

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 209**

51 Int. Cl.:

G01N 33/20 (2009.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/579 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2014 PCT/EP2014/061652**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195387**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2014 E 14728931 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3004886**

54 Título: **Procedimiento de determinación del contenido de endotoxinas en una preparación de sal de aluminio**

30 Prioridad:
07.06.2013 GB 201310151

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2020

73 Titular/es:
**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:
MASCAUX, CLEMENTINE

74 Agente/Representante:
GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 775 209 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 determinación del contenido de endotoxinas en una preparación de sal de aluminio

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona un procedimiento de determinación del contenido de endotoxinas en una preparación de sal de aluminio para su uso en medicina, en particular para su uso como un adyuvante en vacunas.

Antecedentes de la invención

10 Se requieren ensayos de pirógenos o de endotoxinas (LAL) para fármacos parenterales. Los ensayos de endotoxina clásicos no pueden usarse para evaluar el contenido de endotoxinas de las sales de aluminio. El control de endotoxinas añadido al producto no se recupera debido a su propiedad de interactuar con la sal de aluminio. Esto se ilustra en Shi et al., 2001, Vaccines 19: 1747-1752, que muestra que un adyuvante de hidróxido de aluminio detoxificó la endotoxina adsorbiéndola.

15 Los criterios de validez del ensayo requieren la recuperación y la capacidad de medir la endotoxina de control en concentraciones de aluminio a granel. Debido a esta interacción, generalmente se considera que los ensayos de endotoxinas estándar no son adecuados para los ensayos de endotoxinas en adyuvantes de sal de aluminio. El único ensayo que es adecuado para determinar la endotoxina es el ensayo de pirógenos en conejos que implica la inyección de la sal de aluminio en conejos. Se requieren procedimientos mejorados.

Sumario de la invención

20 La presente invención proporciona procedimientos para cuantificar con precisión la endotoxina en la preparación de sal de aluminio. La invención proporciona procedimientos de determinación del contenido de endotoxinas de una preparación de sal de aluminio para su uso en medicina (en particular para su uso como un adyuvante en una vacuna), que comprende las etapas de:

- a) Mezclar la sal de aluminio con un tampón de desorción que comprende una sal y un agente quelante de metales, desorbiendo de esta manera cualquier endotoxina desde la sal de aluminio;
- b) Separar la sal de aluminio de la endotoxina; y
- 25 c) Medir la cantidad de endotoxina.

La divulgación describe además procedimientos de preparación de un tampón de desorción para su uso en un procedimiento de determinación del contenido de endotoxinas de una preparación de sal de aluminio para su uso en medicina (en particular para su uso como un adyuvante en una vacuna), que comprende las etapas de:

- 30 a) Mezclar una base según se define en la presente memoria, un agente quelante de metales según se define en la presente memoria y agua; opcionalmente
- b) Agitar la mezcla (en particular durante un tiempo igual o mayor que 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 minutos); y opcionalmente
- c) Incubar la mezcla durante un tiempo igual o mayor que 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos.

Descripción detallada

35 La presente invención proporciona un procedimiento de determinación del contenido de endotoxinas en una preparación de sal de aluminio para su uso en medicina (en particular para su uso como un adyuvante en una vacuna), que comprende las etapas de:

- a) Mezclar la sal de aluminio con un tampón de desorción que comprende una sal y un agente quelante de metales, desorbiendo de esta manera cualquier endotoxina desde la sal de aluminio;
- 40 b) Separar la sal de aluminio de la endotoxina; y
- c) Medir la cantidad de endotoxina.

La presente invención proporciona un procedimiento de determinación del contenido de endotoxinas en una preparación de sal de aluminio para su uso en medicina (en particular para su uso como un adyuvante en una vacuna), que comprende las etapas de:

- 45 a) Mezclar la sal de aluminio con un tampón de desorción que comprende una sal y un tampón de desorción, desorbiendo de esta manera cualquier endotoxina desde la sal de aluminio;
- b) Centrifugar la mezcla separando de esta manera la sal de aluminio de la endotoxina; y

- c) Medir el contenido de endotoxinas del sobrenadante.

La presente divulgación describe además un procedimiento de determinación del contenido de endotoxinas en una preparación de sal de aluminio para su uso en medicina (en particular para su uso como un adyuvante en una vacuna), que comprende las etapas de:

- 5 a) Mezclar la sal de aluminio con un tampón de desorción, desorbiendo de esta manera cualquier endotoxina desde la sal de aluminio;
- b) Centrifugar la mezcla separando de esta manera la sal de aluminio de la endotoxina;
- c) Transferir el sobrenadante a un recipiente apirógeno; y
- d) Medir el contenido de endotoxinas en dicho sobrenadante.

10 La presente divulgación describe además un procedimiento de determinación del contenido de endotoxinas en una preparación de sal de aluminio para su uso en medicina (en particular para su uso como un adyuvante en una vacuna), que comprende las etapas de:

- a) Mezclar la sal de aluminio con un tampón de desorción, desorbiendo de esta manera cualquier endotoxina desde la sal de aluminio;
- 15 b) Centrifugar la mezcla separando de esta manera la sal de aluminio de la endotoxina;
- c) Transferir el sobrenadante a un recipiente apirógeno; y
- d) Medir el contenido de endotoxinas en dicho sobrenadante.

20 El término "endotoxina" se usa en la presente memoria con el significado definido en la Farmacopea Europea 5.1.10, es decir, la endotoxina se considera como lipopolisacáridos (LPS) y/o lipooligosacáridos (LOS) derivados de bacterias Gram negativas.

Después de la etapa de mezclado y antes de la etapa de separación/centrifugación, la preparación de sal de aluminio y el tampón de desorción pueden incubarse con el fin de garantizar que cualquier endotoxina unida a la sal de aluminio sea desorbida. Por consiguiente, se describen procedimientos en los que la mezcla de sal de aluminio y tampón de desorción puede incubarse durante más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas. Por ejemplo, el período de incubación es inferior a 96 o 72 horas, es decir, el período de incubación puede ser de entre 1 y 96 horas, entre 5 y 72 horas, entre 10 y 48 horas, entre 15 y 36 horas, o entre 20 y 28 horas. De manera alternativa, es posible que la mezcla no se agite durante la etapa de incubación.

30 La preparación de sal de aluminio y el tampón de desorción se mezclan en una proporción de entre 1:9 y 9:1, por ejemplo 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:2 u 8:2) Por ejemplo, la preparación de sal de aluminio y el tampón de desorción pueden mezclarse en una proporción de entre 3:7, 4:6, 5:5, 6:4 7:3, en particular 4:6, 5:5 y 6:4.

Los procedimientos descritos en la divulgación pueden realizarse a cualquier temperatura que permita la desorción de endotoxina desde la sal de aluminio. De manera adecuada, se describen procedimientos en los que dicha incubación puede realizarse entre 10°C y 70°C, por ejemplo, entre 20°C y 65°C, entre 20°C y 60°C, entre 15°C y 30°C, entre 17°C y 28°C, entre 19°C y 26°C, entre 21°C y 23°C, o aproximadamente a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C).

35 Los procedimientos descritos en la divulgación pueden comprender una etapa de agitación de la mezcla de sal de aluminio y tampón de desorción con el fin de garantizar que el tampón de desorción se mezcle con la composición de aluminio. De manera adecuada, se describen procedimientos en los que la mezcla de sal de aluminio y tampón de desorción puede agitarse después de la etapa a) durante más de 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, 1 minuto, 1 minuto y 30 segundos o 2 minutos.

40 Puede usarse cualquier tampón que facilite la desorción de endotoxina en los procedimientos de la invención. Los tampones de desorción adecuados para su uso en los presentes procedimientos pueden determinarse exponiendo un tampón candidato a sal de aluminio que comprende una cantidad conocida de endotoxina (por ejemplo, 20 UE/ml), incubando durante aproximadamente 24 horas +/- 4 horas a temperatura ambiente, centrifugando a 10.000 rpm +/- 1.000 rpm durante 10 minutos +/- 1min y, a continuación, realizando un ensayo LAL sobre el sobrenadante. Un tampón que desorbe entre el 50 y el 200% de la endotoxina se considera un tampón de desorción adecuado.

45 Se proporcionan procedimientos de la invención en los que dicho tampón de desorción comprende una sal y un agente quelante de metales. Las sales adecuadas son bien conocidas por la persona experta e incluyen, pero no se limitan a, Na_2HPO_4 . El Na_2HPO_4 puede usarse típicamente en una cantidad entre el 15% y el 25%, por ejemplo, aproximadamente el 18%, por ejemplo, el 17,8%, EDTA 0,224%, pH 8,0

50 En algunos aspectos de la divulgación, en particular cuando los procedimientos de la invención se usan para determinar el contenido de endotoxinas en un hidróxido de aluminio, el tampón de desorción puede comprender una sal adicional, por

ejemplo, NaCl. Cuando se usa NaCl, típicamente el tampón de desorción puede comprender NaCl entre 5 y 250 mM.

Los agentes quelantes de metales adecuados son bien conocidos por la persona experta e incluyen, pero no se limitan a, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). El EDTA puede usarse típicamente en una cantidad entre el 0,2 y el 0,3%, por ejemplo, aproximadamente el 0,22%, por ejemplo, el 0,224%.

5 El tampón de desorción puede estar a cualquier pH que facilite la desorción de endotoxina desde la sal de aluminio. Por ejemplo, el tampón de desorción de la invención puede tener un pH superior a pH 5,5, en particular cuando el tampón de desorción se usa para desorber endotoxina desde fosfato de aluminio. Se describen procedimientos en los que dicho tampón de desorción está entre aproximadamente pH 7 y pH 9. Por ejemplo, el tampón de desorción puede estar a aproximadamente pH 8 (por ejemplo, entre pH 7,5 y 8,5)

10 El tampón de desorción puede tener un pH superior a pH 9,5, en particular cuando el tampón de desorción se usa para desorber endotoxina desde hidróxido de aluminio. Se describen procedimientos en los que dicho tampón de desorción puede estar entre aproximadamente pH 9,5 y pH 10,5. Por ejemplo, se describe un tampón de desorción que puede estar a aproximadamente pH 10. El pH puede ser inferior a pH 10,5.

15 El tampón de desorción puede estar a cualquier temperatura que prevenga la precipitación de uno o más de los componentes del tampón, en particular cuando se almacena en un concentrado, por ejemplo, concentrado entre 1,5 y 2 veces. De manera adecuada, se describen procedimientos en los que dicho tampón de desorción se almacena a una temperatura de entre aproximadamente 30°C y 45°C, 35°C y 40°C, 36°C y 38°C, o aproximadamente 37°C.

20 El tampón de desorción está idealmente libre de endotoxinas, de manera adecuada se proporcionan procedimientos de la invención en los que el tampón de desorción está sustancialmente libre de endotoxinas, es decir, no pueden detectarse endotoxinas usando cualquier técnica conocida por la persona experta.

25 La endotoxina se desorbe desde la sal de aluminio y se separa de manera adecuada para permitir el ensayo del contenido de endotoxinas. La separación puede realizarse usando cualquier procedimiento conocido por la persona experta. De manera adecuada, se proporcionan procedimientos de la invención en los que la mezcla se centrifuga a una fuerza requerida para sedimentar la sal de aluminio y mantener la endotoxina en el sobrenadante. Por ejemplo, la mezcla de tampón de desorción y sal de aluminio puede centrifugarse entre 1.000 y 1.500 x g, por ejemplo, aproximadamente 1.118 x g.

30 El contenido de endotoxinas desorbidas puede medirse según cualquier ensayo disponible para la persona experta en la materia para medir la endotoxina. En particular, se proporcionan procedimientos de la invención en los que se mide el contenido de endotoxinas. En particular, se proporcionan procedimientos de la invención en los que se cuantifica el contenido de endotoxinas. Los procedimientos disponibles y conocidos por la persona experta incluyen, pero no se están limitados a, el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), el ensayo de activación de monocitos o el procedimiento EndoLISA. En particular, la endotoxina puede cuantificarse en los procedimientos de la invención mediante LAL (en particular, mediante un procedimiento cromogénico cinético).

35 Los procedimientos de la invención pueden usarse para determinar el contenido de endotoxinas de cualquier sal de aluminio para su uso como un adyuvante en una vacuna. Los adyuvantes de sal de aluminio adecuados son bien conocidos por la persona experta e incluyen, pero no están limitados a, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o una combinación de los mismos. Los adyuvantes de sal de aluminio adecuados incluyen, pero no están limitados a, REHYDRAGEL™ HS, ALHYDROGEL™ 85, REHYDRAGEL™ PM, REHYDRAGEL™ AB, REHYDRAGEL™ HPA, REHYDRAGEL™ LV, ALHYDROGEL™ o una combinación de los mismos. En particular, los procedimientos de la invención se usan para determinar el contenido de endotoxinas de ADJUPHOS, REHYDRAGEL™ HS (hidróxido de aluminio al 3% en agua [General Chemical]) o ALHYDROGEL™ 85 (Brenntag BioSector [Dinamarca]).

40 En particular, los procedimientos de la invención pueden usarse para determinar el contenido de endotoxinas de sales de aluminio que tienen una capacidad de adsorción de proteínas de entre 2,5 y 3,5, 2,6 y 3,4, 2,7 y 3,3 o 2,9 y 3,2, 2,5 y 3,7, 2,6 y 3,6, 2,7 y 3,5, o 2,8 y 3,4 proteína (BSA)/ml de sal de aluminio. Por ejemplo, los procedimientos de la invención pueden usarse para determinar el contenido de endotoxinas de una sal de aluminio con una capacidad de adsorción de proteínas de entre 2,9 y 3,2 mg de BSA/mg de sal de aluminio. La capacidad de adsorción de proteínas de la sal de aluminio puede medirse mediante cualquier medio conocido por la persona experta. Por ejemplo, la capacidad de adsorción de proteínas de la sal de aluminio se mide usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 del documento WO2012/136823 (que utiliza BSA) o variaciones del mismo.

45 Los procedimientos de la invención pueden usarse para determinar el contenido de endotoxinas en las sales de aluminio descritas en la presente memoria (es decir, que tienen la capacidad de adsorción de proteínas descrita en la presente memoria) que tienen un tamaño de cristal de entre 2,8 y 5,7 nm tal como se mide mediante difracción de rayos X, por ejemplo, de 2,9 a 5,6 nm, de 2,8 a 3,5 nm, de 2,9 a 3,4 nm o de 3,4 a 5,6 nm o 3,3 y 5,7 nm tal como se mide mediante difracción de rayos X. La difracción de rayos X es bien conocida por la persona experta. Por ejemplo, el tamaño del cristal puede medirse usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 del documento WO2012/136823 o variaciones del mismo.

55 Los procedimientos de la invención son particularmente útiles en los ensayos de control de calidad. El término ensayo de "control de calidad" se usa en la presente memoria para referirse a un control de calidad (QC) que es un procedimiento o

conjunto de procedimientos destinados a garantizar que un producto fabricado o un servicio realizado cumpla con un conjunto definido de criterios de calidad o cumpla los requisitos del fabricante. Por consiguiente, los procedimientos de la invención son adecuados para su uso en un ensayo de control de calidad.

5 Los procedimientos de la invención descritos en la presente memoria pueden usarse para ensayar la preparación de sal de aluminio antes de la formulación de la sal de aluminio con otros componentes de vacuna. De manera alternativa, los procedimientos de la invención descritos en la presente memoria pueden usarse para ensayar la preparación de sal de aluminio después de la formulación de la sal de aluminio con otros componentes de vacuna (por ejemplo, antígenos particulares). Además, los procedimientos de la invención descritos en la presente memoria pueden usarse para ensayar la preparación de sal de aluminio para determinar el contenido de endotoxinas antes y después de la formulación de la preparación de sal de aluminio con otros componentes de vacuna (por ejemplo, antígenos, en particular los descritos en la presente memoria).

15 Los procedimientos descritos en la presente memoria pueden implicar: extraer una muestra de la parte principal de la sal de aluminio; ensayar la muestra mediante los procedimientos definidos en la presente memoria; y, a continuación, si la muestra pasa el ensayo, adsorber uno o más antígenos (en particular los descritos en la presente memoria) a dicha sal de aluminio; y opcionalmente combinar dicha sal de aluminio con uno o más antígenos adicionales (en particular, los descritos en la presente memoria).

Las sales de aluminio pueden formularse con antígenos antes y/o después del ensayo de su contenido de endotoxinas.

20 Los antígenos que pueden formularse con la sal de aluminio incluyen, pero no están limitados a, toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), antígeno de superficie de hepatitis B, virus de la poliomielitis inactivada (IPV), pertactina, con hemoglutinina filamentosas (FHA) y toxoide pertussis y/o polisacárido de tipo B de *Haemophilus influenzae* (Hib) [en particular, el sacárido capsular de fosfato de polirribosil ribitol (PRP) de *H. influenzae* tipo B], virus del papiloma humano (por ejemplo, partículas similares a virus a partir de HPV 6, 11, 16, 18 o una combinación de los mismos), polisacáridos derivados de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, por ejemplo TT, DT y/o CRM197.

25 Los toxoides tetánicos (TT) y sus procedimientos de preparación son bien conocidos en la técnica. El TT puede producirse mediante la purificación de la toxina a partir de un cultivo de *Clostridium tetani* seguido de detoxificación química, pero de manera alternativa se prepara mediante la purificación de un análogo recombinante o genéticamente detoxificado de la toxina (por ejemplo, tal como se describe en el documento EP 209281). Un procedimiento preferido de detoxificación es el siguiente. Después de la fermentación, el caldo se filtra en un filtro de 0,1-0,3 µm en presencia de diatomita como coadyuvante de filtración. La cosecha se clarifica a través de un filtro de 0,22 µm, se concentra y se diafiltra en membranas de lámina plana de 30 kD contra 10 volúmenes de tampón fosfato (20 mM - pH 7,3). A continuación, la toxina diafiltrada se detoxifica durante 4 semanas a 37°C en las siguientes condiciones: formaldehído 20 mM - lisina 3 mM - fosfato de potasio 100 mM - pH inicial 7,3 - 500 Lf/ml. El toxoide resultante se purifica mediante fraccionamiento con sulfato de amonio, se concentra y se diafiltra (30 kD) contra WFI para eliminar el sulfato de amonio. Se añade NaCl a una concentración final del 0,9%, el pH se ajusta a 7,3 y el toxoide tetánico purificado se filtra de manera estéril.

35 Puede usarse cualquier toxoide tetánico adecuado. El 'toxoide tetánico' puede abarcar fragmentos inmunogénicos de la proteína de longitud completa (por ejemplo, Fragmento C – véase el documento EP 478602).

40 El toxoide tetánico puede adsorberse típicamente en una sal de aluminio. Por ejemplo, la sal de aluminio puede ser hidróxido de aluminio. De manera alternativa, el toxoide tetánico puede adsorberse en una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio. Además, el toxoide tetánico puede adsorberse en una mezcla tanto de hidróxido de aluminio como de fosfato de aluminio.

Los procedimientos de adsorción de proteínas que incluyen toxoides tetánicos en sales de aluminio son bien conocidos por las personas expertas (por ejemplo, la preparación de vacunas se describe en general en Vaccine Design "The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York).

45 Los toxoides diftéricos (DT) y sus procedimientos de preparación están bien documentados. Cualquier toxoide de difteria adecuado puede formularse con la sal de aluminio descrita en la presente memoria después o antes del ensayo de endotoxina. Por ejemplo, el DT puede producirse mediante la purificación de la toxina a partir de un cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* seguida de la detoxificación química, pero de manera alternativa se prepara mediante la purificación de un análogo recombinante o genéticamente detoxificado de la toxina (por ejemplo, CRM197 u otros mutantes tal como se describe en los documentos US 4.709.017, US 5.843.711, US 5.601.827 y US 5.917.017). Un procedimiento de detoxificación preferido es el siguiente. Después de la fermentación, la toxina de la difteria se cosecha mediante TFF de 0,45 µm, se clarifica a través de un filtro de 0,22 µm, se concentra y se diafiltra en membranas de lámina plana de 10 kD contra 10 volúmenes de tampón fosfato (20 mM - pH 7,2). A continuación, la toxina diafiltrada se detoxifica durante 6 semanas a 37°C en las siguientes condiciones: formaldehído 50 mM - lisina 25 mM - fosfato de potasio 50 mM - pH inicial 7,2 - 300 Lf/ml. El toxoide resultante se purifica mediante fraccionamiento con sulfato de amonio, se concentra y se diafiltra (30 kD) contra WFI para eliminar el sulfato de amonio. Se añade NaCl a una concentración final del 0,9%, el pH se ajusta a 7,3 y el toxoide diftérico purificado se filtra de manera estéril.

La vacuna antipoliomielítica inactivada (IPV) puede comprender IPV tipo 1 o IPV tipo 2 o IPV tipo 3, o IPV tipos 1 y 2, o IPV

tipos 1 y 3, o IPV tipos 2 y 3, o IPV tipos 1, 2 y 3.

Los procedimientos de preparación de poliovirus inactivado (IPV) son bien conocidos en la técnica. El IPV debería comprender los tipos 1, 2 y 3, tal como es común en la técnica de la vacunación, y puede ser la vacuna contra la polio Salk que se inactiva con formaldehído (véase, por ejemplo, Sutter y col., 2000, *Pediatr. Clin. North Am.* 47:287; Zimmerman y Spann 1999, *Am Fam Physician* 59:113; Salk et al., 1954, *Publicación mensual oficial de la American Public Health Association* 44(5): 563; Hennesen, 1981, *Develop. Biol. Standard* 47:139; Budowsky, 1991, *Adv. Virus Res.* 39:255) De manera alternativa, el IPV puede prepararse usando cepas Sabin (Sabin-IPV; Kersten et al. (1999), *Vacuna* 17:2059).

El IPV no puede adsorberse (por ejemplo, antes de mezclarlo con otros componentes). De manera alternativa, el componente o los componentes del IPV pueden adsorberse en una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio (por ejemplo, antes o después de mezclar con otros componentes). Por ejemplo, el componente o los componentes del IPV pueden adsorberse en una sal de aluminio tal como fosfato de aluminio. De manera alternativa, el componente o los componentes del IPV pueden adsorberse en una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Si se adsorbe, uno o más componentes del IPV pueden adsorberse por separado o juntos como una mezcla. El IPV puede adsorberse sobre una sal/partícula de aluminio tal como se ha descrito en la presente memoria.

La pertactina (el antígeno de 69 kDa de pertussis) es una proteína de membrana externa que es estable al calor y puede prepararse mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase el documento EP0162639). La pertactina puede adsorberse opcionalmente sobre una partícula de sal de aluminio. Por ejemplo, la pertactina puede adsorberse en hidróxido de aluminio. La pertactina puede adsorberse sobre una sal de aluminio tal como se describe en la presente memoria.

La hemaglutinina filamentosa (FHA) puede prepararse en procedimientos bien conocidos en la técnica (véanse los procedimientos divulgados y referenciados en el documento WO/1990/013313 (US7479283)). La FHA puede adsorberse opcionalmente sobre una partícula de sal de aluminio. Por ejemplo, la FHA puede adsorberse en hidróxido de aluminio. La FHA puede adsorberse sobre una sal de aluminio tal como se describe en la presente memoria.

Los procedimientos de producción del toxoide pertussis son bien conocidos por las personas expertas. La toxina pertussis puede detoxificarse mediante un procedimiento bien conocido de tratamiento con formaldehído o mediante mutaciones (derivadas de PT). Se ha encontrado que las sustituciones de residuos dentro de la subunidad S1 de la proteína resultan en una proteína que conserva las propiedades inmunológicas y protectoras de la toxina pertussis, pero con toxicidad reducida o nula (documento EP 322533) Las mutaciones detoxificantes descritas en las reivindicaciones del documento EP322533 son ejemplos de los mutantes detoxificados de PT de la presente descripción. El toxoide pertussis se adsorbe opcionalmente sobre una partícula de sal de aluminio. El toxoide pertussis puede adsorberse en hidróxido de aluminio. De manera alternativa, el toxoide pertussis puede adsorberse sobre una sal de aluminio tal como se describe en la presente memoria.

El sacárido capsular de fosfato de polirribosil ribitol (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b puede conjugarse con una proteína portadora. El sacárido es un polímero de ribosa, ribitol y fosfato. El antígeno Hib puede adsorberse opcionalmente sobre fosfato de aluminio tal como se describe en el documento WO97/00697, o puede permanecer sin ser adsorbido tal como se describe en el documento WO02/00249 o puede no haber experimentado un procedimiento de adsorción específico.

Cuando en la presente memoria se hace referencia a un antígeno 'no adsorbido en una sal adyuvante de aluminio' ("no adsorbido") significa, por ejemplo, que una etapa de adsorción expresa o dedicada para el antígeno en sal adyuvante de aluminio fresco no está implicada en el procedimiento de formulación de la composición.

Hib puede conjugarse con cualquier portador que pueda proporcionar al menos un epítipo de células T auxiliares, y puede ser toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM-197 (mutante de toxina diftérica) o proteína D de *H. influenzae* no tipificable (documento EP0594610).

Se describe un procedimiento que comprende además la etapa de formular la composición inmunogénica con un antígeno de superficie de hepatitis B.

La preparación del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) está bien documentada. Véase, por ejemplo, Hartford et al., 1983, *Develop. Biol. Norma* 54:125; Gregg et al., 1987, *Biotechnology* 5:479; documentos EP0226846; EP0299108. Puede prepararse de la siguiente manera. Un procedimiento implica purificar el antígeno en forma de partículas a partir del plasma de los portadores de hepatitis B crónica, ya que se sintetizan grandes cantidades de HBsAg en el hígado y se liberan al torrente sanguíneo durante una infección por el VHB. Otro procedimiento implica expresar la proteína mediante procedimientos de ADN recombinante. El HBsAg puede prepararse mediante expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pichia, células de insecto (por ejemplo, Hi5) o células de mamífero. El HBsAg puede insertarse en un plásmido, y su expresión a partir del plásmido puede controlarse mediante un promotor tal como el promotor "GAPDH" (del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). La levadura puede cultivarse en un medio sintético. A continuación, el HBsAg puede purificarse mediante un procedimiento que implica etapas tales como precipitación, cromatografía de intercambio iónico y ultrafiltración. Después de la purificación, HBsAg puede someterse a diálisis (por ejemplo, con cisteína). El HBsAg puede usarse en forma de partículas.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "antígeno de superficie de hepatitis B" o "HBsAg" incluye cualquier

antígeno de HBsAg o fragmento del mismo que muestre la antigenicidad del antígeno de superficie de HBV. Se entenderá que, además de la secuencia de 226 aminoácidos del antígeno HBsAg S (véase Tiollais et al., 1985, Nature 317:489 y referencias en dicho documento), el HBsAg tal como se describe en la presente memoria puede contener, si se desea, la totalidad o parte de una secuencia pre-S tal como se describe en las referencias anteriores y en el documento EP0278940.

5 En particular, el HBsAg puede comprender un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 133-145 seguidos por los residuos 175-400 de la proteína L de HBsAg con relación al marco de lectura abierto en un virus de la hepatitis B de serotipo ad (puede hacerse referencia a este polipéptido como L*; véase el documento EP0414374). Dentro del ámbito de la invención, el HBsAg puede incluir también el polipéptido preS1-preS2-S descrito en el documento EP0198474 (Endotronics) o análogos del mismo, tales como los descritos en el documento EP0304578 (McCormick and Jones). Tal como se usa en la presente memoria, HBsAg puede referirse también a mutantes, por ejemplo, el "mutante de escape" descrito en los documentos WO 91/14703 o EP0511855A1, especialmente el HBsAg en el que la sustitución de aminoácidos en la posición 145 es a arginina partiendo de glicina.

10 El HBsAg puede estar en forma de partículas. Las partículas pueden comprender, por ejemplo, proteína S sola o pueden ser partículas compuestas, por ejemplo, L*, S) donde L* es tal como se ha definido anteriormente y S indica la proteína S de HBsAg. De manera ventajosa, dicha partícula está en la forma en que se expresa en levadura.

15 El HBsAg puede ser el antígeno usado en ENGERIX B™ (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.), que se describe adicionalmente en el documento WO93/24148.

20 El antígeno de superficie de la hepatitis B puede adsorberse opcionalmente sobre una sal de aluminio, en particular fosfato de aluminio, lo que puede realizarse antes del mezclarlo con los otros componentes (descritos en el documento WO93/24148). El componente de hepatitis B debería estar sustancialmente libre de tiomersal (el procedimiento de preparación de HBsAg sin tiomersal se ha publicado anteriormente en el documento EP1307473).

La presente divulgación describe además procedimientos de preparación de un tampón de desorción para su uso en un procedimiento de determinación de la endotoxina de una sal de aluminio que comprende las etapas de:

- 25
- a) Mezclar una o más sales tal como se definen en la presente memoria, un agente quelante de metales tal como se define en la presente memoria y agua; opcionalmente
 - b) Agitar la mezcla (en particular durante un tiempo igual o mayor a 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 minutos); y opcionalmente
 - c) Incubar la mezcla durante un tiempo igual o mayor a 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos.

30 La presente divulgación describe además procedimientos de preparación de un tampón de desorción para su uso en un procedimiento de determinación de la endotoxina de una sal de aluminio que comprende las etapas de:

- a) Mezclar una sal, un agente quelante de metales y agua; opcionalmente
- b) Agitar la mezcla combinada a períodos de incubación a 37°C +/- 1°C (para disolverla); y opcionalmente
- c) Añadir un ácido o una base para fijar el pH
- d) Añadir agua para alcanzar el volumen final de la preparación; opcionalmente
- 35 e) Almacenar a 37°C +/- 1°C

Las etapas a) y b) pueden realizarse más de una vez, se proporcionan procedimientos de preparación de un tampón de desorción tal como se define en la presente memoria en los que las etapas b) y/o c) se repiten 1, 2 o más veces.

Se describen procedimientos de preparación de un tampón de desorción tal como se define en los que el agua está sustancialmente libre de endotoxina.

40 Se describen procedimientos de preparación de una desorción tamponada tal como se define en los que el agua de la etapa a) se precalienta a aproximadamente 30°C y 45°C, 35°C y 40°C, 36°C y 38°C, o aproximadamente a 37°C (± 1°C).

45 Se describen procedimientos de preparación de un tampón de desorción tal como se define en los que el pH se ajusta entre 7 y 9, en particular a aproximadamente pH 8. Puede usarse cualquier ácido para ajustar ese pH sin afectar la capacidad del tampón de desorción para desorber endotoxina a partir de la sal de aluminio. En particular, puede usarse HCl para ajustar el pH en la preparación de los tampones de desorción descritos en la presente memoria. En particular, el pH se ajusta cuando el tampón está a aproximadamente 30°C y 45°C, 35°C y 40°C, 36°C y 38°C, o aproximadamente 37°C (± 1°C). Puede usarse cualquier base o ácido adecuado para ajustar ese pH siempre que no afecte a la capacidad del tampón de desorción para desorber la endotoxina a partir de la sal de aluminio.

50 Se describen procedimientos de preparación de un tampón de desorción tal como se define en la presente memoria que comprenden además la etapa de d) almacenar el tampón de desorción a aproximadamente 30°C y 45°C, 35°C y 40°C, 36°C y 38°C, o aproximadamente 37°C (± 1°C).

Los presentes inventores pretenden que los términos "que comprende", "comprenden" y "comprende" en la presente memoria sean opcionalmente sustituibles por los términos "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso.

El término "aproximadamente" usado en la presente memoria pretende significar la cantidad $\pm 10\%$.

5 **Ejemplos**

1. Preparación del tampón de desorción:

Para preparar 100 ml de tampón de desorción, se colocaron 17,8 g de Na_2HPO_4 , 0,224 g de EDTA y 90 ml de agua libre de pirógenos (si es posible precalentada en una incubadora a 37°C) en un recipiente Nunc de 250 ml, libre de pirógenos.

10 La sal y el EDTA se disolvieron mediante agitación durante 15 minutos en una mesa de agitación, calentando 30 minutos en una incubadora a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y repitiendo la agitación y el calentamiento hasta que se disolvieron completamente.

Para ajustar el pH, se añadieron 3 ml de HCl IN, el pH se midió y se ajustó a pH 8,0 con HCl IN, si fuera necesario. El volumen se rellenó hasta 100 ml con agua libre de pirógenos. La ausencia de endotoxina se determinó mediante análisis LAL a una dilución de 1/100. El tampón de desorción se almacenó a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

2. Determinación de endotoxina:

15 Para determinar el contenido de endotoxinas en una muestra de aluminio (4 ml), se añadió tampón de desorción (6 ml) a la muestra de sal de aluminio. La mezcla se agitó durante 1 minuto y, a continuación, se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas.

20 Después de la incubación, la mezcla se agitó lentamente girando el tubo boca abajo 5 veces. Se extrajo una muestra (1,5 ml) y se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. A continuación, el sobrenadante se transfirió a un tubo libre de pirógenos. A continuación, el contenido de endotoxinas se cuantificó usando el análisis LAL mediante un procedimiento cromogénico cinético a una dilución de 1/50.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación del contenido de endotoxinas en una preparación de sal de aluminio para su uso en medicina, que comprende las etapas de:
 - 5 a. Mezclar la sal de aluminio con un tampón de desorción que comprende una sal y un agente quelante de metales, desorbiendo de esta manera cualquier endotoxina desde la sal de aluminio;
 - b. Separar la sal de aluminio de la endotoxina; y
 - c. Medir la cantidad de endotoxina.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la separación de la etapa b. se realiza mediante centrifugación y la medición de la etapa c. se realiza sobre el sobrenadante.
- 10 3. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la preparación de sal de aluminio y el tampón de desorción se mezclan en una relación de entre 1:9 y 9:1.
4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la mezcla se incuba durante 24 horas.
5. Un procedimiento según la reivindicación 4 en el que dicha incubación se realiza a temperatura ambiente.
- 15 6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la mezcla se agita después de la etapa a. durante 1 minuto
7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicho tampón de desorción tiene un pH entre aproximadamente pH 7 y pH 9.
8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicho tampón de desorción está a una temperatura de aproximadamente 37°C.
- 20 9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tampón de desorción está sustancialmente libre de endotoxina y/o es estéril.
10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que la centrifugación se realiza a entre 100 y 1,500 x g.
- 25 11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la sal de aluminio es fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o una combinación de los mismos.
12. Un ensayo de control de calidad que comprende el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.