

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 886 567**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/10** (2007.01)  
**A61K 47/12** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2007.01)  
**A61K 9/107** (2006.01)  
**A61K 47/44** (2007.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2016 PCT/GB2016/050952**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16170302**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2016 E 16715601 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.06.2021 EP 3285802**

54 Título: **Emulsiones para formulaciones inyectables**

30 Prioridad:

**23.04.2015 GB 201506948**

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

**20.12.2021**

73 Titular/es:

**CRODA INTERNATIONAL PLC (100.0%)  
Cowick Hall Snaith  
Goole, East Yorkshire DN14 9AA, GB**

72 Inventor/es:

**ONDEI, ROBERTA y  
FERNANDES, EDNA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 886 567 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Emulsiones para formulaciones inyectables

La presente invención se refiere a emulsionantes para emulsiones de agua en aceite inyectables y, en particular, al uso de dichas emulsiones en formulaciones para vacunas veterinarias. La presente invención también incluye métodos para preparar dichas formulaciones.

Las emulsiones de agua en aceite (Ag/Ac) son sistemas de dos fases que consisten en una fase oleosa (fase continua) y una fase acuosa (fase discontinua). La fase acuosa se dispersa como pequeñas gotas en la fase oleosa y la emulsión contiene uno o más tensioactivos y emulsionantes. Las emulsiones de agua en aceite se aplican ampliamente en medicina, cosmética y la industria alimentaria y de bebidas. En medicina, las emulsiones de agua en aceite se utilizan generalmente en formulaciones farmacéuticas como vehículo para el suministro de agentes activos, especialmente en el caso de agentes activos insolubles en agua o sensibles al agua.

En las vacunaciones, las emulsiones de agua en aceite se usan comúnmente como un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria contra los antígenos diana derivados de uno o más agentes infecciosos. Estas emulsiones de agua en aceite se aplican generalmente por inyección. Para ser inyectable, una composición debe ser sustancialmente fluida. Sin embargo, estos tipos de emulsiones de agua en aceite son a menudo relativamente viscosas, lo que hace que su inyección sea problemática.

Una forma de intentar superar este problema es utilizar diferentes aceites en la emulsión seleccionados de aceites tanto minerales como no minerales (metabolizables). Sin embargo, aunque los adyuvantes basados en aceite generalmente aumentan la actividad inmunológica de las vacunas, en comparación con las vacunas no oleosas, pueden causar reacciones locales en el lugar de la inyección, especialmente cuando se utilizan aceites minerales.

Los aceites metabolizables, y en particular los aceites (semi)-sintéticos y vegetales, son viscosos a temperatura ambiente y su uso en emulsiones de Ag/Ac conduce a valores de viscosidad de la emulsión que son similares a los del aceite individual. Una reducción del contenido de aceite (y en consecuencia un aumento del contenido de agua) a menudo produce un aumento de la viscosidad de la emulsión hasta tal punto que la inyección ya no es posible. La reducción del contenido de aceite da como resultado un área interfacial aumentada y la cantidad de emulsionante será insuficiente y la emulsión se romperá. Además, los cambios en el contenido de aceite de una emulsión de Ag/Ac afectan a la estabilidad de la emulsión.

La publicación internacional WO 02/067899 describe emulsiones inyectables de agua en aceite. Esta comprende adyuvantes, para usar en la formulación de vacunas, que comprenden una emulsión de agua en aceite, donde dicha emulsión comprende un emulsionante polimérico que es un copolímero de bloques que tiene una fórmula general A-COO-B-OOC-A, en la que B es el resto divalente de un polialquilenglicol soluble en agua y A es el resto de un ácido monocarboxílico complejo soluble en aceite.

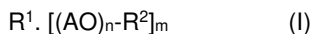
El documento US 2006/034937 describe composiciones farmacéuticas sólidas para el mejor suministro de principios activos farmacéuticos. El vehículo sólido incluye un sustrato y un recubrimiento de encapsulación sobre el sustrato para un mejor suministro de principios activos farmacéuticos hidrófilos o hidrófobos.

Strickley R G, "Solubilizing Excipients In Oral And Injectable Formulations", Pharmaceutical Research, Springer New York LLC, EE.UU., vol. 21, nº 2, 1 de febrero de 2004, páginas 201-230 describe una revisión de formulaciones en solución orales e inyectables. Las formulaciones comprenden disolventes orgánicos solubles en agua, tensioactivos no iónicos, lípidos insolubles en agua, líquidos orgánicos, ciclodextrinas y fosfolípidos.

Estas limitaciones dificultan la obtención de emulsiones de Ag/Ac estables y fluidas, especialmente cuando se basan en aceites metabolizables. Por tanto, existe la necesidad de encontrar otros métodos y/o medios para obtener emulsiones de Ag/Ac estables, que al mismo tiempo sean fluidas. La presente invención tiene como objetivo proporcionar emulsionantes y emulsiones de Ag/Ac estables con una vida en anaquel aceptable, que sean muy adecuadas para incluir en formulaciones para inyección y que tengan la viscosidad deseada.

Por lo tanto, existe la necesidad de emulsionantes para emulsiones de agua en aceite para usar en formulaciones de vacunas que sean capaces de proporcionar propiedades comparables o mejoradas en comparación con los emulsionantes existentes.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una formulación de vacuna que comprende una emulsión de agua en aceite y al menos un antígeno de vacuna para la fiebre aftosa o la enfermedad de Newcastle, aceite y agua, donde dicha emulsión comprende un emulsionante que es un poliol alcoxilado que opcionalmente está terminado en acilo, y en donde el emulsionante tiene una estructura general (I):



en donde

R<sup>1</sup> es el resto de un monosacárido de poliol seleccionado de glucosa, fructosa o sorbitol;

AO se selecciona de oxietileno y/u oxipropileno;

cada n representa independientemente un número entero en el intervalo de 3 a 20;

el total de los índices n (n x m) está en el intervalo de 25 a 70;

5 cada R<sup>2</sup> representa independientemente hidrógeno, o un grupo acilo representado por -C(O)R<sup>3</sup> en donde cada R<sup>3</sup> representa independientemente un resto de ácido polihidroxiálquilcarboxílico, ácido polihidroxiálquenilcarboxílico; y

en donde el ácido polihidroxiálquilcarboxílico y el ácido polihidroxiálquenilcarboxílico se forman a partir de ácidos hidroxiálquil e hidroxiálquenilcarboxílicos de fórmula HO-X-COOH donde X es un radical alifático saturado divalente que tiene de 11 a 17 átomos de carbono y en el que hay al menos 4 átomos de carbono directamente unidos entre los grupos hidroxilo y ácido carboxílico, y el número de unidades hidroxiálquilo e hidroxiálquenilo es en promedio entre 4 y 8;

10 en donde en promedio al menos dos grupos R<sup>2</sup> por molécula son grupos alcanilo como se definen.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para formar una formulación de vacuna que comprende mezclar entre sí:

(i) al menos un emulsionante según el primer aspecto;

(ii) al menos un antígeno de vacuna para la fiebre aftosa o la enfermedad de Newcastle;

15 (iii) aceite; y

(iv) agua.

Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un poliol alcoxilado que opcionalmente está terminado en acilo según el primer aspecto, como emulsionante en una emulsión de agua en aceite para formulaciones de vacunas.

20 Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una emulsión de agua en aceite que comprende emulsionante que es un poliol alcoxilado que opcionalmente está terminado en acilo según el primer aspecto, estando presente dicho emulsionante en la emulsión en el intervalo de 0,1% en peso a 10% en peso.

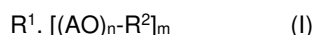
25 Según un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona una fase oleosa que comprende aceite y un emulsionante que es un poliol alcoxilado que opcionalmente está terminado en acilo según el primer aspecto, dicha fase oleosa adecuada para formar una emulsión según el cuarto aspecto y/o una formulación de vacuna según el primer aspecto.

30 Se ha encontrado que el uso de un poliol alcoxilado opcionalmente terminado en acilo como emulsionante para una emulsión de agua en aceite proporciona emulsiones particularmente adecuadas para formulaciones de vacunas inyectables. Los emulsionantes proporcionan emulsiones que pueden requerir menos emulsionante que los emulsionantes conocidos y continúan proporcionando emulsiones estables.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "por ejemplo", "es decir", "tal como" o "que incluye" se entiende que introducen ejemplos que aclaran aún más la materia más general. A menos que se especifique lo contrario, estos ejemplos se proporcionan únicamente como una ayuda para comprender las aplicaciones ilustradas en la presente descripción, y no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

35 Se entenderá que, al describir el número de átomos de carbono en un grupo sustituyente (por ejemplo, "alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>"), el número se refiere al número total de átomos de carbono presentes en el grupo sustituyente, incluido cualquiera presente en cualquier grupo de ramificación. Además, cuando se describe el número de átomos de carbono en, por ejemplo, ácidos grasos, este se refiere al número total de átomos de carbono, incluido el que está en el ácido carboxílico, y cualquiera presente en cualquier grupo de ramificación.

40 El emulsionante es un poliol alcoxilado que opcionalmente está terminado en acilo y tiene una estructura general (I):



en donde

R<sup>1</sup> es el resto de un monosacárido de poliol seleccionado de glucosa, fructosa o sorbitol;

AO se selecciona de oxietileno y/u oxipropileno;

45 cada n representa independientemente un número entero en el intervalo de 3 a 20;

el total de los índices n (n x m) está en el intervalo de 25 a 70;

cada  $R^2$  representa independientemente hidrógeno, o un grupo acilo representado por  $-C(O)R^3$  en donde cada  $R^3$  representa independientemente un resto de ácido polihidroalquilcarboxílico, ácido polihidroalquenilcarboxílico; y

5 en donde el ácido polihidroalquilcarboxílico y el ácido polihidroalquenilcarboxílico se forman a partir de ácidos hidroalquil e hidroalquenilcarboxílico de fórmula  $HO-X-COOH$  donde X es un radical alifático saturado divalente que tiene de 11 a 17 átomos de carbono y en el que hay al menos 4 átomos de carbono unidos directamente entre los grupos hidroxilo y ácido carboxílico, y el número de unidades de hidroalquilo e hidroalquenilo es en promedio entre 4 y 8;

en donde en promedio al menos dos grupos  $R^2$  por molécula son grupos alcanilo como se definen.

10 Los compuestos de la presente invención se construyen al menos teóricamente a partir del grupo  $R^1$  que se puede considerar como el "grupo central" de los compuestos. Este grupo central es el resto (después de la eliminación de m átomos de hidrógeno activos) de un compuesto que contiene al menos m átomos de hidrógeno activos, presentes solo en grupos hidroxilo.

15 El término poliol es bien conocido en la técnica y se refiere a un alcohol que comprende más de un grupo hidroxilo. La expresión "hidrógeno activo" se refiere a los átomos de hidrógeno presentes como parte de los grupos hidroxilo del poliol. Por tanto, se entenderá que el número entero m, que es el número de hidrógenos activos en dicho poliol, es equivalente al número de grupos hidroxilo presentes para cada poliol.

La expresión "resto de poliol" como se usa en el presente documento, a menos que se defina lo contrario, se refiere a un radical orgánico derivado de poliol por eliminación de m átomos de hidrógeno activos, siendo cada átomo de hidrógeno de uno de los grupos hidroxilo presentes.

20 Preferiblemente, el grupo central es el resto de un hidrocarbilo que comprende amino y/o hidroxilo, particularmente un hidrocarbilo  $C_3$  a  $C_{30}$  que comprende amino y/o hidroxilo.

$R^1$  es el resto de un monosacárido, más preferiblemente de glucosa, fructosa o sorbitol, y particularmente de sorbitol.

Se prefiere la forma de cadena abierta de los grupos  $R^1$ ; sin embargo, se pueden usar grupos que incluyen la función éter cíclico interno, y se pueden obtener accidentalmente si la ruta sintética expone el grupo a temperaturas relativamente altas u otras condiciones, que promueven dicha ciclación.

25 El índice m es una medida de la funcionalidad del grupo central  $R^1$  y las reacciones de alcoxilación reemplazarán algunos o todos los átomos de hidrógeno activos (dependiendo de la relación molar del grupo central al grupo de alcoxilación) en la molécula de la que deriva el grupo central. La reacción en un sitio particular se puede restringir o prevenir por impedimento estérico o protección adecuada. Los grupos hidroxilo de terminación de las cadenas de poli(óxido de alqueno) en los compuestos resultantes están entonces disponibles para la reacción con los compuestos  
30 de acilo definidos anteriormente.

El índice m será preferiblemente al menos 3, más preferiblemente en el intervalo de 4 a 10, particularmente de 5 a 8, y especialmente de 5 a 6. Se pueden emplear, y normalmente se emplean, mezclas y por lo tanto m cuando se especifica en una gran cantidad del emulsionante, puede ser un valor promedio y puede no ser un número entero.

35 Los grupos  $R^2$  son los "grupos terminales" de las cadenas de (poli)-óxido de alqueno. Los grupos terminales son hidrógeno o un grupo acilo (también conocido como alcanilo) representado por  $-C(O)R^3$ , donde cada  $R^3$  representa independientemente un resto de ácido polihidroalquilcarboxílico, ácido polihidroalquenilcarboxílico.

40 Los ácidos hidroalquil e hidroalquenilcarboxílicos son de fórmula  $HO-X-COOH$  donde X es un radical alifático divalente saturado o insaturado, preferiblemente saturado, que contiene al menos 8 átomos de carbono y no más de 20 átomos de carbono, típicamente de 11 a 17 carbonos y en los que hay al menos 4 átomos de carbono directamente entre los grupos hidroxilo y ácido carboxílico.

45 De manera deseable, el ácido hidroalquilcarboxílico es ácido 12-hidroxiesteárico. En la práctica, tales ácidos hidroalquilcarboxílicos están disponibles comercialmente como mezclas del ácido hidroxílico y el ácido graso no sustituido correspondiente. Por ejemplo, el ácido 12-hidroxiesteárico se fabrica típicamente por hidrogenación de ácidos grasos de aceite de ricino, que incluyen el ácido hidroxílico insaturado  $C_{18}$  y los ácidos grasos no sustituidos (ácidos oleico y linoleico) que por hidrogenación dan una mezcla de ácidos 12-hidroxiesteárico y esteárico. El ácido 12-hidroxiesteárico disponible comercialmente contiene típicamente aproximadamente de 5 a 8% de ácido esteárico no sustituido.

50 El ácido polihidroalquil o polihidroalquenilcarboxílico se fabrica polimerizando el ácido hidroalquil o hidroalquenilcarboxílico mencionado anteriormente. La presencia del correspondiente ácido graso no sustituido actúa como agente de terminación y, por tanto, limita la longitud de la cadena del polímero. El número de unidades de hidroalquilo o hidroalquenilo es en promedio de 4 a 8 y especialmente aproximadamente 7. El peso molecular del polímero es típicamente de 600 a 3.000, particularmente de 900 a 2.700, más particularmente de 1.500 a 2.400 y especialmente aproximadamente 2.100.

El índice de ácido residual para el ácido polihidroalquil o polihidroalquenilcarboxílico es típicamente menor de 50 mg de KOH/g y preferible está en el intervalo de 30 a 35 mg de KOH/g. Normalmente, el índice de hidroxilo para el

ácido polihidroxiálquil o polihidroxiálquencilcarboxílico es un máximo de 40 mg de KOH/g y preferible está en el intervalo de 20 a 30 mg de KOH/g.

5 El oligómero del ácido hidroxiálquil o hidroxiálquencilcarboxílico se diferencia del polímero en que la terminación no es por el correspondiente ácido graso no sustituido. Es deseable que sea un dímero del ácido hidroxiálquil o hidroxiálquencilcarboxílico.

El grupo oxialquileno AO se selecciona de oxietileno (EO) y/u oxipropileno (PO).

Cuando la cadena de oxialquileno es homopolimérica, se prefieren los homopolímeros de óxido de etileno u óxido de propileno. Más preferiblemente, se prefieren particularmente los homopolímeros de óxido de etileno.

10 Cuando hay más de un grupo oxialquileno presente (es decir, donde n es 2 o más) y al menos dos son parte de la misma cadena de oxialquileno, los grupos oxialquileno pueden ser iguales o pueden ser diferentes a lo largo de dicha cadena de oxialquileno. En esta realización, la cadena de oxialquileno puede ser un copolímero de bloques o aleatorio de diferentes grupos oxialquileno.

Normalmente, cuando se utilizan cadenas copoliméricas de unidades de óxido de etileno y propileno, la proporción molar de unidades de óxido de etileno utilizadas será al menos 50% y más habitualmente al menos 70%.

15 El número de restos de óxido de alquileno en las cadenas de (poli)-óxido de alquileno, es decir, el valor de cada parámetro n, está en el intervalo de 2 a 50, más preferiblemente de 3 a 20, y particularmente de 5 a 10.

El total de los índices n (es decir, n x m) está en el intervalo de 25 a 70, y especialmente de 30 a 50.

20 Cuando el número de restos acilo en la molécula es significativamente menor que m, la distribución de tales grupos puede depender de la naturaleza del grupo central y del grado y efecto de la alcoxilación del grupo central. Por lo tanto, cuando el grupo central deriva de pentaeritrol, la alcoxilación del resto central puede distribuirse uniformemente a lo largo de los cuatro sitios disponibles de los cuales se puede eliminar un hidrógeno activo y en la esterificación de las funciones hidroxilo terminales, la distribución de los grupos acilo será cercana a la distribución aleatoria esperada. Sin embargo, cuando el grupo central deriva de compuestos, tales como sorbitol, donde los átomos de hidrógeno activos no son equivalentes, la alcoxilación dará típicamente longitudes de cadena desiguales para las cadenas de polialquilenoxi. Esto puede dar como resultado que algunas cadenas sean tan cortas que las otras cadenas (más largas) ejerzan efectos estéricos significativos, lo que hace que la esterificación en los grupos hidroxilo terminales de la "cadena corta" sea relativamente difícil. Entonces, la esterificación tendrá lugar generalmente preferentemente en los grupos hidroxilo terminales de "cadena larga".

30 El emulsionante de la invención se puede preparar alcoxilando en primer lugar grupos centrales R<sup>1</sup> que contienen m átomos de hidrógeno activos, por técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante reacción con las cantidades requeridas de óxido de alquileno, por ejemplo, óxido de etileno y/u óxido de propileno. Algunos productos alcoxilados adecuados están disponibles comercialmente, por ejemplo, sorbitol etoxilado 30 (Atlas™ G-2330), sorbitol etoxilado 40 (Atlas™ G-2004), sorbitol etoxilado 50 (Atlas™ G-2005) y trimetilolpropano etoxilado 40 propoxilado 10 (Emkarox™ VG-305W). Todos están disponibles de ex Croda. Otros productos de alcoxilación incluyen sorbitol etoxilado 12 y sorbitol etoxilado 100.

La segunda etapa del procedimiento comprende preferiblemente hacer reaccionar las especies alcoxiladas antes mencionadas con un ácido polihidroxiálquil(alquencil)carboxílico y/o un ácido hidroxiálquil(alquencil)-carboxílico en condiciones estándar de esterificación catalizada a temperaturas de hasta 250°C.

40 La relación molar de producto alcoxilado a un ácido polihidroxiálquil(alquencil)carboxílico y/o un ácido hidroxiálquil(alquencil)carboxílico está en el intervalo preferiblemente de 1:2 a 1:40.

El emulsionante es un líquido con un peso molecular que varía de 3.000 a 8.000. El emulsionante es preferiblemente un copolímero de bloques en estrella.

45 Uno de los beneficios clave del emulsionante es que puede tener un amplio intervalo de HLB dependiendo de si el grupo R<sup>3</sup> es un resto de un ácido polihidroxiálquilcarboxílico, un ácido hidroxiálquilcarboxílico, un oligómero de un ácido hidroxiálquilcarboxílico o una mezcla de los mismos y también dependiendo de la proporción de cada uno de estos ingredientes. El intervalo típico de HLB es de 1,3 a 15,0.

En una realización preferida de la invención, el emulsionante se prepara por reacción del grupo central alcoxilado R<sup>1</sup> con un ácido hidroxiálquilcarboxílico en una relación molar de 1:14 a 1:19. Preferiblemente, el emulsionante preparado por esta vía tiene un HLB de entre 6 y 9 y un peso molecular entre 6.500 y 8.000.

50 En otra realización preferida de la invención, el emulsionante se prepara por reacción del grupo central alcoxilado R<sup>1</sup> con una mezcla de un ácido polihidroxiálquilcarboxílico y un ácido hidroxiálquilcarboxílico donde la relación molar del grupo central alcoxilado a la mezcla de ácidos, preferiblemente, la relación molar de grupo central alcoxilado a la mezcla de ácidos está en el intervalo de 1:1 a 1:6. Preferiblemente, el emulsionante preparado por esta vía tiene un HLB de entre 12 y 15 y un peso molecular entre 3.000 y 4.000.

En otra realización preferida de la invención, el emulsionante se prepara por reacción del grupo central alcoxilado R<sup>1</sup> con un ácido polihidroalquilcarboxílico donde la relación molar entre el grupo central alcoxilado y el ácido preferiblemente está en el intervalo de 1:14 a 1:19. Preferiblemente, el emulsionante preparado por esta vía tiene un HLB de entre 6 y 9 y un peso molecular entre 6.500 y 8.000.

5 El emulsionante que se usa en los sistemas basados en agua es generalmente soluble en agua y tiene un HLB superior a 7.

10 La concentración del aceite en la emulsión de agua en aceite puede variar, y la cantidad de aceite es típicamente de 1% en peso a 90% en peso, habitualmente de 10% en peso a 80% en peso, más habitualmente de 20% en peso a 70% en peso, particularmente de 30% en peso a 60% en peso, y especialmente de 40% en peso a 55% en peso, en peso de la emulsión total.

La cantidad de agua presente en la emulsión es típicamente mayor de 5% en peso, habitualmente de 10% en peso a 90% en peso, más habitualmente de 25% en peso a 75% en peso, particularmente de 35% en peso a 65% en peso y especialmente de 45% en peso a 55% en peso, en peso de la composición total.

15 La emulsión de agua en aceite de acuerdo con la invención puede comprender de 0,1% en peso a 10% en peso, más preferiblemente de 0,7% en peso a 5% en peso, lo más preferiblemente de 0,9% en peso a 3% en peso del emulsionante de acuerdo con la invención. La cantidad de emulsionante presente en la emulsión puede estar lo más preferiblemente en el intervalo de 1,0% en peso a 2,0% en peso. Una ventaja particular de la presente invención es que la cantidad de emulsionante requerida con el fin de proporcionar la emulsificación deseada de la emulsión puede ser particularmente baja en comparación con los emulsionantes anteriores de la técnica.

20 En una realización preferida, una emulsión de agua en aceite según la invención comprende 1,5% en peso del emulsionante.

25 Se encontró que el emulsionante de la presente invención era compatible con una amplia variedad de aceites, proporcionando así una gama mucho más amplia de emulsiones de agua en aceite que tienen la estabilidad y fluidez requeridas para asegurar la administración por inyección. El uso de los presentes emulsionantes proporcionó emulsiones de agua en aceite que tienen buena estabilidad durante el almacenamiento, mejorando así la vida en anaquel de dichas emulsiones. Se encontró que las emulsiones eran estables y fluidas a bajas temperaturas, especialmente a 25°C.

También se pueden usar otros emulsionantes en la emulsión de agua en aceite además del emulsionante de la presente invención.

30 En una realización de la invención, la emulsión de agua en aceite consiste esencialmente en un emulsionante que es un poliol o poliamina alcoxilado que opcionalmente está terminado en acilo, agua y aceite. La emulsión puede consistir esencialmente en estos componentes, o contener dichos componentes sin otros componentes presentes en la emulsión.

35 Los aceites adecuados para usar en la emulsión de agua en aceite de acuerdo con la presente invención son aceites no metabolizables, aceites metabolizables y mezclas de aceites metabolizables y no metabolizables.

Los aceites no metabolizables que pueden usarse en los adyuvantes de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a aceites minerales y aceites de parafina. Se pueden preferir los aceites minerales.

40 Los aceites metabolizables incluyen, pero no se limitan a aceites vegetales, aceites animales, hidrocarburos naturales, aceites sintéticos o semisintéticos metabolizables (tales como Miglyol y Cetiol), ésteres de ácidos grasos de propilenglicol y ácidos grasos C<sub>6</sub> a C<sub>24</sub> tales como oleatos de oleilo, diésteres de ácidos cáprico o caprílico y similares. Los aceites vegetales adecuados son aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de girasol y similares. Los aceites animales adecuados son escualano y escualeno y similares.

La fase oleosa puede ser aceite metabolizable o una mezcla de aceites metabolizables, ya que los aceites no metabolizables (aceites minerales) pueden producir reacciones locales en los lugares de inyección.

45 Las emulsiones de agua en aceite de acuerdo con la invención se pueden preparar usando técnicas convencionales. En general, la fase acuosa, la fase oleosa, el emulsionante y opcionalmente otros emulsionantes y componentes se combinan entre sí y se emulsionan hasta que se obtiene una emulsión estable que tiene la viscosidad baja deseada.

50 Cuando se preparan emulsiones, se debe gastar energía para formar una interfase entre las fases oleosa y acuosa. Por lo tanto, el equipo de emulsión incluye una amplia variedad de agitadores, homogeneizadores, molinos coloidales, mezcladores de chorro y dispositivos ultrasónicos. Los agitadores para el tamaño de producción pueden ser sistemas de agitación de tipo hélice o de tipo palas, con una velocidad de rotación normalmente de hasta 2000 rpm, y se consideran procedimientos de mezcla de baja cizalladura. Otro tipo de agitador en el lugar de producción es el molino coloidal. El principio de funcionamiento del molino coloidal es el paso de las fases mixtas de una fórmula en emulsión entre un estator y un rotor de alta velocidad que gira a velocidades de 2.000 a 18.000 rpm que se considera un

procedimiento de mezcla de alta cizalladura.

El emulsionante según la invención está presente preferiblemente en la fase oleosa. Se pueden incorporar emulsionantes adicionales en la fase acuosa o en la fase oleosa.

5 Las emulsiones de agua en aceite de la presente invención se pueden procesar en una emulsión de agua en aceite en agua (también llamadas "emulsiones dobles"), donde las fases acuosas interna y externa están separadas por una fase oleosa. Este procedimiento consiste en mezclar la emulsión de agua en aceite en una fase acuosa que contiene el emulsionante de la presente invención. Por lo tanto, debe entenderse que estas emulsiones de agua en aceite en agua están incluidas dentro del alcance de las emulsiones de agua en aceite como se define en el presente documento.

10 En el caso de una emulsión de agua en aceite en agua, se prepara una emulsión de agua en aceite según la invención como emulsión de agua en aceite primaria, que posteriormente se añade a una segunda fase acuosa y un segundo emulsionante y se homogeneiza para obtener la emulsión de agua en aceite en agua deseada. El segundo emulsionante necesario para preparar la emulsión de agua en aceite en agua es preferiblemente un emulsionante con un HLB de 10-18, o una combinación de dos o más emulsionantes de modo que se obtenga un HLB deseado.

15 Las emulsiones de agua en aceite y agua en aceite en agua de acuerdo con la presente invención son adecuadas para su uso en formulaciones de vacunas.

Los emulsionantes de la presente invención proporcionan la estabilidad deseada de la emulsión resultante. Las emulsiones no sufren separación significativa durante el almacenamiento, en particular en el fondo del recipiente. La separación durante el almacenamiento se considera crítica ya que la rotura es un defecto crítico.

20 La emulsión de la presente invención tiene una separación máxima de 15% y preferiblemente no más de 10% en un ensayo acelerado durante 15 días a 37°C donde la separación es como se define en los ejemplos y el emulsionante está presente en 1,5% en peso. Lo más preferiblemente, la emulsión no tiene más de 6% de separación para un ensayo acelerado durante 15 días a 37°C.

25 La emulsión de la presente invención tiene una separación máxima de 15% y preferiblemente no más de 10% en un ensayo durante 3 meses a 5-8°C donde la separación es como se define en los ejemplos y el emulsionante está presente en 1,5% en peso. Lo más preferiblemente, la emulsión no tiene más de 6% de separación durante 3 meses a 5-8°C.

30 Se entenderá que los valores de viscosidad definidos a continuación se basan en emulsiones con 1,5% en peso de emulsionante como se muestra en los ejemplos. Los métodos para determinar la viscosidad a cizalladura cero son los que se describen con más detalle en el presente documento. Se entenderá que la viscosidad a cizalladura cero representa la viscosidad en el límite de velocidad de cizalladura baja, es decir, el valor de meseta máximo alcanzado cuando se reduce el esfuerzo de cizalladura o la velocidad de cizalladura, y es efectivamente la viscosidad de la composición mientras está en reposo.

La viscosidad a cizalladura cero de la emulsión a los 0 días puede ser inferior a 130 cP. La viscosidad puede estar en el intervalo de 30 a 110 cP. Preferiblemente, la viscosidad a cizalladura cero está en el intervalo de 50 a 95 cP. Más preferiblemente, la viscosidad a cizalladura cero está en el intervalo de 65 a 85 cP.

35 Se entenderá que la frase 0 días se refiere a las mediciones realizadas justo después de que se forme la emulsión.

La viscosidad a cizalladura cero de la emulsión a los 15 días y 37°C puede ser inferior a 130 cP. La viscosidad puede estar en el intervalo de 35 a 110 cP. Preferiblemente, la viscosidad a cizalladura cero está en el intervalo de 50 a 95 cP. Más preferiblemente, la viscosidad a cizalladura cero está en el intervalo de 65 a 85 cP.

40 La viscosidad a cizalladura cero de la emulsión al cabo de 1 mes y 5-8°C puede ser inferior a 130 cP. La viscosidad puede estar en el intervalo de 20 a 110 cP. Preferiblemente, la viscosidad a cizalladura cero está en el intervalo de 55 a 100 cP. Más preferiblemente, la viscosidad a cizalladura cero está en el intervalo de 70 a 90 cP.

La viscosidad a cizalladura cero de la emulsión a los 2 meses y 5-8°C puede ser inferior a 130 cP. La viscosidad puede estar en el intervalo de 20 a 120 cP. Preferiblemente, la viscosidad a cizalladura cero está en el intervalo de 60 a 110 cP. Más preferiblemente, la viscosidad a cizalladura cero está en el intervalo de 75 a 98 cP.

45 La viscosidad a cizalladura cero de la emulsión a los 3 meses y 5-8°C puede ser inferior a 130 cP. La viscosidad puede estar en el intervalo de 20 a 110 cP. Preferiblemente, la viscosidad a cizalladura cero está en el intervalo de 55 a 100 cP. Más preferiblemente, la viscosidad a cizalladura cero está en el intervalo de 70 a 90 cP.

50 Por tanto, la emulsión de la presente invención proporciona una buena viscosidad en un intervalo deseable para la jeringabilidad a baja concentración del emulsionante. Además, las emulsiones de la presente invención mantienen la viscosidad deseada durante el almacenamiento a lo largo del tiempo.

Las emulsiones de la presente invención tienen un cambio de viscosidad cuando no están bajo cizalladura (cizalladura cero) entre 0 horas y 15 días cuando se mantienen a 37°C, de no más de 20%, preferiblemente no más de 15%, lo más preferiblemente no más de 10%.

Las emulsiones de la presente invención tienen un cambio de viscosidad cuando no están bajo cizalladura (cizalladura cero) entre las 0 horas y 2 meses cuando se mantienen a 5-8°C, de no más de 30%, preferiblemente no más de 20%, lo más preferiblemente no más de 15%.

5 Las emulsiones de la presente invención tienen un cambio de viscosidad cuando no están bajo cizalladura (cizalladura cero) entre las 0 horas y 3 meses cuando se mantienen a 5-8°C, de no más de 30%, preferiblemente no más de 20%, lo más preferiblemente no más de 15%.

10 En relación con la emulsión y el emulsionante, se ha encontrado que los intervalos de viscosidad citados proporcionan la viscosidad deseada de la emulsión y para la formulación de vacuna formada con dicha emulsión. En particular, estos intervalos de viscosidad deseados se obtienen incluso con bajas cantidades del emulsionante que está presente en la emulsión como se describe en el presente documento.

15 Se apreciará que la emulsión comprende partículas de agua y, por tanto, el tamaño y la distribución de las partículas es un factor que refleja la estabilidad de la emulsión. Es importante que haya una distribución homogénea de las partículas para asegurar la estabilidad de la emulsión durante un período más largo. Además, un emulsionante eficaz asegura que las partículas no se junten y produzcan la separación de fases. Por lo tanto, es probable que una emulsión con un tamaño de partículas pequeño y una distribución de partículas homogénea sea una emulsión más estable.

20 En la forma de una distribución de tamaños de partículas, las partículas tendrían un valor de diámetro mediano de partículas en volumen. Se entenderá que el diámetro mediano de partículas en volumen se refiere al diámetro esférico equivalente correspondiente al punto en la distribución que divide la población exactamente en dos mitades iguales. Es el punto que corresponde al 50% del volumen de todas las partículas, leído en la curva de distribución acumulada que relaciona el porcentaje de volumen con el diámetro de las partículas, es decir, el 50% de la distribución está por encima de este valor y el 50% está por debajo. Este valor se denomina valor "D(v, 0,5)" y se determina como se describe en el presente documento.

25 Además, también se puede hacer referencia a los valores "D(v, 0,9)" y "D(v, 0,1)", y estos valores serían el diámetro esférico equivalente correspondiente al 90% o 10% respectivamente del volumen de todas las partículas, leído en la curva de distribución acumulada que relaciona el porcentaje de volumen con el diámetro de las partículas, es decir, son los puntos donde el 10% o el 90% de la distribución está por encima de este valor y el 90% o el 10% están por debajo del valor respectivamente.

30 Los valores de tamaño de partículas, usados para determinar los valores D(v, 0,5), D(v, 0,1) y D(v, 0,9), se miden por técnicas y métodos como se describe con más detalle en el presente documento. Se entenderá que los valores de tamaño de partículas definidos a continuación se basan en emulsiones con 1,5% en peso de emulsionante como se muestra en los ejemplos.

35 En general, se sabe que los tamaños de partículas son particularmente relevantes para la estabilidad a largo plazo de la emulsión. En particular, cuanto menor es el tamaño de D(v, 0,9), mayor es la estabilidad de la formulación durante un período más largo de estabilidad, y generalmente se prefieren tamaños de partículas en el intervalo de 1 a 10 µm con el fin de obtener una emulsión que tenga las propiedades deseadas. Además, la distribución del tamaño de partículas monomodal a lo largo del tiempo es una indicación de la estabilidad de la emulsión.

Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de D(v, 0,5) a los 0 días en el intervalo de 0,7 µm a 7,0 µm. Preferiblemente, en el intervalo de 1,0 µm a 5,0 µm. Más preferiblemente, en el intervalo de 1,2 µm a 3,0 µm. Lo más preferiblemente, en el intervalo de 1,5 µm a 2,1 µm.

40 Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de D(v, 0,1) a los 0 días en el intervalo de 0,5 µm a 7,0 µm. Preferiblemente, en el intervalo de 0,7 µm a 4,0 µm. Más preferiblemente, en el intervalo de 0,8 µm a 2,0 µm. Lo más preferiblemente, en el intervalo de 0,9 µm a 1,3 µm.

45 Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de D(v, 0,9) a los 0 días en el intervalo de 0,5 µm a 10,0 µm. Preferiblemente, en el intervalo de 0,7 µm a 7,0 µm. Más preferiblemente, en el intervalo de 1,0 µm a 4,0 µm. Lo más preferiblemente, en el intervalo de 2,4 µm a 3,1 µm.

Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de D(v, 0,5) a los 15 días y 37°C en el intervalo de 0,7 µm a 8,0 µm. Preferiblemente, en el intervalo de 1,0 µm a 5,0 µm. Más preferiblemente, en el intervalo de 1,2 µm a 3,0 µm. Lo más preferiblemente, en el intervalo de 1,5 µm a 2,1 µm.

50 Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de D(v, 0,1) a los 15 días y 37°C en el intervalo de 0,5 µm a 7,0 µm. Preferiblemente, en el intervalo de 0,7 µm a 4,0 µm. Más preferiblemente, en el intervalo de 0,8 µm a 2,0 µm. Lo más preferiblemente, en el intervalo de 0,9 µm a 1,3 µm.

Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de D(v, 0,9) a los 15 días y 37°C en el intervalo de 0,5 µm a 10,0 µm. Preferiblemente, en el intervalo de 0,7 µm a 7,0 µm. Más preferiblemente, en el intervalo de 1,0 µm a 4,0 µm. Lo más preferiblemente, en el intervalo de 2,4 µm a 3,1 µm.

- Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de  $D(v, 0,5)$  al cabo de 1 mes a 5-8°C en el intervalo de 0,7  $\mu\text{m}$  a 8,0  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, en el intervalo de 1,0  $\mu\text{m}$  a 5,0  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, en el intervalo de 1,2  $\mu\text{m}$  a 3,0  $\mu\text{m}$ . Lo más preferiblemente, en el intervalo de 1,5  $\mu\text{m}$  a 2,1  $\mu\text{m}$ .
- 5 Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de  $D(v, 0,1)$  al cabo de 1 mes a 5-8°C en el intervalo de 0,5  $\mu\text{m}$  a 7,0  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, en el intervalo de 0,7  $\mu\text{m}$  a 4,0  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, en el intervalo de 0,8  $\mu\text{m}$  a 2,0  $\mu\text{m}$ . Lo más preferiblemente, en el intervalo de 1,0  $\mu\text{m}$  a 1,3  $\mu\text{m}$ .
- Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de  $D(v, 0,9)$  al cabo de 1 mes a 5-8°C en el intervalo de 0,5  $\mu\text{m}$  a 10,0  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, en el intervalo de 0,7  $\mu\text{m}$  a 7,0  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, en el intervalo de 1,0  $\mu\text{m}$  a 4,0  $\mu\text{m}$ . Lo más preferiblemente, en el intervalo de 2,4  $\mu\text{m}$  a 3,1  $\mu\text{m}$ .
- 10 Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de  $D(v, 0,5)$  a los 2 meses a 5-8°C en el intervalo de 0,7  $\mu\text{m}$  a 8,0  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, en el intervalo de 1,0  $\mu\text{m}$  a 5,0  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, en el intervalo de 1,2  $\mu\text{m}$  a 3,0  $\mu\text{m}$ . Lo más preferiblemente, en el intervalo de 1,5  $\mu\text{m}$  a 2,1  $\mu\text{m}$ .
- Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de  $D(v, 0,1)$  a los 2 meses a 5-8°C en el intervalo de 0,5  $\mu\text{m}$  a 7,0  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, en el intervalo de 0,7  $\mu\text{m}$  a 4,0  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, en el intervalo de 0,8  $\mu\text{m}$  a 2,0  $\mu\text{m}$ . Lo más preferiblemente, en el intervalo de 0,9  $\mu\text{m}$  a 1,3  $\mu\text{m}$ .
- 15 Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de  $D(v, 0,9)$  a los 2 meses a 5-8°C en el intervalo de 0,5  $\mu\text{m}$  a 10,0  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, en el intervalo de 0,7  $\mu\text{m}$  a 7,0  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, en el intervalo de 1,0  $\mu\text{m}$  a 4,0  $\mu\text{m}$ . Lo más preferiblemente, en el intervalo de 2,4  $\mu\text{m}$  a 3,1  $\mu\text{m}$ .
- Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de  $D(v, 0,5)$  a los 3 meses a 5-8°C en el intervalo de 0,7  $\mu\text{m}$  a 8,0  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, en el intervalo de 1,0  $\mu\text{m}$  a 5,0  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, en el intervalo de 1,2  $\mu\text{m}$  a 3,0  $\mu\text{m}$ . Lo más preferiblemente, en el intervalo de 1,5  $\mu\text{m}$  a 2,1  $\mu\text{m}$ .
- 20 Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de  $D(v, 0,1)$  a los 3 meses a 5-8°C en el intervalo de 0,5  $\mu\text{m}$  a 7,0  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, en el intervalo de 0,7  $\mu\text{m}$  a 4,0  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, en el intervalo de 0,8  $\mu\text{m}$  a 1,8  $\mu\text{m}$ . Lo más preferiblemente, en el intervalo de 0,85  $\mu\text{m}$  a 1,1  $\mu\text{m}$ .
- 25 Las partículas presentes en las emulsiones de la presente invención pueden tener un valor de  $D(v, 0,9)$  a los 3 meses a 5-8°C en el intervalo de 0,5  $\mu\text{m}$  a 10,0  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, en el intervalo de 0,7  $\mu\text{m}$  a 7,0  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, en el intervalo de 1,0  $\mu\text{m}$  a 4,0  $\mu\text{m}$ . Lo más preferiblemente, en el intervalo de 2,4  $\mu\text{m}$  a 3,1  $\mu\text{m}$ .
- Por tanto, la emulsión de la presente invención proporciona un buen tamaño de partículas y una buena distribución del tamaño de partículas en un intervalo deseable para la jeringabilidad a baja concentración del emulsionante. Además, las emulsiones de la presente invención mantienen los tamaños de partículas deseados y la distribución monomodal del tamaño de partículas durante el almacenamiento a lo largo del tiempo.
- 30 Las emulsiones de la presente invención, tienen un cambio en cualquiera o todos de  $D(v, 0,1)$ ,  $D(v, 0,5)$  y  $D(v, 0,9)$  entre las 0 horas y 15 días cuando se mantienen a 37°C, de no más de 25%, preferiblemente no más de 17%, lo más preferiblemente no más de 12%.
- 35 Las emulsiones de la presente invención tienen un cambio en cualquiera o todos de  $D(v, 0,1)$ ,  $D(v, 0,5)$  y  $D(v, 0,9)$  entre las 0 horas y 1 mes cuando se mantienen a 5-8°C 37°C, de no más de 25%, preferiblemente no más de 17%, lo más preferiblemente no más de 12%.
- Las emulsiones de la presente invención tienen un cambio en cualquiera o todos de  $D(v, 0,1)$ ,  $D(v, 0,5)$  y  $D(v, 0,9)$  entre las 0 horas y 2 meses cuando se mantienen a 5-8°C 37°C, de no más de 25%, preferiblemente no más de 17%, lo más preferiblemente no más de 12%.
- 40 Las emulsiones de la presente invención tienen un cambio en cualquiera o todos de  $D(v, 0,1)$ ,  $D(v, 0,5)$  y  $D(v, 0,9)$  entre las 0 horas y 3 meses cuando se mantienen a 5-8°C 37°C de no más de 30%, preferiblemente no más de 25%, lo más preferiblemente no más de 20%.
- Una característica de la presente invención es que los niveles deseados de viscosidad, estabilidad y tamaño de partículas se obtienen mediante niveles bajos de emulsionante. La cantidad de emulsionante requerida por unidad de agua a emulsionar es particularmente baja para los emulsionantes de la presente invención.
- 45 Por tanto, el emulsionante puede tener un valor de eficacia de emulsión que representa el porcentaje en peso de agua emulsionada por porcentaje en peso de emulsionante. El emulsionante de la presente invención puede tener un valor de eficacia de emulsión superior a 15 en emulsiones y formulaciones de vacunas como se definen en el presente documento. Preferiblemente, mayor que 20. Más preferiblemente, mayor que 27. Lo más preferiblemente, un valor de eficacia de emulsión mayor que 30.
- 50 La vacuna comprende el sistema de emulsión. Contiene fase oleosa (generalmente aceite mineral), fase acuosa (que contiene proteínas/antígeno) y el emulsionante responsable de emulsionar el aceite y el agua y mantener estable la

emulsión.

5 Las preparaciones de vacunas basadas en emulsionante según la invención se pueden preparar según métodos conocidos en la técnica. Las emulsiones de agua en aceite se pueden formar en la formulación de vacuna junto con antígenos adecuados y otros componentes. El antígeno puede estar presente en la fase acuosa y en el agua a medida que se añade para formar la emulsión.

Normalmente, las formulaciones de vacunas de la presente invención comprenden aceite en el intervalo de 20% en peso a 90% en peso. Preferiblemente, de 40% a 80%. Normalmente, las formulaciones de vacunas de la presente invención comprenden agua en el intervalo de 80% en peso a 10% en peso. Preferiblemente, de 60% a 20%

10 Normalmente, las formulaciones de vacunas de la presente invención comprenden emulsionante en el intervalo de 0,1% en peso a 15% en peso. Preferiblemente, de 0,1% en peso a 10% en peso.

Las vacunas se utilizan y administran con el fin de activar el sistema inmunitario y proporcionar una respuesta inmunitaria protectora contra un agente infeccioso. Las vacunas pueden basarse en microorganismos vivos atenuados o microorganismos muertos (inactivados), así como en subunidades de microorganismos como componente antigénico.

15 El material antigénico puede mezclarse en la propia emulsión o puede estar comprendido en la formulación pero no en la emulsión. El material antigénico se puede mezclar en la fase acuosa de la emulsión y formulación de vacuna. En la vacuna, el material antigénico puede estar presente en la fase acuosa discontinua de la emulsión.

La emulsión y formulación de vacuna de la presente invención encuentra un uso particular con cepas y antígenos para la fiebre aftosa o la enfermedad de Newcastle.

20 La emulsión y/o formulación de vacuna puede comprender tensioactivo, y estos pueden seleccionarse de tensioactivos no iónicos, aniónicos, catiónicos, anfóteros y/o de ion híbrido.

La presencia de saponina o hidróxido de aluminio es común en vacunas que comprenden excipientes que presentan la propiedad de inducir la respuesta inmunitaria local y actúan como adyuvantes en la producción de anticuerpos.

25 Las vacunas de acuerdo con la invención se administran preferiblemente por métodos parenterales, p. ej. por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa. Sin embargo, si es necesario, las vacunas también se pueden administrar por métodos no parenterales. Las bajas viscosidades de las emulsiones utilizadas en los adyuvantes y/o vacunas de la presente invención son extremadamente adecuadas para la administración parenteral, especialmente por inyección.

Todas las características descritas en el presente documento pueden combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores, en cualquier combinación.

30 Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se hará ahora referencia, a modo de ejemplo, a la siguiente descripción.

Se entenderá que todos los ensayos y propiedades físicas indicadas se han determinado a presión atmosférica y temperatura ambiente (es decir, 25°C), a menos que se indique lo contrario en el presente documento, o a menos que se indique lo contrario en los métodos y procedimientos de ensayo mencionados.

Los métodos de ensayo para determinar los valores son los siguientes:

35 Centrifugación - Se centrifugó un matraz de 10 ml que contenía 10 g de la emulsión durante 60 minutos a 4.000 rpm mediante una centrífuga Baby.

Comprobación de probeta - Se ensayaron 50 ml de emulsión durante un período de estabilidad y se observó la cantidad de aceite liberado en la parte superior. Generalmente es aceptable que se libere hasta 10% del volumen añadido en la parte superior. Agua en el fondo significa que la emulsión se ha roto y no es aceptable.

40 Viscosidad - Se ensayó una muestra de 200 ml de emulsión utilizando Brookfield DV-I. La formulación se evaluó de 100 rpm a 10 rpm. Las formulaciones se evaluaron usando el husillo S61 después de 1 minuto. Los valores de viscosidad mostrados representan Montanide ISA 50 a 30 rpm y el emulsionante A a 60 rpm

45 Tamaño de partículas - Medido con un Mastersizer 3000. El análisis del tamaño de partículas puede predecir la estabilidad de la emulsión durante un período de tiempo o cuando una aplicación requería un valor específico. Para sistemas de emulsión de agua en aceite inyectable, los valores aceptables son de 1 a 10 µm.

Ejemplos de emulsionantes

Los siguientes emulsionantes se prepararon para ensayar en sistemas de emulsión de agua en aceite.

Ejemplo 1 - Preparación del emulsionante A

Se cargaron sorbitol PEG-50 (453 g, 31,2% en peso) y ácido poli-12-hidroxiesteárico (997 g, 68,8% en peso) en un

recipiente de reacción de acero inoxidable. La mezcla se calentó a 210-220°C bajo atmósfera de nitrógeno y agitación. La reacción se mantuvo durante 4-5 horas. Después, la reacción se enfrió a 70-80°C con el producto (Emulsionante A) descargado.

Montanide ISA 50 y emulsionante A - Procedimiento de composición y formulación

- 5 Se formó con el emulsionante A una emulsión fina de baja viscosidad y formulaciones de alta estabilidad para sistemas de Ag/Ac. También se formaron sistemas de emulsión usando un emulsionante existente Montanide ISA 50 para comparación.

Se prepararon las siguientes tres emulsiones:

- 10
- Emulsión de Montanide al 5% - Montanide ISA 50, con Ag/Ac de 50% en peso de agua y 50% en peso de aceite (formado por 45% en peso de aceite mineral y 5% en peso de monooleato de manida). Como fase acuosa se utilizó un sistema de tampón de fosfato (medio PBS) pH ~7,5.
  - Emulsión de Montanide al 1,5% - Montanide ISA 50, con Ag/Ac de 50% de agua y 50% en peso de aceite (formado por 48,5% en peso de aceite mineral y 1,5% en peso de monooleato de manida). Como fase acuosa se utilizó un sistema de tampón de fosfato (medio PBS) pH 7,5.
- 15
- Emulsión de emulsionante A al 1,5% - Emulsionante A, con Ag/Ac de 50% en peso de agua y 50% en peso de aceite (formado por 48,5% en peso de aceite mineral y 1,5% en peso de emulsionante A). Como fase acuosa se utilizó un sistema de tampón de fosfato (medio PBS) pH ~7,5. Se prepararon tres lotes de esta emulsión y se dio el promedio de los resultados.

Preparación de la emulsión

- 20 Las emulsiones se prepararon usando Silverson y una rejilla normal para emulsiones. El aceite y el emulsionante se añadieron juntos en un vaso de precipitados a una temperatura inferior a 20°C. Con agitación suave (1.000 rpm) se añadió la fase acuosa a la fase oleosa. Se aumentó la agitación (4.000-7.000 rpm) para asegurar la homogeneidad durante 5 minutos.

Propiedades físicas

- 25 Todas las muestras se sometieron a centrifugación, comprobación de probeta, viscosidad y medición del tamaño de partículas. Los resultados para una serie de propiedades físicas importantes de la emulsión se muestran en las Tablas 1 a 3.

Tabla 1. - Comprobación de probeta

Condiciones	Montanide al 5%	Emulsionante A al 1,5%
15 días a 37°C	capa de 1 ml en la parte superior	capa de 1 ml de fase turbia en la parte superior, sin cremado ni separación de fases
1 mes a 5-8°C	capa de 4 ml en la parte superior	capa de 1 ml de fase turbia en la parte superior, sin cremado ni separación de fases
2 meses a 5-8°C	capa de 5 ml en la parte superior	capa de 1 ml de fase turbia en la parte superior, sin cremado ni separación de fases
3 meses a 5-8°C	capa de 6 ml en la parte superior	capa de 1,5 ml de fase turbia en la parte superior, sin cremado ni separación de fases

- 30 La emulsión de Montanide mostró un aumento progresivo de la capa separada en la parte superior de la emulsión alcanzando 6 ml de la capa. Esto es más de 10% del volumen y no es aceptable. La emulsión con el emulsionante A formó una capa más pequeña en la parte superior que no progresó hasta los 2 meses de estabilidad. Por tanto, la emulsión de Montanide mostró separación de fases, mientras que la emulsión con el emulsionante A no lo hizo.

Tabla 2. - Viscosidad

Condiciones	Montanide al 5%	Emulsionante A al 1,5%
0 días	141 cP	71 cP
15 días a 37°C	109 cP	73 cP
1 mes a 5-8°C	138 cP	81 cP
2 meses a 5-8°C	162 cP	87 cP
3 meses a 5-8°C	158 cP	83 cP

La emulsión de Montanide mostró alta viscosidad y degradación de la viscosidad durante el almacenamiento. Las emulsiones con el emulsionante A mostraron una viscosidad más baja lo que permite una manipulación y jeringabilidad más fáciles, y la emulsión de Montanide mostró una viscosidad más alta que las emulsiones con el emulsionante A en las mismas condiciones de ensayo de estabilidad.

5 Tabla 3. - Tamaño de partículas

Condiciones	Montanide 5%			Emulsionante A 1,5%		
	D(v, 0,1) µm	D(v, 0,5) µm	D(v, 0,9) µm	D(v, 0,1) µm	D(v, 0,5) µm	D(v, 0,9) µm
0 días*	0,87	1,44	2,15	1,16	1,81	2,72
15 días a 37°C	0,82	1,30	2,07	1,10	1,73	2,62
1 mes a 5-8°C	0,81	1,31	2,05	1,15	1,83	2,76
2 meses a 5-8°C	0,81	1,34	2,16	1,12	1,80	2,76
3 meses a 5-8°C	0,99	1,78	3,05	0,97	1,66	2,67

\* después de la formulación

10 La emulsión de Montanide y emulsionante A mostró un tamaño de partículas estable a lo largo del tiempo durante el almacenamiento y la distribución del tamaño de partículas monomodal. Como Montanide ISA se presenta al 5% y el emulsionante A al 1,5%, se debe considerar que el emulsionante A es muy eficaz en la formación de pequeñas partículas de fase interna y que la película interfacial formada es eficaz para mantener la emulsión estable durante el período de estabilidad. Las emulsiones con emulsionante A mostraron un tamaño de partículas estable a lo largo del tiempo durante el almacenamiento y, por lo tanto, un alto grado de estabilidad con pequeño aumento de partículas grandes o agregación que conduce a la separación.

Comparación de Montanide al 1,5% y el emulsionante A al 1,5%

15 La emulsión de Montanide ISA 50 al 1,5% se comparó con la emulsión del emulsionante A al 1,5%. Se obtuvieron resultados para varios parámetros como se discutió anteriormente. Los resultados para la emulsión de Montanide se dan a continuación y se pueden comparar con los resultados del emulsionante A que se muestran en las Tablas 1-3.

Montanide al 1,5% Resultados a los 0 días

Centrifugación - no aprobado debido al cremado

20 Viscosidad - 106 cP

Tamaño de partículas D(v, 0,9) - 3,70 µm

Montanide al 1,5% Resultados a los 15 días a 37°C

Probeta - no aprobado, la emulsión se rompe y se forma una capa de agua en la parte inferior

Viscosidad - muestra rota por lo tanto no se puede medir

25 Tamaño de partículas D(v, 0,9) - 27,80 µm

No hay resultados de los ensayos de estabilidad a 5°C-8°C ya que la formulación no fue aprobada en el ensayo de estrés a 37°C.

30 Comparando el comportamiento de las emulsiones después de 3 meses se puede observar que las viscosidades de las emulsiones con el emulsionante A al 1,5% son menores que con Montanide ISA 50 al 1,5%. Para aplicaciones inyectables, y considerando que es un sistema de Ag/Ac que puede provocar una alta reacción local, cuanto menor sea el valor de viscosidad menor puede ser la reacción local. Los valores del emulsionante A después de 3 meses fueron más bajos que los de Montanide ISA 50.

35 La distribución del tamaño de partículas para el emulsionante A se logró utilizando solo 1,5% en peso del emulsionante, cuando se puede ver que se requiere Montanide al 5% para lograr una distribución del tamaño de partículas comparable. Por lo tanto, se requiere más de tres veces la cantidad de Montanide para lograr el mismo resultado, y se puede ver que el emulsionante A es tres veces más efectivo por cantidad unitaria.

Los resultados muestran que el emulsionante A forma emulsiones estables a niveles de solo 1,5% en peso, proporciona emulsiones de menor viscosidad que, por lo tanto, serían más fáciles de inyectar y tendrían menor reacción local, y serían más fáciles de inyectar.

40 Al preparar las emulsiones de Montanide al 1,5% se observó que presentaban cremado después de la centrifugación en el tiempo cero lo que es una indicación de que son menos estables. También se vio que después de 15 días la emulsión de Montanide al 1,5% se había separado en dos fases. Este proceso inestable no es aceptable para una

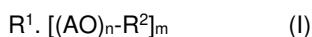
emulsión de Ag/Ac. Por tanto, el ensayo de estabilidad a largo plazo no era posible ya que se produce la separación de fases de las emulsiones.

La comparación de Montanide al 1,5% muestra por lo tanto que el emulsionante A puede lograr emulsiones estables en niveles mucho más bajos que los que se pueden lograr con los emulsionantes anteriores.

- 5 Debe entenderse que la invención no debe limitarse a los detalles de las realizaciones anteriores, que se describen únicamente a modo de ejemplo. Son posibles muchas variaciones.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación de vacuna que comprende una emulsión de agua en aceite y al menos un antígeno de vacuna para la fiebre aftosa o la enfermedad de Newcastle, aceite y agua, donde dicha emulsión comprende un emulsionante que es un poliol alcoxilado que opcionalmente está terminado en acilo, y en donde el emulsionante tiene una estructura general (I):



en donde

R<sup>1</sup> es el resto de un monosacárido de poliol seleccionado de glucosa, fructosa o sorbitol;

AO se selecciona de oxietileno y/u oxipropileno;

- 10 cada n representa independientemente un número entero en el intervalo de 3 a 20;

el total de los índices n (n x m) está en el intervalo de 25 a 70;

cada R<sup>2</sup> representa independientemente hidrógeno, o un grupo acilo representado por -C(O)R<sup>3</sup> en donde cada R<sup>3</sup> representa independientemente un resto de ácido polihidroalquilcarboxílico, ácido polihidroalquenilcarboxílico; y

- 15 en donde el ácido polihidroalquilcarboxílico y el ácido polihidroalquenilcarboxílico se forman a partir de ácidos hidroalquil e hidroalquenilcarboxílicos de fórmula HO-X-COOH donde X es un radical alifático saturado divalente que tiene de 11 a 17 átomos de carbono y en el que hay al menos 4 átomos de carbono directamente unidos entre los grupos hidroxilo y ácido carboxílico, y el número de unidades de hidroalquilo e hidroalquenilo es en promedio entre 4 y 8;

en donde en promedio al menos dos grupos R<sup>2</sup> por molécula son grupos alcanoilo como se definen.

2. La formulación según la reivindicación 1, donde el emulsionante tiene un peso molecular de 3.000 a 8.000.

- 20 3. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el emulsionante tiene un HLB de 1,3 a 15.

4. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la emulsión de agua en aceite comprende de 0,1% en peso a 15% en peso del emulsionante.

5. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la viscosidad a cizalladura cero de la emulsión a los 0 días es inferior a 130 cP.

- 25 6. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las partículas de agua presentes en la emulsión tienen un valor de D(v, 0,5) a los 0 días en el intervalo de 0,7 μm a 7,0 μm.

7. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el valor de eficiencia de emulsión es superior a 15.

8. Un método para formar una formulación de vacuna que comprende mezclar entre sí:

- 30 (i) al menos un emulsionante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;

(ii) al menos un antígeno de vacuna para la fiebre aftosa o la enfermedad de Newcastle;

(iii) aceite; y

(iv) agua.

- 35 9. Uso de un poliol alcoxilado que opcionalmente está terminado en acilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, como emulsionante en una emulsión de agua en aceite para formulaciones de vacunas.

10. Una emulsión de agua en aceite que comprende emulsionante que es un poliol alcoxilado que opcionalmente está terminado en acilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, estando presente dicho emulsionante en la emulsión en el intervalo de 0,1% en peso a 10% en peso.

- 40 11. Una fase oleosa que comprende aceite y un emulsionante que es un poliol alcoxilado que opcionalmente está terminado en acilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, siendo dicha fase oleosa adecuada para formar una emulsión según la reivindicación 10 y/o una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.