

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 379**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

C01B 25/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2016** **PCT/IN2016/000151**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016** **WO16199162**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2016** **E 16753991 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2021** **EP 3307315**

54 Título: **Método para la preparación de gel de fosfato de aluminio para su aplicación en formulaciones de vacuna**

30 Prioridad:

12.06.2015 IN 2963CH2015

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

07.10.2021

73 Titular/es:

BIOLOGICAL E LIMITED (100.0%)

18/1 & 3 Azamabad

Telangana, Hyderabad 500020, IN

72 Inventor/es:

RAVI GANAPATHY;

NAGIREDDY GADE;

MANISH MANOHAR;

VIKRAM MADHUSADAN PARADKAR y

MAHIMA DATLA

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 862 379 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 gel de fosfato de aluminio para su aplicación en formulaciones de vacuna

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para la producción de gel de fosfato de aluminio (AlPhos). También se refiere al uso de gel de fosfato de aluminio, especialmente en composiciones inmunogénicas y/o de vacuna, para la adsorción de antígeno(s).

10

Antecedentes de la invención

Una composición de vacuna puede comprender uno o más adyuvantes. Los "adyuvantes" son sustancias que se incorporan en, o se inyectan simultáneamente con, un antígeno y que potencian de manera inespecífica las subsecuentes respuestas inmunitarias. Las respuestas inmunitarias resultantes duran más por el mantenimiento de niveles suficientes de anticuerpos en la población administrada. Por motivos prácticos y económicos, es necesario obtener esta inmunización profiláctica con el mínimo número de administraciones y emplear la menor cantidad de antígeno compatible con una inmunización eficiente. La naturaleza de estos adyuvantes puede ser inorgánica como el alumbre, tal como fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio, que se usan más habitualmente en vacunas humanas, y adyuvantes orgánicos como el escualeno.

20

Las vacunas veterinarias suelen usar habitualmente adyuvantes a base de aceite. Una vacuna usada para la prevención de la gripe provocada por el virus H5N1, que se denomina habitualmente gripe aviar o "gripe de los pájaros", contiene el adyuvante AS03, una emulsión de aceite en agua. El adyuvante AS03 se compone de los compuestos oleosos D,L-alfa-tocoferol (vitamina E), escualeno, un emulsionante (polisorbato 80) que ayuda a que los componentes se mezclen y no se separen, y agua que contiene pequeñas cantidades de sales.

25

Las sales de aluminio se usan ampliamente desde la década de 1930. Los únicos adyuvantes aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos para su uso en vacunas humanas son adyuvantes que contienen aluminio, debido a su largo historial de seguridad y uso eficaz. Glenn *et al.* habían descrito el efecto de compuestos de aluminio como adyuvante (Glenn AT, Pope CG Waddington H, Wallace U. Immunological Notes XVII a XXIV. J. Pathol. 29, 31-40, 1926).

30

A pesar de esto, se ha descrito que los adyuvantes que contienen aluminio son difíciles de fabricar con propiedades fisicoquímicas reproducibles. Scholtz *et al.*, en 1984, prepararon fosfato de aluminio puro usando cantidades equimolares de cloruro de aluminio y fosfato de trisodio.

35

El gel de fosfato de aluminio se usa como "adyuvante" en las formulaciones de la vacuna pentavalente líquida (VPL), que ayuda a reforzar las respuestas inmunogénicas frente al antígeno de superficie de la hepatitis B, los toxoides diftérico y tetánico que se adsorben sobre las partículas del gel y también posiblemente para los antígenos de tosferina de célula completa. Las sales de aluminio se usan en las vacunas DTaP, la vacuna antineumocócica conjugada y las vacunas contra la hepatitis B. Aunque ha habido una búsqueda de adyuvantes alternativos, seguirán usándose los compuestos de aluminio (fosfato e hidróxido de aluminio) como adyuvantes para vacunas humanas durante muchos años debido a su buen historial de seguridad, bajo coste y adyuvanticidad con una variedad de antígenos.

40

45

Habitualmente, se han usado dos métodos para preparar vacunas y toxoides con compuestos de aluminio: precipitación *in situ* de compuestos de aluminio en presencia de antígeno (desarrollada originalmente para purificar toxoides mediante precipitación con alumbre) y adsorción de antígeno sobre gel de aluminio preformado. La adsorción de antígenos sobre adyuvantes de aluminio, o bien durante la precipitación *in situ* de adyuvantes de aluminio o bien sobre geles de aluminio preformados, depende de las características físicas y químicas del antígeno, el tipo de adyuvante de aluminio y las condiciones de adsorción. A menudo, estas condiciones se pasan por alto, y una preparación de adyuvante de aluminio mal formulada no muestra una adyuvanticidad óptima.

50

El documento SU481539 divulgó un método para producir un hidrogel de aluminofosfato poroso haciendo reaccionar cloruro de aluminio con ácido fosfórico al 85%. Se enfrió la disolución resultante hasta de -8 a -10°C, se introdujo lentamente con agitación vigorosa, se enfrió hasta la misma temperatura que el óxido de etileno. Se calentó el gel resultante a una temperatura de 50-350°C y una presión de vapor de agua de 1-170 atm durante 2 horas, se lavó con agua destilada, se secó y se calcinó a 200°C en aire a 650-700°C durante 4-6 horas.

55

El documento SU550340 divulgó un método para producir gel de fosfato de aluminio haciendo reaccionar acetato de aluminio con ácido fosfórico, seguido de filtración, lavado, secado a 30-40°C durante 12 horas, luego a 110-120°C durante 4 horas, y activación del producto a 600°C en el plazo de 4 horas. El método propuesto también es complicado y laborioso, ya que requiere un tiempo de secado prolongado y la activación del producto final a altas temperaturas.

60

El documento SU559895 divulgó un método para producir un hidrato de fosfato de aluminio amorfo haciendo reaccionar una disolución de nitrato de aluminio y ácido fosfórico en la razón molar 1:0,95-1,05, seguido de

65

neutralización con amoníaco hasta pH=6,0 con la temperatura en el intervalo de 15-20°C. Se filtra el producto resultante, se lava con agua y se seca a una temperatura de 60-80°C.

El documento DE 2152228 divulgó un procedimiento para la producción de gel de fosfato de aluminio que comprende formar una mezcla de aluminato de sodio, ácido fosfórico y sulfato de aluminio en un medio acuoso, hacer reaccionar la mezcla de tal manera que el valor de pH de la suspensión resultante esté entre 5 y 6 y calentar el fosfato de aluminio, que se precipita, hasta una temperatura superior a 70°C o bien durante o bien después de su precipitación.

El documento RU2149138C divulgó un procedimiento para producir un gel de fosfato de aluminio, en el que se sometió una disolución inicial de sales de aluminio solubles en agua y fosfato de sodio a filtración en una unidad de microfiltración con un umbral de ancho de banda de 0,22 micrómetros y se hizo reaccionar con una sal de aluminio soluble con fosfato de sodio. Se precipitó el producto deseado con agitación vigorosa durante 15-45 min a una velocidad de rotación del agitador de 3,3-8,3 s⁻¹. Se forma un gel de fosfato de aluminio a una temperatura de 18-60°C durante 5-7 días, seguido de su lavado.

El documento WO 2009/136233A1 divulgó un método para producir nanopartículas de fosfato de aluminio con un diámetro de partícula menor de 1000 nm, preferiblemente de 10 a 600 nm, que comprende: a. preparar el gel de fosfato de aluminio; b. ajustar el pH del gel de fosfato de aluminio; c. someter el gel de fosfato de aluminio a reducción de tamaño; d. proporcionar nanopartículas de fosfato de aluminio de tamaño deseado; y e. suspender opcionalmente las nanopartículas en un tampón adecuado, en el que el gel de fosfato de aluminio puede prepararse (i) *in situ*, (ii) suspendiendo polvo de fosfato de aluminio en un disolvente adecuado, o (iii) mediante tratamiento de cloruro de aluminio equimolar con fosfato de trisodio para efectuar la formación del gel de fosfato de aluminio, seguido de retirada de cloruro, si fuera necesario.

La patente estadounidense n.º 8.540.955 divulgó un método mejorado para producir el adyuvante de aluminio AlPO₄, que comprende las etapas de mezclar una disolución de cloruro de aluminio y una disolución de fosfato tribásico de sodio para producir un precipitado de fosfato de aluminio, en el que la mejora comprende la sedimentación del precipitado de fosfato de aluminio a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C.

Burrell *et al.* [Vaccine. 4 de junio de 1999; 17(20-21):2599-603] divulgaron que el adyuvante de fosfato de aluminio permaneció amorfo cuando se esterilizó en autoclave durante 30 ó 60 min a 121°C. Sin embargo, las reacciones de desprotonación y deshidratación se produjeron tal como se evidenció por una disminución del pH. También disminuyeron la capacidad de adsorción de proteínas, la tasa de neutralización del ácido a pH 2,5 y el punto de carga cero, lo que indican que las reacciones de desprotonación/deshidratación dieron como resultado un área de superficie reducida.

Burrell *et al.* [Vaccine. 15 de septiembre de 2000; 19(2-3):275-81] divulgaron un procedimiento para preparar adyuvante de fosfato de aluminio, en el que se bombeó una disolución acuosa que contenía cloruro de aluminio y dihidrogenofosfato de sodio al recipiente de reacción a una velocidad constante. Una segunda bomba infundió una disolución de hidróxido de sodio a la velocidad requerida para mantener el pH deseado. Se realizaron precipitaciones entre pH 3,0 y 7,5 a intervalos de pH de 0,5.

El documento WO2013/078102 describe un método para preparar adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, que comprende las etapas de: (a) mezclar conjuntamente una disolución de una sal de aluminio con una disolución de un fosfato a una razón molar de P/Al definida en presencia de un tampón que mantiene un pH constante; y (b) intercambiar el tampón con una disolución de intercambio de tampón para retirar al menos el 80% de cualquier fosfato, tampón u otra sal residual en exceso de los reactantes originales.

Las características de los adyuvantes de aluminio, tales como el tamaño de las partículas de gel, la capacidad de adsorción, el punto isoeléctrico y la razón de aluminio con respecto a fosfato, dependen de las condiciones de elaboración de estos geles, incluyendo el orden de adición de los reactivos, la velocidad a la que se añaden y mezclan los reactivos, la velocidad de mezclado, el tiempo necesario para ajustar el pH y la escala de preparación del gel. Por tanto, se ha descrito que los adyuvantes de aluminio son difíciles de fabricar de manera fisicoquímicamente reproducible, dando como resultado de ese modo variaciones entre lotes.

Los métodos para preparar gel de fosfato de aluminio divulgados en la técnica anterior son tediosos y complejos. Aunque se han descrito métodos para producir adyuvante de fosfato de aluminio, sigue existiendo la necesidad en la técnica de métodos que sean más eficientes en una escala industrial. Además, es deseable que las características del adyuvante de fosfato de aluminio producido mediante cualquier método nuevo satisfagan las propiedades del adyuvante ya presentes en diversos productos comercializados para permitir su uso en preparaciones de vacuna.

Objetivo de la invención

El principal objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para la producción de gel de fosfato de aluminio a través de un método sencillo y económico.

Otro objetivo de la presente invención es evitar el uso de la adición de álcali o ácido para la gestión de diferentes pH tal como se usó previamente en el estado de la técnica, más bien los materiales y parámetros del procedimiento se ajustan de modo que el gel de fosfato de aluminio se produce en condiciones y a una concentración optimizadas; esto evitaría el uso de álcalis como carbonatos e hidróxidos que crearían nuevas especies de sales y una estructura del gel no uniforme que, por tanto, puede requerir la retirada.

Aún otro objetivo de la presente invención es tener un método que sea sencillo, fácil de controlar, más rápido para producir y que evite temperaturas extremas o largas duraciones durante la maduración, etc.

Un objetivo final de la presente invención es demostrar la idoneidad del gel de fosfato de aluminio preparado tal como se describe en preparaciones de vacuna como adyuvante.

En resumen, la invención se refiere a un procedimiento mejorado, que puede aumentarse de escala, para producir un gel de fosfato de aluminio estéril con buena eficiencia, pero tiempo, esfuerzos y coste reducidos, con demostración de su idoneidad en la elaboración de preparaciones de vacuna estables.

Sumario de la invención

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de gel de fosfato de aluminio que tiene partículas con una distribución de tamaño que tiene una mediana de tamaño de partícula $d(50)$ en el intervalo de $3,0\ \mu\text{m}$ a $9,0\ \mu\text{m}$ y un tamaño medio de partícula menor de $7\ \mu\text{m}$, en el que el procedimiento comprende las etapas de: i) añadir disoluciones de sal de aluminio y sal de fosfato alcalino a agua en concentraciones específicas para mantener el pH entre 3,0 y 4,0, con agitación para obtener un precipitado, ii) esterilizar el precipitado de fosfato de aluminio de la etapa (i) calentando el precipitado de fosfato de aluminio hasta una temperatura en el intervalo de $120\text{--}150^\circ\text{C}$ durante un periodo de 30 a 90 minutos; y iii) obtener el gel de fosfato de aluminio, en el que el procedimiento está desprovisto de las etapas de sedimentación de la suspensión de fosfato de aluminio y retirada del sobrenadante, y en el que el procedimiento no implica la adición de ningún otro ácido o álcali para el ajuste del pH.

La invención también proporciona un gel de fosfato de aluminio que puede obtenerse mediante un procedimiento de la invención, que tiene una distribución de tamaño de partícula en la que la mediana de tamaño de partícula $d(50)$ está en el intervalo de $3,0\ \mu\text{m}$ a $9,0\ \mu\text{m}$, el tamaño medio de partícula es menor de $7\ \mu\text{m}$ y la distribución acumulada del 90% $d(90)$ está en el intervalo de $< 15\ \mu\text{m}$.

La invención proporciona adicionalmente una composición de vacuna que comprende uno o más antígenos adsorbidos sobre un gel de fosfato de aluminio según la invención.

Esencialmente, la invención se refiere al procedimiento, tal como se enumera en las reivindicaciones, para producir gel de fosfato de aluminio con una distribución de tamaño de partícula controlada y sistemática mediante la manipulación de las concentraciones de las disoluciones, los parámetros de mezclado y las velocidades de adición, pero sin necesidad de etapas de dimensionamiento ni de lavado del gel.

Descripción detallada de la invención

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona un método, tal como se enumera en las reivindicaciones, para producir gel de fosfato de aluminio, que comprende las etapas de añadir sal de aluminio y sal de fosfato alcalino a agua manteniendo el pH entre 3,0 y 4,0, con agitación para obtener un precipitado.

La sal de aluminio, tal como se usa según la presente invención, está en forma de cloruro de aluminio hexahidratado.

El fosfato alcalino usado según la presente invención es fosfato de sodio, preferiblemente, fosfato tribásico de sodio o fosfato dibásico de sodio.

El pH se mantiene añadiendo concentraciones específicas de las disoluciones de cloruro de aluminio y fosfato de trisodio. Preferiblemente, se usa la concentración de entre 400 y 500 milimolar (mM), más preferiblemente se usa entre 480 y 490 mM.

Tanto el cloruro de aluminio como el fosfato de trisodio se añaden a agua con agitación durante un periodo de 10 a 60 minutos, preferiblemente de 35 a 55 minutos, con la adición de una cantidad inicial de disolución de cloruro de aluminio durante un periodo de 1 a 60 segundos, preferiblemente 30 segundos, más preferiblemente de 2 a 10 segundos, antes de la adición de disolución de fosfato de sodio, para mantener el pH de precipitación entre 3,0 y 4,0, preferiblemente entre 3,2 y 3,5, casi durante toda la reacción excepto la última parte del 5-10% de adición.

Las disoluciones se añaden a agua con agitación a no menos de 400 rpm, preferiblemente entre 500 y 600 rpm y de manera más adecuada en el intervalo de medio a superior.

- 5 Las disoluciones de cloruro de aluminio y fosfato de trisodio se añaden a agua a temperatura ambiente o a una temperatura de entre 20°C y 25°C.

10 Las disoluciones de cloruro de aluminio y fosfato de trisodio se añaden y se mezclan con agua en un recipiente, que tiene al menos 2 deflectores, y preferiblemente entre 2 y 4. El mecanismo de agitación está montado en la parte superior y la varilla de agitación tiene al menos 3 impulsores, cada uno con no menos de 4 aspas.

15 Según el procedimiento de la presente invención, se forma el gel a un intervalo de pH de 3,2 a 3,5 sin la adición de ningún otro ácido o álcali. Este método puede usarse para proporcionar un gel con una concentración no mayor de 3 mg/ml de aluminio, preferiblemente, en el intervalo hasta 2,5 mg/ml de aluminio.

20 El gel de fosfato de aluminio preparado según la presente invención tiene una distribución de tamaño de partícula en la que la mediana de tamaño de partícula $d(50)$ está en el intervalo de 3,0 micrómetros a 9,0 micrómetros, el tamaño medio de partícula es menor de 7 micrómetros y la distribución acumulada del 90% $d(90)$ está en el intervalo de <15 μm , preferiblemente de 5 a 10 μm .

25 La eficiencia del método se mejora significativamente añadiendo el cloruro de aluminio y fosfato tribásico de sodio a agua a una razón constante y manteniendo el pH y la temperatura. Un procedimiento de este tipo también hace que las etapas requeridas en la purificación y concentración del producto final, es decir, el gel de fosfato de aluminio, sean redundantes.

El procedimiento implica esterilizar el precipitado de fosfato de aluminio de la etapa (i) calentando el precipitado de fosfato de aluminio hasta una temperatura en exceso de 120°C, preferiblemente 120-150°C, durante un periodo de no menor de 30 minutos y preferiblemente de 30 a 90 minutos.

30 Otra mejora de la presente invención es realizar las etapas del procedimiento enumeradas en las reivindicaciones dentro de un sistema cerrado, aumentando de ese modo la garantía de esterilidad del producto final y reduciendo la necesidad de pruebas de esterilidad. Esto hace que el procedimiento global sea más eficiente ya que reduce el número pruebas de esterilidad que deben realizarse.

35 En aún otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento, tal como se enumera en las reivindicaciones, para la preparación de gel de fosfato de aluminio estéril de manera aséptica en el plazo de 60 minutos, más preferiblemente en el plazo de 45 minutos, con el uso de WFI esterilizada previamente en un recipiente, disoluciones químicas esterilizadas por filtración y otros accesorios relacionados con el procedimiento, que pueden usarse inmediatamente para la formulación de vacunas sin ninguna prueba de purificación, dimensionamiento u otras pruebas.

45 En aún otra realización, el gel de fosfato de aluminio producido según la presente invención es tal como se enumera en las reivindicaciones y es más resistente a los cambios en el dimensionamiento de las partículas y otros parámetros fisicoquímicos. Además, el pH del gel, tras la esterilización, está en el intervalo más adecuado para combinar antígenos que tienen un punto isoeléctrico (pI) por encima de 5,0 y, de ese modo, no se requiere el ajuste del pH.

50 En aún otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento, tal como se enumera en las reivindicaciones, para la preparación de gel de fosfato de aluminio estéril que, inesperadamente, ayudar a evitar las etapas de sedimentación y, por tanto, no hay formación de sobrenadante. Así, todo el procedimiento se completa dentro de un periodo de tiempo de 1 a 5 horas, hacia este último si se sigue un modo de esterilización posterior a la preparación, que lo hace sencillo, económico y operacionalmente muy factible.

55 En una realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento tal como se enumera en las reivindicaciones y que comprende las etapas de:

i) añadir las disoluciones de cloruro de aluminio y fosfato de trisodio a agua para inyección con agitación en el plazo de 60 minutos, preferiblemente entre 35 y 55 minutos, manteniendo el pH del precipitado formado entre 3,0 y 4,0, preferiblemente entre 3,2 y 3,5;

60 ii) esterilizar el precipitado de fosfato de aluminio de la etapa (i) calentando el precipitado de fosfato de aluminio hasta una temperatura en el intervalo de 120-150°C durante un periodo de 30 a 90 minutos; y

65 iii) obtener el gel de fosfato de aluminio que tiene partículas con una distribución de tamaño que tiene $d(50)$ en el intervalo de 3,0 μm a 9,0 μm y un tamaño medio de partícula menor de 7 μm , en el que el procedimiento está desprovisto de las etapas de sedimentación de la suspensión de fosfato de aluminio y retirada del sobrenadante y no implica la adición de ningún otro ácido o álcali para el ajuste del pH.

El adyuvante de fosfato de aluminio preparado según la presente invención permaneció estable durante la vida útil de almacenamiento cuando se almacenó a o por debajo de temperatura ambiente.

5 En una realización más preferida, la presente invención proporciona un método, tal como se enumera en las reivindicaciones, para producir gel de fosfato de aluminio que tiene una distribución de tamaño de partícula en la que $d(90)$ está en el intervalo de $<15\ \mu\text{m}$, que comprende las etapas de:

10 i) añadir las disoluciones de cloruro de aluminio y fosfato de trisodio a una concentración de entre 400 y 500 milimolar (mM) a agua para inyección, en el que la cantidad inicial de disolución de cloruro de aluminio se añade, de 2 a 10 segundos antes de la adición de disolución de fosfato de sodio, con agitación en el plazo de 60 minutos, preferiblemente entre 35 y 55 minutos, manteniendo el pH del precipitado formado entre 3,0 y 4,0, preferiblemente entre 3,2 y 3,5;

15 ii) esterilizar el precipitado de fosfato de aluminio de la etapa (i) calentando el precipitado de fosfato de aluminio hasta una temperatura en el intervalo de $120\text{--}150^\circ\text{C}$ durante un periodo de 30 a 90 minutos, y

20 iii) obtener el gel de fosfato de aluminio que tiene partículas con una distribución de tamaño que tiene $d(50)$ en el intervalo de $3,0\ \mu\text{m}$ a $9,0\ \mu\text{m}$ y un tamaño medio de partícula menor de $7\ \mu\text{m}$, en el que el procedimiento está desprovisto de las etapas de sedimentación de la suspensión de fosfato de aluminio y retirada del sobrenadante y no implica la adición de ningún otro ácido o álcali para el ajuste del pH.

25 El mecanismo de adyuvancia de los compuestos de aluminio incluye la formación de un depósito, la captación eficiente de partículas de antígeno adsorbidas sobre el aluminio mediante células presentadoras de antígeno debido a su naturaleza particulada y tamaño óptimo ($<10\ \mu\text{m}$); y la estimulación de células inmunocompetentes del cuerpo a través de la activación del complemento.

30 En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de formulación de una vacuna, que comprende las etapas de:

i. añadir las disoluciones de cloruro de aluminio y fosfato de trisodio esterilizadas por filtración a agua para inyección esterilizada previamente con agitación en el plazo de 60 minutos, preferiblemente entre 35 y 55 minutos, manteniendo el pH del precipitado formado entre 3,0 y 4,0, preferiblemente entre 3,2 y 3,5;

35 ii. añadir los antígenos al gel de fosfato de aluminio obtenido en la etapa (i) inmediatamente sin ninguna purificación, esterilización, dimensionamiento.

40 En aún otra realización, la presente invención proporciona el uso del gel de fosfato de aluminio, tal como se enumera en las reivindicaciones, para la adsorción de antígenos en preparaciones de vacuna.

Ventajas de la invención

1. El procedimiento de la presente invención no implica ninguna adición de ácido / álcali para el ajuste del pH.

45 2. El procedimiento no implica ninguna etapa para la reducción del tamaño de partícula del gel de fosfato de aluminio.

3. El procedimiento no implica las etapas de sedimentación y, por tanto, de retirada del sobrenadante.

50 4. El procedimiento no implica ninguna etapa de lavado.

5. El procedimiento evita condiciones de alta temperatura y duraciones más largas durante la maduración.

55 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 en modo alguno, sino que incluye variaciones de los mismos dentro de los parámetros descritos en el presente documento, tal como pueden conocer los expertos en la técnica y tal como se enumera en las reivindicaciones.

Ejemplo 1. Preparación de gel de fosfato de aluminio.

60 Se usaron disoluciones de cloruro de aluminio y fosfato de trisodio a una concentración de $485\pm 1\ \text{mM}$ como materias primas y agua para inyección (WFI) como disolvente para producir el gel de fosfato de aluminio. Se añadieron ambas disoluciones tal como se muestra en la tabla proporcionada a continuación a una tasa constante, en el plazo de 45 ± 10 minutos, a WFI (a un volumen $3,1\text{--}3,15\times$ del volumen de una disolución) con agitación a $550\pm 50\ \text{rpm}$ en un recipiente que tenía 2-4 deflectores, un agitador montado en la parte superior con un mínimo de 3 impulsores a diferentes alturas y cada uno con 4 aspas. Se inició la adición de disolución de cloruro de aluminio 2-5 segundos antes de iniciar la adición de disolución de fosfato de sodio para mantener el pH de precipitación por debajo de 3,5 durante

todo el procedimiento, excepto durante el último 5-10% del tiempo de adición, durante el cual se observó que el pH aumentó hasta alrededor de 5,0. Tras completar la adición, se esterilizó el gel *in situ* usando vapor a $\geq 121,1^{\circ}\text{C}$ durante 30-45 minutos. El pH del gel, tras la esterilización, se redujo en ~ 1 unidad hasta alcanzar alrededor de $4,0 \pm 0,3$.

Tabla 1: Preparación de gel de fosfato de aluminio				
Disoluciones madre	Cant./l	Volúmenes de disolución requeridos para un volumen de gel de...		
		1,8 l	18 l	40 l
Cloruro de aluminio (disolución 1)	117,1 g/l	350 ml	3,5 l	7,7 l
Fosfato de trisodio (disolución 2)	184,3 g/l	350 ml	3,5 l	7,7 l
WFI requerida		1,1 l	11 l	24,6 l
La concentración final de ambas sales en el gel es de 94,3 mM; razón 1:1.				

Se produjo gel de fosfato de aluminio, usando el procedimiento anterior, en escalas de 1 l a 40 l, proporcionando resultados de manera reproducible en cada escala siempre que los parámetros estén dentro del intervalo dado. No hay ninguna sedimentación, purificación (es decir lavado) del gel usando tampones, por ejemplo, solución salina, etc., en este procedimiento y, así, es muy sencillo, directo y da como resultado un gel que está listo para usar para la combinación. Por tanto, el procedimiento demostró su versatilidad, capacidad de aumento de escala y su economía, confirmándose de ese modo su idoneidad para la producción comercial.

Ejemplo 2. Tamaño de partícula de la preparación de gel de fosfato de aluminio.

Se determinó el tamaño de partícula del gel de fosfato de aluminio preparado tal como se describió en el ejemplo 1 y se encontró que el tamaño medio de partícula estaba en el intervalo no mayor de 7 μm , con intervalos de d(10), d(50) y d(90) que eran $>1 \mu\text{m}$, 3-8 μm y $<14 \mu\text{m}$, respectivamente, sin ninguna etapa de procesamiento adicional, por ejemplo, homogeneización, selección/retirada de partículas finas, etc. En la tabla 2 se proporcionan datos representativos para el pH y los tamaños de partícula, junto con valores de PZC y potencial zeta, estimados durante la preparación de lotes de gel elaboradas a escalas de 18 l y 40 l, tanto antes como después de la esterilización. Los datos indican que sin ninguno de los requisitos adicionales del procedimiento, el procedimiento ha demostrado su sencillez y reproducibilidad.

Tabla 2: Intervalos de pH, tamaño de partícula y otros parámetros sometidos a prueba en 3 lotes de cada gel de fosfato de aluminio (gel AlPhos) preparado a las escalas de 18 l y 40 l													
N.º de lote		18 l						40 l					
		APG 18/01		APG 18/02		APG 18/03		APG 40/01		APG 40/02		APG 40/03	
		AE	DE	AE	DE	AE	DE	AE	DE	AE	DE	AE	DE
pH		5,2	4,31	5,23	4,1	4,88	3,91	4,9	4,06	5,1	4,2	4,9	3,82
Tamaño de partícula (µm)	Media	3,64	4,75	3,59	5,64	3,68	4,18	4,26	4,85	3,42	4,63	3,64	4,33
	d ₁₀	2,07	3,15	2,07	2,68	2,01	2,71	2,73	3,26	2,03	3,19	2,28	2,66
	d ₅₀	4,77	6,7	4,51	7,84	4,35	5,62	4,74	6,13	3,92	6,54	4,07	5,28
	d ₉₀	8,26	10,9	7,7	12,7	8,89	9,88	7,33	10,0	6,75	10,2	6,54	8,83
PZC		5,19	5,4	5,23	5,39	5,48	5,44	5,1	5,18	5,27	5,35	5,27	5,34
Potencial zeta a pH 7,5		-31,1	-35,7	-31,8	-32,0	-26,5	-28,8	-33,5	-35,0	-31,9	-32,4	-30,8	-32,3
AE = antes de la esterilización; DE = después de la esterilización													

Ejemplo 3. Formulación de adyuvante de gel de fosfato de aluminio en composiciones inmunogénicas.

Se usó el gel de fosfato de aluminio preparado tal como se describió en el ejemplo 1 en una formulación de vacuna pentavalente líquida (VPL), que comprendía toxoide diftérico (DT), toxoide tetánico (TT), tosferina de células completas (wP), anticuerpo de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y conjugado de polirribosil ribitol fosfato-TT de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) como componentes antigénicos, en solución salina como diluyente final. En esta formulación, al gel obtenido tal como en el ejemplo 1, con agitación a 200-300 rpm, se le añadieron los antígenos de HBsAg, DT y TT uno tras otro sin necesidad de ajustar el pH, ya que es el pH ideal para su adsorción al gel (adyuvante) según la bibliografía y demostrado en los estudios de los presentes inventores. Luego se le añadió a esta combinación hasta el 80% de la solución salina requerida para completar el volumen final, seguido de la adición de wP; luego se enfrió la combinación completa hasta por debajo de 10°C y se añadió el componente Hib con agitación. Luego se completó el volumen final hasta el nivel requerido con solución salina. Luego se ajustó el pH de la combinación, si fuera necesario, para que estuviese entre 6,2 y 6,5, pero se encontró que no era necesario en la mayoría de los casos.

Se optimizó el procedimiento, tal como se describió anteriormente, para el procedimiento de combinación de VPL usando el gel de fosfato de aluminio preparado tal como se describió en el ejemplo 1 a diferentes escalas. Se elaboraron combinaciones de VPL de volúmenes que oscilaban entre 100 ml y 60 l usando este procedimiento, y todas

se sometieron a prueba y se demostró que cumplían las especificaciones para la vacuna, incluyendo los parámetros de seguridad y potencia de cada antígeno usado en la formulación.

El gel de fosfato de aluminio también demostró ser adecuado en la preparación de la vacuna cuadrivalente líquida (VCL), que comprende toxoide diftérico (DT), toxoide tetánico (TT), tosferina de células completas (wP) y conjugado de polirribosil ribitol fosfato-TT de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) como los componentes antigénicos, en solución salina como diluyente final. La formulación de esta vacuna sigue los mismos antígenos y las mismas secuencias de su adición, excepto porque no se usa HBsAg, que se añade en primer lugar en la preparación de VPL.

Se han elaborado combinaciones de VCL de volúmenes que oscilan entre 1 l y 60 l usando este procedimiento, y todas se han sometido a prueba y han demostrado que cumplen las especificaciones para la vacuna, incluyendo los parámetros de seguridad y potencia de cada antígeno usado en la formulación.

Ejemplo 4. Procedimiento para determinar la capacidad de adsorción de antígenos y resultados.

Entre los antígenos usados para formular VPL, HBsAg, DT y TT fueron los tres que se unieron al gel de fosfato de aluminio. El requisito interno para la unión en VPL para HBsAg fue $\geq 90\%$, para DT fue $\geq 28\%$ y para TT fue $\geq 30\%$. El gel de fosfato de aluminio producido a diferentes escalas ha cumplido sistemáticamente estos requisitos, cuando se sometió a prueba según se produce un lote de gel de hasta 40 l y un volumen de combinación de VPL de hasta 60 l. Las variaciones de los valores del % de adsorción entre las combinaciones de VPL producidas usando el gel de fosfato de aluminio preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, ambas elaboradas a diferentes escalas, no son significativas. Además, la exposición de la vacuna a condiciones de estrés (37°C durante 14 días) no cambió significativamente los valores del % de adsorción. En la tabla 3 se resume un ejemplo representativo de esta propiedad del gel, elaborado a diferentes escalas (1 l y 18 l) y usado para combinación de VPL a las escalas de 2 l y 60 l, junto con combinaciones de 2 l y 60 l de VPL elaboradas usando Adju-Phos® de Brenntag Biosector (proveedor comercial).

Como ejemplo de la prueba de estabilidad de la combinación gel / VPL elaborada usando el gel de fosfato de aluminio preparado según el ejemplo 1, en la tabla 4 se resumen los resultados del % de adsorción para los tres antígenos de una combinación de VPL de 4 l elaborada y sometida a prueba el día 0 (liberación), después de la incubación a 37°C los días 5, 7 y 14.

Tabla 3: Resultados del % de adsorción en combinaciones de VPL con diferentes fuentes de gel y tamaños de combinación					
N.º de muestra	Antígeno	Adju-Phos® (Brenntag)		Preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 1	
		VPL de 2 l	VPL de 60 l	VPL de 2 l	VPL de 60 l
1	HBsAg	94,8	99,7	98,8	98,9
2	Toxoide diftérico	47,6	59,6	50,0	58,3
3	Toxoide tetánico	41,7	46,7	44,8	46,7

Los datos presentados en la tabla 3 confirman que el % de adsorción del gel de fosfato de aluminio preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 coincide con el de Adju-Phos de Brenntag.

Tabla 4: Resultados del % de adsorción – combinación de VPL de 4 l en la liberación (día 0) y después de la incubación a 37°C durante 14 días			
Día de muestreo	Toxoide diftérico	Toxoide tetánico	HBsAg
Día 0	50,0	40,72	96,5
Día 5	77,1	53,8	98,7
Día 7	41,7	48,6	99,2
Día 14	56,8	47,5	98,9

Ejemplo 5. Otros procedimientos para caracterizar el gel y sus resultados.

Se analizaron varios lotes del gel de fosfato de aluminio producido tal como se describió en el ejemplo 1 para determinar diversas propiedades fisicoquímicas de modo que se caracterizaran por completo. Aparte del pH, el tamaño de partícula y el contenido en aluminio, también se sometieron a prueba otros parámetros que, junto con los motivos para su análisis, se resumen en la tabla 5.

Tabla 5: Propiedades fisicoquímicas del gel AlPhos que va a someterse a prueba y fundamento		
Parámetro	Límite	Impacto/motivo para su análisis
Aspecto	Suspensión turbia blanca en la que el portador mineral tiende a sedimentar lentamente	Describe el aspecto físico general

Contenido en aluminio		No menor de 2 mg/ml	Determina la unión
Tamaño de partícula (mm)	Media	No más de (NMT) 7	Determines el área de superficie, el potencial de agregación, la capacidad de unión
	D ₁₀	≥1	
	D ₅₀	3-8	
	D ₉₀	≤14	
PZC (pl)		5,1±0,5	
Potencial zeta (a pH 7,5)		de -28 a -40 mV	Determina la razón/tasas de adsorción; también determina el principal factor determinante de la agregación
Capacidad de adsorción de antígenos		rHBsAg: ≥90%	Determina la distribución relativa de antígenos en las fases de sol/gel
		DT: ≥28%	
		TT: ≥30%	
Perfil de impurezas	Aluminio libre	NMT 50 ppm	Indica la pureza del gel
	Fosfatos solubles	NMT 0,5% como PO ₄	
Densidad relativa /		1,00-1,03	Determina el peso/unidad
Tasa de sedimentación		NMT 35%	Determina la capacidad de sedimentación del gel
Osmolalidad		550±50 mOsm/Kg	Refleja la concentración de solutos en el gel

En las tablas 6 y 7 se resumen datos cuantitativos representativos de los seis lotes del gel de fosfato de aluminio producido a una escala de 18 l preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 para los lotes de validación del procedimiento de los lotes de VPL y VCL. Todos estos lotes cumplieron los requisitos para todos los parámetros sometidos a prueba en las etapas tanto posterior como anterior a la esterilización; mientras que todos los lotes cumplieron las especificaciones para el aspecto, la esterilidad y los niveles de impurezas, en estas tablas se analizaron los parámetros cuantitativos entre los mismos.

Tabla 6: Análisis de resultados de pruebas de parámetros fisicoquímicos del gel de fosfato de aluminio preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 – etapa anterior a la esterilización

N.º de muestra	Prueba		En lotes de VPL			En lotes de VCL			Análisis		
			VPL-1	VPL-2	VPL-3	VCL-A	VCL-B	VCL-C	Prom.	Desv. est.	% de CV
1	Tamaño de partícula (mm)	Media	3,50	3,19	3,24	3,50	3,62	3,73	3,46	0,21	6,10
		D ₁₀	2,03	1,86	1,93	1,97	2,12	2,26	2,03	0,14	7,09
		D ₅₀	4,2	3,67	3,68	4,4	4,19	4,29	4,07	0,32	7,77
		D ₉₀	7,34	6,43	6,28	7,82	7,26	7,19	7,05	0,59	8,31
2	PZC (pl)		5,33	5,44	5,41	5,49	5,50	5,36	5,3	5,43	0,06
3	Potencial zeta (a pH 7,5)		-32,8	-32,6	-31,8	-33,4	-30,7	-33,7	-32,3	-32,3	1,5
4	Tasa de sedimentación a las 48 horas (en %)		27	25	25	25	25	25	25	25,0	0,0

Los valores de CV (coeficiente de variación) para todos los parámetros sometidos a prueba, sin considerar los intervalos individuales de distribución de tamaños de partícula, estaban dentro del 10% y más en la etapa posterior a la esterilización; esto indicó una buena sistematicidad del procedimiento de preparación del gel a lo largo de los seis lotes analizados, producidos a lo largo de un periodo de 6 meses con diferentes lotes de materiales de entrada. Los datos también confirmaron que sólo se producen cambios menores, no significativos tras la esterilización en los parámetros fisicoquímicos del gel.

Tabla 7: Análisis de resultados de pruebas de parámetros fisicoquímicos del gel de fosfato de aluminio preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 – etapa posterior a la esterilización

N.º de muestra	Prueba		En lotes de VPL			En lotes de VCL			Análisis		
			VPL-1	VPL-2	VPL-3	VCL-A	VCL-B	VCL-C	Prom.	Desv. est.	% de CV
1	Contenido en aluminio		2,42	2,42	2,395	2,05	2,15	2,10	2,26	0,17	7,71
2	pH		3,77	4,28	4,31	3,91	4,04	4,21	4,09	0,22	5,32
3	Tamaño de partícula (mm)	Media	4,13	3,91	4,00	4,24	3,90	4,00	4,03	0,13	3,28
		D ₁₀	2,49	2,57	2,39	2,52	2,46	2,38	2,47	0,07	3,00
		D ₅₀	5,48	4,07	4,97	5,73	5,15	4,68	5,01	0,59	11,81

		D ₉₀	9,29	7,63	8,45	9,63	8,51	7,85	8,56	0,78	9,14
4	PZC (pI)		5,33	5,48	5,54	5,47	5,44	5,4	5,44	0,07	1,33
5	Potencial zeta (a pH 7,5)		-32,8	-31,27	-33,43	-33,9	-33,03	-34,17	-33,7	0,60	1,77
6	Densidad relativa		1,020	1,020	1,019	No comprobada			No aplicable		
7	Osmolalidad		528	542	509	No comprobada			No aplicable		
8	Tasa de sedimentación a las 48 horas (en %)		27	28	28	28	27	28	27,7	0,52	1,87

Para unos pocos lotes, se han sometido a prueba algunos de estos parámetros a lo largo del periodo de almacenamiento del gel (hasta 7 días) en diferentes etapas, en concreto, después de la preparación, después de la esterilización *in situ* y después de la esterilización en autoclave del gel esterilizado *in situ*. En la tabla 8 se resumen datos representativos de un lote sometido a prueba para determinar el efecto del almacenamiento sobre diferentes parámetros. Los datos confirman que los parámetros no cambian mucho hasta 7 días tras la esterilización/esterilización en autoclave. Estos datos de caracterización y sus análisis confirman la sistematicidad de los geles elaborados a diferentes escalas y también vuelven a confirmar la robustez del procedimiento de preparación del gel.

Tabla 8: Parámetros fisicoquímicos de un lote de gel de fosfato de aluminio en diferentes etapas de producción y almacenamiento										
Etapa	Tamaño de partícula (µm)				pH	PZC	ZP (a pH 7,5)	Osmolalidad (mOsm/Kg)	Tasa de sedimentación (%), a las 48 h	
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Media						
Después de la preparación	2,21	4,73	8,38	3,79	5,51	5,2	-32,87	518	25	
Tras la esterilización <i>in situ</i>	2,90	5,60	9,30	4,44	4,20	5,0	-31,93	No comprobada	28	
Tras la esterilización en autoclave del gel esterilizado <i>in situ</i> (día 0)	2,99	5,79	9,73	4,52	4,20	5,0	-32,10		28	
Tras la esterilización en autoclave del gel esterilizado <i>in situ</i> (día 7)	2,94	5,79	10,04	4,54	4,65	5,0	-34,67		28	
Sólo tras la esterilización en autoclave	Día 0	2,19	4,74	8,45	3,78	4,30	5,1	-32,00	523	26
	Día 7	2,33	4,92	9,19	3,94	4,68	5,2	-33,27	524	25

Ejemplo 6. Eficacia y estabilidad del gel AlPhos como adyuvante en preparaciones de vacuna.

Se formularon tres lotes de VPL de 60 l con tres lotes diferentes de gel de fosfato de aluminio preparado tal como se describió en el ejemplo 1 y se formuló un lote de VPL de 60 l con gel Adju-Phos de Brenntag como "control" (para la comparación del producto producido usando el procedimiento tal como se describió en el ejemplo 1 y los geles AlPhos de Brenntag). Se preparó el gel de fosfato de aluminio a una escala de 18 l usando disoluciones esterilizadas y en un recipiente estéril y se transfirió a frascos de vidrio estériles para su esterilización mediante esterilización en autoclave; se transfirió este gel estéril a un recipiente de combinación para la combinación de VPL.

Se produjeron tres productos a granel finales de VPL usando gel de fosfato de aluminio interno con los siguientes números de lote (tal como se mencionó en las tablas 6 y 7, en el ejemplo 5): VPL-1, VPL-2 y VPL-3. Al lote de "referencia" del producto a granel final de VPL producido con Adju-Phos de Brenntag se le dio el número "VPL-4".

Los lotes de antígenos usados para la formulación de VPL-1 y VPL-4 fueron los mismos, para permitir la comparación del impacto del gel elaborado preparado según la presente invención y el de Adju-Phos disponible comercialmente, elaborado por Brenntag Biosector.

Los resultados de todas las pruebas cualitativas y cuantitativas cumplieron los criterios de aceptación para el parámetro respectivo y, por tanto, confirman que el gel AlPhos preparado según la presente invención produjo lotes de VPL que eran muy comparables con el producido usando el Adju-Phos de Brenntag, confirmando de ese modo la idoneidad del gel AlPhos interno para la elaboración de preparaciones de vacuna.

- De manera similar a la VPL, también se produjeron tres productos a granel finales de VCL (vacuna contra D-T-P-Hib) usando el gel de fosfato de aluminio preparado según la presente invención con los siguientes números de lote (tal como se mencionó en las tablas 6 y 7, en el ejemplo 5): VCL-A, VCL-B y VCL-C. Los resultados de todas las pruebas cualitativas y cuantitativas cumplieron los criterios de aceptación (igual que para VPL) para el parámetro respectivo, volviéndose a confirmar de ese modo que el gel preparado según la presente invención para la combinación de lotes de VCL también fue muy sistemático. Estos datos reafirman la idoneidad del gel AlPhos de la presente invención para la elaboración de preparaciones de vacuna.
- Se llenaron todos los lotes de VPL y VCL producidos tal como anteriormente en viales de vidrio en presentaciones de 10 dosis (5,0 ml) de dosis individuales (0,5 ml) y se sometieron a estudios de estabilidad en condiciones de almacenamiento en tiempo real (2-8°C) y a temperatura acelerada (25±2°C). Se evaluaron los parámetros de prueba para comprobar que la estabilidad cumpliera las especificaciones de almacenamiento hasta 3 meses, cuando se realizó la última prueba, en ambas condiciones para ambas vacunas; y los resultados de los parámetros de estabilidad sometidos a prueba en la lotes finales llenados de VPL-1 y VPL-4 hasta el punto de tiempo de 9 meses cuando se almacenaron en condiciones de almacenamiento en tiempo real son de nuevo comparables, lo que indica que no hay ningún cambio en ninguno de los parámetros sometidos a prueba debido al cambio en la fuente de gel AlPhos.
- Así, el procedimiento de la presente invención para preparar gel de fosfato de aluminio usando el procedimiento único ha demostrado que es fácilmente reproducible, puede aumentarse de escala y es muy adecuado para su uso en preparaciones de vacuna como adyuvante.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de gel de fosfato de aluminio que tiene partículas con una distribución de tamaño que tiene una mediana de tamaño de partícula d(50) en el intervalo de 3,0 μm a 9,0 μm y un tamaño medio de partícula menor de 7 μm , en el que el procedimiento comprende las etapas de:
5
i) añadir disoluciones de sal de aluminio y sal de fosfato alcalino a agua en concentraciones específicas para mantener el pH entre 3,0 y 4,0, con agitación para obtener un precipitado,
10
ii) esterilizar el precipitado de fosfato de aluminio de la etapa (i) calentando el precipitado de fosfato de aluminio hasta una temperatura en el intervalo de 120-150°C durante un periodo de 30 a 90 minutos; y
15
iii) obtener el gel de fosfato de aluminio, en el que el procedimiento está desprovisto de las etapas de sedimentación de la suspensión de fosfato de aluminio y retirada del sobrenadante,
y en el que el procedimiento no implica la adición de ningún otro ácido o álcali para el ajuste del pH.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento no implica ninguna etapa para la reducción del tamaño de partícula del gel de fosfato de aluminio.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sal de aluminio es cloruro de aluminio y la sal de fosfato alcalino es fosfato de trisodio, y las concentraciones de las disoluciones de cloruro de aluminio y fosfato de trisodio usadas están en el intervalo de 400 y 500 milimolar (mM), preferiblemente entre 480 y 490 mM.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sal de aluminio es cloruro de aluminio y la sal de fosfato alcalino es fosfato de trisodio, y la adición de las disoluciones de cloruro de aluminio y fosfato de trisodio se lleva a cabo con agitación a no menos de 400 rpm, preferiblemente entre 500 y 600 rpm.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la adición en la etapa (i) se lleva a cabo a temperatura ambiente o a una temperatura de entre 20°C y 25°C.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la adición se lleva a cabo durante un periodo de 10 a 60 minutos, preferiblemente de 35 a 55 minutos.
7. Gel de fosfato de aluminio que puede obtenerse mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, que tiene una distribución de tamaño de partícula en la que la mediana de tamaño de partícula d(50) está en el intervalo de 3,0 micrómetros a 9,0 micrómetros, el tamaño medio de partícula es menor de 7 micrómetros y la distribución acumulada del 90% d(90) está en el intervalo de <15 μm .
8. Gel de fosfato de aluminio según la reivindicación 7, en el que d(90) está en el intervalo de 5 a 10 μm .
9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento se lleva a cabo en un sistema cerrado.
10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento se lleva a cabo a un intervalo de pH de 3,2 a 3,5.
11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento evita las etapas de sedimentación y, por tanto, no hay formación de sobrenadante.
12. Procedimiento para la preparación de gel de fosfato de aluminio según la reivindicación 1, en el que en la etapa i), se añaden disoluciones de cloruro de aluminio y fosfato de trisodio a agua para inyección con agitación en el plazo de 60 minutos, preferiblemente entre 35 y 55 minutos, manteniendo el pH del precipitado formado entre 3,0 y 4,0, preferiblemente entre 3,2 y 3,5.
13. Composición de vacuna que comprende uno o más antígenos adsorbidos sobre el gel de fosfato de aluminio según la reivindicación 7 u 8.