

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 360**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06795518 .7**
96 Fecha de presentación: **02.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1909830**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54 Título: **REDUCCIÓN DE LAS INTERFERENCIAS ENTRE ADYUVANTES QUE CONTIENEN ACEITE Y ANTÍGENOS QUE CONTIENEN TENSIOACTIVOS.**

30 Prioridad:
02.08.2005 GB 0515906
04.11.2005 GB 0522599
24.11.2005 GB 0523923

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.12.2011

73 Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
VIA FIORENTINA 1
53100 SIENA (SI), IT

72 Inventor/es:
CONTORNI, Mario

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 360 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

Reducción de las interferencias entre adyuvantes que contienen aceite y antígenos que contienen tensioactivos

Campo de la técnica

5 La presente invención está en el campo de la fabricación de vacunas adyuvadas. En concreto, se refiere al uso de adyuvantes grasos durante la fabricación de vacunas basadas en antígenos que contienen tensioactivos.

Técnica anterior

10 El uso de adyuvantes para potenciar las respuestas inmunitarias contra antígenos de vacunas es bien conocido (p. ej., véase las referencias 1 y 2). Durante muchos años, los únicos adyuvantes aprobados para uso humano han sido las sales de aluminio III, no obstante en muchos países se han aprobado las vacunas que contienen el adyuvante MF59 y el adyuvante RC-52, incluidos Italia (en el producto de Chiron FLUAD™) y Argentina (en el producto de Berna Biotech SUPERVAX™) Otros adyuvantes en las últimas etapas de experimentación para uso humano incluyen mezclas de colesterol y saponinas, ISCOM, MPL™, AS04, virosomas, SBA4, etc. MPL™ o monofosforilo lípido A 3-O-desacilado se ha usado con el HBsAg, por ejemplo véase el documento WO 98/43670.

15 Una característica habitual de algunas alternativas a las sales de aluminio es la presencia de un componente graso. Por ejemplo, el adyuvante MF59 incluye escualeno (un aceite) y MPL™ contiene una forma desacilada de monofosforilo lípido A que tiene múltiples cadenas de ácido graso fijadas a una estructura de di-glucosamina.

La invención se refiere a la evitación de las interferencias que se pueden producir entre estos adyuvantes grasos y antígenos que incluyen un componente tensioactivo.

Sumario de la invención

20 El inventor ha encontrado que los adyuvantes grasos en composiciones de vacuna pueden ser incompatibles con antígenos que incluyen un componente tensioactivo. No obstante, en muchas situaciones sigue siendo deseable combinar un adyuvante graso y una mezcla de antígeno/tensioactivo, y es un objeto de la invención proporcionar formas de evitar las dificultades que pueden surgir al hacerlo. Es un objeto adicional de proporcionar procedimientos para combinar adyuvantes y antígenos, en los que se evita la incompatibilidad.

25 Para evitar estos problemas de incompatibilidad al usar antígenos que normalmente se purifican usando tensioactivos, un enfoque sería usar un procedimiento para prepara una composición inmunogénica, en la que: (a) la composición comprende un antígeno y un adyuvante graso; y (b) el antígeno se purifica sustancialmente en ausencia del tensioactivo. Purificando el antígeno mediante una vía alternativa que evita el uso de tensioactivo se superaría cualquier incompatibilidad con adyuvantes grasos.

30 Por motivos clínicos, históricos o reguladores puede no ser posible para purificar un antígeno sin el uso de tensioactivos o para eliminar totalmente los tensioactivos de las vacunas. En esta situación, la invención evita las interferencias reduciendo la proporción entre el aceite y el tensioactivo en la composición. Una vacuna típica de MF59/HBsAg contiene un enorme exceso de aceite con respecto al tensioactivo, con una proporción
35 aceite:tensioactivo de más de 4000:1 (en peso). La invención está dirigida a minimizar la cantidad de adyuvante graso en una composición y usa, como máximo, un exceso de 1000 veces en peso de aceite. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunogénica, que comprende las etapas de combinar (i) un componente de antígeno de superficie viral que incluye un tensioactivo y (ii) un componente adyuvante graso, para dar una composición en la que la proporción en peso entre el adyuvante graso y el tensioactivo es inferior a 1000:1.

El adyuvante graso

La invención usa adyuvantes grasos, es decir un componente adyuvante que incluye una molécula grasa. Los adyuvantes grasos típicos comprenden un aceite metabolizable, un ácido graso y/o una molécula que comprende un resto ácido graso.

45 Dos adyuvantes grasos preferidos son los adyuvantes conocidos como 'MF59' y 'MPL'. 'MF59' es un adyuvante graso porque contiene escualeno, que es un aceite metabolizable. 'MPL' es adyuvante graso porque contiene un disacárido sustituido con múltiples cadenas de ácido graso. Así como MF59, también se pueden usar adyuvantes en emulsión de aceite en agua.

50 Por tanto, las composiciones preferidas de la invención incluyen: (a) una emulsión de aceite en agua, tal como una emulsión submicrónica de aceite en agua. que comprende escualeno y monooleato de polioxietileno sorbitano (y, opcionalmente, trioleato de sorbitano); y/o (b) un monofosforilo lípido A 3-O-desacilado. El monooleato de polioxietileno sorbitano también se conoce como polisorbato 80.

Además de 'MF59' y 'MPL', otros adyuvantes grasos que se pueden usar con la invención incluyen, entre otros: derivados de glucosamida fosfato; N-acil-seudopéptidos; el adyuvante soluble derivado del lípido A de *Escherichia*

coli conocido como "OM-174"; los compuestos que contienen lípidos unidos a una estructura acíclica que contiene fosfato; y análogos del lípido A sintético acíclico.

Cuando se usa un adyuvante en emulsión de aceite en agua, tal como MF59, normalmente se añade a un volumen igual de una composición antigénica acuosa, de modo que la emulsión es 50 % en volumen de la composición total.

5 Cuando se usa un adyuvante 3D-MPL, una dosis típica está entre 25 µg/ml y 200 µg/ml, por ejemplo en el intervalo de 50-150 µg/ml, 75-125 µg/ml, 90-110 µg/ml o aproximadamente 100 µg/ml. Es habitual administrar entre 25-75 µg de 3D-MPL por dosis, por ejemplo entre 45-55 µg o aproximadamente 50 µg de 3D-MPL por dosis. Un adyuvante en emulsión tal como MF59 normalmente se proporcionará en un contenedor distinto del del antígeno, para la mezcla extemporánea en el momento de usar, o se puede proporcionar ya mezclado con el antígeno. Normalmente, un adyuvante 3D-MPL ya estará mezclado con el antígeno antes de su distribución a los usuarios finales.

MF59

15 El adyuvante 'MF59' es una emulsión de aceite en agua formada por escualeno, Tween 80 (monooleato de polioxitilensorbitano) y Span 85 (trioleato de sorbitano). La emulsión se microfluidifica para dar una emulsión con un tamaño de gota en submicrones. La preparación de M59 se describió inicialmente en la referencia 3 y el producto se ha fabricado y comercializado en Chiron Corporation, Detalles adicionales se pueden encontrar en el Capítulo 10 de la ref. 2, el Capítulo 12 de la ref. 1 y en las referencias de 4 a 6. La composición de MF59 en volumen es 5% de escualeno, 0,5 % de polisorbato 80 y 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas proporciones pasan a ser 4,3 % de escualeno, 0,5 % de polisorbato 80 y 0,48 % de Span 85. El contenido en tensioactivo del mismo MF59 no se tiene en cuenta al calcular la proporción aceite:tensioactivo, ya que la proporción se basa en el contenido de tensioactivo del antígeno.

La emulsión M59 incluye, de forma ventajosa, iones de citrato, *por ejemplo* tampón de citrato sódico 10 mM.

Otras emulsiones en aceite en agua

25 Como alternativa al adyuvante MF59, se pueden usar otras emulsiones de aceite en agua. Normalmente, las emulsiones de adyuvante incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el(los) aceite(s) y el(los) tensioactivo(s) biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Generalmente, las gotas de aceite en la emulsión tienen un diámetro inferior a 5 µm, habitualmente con un diámetro de submicrones. Los tamaños de las gotas pequeñas se pueden conseguir con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren las gotas con un tamaño inferior a 220 nm, ya que pueden someterse a esterilización en filtro.

30 Las emulsiones pueden incluir aceites como los procedentes de una fuente animal (como un pez) o una fuente vegetal, en lugar de aceites minerales. Entre las fuentes de aceites vegetales se incluyen nueces, semillas y granos. Como ejemplos de aceites de nuez están el aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite de coco y el aceite de oliva, los disponibles con mayor frecuencia. Se puede usar aceite de jojoba, obtenido, por ejemplo, de la semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el disponible más fácilmente, pero también pueden usarse aceites de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, mijo, triticale y similares. Los ésteres de ácido graso de 6-10 átomos de carbono del glicerol y de 1,2-propanodiol, aunque no se producen de forma natural en los aceites de semilla, se pueden preparar mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales adecuados a partir de los aceites de frutos secos y de semillas. Las grasas y los aceites de la leche de mamífero son metabolizables y, por tanto, pueden usarse en la práctica de esta invención. Los procedimientos de separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que se pueden recuperar con facilidad. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, los aceites de hígado de tiburón y el aceite de ballena, como esperma de ballena, son ejemplos de los diversos aceites de pescado que se pueden usar en la presente memoria descriptiva. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y normalmente se denominan terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado ramificado conocidos como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que es particularmente preferido en el presente documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, También es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluidos el escualeno y el escualano, están disponibles fácilmente en fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). También se pueden usar mezclas de aceites.

55 Los tensioactivos se pueden clasificar por su "EHL" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un EHL de al menos 10, preferentemente de al menos 15 y más preferentemente de al menos 16. La invención se puede usar con tensioactivos que incluyen, entre otros: los tensioactivos de ésteres de polioxitilensorbitano (normalmente denominados los Tween), especialmente polisorbato 10 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP), y/u óxido de butileno (OB), vendidos con el nombre comercial de DOWFAX™, tal como copolímeros de bloque de OE/OP, octoxinoles, en los que puede variar el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodilo) que se repiten, de los que el octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) es de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxitileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico,

estearílico y oleílico (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitano (normalmente conocidos como los SPAN), tal como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano. Entre los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión están Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitano), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Triton X-100. Se pueden usar mezclas de tensioactivos, por ejemplo mezclas de Tween 80/Span 85 o mezclas de Tween 80/Triton-X100.

Los adyuvantes en emulsión de aceite en agua útiles con la invención incluyen, entre otros:

- Una emulsión de escualeno, μ -tocoferol y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (p. ej., al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10% de escualeno, de 2 a 10% de tocoferol y de 0,3 a 3% de Tween 80, y la proporción en peso de escualeno:tocoferol es, preferentemente, ≤ 1 , dado que esta proporciona una emulsión más estable. Una de estas emulsiones puede prepararse mediante la disolución de Tween 80 en PBS para dar una solución al 2%, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno) y, posteriormente, microfluidificando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas de aceite en submicrones, por ejemplo con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm.
- Una emulsión de escualeno, α -tocoferol y un detergente Triton (p. ej., Triton X-100).
- Una emulsión de escualeno, poloxámero 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión se puede formular en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de liberación útil para dipéptidos de muramilo y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [7] (0,05-1% Thr-MDP, 5% de escualano, 2,5 % de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). También se puede usar con Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [8] (5% de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidificación.
- Una emulsión que tiene de 0,5-50 % de un aceite, 0,1-10 % de un fosfolípido y 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Como se ha descrito en la referencia 9, componentes fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños de gotas de submicrones son ventajosos.
- Una emulsión submicrónica de aceite en agua de un aceite no metabolizable (tal como un aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tal como QuilA saponina, colesterol, un conjugado de saponina lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 19, producido mediante la adición de amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetilydoctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina.
- Una emulsión en la que una saponina (p. ej., QuilA o QS21) y un esteroles (p. ej., colesterol) se asocian en forma de micelas helicoidales [11].

Preferentemente, las emulsiones se mezclan con antígeno de forma extemporánea en el momento de la liberación. Por tanto, el adyuvante y el antígeno normalmente se conservan por separado en una vacuna envasada o distribuida, preparada para formulación al final en el momento de usar. En general, el antígeno estará en forma acuosa, de modo que la vacuna se prepara al final mezclando dos líquidos. La proporción en volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (p. ej., entre 5:1 y 1:5), pero normalmente es de aproximadamente 1:1.

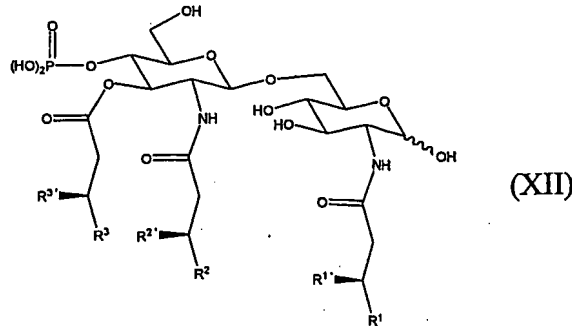
Cuando una composición incluye un tocoferol, se pueden usar cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ -tocoferoles, pero se prefieren los tocoferoles α . El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo diferentes sales y/o isómeros. Entre las sales se incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato etc. También se pueden usar el D- α -tocoferol y el DL- α -tocoferol. Un α -tocoferol preferido es DL- α -tocoferol y la sal preferida de este tocoferol es el succinato.

3D-MPL

El monofosforilo lípido A 3-O-desacilado (ED-MPL, también denominado monofosforilo lípido A 3-des-O-acilado o -3-O-desacil-4'-monofosforilo lípido A) es un adyuvante conocido. El nombre indica que la posición 3 de la glucosamina en el extremo reductor del monofosforilo lípido A está desacilada. El ED-MPL se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *Salmonella minnesota* y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil a ácido y un grupo acilo lábil a bases. Activa las células del linaje de monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citoquinas, incluidas IL-1, IL-12, TNF- α y GM-CSF. La preparación de 3D-MPL se describió inicialmente en la referencia 12 y el producto se ha fabricado y comercializado en Corixa Corporation con el nombre comercial "MPL". Detalles adicionales se pueden encontrar en las referencias 13 a 16.

El 3D-MPL puede tomar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, que varían según su acilación (p. ej., que tienen 3, 4, 5 o 6 cadenas de acilo, que pueden tener diferentes longitudes). Los dos monosacáridos de

glucosamina (También conocida como 2-desoxi-2-amino-glucosa) están N-aciladas e sus carbonos de la posición 2 (es decir, en las posiciones 2 y 2') y también hay O-acilación en la posición 3'. El grupo fijado al carbono 2 tiene la fórmula $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^1\text{R}^1$. El grupo fijado al carbono 2' tiene la fórmula $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^2\text{R}^2$. El grupo fijado al carbono 3' tiene la fórmula $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^3\text{R}^3$. Una estructura representativa es:



5

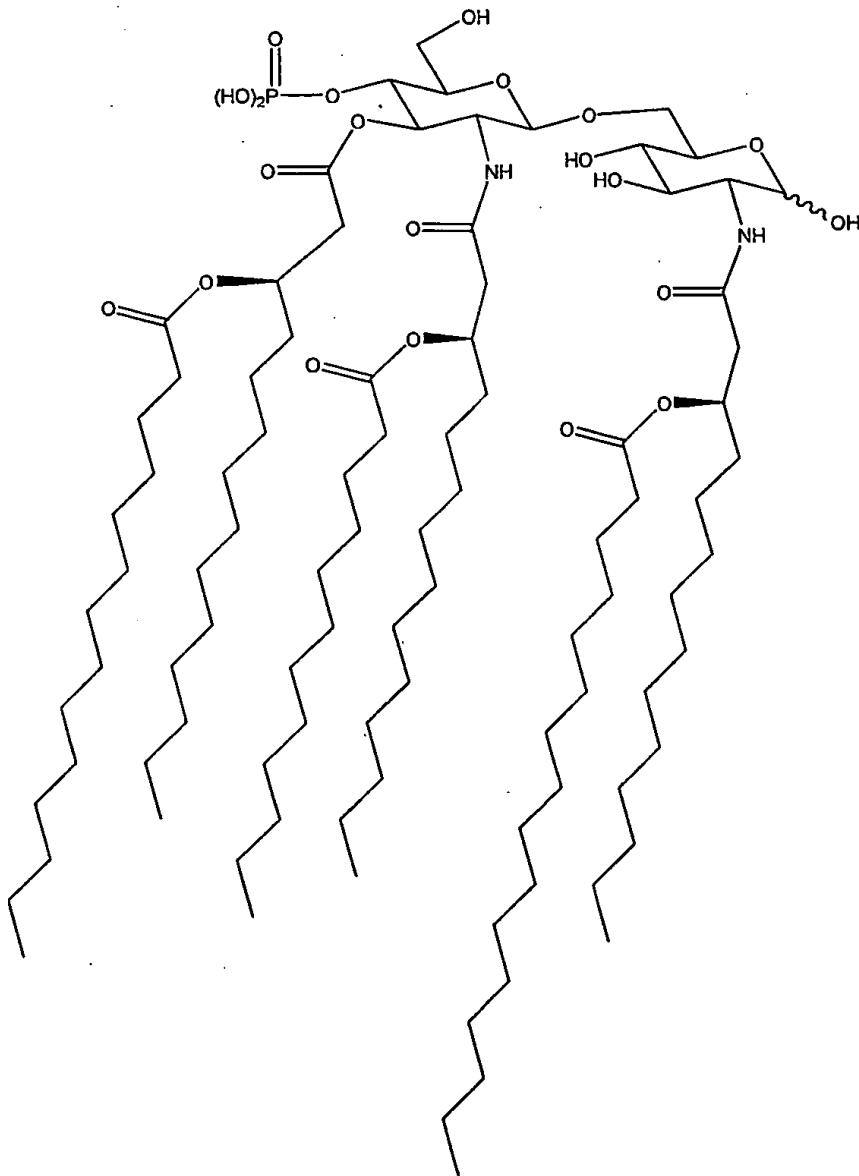
Los grupos R^1 , R^2 y R^3 son, cada uno de forma independiente, $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$. El valor de n está, preferentemente, entre 8 y 16, más preferentemente entre 9 y 12, y más preferentemente es 10.

Los grupos R^1 , R^2 y R^3 pueden ser, cada uno de forma independiente: (a) $-\text{H}$; (b) $-\text{OH}$; o (c) $-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^4$, en la que R^4 es $-\text{H}$ o $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$, en la que el valor de m es, preferentemente, entre 8 y 16, más preferentemente 10, 12 o 14. En la posición 2, m es, preferentemente, 14. En la posición 2', m es, preferentemente, 10. En la posición 3', m es, preferentemente, 12. Los grupos R^1 , R^2 y R^3 son, por tanto, preferentemente grupos $-\text{O}$ -acilo de ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

Cuando todos los R^1 , R^2 y R^3 son $-\text{H}$, el 3D-MPL tiene sólo 3 cadenas de acilo (uno en cada una de las posiciones 2, 2' y 3'). Cuando sólo dos de R^1 , R^2 y R^3 son $-\text{H}$, el 3D-MPL puede tener 4 cadenas de acilo. Cuando sólo uno de R^1 , R^2 y R^3 son $-\text{H}$, el 3D-MPL puede tener 5 cadenas de acilo. Cuando ninguno de R^1 , R^2 y R^3 es $-\text{H}$, el 3D-MPL puede tener 6 cadenas de acilo. El adyuvante 3D-MPL usado de acuerdo con la invención puede ser una mezcla de estas formas, con de 3 a 6 cadenas acilo, pero se prefiere que incluya 3D-MPL con 6 cadenas de acilo en la mezcla y, en particular, para garantizar que la forma cadena hexaacilo compone al menos el 10 % en peso del 3D-MPL total, por ejemplo $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$ o más. Se ha descubierto que 3DMPL con 6 cadenas de acilo es la forma adyuvante más activa.

20

Por tanto, la forma más preferida de 3D-MPL para inclusión en las composiciones de la invención es:



(XIII)

Cuando 3D-MPL se usa en forma de una mezcla, las referencias a cantidades o concentraciones de 3D-MPL en las composiciones de la invención se refieren a la especie de 3D-MPL combinadas en la mezcla.

- 5 En condiciones acuosas, 3D-MPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños, por ejemplo con un diámetro <150 nm o >500 nm. En la invención se pueden usar una o ambas y las mejores partículas se pueden seleccionar mediante ensayo rutinario. Las partículas más pequeñas (p. ej., lo suficientemente pequeñas como para dar una suspensión acuosa clara de 3D-MPL) se prefieren para el uso de acuerdo con la invención por su superior actividad [17]. Las partículas preferidas tienen un diámetro medio inferior a 220 nm, más preferentemente inferior a 200 nm o inferior a 150 nm o inferior a 120 nm, e incluso pueden tener un diámetro medio inferior a 100 nm. No obstante, en la mayoría de los casos el diámetro medio no será inferior a 50 nm. Estas partículas son lo bastante pequeñas como para ser adecuadas para esterilización por filtración. El diámetro de la partícula se puede evaluar mediante la técnica rutinaria de dispersión dinámica de luz, que revela un diámetro medio de partícula. Cuando se dice que una partícula tiene un diámetro de x nm, en general tendrán una distribución de partículas alrededor de esta media, pero al menos el 50 % en número (p. ej., $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$, o más) de las partículas tendrá un diámetro dentro del intervalo de $x \pm 25\%$.
- 10
15

El 3D-MPL se puede usar por si solo como adyuvante o en combinación con uno o más compuestos adyuvantes adicionales. Por ejemplo, se sabe usar el ED-MPL en combinación con la QS21 saponina [18], con QS21 y una emulsión de aceite en agua [19], con fosfato de aluminio. [20], con hidróxido de aluminio [21] o con saponinas e interleucina-12 [22].

20

Una mezcla adyuvante preferida, particularmente para usar con HBsAg, comprende una mezcla de 3D-MPL y una sal de aluminio, preferentemente fosfato de aluminio. De forma ventajosa, el 3D-MPL se adsorbe sobre la sal de aluminio. Preferentemente, al menos el 50 % (en peso) de 3D-MPL se adsorbe, por ejemplo, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 98\%$ o más.

- 5 Los adyuvantes de aluminio actualmente en uso normalmente se denominan adyuvantes de "hidróxido de aluminio" o "fosfato de aluminio". No obstante, estos son nombres de consenso, ya que ninguna es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (p. ej., véase el capítulo 9 de la referencia 2). Para la combinación con un adyuvante graso, tal como 3D-MPL, la invención puede usar cualquiera de las sales "hidróxido" o "fosfato" que en general se usan como adyuvantes.
- 10 Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son, normalmente, sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son, al menos parcialmente, cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que se puede representar con la fórmula $\text{AlO}(\text{OH})$, se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, tal como hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, mediante espectroscopia de infrarrojos (IR), en particular mediante la presencia de una banda de adsorción a 1070 cm^{-1} y un fuerte hombro a $3090\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$ (capítulo 9 de ref. 2).
- 15 Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son, normalmente, sales de hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo también una pequeña cantidad de sulfato. Pueden obtenerse mediante precipitación y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen sobre el grado de sustitución del fosfato por hidroxilo en la sal. En general, los hidroxifosfatos tienen una proporción molar de PO_4/Al entre 0,3 y 0,99. Los hidroxifosfatos se pueden distinguir de AlPO_4 mediante la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda del espectro IR a 3164 cm^{-1} (p. ej., cuando se sella a $200 \text{ }^\circ\text{C}$) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la ref. 2).
- 20

La proporción molar $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ de un adyuvante de fosfato de aluminio estará, en general, entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y, más preferentemente, $0,95 \pm 0,1$. El fosfato de aluminio será, en general, amorfo, particularmente para las sales hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a $0,6 \text{ mg}$ de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio será, en general, 25
particulado. Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de $0,5\text{-}20 \text{ }\mu\text{m}$ (p. ej., de aproximadamente $5\text{-}10 \text{ }\mu\text{m}$) después de la adsorción de cualquier antígeno.

El PZC de fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar en función de las condiciones de reacción y la concentración de los reactantes usado para la preparación de la sal mediante precipitación. PZC también se altera cambiando la 30
concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato= PCZ más ácido) o añadiendo un tampón tal como un tampón de histidina (hace que el PZC sea más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán, en general, un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5, por ejemplo de aproximadamente 5,7.

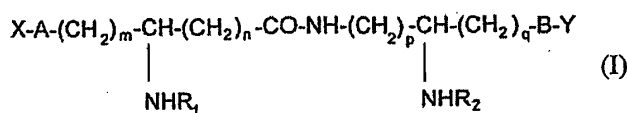
Una solución de fosfato de aluminio usada para preparar una composición de la invención puede contener un 35
tampón (p. ej., un fosfato o una histidina o un tampón Tris), pero esto no siempre es necesario. La solución de fosfato de aluminio es, preferentemente, estéril y apirógena. La solución de fosfato de aluminio puede incluir iones fosfato acuosos libres, por ejemplo presentes a una concentración entre $1,0$ y 20 mM , preferentemente entre 5 y 15 mM , y más preferentemente de aproximadamente 10 mM . La solución de fosfato de aluminio puede también comprender cloruro sódico. La concentración de cloruro sódico está, preferentemente, en el intervalo de $0,1$ a 100 mg/ml (p. ej., $0,5\text{-}50 \text{ mg/ml}$, $1\text{-}20 \text{ mg/ml}$, $2\text{-}10 \text{ mg/ml}$) y, más preferentemente, es de aproximadamente $3 \pm 1 \text{ mg/ml}$. La presencia de NaCl facilita la medición correcta del pH antes de la adsorción de antígenos.

40

Preferentemente, el fosfato de aluminio se usa en forma de una solución acuosa a la que se añade 3D-MPL (y, opcionalmente, un antígeno) (NB: Es estándar para hacer referencia a fosfato de aluminio acuoso como "solución", aunque, en una visión fisicoquímica estricta, la sal es insoluble y forma una suspensión). Se prefiere diluir el fosfato 45
de aluminio a la concentración requerida y garantizar una solución homogénea antes de la adición de 3D-MPL y/o el antígeno.

N-acil-pseudodipéptidos

Preferentemente, un adyuvante de N-acil-pseudodipéptido incluye un grupo hidroxilo que es esterificado por un grupo ácido en forma neutra o cargada. Los grupos acilo dan a los pseudopéptidos un carácter graso. 50
Preferentemente, el adyuvante tiene la fórmula (I)



en la que:

ES 2 371 360 T3

- R¹ es un grupo acilo derivado de un ácido carboxílico de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, que tiene de 2 a 24 átomos de carbono, estando el ácido carboxílico insustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en los grupos hidroxilo, alquilo, alcoxi, aciloxi, amino, acilamino, aciltio y (alquil(C₁₋₂₄))tio;
- 5 - R₂ es un grupo acilo derivado de un ácido carboxílico de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, que tiene de 2 a 24 átomos de carbono, estando el ácido carboxílico insustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en los grupos hidroxilo, alquilo, alcoxi, aciloxi, amino, acilamino, aciltio y (alquil(C₁₋₂₄))tio;
- X es un átomo de hidrógeno o un grupo ácido en forma neutra o cargada;
- 10 - Y es un átomo de hidrógeno o un grupo ácido en forma neutra o cargada;
- A es un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo imino -NH-;
- B es un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo imino -NH-;
- in es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;
- n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;
- 15 - p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y
- es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10,

siempre que al menos uno de los sustituyentes X o Y designa un grupo ácido en forma neutra o iónica.

El adyuvante puede usarse en forma ácida o de sal con una base orgánica o mineral. '

- 20 Las bases formadoras de sal destinadas para uso terapéutico incluyen principalmente bases de metal alcalino, tal como hidróxido sódico, potásico o de litio, sales de amonio; bases de metales alcalino térreos tales como hidróxido de calcio o de estroncio y sales de magnesio; sales de metal ferroso y similares; bases orgánicas tales como las derivadas de aminas primarias, secundarias, terciarias, tales como metilamina, dietilamina, monoetanolamina, dietanolamina, bencilamina, N-metilbencilamina, veratrilamina, trimetoxibencilamina, aminoácidos básicos tales como lisina y ornitina o aminoazúcares. Ejemplos de bases no destinados para uso terapéutico son brucina,
- 25 estriocina, agmatina, homarina, glucosamina, N-metilglucosamina o N-metilmorfolina.

Los sustituyentes preferidos X e Y se seleccionan de:

- carboxi [alquil(C₁₋₅)]
- CH-[(CH₂)_rCOOH] [(CH₂)_sCOOH], en la que: r es 0,1, 2, 3, 4 o 5; s es 0, 1, 2, 3, 4 o 5
- fosfono [alquil(C₁₋₅)]
- 30 - dihidroxifosforiloxi [alquil(C₁₋₅)]
- dimetoxifosforilo
- fosfono
- hidroxisulfonilo
- hidroxisulfonil[alquil(C₁₋₅)]
- 35 - hidroxisulfoniloxi [alquil(C₁₋₅)]

- 40 Cuando los sustituyentes x y/o Y designan un grupo ácido en forma neutra, se hace referencia a la forma carboxílica, sulfónica o fosfónica libre. Cuando el grupo ácido está en forma cargada, se hace referencia a la forma de sal de carboxílico, sulfónico o fosfórico, a saber, mediante la adición de una base orgánica o mineral, preferentemente una destinada para uso terapéutico. Se aplican consideraciones similares cuando X y/o Y designan un grupo carboxialquilo, alquenilbiscarboxílico, hidroxisulfonilo, hldroxisulfonilalquilo, hidroxisulfonil-oxialquilo, fosfonoalquilo o un fosforiloxialquilo.

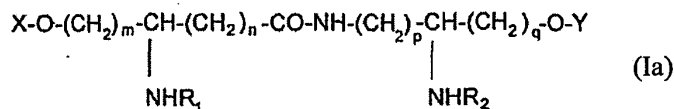
- 45 Cuando m= 1 y n= 0, el adyuvante deriva de serina. Cuando m= 2 y n= 0, el adyuvante deriva de homoserina. Si m= 3 y n= 0, se hace referencia a un compuesto de pentahomoserina. Si m= 4 y n= 0, se hace referencia a un compuesto de hexahomoserina.
- 45 Cuando p=3 y q=1, el producto de interés puede ser un compuesto de citrulina, ornitina o arginina. Cuando p= 4 y q=

1, se hace referencia a un compuesto de homoarginina o lisina.

R₁ y R₂ incluyen derivados de acilo saturados o insaturados, de cadena ramificada o lineal, que tienen una cadena de tamaño variable de naturaleza distinta o idéntica, que pueden tener uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo, amino, acilamino, hidroxilo, alcoxi, aciloxi, acitio y alquiltio.

- 5 Ejemplos de dichos derivados acilados sustituidos son radicales ricinoleilo, 1,2-hidroxiestearoilo, 2-hidroxi-3-metil butiroilo, 3-hidroxi-2-aminopentanoilo, palmitoilo, elaidilo; eleostearoilo, araquidoilo, araquidonilo, gadoleilo, behenilo, erucilo, 8-metildecanoilo, 9-metildecanoilo, docosohexaenoil o eicosapentaneilo.

Adyuvantes preferidos tienen la fórmula (Ia), en la que A y B son, ambos, átomos de oxígeno.

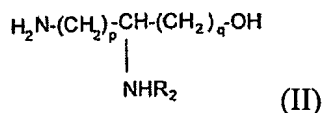


- 10 En la fórmula (Ia), X e Y son, preferentemente, un átomo de hidrógeno o un grupo fosfono.

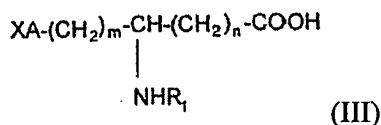
Adyuvantes adecuados de fórmula (Ia) incluyen:

- 3-(3-dodecanoiloxltetradecanoilamino) 9-(3-hidroxitetradecanoilamino) 4-oxo-5-azadecan-1,10-diol 1 y/o 10-dihidrogenofosfato y sus sales de adición formadas con una base orgánica o mineral,
- 15 - 3-(3-dodecanoiloxltetradecanoilamino) 9-(3-hidroxitetradecanoilamino) 4-oxo-5-azadecan-1,10-diol 1,10-bis(dihidrogenofosfato) y sus sales de adición formadas con una base orgánica o mineral,
- 3-(3-hidroxitetradecanoilamino) 9-(3-dodecanoiloxitetradecanoilamino) 4-oxo-5-azadecan-1,10-diol 1,10-bis(dihidrogenofosfato) y sus sales de adición formadas con una base orgánica o mineral,
- 3-(3-dodecanoiloxitetradecanoilamino) 9-(3-hidroxitetradecanoilamino) 4-oxo-5-azadecan-1,10-diol 1 dihidrogenofosfato y sus sales de adición formadas con una base orgánica o mineral,
- 20 - 3-(3-hidroxitetradecanoilamino) 9-(3-docecanoiloxitetradecanoilamino) 4-oxo-5-azadecan-1,10-diol 1 dihidrogenofosfato y sus sales de adición formadas con una base orgánica o mineral,
- 3-(3-hidroxitetradecanoilamino) 9-(3-docecanoiloxitetradecanoilamino) 4-oxo-5-azadecan-1,10-diol 10 dihidrogenofosfato y sus sales de adición formadas con una base orgánica o mineral,

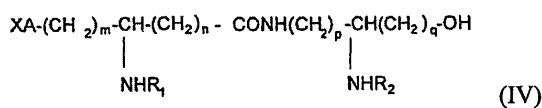
- 25 Procedimientos para sintetizar adyuvantes de fórmula (I) se divulgan con detalles en la referencia 23 e incluyen procedimientos que comprenden las etapas de: Proteger los grupos amino funcionales en las posiciones (q+1) y ω de un diaminoácido bloqueando los reactivos que fácilmente sufren acidolisis e hidrogenólisis, respectivamente; hacer reaccionar el grupo funcional carboxílico libre con un agente reductor para dar un alcohol correspondiente; desproteger el grupo amino funcional en la posición (q + 1) y, después, acilar por medio de un derivado funcional de ácido carboxílico de fórmula R₂OH y, posteriormente, liberar el grupo amino funcional mediante hidrogenólisis, para
- 30 dar un alcohol diamino de fórmula general II:



En la que el alcohol amino se condensa en presencia de un agente de condensación peptídico en un disolvente inerte, junto con un compuesto ω-hidroxi, ω-amino o ω-tio aminoácido de fórmula general III:

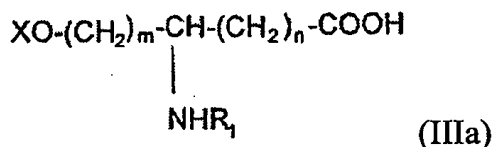


- 35 para proporcionar un compuesto dipeptídico de fórmula (IV)

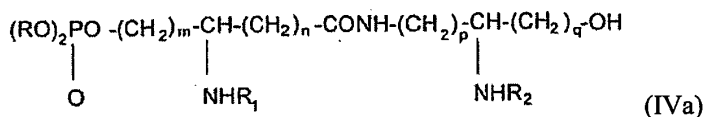


Cuyo grupo funcional de alcohol libre terminal puede estar, en caso necesario, protegido (p. ej., por un grupo alquilo o acilo, o cualquier otro grupo protector adecuado) o sustituido de otro modo, en caso necesario, en presencia de un agente de acoplamiento. El alcohol protegido puede someterse a una hidrogenación catalítica u otro tratamiento de desprotección con el fin de obtener el derivado de fórmula general I.

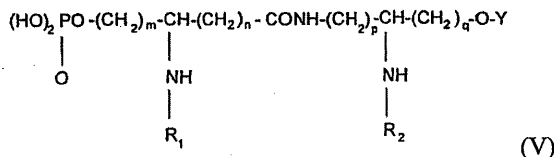
Los procedimientos para sintetizar adyuvantes de fórmula (II) también se divulgan con detalle en la referencia 23 e incluyen procedimientos que comprenden las etapas de: proteger los grupos amino funcionales en las posiciones (q+1) y ω de un diaminoácido de fórmula H₂N(CH₂)_pCHNH₂(CH₂)_{q+1}COOH protegiendo los reactivos que fácilmente sufren acidolisis e hidrogenólisis, respectivamente; hacer reaccionar el grupo funcional carboxílico libre con un agente reductor para dar un alcohol correspondiente; desproteger el grupo amino funcional en la posición (q + 1) y, después, acilar por medio de un derivado funcional de ácido carboxílico de fórmula R₂OH, después desproteger el grupo amino funcional mediante hidrogenólisis para obtener un alcohol amino de fórmula general II, en el que el alcohol amino se condensa en presencia de un agente de condensación de péptidos en un disolvente inerte, junto con un derivado funcional de ω-hidroxi-aminoácido de fórmula general IIIa:



en la que X es un radical dialquiloxi- o diariloxi-fosforilo de fórmula (RO)₂P-O, para dar un compuesto de tipo péptido de fórmula IVa:

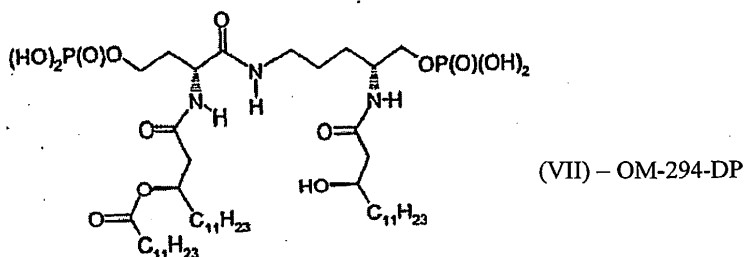
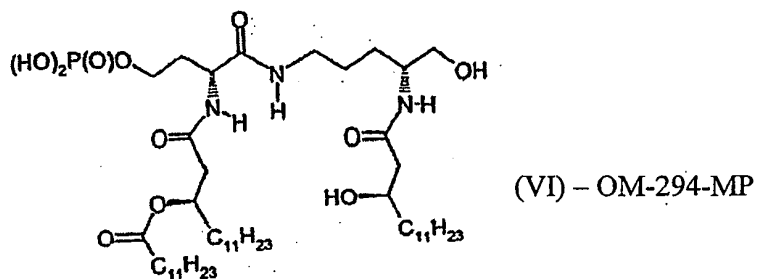


en la que R es un radical que fácilmente sufre hidrogenólisis, cuyo otro grupo alcohol funcional puede, si se desea, fosforilarse mediante un agente de fosforilación en presencia de un agente de acoplamiento, en caso necesario. El alcohol protegido se puede someter a una hidrogenación catalítica por un lado con el fin de desproteger el grupo alcohol funcional opcionalmente presente en el grupo acilo R₂ y, por la otra, liberar el grupo fosfatos funcional y, después, desproteger mediante hidrogenólisis el segundo grupo funcional fosfato opcionalmente presente, con el fin de obtener el derivado de fórmula general V:



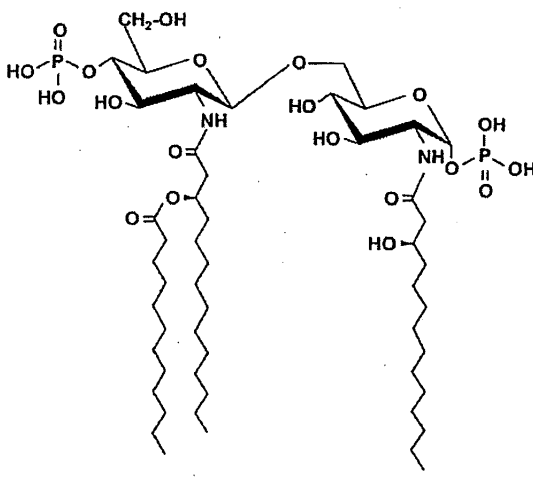
y opcionalmente realizar la etapa adicional de formación de sal por medio de una base orgánica o mineral. La estereoquímica de centros quirales de grupos acilamino se determina mediante la configuración de aminoácidos usada inicialmente, mientras que la estereoquímica de los grupos acilamino depende de la configuración de ácido graso usada inicialmente. Se puede iniciar a partir de un diaminoácido que tiene una configuración L o D o de una naturaleza racémica. Se puede iniciar a partir de un aminoácido hidroxilado de configuración L, D o de una mezcla racémica. Todos estos estereoisómeros o diastereoisómeros están incluidos dentro del ámbito de la invención.

Adyuvantes particularmente preferidos y compuestos notablemente mono y bis-fosforilados, son aquellos que se conocen como "OM-294-MP" (fórmula VI) y "OM-294-DP" (fórmula VII) [23]:



OM-174

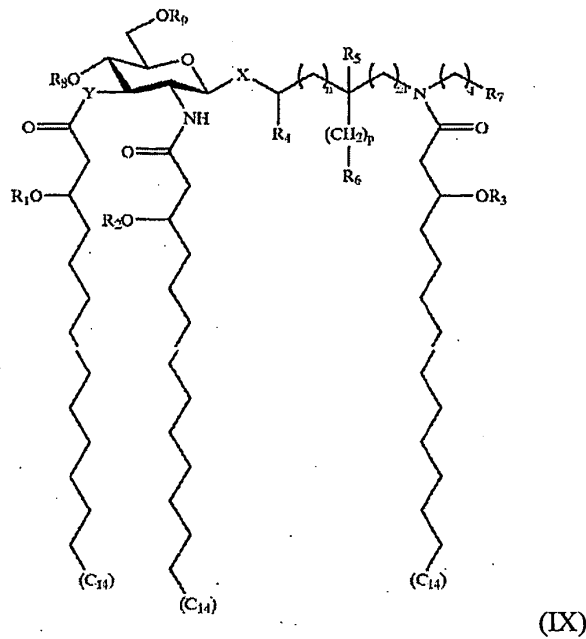
- 5 El OM-174 se puede obtener mediante síntesis química y conserva un motivo de triacilo del lípido A. Se describe con más detalle en las referencias 24-26. La referencia 26 proporciona la fórmula de OM-174 como:



- 10 Por tanto, OM-174 tiene una estructura de diglucosamina unida por $(\beta(1 \rightarrow 6) 1,4'$ -bifosforilada, como se encuentra en el lípido A natural. La OM-174 puede estar presente en forma de agregados con una estructura H_I micelar, es decir en la que las moléculas de lípido se empaquetan con su estructura sobre una superficie cilíndrica con las cadenas acilo dirigidas hacia el interior, estando los propios cilindros empaquetados hexagonalmente. Una fase cúbica puede estar ausente. Una fase H_{II} puede también estar ausente.

Derivados de glucosaminida fosfato

- 15 Los derivados de aminoalquilglucosaminida (AGP) (p. ej., RC-529 [27,28]) son adyuvantes grasos por las cadenas de acilo. En general estos derivados pueden tener la fórmula siguiente [29]:

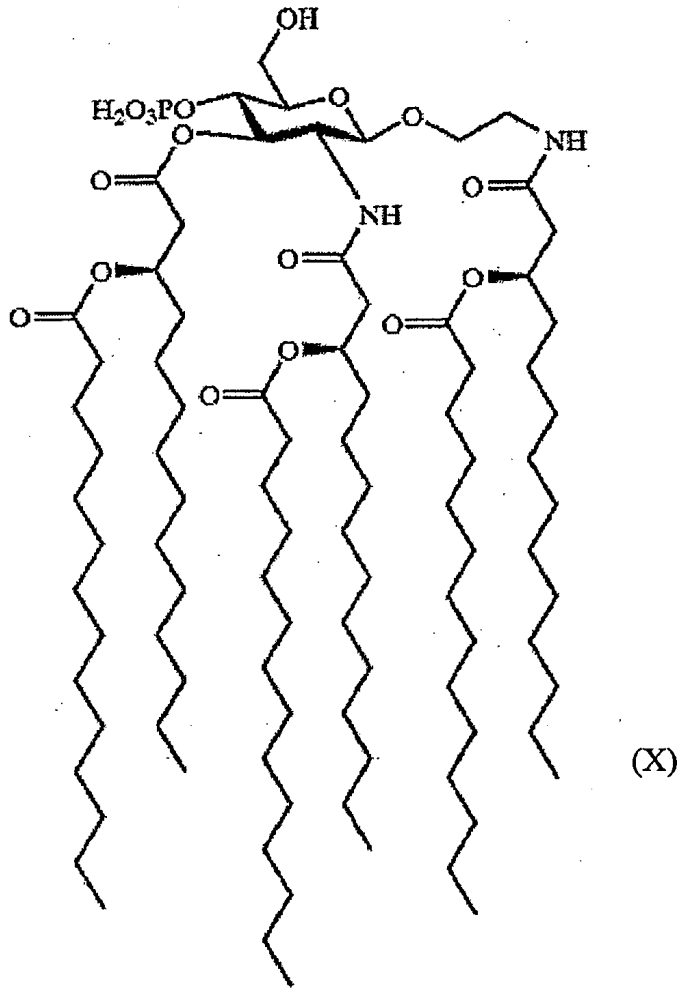


en la que:

- 5 - X representa un átomo de oxígeno o de azufre en la posición axial o ecuatorial;
- Y representa un átomo de oxígeno o un grupo NH;
- "n", "m", "p" y "q" son iguales o diferentes y son números enteros de 0 a 6;
- R₁, R₂ y R₃, que pueden ser iguales o diferentes, son residuos de acilo graso que tienen de 1 a 20 átomos de carbono y en la que R₁, R₂ o R₃ es, opcionalmente, hidrógeno;
- 10 - R₄ y R⁵ son iguales o diferentes y son hidrógeno o metilo;
- R₆ y R₇ son iguales o diferentes y son hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo, fosfónico, fosfonooxilo, sulfuro, sulfonooxilo, amino, mercapto, ciano, nitro, formilo o carboxilo y ésteres y amidas de los mismos;
- R₈ y R₉ son iguales o diferentes y son fosfónico o hidrógeno, con, preferentemente, siendo al menos uno de R₈ y R₉ fosfónico.

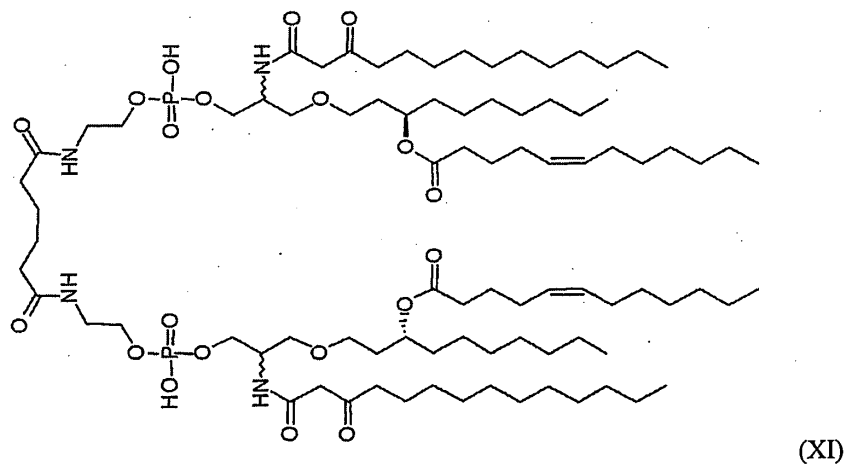
15 La configuración de los centros estereogénicos en 3' a los que están unidos los residuos de acilo graso normales es R o S, pero preferentemente R. La estereoquímica de los átomos de carbono a los que están unidos R₄ o R₅ puede ser R o S. Todos los estereoisómeros, tanto enantiómeros como diaestereómeros, y mezclas de los mismos, se considera que entran dentro del alcance de la invención objeto. Adyuvantes adecuados incluyen las sales de estos compuestos.

Un compuesto AGP preferido es 'RC-529', que se puede preparar como se describe en la referencia 30:



Análogos del lípido A acíclicos sintéticos

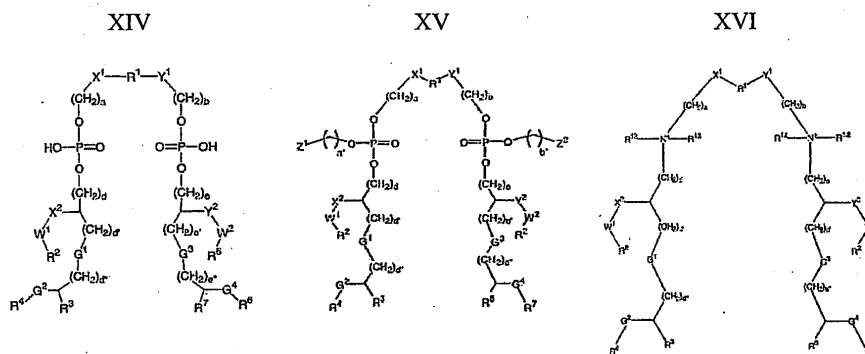
5 Un análogo del lípido A que se puede usar como un adyuvante en las composiciones de la invención es ER-112022 [31], un dímero de fosfolípido conectado mediante una estructura acíclica:



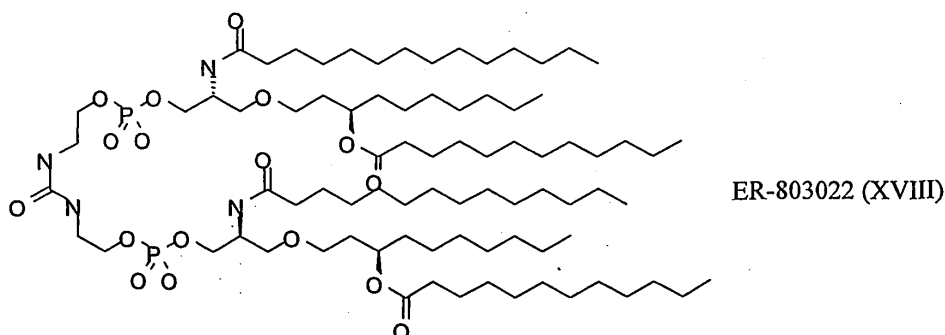
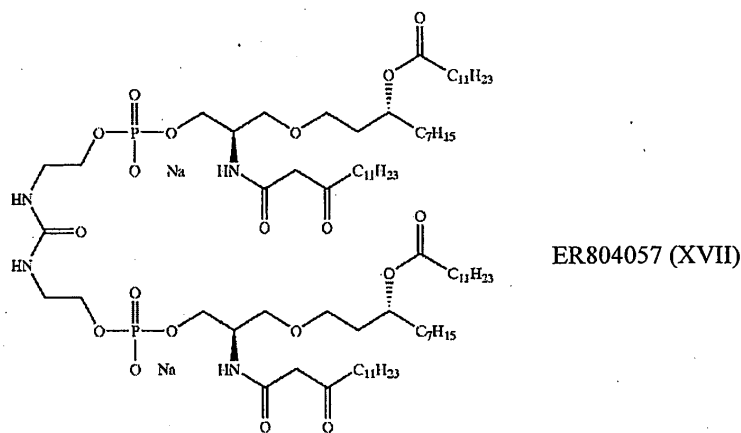
Cada unidad monomérica de ER-112022 contienen3 grupos grasos únicos que están unidos indirectamente a un fosfatodiéster. Los grupos grasos incluyen una cadena éter de 10 carbonos, una cadena aciloxi insaturada de 12 carbonos unida a la cadena éter y una cadena b-oxo-amida de 14 carbonos unida más cerca al fosfodiéster. Por

tanto, el compuesto tiene 3 características únicas comparadas con el lípido a natural de *E. coli*: (i) ER-112022 carece de una estructura de hidrato de carbono cíclico; (ii) segundo, los fosfatos son fosfodiésteres incorporados dentro de los confines de la base estructural, al contrario que los fosfoésteres en el lípido a de *E. coli*; y (iii) la estructura es simétrica (seis ácidos grasos organizados simétricamente en una estructura que no es de hidrato de carbono).

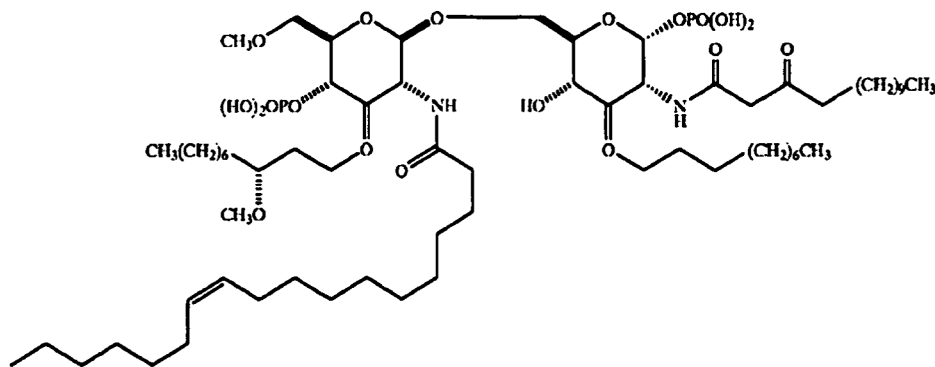
5 Compuestos útiles similares incluyen aquéllos con la fórmula XIV, XV o XVI, o sales de los mismos:



como se define en la referencia 32, tal como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', ER 803022 o 'ER 804057', por ejemplo:



Los compuestos que contienen lípidos unidos a una estructura acíclica que contiene fosfato también se pueden usar como adyuvantes, tales como el antagonista de TLR4 E5564 [33,34]:



(XIX)

El tensioactivo

La invención usa tensioactivo durante la purificación del antígeno, pero a niveles controlados respecto al adyuvante graso.

Normalmente, el tensioactivo será un tensioactivo no iónico, particularmente aquéllos que ya se encuentran en las formulaciones de vacuna. Se prefieren los tensioactivos orgánicos. Normalmente, estos son el producto de la reacción de un óxido de alquileo (p. ej., óxido de etileno) con un alcohol graso, ácido graso, alquilfenol, alquilamino u otro compuesto adecuado que tiene al menos un átomo de hidrógeno activo. Para la mayoría de los tensioactivos, los alcoholes, aminas y ácidos más habituales tienen una longitud de cadena de carbono en el intervalo de C₈-C₁₈. Los alquilfenoles más habituales son nonilfenol y octilfenol. Particularmente preferidos son los tensioactivos que contienen residuos de poli(oxieteno).

Por ejemplo, la invención se puede usar con tensioactivos incluidos, entre otros: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitano (normalmente denominados los Tween), especialmente polisorbato 10 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP), y/u óxido de butileno (OB), vendidos con el nombre comercial de DOWFAX™, tal como copolímeros de bloque de OE/OP, octoxinoles, en los que puede variar el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodilo) que se repiten, de los que el octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) es de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitano (normalmente conocidos como los SPAN), tal como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano.

Dos tensioactivos específicos de interés son Triton X-100 y polisorbato 20. Realizaciones preferidas de la invención usan un componente antigénico que comprende uno de estos dos tensioactivos no iónicos.

La invención es particularmente adecuada para usar con polisorbato 20. Este tensioactivo tiene un perfil de seguridad establecido para administración a seres humanos, incluidos dentro de vacunas.

Los tensioactivos se pueden clasificar por su "EHL" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Tensioactivos preferidos de la invención tienen un EHL de al menos 10, preferentemente al menos 15 y, más preferentemente al menos 16.

Para administrar dosis grandes del tensioactivo a un paciente se prefiere que la concentración del tensioactivo en la composición no sea superior a 50 µg/ml, por ejemplo ≤ 40 µg/ml, ≤ 35 µg/ml, ≤ 30 µg/ml, ≤ 25 µg/ml, ≤ 20 µg/ml, ≤ 15 µg/ml, ≤ 10 µg/ml, ≤ 5 µg/ml, etc. Se prefiere una concentración de ≤ 20 µg/ml.

El antígeno

La invención implica el uso de un antígeno de superficie viral. La invención es particularmente adecuada para uso con antígenos que normalmente se purifican usando tensioactivos. Habitualmente, estos antígenos son lipófilos. Normalmente incluirán al menos una región transmembrana, que funciona in vivo para localizar el antígeno dentro de una bicapa lipídica, por ejemplo sobre la superficie de un patógeno.

El componente antigénico incluye un tensioactivo. En lugar de ser una simple mezcla de antígeno y tensioactivo, se prefiere que el antígeno y el tensioactivo estén en forma de un complejo. Los complejos antígeno/tensioactivo incluyen liposomas estabilizados con tensioactivo que contienen antígeno y niosomas, que son vesículas formadas por compuestos anfífilos no iónicos sintéticos. Un complejo antígeno/tensioactivo preferido es un antígeno particulado de superficie de la hepatitis B, purificado en presencia de un tensioactivo. La referencia 35 describe cómo las partículas de HBsAg recombinante pueden conservar el Tween 20 que se usó durante su purificación

(hasta 25 µg de Tween 20 por 100 µg de HBsAg).

El antígeno más preferido para usar con la invención es, por tanto, el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBV) en forma de partículas sustancialmente esféricas (diámetro medio de aproximadamente 20 nm), incluida una matriz lipídica que comprende fosfolípidos y un tensioactivo no iónico, tal como polisorbato 20. El tensioactivo no iónico puede incorporarse en la partícula durante la purificación.

El virus de la hepatitis B (HBV) es uno de los agentes conocidos que causa hepatitis viral. El virión del HBV consta de un núcleo interno rodeado por una proteína externa o cápsida, y el núcleo viral contiene el genoma de ADN del virus. El componente principal de la cápsida es una proteína conocida como antígeno de superficie del HBV o, más habitualmente, 'HBsAg', que normalmente es un polipéptido de 226 aminoácidos con un peso molecular de -24 kDa. Todas las vacunas para la hepatitis B existentes contienen HBsAg y, cuando este antígeno se administra a un vacunado normal, estimula la producción de anticuerpos anti-HBsAg, que protegen contra la infección por HBV.

Para la fabricación de vacunas, el HBsAg se puede formar de dos modos: El primer procedimiento implica purificar el antígeno en forma particulada a partir del plasma de portadores de hepatitis B crónica, ya que se sintetizan grandes cantidades de HBsAg en el hígado y se liberan en la corriente sanguínea durante una infección del HBV. El segundo modo implica expresar la proteína mediante procedimientos de ADN recombinante. El HBsAg para usar con el procedimiento de la invención se expresa de forma recombinante en células de levadura. Las levaduras adecuadas incluyen huéspedes *Saccharomyces* (tales como *S. cerevisiae*), *Pichia* (tales como *P. pastoris*) o *Hansenula* (tales como *H. polymorpha*). Como alternativa, el antígeno se puede expresar en mamíferos recombinantes (p. ej., en células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células Bu3 etc.), de insecto (p. ej., usando vectores baculovirus) o células vegetales. No obstante, en general se usa expresión en levaduras.

El HBsAg expresado en levaduras está, preferentemente, no glicosilado. Al contrario que el HBsAg nativo (es decir, como en el producto purificado de plasma), el HBsAg que se expresa en levaduras está, en general, no glicosilado y esta es la forma más preferida de HBsAg para uso con la invención, porque es altamente inmunógeno y puede prepararse sin el riesgo de contaminación del producto sanguíneo. Las partículas de HBsAg expresado en levaduras puede incluir fosfatidilinositol, que no se encuentra en los viriones de HBV naturales. Las partículas pueden también incluir una cantidad no tóxica de LPS con el fin de estimular el sistema inmunitario [36].

Los procedimientos principales para purificar HBsAg se conocen en la técnica (p. ej., véase, las referencias 37-62):. De estos diversos procedimientos, la invención usa un tensioactivo no iónico durante la purificación, de modo que el tensioactivo se incorpora en el producto de HBsAg particulado final. Usando polisorbato 20 durante la alteración de células de levadura recombinantes al principio de la purificación es un modo preferido de introducir el tensioactivo en las partículas de HBsAg.

Un procedimiento preferido para la purificación de HBsAg implica, tras la rotura de la célula: ultrafiltración, cromatografía de exclusión por tamaño; cromatografía de intercambio aniónico; ultracentrifugación; desalación y esterilización por filtración. Los lisados se pueden precipitar tras la rotura de la célula (p. ej., usando un polietilenglicol), dejando el HBsAg en solución, preparado para ultrafiltración. Antes o después de la esterilización por filtración, es posible estabilizar las partículas de HBsAg mediante tratamiento con formaldehído. A continuación, el exceso de formaldehído se puede eliminar mediante ultrafiltración o mediante cromatografía. Se puede esterilización por filtración adicional.

Preferentemente, el HBsAg procede del HBV, subtipo adw2.

Además de la secuencia "S", un antígeno de superficie puede incluir toda o parte de una secuencia pre-S, tal como toda o parte de una secuencia pre-S1 y/o pre-S2.

Otros antígenos de superficie viral que se pueden usar en la invención serán, en general, glicoproteínas de la cubierta procedentes de los virus con cubierta. Los antígenos de superficie viral para usar con la invención pueden incluir, entre otros:

- Una proteína de retroviridae. Retroviridae incluye lentivirus y espumavirus. Los virus de interés incluyen HTLV-I, HTLVII, virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, incluidos VIH-1 y VIH-2), virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), virus espumoso de chimpancé y espumavirus humano.
- Una proteína de paramixoviridae, tal como la proteína F. Paramixoviridae incluyen (a) el Paramixovirinae, que incluye Paramixovirus, Rubulavirus y Morbillivirus y (b) el Pneumovirinae, que incluye los Pneumovirus. Los virus de interés incluyen el virus de parainfluenza (PIV), el paramixovirus humano, el virus de Rinderpest, el virus de la peste de pequeños rumiantes, el virus del sarampión, el virus de las paperas, el virus sincitial respiratorio (VSR), el virus Nipah, el virus Hendra, el morbillivirus equino (EMV), el virus Lyssavirus y Menangle.
- Una proteína de filoviridae. Filoviridae incluyen los virus de Marburg y Ebola.
- Una porción de glicoproteínas de un coronavirus. Coronaviridae incluyen coronavirus y torovirus. Los virus de interés incluyen los coronavirus humanos (incluido el coronavirus del SDRA), el virus de la bronquitis infecciosa

aviar, el virus de la peritonitis infecciosa felina, el virus de la hepatitis murina, el virus de la diarrea epidémica porcina, el virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina, el virus de la gastroenteritis transmisible porcina y el virus de Berne.

- 5 - Una proteína de rhabdoviridae, tal como la proteína G. Rhabdoviridae incluyen Rhabdovirus, Vesiculovirus, Lyssavirus, Ephemerovirus, Cytorhabdovirus y Nucleorhabdovirus. Los virus de interés incluyen el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la rabia, el virus de mokola, el virus de la fiebre efímera bovina.
- 10 - Una proteína de togaviridae. Togaviridae incluye alfavirus y rubivirus. Los virus de interés incluyen el virus Sindbis, el virus de la encefalitis oriental y occidental, el virus del bosque Semliki, el virus de la rubeola, el virus Aura, el virus Babanki, el virus del bosque Barmah avis-A, el virus de bebaru, el virus de Buggy Creek, el virus chikungunya, el virus de las Everglades, el virus de Fort Morgan, el virus getah, el virus J de las Highlands, el virus Kyzylgach, el virus Mayaro, el virus Middelburg, el virus Mucambo, el virus Ndumu, el virus Ockelbo. el virus o'nyong-nyong, el virus Pixuna, el virus de Ross River, el virus Sagiyama, el virus Una virus, el virus de la encefalitis equina venezolana y el virus Whataroa.
- 15 - Una glicoproteína de la cubierta ('E') de un flaviviridae. Flaviviridae incluyen Flavivirus, Pestivirus y Hepacivirus. Los virus de interés incluyen el virus del dengue, el virus de la hepatitis C, el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa. el virus del nilo occidental, el virus de la encefalitis de San Luis, el virus de la diarrea bovina y el virus de la encefalitis de transmisión por garrapatas (TBE).
- 20 - Una proteína de bunyaviridae. Bunyaviridae incluyen Bunyavirus, Nairovirus, Phlebovirus, Hantavirus y Tospovirus. Virus de interés incluyen bunyavirus, el virus de Bunyamwera, el virus de la encefalitis de California, el virus de La Cross, el virus de Hantaan, el virus Sin Nombre, el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, el virus de la fiebre siciliana Sandfly y el virus de la fiebre del valle del Rift.
- 25 - Una proteína de hepadnaviridae (incluido HBsAg). Hepadnaviridae incluyen orthohepadnavirus y avihepadnavirus. Además del virus de la hepatitis B humana, esta familia de virus incluyen el virus de la hepatitis B de la ardilla de tierra, el virus de la hepatitis B de marmota, el virus de la hepatitis B del mono wooly, el virus de la hepatitis de la ardilla del ártico, el virus de la hepatitis B de pato, el virus de la hepatitis B de garza y el virus de la hepatitis B del ganso de Ross.
- 30 - Una proteína de herpesviridae. Herpesviridae incluyen Simplexvirus, Varicellovirus, Roseolovirus, Citomegalovirus, Muromegalovirus, Linfocriptovirus y Rhadinovirus. Virus de interés incluyen los virus del herpes humano, incluidos los virus del herpes simple (HSV), el virus de la varicela zóster (VZV), el virus de Epstein-Barr (EBV), el citomegalovirus (CMV), el Herpesvirus 6 humano (HHV6), el herpesvirus 7 humano (HBV7) y el Herpesvirus 8 humano (HHV8), etc. Antígenos adecuados pueden seleccionarse de glicoproteínas gB, gC, gD y gH (p. ej., en HSV). Particularmente se prefiere gD2 del HSV.
- 35 - Una proteína de Ortomixoviridae. Ortomixoviridae incluyen los virus de la gripe y de thogoto. Se prefieren los antígenos de los virus de la gripe (virus de la gripe A, B o C), incluidos los antígenos de superficie hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA).

Estos antígenos de superficie viral normalmente se purifican usando tensioactivos y, por tanto, el componente antigénico puede incluir un tensioactivo, particularmente si está presente en forma particulada que incluye lípidos.

- 40 La invención también es útil con los antígenos particulados basados en proteínas híbridas o de fusión que comprenden un antígeno de superficie viral y un antígeno heterólogo. Por ejemplo, se sabe condensar la secuencia del HBsAg con antígenos heterólogos para explotar la capacidad del HBsAg para ensamblarse en partículas.

Por ejemplo, la referencia 63 notifica fusiones de la gp120 del VIH-1 con el HBsAg para dar una proteína que se ensambla de forma espontánea en partículas que se asemejan a las partículas del HBsAg nativo en tamaño y densidad, consistente con una composición lipídica de aproximadamente el 25 % y un contenido en gp120 de aproximadamente 100 por partícula. La gp120 podía plegarse en su conformación nativa en la fusión y seguir conservando su actividad biológica. De forma similar, los epítomos de gp41 del VIH se han mejorado preparando fusiones internas con HBsAg y la proteína de fusión se autoensambló en levaduras en partículas de lipoproteína de 22 nm [64].

- 50 Este enfoque también se ha usado para las vacunas contra la malaria. La referencia 65 notifica que epítomos de hasta 61 aa del antígeno gp190 de la malaria se insertaron en la secuencia del HBsAg y que las partículas híbridas expresadas podían provocar una respuesta inmunitaria anti-gp190 en animales. La referencia 66 indica una proteína que tiene 16 repeticiones de una secuencia 4-mer de la proteína de circunsporozoito expresada en forma de una proteína de fusión con HBsAg. La referencia 67 indica la producción en levaduras de partículas similares a virus compuestas por Pfs16 condensada con el HBsAg. La referencia 68 desvela un antígeno híbrido en el que la proteína del circunsporozoito está condensada con el HBsAg. La referencia 69 desvela una fusión de la región en el C

composición que contiene 1 µg/ml de tensioactivo en un componente antigénico, la concentración de 3D-MPL será inferior a 1 µg/ml.

5 La proporción 1000:1 es la máxima. Para reducir adicionalmente el potencial de interferencias entre el aceite en un adyuvante y el tensioactivo en un antígeno se puede reducir la proporción. Por tanto, la proporción puede ser ≤ 500:1, ≤ 400:1, ≤ 300:1, ≤ 200:1, ≤ 100:1, ≤ 50:1, o incluso ≤25:1. A una proporción de ≤ 100:1, una composición que contiene 10 µg/ml de tensioactivo en un componente antigénico tendría un contenido de aceite (p. ej., escualeno o 3D-PML) o ≤ 1 mg/ml. A una proporción de ≤ 25:1, una composición que contiene 10 µg/ml de tensioactivo en un componente antigénico tendría un contenido de aceite (p. ej., contenido de escualeno o 3D-PML) de 250 µg/ml, por el contrario, una composición que comprende 100 µg/ml de 3D-MPL no tendría menos de 4 µg/ml de tensioactivo como parte del antígeno.

10 La proporción es, preferentemente, 1,5:1 por ejemplo ≥ 2:1, ≥ 2,5:1, ≥ 3:1, ≥ 4:1, ≥ 5:1 o más.

15 Para 3D-MPL, se prefiere una proporción entre 2,5:1 y 25:1, más preferentemente entre 2,5:1 y 10:1, e incluso más preferentemente entre 2,5:1 y 5:1. Por tanto, una composición que contiene 10 µg/ml de tensioactivo en un componente antigénico tendría un contenido de 3D-MPL de entre 25 µg/ml y 250 µg/ml, preferentemente entre 25 µg/ml y 100 µg/ml, e incluso más preferentemente entre 25 µg/ml y 50 µg/ml, por el contrario, una composición que comprende 100 µg/ml de 3D-MPL incluiría un antígeno que tiene un contenido en tensioactivo de entre 4 µg/ml y 40 µg/ml, e incluso más preferentemente entre 20 µg/ml y 40 µg/ml.

La composición inmunógena

20 Además de contener antígeno (y un adyuvante graso (y un nivel bajo de tensioactivo), las composiciones de la invención pueden comprender vehículos, adyuvantes, excipientes, tampones etc., como se describe con mayor detalle a continuación. Los componentes no antigénicos pueden proceder de varias fuentes. Por ejemplo, pueden estar presentes en uno de los materiales de antígeno o adyuvante que se usa durante la fabricación o pueden usarse por separado de estos componentes.

Las composiciones preferidas de la invención incluyen uno o más vehículos farmacéuticos y/o excipientes.

25 Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere cloruro sódico (NaCl), que puede estar presente a entre 1 y 20 mg/ml.

30 Generalmente, las composiciones tendrán una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg y, más que preferentemente, entrarán dentro del intervalo de 280-320 mOsm/kg. Previamente se ha comunicado que la osmolalidad no tiene un impacto sobre el dolor causado por la vacunación [72], pero, no obstante, se prefiere mantener la osmolalidad dentro de este intervalo.

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más tampones. Entre los tampones típicos se incluyen: Un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina; o un tampón citrato. Normalmente, los tampones estarán incluidos en el intervalo de 5-50 mM y, preferentemente, en el intervalo de 5-20 mM.

35 Generalmente, el pH de una composición de la invención estará entre 5,0 y 7,5, y más normalmente entre 5,0 y 6,0, para una estabilidad óptima o entre 6,0 y 7,0. Por tanto, el procedimiento de la invención puede incluir una etapa de ajustar el pH de la vacuna en bruto antes de envasar en los contenedores de dosificación. Una vacuna que contiene los toxoides de difteria y del tétanos tiene, preferentemente, un pH ≥6, para evitar el riesgo de reversión de la toxicidad de los toxoides (particularmente en el toxoide de difteria) y, por tanto, una vacuna que contiene los toxoides y los antígenos de HBsAg tiene preferentemente, un pH entre 6,0 y 7,0. Para otras vacunas, incluidas las vacunas monovalentes de HBsAg puede ser aceptable un pH <6.

Preferentemente, las composiciones de la invención son estériles.

Preferentemente, las composiciones de la invención son apirógenas, por ejemplo que contienen < 1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y, preferentemente, < 0,1 UE por dosis.

45 Preferentemente, las composiciones de la invención no tienen glúten.

50 Si se usa HBsAg adsorbido, el producto de vacuna final puede ser una suspensión con un aspecto turbio. Este aspecto significa que la contaminación microbiana no se puede ver fácilmente y, por tanto, la vacuna contiene, preferentemente, un agente antimicrobiano. Esto es particularmente importante cuando la vacuna está envasada en contenedores de múltiples dosis. Los conservantes preferidos para incluir son 2-fenoxietanol y/o timerosal. No obstante, se recomienda no usar conservantes de mercurio durante el procedimiento de la invención, aunque se ha encontrado que timerosal está en muchas vacunas de HBV existentes. No obstante, por seguridad, se prefiere que la composición final contenga menos de aproximadamente 25 ng/ml de mercurio. Más preferentemente, el producto de vacuna fina no contiene timerosal detectable. En general, esto se conseguirá eliminando el conservante de mercurio de una preparación antigénica antes de su adición en el procedimiento de la invención o evitando el uso de

timerosal durante la preparación de los componentes usados para fabricar la composición. El HBsAg se puede someter a diálisis (p. ej., con cisteína) para eliminar cualquier conservante de mercurio, tal como timerosal, que pueda haberse usado durante la preparación de HBsAg [73,74].

5 Durante la fabricación, la dilución de los componentes para dar concentraciones finales deseadas normalmente se realizará con API (agua para inyectables)

La concentración de cualquier fosfato de aluminio en una composición de la invención, expresado en términos de Al^{3+} es, preferentemente, inferior a 5 mg/ml, por ejemplo ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 1 mg/ml, etc.

10 La concentración de HBsAg en una composición de la invención es, preferentemente, inferior a 100 μ g/ml, por ejemplo ≤ 90 μ g/ml, ≤ 80 μ g/ml, ≤ 70 μ g/ml, ≤ 65 μ g/ml, ≤ 60 μ g/ml, ≤ 55 μ g/ml, ≤ 50 μ g/ml, ≤ 45 μ g/ml, ≤ 40 μ g/ml, etc. Una concentración de aproximadamente 40 μ g/ml o de aproximadamente 20 μ g/ml es típica.

Preferentemente, las composiciones de la invención se administran a los pacientes en dosis de 0,5 ml. Se entenderá que las referencias a las dosis de 0,5 ml incluyen variaciones normales, por ejemplo de 0,5 ml \pm 0,05 ml.

15 La invención puede proporcionar material a granel, que es adecuado para envasar en dosis individuales, que después se puede distribuir para la administración a los pacientes. Las concentraciones mencionadas anteriormente son, normalmente, concentraciones en dosis envasada final, y, por tanto, las concentraciones de la vacuna en bruto pueden ser mayores (p. ej., para reducir a las concentraciones finales mediante dilución).

Generalmente, las composiciones de la invención estarán en forma acuosa.

Envasado de las composiciones de la invención

20 Después de combinar el antígeno y el adyuvante, los procedimientos de la invención pueden comprender una etapa de extraer y envasar una muestra de 0,5 ml de la mezcla en un contenedor. Para las situaciones de multidosis, las cantidades para múltiples dosis se extraerán y envasarán juntas en un único contenedor. Como se ha mencionado anteriormente, en una disposición alternativa el antígeno y el adyuvante se envasan por separado, para mezclado extemporáneo en el momento del uso.

25 Los procedimientos de la invención pueden comprender la etapa adicional de envasar la vacuna en contenedores para su uso. Contenedores adecuados incluyen viales y jeringuillas desechables (preferentemente estériles).

30 Cuando una composición de la invención está envasada en un vial, el vial estará hecho preferentemente de material de vidrio o plástico. Preferentemente, el vial se esteriliza antes de que la composición se añada. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales se sellan, preferentemente, con un tapón sin látex. El vial puede incluir una dosis única de vacuna o puede incluir más de una dosis (un vial "multidosis"), *por ejemplo* 10 dosis. Cuando se usa un vial de multidosis, cada dosis se extraerá con una aguja y jeringuilla estéril en condiciones asépticas estrictas, con cuidado de evitar la contaminación de los contenidos del vial. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

35 Un vial puede tener una tapa (p. ej., un cierre de tipo Luer) adaptada de modo que se pueda insertar en la tapa una jeringuilla pre-cargada, expeler los contenidos de la jeringuilla hacia el interior del vial y de modo que los contenidos del vial se puedan volver a introducir en la jeringuilla. Tras la retirada de la jeringuilla del vial, se puede insertar una aguja y la composición se puede administrar a un paciente. Preferentemente, la tapa está dentro de un sello o cubierta, de modo que el sello o cubierta ha de retirarse antes de poder acceder a la tapa-

40 Cuando la composición se envasa en el interior de una jeringuilla, de preferencia, normalmente, la jeringuilla no llevará la aguja colocada, aunque puede suministrarse aparte una aguja con la jeringuilla para colocar y usar. Se prefieren las agujas de seguridad. Son típicas las agujas de 2,54 cm y 0,61 mm, 2,54 cm y 0,51 mm y 1,6 cm y 0,51 mm. Las jeringuillas pueden proporcionarse con etiquetas que se pueden despegar en las que figurará impreso el número de lote y la fecha de caducidad de los contenidos, con el fin de facilitar el mantenimiento de un registro. Preferentemente, el émbolo de la jeringuilla tiene un tapón para evitar que el émbolo se saque accidentalmente durante la aspiración. Se prefiere un émbolo de caucho de butilo. Las jeringuillas pueden tener una tapa y/o un émbolo de caucho de látex. Las jeringuillas desechables contienen una dosis única de vacuna. Generalmente, la jeringuilla tiene un capuchón en la punta para sellar la punta antes de insertar una aguja y el capuchón de la punta está hecho de, preferentemente, un caucho de butilo. Si la jeringuilla y la aguja se envasan por separado, la aguja estará equipada, preferentemente, con una cubierta de caucho de butilo. Se prefiere caucho de butilo gris. Las jeringuillas preferidas son aquéllas comercializadas con la marca "Tip-Lok"TM.

50 Cuando se usa un contenedor de vidrio (p. ej., una jeringuilla o un vial), se prefiere usar un contenedor hecho de vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de cal sodada.

Una vez envasada una composición en un contenedor, el contenedor puede introducirse dentro de una caja para su distribución, por ejemplo dentro de una caja de cartón, y la caja se etiquetará con los detalles de la vacuna, por ejemplo su nombre comercial, una lista de los antígenos en la vacuna (p. ej., "recombinante de hepatitis B" etc.), el

5 contenedor de presentación (p. ej., "Jeringuillas precargadas desechables de tipo Tip-Lok o viales monodosis de 10 x 0,5 ml), su dosis (p. ej., cada una con una dosis de 0,5 ml), advertencias (p. ej., "Sólo para uso de adultos" o "Solo para uso pediátrico"), una fecha de caducidad, una indicación (p. ej., "inmunización activa contra el virus de la hepatitis B (HBV) causada por todos los subtipos conocidos para pacientes con insuficiencia renal (incluidos los pacientes de pre-hemodiálisis y en hemodiálisis) a partir de los 15 años de edad" etc.), un número de patente etc. Cada caja podría contener más de una vacuna envasada, por ejemplo cinco o diez vacunas envasadas (particularmente para viales). Si la vacuna está dentro de una jeringuilla, la caja puede mostrar una imagen de la jeringuilla.

10 La vacuna puede distribuirse junto con (p. ej., en la misma caja) un folleto que incluya los detalles de la vacuna, *por ejemplo* instrucciones de administración, detalles de los antígenos que lleva la vacuna etc. Asimismo, las instrucciones pueden contener advertencias para, *por ejemplo*, tener disponible con facilidad una solución de adrenalina para el caso de que se produzca una reacción anafiláctica grave tras la vacunación, etc.

La vacuna envasada se almacena (preferentemente) a una temperatura entre 2°C y 8°C. No debe congelarse.

Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna

15 Las composiciones de la invención son adecuadas para la administración a pacientes humanos y la invención proporciona un procedimiento para elevar una respuesta inmunitaria en un paciente, que comprende la etapa de administrar tal composición de la invención al paciente.

20 La invención también proporciona el uso de (i) un componente de antígeno de superficie viral que incluye un tensioactivo y (ii) un adyuvante graso en la fabricación de un medicamento para administrar a un paciente, en la que la proporción en peso entre el adyuvante graso en (ii) y el tensioactivo en (i) es inferior a 1000:1.

25 Las composiciones inmunógenas de la invención son, preferentemente, vacunas para, por ejemplo, uso en la prevención y/o tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B. Los pacientes que han recibido composiciones de la invención tienen, preferentemente, un título de anti-HBsAg GM en suero ≥ 500 mUI/ml, medido 6 semanas después de la primera inmunización. Más preferentemente, el título es ≥ 500 mUI /ml, medido tras 12 meses.

30 Las composiciones son particularmente útiles para proteger contra las infecciones por el virus de la hepatitis B y/o tratarlas en pacientes para los que las vacunas adyuvadas existentes (como el producto ENGERIX B™) son ineficaces. Los subgrupos de pacientes para los que las composiciones son particularmente adecuadas incluyen: Pacientes inmunocomprometidos, pacientes de hemodiálisis, pacientes en pre-hemodiálisis, pacientes con insuficiencia renal, pacientes con insuficiencia renal temprana antes de que requieran hemodiálisis, pacientes en espera de un trasplante de hígado, por ejemplo en las listas de espera, pacientes con insuficiencia renal terminal. Pacientes que han recibido un trasplante de órgano (particularmente un trasplante de hígado), por ejemplo en el periodo de 6 meses anterior a una primera dosis de la vacuna de la invención, pacientes receptores (o que han recibido en, por ejemplo, el periodo de 6 meses previo a la primera dosis de la vacuna de la invención, tratamiento con inmunoglobulina contra la hepatitis B (HBIG), pacientes con un haplotipo HLA DQ2 [75]; pacientes con un haplotipo HLA DR3 [75]; pacientes con un haplotipo HLA DR7 [75]; pacientes con el alelo de HLA DQB 1*0202 [76], pacientes infectados con el VIH, portadores crónicos del HBV, pacientes que recientemente han recibido una transfusión de sangre, pacientes que reciben fármacos inmunosupresores, pacientes que sufren SIDA, pacientes con ascitis, pacientes con cirrosis, pacientes con encefalopatía, pacientes que están recibiendo terapia con interferón, y, en particular ifn- α , pacientes fumadores de cigarrillos, pacientes fumadores de puros, pacientes con un índice de masa corporal ≥ 30 kg/m² y pacientes que han recibido una vacuna de HBsAg pero que no se han seroconvertido (p. ej., tienen un título anti-HBsAg en suero <10 mUI/ml tras un programa de dosificación primaria convencional, tal como 3 dosis de ENGERIX B™).

45 Estos pacientes pueden tener un índice de aclaramiento de creatinina inferior a 30 ml/min (siendo el intervalo sano normal de 100-140 ml/min en varones y 90-130 ml/min en mujeres). Preferentemente, los pacientes tendrán al menos 15 años de edad, por ejemplo entre 15-40 años de edad, entre 15-60 años de edad, entre 40-60 años de edad o incluso más de 60 años de edad. Los pacientes mayores de 55 años pueden ser tratados de forma útil con independencia de cualquier enfermedad subyacente.

50 Las composiciones de la invención se pueden administrar mediante inyección intramuscular en, por ejemplo, el deltoides.

Cuando las composiciones de la invención incluyen un adyuvante a base de aluminio, se puede producir sedimentación de los componentes durante el almacenamiento. Por tanto, la composición debe agitarse antes de la administración a un paciente. La composición agitada será una suspensión blanca turbia.

Procedimientos preferidos y vacunas de la invención

55 Un procedimiento preferido para preparar una composición inmunógena comprende las etapas de combinar (i) un componente de HBsAg que incluye polisorbato 20 y (ii) un componente adyuvante que comprende 3D-MPL

adsorbido en un fosfato de aluminio, para dar una composición en la que la proporción en peso entre 3D-MPL y el polisorbato 20 es inferior a 1000:1.

5 Una composición inmunógena preferida es una en la que: (a) la composición comprende HBsAg, polisorbato 20, 3D-MPL y un adyuvante de fosfato de aluminio, en el que el polisorbato 20 se incorpora en las partículas de HBsAg durante la purificación; y (b) la proporción en peso entre el 3D-MPL y el polisorbato 20 es inferior a 1000:1. Preferentemente, el 3D-MPL y el HBsAg se adsorben en fosfato de aluminio. La concentración de HBsAg es de aproximadamente 40 µg/ml. La concentración de 3D-MPL es de aproximadamente 40 µg/ml. La concentración de Al³⁺ es de aproximadamente 1mg/ml.

10 Otra composición preferida, comprende (i) HBsAg, purificado de *S. cerevisiae* e (ii) un adyuvante que comprende una mezcla de fosfato de aluminio y 3D-MPL. La concentración de HBsAg es de aproximadamente 40 µg/ml. La concentración de 3D-MPL es de aproximadamente 100 µg/ml. La concentración de Al³⁺ es de aproximadamente 1mg/ml. HBsAg incluye polisorbato 20 y la proporción en peso de aceite:tensioactivo (Es decir, la proporción en peso de 3D-MPL:polisorbato 20) está entre 2,5:1 y 100:1 es decir el polisorbato 20 está presente a un nivel entre 1 µg/ml y 40 µg/ml (es decir, entre 2,5 µg y 100 µg de polisorbato 20 por 100 µg de HBsAg). Preferentemente, la proporción
15 está entre 2,5:1 y 25:1, es decir el polisorbato 20 está presente a un nivel entre 4 µg/ml y 40 µg/ml. Tanto el 3D-MPL como HBsAg se adsorben en el fosfato de aluminio.

General

El término "que comprende" abarca (que incluye" además de "constituido por", *por ejemplo* una composición "que comprende" X puede estar constituido sólo por X o puede incluir algo adicional, *por ejemplo* X + Y.

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

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

25 A menos que se indique específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Por tanto, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, dos componentes se pueden combinar entre sí y, después, la combinación puede combinarse con el tercer componente, *etc.* Como se ha descrito anteriormente, los componentes se pueden mezclar durante la fabricación o de forma extemporánea en el momento del uso.

30 Cuando un antígeno se describe como "adsorbido" en un adyuvante, se prefiere que al menos el 50 % (en peso) de dicho antígeno se adsorbe, por ejemplo el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más. Se prefiere que el HBsAg se adsorba totalmente, es decir nada detectable en el sobrenadante.

Cuando se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deberán obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EST) y, en particular, libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

35 Los cauchos de butilo incluyen cauchos de clorobutilo y de bromobutilo.

Se apreciará que pueden existir grupos ionizables en la forma neutra mostrada en las fórmulas del presente documento o pueden existir en forma cargada, por ejemplo dependiendo del Ph. Por tanto, un grupo fosfato se puede mostrar como -P-O-(OH)₂, esta fórmula es simplemente representativa del grupo fosfato neutro y otras formas cargadas entran dentro de la invención. De forma similar, pueden existir anillos de azúcar en forma abierta y cerrada
40 y que, mientras que las formas cerradas se muestran en las fórmulas estructurales de la presente memoria descriptiva, las formas abiertas también quedan abarcadas por la invención.

MODOS PARA REALIZAR LA INVENCION

Se estudiaron tres preparaciones diferentes de HBsAg::

- HBsAg expresado en células de *S. cerevisiae* purificado usando tensioactivo no iónico.
- 45 • HBsAg expresado en células de la levadura *Hanensula* purificado usando tensioactivo no iónico.
- HBsAg expresado en células CHO, con la secuencia preS2, purificado sin usar tensioactivos.

Se estudiaron dos adyuvantes diferentes:

- Hidróxido de aluminio (1 mg/ml)
- MF59 en tampón citrato (13 mM)

ES 2 371 360 T3

Se prepararon seis formulaciones, cada una con 20 µg/ml de HBsAg, NaCl 0,15M y 0,01% de metiolato:

	A	B	C	D	E	F
HBsAg	CHO	CHO	<i>Hanensula</i>	<i>Hanensula</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Adyuvante	Hidróxido de Al	MF59	Hidróxido de Al	MF59	Hidróxido de Al	MF59
NaCl	0,15M	0,15M	0,15M	0,15M	0,15M	0,15M
Mertiolato	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%
Tensioactivo	-	-	+	+	+	+

5 Se ha notificado que MF59 potencia la respuesta de anticuerpos en primates al HBsAg recombinante [77]. Las formulaciones A a D se usaron para inmunizar monos verdes africanos. Grupos de 6 monos fueron inmunizados por vía intramuscular el día 0 y el día 28. Se extrajo sangre a tiempo 0 y, después, cada 2 semanas hasta la semana 8, y se midieron los títulos de anti-HBsAg (GMT) mediante ELISA. Los títulos se normalizaron a 1,0, que era el valor del día 14 en cada grupo, y los resultados normalizados fueron los siguientes:

	A	B	C	D
Huésped	CHO	CHO	Levadura	Levadura
Adyuvante	Hidróxido de Al	MF59	Hidróxido de Al	MF59
Tensioactivo	-	-	+	+
Día 14	1,0	1,0	1,0	1,0
Día 28	0,9	0,8	1,3	0,4
Día 42	19,2	159,8	108,8	85,2
Día 56	10,8	32,6	61,3	24,5

10 En cuanto a los títulos del día 42 y el día 56, estos datos muestran que el adyuvante MF59 aumentó los títulos mucho más marcadamente que el adyuvante aluminio para el antígeno expresado en CHO (incremento de 160 veces frente a incremento de 20 veces el día 42), pero la situación se invirtió para el antígeno expresado en *Hanensula* (incremento de 85 veces frente a incremento de 110 veces el día 42).

Se realizaron experimentos similares en babuinos usando las formulaciones B, E y F. Los valores de GMT se midieron 14 días después de la primera inyección y con respecto al valor del grupo F fueron los siguientes:

	A	B	E	F
Tensioactivo	-	-	+	+
Adyuvante	Hidróxido de Al	MF59	Hidróxido de Al	MF59
Día 14	-	13,5	4,5	1,0

15 Aquí, el uso de MF59 en lugar del adyuvante de aluminio conduce a una respuesta de GMT menor (compárense los grupos E y F), mientras que cabría esperar un incremento (grupo B y referencia 77).

20 Las respuestas de anti-HBsAg 28 días después de la primera inyección usando las formulaciones E y F también se compararon en monos rhesus, monos verdes africanos y ratones C3H (nota: los ratones recibieron un 60% de la dosis de HBsAg). Además de medir los valores de GMT, también se midió el número de respondedores, es decir animales que muestran un título de >10 ml U/ml. Los resultados normalizados para el grupo F fueron los siguientes:

	GMT		Respondedores	
	E	F	E	F
Adyuvante	Hidróxido de Al	MF59	Hidróxido de Al	MF59
Rhesus	4,2	1,0	60 %	20 %
AGM	110,0	1,0	100 %	50 %
Ratones	0,1	1,0	94 %	100 %

En contraste con los ratones, el uso de MF59 como adyuvante en primates dio como resultado una considerable disminución de los valores de GMT y de los niveles de respondedores para el HBsAg expresado en *S. cerevisiae*.

- 5 Por último, el incremento de GMT resultante de la vacunación de refuerzo con las formulaciones E y F se midió en monos verdes africanos seropositivos. Los títulos se midieron antes de la dosis de refuerzo y, de nuevo 28 días después, y el incremento de los títulos fue el siguiente:

Grupo	Adyuvante	Incremento (x)
E	Hidróxido de Al	91,5 X
f	MF59	19,1 X

- 10 Además de proporcionar un incremento menor que el adyuvante hidróxido de aluminio, MF59 dio un valor de GMT menor 28 días después de la dosis de refuerzo.

- 15 En general, MF59 parece ser un adyuvante peor que el hidróxido de aluminio para HBsAg expresado en levaduras en primates, pero un adyuvante mejor para el HBsAg expresado en CHO. Estos resultados se pueden explicar por una interacción entre (a) tensioactivo residual en HBsAg purificado de levaduras y (b) exceso del aceite escualeno en el adyuvante MF59. Como aceite, el escualeno está sujeto a la acción de tensioactivos en condiciones acuosas, y al contrario, y se ha propuesto que el tensioactivo en el antígeno es incompatible con el aceite en el adyuvante. Esta incompatibilidad puede tratarse con purificación del HBsAg sin usar detergentes (p. ej., como en el material expresado en CHO) o asegurándose que el aceite no esté presente en un exceso tal que interfiera con el tensioactivo en el antígeno.

- 20 En una composición de HBsAg adyuvada con MF59, un volumen de MF59 se combina con un volumen de solución antigénica. Por tanto, en un volumen de 100 ml, habrá una solución de 50 ml de MF59 y 50 ml de HBsAg. Estos 100 ml contienen 2,15 g de escualeno del MF59 y, a una concentración de HBsAg de 40 µg/ml, contiene 2 mg de HBsAg. A una concentración de polisorbato 20 de 25 µg por 100 µg de HBsAg [35], los 100 ml contienen 0,5 mg de polisorbato 20. La proporción aceite:tensioactivo en una vacuna típica adyuvada con MF59 es, por tanto, 4300:1. Reduciendo el exceso de aceite a menos de 1000:1, la interacción entre el aceite en el adyuvante y el tensioactivo en el antígeno puede reducirse sustancialmente, de modo que se reduce la interferencia.

- 25 Debe entenderse que la invención se ha descrito únicamente a modo de ejemplo y que se pueden realizar modificaciones permaneciendo dentro del alcance de la invención.

REFERENCIAS

- 30 [1] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 [2] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 [3] Documento WO90/14837.
 [4] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
 35 [5] Patente de EE.UU. 6.299.884.
 [6] Patente de EE.UU. 6,451,325.
 [7] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
 [8] Hariharan y col., (1995) Cancer Res 55:3486-9.
 [9] WO95/11700.
 40 [10] Patente de EE.UU. 6,080,725.
 [11] WO2005/097181.

- [12] UK patent application GB-A-2220211.
 [13] Myers y col., (1990) pages 145-156 of Cellular and molecular aspects of endotoxin reaction.
 [14] Ulrich (2000) Chapter 16 (pages 273-282) of reference 1.
 [15] Johnson y col., (1999) J Med Chem 42:4640-9.
 5 [16] Baldrick y col., (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413.
 [17] WO 94/21292.
 [18] WO94/00153.
 [19] WO97/01640/
 [20] WO96/26741.
 10 [21] WO93/19780.
 [22] Patente de EE.UU. 6,375,945.
 [23] WO00/00462.
 [24] Meraldi y col., (2003) Vaccine 21:2485-2491.
 [25] Pajak y col., (2003) Vaccine 21:836-842.
 15 [26] Brandenburg y col., (2000) Eur J Biochem 267 :3370-7.
 [27] Johnson y col., (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.
 [28] Evans y col., (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.
 [29] Patente de EE.UU. 6,764,840.
 [30] Patente de EE.UU. application 2005/0107600.
 20 [31] Lien y col., (2001) J. Biol. Chem 276:1873-80.
 [32] WO03/011223.
 [33] Wong y col., (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42.
 [34] US2005/0215517.
 [35] Costa y col., (1997) Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo v.39 n.1 São Paulo Ene.
 25 [36] Vanlandschoot y col., (2005) J Gen Virol 86:323-31.
 [37] Hilleman (1993) pages 17-40 of Hepatitis B vaccines in clinical practice ISBN 0-8247-8780-3.
 [38] Gerin y col., (1969) J Virol 4:763.
 [39] Gerin y col., (1969) J Virol 7:569.
 [40] Siebke y col., (1972) Acta Pathol Microbiol Scan sect B 80:935.
 30 [41] Pillot y col., (1976) J Clin Microbiol 4:205.
 [42] Duimel & Krijnen (1972) Vox Sang 23:249.
 [43] Neurath y col., (1974) PNAS USA 71:2663.
 [44] Charm & Wong (1975) Biotechnol Bioeng 16:593.
 [45] Patente de EE.UU. 4,857,317.
 35 [46] Patente de EE.UU. 4,683,294.
 [47] Houwen y col., (1975) J Immunol Methods 8:185.
 [48] Sitrin y col., (1993) pages 83-101 of Hepatitis B vaccines in clinical practice ISBN 0-8247-8780-3.
 [49] Wampler y col., (1985) PNAS USA 82:6830-4.
 [50] Chi y col., (1994) Ann N Y Acad Sci 721:365-73.
 40 [51] Agraz y col., (1994) J Chromatogr A 672:25-33.
 [52] Mason y col., (1992) PNAS USA 89:11745-9.
 [53] Deml y col., (1999) J Virol Methods 79:205-17.
 [54] Ibarra y col., (1999) J Chromatogr B Biomed Sci Appl 735:271-7.
 [55] WO90/10058.
 45 [56] Solicitud de patente japonesa JP63239234.
 [57] Patente de EE.UU. 4,694,074.
 [58] EP-0341733.
 [59] Patente de EE.UU. 5,242,812.
 [60] Solicitud de patente rusa RU-2128707.
 50 [61] Hardy y col., (2000) J Biotechnol 77:157-67.
 [62] Dogan y col., (2000) Biotechnol Prog 16:435-41.
 [63] Berkower y col., (2004) Virology 321(1):75-86.
 [64] Eckhart y col., (1996) J Gen Virol 77:2001-8.
 [65] von Brunn y col., (1991) Vaccine 9(7):477-84.
 55 [66] Vreden y col., (1991) Am J Trop Med Hyg 45(5):533-8.
 [67] Moelans y col., (1995) Mol Biochem Parasitol 72(1-2):179-92.
 [68] Stoute y col., (1997) N Engl J Med 336(2):86-91.
 [69] Wunderlich & del Portillo (2000) Mol Med 6(3):238-45.
 [70] Patente de EE.UU. 5,928,902
 60 [71] WO93/10152.
 [72] Nony y col., (2001) Vaccine 27:3645-51.
 [73] WO02/12287
 [74] WO03/066094.
 [75] Desombere y col., (1998) Tissue Antigens 51:593-604.
 65 [76] McDermott y col., (1997) Tissue Antigens. 50:8-14.
 [77] Traquina y col., (1996) J Infect Dis 174:1168-75.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS SRL CONTORNI Mario

<120> REDUCCIÓN DE LAS INTERFERENCIAS ENTRE ADYUVANTES QUE CONTIENEN ACEITE Y ANTÍGENOS QUE CONTIENEN TENSIOACTIVOS

- 5 <130> PD41598W0
- <140> PCT/IB2006/YYYYYY
- <141> 2006-08-02
- <150> GB-0515906.6
- <151> 2005-08-02
- 10 <150> GB-0522599.0
- <151> 2005-11-04
- <150> GB-0523923.1
- <151> 2005-11-24
- <160> 2
- 15 <170> SeqWin99, version 1.02
- <210> 1
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Plasmodium falciparum

20 <400> 1

Asn Ala Asn Pro
↓

- <210> 2
- <211> 423
- <212> PRT
- 25 <213> Plasmodium falciparum
- <400> 2

```

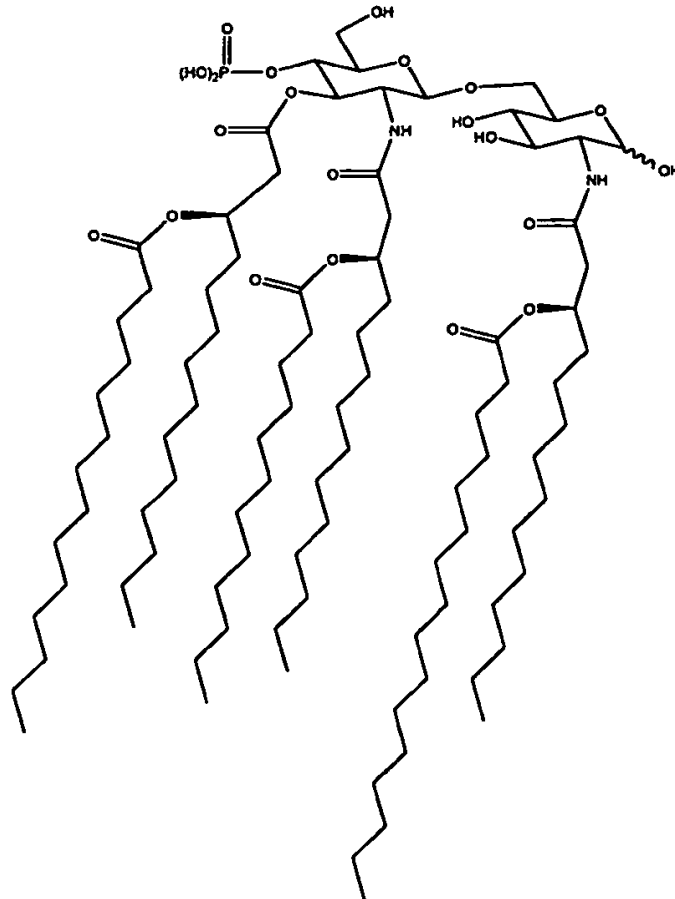
Met Met Ala Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
↓
Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
20
Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
35
Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
50
Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
65
Asn Pro Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro
85
Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn Asn Ala Asn Asn Ala Val
100
Lys Asn Asn Asn Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Glu Gln Tyr
    
```

ES 2 371 360 T3

	115		120		125														
Leu	Lys 130	Lys	Ile	Lys	Asn	Ser 135	Ile	Ser	Thr	Glu	Trp 140	Ser	Pro	Cys	Ser				
Val	Thr	Cys	Gly	Asn	Gly 150	Ile	Gln	Val	Arg	Ile 155	Lys	Pro	Gly	Ser	Ala 160				
Asn	Lys	Pro	Lys	Asp 165	Glu	Leu	Asp	Tyr	Glu 170	Asn	Asp	Ile	Glu	Lys 175	Lys				
Ile	Cys	Lys	Met 180	Glu	Lys	Cys	Ser	Ser 185	Val	Phe	Asn	Val	Val 190	Asn	Ser				
Arg	Pro	Val 195	Thr	Asn	Met	Glu	Asn 200	Ile	Thr	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro				
Leu	Leu 210	Val	Leu	Gln	Ala	Gly 215	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr 220	Arg	Ile	Leu	Thr				
Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp 230	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser 235	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly 240				
Gly	Ser	Pro	Val	Cys 245	Leu	Gly	Gln	Asn	Ser 250	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser 255	Asn				
His	Ser	Pro	Thr 260	Ser	Cys	Pro	Pro	Ile 265	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg 270	Trp	Met				
Cys	Leu	Arg 275	Arg	Phe	Ile	Ile	Phe 280	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu 285	Leu	Cys	Leu				
Ile	Phe 290	Leu	Leu	Val	Leu	Leu 295	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met 300	Leu	Pro	Val	Cys				
Pro	Leu	Ile	Pro	Gly	Ser 310	Thr	Thr	Thr	Asn	Thr 315	Gly	Pro	Cys	Lys	Thr 320				
Cys	Thr	Thr	Pro	Ala 325	Gln	Gly	Asn	Ser	Met 330	Phe	Pro	Ser	Cys	Cys 335	Cys				
Thr	Lys	Pro	Thr 340	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr 345	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro 350	Ser	Ser				
Trp	Ala	Phe 355	Ala	Lys	Tyr	Leu	Trp 360	Glu	Trp	Ala	Ser	Val 365	Arg	Phe	Ser				
Trp	Leu 370	Ser	Leu	Leu	Val	Pro 375	Phe	Val	Gln	Trp	Phe 380	Val	Gly	Leu	Ser				
Pro	Thr	Val	Trp	Leu	Ser 390	Ala	Ile	Trp	Met	Met 395	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro 400				
Ser	Leu	Tyr	Ser	Ile 405	Val	Ser	Pro	Phe	Ile 410	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile 415	Phe				
Phe	Cys	Leu	Trp	Val	Tyr	Ile													
			420																

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una composición inmunogénica, que comprende las etapas de combinar (i) un componente de antígeno de superficie viral que incluye un tensioactivo y (ii) un componente adyuvante graso, para dar una composición en la que la proporción en peso entre el adyuvante graso y el tensioactivo es inferior a 1000:1.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el adyuvante graso comprende un aceite metabolizable.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el adyuvante graso comprende una emulsión submicrónica de aceite en agua de escualeno y polisorbato 80.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el adyuvante graso comprende una molécula que comprende un resto ácido graso.
- 10 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el adyuvante graso es un monofosforilo lípido A 3-desoxiacilado ('3D-MPL').
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el 3D-MPL es una mezcla de moléculas que varían según su acilación.
7. El procedimiento de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que el adyuvante graso incluye:



- 15 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el ED-MPL está en forma de partículas.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que las partículas se pueden esterilizar mediante filtración.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que el 3D-MPL está en una combinación con una sal de aluminio.
- 20 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la sal de aluminio es un fosfato de aluminio.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el 3D-MPL se adsorbe sobre la sal de aluminio.

13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tensioactivo es un éster de polioxietilensorbitano.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el éster es polisorbato 20.
- 5 15. El procedimiento de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el que la concentración de tensioactivo no es superior a 50 µg/ml.
16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno de superficie viral es un antígeno particulado de superficie de la hepatitis B, purificado en presencia de un tensioactivo.
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el HBsAg se expresa en una célula de levadura.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en la que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
- 10 19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el HBsAg no está glicosilado y/o incluye fosfatidilinositol.
20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que el HBsAg procede del subtipo adw1 del virus de la hepatitis B.
- 15 21. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno es una proteína híbrida que comprende un antígeno de superficie viral y un antígeno heterólogo.
22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que el antígeno de superficie viral es HBsAg y el antígeno heterólogo es un antígeno de la malaria.
23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que la proteína híbrida comprende HBsAg y un fragmento de la proteína circunsporozoito de *Plasmodium falciparum*.
- 20 24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que la proteína híbrida comprende una porción C-terminal de una proteína circunsporozoito de *Plasmodium falciparum*, cuatro o más repeticiones en tándem de la región inmunodominante de la proteína circunsporozoito y HBsAg.
25. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la proporción en peso del adyuvante graso y el tensioactivo es inferior a 500:1.
- 25 26. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la proporción en peso del adyuvante graso y el tensioactivo es inferior a 50:1.
27. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el adyuvante graso es un 3D-MPL y la proporción en peso del adyuvante graso y el tensioactivo está entre 2,5:1 y 25:1.
- 30 28. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la composición tiene una osmolalidad de 200 mOsm/kg a 400 mOsm/kg.
29. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la composición incluye un tampón fosfato.
30. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la composición tiene un pH entre 6,5 y 7,0.
- 35 31. El uso de (i) un componente de antígeno de superficie viral que incluye un tensioactivo y (ii) un adyuvante graso en la fabricación de un medicamento para administrar a un paciente, en el que la proporción en peso entre el adyuvante graso en (ii) y el tensioactivo en (i) es inferior a 1000:1.
- 40 32. Un procedimiento para preparar una composición inmunógena, que comprende las etapas de combinar (i) un componente de HBsAg que incluye polisorbato 20 y (ii) un componente adyuvante que comprende 3D-MPL adsorbido en un fosfato de aluminio, para dar una composición en la que la proporción en peso entre 3D-MPL y el polisorbato 20 es inferior a 1000:1.
33. Una composición inmunogénica, en la que: (a) la composición comprende HBsAg, polisorbato 20, 3D-MPL y un adyuvante de fosfato de aluminio, en la que el polisorbato 20 se incorpora en las partículas de HBsAg durante la purificación; y (b) la proporción en peso entre el 3D-MPL y el polisorbato 20 es inferior a 1000:1.