

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201890430 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.06.29

(51) Int. Cl. A61K 39/39 (2006.01)
C01B 25/36 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.06.13

(54) СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГЕЛЯ ФОСФАТА АЛЮМИНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В
ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТАХ

(31) 2963/CHE/2015

(32) 2015.06.12

(33) IN

(86) PCT/IN2016/000151

(87) WO 2016/199162 2016.12.15

(88) 2017.01.19

(71) Заявитель:
БАЙОЛОДЖИКАЛ И ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:
Рави Ганапатхи, Нагиредди Гаде,
Маниш Манохар, Викрам Мадхусадан
Парадкар, Махима Датла (IN)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к усовершенствованному способу получения геля фосфата алюминия (AlPhos, алюминийфосфатного геля), в котором растворы соли алюминия и соли в виде щелочного фосфата добавляют к воде, поддерживая pH, при перемешивании с получением осадка, с последующей стерилизацией указанного осадка и, в конечном счете, получением алюминийфосфатного геля.

A1

201890430

201890430

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-548102ЕА/032

СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГЕЛЯ ФОСФАТА АЛЮМИНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТАХ

Область техники

Настоящее изобретение относится к усовершенствованному способу получения геля фосфата алюминия (AlPhos, алюминийфосфатного геля). Он также относится к применению алюминийфосфатного геля, в особенности в иммуногенных и/или вакцинных композициях, для адсорбции антигена(ов).

Предпосылки создания изобретения

Вакцинная композиция может содержать один или более адъювантов. «Адъюванты» представляют собой вещества, которые включаются или вводятся одновременно с антигеном и которые неспецифически усиливают последующие иммунные ответы. Полученные иммунные ответы длятся дольше, поддерживая достаточные уровни антител, в подвергнутой введению популяции. По практическим и экономическим причинам этой профилактической иммунизации необходимо достичь с помощью минимального числа введений и с использованием минимального количества антигена, совместимого с эффективной иммунизацией. Природа этих адъювантов может быть неорганической, как квасцы, такие как фосфат алюминия и гидроксид алюминия, которые чаще всего используются в вакцинах для людей, и органической, как сквален.

В ветеринарных вакцинах обычно используются масляные адъюванты. Вакцина, используемая для профилактики гриппа, вызываемого вирусом H5N1, который обычно именуют птичьим гриппом или «птичьим гриппом», содержит адъювант AS03, эмульсию типа масло-В-воде. Адъювант AS03 состоит из масляных соединений D,L-альфа-токоферола (витамина Е), сквалена, эмульгатора - полисорбата-80, который помогает ингредиентам смешиваться и не дает им разъединяться, и воды, содержащей небольшие количества солей.

Соли алюминия широко используются с 1930-х годов. Единственными адъювантами, разрешенными Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств для

применения в вакцинах для людей, являются содержащие алюминий адъюванты, благодаря их долгой истории безопасного и эффективного применения. Glenny и др. описали эффект соединений алюминия в качестве адъюванта (Glenny AT, Pope CG Waddington H, Wallace U. Immunological Notes XVII to XXIV J. Pathol., 29, 31-40, 1926).

Несмотря на это, содержащие алюминий адъюванты были описаны как трудные для производства с воспроизводимыми физико-химическими свойствами. Scholtz и др., в 1984 году, получили чистый фосфат алюминия, используя эквимоллярные количества хлорида алюминия и тринатрийфосфата.

Алюминийфосфатный гель используют в препаратах жидкой пятивалентной вакцины (LPV) в качестве «адъюванта», помогающего усилить иммуногенные ответы на поверхностный антиген вируса гепатита-В, дифтерийный и столбнячные анатоксины, которые адсорбированы на частицах геля, а также, возможно, на цельноклеточные коклюшные антигены. Соли алюминия используются в вакцинах DTap, противопневмококковой конъюгатной вакцине и вакцинах против гепатита В. Несмотря на поиск альтернативных адъювантов, соединения алюминия (фосфат и гидроксид алюминия) будут по-прежнему использоваться в качестве адъювантов для вакцин для людей в течение многих лет из-за их хорошей репутации, заключающейся в безопасности, низкой стоимости и адъювантности с рядом антигенов.

Два способа широко используются для приготовления вакцин и анатоксинов с соединениями алюминия - *in situ* осаждение соединений алюминия в присутствии антигена (первоначально разработанное для очистки анатоксинов путем осаждения квасцами) и адсорбция антигена на предварительно образованном алюминиевом геле. Адсорбция антигенов на содержащих алюминий адъювантах либо во время *in situ* осаждения содержащих алюминий адъювантов, либо на предварительно образованных алюминиевых гелях зависит от физических и химических характеристик антигена, типа содержащего алюминий адъюванта и условий адсорбции. Эти условия часто упускаются из виду, и плохо приготовленный препарат содержащего алюминий адъюванта не проявляет оптимальной адъювантности.

В SU481539 описывается способ получения пористого гидрогеля алюмофосфата с помощью реакции хлорида алюминия с 85% фосфорной кислотой. Полученный раствор охлаждали до температуры от -8 до -10°C , медленно вводили при энергичном перемешивании, охлаждали до той же температуры, что и окись этилена. Полученный гель нагревали при температуре $50-350^{\circ}\text{C}$ и давлении водяного пара $1-170$ атм в течение 2 часов, промывали дистиллированной водой, сушили и прокаливали при 200°C на воздухе при $650-700^{\circ}\text{C}$ в течение 4-6 часов.

В SU550340 описывается способ получения алюминийфосфатного геля с помощью реакции ацетата алюминия с фосфорной кислотой с последующей фильтрацией, промывкой, сушкой при $30-40^{\circ}\text{C}$ в течение 12 часов, затем при $110-120^{\circ}\text{C}$ в течение 4 часов и активацией продукта при 600°C в течение 4 часов. Предлагаемый способ также является сложным и трудоемким, поскольку в его случае требуется длительное время высушивания и активация конечного продукта при высоких температурах.

В SU559895 описывается способ получения аморфного гидрата фосфата алюминия с помощью реакции раствора нитрата алюминия и фосфорной кислоты в молярном соотношении $1:0,95-1,05$ с последующей нейтрализацией аммиаком до $\text{pH}=6$ с температурой в диапазоне $15-20^{\circ}\text{C}$. Полученный продукт фильтруют, промывают водой и сушат при температуре $60-80^{\circ}\text{C}$.

В DE 2152228 описывается способ получения алюминийфосфатного геля, который включает образование смеси алюмината натрия, фосфорной кислоты и сульфата алюминия в водной среде, реакцию в смеси таким образом, чтобы значение pH полученной суспензии находилось между 5 и 6, и нагревание осаждаемого фосфата алюминия до температуры выше 70°C во время или после его осаждения.

В RU2149138 описывается способ получения алюминийфосфатного геля, в котором исходный раствор водорастворимых солей алюминия и фосфорнокислого натрия подвергали фильтрации на установке для микрофильтрации с порогом

пропускания 0,22 мкм и осуществляли реакцию растворимой соли алюминия с фосфатом натрия. Желаемый продукт осаждали при энергичном перемешивании в течение 15–45 мин при скорости вращения мешалки 3,3–8,3 сек⁻¹. Алюминийфосфатный гель образуется при температуре 18–60°C в течение 5–7 дней, а затем его промывают.

В WO 2009/136233 A1 описывается способ получения наночастиц фосфата алюминия с диаметром частиц менее 1000 нм, предпочтительно от 10 до 600 нм, включающий: а. приготовление алюминийфосфатного геля; б. регулирование pH алюминийфосфатного геля; с. подвергание алюминийфосфатного геля уменьшению размера; d. получение наночастиц фосфата алюминия желаемого размера; и е. необязательно суспендирование наночастиц в подходящем буфере, причем алюминийфосфатный гель может быть получен (i) *in situ*, (ii) суспендированием порошка фосфата алюминия в подходящем растворителе или (iii) обработкой эквимольного количества хлорида алюминия тринатрийфосфатом для осуществления образования алюминийфосфатного геля, с последующим удалением хлорида, если требуется.

В патенте США с № 8540955 описывается усовершенствованный способ получения содержащего алюминий адъюванта $AlPO_4$, который включает стадии смешивания раствора хлорида алюминия и раствора трехосновного фосфата натрия с получением осадка фосфата алюминия, причем усовершенствование включает осаждение осадка фосфата алюминия при температуре в диапазоне от приблизительно 50°C до приблизительно 70°C.

Burrell и др. [Vaccine. 1999 Jun 4; 17(20-21):2599-603] обнаружили, что адъювант в виде фосфата алюминия оставался аморфным после автоклавирования в течение 30 или 60 мин при 121°C. Однако происходили реакции депротонирования и дегидратации, о чем свидетельствует уменьшение pH. Способность к адсорбции белков, скорость нейтрализации кислот при pH 2,5 и точка нулевого заряда также уменьшались, что указывает на то, что реакции депротонирования/дегидратации приводили к уменьшению площади поверхности.

Burfell и др. [Vaccine. 2000 Sep 15, 19(2-3):275-81] описали способ получения адъюванта в виде фосфата алюминия, в котором водный раствор, содержащий хлорид алюминия и дигидрофосфат натрия, закачивали в реакционный сосуд с постоянной скоростью. Второй насос вводил раствор гидроксида натрия со скоростью, необходимой для поддержания желаемого pH. Осаждения проводили между pH 3,0 и 7,5 с интервалами pH 0.

Характеристики содержащих алюминий адъювантов, такие как размер частиц геля, адсорбционная способность, изоэлектрическая точка и отношение алюминия к фосфату, зависят от условий образования этих гелей, в том числе порядка добавления реагентов, скорости, с которой добавляют и смешивают реагенты, скорости перемешивания, времени, необходимого для регулирования pH, и шкалы гелеобразования. По этой причине, содержащие алюминий адъюванты были описаны как трудные в производстве физически-химически воспроизводимым образом, что приводит к варьированиям между партиями.

Способы приготовления алюминийфосфатного геля, описанные в вышеупомянутом известном уровне техники, являются трудоемкими и сложными. Хотя способы получения адъюванта в виде фосфата алюминия были описаны, в данной области техники остается потребность в способах, которые более эффективны в промышленном масштабе. Кроме того, желательно, чтобы характеристики адъюванта в виде фосфата алюминия, полученного любым новым способом, соответствовали свойствам адъюванта, уже присутствующего в различных продаваемых продуктах, чтобы сделать возможным его применение в вакцинных препаратах.

Цель изобретения

Основная цель настоящего изобретения заключается в обеспечении усовершенствованного процесса получения алюминийфосфатного геля простым и экономичным способом.

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы избежать использования добавления щелочи или кислоты для различного регулирования pH, как ранее использовалось в уровне техники, наоборот, регулируют производственные материалы и параметры, чтобы алюминийфосфатный гель образовывался в

оптимизированных условиях и концентрации; это позволит избежать использования щелочей, таких как карбонаты и гидроксиды, которые будут создавать новые виды солей и неоднородную структуру геля, поэтому может потребоваться их удаление.

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы иметь способ, который является простым, легким в управлении, быстрее выполнять и который позволяет избежать экстремальных температур или длительных периодов для образования и т.д.

Конечная цель настоящего изобретения заключается в демонстрации пригодности алюминийфосфатного геля, приготовленного как описано, в вакцинных препаратах в качестве адъюванта.

Короче говоря, настоящее изобретение относится к усовершенствованному, масштабируемому способу получения стерильного алюминийфосфатного геля с хорошей эффективностью, но с сокращением времени, усилий и затрат с демонстрацией его пригодности при изготовлении стабильных вакцинных препаратов.

Краткое описание сущности настоящего изобретения

Настоящим изобретением обеспечивается усовершенствованный способ приготовления алюминийфосфатного геля, который включает:

i) добавление растворов соли алюминия и соли в виде щелочного фосфата к воде, поддерживая pH между 3,0 и 4,0, при перемешивании с получением осадка;

ii) стерилизацию осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры в диапазоне 120-150°C в течение периода времени от 30 до 90 минут; и

iii) получение алюминийфосфатного геля, имеющего частицы с распределением по размеру, характеризующимся $d(50)$ в пределах от 3,0 мкм до 9,0 мкм и средним размером частиц менее 7 мкм, причем этот способ лишен стадий осаждения суспензии фосфата алюминия и удаления супернатанта.

По существу, настоящее изобретение относится к способу получения алюминийфосфатного геля с контролируемым и

единообразным распределением частиц по размеру, путем манипулирования концентрациями растворов, параметрами смешивания и скоростями добавления, но без какой-либо необходимости в стадиях определения размеров и промывки геля.

Подробное описание настоящего изобретения

Настоящим изобретением обеспечивается способ получения алюминийфосфатного геля, который включает стадии добавления соли алюминия и соли в виде щелочного фосфата к воде, поддерживая pH между 3,0 и 4,0 при перемешивании с получением осадка.

Соль алюминия, используемая в соответствии с настоящим изобретением, находится в форме гексагидрата хлорида алюминия.

Щелочной фосфат, используемый в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой фосфат натрия, предпочтительно трехосновный фосфат натрия или двухосновный фосфат натрия.

pH поддерживается добавлением определенных концентраций растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата. Предпочтительно используют концентрацию между 400 и 500 миллимоль (мМ), более предпочтительно от 480 до 490 мМ.

Как хлорид алюминия, так и тринатрийфосфат добавляют к воде при перемешивании в течение периода от 10 до 60 минут, предпочтительно от 35 до 55 минут, с добавлением исходного количества раствора хлорида алюминия в течение периода от 1 до 60 секунд, предпочтительно 30 секунд, более предпочтительно от 2 до 10 секунд, перед добавлением раствора фосфата натрия, для поддержания pH осадка между 3,0 и 4,0, предпочтительно между 3,2 и 3,5, почти на протяжении всей реакции, за исключением последней составляющей 5-10% части добавления.

Растворы добавляют к воде при перемешивании со скоростью не менее 400 об/мин, предпочтительно между 500 и 600 об/мин и более подходяще в пределах от среднего до более высокого.

Растворы хлорида алюминия и тринатрийфосфата добавляют к воде при комнатной температуре или при температуре от 20 до 25°C.

Растворы хлорида алюминия и тринатрийфосфата добавляют и смешивают с водой в сосуде, который имеет перегородки, минимум 2 и предпочтительно от 2 до 4 перегородок. Механизм перемешивания

установлен сверху, и перемешивающий стержень имеет по крайней мере 3 лопастных колеса, каждое из которых имеет не менее 4 лопастей.

В соответствии со способом настоящего изобретения гель образуется при pH от 3,2 до 3,5 без добавления какой-либо другой кислоты или щелочи. Этот способ может использоваться для обеспечения геля с концентрацией не более 3 мг/мл алюминия, предпочтительно в области до 2,5 мг/мл «алюминия».

Алюминийфосфатный гель, приготовленный в соответствии с настоящим изобретением, имеет распределение частиц по размеру, в случае которого $d(90)$ находится в области <15 мкм, предпочтительно от 5 до 10 мкм.

Эффективность способа значительно увеличивают, добавляя хлорид алюминия и трехосновный фосфат натрия к воде в постоянном соотношении и поддерживая pH и температуру. Такой способ также делает стадии, необходимые для очистки и концентрирования конечного продукта, т.е. алюминийфосфатного геля, излишними.

В еще одном варианте осуществления способ включает стерилизацию осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры, превышающей 120°C, предпочтительно 120-150°C, в течение периода, составляющего не менее 30 минут и предпочтительно от 30 до 90 минут.

Другим усовершенствованием настоящего изобретения является выполнение стадий способа в замкнутой системе, что увеличивает гарантию стерильности конечного продукта и уменьшает потребность в проверке на стерильность. Это делает весь способ более эффективным, поскольку это уменьшает число проверок на стерильность, которые необходимо выполнить.

В еще одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ приготовления асептически в пределах 60 минут, более предпочтительно в пределах 45 минут, с использованием предварительно стерилизованной WFI (воды для инъекций) в сосуде, подвергнутых стерилизации фильтрованием химических растворов и других, связанных со способом

вспомогательных средств, стерильного алюминийфосфатного геля, который может быть немедленно использован для приготовления вакцин без какой-либо очистки, определения размеров или другой проверки.

В еще одном варианте осуществления алюминийфосфатный гель, полученный в соответствии с настоящим изобретением, более устойчив к изменениям размеров частиц и других физико-химических параметров. Кроме того, pH геля после стерилизации находится в диапазоне, более подходящем для смешивания антигенов, которые имеют изоэлектрическую точку (pI) выше 5,0 и, таким образом, не требуют регулировки pH.

В еще одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ приготовления стерильного алюминийфосфатного геля, который неожиданно помогает избежать стадий осаждения, и, таким образом, не образуется супернатант. Следовательно, весь способ завершается в пределах периода времени от 1 до 5 часов, около последнего значения, если соблюдается режим стерилизации после приготовления, что делает его простым, экономичным и в эксплуатационном отношении очень возможным.

В предпочтительном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ приготовления алюминийфосфатного геля, который включает стадии:

i) добавления растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата к воде для инъекций при перемешивании в течение 60 минут, предпочтительно от 35 до 55 минут, поддерживая pH образуемого осадка между 3,0 и 4,0, предпочтительно между 3,2 и 3,5;

ii) стерилизации осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры в диапазоне 120-150°C в течение периода времени от 30 до 90 минут; и

iii) получения алюминийфосфатного геля, имеющего частицы с распределением по размеру, характеризующимся $d(50)$ в пределах от 3,0 мкм до 9,0 мкм и средним размером частиц менее 7 мкм, причем этот способ лишен стадий осаждения суспензии фосфата алюминия и

удаления супернатанта.

Адъювант в виде фосфата алюминия, приготовленный в соответствии с настоящим изобретением, оставался стабильным в течение срока годности при хранении при комнатной температуре или ниже комнатной.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ получения алюминийфосфатного геля, имеющего распределение частиц по размеру, в случае которого $d(90)$ находится в области <15 мкм, который включает стадии:

i) добавления растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата в концентрации от 400 до 500 миллимоль (мМ) к воде для инъекций, причем начальное количество раствора хлорида алюминия добавляют за 2-10 секунд до добавления раствора фосфата натрия, при перемешивании в течение 60 минут, предпочтительно от 35 до 55 минут, поддерживая pH образуемого осадка между 3,0 и 4,0, предпочтительно между 3,2 и 3,5;

ii) стерилизации осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры в диапазоне 120-150°C в течение периода времени от 30 до 90 минут; и

iii) получения алюминийфосфатного геля, имеющего частицы с распределением по размеру, характеризующимся $d(50)$ в пределах от 3,0 мкм до 9,0 мкм и средним размером частиц менее 7 мкм, причем этот способ лишен стадий осаждения суспензии фосфата алюминия и удаления супернатанта.

Механизм адъювантности соединений алюминия включает образование депо, эффективное поглощение антигенных частиц, адсорбированных на алюминии, антиген-презентирующими клетками вследствие природы частиц и оптимального размера (<10 мкм); и стимуляцию иммунокомпетентных клеток организма посредством активации комплемента.

В еще одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ приготовления вакцины, который включает стадии:

i. добавления растворов подвергнутых стерилизации фильтрованием хлорида алюминия и тринатрийфосфата к предварительно стерилизованной воде для инъекций при перемешивании в течение 60 минут, предпочтительно от 35 до 55 минут, поддерживая pH образуемого осадка между 3,0 и 4,0, предпочтительно между 3,2 и 3,5;

ii. добавления антигенов к алюминийфосфатному гелю, полученному на стадии (i), незамедлительно без какой-либо очистки, стерилизации, определения размеров.

В еще одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусматривается применение алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии со способом адсорбции антигенов в вакцинных препаратах.

Преимущества настоящего изобретения

1. Способ настоящего изобретения не включает какое-либо добавление кислоты/щелочи для регулирования pH.

2. Способ не включает какую-либо стадию для уменьшения размера частиц алюминийфосфатного геля.

3. Способ не включает стадии осаждения и, таким образом, удаления супернатанта.

4. Способ не включает какую-либо стадию промывки.

5. Способ позволяет избежать высокотемпературных условий и более длительных периодов для образования.

Настоящее изобретение будет конкретнее проиллюстрировано со ссылкой на следующие примеры. Однако следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается этими примерами каким-либо образом, но включает его варианты в пределах параметров, описанных здесь, как это бывает хорошо известно специалистам в данной области техники.

Пример-1. Приготовление алюминийфосфатного геля.

Растворы хлорида алюминия и тринатрийфосфата в концентрации 485 ± 1 mM использовали в качестве сырья, а воду для инъекций (WFI) в качестве растворителя для получения алюминийфосфатного геля. Оба раствора добавляли, как показано в таблице, приведенной ниже, с постоянной скоростью в течение 45 ± 10 минут к WFI (в

объеме 3,1-3,15X объема раствора) при перемешивании при 550 ± 50 об/мин в сосуде, имеющем 2-4 перегородки, установленную сверху мешалку с минимум 3 лопастными колесами на разных высотах, и каждое из которых имеет 4-лопасти. Добавление раствора хлорида алюминия начинали за 2-5 секунд до начала добавления раствора фосфата натрия для поддержания pH осаждения ниже 3,5 на протяжении всего процесса, за исключением последних 5-10% времени добавления, в течение которого наблюдалось повышение значения pH до приблизительно 5,0. После завершения добавления гель подвергали *in situ* стерилизации с использованием пара при $>121,1^\circ\text{C}$ в течение 30-45 минут. pH геля, после стерилизации, уменьшали на ~ 1 единицу, чтобы достичь приблизительно $4,0 \pm 0,3$.

Таблица 1: Приготовление алюминийфосфатного геля

Исходные растворы	Кол-во/л	Объемы растворов, требуемые для приготовления геля, объем		
		1,8 л	18 л	40 л
Хлорид алюминия (раствор 1)	117,1 г/л	350 мл	3,5 л	7,7 л
Тринатрийфосфат (раствор 2)	184,3 г/л	350 мл	3,5 л	7,7 л
WFI, требуемое кол-во		1,1 л	11 л	24,6 л
Конечная концентрация обеих солей в геле составляет 94,3 мМ; соотношение 1:1				

Алюминийфосфатный гель был получен в масштабе от 1 до 40 литров с использованием вышеописанного способа, воспроизводимо дающего результаты в каждом масштабе при условии, что параметры находятся в заданном диапазоне. В этом способе нет другого осаждения, очистки - т.е. промывки геля с использованием каких-либо буферов для, например, физиологического раствора и т.п., и, следовательно, он является очень простым, прямым и приводит к получению геля, который готов для смешивания. Этот способ, таким образом, доказал свою универсальность, масштабируемость и экономическую эффективность, подтвердив тем самым его пригодность для коммерческого производства.

Пример-2. Размер частиц препарата алюминийфосфатного геля

Определяли размер частиц алюминийфосфатного геля, приготовленного как описано в примере 1, и было установлено, что

средний размер частиц находится в области не более 7 мкм, при этом пределы для $d(10)$, $d(50)$ и $d(90)$ составляют >1 мкм, 3–8 мкм и <14 мкм, соответственно, без какой-либо дополнительной стадии обработки, например, гомогенизации, отбора/удаления мелких частиц и т.д. Репрезентативные данные для значений pH и размеров частиц, вместе со значениями PZC и Дзета-потенциала, установленные во время приготовления партий геля, изготовленных в масштабе 18 л и 40 л, как до, так и после стерилизации, приведены в таблице 2. Данные показывают, что без каких-либо дополнительных требований к способу этот способ доказал свою простоту и воспроизводимость.

Таблица 2: pH, пределы размеров частиц и другие параметры, проверенные на каждой из 3 партий алюминийфосфатного геля (AlPhos Gel), приготовленного в масштабе 18 л и 40 л.

№ партии		18 л						40 л					
		APG 18/01		APG 18/02		APG 18/03		APG 40/01		APG 40/02		APG 40/03	
		BS	AS	BS	AS	BS	AS	BS	AS	BS	AS	BS	AS
pH		5,2	4,3 1	5,2 3	4,1	4,8 8	3,9 1	4,9	4,0 6	5,1	4,2	4,9	3,8 2
Размер частиц (мкм)	Среднее значение	3,64	4,7 5	3,5 9	5,6 4	3,6 8	4,1 8	4,2 6	4,8 5	3,4 2	4,6 3	3,6 4	4,3 3
	d_{10}	2,07	3,1 5	2,0 7	2,6 8	2,0 1	2,7 1	2,7 3	3,2 6	2,0 3	3,1 9	2,2 8	2,6 6
	d_{50}	4,77	6,7	4,5 1	7,8 4	4,3 5	5,6 2	4,7 4	6,1 3	3,9 2	6,5 4	4,0 7	5,2 8
	d_{90}	8,26	10, 9	7,7	12, 7	8,8 9	9,8 8	7,3 3	10, 0	6,7 5	10, 2	6,5 4	8,8 3
PZC		5,19	5,4	5,2 3	5,3 9	5,4 8	5,4 4	5,1 8	5,1 7	5,2 5	5,3 5	5,2 7	5,3 4
Дзета-потенциал @ 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
BS=до стерилизации; AS=после стерилизации.													

Пример-3. Представление адъюванта в виде алюминийфосфатного геля в иммуногенных композициях

Алюминийфосфатный гель, приготовленный как описано в примере 1, использовали в препарате жидкой пятивалентной вакцины (LPV), содержащей дифтерийный анатоксин (DT), столбнячный анатоксин (TT), цельноклеточный коклюшный антиген (wP), поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и конъюгат полирибозил-рибитол-фосфата *Haemophilus influenzae* типа-b с TT (Hib) в качестве антигенных компонентов, в физиологическом растворе в качестве конечного разбавителя. В этом препарате к гелю, полученному как в примере 1, при перемешивании при 200–300 об/мин добавляли один за другим антигены HBsAg, DT и TT без необходимости какого-либо регулирования pH, так как это идеальный pH для их адсорбции на геле (адъюванте), согласно литературе и как доказано в наших исследованиях. Затем эту смесь дополняли до 80% физиологическим раствором, необходимым для конечного объемного состава, с последующим добавлением wP; затем всю смесь охлаждали до температуры ниже 10°C и добавляли компонент Hib при перемешивании. Затем конечный объем доводили до требуемого уровня физиологическим раствором. Затем pH смеси, если требуется, регулировали так, чтобы он составлял от 6,2 до 6,5, но в большинстве случаев не было установлено, что это необходимо.

Описанный выше способ был оптимизирован для способа смешивания LPV, используя алюминийфосфатный гель, приготовленный как описано в примере 1, в разных масштабах. С помощью этого способа были изготовлены смеси LPV объемом от 100 мл до 60 л, и все они были проверены и, как было доказано, соответствуют спецификациям для вакцины, включая параметры безопасности и активности каждого антигена, используемого в препарате.

Было также показано, что алюминийфосфатный гель подходит для приготовления жидкой четырехвалентной вакцины (LQV), содержащей дифтерийный анатоксин (DT), столбнячный анатоксин (TT), цельноклеточный коклюшный антиген (wP) и конъюгат полирибозил-рибитол-фосфата *Haemophilus influenzae* типа-b с TT (Hib) в качестве антигенных компонентов, в физиологическом растворе в качестве конечного разбавителя. В препарате этой

вакцины прослеживаются те же антигены и следуют тем последовательностям их добавления, за исключением того, что не используется HBsAg, который первым добавляют в препарате LPV.

Смеси LPV объемом от 100 мл до 60 л были приготовлены, используя этот способ, и все они были проверены и, как было доказано, соответствуют спецификациям для вакцины, включая параметры безопасности и активности каждого антигена, используемого в препарате.

Пример 4. Процедура и результаты способности к адсорбции антигенов

Среди антигенов, используемых для приготовления LPV, HBsAg, DT и TT были тремя, которые связываются с алюминийфосфатным гелем. Собственное требование для связывания в LPV для HBsAg составляло >90%, для DT – >28%, а для TT оно составляло >30%. Алюминийфосфатный гель, полученный в разных масштабах, постоянно соответствовал этим требованиям при проверке в случае производства партии геля до 40 л и объема смеси LPV до 60 л. Вариации значений % адсорбции между обеими смесями LPV, полученными с использованием алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии с описанной в примере 1 процедурой, изготовленного в разных масштабах, являются незначительными. Кроме того, подвергание вакцины воздействию напряженных состояний (37°C в течение 14 дней) не меняло значительно значения % адсорбции. Репрезентативный пример этого свойства геля, изготовленного в разных масштабах (1 л и 18 л) и используемого для смеси LPV в масштабах 2 л и 60 л, вместе с 2-л и 60-л смесями LPV, полученными с использованием Adju-Phos® от Brenntag Biosector (коммерческий поставщик), приведен в таблице 3.

В качестве примера доказательства стабильности смеси гель/LPV, полученной с использованием алюминийфосфатного геля, полученного в соответствии с примером 1, результаты в виде % адсорбции для трех антигенов 4-л смеси LPV, полученной и проверенной в дни 0 (выпуска готового продукта), после инкубации при 37°C в дни 5, 7 и 14 суммированы в таблице 4.

Таблица 3: Результаты в виде % адсорбции, в случае смесей LPV с использованием различных источников гелей и размеров смесей

Номер по порядку	Антиген	Adju-Phos® (Brenntag)		При приготовлении в соответствии с процедурой, описанной в примере 1.	
		2 л LPV	60 л LPV	2 л LPV	60 л LPV
1	HBsAg	94,8	99,7	98,8	98,9
2	Дифтерийный анатоксин	47,6	59,6	50,0	58,3
3	Столбнячный анатоксин	41,7	46,7	44,8	46,7

Данные, представленные в таблице 3, подтверждают, что % адсорбции алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии с описанной в примере 1 процедурой, соответствует таковому для Adju-Phos от Brenntag.

Таблица 4: Результаты в виде % адсорбции – 4 л смеси LPV в момент выпуска готовой продукции (день 0) и после инкубации при 37°C в течение 14 дней

День отбора образца	Дифтерийный анатоксин	Столбнячный анатоксин	HBsAg
День 0	50,0	40,72	96,5
День 5	77,1	53,8	98,7
День 7	41,7	48,6	99,2
День 14	56,8	47,5	98,9

Пример-5. Другие процедуры для характеристики геля и их результаты.

Несколько партий алюминийфосфатного геля, полученного как описано в примере 1, были проанализированы на различные физико-химические свойства, чтобы они были полностью охарактеризованы. Кроме pH, размера частиц и содержания алюминия, было также проверено несколько более параметров, которые, наряду с причинами их анализа, суммированы в таблице 5.

Таблица 5: Проверяемые физико-химические свойства AlPhos геля и основная причина

Параметр		Предел	Влияние/причина анализа
Внешний вид		Белая мутная суспензия, в которой минеральный носитель имеет тенденцию к медленному оседанию	Описывает общий физический вид
Содержание алюминия		Не менее 2 мг/мл	Определяет связывание
Размер частиц (мкм)	Среднее значение	Не более 7	Определяет площадь поверхности, возможность агрегации, связывающую способность
	D ₁₀	≥1	
	D ₅₀	3–8	
	D ₉₀	≤14	
PZC (pI)		5,1±0,5	
Дзета-потенциал (@pH 7,5)		От -28 до -40 мВ	Определяет коэффициент/скорости адсорбции; основной фактор, определяющий агрегацию, также определяет
Способность к адсорбции антигенов		rHBsAg: ≥90%	Определяет относительное распределение антигенов в фазах раствор/гель
		DN: ≥28%	
		TT: ≥30%	
Профиль распределения	Свободный алюминий	Не более 50 ч./мл.	Определяет степень чистоты геля

концентрации и примеси	Раствори мые фосфаты	Не более 0,5% в виде PO_4	
Удельный вес		1,00–1,03	Определяет вес/единицу
Скорость осаждения		Не более 35%	Определяет осаждаемость геля
Осмотическое давление		550±50 мосмоль/кг	Отражает концентрацию растворенных веществ в геле

Репрезентативные количественные данные от шести партий алюминийфосфатного геля, полученных в масштабе 18 л, приготовленных в соответствии с описанной в примере 1 процедурой, для партий валидации способа – партий LPV и LQV приведены в таблицах 6 и 7. Все эти партии соответствовали требованиям для всех параметров, проверенных на обеих стадиях после и до стерилизации; в то время как все партии соответствовали спецификациям для внешнего вида, стерильности и уровней примесей, количественные параметры среди них были проанализированы в этих таблицах.

Таблица 6: Анализ результатов физико-химических параметров. Проверка алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии с описанной в примере 1 процедурой – стадия до стерилизации

Номер по поряд ку	Тест		В партиях LPV			В партиях LQV			Анализы		
			LPV -1	LPV -2	LPV -3	LQV -A	LQV -B	LQV -C	Среднее значение	Стандартное отклонение	% CV
1	Размер частиц (мкм)	Среднее значени е	3,5	3,1	3,2	3,5	3,6	3,7	3,46	0,21	6,1
			0	9	4	0	2	3			0
		D ₁₀	2,0	1,8	1,9	1,9	2,1	2,2	2,03	0,14	7,0
			3	6	3	7	2	6			9
		D ₅₀	4,2	3,6	3,6	4,4	4,1	4,2	4,07	0,32	7,7
				7	8		9	9			7

		D ₉₀	7,3 4	6,4 3	6,2 8	7,8 2	7,2 6	7,1 9	7,05	0,59	8,3 1
2	PZC		5,3 3	5,4 4	5,4 1	5,4 9	5,5 0	5,3 6	5,3	5,43	0,0 6
3	Дзета-потенциал (@ pH 7,5)		– 32, 8	– 32, 6	– 31, 8	– 33, 4	– 30, 7	– 33, 7	– 32,3	– 32,3	1,5
4	Скорость осаждения @ 48 часов (в %)		27	25	25	25	25	25	25	25,0	0,0

Значения CV (коэффициента вариации) для всех проверенных параметров, без учета индивидуальных пределов распределения размеров частиц, находились в пределах 10% и даже более в случае стадии после стерилизации; это свидетельствовало о большом постоянстве процедуры приготовления геля в пределах шести проанализированных партий, изготовленных в течение 6 месяцев с использованием различных партий исходных материалов. Данные также подтвердили, что только минорные, незначительные изменения в физико-химических параметрах геля происходят после стерилизации.

Таблица 7: Анализ результатов физико-химических параметров. Проверка алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии с описанной в примере 1 процедурой – стадия после стерилизации

Номер по порядку	Тест		В партиях LPV			В партиях LQV			Анализ		
			LPV-1	LPV-2	LPV-3	LQV-A	LQV-B	LQV-C	Среднее значение	Стандартное отклонение	% CV
1	Содержание алюминия		2,42	2,42	2,39 5	2,0 5	2,15	2,10	2,2 6	0,17	7, 71
2	pH		3,77	4,28	4,31	3,9 1	4,04	4,21	4,0 9	0,22	5, 32
3	Размер частиц (мкм)	Среднее значение	4,13	3,91	4,00	4,2 4	3,90	4,00	4,0 3	0,13	3, 28
		D ₁₀	2,49	2,57	2,39	2,5	2,46	2,38	2,4	0,07	3,

					2			7		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		5,33	5,48	5,54	5,47	5,44	5,4	5,44	0,07	1,33
5	Дзета-потенциал (@ pH 7,5)		– 32,8	– 31,27	– 33,43	– 33,9	– 33,03	– 34,17	– 33,7	0,60	1,77
6	Удельный вес		1,020	1,020	1,019	Не проверено			Не применимо		
7	Осмотическое давление		528	542	507	Не проверено			Не применимо		
8	Скорость осаждения @ 48 часов (в %)		27	28	28	28	27	28	27,7	0,52	1,87

Некоторые из этих параметров для нескольких партий проверялись на протяжении периода хранения геля (до 7 дней) на разных стадиях, а именно: после приготовления, после in-situ стерилизации и после автоклавирования in-situ стерилизованного геля. Репрезентативные данные от одной партии, проверенной в отношении эффекта хранения на различные параметры, суммированы в таблице 8. Данные подтверждают, что параметры не изменяются значительно до 7 дней после стерилизации/автоклавирования. Эти характеристики и их анализ подтверждают единообразие гелей, полученных в разных масштабах, а также подтверждают надежность способа приготовления геля.

Таблица 8: Физико-химические параметры партии алюминийфосфатного геля на различных стадиях приготовления и хранения

Стадия	Размер частиц (мкм)	pH	PZC	Д	м	о	с	у
--------	---------------------	----	-----	---	---	---	---	---

		D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Среднее значение			ета	м	с
После приготовления		2,2 1	4,7 3	8,38	3,7 9	5,5 1	5, 2	– 32,8 7	518	25
После in-situ стерилизации		2,9 0	5,6 0	9,30	4,4 4	4,2 0	5, 0	– 31,9 3	Не проверено	28
После автоклавирования in-situ стерилизованного геля (День 0)		2,9 9	5,7 9	9,73	4,5 2	4,2 0	5, 0	– 32,1 0		28
После автоклавирования in-situ стерилизованного геля (День 7)		2,9 4	5,7 9	10,0 4	4,5 4	4,6 5	5, 0	– 34,6 7		28
После автоклавирования только	День 0	2,1 9	4,7 4	8,45	3,7 8	4,3 0	5, 1	– 32,0 0	523	26
	День 7	2,3 3	4,9 2	9,19	3,9 4	4,6 8	5, 2	– 33,2 7	524	25

Пример-6. Эффективность и стабильность AlPhos геля в качестве адъюванта в вакцинных препаратах.

Три партии 60 л LPV были приготовлены с использованием трех различных партий алюминийфосфатного геля, приготовленного как описано в примере 1, и одна 60-л партия LPV была приготовлена с использованием Adju-Phos геля от Brenntag в качестве «контроля» – для сравнения продукта, полученного с использованием описанной в примере 1 процедуры, и AlPhos гелей от Brenntag. Алюминийфосфатный гель был приготовлен в масштабе 18 л с использованием стерилизованных растворов и в стерильном сосуде и перенесен в стерильные стеклянные бутылки для стерилизации автоклавированием; этот стерильный гель был перенесен в сосуд для смешивания для смеси LPV.

Три конечных балка LPV были получены с использованием

алюминийфосфатного геля собственного производства со следующими номерами партий (как указано в таблицах 6 и 7 в примере 5): LPV-1, LPV-2 и LPV-3. «Контрольной» партии конечного балка LPV, полученного с использованием Adju-Phos от Brenntag, присвоен номер «LPV-4».

Множество антигенов, используемых для приготовления LPV-1 и LPV-4, было одинаковым, чтобы можно было сравнить влияние геля, полученного в соответствии с настоящим изобретением, и влияние Adju-Phos, имеющегося в продаже, изготовленного Brenntag Biosector.

Результаты всех качественных и количественных тестов соответствовали критериям приемлемости для соответствующего параметра и, таким образом, подтверждают, что AlPhos гель, приготовленный в соответствии с настоящим изобретением, создавал партии LPV, которые были очень сопоставимы с партиями, полученными с использованием Adju-Phos от Brenntag, тем самым подтверждая пригодность AlPhos геля собственного производства при изготовлении вакцинных препаратов.

Подобно LPV, три конечных балка LQV (вакцины D-T-P-Hib) были также получены с использованием алюминийфосфатного геля, приготовленного в соответствии с настоящим изобретением, со следующими номерами партий (как указано в таблицах 6 и 7 в примере 5): LQV-A, LQV-B и LQV-C. Результаты всех качественных и количественных тестов соответствовали критериям приемлемости (таким же, как для LPV) для соответствующего параметра, тем самым подтверждая, что гель, приготовленный в соответствии с настоящим изобретением для смешивания партий LQV, также был очень единообразным. Эти данные вновь подтверждают пригодность AlPhos геля настоящего изобретения при изготовлении вакцинных препаратов.

Все партии LPV и LQV, полученные как указано выше, загружали в стеклянные флаконы в виде 10 однократных доз (0,5 мл) (всего 5,0 мл) и подвергали исследованиям стабильности в режиме реального времени (2-8°C) и в условиях ускоренных испытаний в виде хранения при температурах (25±2°C). Все

параметры тестов, которые были оценены для проверки стабильности, соответствовали спецификациям до 3 месяцев хранения, при последней проверке, в обоих условиях для обеих вакцин; и результаты параметров стабильности, проверенных на загруженных конечных партиях LPV-1 и LPV-4 до составляющего 9 месяцев момента времени при сохранении в условиях хранения в режиме реального времени, снова являются сопоставимыми, что указывает на отсутствие изменения какого-либо из проверенных параметров из-за смены источника AlPhos геля.

Следовательно, доказано, что способ настоящего изобретения для приготовления алюминийфосфатного геля с использованием уникального процесса является легко воспроизводимым, масштабируемым и очень подходящим для применения в вакцинных препаратах в качестве адъюванта.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Усовершенствованный способ приготовления алюминийфосфатного геля, который включает:

i) добавление растворов соли алюминия и соли в виде щелочного фосфата к воде, поддерживая pH между 3,0 и 4,0, при перемешивании с получением осадка;

ii) стерилизацию осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры в диапазоне 120–150°C в течение периода времени от 30 до 90 минут; и

iii) получение алюминийфосфатного геля, имеющего частицы с распределением по размеру, характеризующимся $d(50)$ в пределах от 3,0 мкм до 9,0 мкм и средним размером частиц менее 7 мкм, причем способ лишен стадий осаждения суспензии фосфата алюминия и удаления супернатанта.

2. Способ по п. 1, в котором используемые концентрации растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата находятся в диапазоне от 400 до 500 миллимоль (мМ), предпочтительно от 480 до 490 мМ.

3. Способ по п. 1, в котором добавление растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата выполняют при перемешивании со скоростью не менее 400 об/мин, предпочтительно между 500 и 600 об/мин.

4. Способ по п. 1, в котором добавление на стадии (i) выполняют при комнатной температуре или при температуре от 20°C до 25°C.

5. Способ по п. 1, в котором добавление выполняют в течение периода от 10 до 60 минут, предпочтительно от 35 до 55 минут.

6. Алюминийфосфатный гель, приготовленный как заявлено в п. 1, имеющий распределение частиц по размеру, в случае которого $d(90)$ находится в области <15 мкм, предпочтительно от 5 до 10 мкм.

7. Способ по п. 1, который выполняют в замкнутой системе.

8. Способ по п. 1, который выполняют в диапазоне pH от 3,2 до 3,5 без добавления какой-либо другой кислоты или щелочи

9. Способ по п. 1, который избегает стадий осаждения, и в связи с этим супернатант не образуется.

10. Усовершенствованный способ приготовления алюминийфосфатного геля, который включает стадии:

i) добавления растворов хлорида алюминия и тринатрийфосфата к воде для инъекций при перемешивании в течение 60 минут, предпочтительно от 35 до 55 минут, поддерживая pH образуемого осадка между 3,0 и 4,0, предпочтительно между 3,2 и 3,5;

ii) стерилизации осадка фосфата алюминия со стадии (i) путем нагревания осадка фосфата алюминия до температуры в диапазоне 120-150°C в течение периода времени от 30 до 90 минут; и

iii) получения алюминийфосфатного геля, имеющего частицы с распределением по размеру, характеризующимся $d(50)$ в пределах от 3,0 мкм до 9,0 мкм и средним размером частиц менее 7 мкм, причем способ лишен стадий осаждения суспензии фосфата алюминия и удаления супернатанта.

11. Вакцинная композиция, содержащая один или более антигенов, адсорбированных на алюминийфосфатном геле, приготовленном как заявлено в любом из п.п. 1-10.

По доверенности