

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2009.08.28	(73) Titular(es): NOVARTIS AG	
(30) Prioridade(s): 2008.08.28 US 190486 P	LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL	CH
(43) Data de publicação do pedido: 2011.01.05	(72) Inventor(es): MICHAEL BROEKER	DE
(45) Data e BPI da concessão: 2011.06.22 167/2011	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA	PT
	AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA	

(54) Epígrafe: **PRODUÇÃO DE ESQUALENO A PARTIR DE LEVEDURAS HIPERPRODUTORAS**

(57) Resumo:

REVELA-SE UM PROCEDIMENTO PARA A PREPARAÇÃO DE LEVEDURA PURIFICADA, EM QUE A FONTE DE ESQUALENO É UMA ENZIMA QUE HIPERPRODUZ ESQUALENO. O ESQUALENO É ÚTIL PARA FINS FARMACÊUTICOS. POR EXEMPLO, PODE SER USADO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA EMULSÃO DE ÓLEO EM ÁGUA, E A EMULSÃO É ESPECIALMENTE ADEQUADA PARA SER USADA COMO ADJUVANTE IMUNOLÓGICO.

RESUMO**"Produção de esqualeno a partir de leveduras
hiperprodutoras"**

Revela-se um procedimento para a preparação de levedura purificada, em que a fonte de esqualeno é uma enzima que hiperproduz esqualeno. O esqualeno é útil para fins farmacêuticos. Por exemplo, pode ser usado para a preparação de uma emulsão de óleo em água, e a emulsão é especialmente adequada para ser usada como adjuvante imunológico.

DESCRIÇÃO

"Produção de esqualeno a partir de leveduras hiperprodutoras"

Área Técnica

Esta invenção enquadra-se na área do fabrico de esqualeno destinado a ser utilizado em adjuvantes de emulsão de óleo em água.

Técnica Anterior

O óleo de fígado de tubarão contém um terpenóide insaturado chamado esqualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno. É conhecida a utilização do esqualeno em emulsões de óleo em água em vacinas humanas como, por exemplo, a emulsão MF59 que é utilizada como adjuvante em vacinas da gripe. O esqualeno também é usado noutros produtos farmacêuticos (por exemplo: unguentos, supositórios) e em cosméticos.

As fontes actuais do esqualeno são, principalmente, óleos de peixe e, em particular, óleos de fígado de tubarão. Pode haver problemas associados ao uso de esqualeno extraído a partir de óleo de fígado de tubarão, particularmente se as normas rigorosas de fabrico (tais como as utilizadas durante a produção de MF59 pela Novartis) não forem respeitadas. Por exemplo, os tubarões podem estar infestados por elementos patogénicos que também são infecciosos no caso dos seres humanos ou que produzem substâncias que são nocivas para os seres humanos, e podem existir agentes de tubarão de EET ou do tipo EET [por exemplo, referências 1-3]. Além disso, os tubarões podem conter toxinas humanas, tais como a toxina

carcha. Por isso, as fontes de esqualeno baratas de baixa qualidade não são adequadas para uso farmacêutico humano. O risco de danos num receptor humano pode aumentar em situações em que o esqualeno faça parte de um adjuvante imunológico porque, por definição, o adjuvante pode induzir uma forte resposta imune indesejável contra a impureza.

Por isso, em vez de se usarem fontes de esqualeno derivado de tubarões baratas e de baixa qualidade, os usos farmacêuticos do esqualeno (por exemplo, tal como utilizado no fabrico de MF59) utilizam um material de melhor qualidade, mas estes esqualenos de alta qualidade são caros e a sua disponibilidade é limitada. Tais fontes caras não são úteis, por exemplo, para serem utilizadas no mundo em vias de desenvolvimento.

Seria útil que se descobrisse uma fonte de esqualeno que satisfizesse estes altos níveis farmacêuticos mas não tão dispendiosa. É por isso desejável uma fonte de esqualeno alternativa viável, particularmente quando o esqualeno se destina a ser usado num adjuvante imunológico. Uma fonte de esqualeno de grau farmacêutico mais barata seria particularmente útil para países em vias de desenvolvimento que não têm acesso fácil a tubarões ou não se podem permitir facilmente o uso do material dispendioso de grau farmacêutico actualmente utilizado, por exemplo, pela Novartis. Uma eventual fonte é a das leveduras [5, 37, 38].

Descrição da invenção

A invenção refere-se a procedimentos para a preparação de esqualeno a partir de leveduras que

hiperproduzem esqualeno. As leveduras são organismos GRAS (geralmente considerados como de uso seguro) e como tais constituem uma fonte útil de esqualeno para uso farmacêutico. Além disso, o esqualeno pode ser preparado livre de contaminação por elementos patogênicos, priões e toxinas ambientais; por exemplo, as leveduras estão, *a priori*, livres de mercúrio. Na área das vacinas já se usam as leveduras (por exemplo, para a expressão recombinante do antigénio de superfície do vírus da hepatite B) e, por isso, não representam qualquer preocupação reguladora específica, isto é, o esqualeno derivado de leveduras é especialmente adequado para ser utilizado na preparação de adjuvantes imunológicos. Finalmente, as técnicas de cultivo de leveduras estão generalizadas e são facilmente adaptáveis à transferência de tecnologia.

A invenção proporciona um procedimento para a preparação de um adjuvante de emulsão de óleo em água, que compreende as etapas seguintes: (a) purificar esqualeno a partir de uma levedura que produz um alto rendimento de esqualeno durante o cultivo; e (b) combinar o esqualeno purificado da etapa (a) com um componente aquoso para formar a emulsão de óleo em água. A invenção também proporciona um procedimento para a preparação de um adjuvante de emulsão de óleo em água, que compreende as etapas seguintes:

(a) purificar esqualeno a partir de uma levedura que produz um alto rendimento de esqualeno durante o cultivo; e

(b) combinar o esqualeno da etapa (a) com um componente aquoso para formar a emulsão de óleo em água. As leveduras são desenvolvidas em meios controlados,

livres de produtos de origem animal.

A invenção também proporciona um procedimento para a preparação de uma composição imunogénica (por exemplo, uma vacina), que compreende a preparação de uma emulsão de óleo em água tal como anteriormente descrito, e a mistura da emulsão com um imunogénio.

A invenção também proporciona um procedimento para a preparação de um kit para a preparação de uma composição imunogénica desta forma, que compreende a preparação de uma emulsão de óleo em água, tal como anteriormente descrito, a embalagem da composição num primeiro recipiente, e a combinação do primeiro recipiente em forma de kit com um segundo recipiente, em que o segundo recipiente contém um imunogénio. O imunogénio pode estar em forma seca ou aquosa.

Produção de esqualeno em levedura

A invenção utiliza esqualeno que foi purificado a partir de levedura. As leveduras podem ser estirpes naturais ou mutantes que são seleccionadas por um alto rendimento de esqualeno, mas em geral serão estirpes geneticamente modificadas que foram manipuladas para produzirem altos rendimentos de esqualeno. Outra possibilidade consiste em cultivar estirpes de leveduras naturais, mutantes ou modificadas na presença de factores que resultam num aumento do rendimento de esqualeno.

O rendimento de esqualeno pode ser expresso como uma % do peso seco celular (cdw) numa levedura particular. Uma estirpe normal de levedura de tipo selvagem *Yarrowia lipolytica* pode produzir tipicamente esqualeno aproximadamente a 0,5% cdw, enquanto uma levedura de cerveja normal *Saccharomyces uvarum* pode produzir esqualeno

aproximadamente a 1,4% cdw [4]. Uma levedura que produz um "alto rendimento" de esqualeno é uma levedura em que pelo menos 2% cdw são esqualeno, por exemplo: $\geq 3\%$, $\geq 4\%$, $\geq 5\%$, $\geq 6\%$, $\geq 7\%$, $\geq 8\%$, $\geq 9\%$, $\geq 10\%$, $\geq 11\%$, $\geq 12\%$, $\geq 13\%$, $\geq 14\%$, $\geq 15\%$ ou mais de cdw.

O rendimento de esqualeno também pode ser expresso como uma % dos lípidos totais numa levedura particular. Uma levedura da cerveja normal *S.uvarum* produz esqualeno a 33% dos lípidos totais [4]. Uma levedura que produz um "alto rendimento" de esqualeno pode produzir esqualeno a $>40\%$ dos lípidos totais, por exemplo: $>50\%$, $>60\%$, etc.

De forma vantajosa, o esqualeno está, pelo menos em 95%, na sua configuração trans (isoforma natural), por exemplo: $>96\%$, $>97\%$, $>98\%$, $>99\%$, ou 100%.

As estirpes de levedura mutantes naturais que têm um alto rendimento de esqualeno são conhecidas na técnica como, por exemplo, a estirpe *Torulasopra delbrueckii* descrita na referência 5. Os mutantes podem ser obtidos por procedimentos bem conhecidos de indução de mutações (quer mutagénesse aleatória quer dirigida) como, por exemplo, os descritos nas referências 6 e 7, seguidos da crivagem das células que sofreram mutagénesse para se seleccionarem as que apresentam um alto rendimento de esqualeno adequado. A referência 8 descreve estirpes de levedura mutantes com mutações sensíveis à temperatura da 4- α -carboxiesterol-C3-desidrogenase (ERG26) que provoca a acumulação de esqualeno quando se desenvolvem a uma temperatura apropriada.

No entanto, normalmente a invenção usará leveduras geneticamente modificadas. Podem ser utilizados diversos procedimentos para o aumento do rendimento de esqualeno de uma estirpe de partida. O metabolismo dos esteróis pode ser

manuseado para se aumentarem os rendimentos de esqualeno, por exemplo, aumentando o anabolismo do esqualeno e/ou diminuindo o catabolismo do esqualeno (incluindo a sua degradação e/ou a sua conversão natural a ergosterol). Os genes envolvidos na biossíntese de esqualeno incluem mevalonato cinase, fosfomevalonato cinase, pirofosfomevalonato descarboxilase, isopentenil pirofosfato isomerase, HMGR (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase), e esqualeno sintase. Os genes envolvidos na conversão de esqualeno a ergosterol incluem esqualeno epoxidase (ERG1), lanosterol sintase, C14-dimetilase, d14-redutase, C4-metiloxidase, C4-descarboxilase (ERG26), 3-cetorredutase, C24-metiltransferase, C8-isomerase, C5-dessaturase, d22-dessaturase e d24-redutase. Outras enzimas catabólicas incluem LEU2 (P-isopropilmalato desidrogenase), oxidoesqualeno ciclase, cimosterol-24-metiltransferase e ergosta-5,7,24(28)-trienol-22-desidrogenase. Tais manipulações são divulgadas, por exemplo, na referência 9.

Os níveis de actividade das enzimas pertinentes podem ser aumentados ou diminuídos de qualquer forma adequada, normalmente mediante engenharia genética. As leveduras podem ser geneticamente modificadas mediante procedimentos standard, incluindo os descritos nas referências 7 e 10. Os genes podem ser introduzidos em leveduras de diferentes formas como, por exemplo, num plasmídeo, ou por integração cromossómica. As técnicas de inactivação de genes também estão bem estabelecidas para leveduras.

As vias para o aumento da actividade enzimática incluem, mas não se limitam a: aumentar o número de cópias de uma enzima que já está presente numa estirpe, por exemplo, adicionando um ou mais genes, normalmente num

plasmídeo; aumentar os níveis de expressão (hiperexpressão) de uma enzima que já está presente, por exemplo, dotando-a de um promotor mais forte; adicionar uma enzima heteróloga, isto é, uma enzima que ainda não esteja presente numa estirpe; diminuir ou evitar a expressão de um factor supressor ou inibidor; modificar a sequência de uma enzima que já está presente numa estirpe, por exemplo, para aumentar a estabilidade, para eliminar resíduos de aminoácido que exercem inibição, alterar o tráfego de proteínas ou a localização celular, etc. Por exemplo, sabe-se que o truncamento de uma sequência de uma enzima pode fazer com que ela passe de uma proteína de membrana a uma proteína citosólica de forma que provoque a acumulação de esqualeno.

As vias para a redução da actividade enzimática incluem, mas não se limitam a: deleção de uma enzima que já está presente numa estirpe; diminuição dos níveis de expressão de uma enzima que já está presente, por exemplo, dotando-a de um promotor mais fraco; aumentar a expressão de um factor inibidor ou supressor; modificar a sequência de uma enzima que já está presente numa estirpe, por exemplo, para diminuir a estabilidade, modificar os resíduos de aminoácido que medeiam a actividade enzimática, eliminar domínios funcionais, alterar o tráfego de proteínas ou a localização celular; etc.

Os níveis de sub- ou sobre-expressão, e de actividade aumentada ou deficiente, expressam-se relativamente à estirpe de tipo selvagem correspondente que não tem modificação pertinente.

Já existem vários relatórios de manipulações genéticas adequadas em levedura. Por exemplo, a referência 11 divulga

leveduras com acumulação de esqualeno aumentada devida à hiperexpressão de HMGR com expressão deficiente de cimosterol-24-metiltransferase e/ou ergosta-5,7,24(28)-trienol-22-desidrogenase. A referência 12 divulga leveduras que expressam uma HMGR truncada (a isoenzima HMG1) à qual falta a sua região de união à membrana, proporcionando desta forma uma enzima citosólica, e que apresenta acumulação de esqualeno. A alteração da esqualeno epoxidase provoca a acumulação de esqualeno [13]. A referência 14 divulga a modificação de *Yarrowia lipolytica* para inibição da acetil-CoA carboxilase e para hiperexpressão de HMGR, de forma que as estirpes produziram esqualeno a 2% cdw utilizando fontes de carbono baratas tais como queijo, soro ou cana-de-açúcar. A mutação da oxidoesqualeno ciclase (ERG7) também pode causar a acumulação de esqualeno [8]. Descobriu-se que um auxótrofo para ergosterol incapaz de crescer à base de 3-cetosteróis sem a adição de colesterol acumula esqualeno [15]. As estirpes de levedura com deficiências na síntese do hemo podem acumular esqualeno [16].

Pode-se utilizar uma combinação destas focagens como, por exemplo, a expressão de HMGR truncada citosólica em combinação com a inativação da esqualeno epoxidase.

Dá-se preferência às estirpes de *S.cerevisiae* que expressam HMGR truncada, tais como as descritas na referência 12. A expressão de uma forma solúvel não unida a membrana de HMG1, idealmente sob o controlo de um promotor constitutivo (por exemplo, um promotor ADH1), conduz a um alto nível de acumulação de esqualeno (40x tipo de tipo selvagem). A proteína truncada pode conter parte da região espaçadora e o domínio catalítico C-terminal de HMG1p mas

não ter a região N-terminal de fixação à membrana. Uma estirpe pode expressar uma ou mais cópias do gene.

A levedura (natural, mutante ou modificada) pode ser desenvolvida na presença de factores que aumentem o rendimento de esqualeno. Por exemplo, os antimicóticos de alilamina (por exemplo: terbinafina, naftifina) podem inibir a esqualeno epoxidase dando como resultado uma falta de ergosterol e uma acumulação de esqualeno intracelular [17]. Se os inibidores da esqualeno epoxidase estiverem incluídos num nível subletal, ou se forem utilizados com estirpes resistentes, etc., o rendimento de esqualeno de um cultivo pode aumentar. Foi observado um aumento do rendimento de esqualeno de ~100 vezes na referência 18 na presença de terbinafina. As esqualeno epoxidases em diferentes espécies de *Candida* diferem na sensibilidade à terbinafina num factor de aproximadamente 10, de modo que a concentração de um factor pode ter que ser optimizada para qualquer levedura de interesse. Outros antimicóticos que podem causar a acumulação de esqualeno incluem, mas não se limitam a, voriconazol [19], 6-amino-2-n-pentiltiobenzotiazol [20], e antimicóticos de tiocarbamato (por exemplo, tolnaftato e tolciclato) [21]. O desenvolvimento na presença de tiamina também pode aumentar o rendimento de esqualeno [22].

As leveduras adequadas incluem qualquer levedura que produza esqualeno ou que possa ser manipulada para produzir esqualeno. Os exemplos de leveduras adequadas incluem espécies do 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*, *Saccharomycodes*, *Schizoblastosporion*, *Schizosaccharomyces*, *Schwaniomyces*, *Sporobolomyces*, *Sterigmatomyces*, *Sympodiomyces*, *Taphrina*, *Torula*, *Torulaspora*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, *Zygo Hansenula*, e *Zygosaccharomyces*. Os géneros úteis para a invenção são a *Saccharomyces*, e a *Torulaspora*. Uma espécie preferida para uso com a invenção é a *Torulaspora delbrueckii* e a mais preferida é a *Saccharomyces cerevisiae*.

A fermentação de leveduras para a produção de esqualeno pode ser efectuada em grande escala, proporcionando quantidades quase ilimitadas de esqualeno e, por isso, reduzindo o custo unitário do esqualeno produzido. A levedura pode ser desenvolvida usando qualquer cultivo ou sistema de fermentação conhecido. Os sistemas de fermentação de leveduras adequados para serem utilizados na invenção incluem sistemas de fermentação por lotes e contínuos. Pode-se utilizar um sistema de cultivo em duas etapas. A levedura pode ser desenvolvida sob condições aeróbias para se aumentar a biomassa antes de ser mudada para uma fase anaeróbia (pelo menos parcialmente) para se aumentar a produção de esqualeno. Um sistema de cultivo em duas etapas permite a separação da acumulação de esqualeno da fase de crescimento. O cultivo de levedura sob condições anaeróbicas pode ser utilizado para o aumento da produção de esqualeno [23-25], e as fontes de carbono também podem influir.

Devido ao facto de a levedura poder ser desenvolvida num meio controlado, pode-se ter a certeza de que um

cultivo está livre de agentes causadores de doenças, toxinas ambientais e outros contaminantes. Os meios adequados para o desenvolvimento de levedura dependerão da espécie de levedura e do sistema de fermentação. Os meios adequados incluem meios ricos ou mínimos, com e sem suplementos. Por exemplo, a levedura pode ser desenvolvida em MM, EMM, YPD, YPDS, YPG, YPGS, YT, YAPD, YEPD, YPL, YEP, YNBD e SD. Utilizam-se meios livres de qualquer produto de origem animal (por exemplo, soro).

Devido ao controlo das condições de cultivo, o esqualeno purificado a partir de levedura de acordo com a invenção está livre de contaminação por elementos patogénicos, produtos metabólicos de elementos patogénicos, toxinas e outras substâncias prejudiciais, e *a priori* está livre de agentes que provocam EET (tais agentes não se encontram nas leveduras). Os procedimentos para o isolamento de esqualeno a partir de levedura são conhecidos na técnica e incluem procedimentos tais como cromatografia, extracção de solvente líquido-líquido, extracção com gás subcrítico [26] e extracção com fluidos supercríticos (opcionalmente precedida de liofilização), por exemplo, utilizando CO₂, extracção de solvente clorofórmio-metanol [5,23,27]. Em condições ideais, o esqualeno purificado tem uma pureza superior a 97% (em peso), mais preferivelmente superior a 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,99%, e inclusivamente de 100%. Idealmente, o esqualeno purificado contém menos de 6153 pg de PCB/dioxina por grama de esqualeno, medido como equivalentes tóxicos (TEQ). Os TEQ permitem que a toxicidade de uma mistura de PCB's/dioxinas seja representada como um único número. A toxicidade de cada PCB (bifenilo policlorado) é expressa como uma fracção (o

factor de equivalência tóxica, TEF; OMS 2005) da toxicidade da dioxina 2,3,7,8-TCDD (que tem um valor de referência de 1). Para calcular o TEQ total de uma mistura, multiplica-se a massa de cada PCB pelo seu TEF e depois o TEQ é a soma destes valores. Por exemplo, o esqualeno pode ter níveis 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).

Depois de o esqualeno ter sido purificado a partir da levedura, é utilizado para a preparação de adjuvantes de emulsão de óleo em água.

Emulsões de óleo em água

Descobriu-se que as emulsões de óleo em água são particularmente adequadas para serem utilizadas como adjuvantes em vacinas. As emulsões preparadas de acordo com a invenção incluem esqualeno e pelo menos um tensioactivo, além de um componente aquoso. As emulsões podem conter óleos adicionais. Em condições ideais, o(s) óleo(s) e o(s) tensioactivo(s) são biodegradáveis (metabolizáveis) e biocompatíveis.

Podem ser usadas combinações oleosas de esqualeno e tocoferóis. Quando uma composição inclui um tocoferol, pode ser utilizado qualquer um dos α , β , γ , δ , ϵ ou ζ tocoferóis, mas dá-se preferência aos α -tocóferóis. O tocoferol pode adquirir diversas formas como, por exemplo, diferentes sais e/ou isómeros. Os sais incluem sais orgânicos, tais como succinato, acetato, nicotinato, etc. Podem ser utilizados tanto D- α -tocóferol como DL- α -tocóferol. Um α -tocóferol preferido é o DL- α -tocóferol.

É habitual um conteúdo em óleo no intervalo de 2-20% (em volume).

As gotinhas de óleo da emulsão têm geralmente um

diâmetro inferior a 5 μm , e podem inclusivamente ter um diâmetro submicrométrico, sendo estes tamanhos reduzidos convenientemente alcançados com um microfluidificador para proporcionarem emulsões estáveis. Dá-se preferência às gotinhas com um tamanho de menos de 220 nm, dado que podem ser submetidas a esterilização por filtração.

Os tensioactivos podem ser classificados pelos seus 'HLB' (relação hidrófilo/lipofílico). Os tensioactivos preferidos da invenção têm um HLB de pelo menos 10, preferivelmente pelo menos 15, e mais preferivelmente pelo menos 16. A invenção pode ser utilizada com tensioactivos que incluem, mas não se limitam a: tensioactivos de ésteres de polioxietileno sorbitano (comummente denominados Tweens), especialmente polissorbato 20 e polissorbato 80; co-polímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), e/ou óxido de butileno (BO), comercializados sob o nome comercial DOWFAX™, tais como co-polímeros de bloco lineares EO/PO; octoxinóis, que podem variar no número de repetições dos grupos etóxi (oxil,2-etanodiilo), sendo o octoxinol-9 (Triton X-100, ou t-octilfenoxipolietoxietanol) de interesse especial; (octilfenóxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tais como fosfatidilcolina (lecitina); nonilfenol etoxilatos, tais como a série NP de Tergitol™; éteres gordos de polioxietileno derivados de lauril, cetil, estearil e álcoois oleicos (conhecidos como tensioactivos Brij), tais como trietilenoglicol monolauril éter (Brij 30); e ésteres de sorbitano (conhecidos comummente como os SPAN's), tais como trioleato de sorbitano (Span 85) e monolaurato de sorbitano. Dá-se preferência aos tensioactivos não iónicos. O tensioactivo mais preferido para inclusão na emulsão é o polissorbato 80

(mono-oleato de polioxietileno de sorbitano; Tween 80).

Podem ser utilizadas misturas de tensioactivos, por exemplo, misturas de Tween 80/Span 85. Uma combinação de um éster de polioxietileno sorbitano e um octoxinol também é adequada. Outra combinação útil compreende laureth 9 mais um éster de polioxietileno sorbitano e/ou um octoxinol.

As quantidades preferidas de tensioactivos (% em peso) são: ésteres de polioxietileno sorbitano (tais como Tween 80) 0,01 a 2%; octil- ou nonilfenóxi polioxietanóis (tais como Triton X-100, ou outros detergentes da série Triton) 0,001 a 0,1%; éteres de polioxietileno (tais como laureth 9) 0,1 a 20%.

Dá-se preferência às emulsões de óleo em água contendo esqualeno que contenha o tensioactivo polissorbato 80. Os adjuvantes específicos de emulsões de óleo em água que podem ser fabricados utilizando esqualeno purificado de acordo com a invenção incluem, mas não se limitam a:

- Uma emulsão submicrométrica de esqualeno, polissorbato 80, e trioleato de sorbitano. A composição da emulsão em volume pode ser de aproximadamente 5% de esqualeno, de aproximadamente 0,5% de polissorbato 80 e de aproximadamente 0,5% de Span 85. Em termos de peso, estas relações convertem-se em 4,3% de esqualeno, 0,5% de polissorbato 80 e 0,48% de Span 85. Este adjuvante é conhecido como 'MF59' [28-30], tal como descrito mais pormenorizadamente no capítulo 10 da ref^a. 31 e capítulo 12 da ref^a. 32. De forma vantajosa, a emulsão de MF59 inclui iões citrato como, por exemplo, tampão citrato de sódio 10mM.

- Uma emulsão submicrométrica de esqualeno, um tocoferol, e polissorbato 80. Estas emulsões podem ter

entre 2 a 10% de esqualeno, entre 2 a 10% de tocoferol e entre 0,3 a 3% de polissorbato 80, e a relação em peso de esqualeno:tocoferol é preferivelmente ≤ 1 (por exemplo, 0,90), dado que isto pode proporcionar uma emulsão mais estável. O esqualeno e o polissorbato 80 podem estar presentes numa relação de volume de aproximadamente 5:2 ou numa relação em peso de aproximadamente 11:5. Uma emulsão deste tipo pode ser fabricada dissolvendo Tween 80 em PBS para dar uma solução de 2%, misturando depois 90ml desta solução com uma mistura de (5 g de DL- α -tocoferol e 5 ml de esqualeno), e microfluidificando depois a mistura. A emulsão resultante tem gotinhas de óleo submicrométricas, por exemplo, com um diâmetro médio de entre 100 e 250 nm, de aproximadamente 180 nm. A emulsão também pode incluir um monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL). Outra emulsão útil deste tipo pode compreender, por dose humana, 0,5-10 mg de esqualeno, 0,5-11 mg de tocoferol, e 0,1-4 mg de polissorbato 80 [33].

- Uma emulsão de esqualeno, um tocoferol, e um detergente Triton (por exemplo Triton X-100). A emulsão também pode incluir 3D-MPL (veja adiante). A emulsão pode conter um tampão fosfato.

- Uma emulsão que compreende esqualeno, um solvente aquoso, um tensioactivo não iónico hidrofílico de alquiléter de polioxietileno (por exemplo polioxietileno(12)cetoestearil éter) e um tensioactivo não iónico hidrofóbico (por exemplo, um éster de sorbitano ou um éster de manitano, tal como mono-oleato de sorbitano ou 'Span 80'). A emulsão é preferivelmente

termorreversível e/ou tem pelo menos 90% de gotinhas de óleo (em volume) com um tamanho de menos de 200 nm [34]. A emulsão também pode incluir um ou mais de: alditol; um agente crioprotector (por exemplo, um açúcar, tal como dodecilmaltósido e/ou sacarose); e/ou um alquilpoliglicósido. A emulsão pode incluir um agonista TLR4 [35]. Tais emulsões podem ser liofilizadas.

- Uma emulsão de esqualeno, poloxâmero 105 e Abil-Care [36]. A concentração final (peso) destes componentes nas vacinas adjuvadas são 5% de esqualeno, 4% de poloxâmero 105 (poliol plurónico) e 2% de Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; triglicéridos caprílico/cáprico).

As emulsões podem ser misturadas com um componente separado contendo antigénio de forma extemporânea, no momento da administração ou durante o fabrico da vacina. Quando estes dois componentes forem líquidos, a relação de volume dos dois líquidos a misturar pode variar (por exemplo entre 5:1 e 1:5) mas em geral é de cerca de 1:1.

Por isso, um procedimento da invenção pode incluir uma etapa adicional de combinação da emulsão com um imunogénio. O procedimento pode incluir uma etapa adicional de embalagem da emulsão ou a mistura emulsão/imunogénio. Uma emulsão produzida de acordo com a invenção pode ser embalada num primeiro contentor dentro de um kit, e este kit inclui um segundo contentor que inclui um imunogénio. Os conteúdos dos dois contentores podem ser posteriormente misturados e administrados a um sujeito (por exemplo um ser humano) ou podem ser co-administrados em separado.

Geral

A expressão "que compreende" engloba "que inclui" assim como "constituído por" por exemplo uma composição "que compreende" X pode ser constituída exclusivamente por X ou pode incluir algo adicional, por exemplo X+E.

O termo "aproximadamente" em relação com um valor numérico x é opcional e significa, por exemplo, $x \pm 10\%$.

Modos de execução da invenção

Preparam-se diversas estirpes mutantes de levedura mediante técnica de engenharia genética. As estirpes mutantes sobre-expressam ou sub-expressam enzimas envolvidas no metabolismo do esqualeno. Uma de tais de leveduras é a estirpe ATC1551 divulgada na referência 11, que pode produzir esqualeno até 16% cdw sob condições de crescimento adequadas.

Depois do cultivo, as células cultivadas são recolhidas e rompidas utilizando um moinho de pérolas de vidro. Purifica-se o esqualeno a partir do lisado por extracção de solvente com clorofórmio-metanol (2:1) ou, para se melhorar o rendimento, mediante o procedimento divulgado na referência 5, utilizando liofilização e depois extracção com dióxido de carbono supercrítico. O esqualeno resultante é de alta pureza (>95%).

O esqualeno purificado é combinado com uma mistura de tensioactivos Tween 80 e Span 85 e com um tampão citrato para a preparação de uma mistura com 5% de esqualeno, 0,5% de Tween 80 e 0,5% de Span 85 (em volume). Esta mistura é microfluidificada para a preparação de uma emulsão com um tamanho médio de gotinha de menos de 500 nm. Esta emulsão, conhecida como 'MF59', pode ser utilizada como um adjuvante de vacina.

REFERÊNCIAS

- [1] Borucinska & Frasca (2002) J Fish Diseases 25: 287-98.
- [2] Bertone e cols. (1996) J Fish Diseases 19:429-34. [3] Briones e cols. (1998) J Vet Med B 45:443-5. [4] Blagovic e cols. (2001) Food technol. Biotechnol. 39:175-81.
- [5] Bhattacharjee et al. (2003) World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19:605-608. [6] Boeke e cols., (1984) Mol. Gen. Genet., 197: 345-346
- [7] Sherman e cols., (1986) Methods and Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. [8] Germann y cols. (2005) J Biol Chem 280:35904-13. [9] Veen e 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 dos E.U.A. 5460949.
- [12] Polakowski e cols. (1998) Appl Microbiol Biotech-nol 49(1):66-71.
- [13] Pasrija e cols. (2005) J Antimicrob Chemother. 55(6):905-13.
- [14] Performance of the Third 50 Completed ATP Projects (2006) NIST SP 950-4, páginas 59-62. [15] Gachotte e cols. (1999) PNAS E.U.A. 96:12655-60. [16] Ness e cols. (1998) J Bacteriol. 180(7):1913-9. [17] Ryder e cols. (1985) Biochem J. 230:765-770 [18] Leber e cols. (2001) European Journal of Biochemistry 268:914-924.
- [19] Sanati e cols. (1997) Antimicrob Agents

Chemother. 41(11):2492-6.

[20] Kuchta e cols. (1997) FEMS Microbiol Carta 150: 43-7.

[21] Ryder e cols. (1986) Antimicrob Agents Chemother 20:858-60.

[22] Nishikawa e cols. (1978) Biochim Biophys Acta 531(1):86-95.

[23] Bhattacharjee e cols., (2001) World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17: 811-816 [24] Jahnke & Klein (1983) J Bacteriol 155:488-92. [25] Valero e cols. (2001) J Bioscience Bioengin 92: 33-8.

[26] WO94/26683.

[27] Foch e cols., (1957) Journal of Biological Chemistry, 226: 497-509. [28] WO90/14837.

[29] Podda e Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.

[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 da série Methods in Molecular Medicine). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.

[33] WO2008/043774. [34] US-2007/0014805. [35] US-2007/0191314.

[36] Suli e cols. (2004) Vaccine 22(25-26):3464-9.

[37] Spanova e cols. (2008) Resumen PO42, Chemistry and Physics of Lipids 154 S:S32-S36. [38] Chang e cols. (2008) Appl. Microbiol. Biotechnol. 78:963-972.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- US 5460949 A [0043]
- WO 9426683 A [0043]
- WO 9014837 A [0043]
- WO 2008043774 A [0043]
- US 20070014805 A [0043]
- US 20070191314 A [0043]

Literatura não relacionada com patentes, citada na descrição

- **Borucinska ; Frasca.** J Fish Diseases, 2002, vol.25, 287-98 [0043]
- **Bertone et al.** J Fish Diseases, 1996, vol. 19, 429-34 [0043]
- **Briones et al.** J Vet Med B, 1998, vol. 45, 443-5 [0043]
- **Blagovic et al.** Food technol. Biotechnol., 2001, vol. 39, 175-81 [0043]
- **Bhattacharjee et al.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, vol. 19, 605-608 [0043]

- **Boeke et al.** Mol. Gen. Genet., 1984, vol. 197, 345-346 [0043]
- **Sherman et al.** Methods and Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986 [0043]
- **Germann et al.** J Biol Chem, 2005, vol. 280, 35904-13 [0043]
- **Veen et al.** FEMS Yeast Research, 2003, vol. 4, 87-95 [0043]
- **Sambrook, J. ; Fritsch, E.F. ; Maniatis, T.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0043]
- **Polakowski et al.** Appl Microbiol Biotechnol, 1998, vol. 49 (1), 66-71 [0043]
- **Pasrija et al.** J Antimicrob Chemother., 2005, vol.55 (6), 905-13 [0043]
- Performance of the Third 50 Completed ATP Projects (2006) NIST SP 950-4, 2006, 59-62 [0043]
- **Gachotte et al.** PNAS USA, 1999, vol. 96, 12655-60 [0043]
- **Ness et al.** J Bacteriol., 1998, vol. 180 (7), 1913-9 [0043]
- **Ryder et al.** Biochem J., 1985, vol. 230, 765-770 [0043]
- **Leber et al.** European Journal of Biochemistry, 2001, vol. 268, 914-924 [0043]
- **Sanati et al.** Antimicrob Agents Chemother, 1997, vol. 41 (11), 2492-6 [0043]
- **Kuchta et al.** FEMS Microbiol Lett, 1997, vol. 150, 43-7 [0043]
- **Ryder et al.** Antimicrob Agents Chemother, 1986, vol. 20, 858-60 [0043]
- **Nishikawa et al.** Biochim Biophys Acta, 1978, vol. 531 (1), 86-95 [0043]

- **Bhattacharjee et al.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, vol. 17, 811-816 **[0043]**
- **Jahnke ; Klein.** J Bacteriol, 1983, vol. 155, 488-92 **[0043]**
- **Valero et al.** J Bioscience Bioengin, 2001, vol. 92, 33-8 **[0043]**
- **Foch et al.** Journal of Biological Chemistry, 1957, vol. 226, 497-509 **[0043]**
- **Podda ; Del Giudice.** Expert Rev Vaccines, 2003, vol. 2, 197-203 **[0043]**
- **Podda.** Vaccine, 2001, vol. 19, 2673-2680 **[0043]**
- Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. Plenum Press, 1995 **[0043]**
- Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols. Methods in Molecular Medicine series. vol. 42 **[0043]**
- **Suli et al.** Vaccine, 2004, vol. 22 (25-26), 3464-9 **[0043]**
- **Spanova et al.** Chemistry and Physics of Lipids, 2008, vol. 154, S32-S36 **[0043]**
- **Chang et al.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, vol. 78, 963-972 **[0043]**

REIVINDICAÇÕES

1. A invenção proporciona um procedimento para a preparação de um adjuvante de emulsão de óleo em água que compreende as etapas seguintes:

(a) purificar esqualeno a partir de uma levedura que produz um alto rendimento de esqualeno durante a cultura, na qual a levedura se desenvolve num meio de crescimento controlado, livre de produtos de origem animal; e

(b) combinar o esqualeno purificado na etapa (a) com um componente aquoso para formar o adjuvante de emulsão de óleo em água.

2. Um procedimento para a preparação de um adjuvante de emulsão de óleo em água que compreende as etapas seguintes:

(a) obter esqualeno que foi purificado a partir de uma levedura que produz um alto rendimento de esqualeno durante a cultura, na qual a levedura se desenvolve num meio de crescimento controlado, livre de produtos de origem animal; e

(b) combinar o esqualeno da etapa (a) com um componente aquoso para formar o adjuvante de emulsão de óleo em água.

3. O procedimento de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a levedura produz esqualeno a $\geq 5\%$ de peso seco celular.

4. O procedimento de qualquer uma das

reivindicações anteriores, em que a levedura é uma espécie do género *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*.

5.0 procedimento de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a levedura expressa uma enzima HMGR truncada que tem uma localização citosólica.

6.0 procedimento de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a levedura é uma estirpe modificada que, relativamente a uma estirpe parental não modificada, hiperexpressa HMGR.

7.0 procedimento de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a levedura é uma estirpe modificada que, relativamente a uma estirpe parental não modificada, sub-expressa a cimosterol-24-metiltransferase e/ou a ergosta-5,7,24(28)-trienol-22-desidrogenase.

8.0 procedimento de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a levedura expressa uma oxidoesqualeno ciclase mutante.

9.0 procedimento de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a levedura tem uma disrupção na esqualeno epoxidase.

10. 0 procedimento de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a levedura se desenvolve na presença de factores que aumentam o rendimento de esqualeno durante a cultura, por exemplo,

em que o factor é alilamina, voriconazol, 6-amino-2-n-pentiltiobenzotiazol, tiamina ou um tiocarbamato.

11. O procedimento de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a levedura se desenvolve em condições parcial ou totalmente anaeróbicas antes da purificação do esqualeno.

12. O procedimento de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o esqualeno tem uma pureza superior a 97% (em peso).

13. O procedimento de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que a emulsão de óleo em água tem gotículas de óleo com um diâmetro submicrométrico, em que a emulsão de óleo em água é uma emulsão microfluidificada e/ou em que a emulsão de óleo em água compreende esqualeno e polissorbato 80.

14. Um procedimento para a preparação de uma vacina para uso por via parenteral em seres humanos, que compreende uma etapa de preparação de um adjuvante de emulsão de óleo em água pelo procedimento de qualquer uma das reivindicações 1 a 13, e a mistura do adjuvante de emulsão com um imunogénio.

15. Um procedimento para a preparação de um kit para a preparação de uma composição imunogénica, que compreende a preparação de uma emulsão de óleo em água mediante o procedimento de qualquer uma das reivindicações 1 a 13, a embalagem da emulsão num primeiro recipiente e a combinação do primeiro

recipiente em forma de kit com um segundo recipiente, em que o segundo recipiente contém um imunogénio.