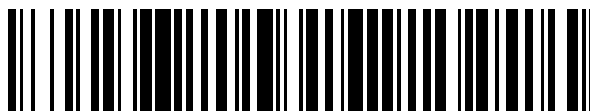


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 158**

51 Int. Cl.:

C07C 11/21	(2006.01) B01D 3/14	(2006.01)
C07C 7/04	(2006.01) C12N 7/00	(2006.01)
A61K 9/107	(2006.01)	
A61K 31/01	(2006.01)	
A61K 39/39	(2006.01)	
A61K 47/06	(2006.01)	
A61P 31/16	(2006.01)	
A61K 39/00	(2006.01)	
A61K 39/145	(2006.01)	
B01D 3/10	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2011 E 13164769 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **31.07.2019 EP 2620423**

54 Título: **Procedimientos mejorados para preparar escualeno**

30 Prioridad:

12.05.2010 US 395448 P

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

26.03.2020

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

HORA, MANINDER

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 597 158 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimientos mejorados para preparar escualeno

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención está en el campo de la fabricación de composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden escualeno que tiene una pureza adecuada para aplicaciones farmacéuticas.

10 TÉCNICA ANTERIOR

El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado ramificado llamado escualeno, ($C_{10}H_{16}$; $[(CH_3)_2C=CHCH_2CH_2C(CH_3)]_2=CHCH_2-$); 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosa-hexaeno; CAS RN 7683-64-9). El escualeno es conocido para su uso en emulsiones de aceite en agua en vacunas humanas, por ejemplo, la emulsión MF59 que se usa para adyuvantar vacunas contra la gripe. El informe de evaluación de CHMP para Focetria (EMA, 24 de septiembre de 2009) describe la destilación y re-destilación de escualeno a partir de aceite de hígado de tiburón para la producción de MF59C.1 (una formulación de citrato de MF59). El escualeno también se usa en otros productos farmacéuticos (por ejemplo, pomadas, supositorios) y en cosméticos.

Las actuales fuentes para el escualeno son principalmente aceites de pescado, y en particular aceites de hígado de tiburón. Puede haber problemas asociados al uso de escualeno extraído de aceite de hígado de tiburón, particularmente si no se mantienen rigurosos patrones de fabricación (tales como aquellos usados durante la producción de MF59 por Novartis). Por ejemplo, los tiburones pueden infectarse por patógenos que también son infecciosos para los seres humanos o que producen sustancias que son perjudiciales para los seres humanos, y pueden existir TSE o agentes de tiburón similares a TSE [por ejemplo, referencias 1-3]. Además, los tiburones pueden contener toxinas humanas, tales como carchatoxina. Además, los tiburones pueden contener proteínas a las que los seres humanos pueden ser alérgicos. Una proteína de pescado a la que los seres humanos son alérgicos es parvalbúmina que se encuentra en los tiburones. Así, las fuentes de baja calidad baratas de escualeno no son adecuadas para uso farmacéutico humano. El riesgo de daño a un receptor humano puede ser elevado en situaciones en las que el escualeno sea parte de un adyuvante inmunológico debido a que, por definición, el adyuvante puede inducir una fuerte respuesta inmunitaria no deseada contra la impureza.

Sería útil encontrar procedimientos adicionales y mejorados para preparar escualeno que fuera adecuado para uso farmacéutico, es decir, un producto que cumpliera normas reguladoras y no contuviera contaminantes, patógenos, virus, toxinas humanas o proteínas que pudieran ser perjudiciales para los seres humanos. El procedimiento de la presente invención es particularmente útil para la purificación de escualeno derivado de aceite de hígado de tiburón.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un procedimiento para la fabricación de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una emulsión de aceite en agua que comprende (i) preparar escualeno a partir de una composición que comprende escualeno de una fuente animal, mediante un procedimiento que comprende las etapas de: (a) una destilación de purificación llevada a cabo a una temperatura T_1 ; (b) una destilación desnaturizante llevada a cabo a una temperatura T_2 ; en el que las etapas (a) y (b) pueden realizarse en cualquier orden; T_1 y T_2 son suficientes para hacer que hierva el escualeno; $T_2 > T_1$; y $T_2 \geq 200$ °C; y $T_2 - T_1$ desde 50°C a 200°C (ii) preparar una emulsión usando el escualeno preparado en la etapa (i). La fuente animal es normalmente una fuente de pescado, tal como aceite de hígado de tiburón (o un extracto del mismo), es decir, la invención proporciona un procedimiento para preparar escualeno de aceite de hígado de tiburón o de un extracto de aceite de hígado de tiburón.

También se describe un procedimiento para la fabricación de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una emulsión de aceite en agua que comprende (i) preparar escualeno a partir de una composición que contiene escualeno que comprende las etapas de (a) una destilación de purificación llevada a cabo a una temperatura T_1 ; (b) una destilación desnaturizante llevada a cabo a una temperatura T_2 ; en el que las etapas (a) y (b) pueden realizarse en cualquier orden; T_1 y T_2 son suficientes para hacer que hierva el escualeno; $T_1 < 140$ °C y $T_2 \geq 200$ °C (ii) preparar una emulsión usando el escualeno preparado en la etapa (i). La composición que contiene escualeno puede ser útilmente aceite de hígado de tiburón o un extracto del mismo.

También se describe un procedimiento para la fabricación de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una emulsión de aceite en agua, comprendiendo dicho procedimiento: (i) proporcionar una composición que comprende escualeno que comprende 99 % de escualeno o más que ha sido obtenido por un proceso de destilación a una temperatura inferior a 140 °C; y (ii) re-destilar la composición de (i) a una temperatura superior a o igual a 200 °C; en el que las condiciones para tanto la destilación como la re-destilación son suficientes para hacer que el escualeno hierva.

El procedimiento de la presente invención puede usarse para producir un producto que es adecuado para aplicaciones farmacéuticas. En particular, el procedimiento de la presente invención puede usarse para producir

escualeno purificado que no contiene contaminantes, patógenos, virus, toxinas o proteínas humanas, en particular la proteína parvalbúmina, que podría ser perjudicial para seres humanos.

5 También se describe un procedimiento para preparar una composición de vacuna, que comprende preparar una emulsión como se ha descrito anteriormente y combinar la emulsión con un antígeno.

La presente invención proporciona además un procedimiento para preparar un kit de vacuna que comprende preparar una emulsión según la presente invención y envasar la emulsión en un kit como un componente de kit junto con un componente de antígeno.

10 También se describe escualeno preparado según los procedimientos de la presente invención.

También se describe una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno preparado según los procedimientos de la presente invención.

15 También se describe una vacuna que comprende escualeno preparado según los procedimientos de la presente invención.

20 También se describe el uso de escualeno preparado según los procedimientos de la presente invención en una vacuna.

Destilación de purificación

25 La composición descrita que comprende escualeno puede derivarse de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, espumas de jabón de licor negro; jabón de resinas de lejías celulósicas; resina de lejías celulósicas en bruto; brea de resinas de lejías celulósicas; aceite de caña de azúcar; residuos de extracción, desengomado y refinado de aceites y grasas; residuos de destilación de ácidos grasos y ésteres; destilados de desodorización de aceites vegetales; aceite de oliva; aceite de soja; aceite de salvado de arroz; aceite de hígado de tiburón; sebo de res; aceite de café; aceite de pescado; aceite de hígado de bacalao; aceite de germen de trigo; aceite de germen de maíz; aceites de palma; aceites de andiroba; y aceite de residuos de tomate. En particular, la composición que comprende escualeno puede derivarse de aceite de hígado de tiburón.

35 La destilación de purificación elimina impurezas de una composición que comprende escualeno para producir una composición purificada. La composición que comprende escualeno es generalmente un líquido. Antes de la destilación de purificación, la composición que comprende escualeno puede contener impurezas tales como escualamina; alquilglicerol; ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos omega-3); vitaminas A y D; pristina; triglicéridos; éteres de glicerol y alcoholes grasos.

40 La destilación de purificación se lleva a cabo a una temperatura T_1 en la que T_1 es suficiente para hacer que hierva el escualeno, es decir, T_1 puede ser superior a o igual al punto de ebullición del escualeno. El punto de ebullición del escualeno es 429 - 430 °C a 760 mm de Hg (es decir, 1 atmósfera).

45 El punto de ebullición de un líquido es la temperatura a la que la presión de vapor de la fase líquida de un compuesto es igual a la presión externa que actúa sobre la superficie del líquido. Por tanto, el punto de ebullición del escualeno, y de ahí el límite inferior de T_1 , dependerá de la presión externa que actúe sobre la superficie de la composición que comprende escualeno. Este fenómeno es muy conocido en la técnica y el experto podría calcular el punto de ebullición del escualeno a una presión de destilación dada usada. Alternativamente, el experto podría calcular la presión de destilación requerida basándose en un punto de ebullición observado deseado del escualeno. Tales cálculos pueden llevarse a cabo usando un nomógrafo.

50 En una realización, la destilación de purificación puede llevarse a cabo a una temperatura de al menos 70 °C, por ejemplo, al menos 75 °C, o al menos 80 °C. En otra realización, la destilación de purificación puede llevarse a cabo a una temperatura inferior a 140 °C, por ejemplo, inferior a 130 °C, inferior a 120 °C, inferior a 110 °C, inferior a 100 °C inferior a 95 °C, inferior a 90 °C o inferior a 85 °C.

55 En una realización, la destilación de purificación puede llevarse a cabo en un vacío próximo. En particular, la destilación de purificación puede llevarse a cabo a una presión de al menos 0,5 μm de Hg, por ejemplo, al menos 0,75 μm de Hg, o al menos 1 μm de Hg. La destilación de purificación puede llevarse a cabo a una presión inferior a 5 μm de Hg, por ejemplo, inferior a 2,5 μm de Hg o inferior a 2 μm de Hg.

60 Otras realizaciones de la presente invención comprenden combinaciones de las temperaturas mínimas y máximas y las presiones mínimas y máximas citadas anteriormente.

65 La destilación de purificación puede producir una composición que comprende al menos el 95 % de escualeno, por ejemplo, al menos el 96 % de escualeno, al menos el 97 % de escualeno, al menos el 98 % de escualeno, al menos el 99 % de escualeno, al menos el 99,5 % de escualeno, al menos el 99,8 % de escualeno, al menos el 99,9 % de

escualeno, o incluso el 100 % de escualeno.

5 Todos los porcentajes citados en el presente documento son porcentajes en peso y pueden medirse usando cromatografía de gases (CG). Puede realizarse una técnica de CG inyectando una muestra de escualeno en hexano sobre un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama (FID). El análisis puede realizarse en una columna capilar de 30 m x 0,32 mm x 0,50 mm mantenida a 200 °C durante 2 minutos y luego incrementarse a 12 °C por minuto hasta 310 °C, donde se mantiene durante 9 minutos. El puerto de inyección y el FID se mantienen a 300 °C y 320 °C, respectivamente. La identidad del pico de escualeno se establece usando CG/EM (cromatografía de gases usando un detector selectivo de masa). La pureza se informa como el área del pico de escualeno como porcentaje de la suma de las áreas de todos los picos en el cromatograma.

10 La destilación de purificación puede llevarse a cabo antes de la destilación desnaturalizante, produciendo una composición purificada. Alternativamente, la destilación de purificación puede llevarse a cabo después de la destilación desnaturalizante, produciendo una composición purificada desnaturalizada.

15 **Destilación desnaturalizante**

20 Los tiburones, y por tanto, el escualeno derivado de aceite de hígado de tiburón, pueden contener proteínas a las que los seres humanos son alérgicos. Una proteína de pescado común a la que los seres humanos pueden ser alérgicos es la parvalbúmina, que se encuentra en los tiburones. Además, las proteínas o materiales contaminantes pueden haberse introducido a la composición de escualeno, por ejemplo, tras la destilación de purificación o como productos de degradación del escualeno. Las posibles proteínas o materiales contaminantes incluyen acetona, acetaldehído, formaldehído y agua. Ventajosamente, la etapa de destilación desnaturalizante desnaturaliza y/o elimina proteínas, en particular parvalbúmina, y cualquier proteína contaminante, de la composición que comprende escualeno, proporcionando así una composición desnaturalizada. Otra ventaja del procedimiento de la presente invención es que la destilación desnaturalizante puede garantizar que cualquier posible virus presente en la composición que comprende escualeno se inactive y/o elimine de la composición purificada. La composición desnaturalizada es, por tanto, más segura para uso humano que una composición no desnaturalizada.

30 Sin desear ceñirse a teoría alguna, el punto de ebullición del escualeno dependerá de la presión externa que actúe sobre la superficie de la composición que comprende escualeno. Sin embargo, la temperatura a la que cualquier proteína presente en la composición que comprende escualeno se desnaturalizará es generalmente independiente de la presión externa que actúa sobre la superficie de la composición que comprende escualeno. Por tanto, la destilación desnaturalizante puede llevarse a cabo a una temperatura específica, independientemente de la presión bajo la que se realiza la destilación. En particular, la destilación desnaturalizante puede llevarse a cabo a una temperatura T_2 en la que la T_2 puede ser superior a o igual a 200 °C, superior a o igual a 205 °C, superior a o igual a 210 °C, superior a o igual a 215 °C, superior a o igual a 220 °C, superior a o igual a 230 °C, superior a o igual a 240 °C, superior a o igual a 250 °C, o superior a o igual a 260 °C.

40 La destilación desnaturalizante puede llevarse a cabo a una temperatura inferior a 500 °C, por ejemplo, inferior a 480 °C, inferior a 450 °C, inferior a 420 °C, inferior a 400 °C, inferior a 350 °C, o inferior a 300 °C.

45 La destilación desnaturalizante puede llevarse a cabo a un vacío próximo. En particular, la destilación desnaturalizante puede llevarse a cabo a una presión de al menos 0,5 mm de Hg, por ejemplo, al menos 0,6 mm de Hg, al menos 0,7 mm de Hg o al menos 0,8 mm de Hg. La destilación desnaturalizante puede llevarse a cabo a una presión inferior a 5 mm de Hg, por ejemplo, inferior a 4 mm de Hg, inferior a 3 mm de Hg, inferior a 2 mm de Hg, inferior a 1,5 mm de Hg, inferior a 1 mm de Hg, o inferior a 0,9 mm de Hg.

50 Otras realizaciones de la presente invención comprenden combinaciones de las temperaturas mínimas y máximas y las presiones mínimas y máximas citadas anteriormente.

55 Para llevar a cabo la destilación desnaturalizante a una alta temperatura tal puede ser ventajoso usar un aparato en el que la composición que comprende escualeno se pone en contacto con una superficie caliente. La superficie caliente puede mantenerse a la temperatura T_2 , como se ha definido anteriormente, y la presión que rodea la superficie caliente puede ser las presiones definidas anteriormente para la destilación desnaturalizante. La presión que rodea la superficie caliente puede seleccionarse para garantizar que el punto de ebullición observado de escualeno sea T_2 o menos. Como la composición que comprende escualeno se pone en contacto con la superficie caliente, se volatilizarán aquellos componentes de la composición, que incluyen escualeno, cuyo punto de ebullición es inferior a T_2 a la presión que rodea la superficie caliente. Los componentes no volátiles, por ejemplo, proteínas, quedan sobre la superficie caliente y pueden desnaturalizarse y separarse del escualeno.

60 Antes de la destilación desnaturalizante, la composición que comprende escualeno puede comprender del 85 % al 99,9 % de escualeno, por ejemplo, del 90 % al 99,5 % de escualeno, del 95 % al 99,5 % de escualeno, o del 97 % al 99,5 % de escualeno.

65 La destilación desnaturalizante puede producir una composición de escualeno que tiene un mayor porcentaje de

escualeno. En particular, la destilación desnaturalizante puede producir una composición desnaturalizada que comprende al menos el 95 % de escualeno, por ejemplo, al menos el 99 % de escualeno, al menos el 99,5 % de escualeno, al menos el 99,9 % de escualeno, o incluso el 100 % de escualeno.

5 La destilación desnaturalizante puede producir una composición desnaturalizada que comprende menos del 0,5 % de proteína, por ejemplo, menos del 0,1 % de proteína, menos del 0,01 % de proteína, o 0 % de proteína. Por tanto, la presente invención proporciona escualeno que comprende menos del 0,5 % de proteína, por ejemplo, menos del 0,1 % de proteína, menos del 0,01 % de proteína, o 0 % de proteína.

10 En una realización, la destilación desnaturalizante puede llevarse a cabo después de la destilación de purificación, produciendo una composición desnaturalizada purificada.

T_2 es superior a T_1 . $T_2 - T_1$ es de 50 °C a 200 °C, opcionalmente de 80 °C a 150 °C.

15 **Disolventes**

Para evitar la introducción de impurezas a la composición que comprende escualeno, que es particularmente importante si la composición de escualeno está prevista para su uso en vacunas, las destilaciones de purificación y desnaturalizantes pueden llevarse a cabo sin la adición de disolventes.

20 **Saponificación**

25 La composición que comprende escualeno puede someterse a saponificación. La saponificación se llevará normalmente a cabo antes de las etapas de destilación (a) y (b), tratadas anteriormente. Alternativamente, la saponificación puede llevarse a cabo entre las etapas de destilación (a) y (b), en cualquier orden que se realicen. Alternativamente, pero no normalmente, la saponificación puede llevarse a cabo después de las etapas de destilación (a) y (b). La saponificación puede destruir proteínas presentes en la composición que comprende escualeno. Sin embargo, la saponificación puede no eliminar todas las proteínas presentes. Cualquier proteína residual que quede en la composición que comprende escualeno después de la saponificación puede eliminarse mediante una etapa de destilación desnaturalizante. La combinación de saponificación y destilación desnaturalizante es ventajosa, ya que mejora la probabilidad de que el escualeno no contenga ninguna proteína.

35 La saponificación es la hidrólisis de un éster en condiciones básicas para formar un alcohol y la sal de un ácido carboxílico. Durante la saponificación de la composición que comprende escualeno, una base (por ejemplo, NaOH o KOH) se añade a la composición que puede producir los ésteres de ácidos grasos (por ejemplo, los triglicéridos) para convertir en jabón. La saponificación puede ser ventajosa debido a que puede aumentar la diferencia entre los puntos de ebullición de los productos saponificados y los puntos de ebullición de los productos sin saponificar, haciendo más eficiente la separación mediante destilación, por ejemplo, la destilación de purificación y/o la desnaturalizante. Alternativamente, los productos saponificados pueden eliminarse por otros medios, por ejemplo, por centrifugación.

40 La eliminación de los ésteres de ácidos grasos por saponificación puede producir una composición saponificada que comprende escualeno, que puede ser de pureza mejorada (es decir, un mayor % de escualeno) en comparación con la composición sin saponificar que comprende escualeno.

45 **Caracterización del escualeno**

El escualeno producido mediante el procedimiento de la presente invención puede tener un valor de saponificación de menos de 4 mg/ml, por ejemplo, menos de 3 mg/ml, menos de 2 mg/ml o menos de 1 mg/ml. Esta medición indica la cantidad de especies saponificables presentes en el escualeno. El valor de saponificación puede determinarse como los equivalentes de hidrólisis y neutralización de hidróxido sódico como se describe en la Farmacopea estadounidense (USP) <401>. Un valor de saponificación obtenido usando NaOH puede convertirse en un valor de KOH multiplicándolo por la relación de los pesos moleculares de KOH y NaOH (1,403).

55 El escualeno producido mediante el procedimiento de la presente invención puede tener un valor de ácido de menos de o igual a 1 mg de KOH / g, por ejemplo, menos de o igual a 0,8 mg de KOH / g, menos de o igual a 0,6 mg de KOH / g, menos de o igual a 0,5 mg de KOH / g, menos de o igual a 0,4 mg de KOH / g, menos de o igual a 0,2 mg de KOH / g, menos de o igual a 0,1 mg de KOH / g, menos de o igual a 0,05 mg de KOH / g, menos de o igual a 0,03 mg de KOH / g, menos de o igual a 0,02 mg de KOH / g, o menos de o igual a 0,01 mg de KOH / g. El valor de ácido puede determinarse como los equivalentes de neutralización de hidróxido potásico consumidos por escualeno como se describe en USP <401>.

65

Emulsiones de aceite en agua

Una vez la composición que comprende escualeno ha sido preparada como se ha descrito anteriormente, puede usarse para la preparación de productos aguas abajo, por ejemplo, medicinas, adyuvantes de emulsiones de aceite en agua, etc.

Para evitar la contaminación es preferible que el escualeno se mantenga estéril tras el tratamiento por destilación y antes de la preparación del producto aguas abajo. Por ejemplo, si el producto aguas abajo es una emulsión, los aparatos de destilación y emulsión podría formar un sistema cerrado para evitar la contaminación del escualeno antes de la formación de la emulsión. Alternativamente o además, el escualeno podría mantenerse bajo una atmósfera inerte, por ejemplo, nitrógeno, antes de la preparación del producto aguas abajo.

Se ha encontrado que las emulsiones de aceite en agua son particularmente adecuadas para su uso en adyuvantar vacunas. Las emulsiones preparadas según la invención incluyen escualeno y al menos un tensioactivo, además de un componente acuoso. Las emulsiones pueden contener aceites adicionales. Idealmente, el (los) aceite(s) y tensioactivo(s) son biodegradable(s) (metabolizable(s)) y biocompatible(s).

Pueden usarse combinaciones de aceite de escualeno y tocoferoles. Si una composición incluye un tocoferol, puede usarse cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ , pero se prefieren α -tocoferoles. Puede usarse D- α -tocoferol y DL- α -tocoferol. Un α -tocoferol preferido es DL- α -tocoferol. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo, diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Si se usa una sal de un tocoferol, la sal preferida es el succinato. Es útil una combinación de aceite que comprende escualeno y un tocoferol (por ejemplo, DL- α -tocoferol).

Es típico un contenido de aceite en el intervalo del 2-20 % (en volumen).

El componente acuoso puede ser agua (por ejemplo, agua para inyección) o puede incluir adicionalmente componentes, por ejemplo, solutos. Por ejemplo, puede incluir sales para formar un tampón, por ejemplo, sales de citrato o fosfato, tales como sales de sodio. Tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina; o un tampón citrato. Los tampones normalmente se incluirán en el intervalo 5-20 mM.

El tensioactivo es preferentemente biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Los tensioactivos pueden clasificarse por su 'HLB' (balance hidrófilo/lipófilo), en el que un HLB en el intervalo 1-10 generalmente significa que el tensioactivo es más soluble en aceite que en agua, y un HLB en el intervalo 10-20 es más soluble en agua que en aceite. Las emulsiones comprenden preferentemente al menos un tensioactivo que tiene un HLB de al menos 10, por ejemplo, al menos 15, o preferentemente al menos 16.

La invención puede usarse con tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los ésteres de polioxietileno de tensioactivos de sorbitano (comúnmente denominados los Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP) y/u óxido de butileno (OB), comercializados bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros de bloques de OE/OP lineales; octoxinolos, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) de repetición, siendo octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes láuricos, cetílicos, estearílicos y oleicos (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter de monolaurilo de trietilenglicol (Brij 30); éter de polioxietileno-9-laurilo; y ésteres de sorbitano (comúnmente conocidos como SPAN), tales como trioleato de sorbitano (Span 85) y monooleato de sorbitano. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son polisorbato 80 (Tween 80; monooleato de polioxietilensorbitano), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Triton X-100.

Pueden incluirse mezclas de tensioactivos en la emulsión, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85, o mezclas de Tween 80/Triton-X100. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietilensorbitano tal como monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende lauril éter-9 más un éster de polioxietilensorbitano y/o un octoxinol. Mezclas útiles pueden comprender un tensioactivo con un valor de HLB en el intervalo de 10-20 (por ejemplo, Tween 80, con un HLB de 15,0) y un tensioactivo con un valor de HLB en el intervalo de 1-10 (por ejemplo, Span 85, con un HLB de 1,8).

Cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietilensorbitano (tales como Tween 80) 0,01 al 2 %; octil- o nonilfenoxipolietoxietanoles (tales como Triton X-100, u otros detergentes de la serie Triton) 0,001 al 0,1 %; éteres de polioxietileno (tales como lauril éter-9) 0,1 al 20 %.

Se prefieren emulsiones de aceite en agua que contienen escualeno que contienen tensioactivo de polisorbato 80.

La emulsión de aceite en agua puede fabricarse usando un procedimiento que comprende las etapas de: (i) preparación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño de gotita de aceite promedio, también conocida

como una emulsión preliminar o una pre-emulsión; (ii) microfluidización de la primera emulsión para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño de gotita de aceite promedio que es menos del primer tamaño de gotita de aceite promedio; y (iii) filtración de la segunda emulsión. La primera emulsión puede prepararse mediante homogenización.

Las gotitas de aceite en la emulsión tienen generalmente menos de 5 µm de diámetro, y pueden incluso tener diámetro submicrométrico, consiguiéndose estos pequeños tamaños convenientemente con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotitas con un tamaño inferior a 220 nm, ya que pueden someterse a esterilización por filtración.

Adyuvantes específicos para emulsiones de aceite en agua que pueden prepararse usando escualeno preparado según la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 (Tween 80) y trioleato de sorbitano (Span 85). La composición de la emulsión en volumen puede ser aproximadamente 5 % de escualeno, aproximadamente 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas relaciones son 4,3 % de escualeno, 0,5 % de polisorbato 80 y 0,48 % de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [4-6], como se describe en más detalle en el Capítulo 10 de la ref. 7 y el Capítulo 12 de la ref. 8. La emulsión de MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón citrato de sodio 10 mM.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol (idealmente DL- α -tocoferol) y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener (en peso) del 2 al 10 % de escualeno, del 2 al 10 % de tocoferol y del 0,3 al 3 % de polisorbato 80, por ejemplo, 4,3 % de escualeno, 4,7 % de tocoferol y 1,9 % de polisorbato 80. La relación de peso de escualeno:tocoferol es preferentemente ≤ 1 (por ejemplo, 0,90), ya que éste puede proporcionar una emulsión más estable. El escualeno y el polisorbato 80 pueden estar presentes a una relación de volumen de aproximadamente 5:2 o a una relación de peso de aproximadamente 11:5. Una emulsión tal puede prepararse disolviendo polisorbato 80 en PBS dando una disolución al 2 %, luego mezclando 90 ml de esta disolución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), luego microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante tiene gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente aproximadamente 180 nm. La emulsión también puede incluir un monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3d-MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender, por dosis humana, 0,5-10 mg de escualeno, 0,5-11 mg de tocoferol y 0,1-4 mg de polisorbato 80 [9].

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL. La emulsión puede contener un tampón fosfato.

- Una emulsión que comprende escualeno, un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una relación másica de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 µg/ml de polisorbato 80, 110 µg/ml de Triton X-100 y 100 µg/ml de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL. La emulsión también puede incluir una saponina, tal como QS21. La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.

- Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de éter alquílico de polioxietileno (por ejemplo, éter cetosteárico de polioxietileno (12)) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitano o éter de manida, tal como monooleato de sorbitano o 'Span 80'). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos el 90 % de gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [10]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglucósido. La emulsión puede incluir un agonista de TLR4 [11]. Tales emulsiones pueden liofilizarse.

- Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil-Care [12]. La concentración final (peso) de estos componentes en vacunas adyuvantadas son del 5 % de escualeno, 4 % de poloxámero 105 (poliol plurónico) y 2 % de Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; triglicérido caprílico/cáprico).

Las composiciones de estas emulsiones, expresadas anteriormente en términos de porcentaje, pueden modificarse por dilución o concentración (por ejemplo, por un número entero tal como 2 ó 3 o por una fracción tal como 2/3 ó 3/4), en las que sus relaciones permanecen iguales. Por ejemplo, un MF59 2 veces concentrado tendría aproximadamente 10 % de escualeno, aproximadamente 1 % de polisorbato 80 y aproximadamente 1 % de trioleato de sorbitano. Las formas concentradas pueden diluirse (por ejemplo, con una disolución de antígeno) dando una concentración final deseada de emulsión.

Las emulsiones de la invención se guardan idealmente a entre 2 °C y 8 °C. No deben congelarse. Deben mantenerse idealmente alejadas de la luz directa. En particular, las emulsiones y vacunas que contienen escualeno de la invención deben protegerse para evitar la degradación fotoquímica del escualeno. Si las emulsiones de la

invención se almacenan, entonces esto es preferentemente en una atmósfera inerte, por ejemplo, N₂ o argón.

Vacunas

5 Aunque es posible administrar adyuvantes para emulsiones de aceite en agua por sí mismas a pacientes (por ejemplo, para proporcionar un efecto adyuvante para un antígeno que se ha administrado por separado al paciente), es más usual mezclar el adyuvante con un antígeno antes de la administración, para formar una composición inmunogénica, por ejemplo, una vacuna. La mezcla de emulsión y antígeno puede tener lugar extemporáneamente, en el momento de uso, o puede tener lugar durante la fabricación de la vacuna, antes de envasarla. Los procedimientos de la invención pueden aplicarse en ambas situaciones.

10 Así, un procedimiento de la invención puede incluir otra etapa de procedimiento de mezcla de una emulsión que comprende escualeno preparada según la presente invención con un componente de antígeno. Como alternativa, puede incluir otra etapa de envasado del adyuvante en un kit como un componente de kit junto con un componente de antígeno.

15 En general, por tanto, la invención puede usarse cuando se preparan vacunas mixtas o cuando se preparan kits que incluyen antígeno y adyuvante listos para mezclar. Si la mezcla tiene lugar durante la fabricación, entonces los volúmenes de antígeno y emulsión a granel que se mezclan normalmente serán superiores a 1 litro, por ejemplo, ≥5 litros, ≥10 litros, ≥20 litros, ≥50 litros, etc. Si la mezcla tiene lugar en el momento de uso, entonces los volúmenes que se mezclan normalmente serán inferiores a 1 mililitro, por ejemplo, ≤0,6 ml, ≤0,5 ml, ≤0,4 ml, ≤0,3ml, ≤0,2 ml, etc. En ambos casos es usual mezclar volúmenes sustancialmente iguales de disolución de emulsión y antígeno, es decir, sustancialmente 1:1 (por ejemplo, entre 1,1:1 y 1:1,1, preferentemente entre 1,05:1 y 1:1,05, y más preferentemente entre 1,025:1 y 1:1,025). En algunas realizaciones, sin embargo, puede usarse un exceso de emulsión o un exceso de antígeno [13]. Si se usa un volumen en exceso de un componente, el exceso será generalmente de al menos 1,5:1, por ejemplo, ≥2:1, ≥2,5:1, ≥3:1, ≥4:1, ≥5:1, etc.

20 Si el antígeno y el adyuvante se presentan como componentes separados dentro de un kit, están físicamente separados entre sí dentro del kit, y esta separación puede lograrse de diversas formas. Por ejemplo, los componentes pueden estar en recipientes separados, tales como viales. El contenido de dos viales puede entonces mezclarse cuando se necesite, por ejemplo, sacando el contenido de un vial y añadiéndolo al otro vial, o sacando por separado el contenido de ambos viales y mezclándolos en un tercer recipiente.

25 En otra disposición, uno de los componentes del kit está en una jeringuilla y el otro está en un recipiente tal como un vial. La jeringuilla puede usarse (por ejemplo, con una aguja) para insertar su contenido en el vial para la mezcla, y la mezcla puede entonces sacarse en la jeringuilla. Los contenidos mezclados de la jeringuilla pueden entonces administrarse a un paciente, normalmente mediante una nueva aguja estéril. El envasar un componente en una jeringuilla elimina la necesidad de usar una jeringuilla separada para la administración al paciente.

30 En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se mantienen juntos, pero por separado en la misma jeringuilla, por ejemplo, una jeringuilla de doble cámara, tal como la desvelada en las referencias 14-21, etc. Cuando la jeringuilla se acciona (por ejemplo, durante la administración a un paciente), entonces el contenido de las dos cámaras se mezclan. Este disposición evita la necesidad de una etapa de mezcla separada en el momento de uso.

35 Los contenidos de los diversos componentes del kit estarán generalmente todos en forma líquida. En algunas disposiciones, un componente (normalmente el componente de antígeno en vez del componente de emulsión) está en forma seca (por ejemplo, en una forma liofilizada), estando el otro componente en forma líquida. Los dos componentes pueden mezclarse con el fin de reactivar el componente seco y dar una composición líquida para administración a un paciente. Un componente liofilizado normalmente se localizará dentro de un vial en vez de una jeringuilla. Los componentes secados pueden incluir estabilizadores tales como lactosa, sacarosa o manitol, además de mezclas de los mismos, por ejemplo, mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol, etc. Una posible disposición usa un componente de emulsión líquido en una jeringuilla precargada y un componente de antígeno liofilizado en un vial.

40 Si las vacunas contienen componentes, además de emulsión y antígeno, entonces estos componentes pueden incluirse adicionalmente en uno de estos dos componentes del kit, o pueden ser parte de un tercer componente del kit.

45 Recipientes adecuados para vacunas mezcladas de la invención, o para componentes del kit individuales, incluyen viales y jeringuillas desechables. Estos recipientes deben ser estériles.

50 Si una composición/componente se localiza en un vial, el vial está preferentemente hecho de un material de vidrio o plástico. El vial se esteriliza preferentemente antes de añadir la composición. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales se sellan preferentemente con un tapón sin látex, y se prefiere la ausencia de látex en todo el material de envasado. En una realización, un vial tiene un tapón de caucho butílico. El vial puede incluir una dosis única de vacuna/componente, o puede incluir más de una dosis (un vial 'multidosis'), por ejemplo, 10 dosis. En

una realización, un vial incluye 10 dosis x 0,25 ml de emulsión. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

Un vial puede tener un tapa (por ejemplo, un cierre roscado de ajuste hermético) adaptado de forma que una jeringuilla precargada pueda insertarse en la tapa, el contenido de la jeringuilla pueda descargarse en el vial (por ejemplo, para reconstituir material liofilizado en su interior) y el contenido del vial pueda sacarse en la jeringuilla. Después de sacar la jeringuilla del vial, una aguja pueden entonces unirse y la composición puede administrarse a un paciente. La tapa está preferentemente localizada dentro de un sello o cubierta, de forma que el sello o cubierta tenga que quitarse antes de poder acceder a la tapa.

Si una composición/componente está envasada en una jeringuilla, la jeringuilla normalmente no tendrá una aguja unida a ella, aunque puede suministrarse una aguja separada con la jeringuilla para el ensamblaje y uso. Se prefieren agujas de seguridad. Son típicas agujas de 1 pulgada 23 de calibre, 1 pulgada 25 de calibre y 5/8 de pulgada 25 de calibre. Las jeringuillas pueden proveerse de etiquetas desprendibles en las que pueden estar impresas el número de lote, estación de la gripe y fecha de caducidad del contenido para facilitar el mantenimiento del registro. El émbolo de la jeringuilla tiene preferentemente un tapón para prevenir que el émbolo se quite accidentalmente durante la aspiración. Las jeringuillas pueden tener un tapa de goma de látex y/o émbolo. Las jeringuillas desechables contienen una dosis única de vacuna. La jeringuilla tendrá generalmente un protector para sellar la punta antes de la unión de una aguja, y el protector está hecho preferentemente de un caucho butílico. Si la jeringuilla y la aguja están envasadas por separado, entonces la aguja se ajusta preferentemente con un protector de goma butílica.

La emulsión puede diluirse con un tampón antes de envasarla en un vial o una jeringuilla. Tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina; o un tampón citrato. La dilución puede reducir la concentración de componentes del adyuvante mientras que se retienen sus proporciones relativas, por ejemplo, para proporcionar un adyuvante "diluido al 50 %".

Los recipientes pueden marcarse para mostrar un volumen de media dosis, por ejemplo, para facilitar la administración a niños. Por ejemplo, una jeringuilla que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestra un volumen de 0,25 ml.

Cuando se usa un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringuilla o un vial), entonces se prefiere usar un recipiente hecho de un vidrio de borosilicato en vez de un vidrio de cal sodada.

Pueden usarse diversos antígenos con emulsiones de aceite en agua, que incluyen, pero no se limitan a: antígenos virales tales como proteínas de la superficie viral; antígenos bacterianos tales como antígenos de proteína y/o sacárido; antígenos fúngicos; antígenos parasíticos; y antígenos de tumor. La invención es particularmente útil para vacunas contra el virus de la gripe, VIH, anquilostoma, virus de la hepatitis B, virus del herpes simple, rabia, virus respiratorio sincitial, citomegalovirus, *Staphylococcus aureus*, clamidia, coronavirus de SARS, virus de la varicela zóster, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, virus de Epstein Barr, virus del papiloma humano, etc. Por ejemplo:

- Antígenos del virus de la gripe. Éstos pueden tomar la forma de un virus vivo o un virus inactivado. Si se usa un virus inactivado, la vacuna puede comprender virión completo, virión fraccionado o antígenos de superficie purificados (incluyendo hemaglutinina y, normalmente, incluyendo también neuraminidasa). Los antígenos de la gripe también pueden presentarse en forma de virosomas. Los antígenos pueden tener cualquier subtipo de hemaglutinina, seleccionada de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16. La vacuna puede incluir antígeno(s) de una o más cepas del virus de la gripe (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más), que incluyen virus de la gripe A y/o virus de la gripe B, por ejemplo, una vacuna para A/H5N1 o A/H1N1 monovalente, o una vacuna para A/H1N1 + A/H3N2 + B trivalente. Los virus de la gripe pueden ser una cepa reagrupada, y pueden haber sido obtenidos por técnicas de genética inversa [por ejemplo, 22-26]. Así, el virus puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/PR/8/34 (normalmente 6 segmentos de A/PR/8/34, siendo los segmentos HA y N de una cepa de vacuna, es decir, un reagrupamiento 6:2). Los virus usados como fuente de los antígenos pueden cultivarse tanto en huevos (por ejemplo, huevos de gallina embrionados) como en cultivo celular. Si se usa cultivo celular, el sustrato celular normalmente será una línea celular de mamífero, tal como MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc. Las líneas celulares de mamífero preferidas para el cultivo del virus de la gripe incluyen: células MDCK [27-30], derivadas de riñón canino de Madin Darby; células Vero [31-33], derivadas de riñón de mono verde africano; o células PER.C6 [34], derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. Si el virus se ha cultivado en una línea celular de mamífero, entonces la composición estará ventajosamente libre de proteínas del huevo (por ejemplo, albúmina de huevo y ovomucoide) y de ADN de pollo, reduciendo así la alergenicidad. Las dosis unitarias de vacuna se normalizan normalmente por referencia al contenido de hemaglutinina (HA), normalmente medido por SRID. Las vacunas existentes normalmente contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque pueden usarse menores dosis, particularmente si se usa un adyuvante. Se han usado dosis fraccionarias tales como 1/2 (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), 1/4 y 1/8 [35, 36], ya que tienen mayor dosis (por ejemplo, 3x o 9x dosis [37, 38]). Así, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de la gripe, preferentemente entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo, 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5 µg, 0,5-5 µg, etc. Dosis particulares incluyen, por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8,

aproximadamente 3,75, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc., por cepa.

• Virus de la inmunodeficiencia humana, que incluye VIH-1 y VIH-2. El antígeno normalmente será un antígeno de la envuelta.

5

• Antígenos de superficie del virus de la hepatitis B. Este antígeno se obtiene preferentemente mediante procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, después de la expresión en una levadura de *Saccharomyces cerevisiae*. A diferencia de HBsAg viral nativo, el antígeno expresado en levadura recombinante no está glucosilado. Puede estar en forma de partículas sustancialmente esféricas (diámetro promedio de aproximadamente 20 nm), que incluye una matriz lipídica que comprende fosfolípidos. A diferencia de las partículas de HBsAg nativas, las partículas expresadas en levadura pueden incluir fosfatidilinositol. El HBsAg puede ser de cualquiera de los subtipos ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- y adrq+.

10

• Anquilostoma, particularmente como se observa en caninos (*Ancylostoma caninum*). Este antígeno puede ser Ac-MTP-1 recombinante (metaloproteasa similar a astacina) y/o una hemoglobinasa aspártica (Ac-APR-1), que puede expresarse en un sistema de baculovirus/células de insecto como una proteína secretada [39, 40].

15

• Antígenos del virus del herpes simple (VHS). Un antígeno del VHS preferido para su uso con la invención es gD de glucoproteína de membrana. Se prefiere usar gD de una cepa de VHS-2 (antígeno 'gD2'). La composición puede usar una forma de gD en la que la región de ancla de la membrana del extremo C se ha deletado [41], por ejemplo, un gD truncado que comprende los aminoácidos 1-306 de la proteína natural con la adición de asparagina y glutamina en el extremo C. Esta forma de la proteína incluye el péptido señal que se escinde dando una proteína de 283 aminoácidos madura. La delección del anclaje permite preparar la proteína en forma soluble.

20

• Antígenos del virus del papiloma humano (VPH). Los antígenos del VPH preferidos para su uso con la invención son proteínas de la cápside L1, que pueden ensamblarse para formar estructuras conocidas como partículas similares a virus (VLP). Las VLP pueden producirse por expresión recombinante de L1 en células de levadura (por ejemplo, en *S. cerevisiae*) o en células de insecto (por ejemplo, en células de *Spodoptera*, tales como *S. frugiperda*, o en células de *Drosophila*). Para células de levadura, los vectores de plásmido pueden llevar el (los) gen(es) L1; para células de insecto, los vectores de baculovirus pueden llevar el (los) gen(es) L1. Más preferentemente, la composición incluye VLP de L1 de tanto cepas de VPH-16 como de VPH-18. Se ha mostrado que 3ta combinación bivalente es altamente eficaz [42]. Además de cepas de VPH-16 y VPH-18, también es posible incluir VLP de L1 de cepas de VPH-6 y VPH-11. También es posible el uso de cepas de VPH oncogénicas. Una vacuna puede incluir entre 20-60 µg/ml (por ejemplo, aproximadamente 40 µg/ml) de L1 por cepa de VPH.

25

30

35

• Antígeno del carbunco. El carbunco se produce por *Bacillus anthracis*. Antígenos de *B. anthracis* adecuados incluyen componentes A (factor letal (LF) y factor de edema (EF)), ambos de los cuales pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (PA). Los antígenos pueden desintoxicarse opcionalmente. Pueden encontrarse más detalles en las referencias [43 a 45].

40

• Antígenos de *S. aureus*. Se conoce una variedad de antígenos de *S. aureus*. Antígenos adecuados incluyen sacáridos capsulares (por ejemplo, de una cepa de tipo 5 y/o tipo 8) y proteínas (por ejemplo, IsdB, Hla, etc.). Los antígenos de sacárido capsular están idealmente conjugados con una proteína transportadora.

45

• Antígenos de *S. pneumoniae*. Se conoce una variedad de antígenos de *S. pneumoniae*. Antígenos adecuados incluyen sacáridos capsulares (por ejemplo, de uno o más de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y/o 23F) y proteínas (por ejemplo, neumolisina, neumolisina desintoxicada, proteína D de la tríada de polihistidina (PhtD), etc.). Los antígenos de sacáridos capsular se conjugan idealmente con una proteína transportadora.

50

• Antígenos del cáncer. Se conocen una variedad de antígenos específicos de tumor. La invención puede usarse con antígenos que provocan una respuesta inmunoterapéutica contra el cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, etc.

55

Una disolución del antígeno se mezclará normalmente con la emulsión que contiene escualeno, por ejemplo, en una relación de volumen 1:1. Esta mezcla puede tanto realizarse por un fabricante de vacunas, antes de envasarlas, como puede realizarse en el momento de uso, por un trabajador sanitario.

Composiciones farmacéuticas

60 Las composiciones preparadas usando los procedimientos de la invención son farmacéuticamente aceptables.

Pueden incluir componentes, además de la emulsión que contiene escualeno, y el antígeno opcional.

La composición puede incluir un conservante tal como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que la vacuna deba estar sustancialmente libre de material mercurial (es decir, menos de 5 µg/ml), por ejemplo, libre de tiomersal [46, 47]. Son más preferidas las vacunas y componentes que no contienen mercurio.

5 El pH de una composición será generalmente entre 5,0 y 8,1, y más normalmente entre 6,0 y 8,0, por ejemplo, entre 6,5 y 7,5. Un procedimiento de la invención puede, por tanto, incluir una etapa de ajuste del pH de la vacuna antes del envasado.

10 La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirógena, por ejemplo, que contiene <1 UE (unidad de endotoxina, una medida convencional) por dosis, y preferentemente <0,1 UE por dosis. La composición está preferentemente libre de gluten.

15 La composición puede incluir material para una única inmunización, o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit 'multidosis'). La inclusión de un conservante se prefiere en disposiciones multidosis.

Las vacunas se administran normalmente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque puede administrarse la mitad de dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml) a niños.

Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna

20 También se describen kits y composiciones preparadas usando los procedimientos de la invención. Las composiciones preparadas según los procedimientos de la invención son adecuadas para administración a pacientes humanos, también se describe un procedimiento de elevar una respuesta inmunitaria en un paciente, que comprende la etapa de administrar una composición tal al paciente.

25 La invención también proporciona estos kits y composiciones para su uso como medicamentos.

30 También se describe el uso de: (i) una preparación acuosa de un antígeno; y (ii) una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno preparado según la invención, en la fabricación de un medicamento para elevar una respuesta inmunitaria en un paciente.

La respuesta inmunitaria elevada por estos procedimientos y usos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta protectora de anticuerpos.

35 Las composiciones pueden administrarse de diversas formas. La vía de inmunización más preferida es por inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o pierna), pero otras vías disponibles incluyen inyección subcutánea, intranasal [i-iii], oral [iv], intradérmica [v, vi], transcutánea, transdérmica [vii], etc.

40 Las vacunas preparadas según la invención pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. El paciente puede tener menos de 1 año de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad o 55 años de edad. El paciente puede ser anciano (por ejemplo, ≥50 años de edad, preferentemente ≥65 años), jóvenes (por ejemplo, <5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, servicio armado y personal militar, mujeres embarazadas, los pacientes inmunodeficientes crónicamente enfermos y personas que viajan al extranjero. Sin embargo, las vacunas no son únicamente adecuadas para estos grupos, y pueden usarse más generalmente en una población.

45 Las vacunas de la invención pueden administrarse a pacientes en sustancialmente el mismo momento que (por ejemplo, durante la misma consulta o visita médica a un profesional sanitario) otras vacunas.

General

50 El término "que comprende" engloba "que incluye" además de "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

55 El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Si es necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

60 A menos que se establezca específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Por tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Si hay tres componentes, entonces dos componentes pueden combinarse entre sí, y luego la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

65 Las diversas etapas de los procedimientos pueden llevarse a cabo en el mismo momento o en momentos diferentes,

en la misma localización geográfica o localizaciones geográficas diferentes, por ejemplo, países, y por la misma persona o entidades diferentes.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

5

Ejemplo 1

La Figura 1 muestra un esquema de un aparato de destilación que puede usarse para la etapas de destilación de purificación y/o desnaturalizante del procedimiento de la presente invención. El procedimiento descrito con referencia a la Figura 1 puede llevarse a cabo sin la adición de ningún disolvente a la composición que comprende escualeno. En la realización mostrada en la Figura 1, la composición que comprende escualeno se coloca en un recipiente de alimentación (1) cubierto con nitrógeno. Un extremo de una línea de entrada (3) tiene un prefiltro de polipropileno y se coloca en el recipiente de alimentación, mientras que el otro extremo de la línea de entrada tiene una aguja de acero inoxidable (calibre 19) que se inserta en la parte superior de un aparato de destilación (5). El aparato de destilación comprende una cámara (7) formada como un tubo con un "dedo caliente" cilíndrico (9) que sobresale por el centro. Se calienta benzoato de etilo, que tiene un punto de ebullición de 212 °C, por debajo del dedo para proporcionar calor a la pared del dedo caliente. Aunque el benzoato de etilo se usa en esta realización, es evidente que un disolvente que tiene un mayor punto de ebullición podría usarse para aumentar la temperatura del dedo caliente. Durante la destilación, el aparato de destilación puede evacuarse. La composición que comprende escualeno puede entrarse en el aparato de destilación, por ejemplo, mediante el uso de una menor presión dentro del aparato de destilación, a través de la aguja de acero inoxidable y añadirse gota a gota (11) sobre la pared calentada del dedo caliente. A medida que se calienta la composición que comprende escualeno, aquellos componentes cuyo punto de ebullición está por debajo de 212 °C a la presión dentro del aparato de destilación se volatilizarán. Con el fin de volatilizar el escualeno usando el sistema de la Figura 1, la presión dentro del aparato de destilación debe seleccionarse para reducir el punto de ebullición del escualeno a 212 °C o menos (por ejemplo, aproximadamente 1,5 mm de Hg o menos). Los componentes volatilizados se condensarán sobre la pared externa de la cámara (7), que se enfriará por el aire ambiente, y recorrerán las paredes a un matraz de recogida (13), que también puede estar a vacío. Los componentes no volátiles, por ejemplo, proteínas, quedan sobre la pared del dedo caliente y fluyen en el matraz de residuos (15). Los componentes extremadamente volátiles pueden extraerse a través de la línea de vacío, reduciendo sus niveles en el condensado de escualeno.

El escualeno que ya se ha sometido a destilación de purificación se destiló usando este aparato. Independientemente de la fuente, el escualeno final tuvo regularmente una pureza de $\geq 99,9\%$, un valor de ácido de $< 0,03$ mg de KOH/g y un valor de saponificación < 2 mg/g. La destilación desnaturalizante redujo el contenido de humedad del escualeno, por ejemplo, del 0,022 % al 0,010 %, del 0,006 al 0,005 %, o del 0,010 % al 0,006 %.

35

Ejemplo 2 - Medición del valor de saponificación.

El valor de saponificación es el número de mg de hidróxido potásico requeridos para neutralizar los ácidos libres y saponificar los ésteres contenidos en 1,0 g de la sustancia.

40

Procedimiento (USP <401>): disponer 1,5 g a 2 g de la sustancia en un matraz de 250 ml tarado, pesar con exactitud y añadirlo a 25,0 ml de un hidróxido potásico alcohólico 0,5 N. Calentar el matraz sobre un baño de vapor, bajo un condensador adecuado para mantener el reflujo durante 30 minutos, frecuentemente rotando el contenido. Entonces añadir 1 ml de fenolftaleína TS, y valorar el exceso de hidróxido potásico con ácido clorhídrico VS 0,5 N. Realizar una determinación del blanco bajo las mismas condiciones. La diferencia entre los volúmenes, en ml, de ácido clorhídrico 0,5 N consumido en la prueba actual y en la prueba del blanco, multiplicada por 56,1 y la normalidad exacta del ácido clorhídrico VS 0,5 N, y dividida entre el peso en g de la muestra tomada, es el valor de saponificación.

45

Dependiendo de la fuente de escualeno podría obtenerse un valor de saponificación de $< 1,4$ mg/g.

50

Ejemplo 3 - Medición del valor ácido.

La acidez de grasas y aceites no volátiles puede expresarse como el número de ml de álcali 0,1 N requerido para neutralizar los ácidos libres en 10,0 g de sustancia. El valor de ácido es el número de mg de álcali requeridos para neutralizar los ácidos libres en 1,0 g de la sustancia.

55

Procedimiento (USP <401>): disolver aproximadamente 10,0 g de la sustancia, pesada con exactitud, en 50 ml de una mezcla de volumen igual de alcohol y éter (que se había neutralizado a fenolftaleína con hidróxido sódico 0,1 N) contenida en un matraz. Si el espécimen de prueba no se disuelve en el disolvente frío, conectar el matraz con un condensador adecuado y calentar lentamente, con agitación frecuente, hasta que se disuelva el espécimen. Añadir 1 ml de fenolftaleína TS y valorar con hidróxido sódico VS 0,1 N hasta que la disolución siga débilmente rosa después de agitar durante 30 segundos. Calcular cualquier valor de ácido. Si el volumen de álcali VS 0,1 N requerido para la valoración es menos de 2 ml, puede usarse un valorante más diluido, o el tamaño de muestra puede ajustarse por consiguiente. Los resultados pueden expresarse en términos del volumen de valorante o en términos del volumen

60

65

equivalente de hidróxido sódico 0,1 N.

Dependiendo de la fuente de escualeno podría obtenerse un valor de ácido de 0,03 mg de KOH/g.

5 **Ejemplo 4 - Estudios de enriquecimiento**

Se llevaron a cabo varios estudios de enriquecimiento para demostrar la eficacia de la destilación desnaturalizante.

10 Para determinar los niveles de impureza eliminada por la destilación desnaturalizante, una composición de escualeno se enriqueció con cantidades especificadas de contaminantes (por ejemplo, agua), además de posibles productos de descomposición del escualeno (por ejemplo, formaldehído, acetaldehído y acetona). Las disoluciones enriquecidas se sometieron a una destilación desnaturalizante según la presente invención y se analizaron para las sustancias enriquecidas.

15 4 kg de una composición de escualeno se enriquecieron, por ejemplo, con 0,3 ml (0,2 g) de acetaldehído (>99,5 % pureza), 0,3 ml (0,2 g) de acetona (>99,9 % pureza), 0,55 ml de disolución acuosa al 37 % en peso de formaldehído (0,2 g) y 3,65 g de agua antes de una destilación desnaturalizante como se describe en el Ejemplo 1. El destilado se recogió en tres fracciones y se analizó para las especies enriquecidas junto al material de partida enriquecido. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1

Test/Método	Incremento de materia de partida	Desnaturalización de las fracciones destiladas			Residuo
		Primera fracción	Segunda Fracción	Tercera Fracción	Residuo no volátil
Contenido de Humedad %	0.02	0.03	0.02	0.02	N/A
Acetona (mg/Kg o ppm)	50.9	5.0	5.7	1.1	N/A
Acetaldehído (mg/kg o ppm)	12.4	0.9	1.9	0.9	N/A
Formaldehído (mg/kg o ppm)	2.2	0.7	0.9	No detectado	N/A

Los resultados en la Tabla 1 muestran que las concentraciones de acetona, acetaldehído y formaldehído disminuyeron todas tras la destilación desnaturalizante.

45 Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solo y pueden hacerse modificaciones, mientras que sigan dentro del alcance y espíritu de la invención.

ASPECTOS DE LA INVENCION

50 Aspecto 1. Un procedimiento de preparación de escualeno a partir de una composición que comprende escualeno a partir de una fuente animal, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de (a) una destilación para purificación llevada a cabo a una temperatura T_1 , (b) una destilación desnaturalizante llevada a cabo a una temperatura T_2 ; en el que las etapas (a) y (b) pueden realizarse en cualquier orden; T_1 y T_2 son suficientes para hacer que hierva el escualeno; $T_2 > T_1$; y $T_2 \geq 200$ °C.

55 Aspecto 2. Un procedimiento de preparación de escualeno a partir de una composición que comprende escualeno, que comprende las etapas de (a) una destilación para purificación llevada a cabo a una temperatura T_1 , (b) una destilación desnaturalizante llevada a cabo a una temperatura T_2 ; en el que las etapas (a) y (b) pueden realizarse en cualquier orden; T_1 y T_2 son suficientes para hacer que hierva el escualeno; $T_1 < 140$ °C y $T_2 \geq 200$ °C.

60 Aspecto 3. El procedimiento del aspecto 1 o el aspecto 2, en el que la composición comprende una o más proteínas.

Aspecto 4. El procedimiento del aspecto 3, en el que la composición comprende parvalbúmina.

65 Aspecto 5. El procedimiento de uno cualquiera de los aspectos 1-4, en el que la destilación desnaturalizante se lleva a cabo a una presión de 0,5 mm de Hg a 5,0 mm de Hg.

- Aspecto 6. El procedimiento de uno cualquiera de los aspectos 1-5, en el que la destilación para purificación se lleva a cabo a una temperatura de 70 a 100 °C.
- 5 Aspecto 7. El procedimiento de uno cualquiera de los aspectos 1-6, en el que la destilación para purificación se lleva a cabo a una presión de 0,5 µm de Hg a 5 µm de Hg.
- Aspecto 8. El procedimiento de uno cualquiera de los aspectos 1-7, en el que la destilación para purificación se lleva a cabo antes de la destilación desnaturalizante.
- 10 Aspecto 9. El procedimiento de uno cualquiera de los aspectos 1-8, en el que la composición que comprende escualeno se somete a saponificación.
- Aspecto 10. El procedimiento del aspecto 9, en el que la saponificación comprende la adición de NaOH o KOH a la composición que comprende escualeno.
- 15 Aspecto 11. Un procedimiento para la re-destilación de una composición que comprende 99 % de escualeno o más, siendo dicha re-destilación una destilación desnaturalizante llevada a cabo a una temperatura T_2 ; en el que $T_2 \geq 200$ °C.
- 20 Aspecto 12. Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que comprende preparar una emulsión usando el escualeno preparado según uno cualquiera de los aspectos 1 a 11.
- Aspecto 13. Un procedimiento de preparación de una composición de vacuna, que comprende preparar una emulsión según el aspecto 12 y combinar la emulsión con un antígeno.
- 25 Aspecto 14. Un procedimiento de preparación de un kit de vacuna, que comprende preparar una emulsión según el aspecto 12 y envasar la emulsión en un kit como un componente de kit junto con un componente de antígeno.
- Aspecto 15. El procedimiento del aspecto 14, en el que los componentes del kit están en viales separados.
- 30 Aspecto 16. El procedimiento del aspecto 15, en el que los viales están hechos de vidrio de borosilicato.
- Aspecto 17. El procedimiento de uno cualquiera de los aspectos 13 a 16, en el que el antígeno es un antígeno del virus de la gripe.
- 35 Aspecto 18. El procedimiento del aspecto 17, en el que la combinación de la emulsión y el antígeno forma una composición de vacuna y en el que la composición de vacuna incluye aproximadamente 15 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 7,5 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 3,8 µg, aproximadamente 3,75 µg, aproximadamente 1,9 µg, o aproximadamente 1,5 µg de hemaglutinina por cepa del virus de la gripe.
- 40 Aspecto 19. El procedimiento del aspecto 17 o el aspecto 18, en el que la combinación de la emulsión y el antígeno forma una composición de vacuna y en el que la composición de vacuna incluye un conservante de tiomersal o de 2-fenoxietanol.
- 45 Aspecto 20. Escualeno preparado según el procedimiento de uno cualquiera de los aspectos 1 a 11.
- Aspecto 21. Una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno según el aspecto 20.
- Aspecto 22. Una vacuna que comprende escualeno según el aspecto 20.
- 50 Aspecto 23. Uso de escualeno según el aspecto 20 en un adyuvante y/o una vacuna.

REFERENCIAS

- 55 [1] Borucinska & Frasca (2002) J Fish Diseases 25:287-98.
 [2] Bertone y col. (1996) J Fish Diseases 19:429-34.
 [3] Briones y col. (1998) J Vet Med B 45:443-5.
 [4] WO90/14837.
 [5] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
- 60 [6] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
 [7] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 [8] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- 65 [9] WO2008/043774.
 [10] US-2007/0014805.

[11] US-2007/0191314.
 [12] Suli y col. (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.
 [13] WO2007/052155.
 [14] WO2005/089837.
 5 [15] US 6.692.468.
 [16] WO00/07647.
 [17] WO99/17820.
 [18] US 5.971.953.
 [19] US 4.060.082.
 10 [20] EP-A-0520618.
 [21] WO98/01174.
 [22] Hoffmann y col. (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.
 [23] Subbarao y col. (2003) *Virology* 305:192-200.
 [24] Liu y col. (2003) *Virology* 314:580-590.
 15 [25] Ozaki y col. (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.
 [26] Webby y col. (2004) *Lancet* 363:1099-1103.
 [27] WO97/37000.
 [28] Brands y col. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
 [29] Halperin y col. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
 20 [30] Tree y col. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
 [31] Kistner y col. (1998) *Vaccine* 16:960-8.
 [32] Kistner y col. (1999) *Dev Biol Stand* 98:110-110.
 [33] Bruhl y col. (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
 [34] Pau y col. (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
 25 [35] WO01/22992.
 [36] Hehme y col. (2004) *Virus Res.* 103(1-2):163-71.
 [37] Treanor y col. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.
 [38] Keitel y col. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.
 [39] Williamson y col. (2006) *Infection and Immunity* 74: 961-7.
 30 [40] Loukas y col. (2005) *PLoS Med* 2(10): e295.
 [41] EP-A-0139417.
 [42] Harper y col. (2004) *Lancet* 364(9447):1757-65.
 [43] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.
 [44] Demicheli y col. (1998) *Vaccine* 16:880-884.
 35 [45] Stepanov y col. (1996) *J Biotechnol* 44:155-160.
 [46] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.
 [47] WO02/097072.
 [48] Greenbaum y col. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
 [49] Zurbriggen y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
 40 [50] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.
 [51] Mann y col. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
 [52] Halperin y col. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
 [53] Herbert y col. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
 45 [54] Chen y col. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la fabricación de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una emulsión de aceite en agua, que comprende:
- 10 (i) preparar escualeno a partir de una composición que comprende escualeno de una fuente animal mediante un procedimiento que comprende las etapas de: (a) una destilación de purificación llevada a cabo a una temperatura T_1 ; y (b) una destilación desnaturalizante llevada a cabo a una temperatura T_2 ; en el que las etapas (a) y (b) pueden realizarse en cualquier orden; T_1 y T_2 son suficientes para hacer que hierva el escualeno; $T_2 > T_1$; $T_2 \geq 200$ °C; y $T_2 - T_1$ es desde 50°C a 200°C.
- (ii) preparar una emulsión usando el escualeno preparado en la etapa (i).
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el escualeno preparado en la etapa (i) se mantiene estéril tras el tratamiento de destilación y antes de la preparación de la emulsión en la etapa (ii).
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la composición usada en la etapa (i) comprende una o más proteínas.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la composición comprende parvalbúmina.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la destilación desnaturalizante se lleva a cabo a una presión de 0,5 mm de Hg (66,7 Pa) a 5,0 mm de Hg (666,6 Pa).
- 25 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la destilación de purificación se lleva a cabo a una temperatura de 70 a 100 °C.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la destilación de purificación se lleva a cabo a una presión de 0,5 μ m de Hg (66,7 mPa) a 5 μ m de Hg (666,6 mPa).
- 30 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la destilación de purificación se lleva a cabo antes de la destilación desnaturalizante.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición usada en la etapa (i) se somete a saponificación.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la saponificación comprende la adición de NaOH o KOH a la composición que comprende escualeno.
- 40 11. Un procedimiento para preparar un kit de vacuna, que comprende preparar una emulsión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y envasar la emulsión en un kit como un componente de kit junto con un componente de antígeno.

45

50

55

FIGURA 1

