



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 366 941**

(51) Int. Cl.:

**C12P 5/02** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **09786243 .7**

(96) Fecha de presentación : **28.08.2009**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2268823**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2011**

(54) Título: **Producción de escualeno a partir de levaduras hiperproductoras.**

(30) Prioridad: **28.08.2008 US 190486 P**

(73) Titular/es: **NOVARTIS AG.**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.10.2011**

(72) Inventor/es: **Broeker, Michael**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2011**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 941 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

Producción de escualeno a partir de levaduras hiperproductoras

### Campo Técnico

La presente invención es en el campo de la fabricación de escualeno para su uso en adyuvantes de emulsión de aceite en agua.

### Técnica Anterior

El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide instaurado llamado escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno. Se conoce el escualeno para su uso en emulsiones de aceite en agua en vacunas humanas, por ejemplo la emulsión MF59 que se utiliza para adyuvar vacunas de la gripe. El escualeno también es usado en otros productos farmacéuticos (por ejemplo, ungüentos, supositorios) y en cosméticos.

Las fuentes actuales del escualeno son, principalmente, aceites de pescado y, en particular, aceites de hígado de tiburón. Puede haber problemas asociados con el uso de escualeno extraído a partir de aceite de hígado de tiburón, particularmente si los estándares de fabricación rigurosos (tales como aquellos utilizados durante la producción de MF59 por Novartis) no se mantienen. Por ejemplo, los tiburones pueden estar infestados por patógenos que son 15 también infecciosos para los humanos o que producen sustancias que son nocivas para los humanos, y pueden existir agentes de tiburón de EET o tipo EET [por ejemplo, referencias 1-3]. Además, los tiburones puede contener toxinas humanas, tales como la toxina carcha. Por lo tanto, las fuentes de escualeno baratas de baja calidad no son adecuadas para uso farmacéutico humano. El riesgo de daño a un receptor humano puede elevarse en situaciones en 20 las que el escualeno es parte de un adyuvante inmunológico porque, por definición, el adyuvante puede inducir una fuerte respuesta inmune no deseada frente a la impureza.

En lugar de usar fuentes de escualeno derivado de tiburones baratas de baja calidad, por lo tanto, los usos farmacéuticos del escualeno (por ejemplo, como se utiliza en la fabricación de MF59) emplean un material de mayor calidad, pero estos escualenos de alta calidad son caros y de disponibilidad limitada. Tales fuentes caras no son útiles, por ejemplo, para su uso en el mundo en desarrollo.

Sería útil encontrar una fuente de escualeno que cumpla estos altos estándares farmacéuticos sin ser tan caro. Es 25 por tanto deseable una fuente de escualeno alternativa viable, particularmente cuando el escualeno está destinado para su uso en un adyuvante inmunológico. Una fuente más barata de escualeno de grado farmacéutico sería particularmente útil en países en desarrollo que o bien no tienen fácil acceso a tiburones o bien no pueden permitirse 30 fácilmente el caro material de grado farmacéutico utilizado actualmente, por ejemplo, por Novartis. Una posible fuente son las levaduras [5, 37, 38].

### Divulgación de la invención

La invención se refiere a procedimientos para la preparación de escualeno a partir de levaduras que hiperproducen escualeno. Las levaduras son organismos GRAS (generalmente considerados como de uso seguro) y como tales son una fuente útil de escualeno para uso farmacéutico. Además, el escualeno puede prepararse libre de 35 contaminación por patógenos, priones y toxinas ambientales; por ejemplo las levaduras están, *a priori*, libres de mercurio. En el campo de las vacunas ya se usan las levaduras (por ejemplo, para la expresión recombinante del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) y por lo tanto no suponen ninguna preocupación regulatoria particular, es decir, el escualeno derivado de levaduras es especialmente adecuado para su uso en la preparación de adyuvantes 40 inmunológicos. Finalmente, las técnicas de cultivo de levaduras están generalizadas y son fácilmente adaptables a la tecnología de transferencia.

La invención proporciona un procedimiento para preparar un adyuvante de emulsión de aceite en agua, que comprende las etapas de: (a) purificar escualeno a partir de una levadura que produce un alto rendimiento de escualeno durante el cultivo; y (b) combinar el escualeno purificado de la etapa (a) con un componente acuoso para formar la emulsión de aceite en agua. La invención también proporciona un procedimiento para preparar un adyuvante de emulsión de aceite en agua, que comprende las etapas de:

(a) obtener escualeno que se ha purificado a partir de una levadura que produce un alto rendimiento de escualeno durante el cultivo; y

(b) combinar el escualeno de la etapa (a) con un componente acuoso para formar la emulsión de aceite en agua. Las levaduras se crecen en medios controlados libre de productos de origen animal.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunogénica (por ejemplo, una vacuna), que comprende preparar una emulsión de aceite en agua como se describe anteriormente, y mezclar la emulsión con un inmunógeno.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar un kit para la preparación de una composición

inmunogénica de esta forma, que comprende preparar una emulsión de aceite en agua como se describe anteriormente, envasar la composición en un primer contenedor, y combinar el primer recipiente en forma de kit con un segundo contenedor, en el que el segundo contenedor contiene un inmunógeno. El inmunógeno puede estar en forma seca o acuosa.

5     **Producción de escualeno en levadura**

La invención utiliza escualeno que se ha purificado a partir de levadura. Las levaduras pueden ser cepas naturales o mutantes que se seleccionan por un alto rendimiento de escualeno, pero generalmente serán cepas genéticamente modificadas que han sido manipuladas para producir altos rendimientos de escualeno. Otra posibilidad es cultivar cepas de levaduras naturales, mutantes o modificadas en presencia de factores que dan como resultado un aumento del rendimiento de escualeno.

10    El rendimiento de escualeno puede expresarse como un % del peso seco celular (cdw) en un levadura particular. Una cepa normal de levadura silvestre *Yarrowia lipolytica* típicamente puede producir escualeno aproximadamente al 0,5% cdw, mientras que una levadura de cerveza normal *Saccharomyces uvarum* puede producir escualeno aproximadamente al 1,4% cdw [4]. Una levadura que produce un "alto rendimiento" de escualeno es una en la que al menos un 2% cdw es escualeno, por ejemplo. ≥ 3%, ≥ 4%, ≥ 5%, ≥ 6%, ≥ 7%, ≥ 8%, ≥ 9%, ≥ 10%, ≥ 11%, ≥ 12%, ≥ 13%, ≥ 14%, ≥ 15% o más de cdw.

15    El rendimiento de escualeno también puede expresarse como un% de los lípidos totales en un levadura particular. Una levadura de la cerveza normal *S.uvarum* produce escualeno al 33% de los lípidos totales [4]. Una levadura que produce un "alto rendimiento" de escualeno puede producir escualeno a >40% de los lípidos totales, por ejemplo. >50%, >60%, etc.

20    De forma ventajosa, el escualeno está, al menos el 95%, en su configuración trans (isoforma natural), por ejemplo. >96%, >97%, >98%, >99%, o 100%.

25    Las cepas de levadura mutantes naturales que tienen un alto rendimiento de escualeno son conocidas en la técnica, por ejemplo la cepa *Torulasopra delbrueckii* descrita en la referencia 5. Los mutantes puede obtenerse por procedimientos bien conocidos de inducir mutaciones (bien mutagénesis aleatoria o dirigida), por ejemplo los descritos en las referencias 6 y 7, seguidos del cribado de las células que han sufrido mutagénesis para seleccionar aquellas con un alto rendimiento de escualeno adecuado. La referencia 8 describe cepas de levadura mutantes con mutaciones sensibles a temperatura de la 4- $\alpha$ -carboxiesterol-C3-deshidrogenasa (ERG26) que provoca la acumulación de escualeno cuando se crecen a una temperatura apropiada.

30    No obstante, normalmente la invención usará levaduras genéticamente modificadas. Pueden utilizarse diversos procedimientos para incrementar el rendimiento de escualeno de una cepa de partida. El metabolismo de los esteroles puede manipularse para aumentar los rendimientos de escualeno, por ejemplo aumentando el anabolismo del escualeno, y/o disminuyendo el catabolismo del escualeno (incluyendo su degradación y/o su conversión natural a ergosterol). Los genes implicados en la biosíntesis de escualeno incluyen mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa, pirofosfomevalonato descarboxilasa, isopentenil pirofosfato isomerasa, HMGR (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa), y escualeno sintasa. Los genes implicados en la conversión de escualeno a ergosterol incluyen escualeno epoxidasa (ERG1), lanosterol sintasa, C14-dimetilasa, d14-reductasa, C4-metiloxidasa, C4-descarboxilasa (ERG26), 3-cetoreductasa, C24-metiltransferasa, C8-isomerasa, C5-desaturasa, d22-desaturasa y d24-reductasa. Otras enzimas catabólicas incluyen LEU2 (P-isopropilmalato deshidrogenasa), oxidoescualeno ciclase, cimosterol-24-metiltransferasa y ergosta-5,7,24(28)-trienol-22-deshidrogenasa. Tales manipulaciones se divultan, por ejemplo, en la referencia 9.

40    Los niveles de actividad de las enzimas pertinentes pueden aumentarse o disminuirse de cualquier forma adecuada, normalmente mediante ingeniería genética. Las levaduras pueden modificarse genéticamente mediante procedimientos estándar, incluyendo los descritos en las referencias 7 y 10. Los genes puede introducirse en levaduras de distintas formas, por ejemplo en un plásmido, o por integración cromosómica. Las técnicas de inactivación de genes también están bien establecidas para levaduras.

45    Las vías para aumentar la actividad enzimática incluyen, pero no se limitan a: aumentar el número de copias de una enzima que ya está presente en una cepa, por ejemplo añadiendo uno o más genes adicionales, normalmente en un plásmido; aumentando los niveles de expresión (hiperexpresión) de una enzima que ya está presente, por ejemplo dotándola de un promotor más fuerte; añadiendo una enzima heteróloga, es decir una que no esté ya presente en una cepa; disminuyendo o evitando la expresión de un factor supresor o inhibidor; modificando la secuencia de una enzima que ya está presente en una cepa, por ejemplo para aumentar estabilidad, para eliminar residuos de aminoácido que ejercen inhibición, cambiar el tráfico de proteínas o la localización celular; etc. Por ejemplo, se sabe que el truncamiento de una secuencia de una enzima puede hacer que pase de ser una proteína de membrana a una proteína citosólica de forma que provoque la acumulación de escualeno.

50    Las vías para reducir la actividad enzimática incluyen, pero no se limitan a: delección de una enzima que ya está presente en una cepa; disminuir los niveles de expresión de una enzima que ya está presente, por ejemplo dotándola de un promotor más débil; aumentando la expresión de un factor inhibidor o supresor; modificando la secuencia de una

enzima que ya está presente en una cepa, por ejemplo para disminuir la estabilidad, modificar los residuos de aminoácido que median la actividad enzimática, eliminar dominios funcionales, cambiar el tráfico de proteínas o la localización celular; etc.

5 Los niveles de infra o sobreexpresión, y de actividad aumentada o disminuida, se expresan en relación con la cepa silvestre correspondiente que carece de la modificación pertinente.

Existen ya varios informes de manipulaciones genéticas adecuadas en levadura. Por ejemplo, la referencia 11 divulga levaduras con acumulación de escualeno aumentada debida a la hiperexpresión de HMGR con expresión disminuida de cimosterol-24-metiltransferasa y/o ergosta-5,7,24(28)-triol-22-deshidrogenasa. La referencia 12 divulga levaduras que expresan una HMGR truncada (la isoenzima HMG1) a la que le falta su región de unión a membrana, proporcionando así una enzima citosólica, y que presente acumulación de escualeno. La alteración de la escualeno epoxidasa provoca la acumulación de escualeno [13]. La referencia 14 divulga la modificación de *Yarrowia lipolytica* para inhibir la acetil-CoA carboxilasa y para hiperexpresar la HMGR, de forma que las cepas produjeron escualeno al 2% cdw utilizando fuentes de carbono baratas tales como queso, suero o caña de azúcar. La mutación de la oxidoescualeno ciclase (ERG7) también puede causar la acumulación de escualeno [8]. Se ha encontrado que un auxótrofo para ergosterol incapaz que crecer a base de 3-cetosteroles sin la adición de colesterol acumula escualeno [15]. Las cepas de levadura con deficiencias en la síntesis del hemo pueden acumular escualeno [16].

Puede utilizarse una combinación de estos enfoques, por ejemplo la expresión de HMGR truncada citosólica en combinación con la inactivación de la escualeno epoxidasa.

20 Se prefieren las cepas de *S.cerevisiae* que expresan HMGR truncada, tales como las descritas en la referencia 12. La expresión de una forma soluble no unida a membrana de HMG1, idealmente bajo el control de un promotor constitutivo (por ejemplo, un promotor ADH1), conduce a un nivel alto de acumulación escualeno (40x tipo silvestre). La proteína truncada puede contener parte de la región espaciadora y el dominio catalítico C-terminal de HMG1p pero carecer de la región N-terminal de anclaje a la membrana. Una cepa puede expresar una o más copias del gen.

25 La levadura (natural, mutante o modificada) puede crecerse en presencia de factores que aumentan el rendimiento de escualeno. Por ejemplo, los antimicóticos de alilamina (por ejemplo, terbinafina, naftifina) pueden inhibir la escualeno epoxidasa dando como resultado una deficiencia de ergosterol y una acumulación de escualeno intracelular [17]. Si los inhibidores de la escualeno epoxidasa están incluidos en un nivel subletal, o se utilizan con cepas resistentes, etc., el rendimiento de escualeno de un cultivo puede aumentar. Un aumento del rendimiento de escualeno de ~100 veces se observó en la referencia 18 en presencia de terbinafina. Las escualeno epoxidadas en distintas especies de *Candida* difieren en la sensibilidad a la terbinafina en un factor de aproximadamente 10, de modo que la concentración de un factor puede tener que optimizarse para cualquier levadura de interés. Otros antimicóticos que pueden causar la acumulación de escualeno incluyen, pero no se limitan a, voriconazol [19], 6-amino-2-n-pentiltiobenzotiazol [20], y antimicóticos de tiocarbamato (por ejemplo, tolnaftato y tolciclato) [21]. El crecimiento en presencia de tiamina también puede aumentar el rendimiento de escualeno [22].

35 Las levaduras adecuadas incluyen cualquier levadura que produzca escualeno o que puede ser manipulada para producir escualeno. Los ejemplos de levaduras adecuadas incluyen especies del género *Arthroascus*, *Arxiozyma*, *Arxula*, *Bullera*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Dipodascopsis*, *Endomyces*, *Eremothecium*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Hormoascus*, *Issatchenkia*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Lodderomyces*, *Metschnikowia*, *Pachysolen*, *Pachytichospora*, *Pichia*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizoblastosporion*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Sporobolomyces*, *Sterigmatomyces*, *Sympodiomyces*, *Taphrina*, *Torula*, *Torulaspora*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, *Zygohansenula*, y *Zygosaccharomyces*. Los géneros útiles para la invención son *Saccharomyces*, y *Torulaspora*. Una especie preferida para usar con la invención es *Torulaspora delbrueckii* y la más preferida es *Saccharomyces cerevisiae*.

45 La fermentación de levaduras para producir escualeno puede llevarse a cabo a gran escala, proporcionando cantidades casi ilimitadas de escualeno y, por tanto, reduciendo el coste unitario del escualeno producido. La levadura puede crecerse usando cualquier cultivo o sistema de fermentación conocido. Los sistemas de fermentación de levaduras adecuados para su uso en el invención incluyen sistemas de fermentación por lotes y continuos. Puede utilizarse un sistema de cultivo en dos etapas. La levadura puede crecerse bajo condiciones aerobias para aumentar la biomasa antes de cambiarlas a una (al menos parcialmente) fase anaerobia para aumentar la producción de escualeno. Un sistema de cultivo en dos etapas permite separar la acumulación de escualeno de la fase de crecimiento. El cultivo de levadura bajo condiciones anaeróbicas puede utilizarse para aumentar la producción de escualeno [23-25], y las fuentes de carbono también pueden influir.

55 Debido a que la levadura puede crecerse en un medio controlado, puede asegurarse que un cultivo esté libre de agentes causantes de enfermedades, toxinas ambientales y otros contaminantes. Los medios adecuados para crecer levadura dependerán de la especie de levadura y el sistema de fermentación. Los medios adecuados incluyen medios ricos o mínimos, con y sin suplementos. Por ejemplo, la levadura puede crecerse en MM, EMM, YPD, YPDS, YPG, YPGS, YT, YAPD, YEPD, YPL, YEP, YNBD y SD. Se emplean medios libres de cualquier producto de origen animal (por ejemplo, suero).

Debido al control de las condiciones de cultivo, el escualeno purificado a partir de levadura de acuerdo con la invención está libre de contaminación por patógenos, productos metabólicos de patógenos, toxinas y otras sustancias perjudiciales, y está a priori libre de agentes que provocan EET (tales agentes no se encuentran en levaduras). Los procedimientos para aislar escualeno a partir de levadura son conocidos en la técnica e incluyen procedimientos tales como cromatografía, extracción de disolvente líquido-líquido, extracción con gas subcrítico [26], y extracción con fluidos supercríticos (opcionalmente precedida por liofilización), por ejemplo utilizando CO<sub>2</sub>, extracción de disolvente cloroformo-metanol [5,23,27]. En condiciones ideales, el escualeno purificado tiene una pureza mayor del 97% (en peso), más preferiblemente, mayor del 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,99%, incluso del 100%. Idealmente, el escualeno purificado contiene menos de 6153 pg de PCB/dioxina por gramo de escualeno, medido como equivalentes tóxicos (TEQ). Los TEQ permiten que la toxicidad de una mezcla de PCBs/dioxinas se represente como un único número. La toxicidad de cada PCB (bifenilo policlorado) se expresa como una fracción (el factor de equivalencia tóxica, TEF; OMS 2005) de la toxicidad de la dioxina 2,3,7,8-TCDD (que tiene un valor de referencia de 1). Para calcular el TEQ total de una mezcla, la masa de cada PCB se multiplica por su TEF y luego el TEQ es la suma de estos valores. Por ejemplo, el escualeno puede tener niveles de dioxina/PCB de menos de 5000 pg/g, 4000 pg/g, 3000 pg/g, 2000 pg/g, 1000 pg/g, 500 pg/g, 100 pg/g, 50 pg/g (TEQ).

Una vez que el escualeno se ha purificado a partir de la levadura se utiliza para la preparación de adyuvantes de emulsión de aceite en agua.

#### ***Emulsiones de aceite en agua***

Se ha encontrado que las emulsiones de aceite en agua son particularmente adecuadas para su uso como adyuvantes en vacunas. Las emulsiones preparadas de acuerdo con la invención incluyen escualeno y al menos un tensioactivo, además de un componente acuoso. Las emulsiones pueden contener aceites adicionales. En condiciones ideales, el/los aceite(s) y el tensioactivo(s) son biodegradables (metabolizables) y biocompatibles.

Pueden usarse combinaciones oleosas de escualeno y tocoferoles. Cuando un composición incluye un tocoferol, puede utilizarse cualquiera de los α, β, γ, δ, ε o ζ tocoferoles, pero se prefieren los α-tocoferoles. El tocoferol puede adquirir diversas formas, por ejemplo distintas sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Pueden utilizarse tanto D-α-tocoferol como DL-α-tocoferol. Un α-tocoferol preferido es el DL-α-tocoferol.

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

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

Los tensioactivos pueden clasificarse por sus 'HLB' (relación hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferiblemente al menos 15, y más preferiblemente al menos 16. La invención puede utilizarse con tensioactivos que incluyen, pero no limitados a: los tensioactivos de ésteres de polioxietilen sorbitán (comúnmente denominados Tween), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), comercializados bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales copolímeros de bloque lineales EO/PO; octoxinol, que puede variar en el número de repeticiones de los grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo), siendo el octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolioxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); nonilfenol etoxilatos, tales como la serie NP de Tergitol™; éteres grasos de polioxietileno derivados de lauril, cetil, estearil y oleil alcoholes (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietileneglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitán (conocidos comúnmente como los SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Se prefieren los tensioactivos no iónicos. El tensioactivo más preferido para incluir en la emulsión es el polisorbato 80 (monooleato de polioxietileno de sorbitán; Tween 80).

Pueden utilizarse mezclas de tensioactivos, por ejemplo mezclas de Tween 80/Span 85. Una combinación de un éster de polioxietileno sorbitán y un octoxinol también es adecuada. Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol.

Las cantidades de tensioactivos preferidas (% en peso) son: ésteres de polioxietileno sorbitán (tales como Tween 80) 0,01 a 2%; octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Triton X-100, u otros detergentes de la serie Triton) 0,001 a 0,1%; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) 0,1 a 20%.

Se prefieren las emulsiones de aceite en agua que contienen escualeno que contienen el tensioactivo polisorbato 80. Los adyuvantes de emulsiones de aceite en agua específicos que pueden fabricarse utilizando escualeno purificado de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión submicrométrica de escualeno, polisorbato 80, y trioleato de sorbitán. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente el 5% de escualeno, de aproximadamente el 0,5% de polisorbato 80 y aproximadamente el 0,5% de Span 85. En términos de peso, estas relaciones se convierten en

un 4,3% de escualeno, un 0,5% de polisorbato 80 y un 0,48% de Span 85. Este adyuvante es conocido como 'MF59' [28-30], como se describe con más detalle en el capítulo 10 de la ref. 31 y capítulo 12 de la ref. 32. De forma ventajosa, la emulsión de MF59 incluye iones citrato, por ejemplo tampón citrato sódico 10mM.

- 5        • Una emulsión submicrométrica de escualeno, un tocoferol, y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener de un 2 a un 10% de escualeno, de un 2 a un 10% tocoferol y de un 0,3 a un 3% de polisorbato 80, y la relación en peso de escualeno:tocoferol es preferiblemente  $\leq 1$  (por ejemplo, 0,90) ya que esto puede proporcionar una emulsión más estable. El escualeno y el polisorbato 80 pueden estar presentes en una relación de volumen de aproximadamente 5:2 o en una relación en peso de aproximadamente 11:5. Un emulsión de este tipo puede fabricarse disolviendo Tween 80 en PBS para dar una disolución al 2%, mezclando después 90ml de esta disolución con una mezcla de (5 g de DL- $\alpha$ -tocoferol y 5 ml de escualeno), y microfluidizando la mezcla después. La emulsión resultante tiene gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo con un diámetro medio de entre 100 y 250 nm, de aproximadamente 180 nm. La emulsión también pueden incluir un monofosforil lípido A 3-O-desacilado (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 [33].

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

- 20      • Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrofílico de alquiléter de polioxietileno (por ejemplo polioxietilen(12)cetoestearil éter) y un tensioactivo no iónico hidrofóbico (por ejemplo un éster de sorbitán o un éster de manitán, tal como monooleato de sorbitán o 'Span 80'). La emulsión es preferiblemente termorreversible y/o tiene al menos un 90% de gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño de menos de 200 nm [34]. La emulsión también pueden incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. La emulsión pueden incluir un agonista TLR4 [35]. Tales emulsiones puede liofilizarse.

- 25      • Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil-Care [36]. La concentración final (peso) de estos componentes en las vacunas adyuvadas son 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; triglicéridos caprílico/cáprico).

30      Las emulsiones pueden mezclarse con un componente separado que contiene antígeno de forma extemporánea, en el momento de la administración, o durante la fabricación de la vacuna. Cuando estos dos componentes son líquidos, entonces la relación de volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (por ejemplo entre 5:1 y 1:5) pero generalmente es de aproximadamente 1:1.

35      Por lo tanto, un procedimiento de la invención pueden incluir una etapa adicional de combinar la emulsión con un inmunógeno. El procedimiento pueden incluir una etapa adicional de envasado de la emulsión o la mezcla emulsión/inmunógeno. Un emulsión producida de acuerdo con la invención puede envasarse en un primer contenedor dentro de un kit, donde el kit incluye un segundo contenedor que incluye un inmunógeno. Los contenidos de los dos contenedores pueden mezclarse y administrarse después a un sujeto (por ejemplo un humano) o pueden coadministrarse por separado.

#### **General**

El término "que comprende" engloba "que incluye" así como "constituido por" por ejemplo un composición "que comprende" X puede estar constituida exclusivamente por X o pueden incluir algo adicional por ejemplo X+Y.

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

#### **Modos de realización de la invención**

45      Se preparan diversas cepas mutantes de levadura mediante técnica de ingeniería genética. Las cepas mutantes, o bien sobreexpresan o bien infraexpresan enzimas implicados en el metabolismo del escualeno. Una de tales de levaduras es la cepa ATC1551 divulgada en la referencia 11, que puede producir escualeno hasta el 16% cdw bajo condiciones de crecimiento adecuadas.

Después del cultivo, las células cultivadas se recogen y se rompen utilizando un molino de perlas de vidrio. Se purifica el escualeno a partir del lisado, bien por extracción de disolvente con cloroformo-metanol (2:1) o, para mejorar el rendimiento, mediante el procedimiento divulgado en la referencia 5 utilizando liofilización y después extracción con dióxido de carbono supercrítico. El escualeno resultante es de alta pureza (>95%).

50      El escualeno purificado se combina con una mezcla de tensioactivos Tween 80 y Span 85 y con un tampón citrato para preparar una mezcla que tiene un 5% de escualeno, un 0,5% de Tween 80 y un 0,5% de Span 85 (en volumen). Esta mezcla se microfluidiza para preparar una emulsión que tiene un tamaño medio de gotita de menos de 500 nm. Esta emulsión, conocida como 'MF59', puede utilizarse como un adyuvante de vacuna.

## REFERENCIAS

- [1] Borucinska & Frasca (2002) J Fish Diseases 25: 287-98.
- [2] Bertone y cols. (1996) J Fish Diseases 19:429-34.
- [3] Briones y cols. (1998) J Vet Med B 45:443-5.
- 5 [4] Blagovic y cols. (2001) Food technol. Biotechnol. 39:175-81.
- [5] Bhattacharjee y al (2003) World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19:605-608.
- [6] Boeke y cols., (1984) Mol. Gen. Genet., 197: 345-346
- [7] Sherman y cols., (1986) Methods and Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- [8] Germann y cols. (2005) J Biol Chem 280:35904-13.
- 10 [9] Veen y cols. (2003) FEMS Yeast Research 4: 87-95.
- [10] Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor [11] patente de EE. UU. 5460949.
- [12] Polakowski y cols. (1998) Appl Microbiol Biotech-nol 49(1):66-71.
- [13] Pasrija y cols. (2005) J Antimicrob Chemother. 55(6):905-13.
- 15 [14] Performance of the Third 50 Completed ATP Projects (2006) NIST SP 950-4, páginas 59-62.
- [15] Gachotte y cols. (1999) PNAS EE. UU. 96:12655-60.
- [16] Ness y cols. (1998) J Bacteriol. 180(7):1913-9.
- [17] Ryder y cols. (1985) Biochem J. 230:765-770
- [18] Leber y cols. (2001) European Journal of Biochemistry 268:914-924.
- 20 [19] Sanati y cols. (1997) Antimicrob Agents Chemother. 41(11):2492-6.
- [20] Kuchta y cols. (1997) FEMS Microbiol Carta 150: 43-7.
- [21] Ryder y cols. (1986) Antimicrob Agents Chemother 20:858-60.
- [22] Nishikawa y cols. (1978) Biochim Biophys Acta 531(1):86-95.
- [23] Bhattacharjee y cols., (2001) World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17: 811-816
- 25 [24] Jahnke & Klein (1983) J Bacteriol 155:488-92.
- [25] Valero y cols. (2001) J Bioscience Bioengin 92: 33-8.
- [26] WO94/26683.
- [27] Foch y cols., (1957) Journal of Biological Chemistry, 226: 497-509. [28] WO90/14837.
- [29] Podda y Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
- 30 [30] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
- [31] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [32] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de la serie Methods in Molecular Medicine). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- 35 [33] WO2008/043774. [34] US-2007/0014805. [35] US-2007/0191314.
- [36] Suli y cols. (2004) Vaccine 22(25-26):3464-9.
- [37] Spanova y cols. (2008) Resumen PO42, Chemistry and Physics of Lipids 154 S:S32-S36.

[38] Chang y cols. (2008) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:963-972.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para preparar un adyuvante de emulsión de aceite en agua, que comprende las etapas de:
  - (a) purificar escualeno a partir de una levadura que produce un alto rendimiento de escualeno durante el cultivo, en el que la levadura se crece en un medio controlado libre de productos de origen animal; y
  - (b) combinar el escualeno purificado en la etapa (a) con un componente acuoso para formar el adyuvante de emulsión de aceite en agua.
2. Un procedimiento para preparar un adyuvante de emulsión de aceite en agua, que comprende las etapas de:
  - (a) obtener escualeno que se ha purificado a partir de una levadura que produce un alto rendimiento de escualeno durante el cultivo, en el que la levadura se crece en un medio controlado libre de productos de origen animal; y
  - (b) combinar el escualeno de la etapa (a) con un componente acuoso para formar el adyuvante de emulsión de aceite en agua.
3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la levadura produce escualeno a ≥ 5% de peso seco celular.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la levadura es una *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la levadura expresa una enzima HMGR truncada que tiene una localización citosólica.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la levadura es una cepa modificada que, con respecto a una cepa madre no modificada, hiperexpresa HMGR.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la levadura es una cepa modificada que, con respecto a una cepa madre no modificada, infraexpresa la cimosterol-24-metiltransferasa y/o la ergosta-5,7,24(28)-triol-22-deshidrogenasa.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la levadura expresa una oxidoescualeno ciclase mutante.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la levadura tiene una escualeno epoxidasa alterada.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la levadura se crece en presencia de factores que aumentan el rendimiento de escualeno durante el cultivo, por ejemplo en el que el factor es alilamina, voriconazol, 6-amino-2-n-pentiltiobenzotiazol, tiamina, o un tiocarbamato.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la levadura se crece en condiciones parcial o totalmente anaeróbicas antes de la purificación del escualeno.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el escualeno tiene una pureza mayor del 97% (en peso).
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la emulsión de aceite en agua tiene gotitas de aceite con un diámetro submicrométrico, en el que la emulsión de aceite en agua es una emulsión microfluidizada, y/o en el que la emulsión de aceite en agua comprende escualeno y polisorbato 80.
14. Un procedimiento para preparar una vacuna para uso por vía parenteral en seres humanos, que comprende una etapa de preparación de un adyuvante de emulsión de aceite en agua por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y la mezcla del adyuvante de emulsión con un inmunógeno.
15. Un procedimiento para preparar un kit para la preparación de una composición inmunogénica, que comprende preparar una emulsión de aceite en agua mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, envasar la emulsión en un primer contenedor, y combinar el primer contenedor en forma de kit con un segundo contenedor, en el que el segundo contenedor contiene un inmunógeno.