asociado con V12 se inició y se controló a un objetivo de 350 rpm. El fosfato sódico tribásico previamente pesado se añadió a V12 (después de que se alcanzó una temperatura de disolución de 35-45 °C). Después de la disolución inicial del fosfato de sodio tribásico, V12 se llevó a un objetivo de 107,4-l de WFI y se mezcló durante 5-35 minutos antes de la verificación visual de que el fosfato de sodio tribásico se había disuelto.

45 El fosfato sódico tribásico se transfirió después de V12 a V13 y se mezcló con cloruro de aluminio hasta que se alcanzó un pH objetivo de 5,20. Después de una hora, el pH se ajustó de nuevo a un pH objetivo de 5,20 añadiendo fosfato de sodio tribásico. Una vez que el pH se estabilizó, el agitador se ralentizó a 150 rpm y el punto de referencia de temperatura se cambió a 60 °C. El agitador se apagó después de mezclar durante una hora. El fosfato de sodio restante tribásico se drenó de V12, luego se eliminaron los filtros de partículas y se reemplazaron con tapas CIP, y V12 y las líneas de transferencia se sometieron al procedimiento CIP.

50 El fosfato de aluminio se asentó en V13 por debajo del tubo de sifón a una temperatura objetivo de 60 °C. Una vez que se completó la sedimentación (debajo del tubo de sifón), el sobrenadante se decantó de V13 a través del tubo de sifón. A continuación, la válvula de muestra para V13 se esterilizó manualmente durante 15 minutos a $\geq 121,1$ °C. Una vez que la válvula de muestra se hubo esterilizado y se había enfriado a menos de 60 °C, se tomaron dos muestras

de biocarga de 25 ml.

El fosfato de aluminio en V13 se esterilizó luego durante 30 minutos a $\geq 121,1$ °C, seguido de la esterilización de la línea de adición de base (15 a una temperatura de $\geq 121,1$ °C). Utilizando el dispositivo de conexión estéril, se conectó una botella de 1-l de NaOH 5N a la línea de adición de base.

5 Una vez que el fosfato de aluminio se había enfriado a una temperatura objetivo de 25 °C, el pH del fosfato de aluminio se ajustó a un objetivo de 5,95. Hasta 16 depósitos de 50-l prelavados y esterilizados se conectaron a sus respectivas ubicaciones de estaciones de llenado.

10 Las líneas de transferencia se esterilizaron luego durante 15 min a $\geq 121,1$ °C. La válvula de muestra para V13 se esterilizó luego durante 15 minutos a $\geq 121,1$ °C. Una vez que la válvula de muestra había sido esterilizada y enfriada a menos de 60 °C, dos se tomaron muestras a granel de 30 ml para determinar el tamaño de partícula, el pH, la concentración de aluminio y la esterilidad.

15 Después de que se tomaron las muestras, el fosfato de aluminio se descargó en los depósitos de 50-l. Una vez que se completó la descarga, V13 y las líneas de transferencia se sometieron a un CIP químico completo. A continuación, se tomaron muestras de todos los depósitos de 50-l para determinar la concentración de aluminio y la esterilidad (sin embargo, en la práctica solo se muestrean la esterilidad del primer y el último tambor). Se fijaron estabilizadores magnéticos a cada depósito y los depósitos se almacenaron en una sala de enfriamiento de 2-8 °C.

Ejemplo 2 - Ensayo de las características físicas, químicas y funcionales de AIPO₄

20 Tres lotes de AIPO₄ producidos de acuerdo con el procedimiento de la Figura 1 y tres lotes de material producido de acuerdo con el procedimiento de la Figura 2 (y el Ejemplo 1) se analizaron para garantizar que el material producido por ambos procedimientos fuera comparable. Los ensayos utilizados se seleccionaron en función de las características físicas, químicas y funcionales de AIPO₄. Estos estudios de caracterización se realizaron además de las pruebas de liberación y todos los lotes cumplieron los criterios de publicación para AIPO₄. Los datos de los estudios de equivalencia se resumen de la siguiente manera:

25 *Análisis del tamaño de partícula:* El análisis del tamaño de partícula de adyuvantes a granel y la vacuna formulada se realizaron mediante dispersión de luz láser en un analizador de tamaño de partícula Malvern (Mastersizer, Serie 2,15). Se midió una suspensión de polvo en un disolvente (por ejemplo, isopropanol) con un haz de láser de ángulo bajo, y se calculó la distribución del tamaño de partícula. El diámetro medio del volumen D[v,0,5] es el diámetro donde el 50 % de la distribución está por encima y el 50 % está por debajo de la mediana. Preferiblemente, dos determinaciones del tamaño medio de partícula no deberían diferir en más del 5 % relativo. La forma de las curvas en las dos determinaciones también debería ser preferiblemente la misma D[v,0,9] es el diámetro donde el 90 % de la distribución del volumen está por debajo de este valor. D[v,0,1] es el diámetro donde el 10 % de la distribución de volumen está por debajo de este valor. El espacio es el ancho de la distribución basada en el cuantil 10 %, 50 % y 90 % (espacio = {D[v, 0,9] - D[v,0,1]}/D[v,0,5]). Antes de cada medición, el instrumento se estandarizó mediante el uso de perlas de un tamaño molecular conocido que representa 2 µm y 10 µm. Se determinó que los tamaños de partícula de AIPO₄ (antes y después de la formulación en Pevnar®) fabricados por ambos procedimientos eran comparables y dentro de las especificaciones que se enumeran en la Tabla 1.

TABLA 1 - TAMAÑO DE LA PARTÍCULA

Antes de la formulación	Después de la formulación
D [v, 0,1] = $\geq 2,0\mu\text{m}$	D [v, 0,1] = $\geq 2,0 \mu\text{m}$
D [v, 0,5] = 3,7 - 8,4µm	D [v, 0,5] = 4,5 - 6,4µm
D [v, 0,9] = $\leq 20,0 \mu\text{m}$	D [v, 0,9] = $\leq 22,0 \mu\text{m}$

40 Ensayo de unión a proteínas: El porcentaje de proteína unido a AIPO₄ se determinó midiendo la concentración de proteína total antes del contacto con el gránulo de aluminio y después del tratamiento con el gránulo de aluminio. El contenido de proteína en el gránulo se midió después de la resuspensión en solución salina. El porcentaje medio de unión de la proteína transportadora CRM₁₉₇ formulada con AIPO₄ del procedimiento de la Figura 1 (97,5 ± 0,8) y formulado con AIPO₄ del procedimiento de la Figura 2 (96,1 ± 1,4) fueron comparables. El porcentaje promedio de unión de Pevnar® formulado con AIPO₄ del procedimiento de la Figura 1 (91,5 ± 1,6) y formulado con AIPO₄ del procedimiento de la Figura 2 (91,7 ± 1,9) también fueron comparables.

50 Ensayo de Nefelometría: La vacuna Pevnar® se analizó en cuanto a antigenicidad mediante nefelometría usando citratación como procedimiento para solubilizar el sedimento de aluminio. Basado en trabajos previos, se sabe que solo los polisacáridos conjugados se unen al aluminio y no a los polisacáridos libres o sacáridos activados. La antigenicidad asociada con el sedimento refleja el polisacárido que está conjugado. Las mediciones de nefelometría se realizaron con el sistema Beckman Array 360 usando anticuerpos y se criaron en conejos. La unión de conjugados Pevnar® individuales a AIPO₄ se midió usando nefelometría, y los datos para el material se prepararon usando los

procedimientos de las Figuras 1 y 2 fueron comparables.

Potencial Zeta/movilidad electroforética: El potencial zeta y la movilidad electroforética se determinaron utilizando un Zetasizer. El potencial zeta de $AlPO_4$ del procedimiento de la Figura 1 fue un promedio de $4,7 \pm 0,2$ mV ($5,1 \pm 0,1$, $3,5 \pm 0,2$ y $5,5 \pm 0,2$ mV). El potencial zeta de $AlPO_4$ del procedimiento de la Figura 2 fue un promedio de $3,3 \pm 0,3$ mV ($3,6 \pm 0,3$, $2,6 \pm 0,4$ y $3,7 \pm 0,1$ mV).

Tiempo de sedimentación: El tiempo de sedimentación se controló midiendo el cambio en la densidad óptica durante 30 minutos en un espectrofotómetro (Shimadzu UV160-IPC) a una longitud de onda de 645 nm. El tiempo/tasa de sedimentación (A_{645}/min) de $AlPO_4$ del procedimiento de la Figura 1 fue 0,024, 0,025 y 0,023. El tiempo/tasa de establecimiento (A_{645}/min) de $AlPO_4$ del procedimiento de la Figura 2 fue 0,027, 0,026 y 0,026.

La Tabla 2 compara algunos de los parámetros que se usan en los procedimientos de las Figuras 1 y 2. Como se muestra, el tiempo de sedimentación del precipitado de fosfato de aluminio se redujo de aproximadamente 7-10 días a aproximadamente 2-5 días al aumentar la temperatura de sedimentación de 25 °C a 60 °C. Esto representa una mejora significativa en la eficacia. Como se describe en el Ejemplo 1, las muestras de fosfato de aluminio producidas por ambos procedimientos tienen características físicas, químicas y funcionales similares.

TABLA 2 - COMPARACIÓN DE PARÁMETROS DE DOS PROCEDIMIENTOS

Procedimiento	Figura 1	Figura 2
Temperatura de reacción	25 °C	25 °C
Velocidad de mezcla durante la reacción	Configuración del Reóstato a 7/14	250 rpm
Equipo de mezcla	Vibromezclador	Rodete impulsor Marine
Tamaño/tipo de recipiente para la sedimentación	Depósito de 200L x 5	Tanque - V13 de 1000L
Tiempo de sedimentación	7-10 días	62-112 horas
Temperatura de sedimentación	25 °C	60 °C
Procedimiento para retirar el sobrenadante	Tubo de sifón en depósitos	Tubo de sifón en tanque
Numero de tanques en el procedimiento de $AlPO_4$	2	2
Carga	Carga del $AlPO_4$ del depósito al tanque 101	No se requiere
Velocidad de mezcla Despues del retiro del sobrenadante	Configuración del Reóstato a 8/93	250 rpm
Esterilización en las condiciones del lugar (SIP)	≥ 121 °C, 45 min	$\geq 121,1$ °C, 30 min
Tiempo de mezcla durante el ajuste del pH final	1-2 hr @ 25 °C	2-4 hr @ 25 °C
Tamaño del depósito de descarga	50L x 8	50L x 13
Sistema de muestreo	Cerrado	Cerrado
Muestreo de esterilidad	Todos los tambores	Primer y último tambor
Temperatura de almacenamiento	2 a 8 °C	2 a 8 °C
Ajuste de pH final en el procedimiento	5,6 a 6,0	5,6 a 6,0

Ejemplo 3 - Simulación de medios

Se llevaron a cabo estudios de simulación de medios en el Skid de Preparación de Medios (MPS) del Ejemplo 1 usando Caldo de Soja Triptico (TSB). Estos estudios demostraron un alto grado de seguridad de que las operaciones de esterilización para el MPS mantuvieron la esterilidad y protegieron contra el ingreso microbiano durante la fabricación, el ajuste del pH, el muestreo y luego la transferencia de soluciones estériles a tambores. Cada ensayo de estudio de medios consistió en un ajuste esterilizante y estéril del pH usando hidróxido de sodio 5N y transferencia estéril de TSB en dieciséis tambores. La transferencia estéril ocurrió después de una retención estéril de ≥ 10 horas. La retención estéril estableció la cantidad total de tiempo que el sistema puede retenerse después de que se hayan realizado las operaciones de esterilización (11 horas). TSB se recogió en una botella de 1 l de las dieciséis estaciones

ES 2 753 776 T3

de llenado y se sometió a una incubación completa. Las muestras tomadas de las ubicaciones #1 y #16 son representativas de todo el procedimiento de transferencia de la solución en tambores. Debido al diseño de sistema cerrado del Skid de Preparación de Medios del Ejemplo 1 y los resultados exitosos de este estudio, las pruebas de esterilidad solo se deben realizar en el primer y último depósito durante la producción comercial, en lugar de en cada tambor, como fue necesario con el procedimiento representado en la Figura 1.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de fosfato de aluminio que comprende:
 - mezclar una solución de cloruro de aluminio y una solución de fosfato de sodio tribásico para producir una suspensión de fosfato de aluminio y un sobrenadante;
 - 5 sedimentar la suspensión de fosfato de aluminio en el rango de 50 °C a 70 °C para producir un precipitado de fosfato de aluminio; y
 - retirar el sobrenadante, en el que los pasos de mezclar, sedimentar y retirar se efectúan dentro de un sistema cerrado.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución de fosfato de sodio tribásico se agrega a la solución de cloruro de aluminio.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la solución de fosfato de sodio tribásico se agrega a la solución de cloruro de aluminio hasta que el pH está en el rango de 5,0 a 5,4 o en el rango de 5,1 a 5,3.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el paso de mezclar se efectúa a una temperatura en el rango de 20 °C a 30 °C o a una temperatura de 25 °C.
- 15 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paso de mezclar comprende mezclar la solución de cloruro de aluminio y la solución de fosfato de sodio tribásico con un rodete impulsor que gira a 150 rpm a 350 rpm, o a 200 rpm a 300 rpm o a 250 rpm.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el paso de sedimentar se efectúa a una temperatura en el rango de 55 °C a 65 °C, o a 60 °C.
- 20 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el paso de sedimentar se efectúa durante un período de entre 2 días a 5 días, o entre 3 días y 4 días.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el paso de retirar comprende retirar el sobrenadante usando un tubo de sifón.
- 25 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende además esterilizar el precipitado de fosfato de aluminio, en el que los pasos de mezclar, sedimentar, retirar y esterilizar se efectúan dentro de un sistema cerrado.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el paso de esterilizar comprende calentar el precipitado de fosfato de aluminio a una temperatura superior a 110 °C o superior a 121 °C.
- 30 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10 que comprende además ajustar el pH del precipitado de fosfato de aluminio, en el que los pasos de mezclar, sedimentar, retirar, esterilizar y ajustar se efectúan dentro de un sistema cerrado.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el paso de ajustar comprende ajustar el pH del precipitado de fosfato de aluminio para estar en el rango de 5,6 a 6,0, o de 5,8 a 6,0, o de 5,9 a 6,0.
- 35 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la concentración de fosfato de aluminio después del paso de mezcla está en el rango de 9,0 a 16,5 mg/ml.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que después del paso de ajustar el pH, el precipitado de fosfato de aluminio incluye partículas con una distribución de tamaño que tiene una D [v, 0,5] en el rango de 3,0 µm a 9,0 µm, o en el rango de 4,5 µm a 6,5 µm.
- 40 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que después del paso de ajustar el pH, el precipitado de fosfato de aluminio incluye partículas con una distribución de tamaño que tiene una D [v, 0,1] de más de 1,5 µm o de más de 2,0 µm.
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que después del paso de ajustar el pH, el precipitado de fosfato de aluminio incluye partículas con una distribución de tamaño que tiene una D [v, 0,9] de menos de 25 µm o de menos de 20 µm.

45

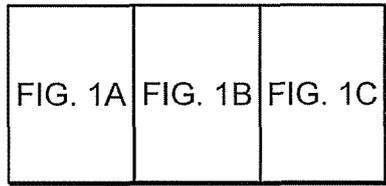


FIG. 1

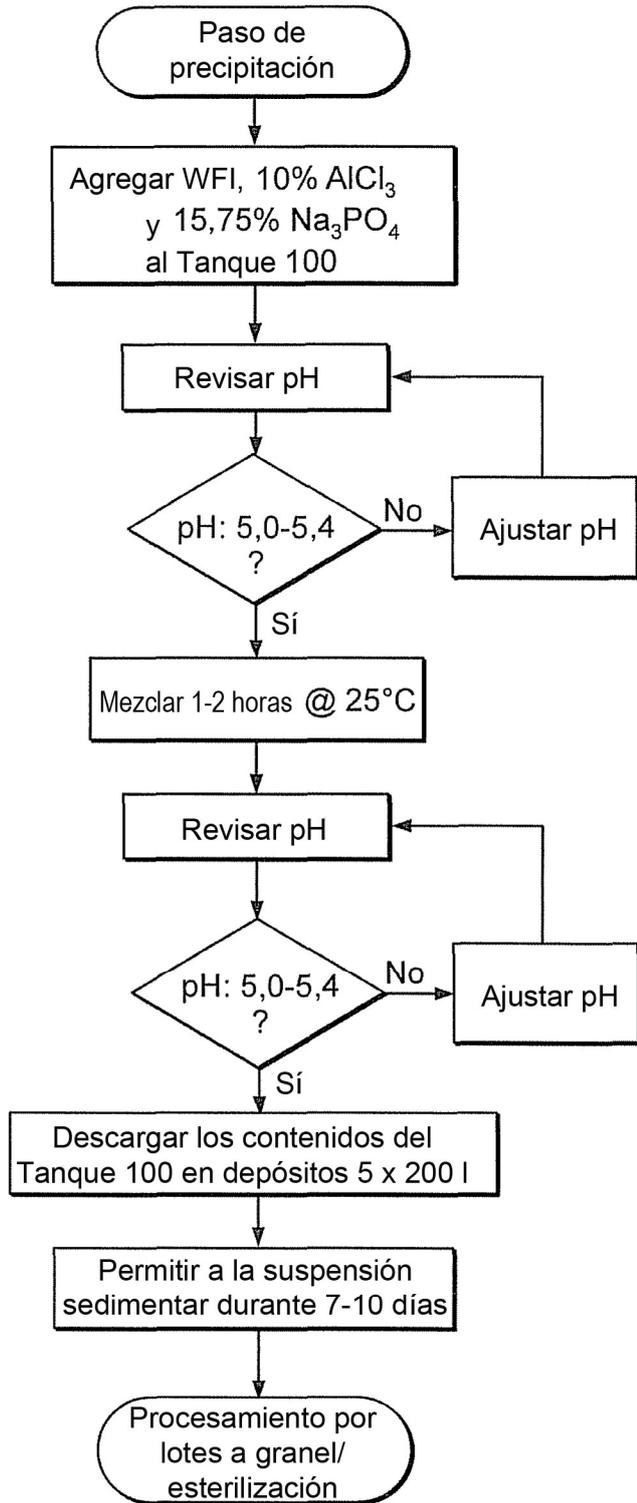


FIG. 1A

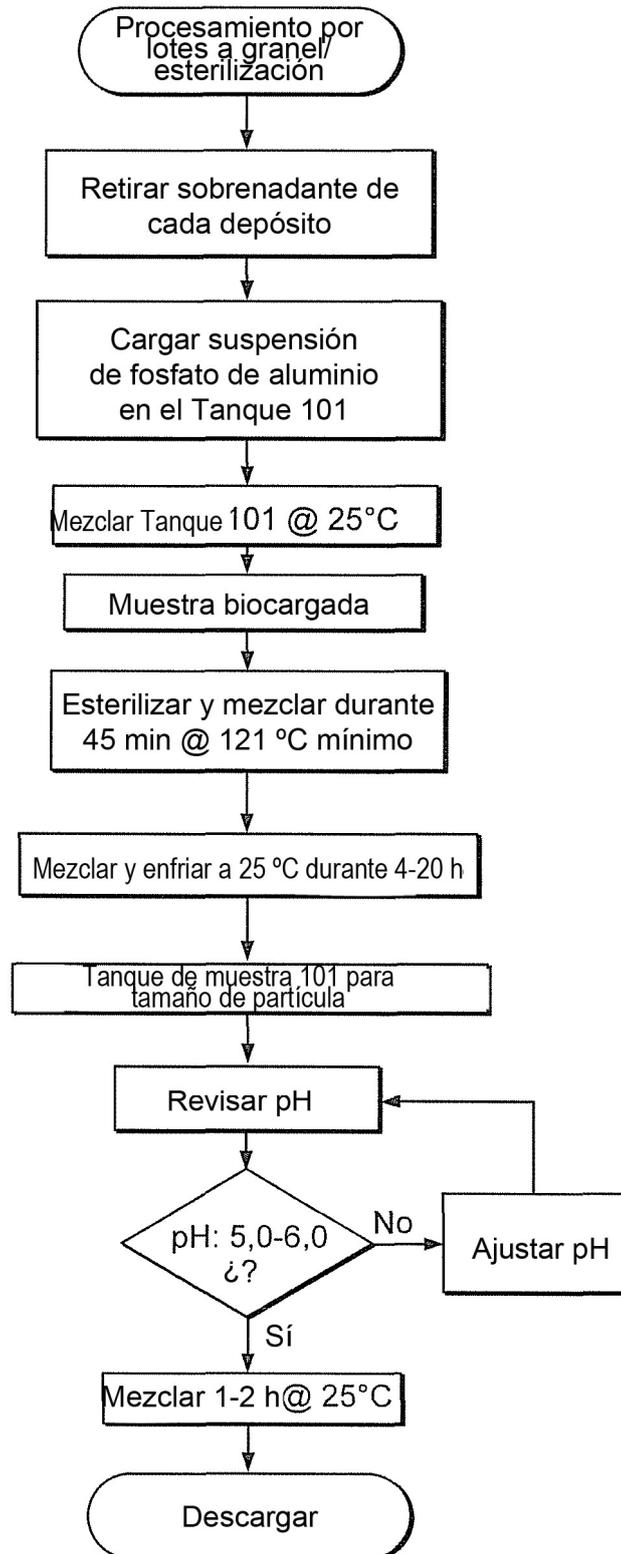


FIG. 1B

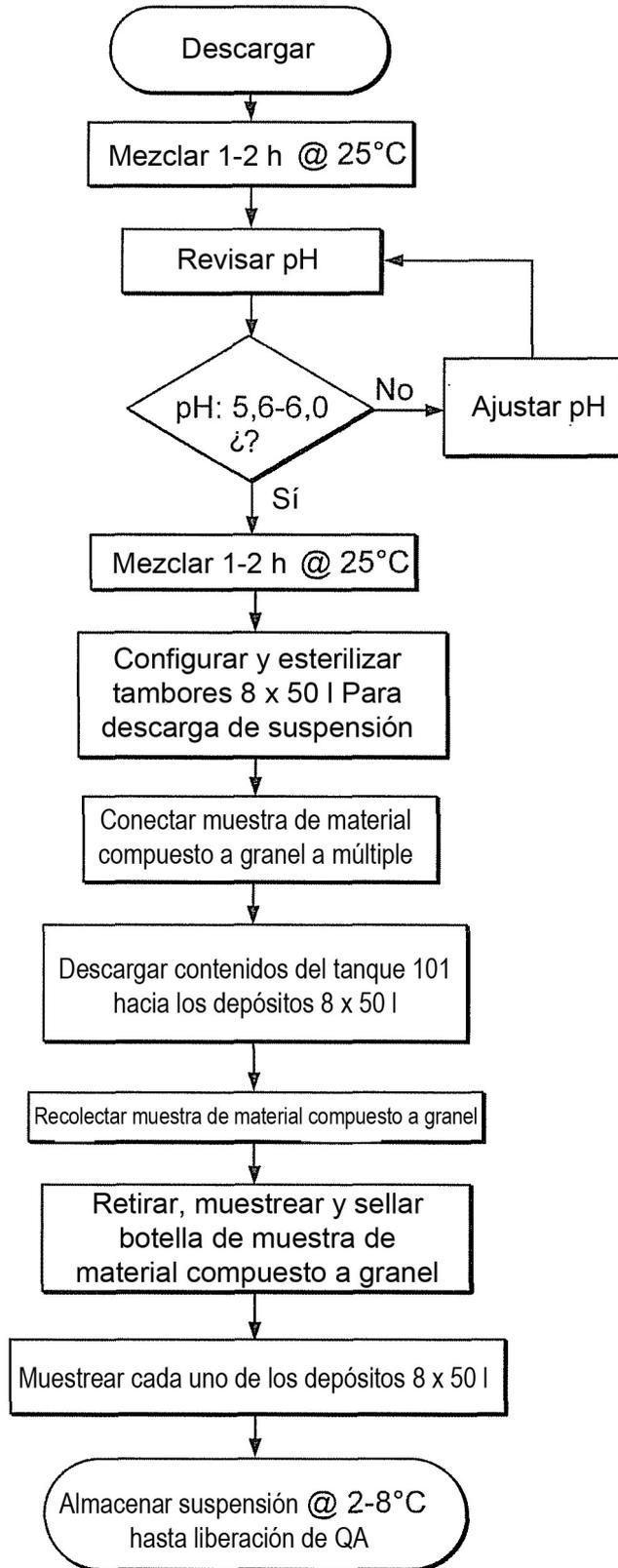


FIG. 1C

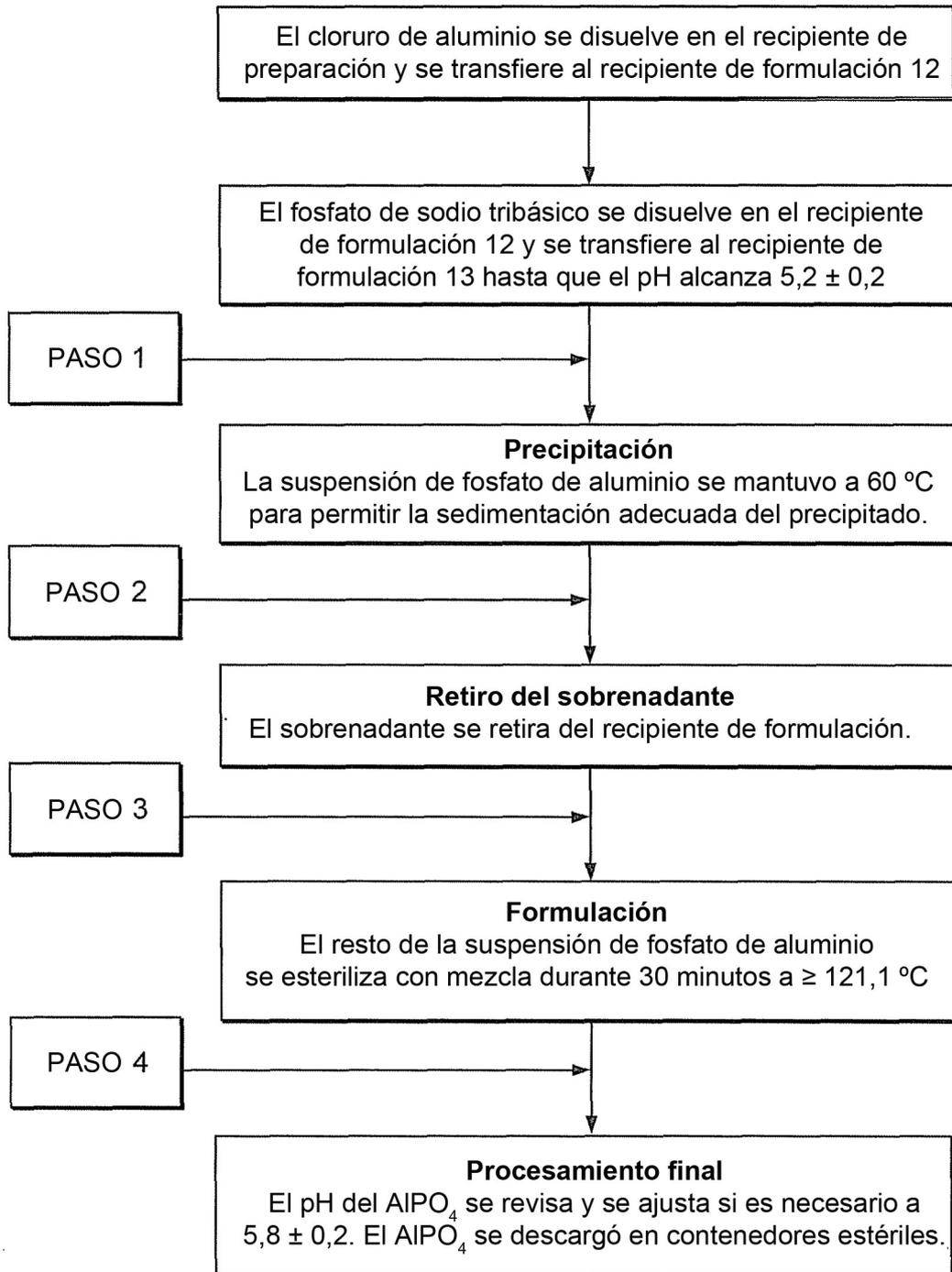


FIG. 2