

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 104**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
A61K 39/25 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09152313 .4**
96 Fecha de presentación: **07.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2080522**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.07.2009**

54 Título: **Emulsión inmuno-adyuvante termorreversible**

30 Prioridad:
07.07.2005 FR 0507240
04.08.2005 FR 0508310

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.11.2012

73 Titular/es:
SANOPI PASTEUR (100.0%)
2, AVENUE PONT PASTEUR
69367 LYON CEDEX 07, FR

72 Inventor/es:
KLUCKER, MARIE-FRANÇOISE;
DALENCON, FRANÇOIS y
PROBECK-QUELLEC, PATRICIA

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 390 104 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

Emulsión inmuno-adyuvante termorreversible

5 La presente invención se refiere al campo de las vacunas gripales; pero más particularmente, la invención se refiere al campo de las vacunas gripales que comprenden una emulsión adyuvante. En la técnica anterior existen numerosas vacunas que contienen uno o varios adyuvantes. La patente US6299884 describe principalmente una formulación adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua cuyo tamaño de gotas de aceite está comprendido entre 100 y 1000 nm. Esta emulsión se obtiene por medio de un homogenizador de alta presión (microfluidizador), en el transcurso de un procedimiento de fabricación que usa elevadas energías mecánicas con el fin de obtener fuerzas de cizallamiento suficientemente grandes para reducir el tamaño de las gotas de aceite. 10 Según esta enseñanza, si el valor mínimo del intervalo de las gotas obtenidas es de 100 nm, el valor medio es claramente mayor y se sitúa, en el mejor de los casos, en aproximadamente 170 nm, más generalmente aproximadamente 500 nm.

15 Se desea poder disponer de una formulación alternativa a la propuesta en esta patente, que se pueda obtener por un procedimiento más sencillo (que no necesite una tecnología de cizallamiento particular) y de baja energía y que sea a la vez reproducible y perfectamente fiable; además, la formulación adyuvante debe permitir ayudar eficazmente a las vacunas permitiendo principalmente aumentar la respuesta inmunitaria obtenida con el fin de disminuir la dosis de antígeno presente, sin presentar ningún signo de toxicidad que perjudicaría su administración con total seguridad.

20 Para conseguir este objetivo, la presente invención tiene por objeto una composición inmunógena que comprende al menos un antígeno contra la gripe y una emulsión adyuvante aceite en agua obtenida por un procedimiento de inversión de fase por variación de la temperatura de una mezcla que comprende al menos :

- escualeno,
- un disolvente acuoso,
- un polioxietilen alquil éter, cuyo balance hidrófilo/lipófilo es superior o igual a 10,
- 25 • un tensioactivo no iónico hidrófobo, cuyo balance hidrófilo/lipófilo es interior o igual a 9.

30 Tal emulsión obtenida por un procedimiento de inversión de fase por variación de temperatura proporciona una ventaja muy grande desde un punto de vista industrial. Dicho procedimiento presenta todas las garantías de seguridad y de rentabilidad necesarias para la industria farmacéutica. Además, gracias a este procedimiento, es posible obtener una emulsión monodispersa cuyo tamaño de gotas de aceite sea muy pequeño, lo que hace que la emulsión así obtenida sea particularmente estable y fácilmente filtrable por medio de filtros esterilizantes cuyo umbral de corte es de 200 nm. Según una característica particular, el 90% de la población volúmica (o d90) de las gotas de aceite tienen un tamaño inferior a 160 nm e incluso a 150 nm.

35 Según un modo particular de realización de la invención, la emulsión según la invención comprende además un alditol; esto permite obtener una inversión de fase a una temperatura inferior a la que sería necesaria para la misma composición sin alditol, lo que permite reducir los costes de producción así como los riesgos de desnaturalización térmica de los constituyentes de la emulsión.

Según un modo particularmente ventajoso, el tensioactivo no iónico hidrófobo de la invención es un éster de sorbitano o un éster de manida. Dichos tensioactivos presentan la ventaja de poder utilizarse con toda seguridad en disoluciones inyectables.

40 Según un modo particular de la invención, la emulsión comprende además un alquilpoliglicósido y un agente crioprotector tal como un azúcar, en particular dodecilmaltósido y/o sacarosa.

45 Por lo tanto, es posible obtener una emulsión liofilizable que, después de liofilización y reconstrucción, vuelva a tener sus propiedades, principalmente granulométricas, es decir que la emulsión liofilizada después de ser reconstituida siga siendo monodispersa y esté constituida por gotas de aceite de las que el 90% de la población volúmica tiene un tamaño inferior a 200 nm.

Esto es particularmente importante para el campo de las vacunas que a veces, por razones de estabilidad (bien de algunos antígenos, bien de algunos adyuvantes) deben conservarse en forma liofilizada.

50 Se describe igualmente un procedimiento de preparación de una composición inmunógena según el cual se mezcla al menos un antígeno vacunal con una emulsión aceite en agua, caracterizado por que se obtiene la emulsión aceite en agua por un procedimiento de inversión de fase por variación de la temperatura.

Según un modo de realización, el procedimiento según la invención comprende al menos una etapa de preparación de la emulsión de aceite en agua por enfriamiento de una emulsión inversa de agua-en-aceite que comprende al menos:

- escualeno,
- 5 • un disolvente acuoso,
- un tensioactivo no iónico hidrófilo que es un polioxietileno alquil éter,
- un tensioactivo no iónico hidrófobo.

10 Mediante dicho procedimiento, muy ventajoso desde el punto de vista industrial, se obtiene una composición inmunógena estable, muy eficaz incluso con una dosis muy baja de antígenos. Además, gracias al procedimiento de preparación utilizado, las gotas de aceite de las emulsiones están todas calibradas con el mismo tamaño muy pequeño; en efecto, cuando se realiza la medida de las propiedades granulométricas (tamaño y distribución de tamaños), se señala que se tiene una emulsión monodispersa, con una curva de distribución de tipo gaussiano muy cerrada, centrada alrededor de un valor pequeño, generalmente alrededor de 80-90 nm.

15 Según un modo de realización particular del procedimiento, se obtiene la emulsión inversa de agua en aceite mezclando escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo que es un polioxietileno alquil éter y un tensioactivo no iónico hidrófobo con el fin de obtener en primer lugar una emulsión bruta de aceite en agua y a continuación se calienta esta emulsión hasta al menos la temperatura de inversión de fase con el fin de obtener la emulsión inversa. Dicha manera de proceder tiene como ventaja limitar la duración durante la que los diferentes componentes de la emulsión se someterán a una temperatura elevada.

20 Según otro modo de realización, el procedimiento comprende las etapas siguientes :

- se calientan por separado, a una temperatura al menos igual a la temperatura de inversión de fase, por una parte la fase acuosa que comprende el disolvente acuoso y el polioxietileno alquil éter y por otra parte la fase oleosa que comprende el escualeno y el tensioactivo hidrófobo y después
- se mezclan las 2 fases con el fin de obtener una emulsión inversa de agua en aceite.

25 Según un modo de realización particular, cada una de las fases acuosa y oleosa se calientan por separado, con mezclado, a una temperatura inferior a la temperatura de inversión de fase. A continuación, se mezclan las 2 fases con el fin de obtener una emulsión de aceite en agua; el conjunto se calienta a continuación a una temperatura igual al menos a la temperatura de inversión de fase con el fin de obtener la emulsión inversa de agua en aceite.

30 Según un modo de realización particular, el procedimiento de preparación según la invención comprende además una etapa de liofilización. Por lo tanto, el procedimiento se puede utilizar para la preparación de composiciones inmunógenas que comprenden antígenos que se deben conservar en forma liofilizada por razones de estabilidad.

En el curso de la descripción siguiente aparecerán otras numerosas ventajas de la presente invención.

Para los fines de la descripción de la invención, los parámetros d50 y d90 mencionados en la presente solicitud de patente son valores volúmicos; el valor de d50 significa el valor de 50% de la población volúmica de las gotas.

35 Por emulsión de aceite en agua en el sentido de la invención se entiende una dispersión de una fase oleosa en una fase acuosa que puede estar constituida bien por agua o bien por una disolución salina, opcionalmente tamponada. Según un modo particular de realización de la invención, la fase acuosa de la emulsión está constituida por una disolución tampón, tal como las disoluciones de Dulbecco tamponadas con fosfato (D-PBS, sin calcio ni magnesio).

40 Por emulsión «adyuvante», se entiende una emulsión inmuno-adyuvante, es decir capaz de modificar la respuesta del sistema inmunitario inducida por la administración de un antígeno, con respecto a la respuesta obtenida en ausencia de emulsión; esta respuesta del sistema inmunitario se puede traducir en una producción de anticuerpos o una activación de algunas células, principalmente de las células presentadoras de antígenos (por ejemplo células dendríticas), los linfocitos T o los linfocitos B. Esta activación celular se puede poner de evidencia por la presencia de marcadores de activación en la superficie de las células o por la liberación de citocinas. La modificación de la respuesta inmunitaria inducida por la emulsión adyuvante puede ser de naturaleza cuantitativa, es decir que se obtiene un aumento de la respuesta inducida, o de naturaleza cualitativa, es decir que se obtiene una respuesta de naturaleza o de orientación diferente, o también que se obtiene una respuesta suplementaria. Por emulsión adyuvante, se entiende igualmente una emulsión que permite reducir la cantidad de antígenos administrados para una misma respuesta inducida.

50 Por composición inmunógena en el sentido de la presente invención se entiende una composición que comprende al menos un antígeno y es susceptible de ser administrada a humanos o a animales con el fin de inducir una respuesta del sistema inmunitario. Esta respuesta puede ser una respuesta humoral (producción de anticuerpos) o celular

- (proliferación y/o activación de células inmunitarias). La composición inmunógena puede ser una composición con fines profilácticos o con fines terapéuticos o incluso los dos. La composición inmunógena obtenida según la invención se puede administrar por cualquier vía habitualmente utilizada o preconizada para las vacunas: vía parenteral, vía mucosa, etc. y presentarse en formas diversas, principalmente líquida o liofilizada. Se puede administrar mediante una jeringa o mediante un inyector sin aguja para inyección intramuscular, subcutánea o intradérmica o mediante un pulverizador nasal.
- Por antígeno en el sentido de la presente invención se entiende cualquier antígeno susceptible de utilizarse en una vacuna, se trate de un germen entero o de un antígeno subunitario, importando poco su naturaleza; el antígeno puede en efecto ser un péptido, una proteína, una glicoproteína, un polisacárido, un glicolípido, un lipopéptido...etc
- La emulsión adyuvante descrita está particularmente adaptada a los antígenos virales; en efecto, se han obtenido resultados particularmente buenos con antígenos del citomegalovirus humano, del virus de inmunodeficiencia humano y de la gripe.
- En lo que respecta a los antígenos del virus de la gripe, es posible usar antígenos que provienen de una sola cepa vírica o de una mezcla de diferentes cepas.
- Es posible usar antígenos obtenidos de virus cultivados de forma tradicional en huevos o en células. Gracias a la invención se ha observado que se podía obtener, tanto para una sola cepa como para una mezcla de cepas, una respuesta satisfactoria del sistema inmunitario reduciendo a la vez de forma muy importante la cantidad de antígenos presente en la dosis de vacuna. Esto puede tener un interés particularmente grande en el caso de la preparación de una vacuna contra una pandemia de gripe en el que es preciso poder producir, en un intervalo de tiempo muy corto, cantidades muy grandes de dosis de vacuna.
- Según la invención, la emulsión de aceite en agua comprende escualeno que es un aceite que proviene en su origen del hígado de tiburón; es un aceite cuya fórmula química bruta es $C_{30}H_{50}$ que comprende 6 enlaces dobles, este aceite es metabolizable y presenta calidades que permiten su utilización en un producto farmacéutico inyectable. Existe igualmente el escualeno de origen vegetal extraído del aceite de oliva. Se han obtenido principalmente buenos resultados usando el escualeno suministrado por la sociedad Fluka que es de origen animal. Las cantidades de escualeno usadas para la preparación de una emulsión concentrada están comprendidas ventajosamente entre 5 y 45%; esta emulsión concentrada se diluye a continuación durante la preparación de las composiciones inmunógenas para preparar dosis inmunizantes en las que la cantidad de escualeno estará comprendida entre 0,5 y 5%. Esta dilución se puede realizar por mezcla sencilla de la emulsión adyuvante según la invención y de la suspensión que comprende el antígeno.
- Según la invención, la emulsión comprende un tensioactivo hidrófilo no iónico cuyo valor del balance hidrófilo/lipófilo o HLB es superior o igual a 10 y que pertenece al grupo químico de los polioxietileno alquil éteres (PAE), también denominados éteres polioxietilenados de alcoholes grasos o polioxietileno glicol éteres de n-alcohol. Estos tensioactivos no iónicos se obtienen por condensación química entre un alcohol graso y óxido de etileno. Tienen una fórmula química general del tipo $CH_3(CH_2)_x(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ en la que n designa el número de unidades de óxido de etileno y habitualmente está comprendido entre 10 y 60 y $x+1$ es el número de átomos de carbono, función de los alcoholes grasos utilizados. En general, estos productos son mezclas de polímeros con cadenas hidrocarbonadas de longitud parecida.
- La emulsión según la invención comprende habitualmente un único PAE hidrófilo. Una mezcla de varios PAE conviene igualmente en la medida en la que el valor global del HLB sea ≥ 10 . Los éteres polioxietilenados de alcoholes grasos que convienen para el objetivo de la invención pueden estar en forma líquida o sólida a temperatura ambiente. Entre los compuestos sólidos se prefieren aquellos que se disuelven directamente en la fase acuosa o que no necesitan un calentamiento grande.
- En la medida en la que el número de unidades de óxido de etileno sea suficiente, los éteres polioxietilenados de los alcoholes laúrico, mirístico, cetílico, oléico y/o esteárico son particularmente apropiados para el objetivo de la invención. Se les puede encontrar principalmente en la gama de productos conocidos con las denominaciones comerciales Brij® para los productos comercializados por la sociedad ICI America's Inc., Eumulgin® para los productos comercializados por la sociedad Cognis o Simulsol® para los productos comercializados por la sociedad SEPPIC.
- Una emulsión particularmente preferida según la invención contiene como tensioactivo hidrófilo no iónico un polioxietileno alquil éter elegido entre el grupo constituido por cetareth-12 (comercializado con la denominación de Eumulgin® B1), cetareth-20 (Eumulgin® B2), steareth-21 (Eumulgin® S21), ceteth-20 (Simulsol® 58 o Brij® 58), ceteth-10 (Brij® 56), steareth-10 (Brij® 76), steareth-20 (Brij® 78), oleth-10 (Brij® 96 o Brij® 97) y oleth-20 (Brij® 98 o Brij® 99). El número situado junto a cada nombre químico corresponde al número de unidades de óxido de etileno en la fórmula química.
- Se han obtenido buenos resultados con el producto BRIJ® 56. Un compuesto particularmente adaptado y preferido por su origen semisintético es el polioxietileno (12) éter cetosteárico, suministrado por la sociedad COGNIS con la

denominación de Eumulgin™ B1. Este compuesto es una mezcla de $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_{12}-\text{OH}$ y de $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{12}-\text{OH}$.

Según la invención, la emulsión adyuvante comprende igualmente un tensioactivo no iónico hidrófobo; se debe tratar de un tensioactivo que pueda ser utilizado en la industria farmacéutica; entre los tensioactivos que convienen a este respecto, se pueden citar los ésteres de sorbitano así como los ésteres de manida; los ésteres de sorbitano se obtienen por reacción de un ácido graso y de una mezcla de ésteres parciales de sorbitol y sus mono y di-anhidros; se puede tratar de un mono-, de un di- o de un tri-éster o incluso de una mezcla; son tensioactivos hidrófobos cuyo balance hidrófilo-lipófilo global (HLB) es inferior a 9 y preferentemente inferior a 6. Principalmente se les puede encontrar en la gama de tensioactivos comercializados por la sociedad ICI America's Inc. con la denominación de SPAN®, o por la sociedad COGNIS con la denominación de Dehymuls™, o por la sociedad ICI con la denominación de ARLACEL™; como ejemplos de tensioactivos que convienen particularmente bien se puede citar el monooleato de sorbitano comercializado con la denominación de Dehymuls SMO™ o de SPAN®80. Entre los tensioactivos constituidos por ésteres de manida, se puede citar el monooleato comercializado por la sociedad SIGMA, o por la sociedad SEPPIC con la denominación de Montanide 80™.

Gracias a la selección de tensioactivos particulares entre todos los tensioactivos propuestos en la técnica anterior para preparar emulsiones, se ha encontrado ahora que se podía producir muy ventajosamente una emulsión adyuvante de aceite en agua usando un procedimiento de inversión de fase.

Para ello, las cantidades de escualeno y de cada uno de los tensioactivos usados se eligen ventajosamente de forma que se obtenga una mezcla cuyo diagrama de fases comprende una fase de curvatura media nula (tipo microemulsión o fase laminar) para la que las tensiones interfaciales son extremadamente bajas.

En el caso de utilización de escualeno, se ha observado que las emulsiones obtenidas son estables, monodispersas y con un tamaño muy pequeño de las gotas de aceite (d_{90} inferior a 200 nm), cuando el valor global del HLB de los diferentes tensioactivos utilizados se sitúa entre 8,5 y 10, y más particularmente entre 8,6 y 9,6. Para determinar las concentraciones respectivas de tensioactivos hidrófilo e hidrófobo en la composición de la emulsión se puede utilizar la fórmula siguiente:

$$\text{HLB}_m = (\text{HLB}_e \times M) + \text{HLB}_{\text{pae}} (1-M)$$

en la que,

HLB_m corresponde al HLB de la mezcla que está preferentemente entre 8,5 y 10, y más particularmente entre 8,6 y 9,6

HLB_e corresponde al HLB del tensioactivo hidrófobo

M corresponde al tanto por ciento en masa de tensioactivo hidrófobo en la mezcla constituida por el tensioactivo hidrófobo y el polioxietileno alquil éter (PAE)

HLB_{pae} corresponde al HLB del PAE.

Se ha observado que usando una concentración de escualeno comprendida entre 5 y 45%, se obtenía de forma muy ventajosa una emulsión cuya temperatura de inversión de fase es inferior a 95°C.

Para dicha emulsión, es posible utilizar un polioxietileno alquil éter con una concentración comprendida entre 0,9 y 9% y un tensioactivo no iónico hidrófobo con una concentración comprendida entre 0,7 y 7%; estando constituido el resto de la emulsión por un disolvente acuoso.

Según un modo particular de realización de la invención, la composición inmunógena comprende además un alditol tal como principalmente el glicerol, el eritritol, el xilitol, el sorbitol o el manitol. Se han obtenido buenos resultados principalmente con el manitol comercializado por la sociedad ROQUETTE Frères. Las cantidades de alditol usadas en el procedimiento de preparación pueden variar entre 1 y 10% y más particularmente entre 2 y 7.

Según un modo particular de realización de la invención, la emulsión adyuvante comprende además un crioprotector que permite la liofilización de la emulsión obtenida; entre los crioprotectores se prefieren particularmente los azúcares y principalmente la sacarosa.

Además, la emulsión según la invención puede comprender un alquilpoliglicósido que es un tensioactivo con cabeza azucarada; principalmente se puede tratar del decil-D galactósidoouronato de sodio o según un modo preferido el dodecil-β-maltósido disponible en la sociedad ROCHE.

Gracias al procedimiento de preparación de la emulsión mediante una inversión de fase obtenida haciendo variar la temperatura, se obtiene muy fácilmente de forma muy reproducible una emulsión de aceite en agua cuyo tamaño de las gotas de aceite es muy homogéneo; el valor de d_{90} (en volumen) es inferior a 200 nm, preferentemente inferior a

150 nm, e incluso próximo a 100 nm, entonces el valor de d50 es inferior a 100 nm o incluso 90 nm. La mayoría de las emulsiones preparadas según el procedimiento de la invención han permitido alcanzar valores de d50 de alrededor de 80 nm con valores de d90 alrededor de 100 nm (medidas realizadas mediante un dispositivo Coulter LS230). Por lo tanto, se puede realizar una filtración esterilizante de la emulsión obtenida, con la condición de que sea suficientemente diluida.

Dichas emulsiones cuyo tamaño de las gotas es homogéneo y muy pequeño son estables en el tiempo. Así, se ha podido observar que una emulsión preparada según la invención y almacenada a 4°C, conservaba después de 2 años un perfil monodisperso con un valor de d50 de 90 nm y un valor de d90 de 116 nm, lo que prueba la gran estabilidad de la emulsión.

La medida del tamaño de las gotas se puede hacer por diferentes medios y, principalmente, mediante granulómetros de difracción láser, tales como los dispositivos Beckman Coulter de la gama LS (principalmente el LS230), o los dispositivos Malvern de la gama Mastersizer (principalmente el Mastersizer 2000). El principio de medida de estos aparatos se basa en el análisis de la intensidad de la luz difundida por las partículas en función del ángulo (detectores a ángulos grandes, medios y pequeños) cuando la muestra es iluminada con un haz láser. Este análisis se realiza por medio de modelos matemáticos elegidos según el tamaño y la naturaleza del material utilizado. En el caso de la medida del tamaño de las partículas submicrométricas, es preciso aplicar un modelo óptico particular (teoría de Mie) que tiene en cuenta los índices de refracción de la muestra (en este caso, 1,495 para el escualeno) y de su medio (en este caso, 1,332 para el agua); igualmente es preciso ser capaz de detectar las pequeñas intensidades emitidas por las partículas muy finas, lo que hace necesario una optimización del análisis:

- una célula suplementaria de detección para la medida a ángulos grandes de la difusión diferencial de las intensidades polarizadas (sistema PIDS de Coulter que permite una medida desde 40 nm);

- sistema de detección que combina 2 longitudes de onda, luz azul y roja, de Malvern. La fuente de luz azul de menor longitud de onda asociada a los detectores de difusión para los ángulos grandes y en retrodifusión refuerza las características del análisis en la gama submicrométrica.

Según los aparatos usados, las medidas pueden variar ligeramente en función de los componentes del aparato y los programas de tratamiento de datos usados. Así, una misma emulsión según la invención ha sido analizada con los 2 aparatos y ha dado los resultados siguientes:

- con el LS230, con los parámetros siguientes: IR de la partícula = 1,495 ; IR del medio = 1,332 ; valor de la absorción = 0; d50 = 80-90 nm y d90 = 120-130 nm;

- con el Mastersizer 2000, con los parámetros siguientes: IR de la partícula = 1,495 ; IR del medio = 1,332 ; valor de la absorción = 0; oscurecimiento = 4-7%; modelo óptico "general purpose"; d50 = 90-100 nm y d90 = 140-150 nm.

El procedimiento se puede llevar a cabo de la siguiente manera : se prepara una emulsión bruta de aceite en agua concentrada por incorporación de la fase acuosa (disolución tamponada, eventualmente con adición de alditol, que comprende el polioxietileno alquil éter) en la fase oleosa (escualeno y tensioactivo no iónico hidrófobo). O a la inversa, por incorporación de la fase oleosa en la fase acuosa. Se obtiene entonces una emulsión de aceite en agua no calibrada que muestra rápidamente su inestabilidad. Esta emulsión se agita y se calienta hasta la obtención de una inversión de fase, es decir la obtención de una emulsión de agua en aceite. La transición o la inversión de fase se puede seguir por conductimetría. En efecto, durante la subida de temperatura la conductividad aumenta hasta la inversión de fase; en este momento, se observa una caída relativamente brutal de la conductividad. La temperatura a la que se produce el cambio de la curvatura de la curva de seguimiento de la conductividad indica el paso de un tipo de emulsión a otro: es la temperatura de inversión de fase. En realidad, esta temperatura es más bien un intervalo de temperaturas que un valor puntual muy preciso; en efecto, se puede considerar que esta temperatura es una temperatura determinada con una aproximación de 1 ó 2 grados con el fin de que el conjunto de la emulsión experimente el fenómeno de inversión de fase. Una vez que se ha alcanzado esta temperatura de inversión y, por lo tanto, se está en presencia de una emulsión de agua en aceite, se detiene el calentamiento de la mezcla. El enfriamiento se puede realizar de forma pasiva dejando simplemente que la emulsión vuelva espontáneamente a la temperatura ambiente, o de forma más activa, realizando por ejemplo un templado de la emulsión en un baño de hielo. Durante el paso por la temperatura de inversión de fase, la emulsión de agua en aceite va de nuevo a invertirse para volver a dar una emulsión de aceite en agua cuyo tamaño de las gotas de aceite es en este caso muy homogéneo y pequeño; la emulsión obtenida es entonces muy estable. Se puede almacenar en este estado a la espera de ser diluida con una disolución que comprende el antígeno de vacuna contra la gripe.

Esta emulsión es termorreversible, lo que significa que si se lleva de nuevo a una temperatura superior a la temperatura de inversión de fase volverá a ser una emulsión de agua en aceite. Se observa que las curvas de seguimiento de la conductividad son superponibles para una misma emulsión cualquiera que sea el número de inversiones térmicas experimentadas y que las emulsiones obtenidas tienen siempre el mismo perfil granulométrico.

- De forma ventajosa, la formulación de la emulsión se elige para tener una temperatura de inversión de fase que sea inferior a 95°C y más particularmente comprendida 45 y 80°C y más particularmente todavía entre 50 y 65°C. Este intervalo de temperaturas es ventajoso puesto que la emulsión no corre el peligro de cambiar de estado si se almacena a una temperatura relativamente elevada ($\approx 37^\circ\text{C}$). Además, como en el procedimiento de preparación de la emulsión termorreversible el calentamiento de los componentes no es demasiado grande, esto contribuye al mantenimiento de la integridad estructural de los componentes. Cuando la temperatura de inversión de fase de la emulsión es elevada, principalmente cuando es superior o próxima a 80°C, se la puede disminuir de forma útil añadiendo a la composición de la emulsión un alditol que se elige habitualmente entre el sorbitol, el manitol, el glicerol, el xilitol o el eritritol. Cuando se usa el alditol en un intervalo de concentración que va de 1 a 10% (p/p) y en particular en un intervalo de concentración que va de 2 a 7% (p/p) se llega a disminuir la temperatura de inversión de fase aproximadamente en 10°C. Igualmente se puede disminuir la temperatura de inversión de fase de la emulsión reemplazando la fase acuosa constituida únicamente por agua por una fase acuosa salina tamponada. Habitualmente se usa un tampón TRIS o un tampón de fosfato como el PBS o el tampón Dulbecco PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} .
- Existen alternativas al procedimiento que acaba de describirse. En efecto, es posible, como acaba de describirse, mezclar las 2 fases acuosa y oleosa con el fin de obtener una emulsión bruta que se calentará entonces y a continuación se enfriará. Alternativamente, las 2 fases preparadas se pueden calentar separadamente a una temperatura ligeramente superior a la temperatura de inversión de fase antes de mezclarlas para dar una emulsión inversa de agua en aceite que se enfriará hasta la obtención de la emulsión submicrométrica de aceite en agua.
- Igualmente se puede calentar ligeramente cada una de las fases antes de hacer la mezcla que conducirá a una emulsión de aceite en agua y a continuación calentar esta emulsión hasta la inversión de fase antes de proceder al enfriamiento.

Todas estas operaciones se pueden realizar en contenedores separados para una preparación en lotes, pero también es posible utilizar un procedimiento en línea.

- El procedimiento de preparación de la emulsión en línea puede consistir principalmente en una mezcla de las dos fases acuosa y oleosa, preparadas previamente de forma separada, mediante un mezclador estático termostatzado, seguido por un enfriamiento en línea a través de un intercambiador de calor refrigerado conectado a la salida del mezclador estático y a continuación la recuperación final de la emulsión según la invención en un recipiente adecuado (frasco o reactor). Se ha utilizado con éxito un mezclador estático constituido por una sucesión de elementos de mezcla compuestos por láminas cruzadas e inclinadas con respecto al eje del tubo en el que están introducidos. La energía necesaria para la mezcla es suministrada por las bombas que transportan los fluidos y la mezcla se realiza sin ninguna pieza móvil a través de los elementos de mezcla por la separación, el desplazamiento y la reunión sucesivas de los constituyentes de la mezcla.

- El procedimiento de preparación en línea se realiza de la siguiente manera: se preparan de forma separada la fase acuosa (disolución tamponada que comprende el polioxietileno alquil éter) y la fase oleosa (escualeno y tensioactivo no iónico hidrófobo) en dos frascos o reactores. Se calientan las dos fases con agitación a una temperatura ligeramente superior a la temperatura de inversión de fase. Entonces se introducen las dos fases en un mezclador estático termostatzado por medio de 2 bombas cuyos caudales se regulan de forma que se obtenga la composición de la emulsión según la invención. La emulsión inversa de agua en aceite se obtiene durante el paso de las dos fases en el mezclador estático. La emulsión inversa se enfría a continuación por paso en línea a través de un intercambiador de calor refrigerado conectado a la salida del mezclador estático. La emulsión de agua en aceite se invierte entonces a través del intercambiador de calor refrigerado para dar lugar a una emulsión de aceite en agua que será introducida en un frasco o un reactor y cuyas características son idénticas a las de la emulsión obtenida por un procedimiento en lotes.

- La emulsión adyuvante según la invención se utiliza a continuación para la preparación de una composición inmunógena. Un modo de realización sencillo consiste en mezclar una disolución que comprende al menos un antígeno gripal con una emulsión obtenida según uno de los modos de realización que acaban de describirse. La composición inmunógena obtenida está en forma de una emulsión de aceite en agua o en forma de una emulsión de aceite en agua termorreversible cuando la cantidad de escualeno representa en masa al menos 5% de la masa total de la composición inmunógena. Alternativamente es posible mezclar el antígeno con la fase acuosa o con la fase oleosa antes de preparar la emulsión. Por supuesto, dicha manera de proceder implica que se trata de antígenos que son compatibles con el procedimiento de termoinversión.

- Las disoluciones del antígeno pueden además contener sales minerales y uno o varios tampones, así como cualquier otro componente utilizado habitualmente en las vacunas, tales como estabilizantes, conservantes u opcionalmente también otros adyuvantes.

Para la preparación de una emulsión liofilizable se prepara en primer lugar una emulsión líquida concentrada, tal como acaba de describirse, pero eligiendo preferentemente como fase acuosa agua en lugar de una disolución tamponada, a continuación se diluye esta emulsión con una disolución que comprende un alditol, un azúcar y un alquilpoliglicósido, por ejemplo con una disolución que comprende manitol, sacarosa y dodecilmaltósido.

La emulsión obtenida se reparte entonces en muestras (por ejemplo 0,5 ml) y se somete a un ciclo de liofilización que se puede realizar de la forma siguiente:

- carga de las muestras a +4°C,
- aproximadamente 2 horas de congelación a una temperatura de -45°C,
- 5 • 14 a 19 horas de secado primario a una temperatura de 0°C,
- 3 horas 30 minutos de secado secundario a una temperatura de +25°C.

La emulsión obtenida se puede conservar entonces a la espera de ser utilizada para la preparación de una composición inmunógena, es decir de asociarse a una composición que comprende antígenos de vacuna. Esta etapa de la preparación de la composición inmunógena se puede hacer recogiendo la emulsión liofilizada por medio de una disolución acuosa que comprende los antígenos. La composición inmunógena así obtenida puede a continuación conservarse en estado líquido o ser sometida de nuevo a un ciclo de liofilización con el fin de conservarla en forma de liofilizado si la naturaleza de los antígenos lo permite.

De forma alternativa es posible diluir directamente la emulsión concentrada con una disolución acuosa que comprende a la vez los antígenos de vacuna así como el alditol, el azúcar y el alquilpoliglicósido y a continuación someter la composición obtenida a liofilización. Por supuesto, dicha manera de proceder implica que se trata de antígenos que son compatibles con un procedimiento de liofilización.

Los ejemplos siguientes ilustran diferentes modos de realización de la invención.

Ejemplo 1: Preparación de una emulsión adyuvante según la invención

Se han mezclado en un vaso de precipitados 3,71 g de Eumulgin™ B1 y 33,9 g de una disolución de manitol al 10% en disolución tampón de PBS, que se ha homogeneizado con agitación a aproximadamente 30°C.

En otro recipiente se han mezclado 2,89 g de Dehymuls™ SMO y 19,5 g de escualeno que se ha agitado magnéticamente.

Cuando se han obtenido fases homogéneas en cada uno de los recipientes, se ha incorporado la fase acuosa en la fase oleosa que era mantenida con agitación a 30°C.

Cuando ha terminado la incorporación, se ha calentado la emulsión bruta obtenida hasta que la temperatura ha alcanzado 58-60 °C, manteniendo la agitación.

A continuación se ha detenido el calentamiento pero se ha mantenido la agitación hasta que la temperatura ha alcanzado la temperatura ambiente.

Entonces se ha obtenido una emulsión de aceite en agua cuyo tamaño de las gotas de aceite estaba centrado alrededor de 80 nm (medida realizada por medio de un LS230) y cuya composición en masa era la siguiente:

- 32,5% de escualeno,
- 6,18% de polioxietileno (12) cetostearyléter,
- 4,82% de monooleato de sorbitano,
- 6% de manitol.

Ejemplo 2: Composición de vacuna contra la gripe.

Se disponía de antígenos de virus gripal obtenidos según el procedimiento descrito en los ejemplos de la solicitud WO9605294, excepto por el hecho de que la cepa vírica usada era la cepa A/New Caledonia H1N1. A partir de esta preparación de antígenos, de la emulsión concentrada según la invención obtenida en el ejemplo 1 y de una suspensión de aluminio suministrada por REHEIS con la denominación AIOOH Rehydra, se han preparado dosis de inmunización de 50 µl que tenían la composición indicada a continuación, donde las cantidades de antígenos de la gripe se expresan en peso de hemaglutinina, HA:

- bien 1 µg de HA en disolución tampón de PBS,
- bien 5 µg de HA en disolución tampón de PBS,
- bien 1 µg de HA y 60 µg de hidróxido de aluminio,

ES 2 390 104 T3

- o bien 1 µg de HA, 1,25 mg de escualeno, 0,185 mg de Dehymuls™ SMO, 0,235 mg de Eumulgin™ B1; 0,21 mg de manitol; todo ello en disolución tampón de PBS.

Se disponía de 8 grupos de 5 ratones BALB/c hembras, de 8 semanas de edad, a las que se les ha administrado el D0 las composiciones preparadas según el reparto siguiente:

- 5
- un grupo ha recibido la composición que tiene 1 µg de HA por vía subcutánea,
 - un grupo ha recibido la misma composición que tiene 1 µg de HA por vía intradérmica,
 - un grupo ha recibido la composición que tiene 5 µg de HA por vía subcutánea,
 - un grupo ha recibido la misma composición que tiene 5 µg de HA por vía intradérmica,
 - un grupo ha recibido la composición que tiene 1 µg de HA y 60 µg de aluminio por vía subcutánea,
- 10
- un grupo ha recibido la misma composición que tiene 1 µg de HA y 60 µg de aluminio por vía intradérmica,
 - un grupo ha recibido la composición que tiene 1 µg de HA y la emulsión según la invención por vía subcutánea,
 - un grupo ha recibido la composición que tiene 1 µg de HA y la emulsión según la invención por vía intradérmica.
- 15
- Se han extraído de cada uno de los ratones muestras sanguíneas el D14, D28, D41, D56 y D105. Los sueros de los ratones inmunizados se han analizado por una parte por la técnica ELISA con el fin de evaluar su contenido en anticuerpos totales inducidos contra la cepa de gripe A/H1N1 de la vacuna trivalente (los valores de los anticuerpos se expresan en unidades arbitrarias de ELISA en valores log₁₀, con un umbral de detección de 1,3 log₁₀) y por otra parte por la técnica IHA (inhibición de la hemaglutinación) para determinar su contenido en anticuerpos funcionales
- 20
- contra la cepa de la gripe A/H1N1. Los valores de los anticuerpos se expresan como la inversa de dilución en valor aritmético, con un umbral de detección de 5.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla siguiente, en la que los valores indicados representan la media de los valores de los ratones de cada grupo.

Valores de ELISA:

Grupo de ratones	Vía de inmunización	D14	D28	D41	D56	D105
1 µg de HA	subcutánea	2,838	3,288	3,556	3,581	3,535
5 µg de HA	subcutánea	3,203	3,642	3,836	3,732	3,844
1 µg de HA + AIOOH	subcutánea	2,860	3,363	3,843	3,951	3,982
1 µg de HA + emulsión	subcutánea	4,043	4,511	4,753	4,723	4,681
1 µg de HA	intradérmica	2,174	2,814	3,143	3,075	2,735
5 µg de HA	intradérmica	2,839	3,297	3,496	3,549	3,479
1 µg de HA + AIOOH	intradérmica	2,654	3,004	3,137	3,020	2,724
1 µg de HA + emulsión	intradérmica	4,134	4,692	4,895	4,911	4,823

Valores de IHA:

Grupo de ratones	Vía de inmunización	D14	D28	D41	D56	D105
1 µg de HA	subcutánea	5	6	5	40	23
5 µg de HA	subcutánea		5	9	20	
1 µg de HA + AIOOH	subcutánea	5	15	23	121	160
1 µg de HA + emulsión	subcutánea	6	160	368	422	485
1 µg de HA	intradérmica	5	5	5	23	8
5 µg de HA	intradérmica		5	8	10	
HA 1µg +AIOOH	intradérmica	5	5	5	26	7
1 µg de HA + emulsión	intradérmica	7	557	1640	1557	1844

5 Estos resultados muestran el interés de la presente invención; en efecto, el hidróxido de aluminio que es un adyuvante muy conocido y muy empleado en la técnica anterior no ha permitido aumentar la inmunogenicidad de los antígenos de la gripe con la misma rapidez y la misma fuerza que la formulación según la invención; también se constata que la composición según la invención ha sido particularmente eficaz tanto por vía subcutánea como por vía intradérmica.

Ejemplo 3: Composición de vacuna contra la gripe.

10 Se ha querido evaluar en ratones el interés de la presente invención para disminuir la cantidad de antígeno de vacuna cuando se trata de una vacuna contra la gripe que contiene como antígenos 3 cepas de virus gripal y que sería administrada por vía intradérmica.

Con este fin, se ha diluido la emulsión concentrada del ejemplo 1 con disolución tampón de PBS con el fin de obtener una emulsión al 5% de escualeno que se ha diluido todavía a la mitad con una composición que comprende los antígenos.

15 Se disponía en efecto de una composición que comprendía virus antigripal que provenía de 3 cepas víricas diferentes obtenidas de la forma descrita en la solicitud de patente WO9605294, las 3 cepas eran en este caso la cepa A/New Caledonia (H1N1), la cepa A/Wyoming (H3N2) y la cepa B/Jiangsu. Dicha composición de vacuna trivalente es una composición clásica para una vacuna contra la gripe y corresponde a una vacuna comercializada en el hemisferio Norte durante la campaña de la gripe en 2004. Las cantidades de antígenos de cada una de las
20 cepas víricas se ha evaluado por su cantidad de hemaglutininas HA.

Las dosis de inmunización preparadas, con un volumen de 50 µl, tenían las composiciones indicadas a continuación:

- 0,33 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
- 1,31 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
- 5,25 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
- 25 • 10,5 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
- 21 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
- 0,33 µg de HA de cada una de las cepas víricas; 1,25 mg de escualeno, 0,185 mg de Dehymuls™ SMO, 0,235 mg de Eumulgin™ B1 y 0,230 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
- 30 • 1,31 µg de HA de cada una de las cepas víricas; 1,25 mg de escualeno, 0,185 mg de Dehymuls™ SMO, 0,235 mg de Eumulgin™ B1 y 0,230 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4;

- 5,25 µg de HA de cada una de las cepas víricas; 1,25 mg de escualeno, 0,185 mg de Dehymuls™ SMO, 0,235 mg de Eumulgin™ B1 y 0,230 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4.

5 Se disponía de 8 grupos de 10 ratones BALB/c, hembras, de 6 a 8 semanas de edad, a los que se les ha administrado por vía intradérmica (cara interna de la oreja) una de las composiciones preparadas, a razón de una composición por grupo.

3 semanas después de la inmunización, se han extraído muestras sanguíneas y se han dosificado por ELISA para cada uno de los grupos, los IgG inducidos contra cada una de las cepas víricas; además, se ha realizado para cada uno de los grupos un ensayo de inhibición de la hemaglutinina contra cada cepa vírica.

10 Los resultados obtenidos se representan en la tabla siguiente en forma de medias para cada uno de los grupos; los resultados de ELISA se expresan en log₁₀ de unidades arbitrarias y los resultados del IHA son los valores medios aritméticos de los inversos de la dilución.

Naturaleza de la composición	H1N1		H3N2		B	
	ELISA	IHA	ELISA	IHA	ELISA	IHA
0,33 µg de HA	3,51	35	4,38	243	4,28	25
1,31 µg de HA	3,96	65	4,74	640	4,35	32
5,25 µg de HA	4,16	92	5,05	970	4,62	53
10,5 µg de HA	4,38	197	5,18	1810	4,71	130
21µg HA	4,63	260	5,37	2389	4,98	184
0,33 µg de HA + emulsión	4,27	226	5,20	2389	4,91	149
1,31 µg de HA + emulsión	4,46	279	5,37	3880	4,95	171
5,25 µg de HA + emulsión	4,68	394	5,58	5487	5,12	22

15 Estos resultados ponen en evidencia el interés particular de la invención para reducir la cantidad de antígenos; en efecto, gracias a la emulsión según la invención se ha podido, para una misma respuesta inmunitaria inducida, disminuir de forma muy importante la cantidad de antígenos presente en la dosis de inmunización.

Ejemplo 4 : Composición de vacuna trivalente contra la gripe en una población no que nunca ha sido infectada previamente

20 Se ha querido evaluar la eficacia de la emulsión de la invención en el caso de una vacuna contra la gripe que se administraría a personas cuyo organismo haya estado ya en contacto con antígenos del virus de la gripe, como es frecuentemente el caso, bien porque las personas han estado ya en contacto con el virus de la gripe o bien porque han estado vacunados anteriormente con una vacuna antigripal.

Según las informaciones publicadas por C.W. Potter en Vaccine, 2003, 21 :940-5, es posible utilizar como modelo animal para realizar este ensayo, ratones BALB/c previamente inmunizados por vía intramuscular por una vacuna trivalente.

25 Por lo tanto, se han preparado dosis de inmunización de 50 µl que comprenden bien únicamente disolución tampón de PBS o bien vacuna trivalente de la campaña 2004, es decir una vacuna que comprende la cepa A/New Caledonia (H1N1), la cepa A/Wyoming (H3N2) y la cepa B/Jiangsu, a razón de 5 µg de HA de cada una de las cepas en disolución tampón de PBS a pH 7,4.

30 Se disponía de 6 grupos de 7 ratones BALB/c; se han inmunizado 3 grupos con las dosis que comprendían únicamente disolución tampón y otros 3 con la vacuna trivalente, por vía intramuscular.

Además se han preparado, a partir de la emulsión concentrada del ejemplo 1 y de una composición de vacuna que comprendía las 3 cepas víricas de la campaña 2004 mencionadas anteriormente, dosis de inmunización de 30 µl que tenían las composiciones siguientes:

- disolución tampón de PBS sola,
- 0,3 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
- 0,3 µg de HA de cada una de las cepas víricas; 0,75 mg de escualeno; 0,11 mg de Dehymuls™ SMO; 0,143 mg de Eumulgin™ B1 y 0,138 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4.

5 Cada una de las composiciones preparadas de este modo ha sido usada para inmunizar el D34 por vía intradérmica (en la cara interna de la oreja) a la vez a un grupo de ratones que habían recibido anteriormente únicamente disolución tampón de PBS y un grupo de ratones que habían recibido una dosis de vacuna trivalente.

10 El D56 se ha extraído una muestra sanguínea de cada uno de los ratones y se ha realizado una dosificación de los anticuerpos producidos contra la cepa H1N1 (A/New Caledonia) mediante un ensayo de inhibición de la hemaglutinina.

Los resultados obtenidos se han resumido en la tabla siguiente y representan los valores medios obtenidos para cada grupo de ratones que han sufrido el mismo protocolo de inmunización.

Identificación del grupo de ratones	Naturaleza de la dosis para el cebado im	Naturaleza de la dosis para el estímulo id	Valor por IHA frente a la cepa H1N1
A	PBS	PBS	5
B	PBS	Vacuna trivalente a 0,3 µg de HA/cepa	59
C	PBS	Vacuna trivalente a 0,3 µg de HA/cepa + emulsión	320
D	Vacuna trivalente a 5 µg de HA/cepa	PBS	145
E	Vacuna trivalente a 5 µg de HA/cepa	Vacuna trivalente a 0,3 µg de HA/cepa	476
F	Vacuna trivalente a 5 µg de HA/cepa	Vacuna trivalente a 0,3 µg de HA/cepa + emulsión	861

15 Estos resultados muestran todo el interés de la invención incluso en individuos que no habían sido previamente infectados frente al antígeno administrado. En efecto, contrariamente a las observaciones de C.W. Potter, durante la utilización de este modelo que no había podido mostrar más que un pequeño efecto adyuvante de los Iscoms cuando se usaban para inmunizar ratones infectados previamente o vacunados previamente con antígenos de la gripe, ahora se observa que la emulsión según la invención ha permitido aumentar de forma significativa la respuesta inducida ya sea con ratones que no habían sido infectados previamente o con ratones que han sido ya
20 inmunizados con una vacuna de la gripe.

Ejemplo 5: Composición de vacuna trivalente contra la gripe que comprende dosis pequeñas de antígenos.

Se han preparado a partir de la emulsión concentrada del ejemplo 1 y de una composición de vacuna que comprende las 3 cepas víricas de la campaña de 2004 (la cepa A/New Caledonia (H1N1), la cepa A/Wyoming (H3N2) y la cepa B/Jiangsu) dosis de inmunización de 30 µl que tienen las siguientes composiciones:

- 25
- 0,1 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
 - 0,4 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
 - 1,6 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
 - 6,3 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,

ES 2 390 104 T3

- 0,1 µg de HA; 0,75 mg de escualeno; 0,11 mg de Dehymuls™ SMO; 0,143 mg de Eumulgin™ B1 y 0,138 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4;

- 0,4 µg de HA; 0,75 mg de escualeno; 0,11 mg de Dehymuls™ SMO; 0,143 mg de Eumulgin™ B1 y 0,138 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4.

5 Se disponía de 6 grupos de 8 ratones BALB/c, hembras, de 8 semanas de edad, a los que se les ha administrado el D0 por vía intradérmica (cara interna de la oreja) una dosis de 30 µl de una de las composiciones indicadas anteriormente (1 composición por grupo).

En cada grupo se ha administrado de nuevo por vía intradérmica a la mitad de los ratones el D29 una segunda dosis que tenía la misma naturaleza que la 1ª dosis administrada.

10 Se han extraído muestras sanguíneas el D22 y el D43 con el fin de determinar las cantidades de anticuerpos inducidos.

Las dosis de anticuerpos han sido realizadas por ELISA para los anticuerpos inducidos el D22 y el D43, frente al conjunto de las cepas administradas: H1N1, H3N2 y B, y por IHA frente a la cepa H1N1 únicamente a la vez el D22 y el D43. Los resultados obtenidos han sido resumidos en la tabla siguiente en la que los valores expresados son las medias obtenidas para cada grupo de ratones. En lo que se refiere a los resultados el D43, las medias han sido realizadas separadamente en el interior de un mismo grupo para los ratones que han recibido 2 dosis de vacunas y los que habían recibido solo una.

Composición de vacuna	Valor por ELISA H1N1 el D22	Valor por ELISA H3N2 el D22	Valor por ELISA B el D22	Valor por IHA H1N1 el D22	Valor por IHA H1N1 el D43	
					Ratones estimulados	Ratones no estimulados
0,1 µg de HA	3,467	4,131	4,063	57	95	80
0,4 µg de HA	3,816	4,527	4,313	73	226	80
1,6 µg de HA	4,069	4,831	4,750	147	1280	135
6,3 µg de HA	4,534	5,298	4,947	320	1522	320
0,1 µg de HA + emulsión	4,200	5,015	4,807	207	2153	538
0,4 µg de HA + emulsión	4,612	5,482	5,001	453	2560	640

Composición de vacuna	Valor por ELISA H1N1 el D43		Valor por ELISA H2N2 el D43		Valor por ELISA B el D43	
	Ratones estimulados	Ratones no estimulados	Ratones estimulados	Ratones no estimulados	Ratones estimulados	Ratones no estimulados
0,1 µg de HA	3,833	3,425	4,782	4,174	4,479	3,911
0,4 µg de HA	4,385	3,599	5,250	4,354	5,053	4,079
1,6 µg de HA	4,906	3,876	5,526	4,779	5,458	4,487
6,3 µg de HA	5,287	4,176	6,073	5,033	5,678	4,773
0,1 µg de HA + emulsión	5,210	4,523	5,990	5,264	5,723	4,943

Composición de vacuna	Valor por ELISA H1N1 el D43		Valor por ELISA H2N2 el D43		Valor por ELISA B el D43	
	Ratones estimulados	Ratones no estimulados	Ratones estimulados	Ratones no estimulados	Ratones estimulados	Ratones no estimulados
0,4 µg de HA + emulsión	5,394	4,790	6,171	5,640	5,962	5,144

5 Estos resultados demuestran que gracias a la emulsión según la invención, incluso con dosis pequeñas de antígenos, se han obtenido respuestas humorales muy importantes. Así, se puede señalar que los mejores resultados son los obtenidos con una dosis de 0,4 µg de HA de cada una de las cepas víricas y una emulsión según la invención; estos resultados son de forma muy sorprendente mucho mejores que los obtenidos usando una dosis de 6,3 µg de HA solo. Además, se observa que incluso en individuos que no han recibido una dosis de recuerdo, el sistema inmunitario continúa induciendo anticuerpos mientras que esto no es el caso en los individuos que han recibido los antígenos de vacuna no adyuvados.

Ejemplo 6: Composición de vacuna contra la gripe trivalente

10 Se han preparado a partir de la emulsión concentrada del ejemplo 1 y de una composición de vacuna que comprende las 3 cepas víricas de la campaña de 2004 (la cepa A/New Caledonia (H1N1), la cepa A/Wyoming (H3N2) y la cepa B/Jiangsu) dosis de inmunización de 30 µl que tienen las siguientes composiciones:

- 0,1 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
- 0,4 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
- 15 • 1,6 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
- 6,3 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
- 0,1 µg de HA; 0,75 mg de escualeno; 0,11 mg de Dehymuls™ SMO; 0,143 mg de Eumulgin™ B1 y 0,138 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4.
- 20 • 0,4 µg de HA; 0,75 mg de escualeno; 0,11 mg de Dehymuls™ SMO; 0,143 mg de Eumulgin™ B1 y 0,138 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4.

Se disponía de 6 grupos de 8 ratones C5B7B/6J, hembras, de 8 semanas de edad, a los que se les ha administrado el D0 por vía intradérmica (cara interna de la oreja) una dosis de 30 µl de una de las composiciones indicadas anteriormente (1 composición por grupo).

Se han extraído muestras sanguíneas el D23 con el fin de determinar las cantidades de anticuerpos inducidos.

25 Las dosis de anticuerpos han sido realizadas por ELISA y por IHA para los anticuerpos inducidos frente al conjunto de las cepas administradas: H1N1, H3N2 y B.

Los resultados obtenidos han sido resumidos en la tabla siguiente en la que los valores expresados son las medias obtenidas para cada grupo de ratones.

Composiciones	ELISA H1N1	ELISA H3N2	ELISA B	IHA H1N1	IHA H3N2	IHA B
0,1 µg de HA	2,924	3,506	3,920	26	174	95
0,4 µg de HA	3,673	4,227	4,431	135	269	147
1,6 µg de HA	3,948	4,593	4,786	160	381	190
6,3 µg de HA	4,446	5,106	5,190	587	1174	453
0,1 µg de HA + emulsión	4,456	5,192	5,064	349	1974	320

Composiciones	ELISA H1N1	ELISA H3N2	ELISA B	IHA H1N1	IHA H3N2	IHA B
0,4 µg de HA + emulsión	4,659	5,337	5,174	761	2348	494

De nuevo los resultados obtenidos demuestran todo el interés de la emulsión según la invención gracias a la que es posible reducir de forma muy importante las cantidades de antígenos presentes: en efecto, se puede considerar globalmente que únicamente con 0,1 µg de HA ayudado por la emulsión según la invención se obtienen tan buenos resultados como con una cantidad de 6,3 µg de HA.

Ejemplo 7: Composición de vacuna trivalente contra la gripe que comprende una emulsión según la invención o según la técnica anterior.

Se han preparado a partir de la emulsión concentrada del ejemplo 1 y de una composición de vacuna que comprende las 3 cepas víricas de la campaña de 2004 (la cepa A/New Caledonia (H1N1), la cepa A/Wyoming (H3N2) y la cepa B/Jiangsu) dosis de inmunización de 30 µl que tienen las siguientes composiciones:

- 0,3 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
- 6,3 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
- 0,3 µg de HA; 0,21 mg de escualeno, 0,031 mg de Dehymuls™ SMO; 0,040 mg de Eumulgin™ B1 y 0,039 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4 (emulsión al 0,7%),
- 0,3 µg de HA; 0,75 mg de escualeno; 0,11 mg de Dehymuls™ SMO; 0,143 mg de Eumulgin™ B1 y 0,138 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4 (emulsión al 2,5%).
- 0,3 µg de HA; 0,645 mg de escualeno; 0,075 mg de Tween™ 80; 0,075mg de Span™ 85 (emulsión según la técnica anterior obtenida por microfluidización).

Se disponía de 5 grupos de 8 ratones BALB/c, hembras, de 8 semanas de edad, a los que se les ha administrado el D0 por vía intradérmica (cara interna de la oreja) una dosis de 30 µl de una de las composiciones indicadas anteriormente (1 composición por grupo).

Para evaluar la cantidad de anticuerpos inducidos, se han realizado extracciones sanguíneas el D21 en las que se ha determinado por IHA (inhibición de la hemaglutinación) la actividad contra la cepa A/H1N1, la cepa A/H3N2 y la cepa B.

Los resultados obtenidos para cada grupo de ratones se representan en la tabla siguiente.

Composición ensayada	IHA frente a H1N1	IHA frente a H3N2	IHA frente a B
0,3 µg de HA	26	174	8
6,3 µg de HA	247	905	73
0,3 µg HA + emulsión de la invención al 0,7%	95	640	37
0,3 µg HA + emulsión de la invención al 2,5%	269	1974	73
0,3 µg HA + emulsión según la técnica anterior	135	987	57

Estos resultados demuestran que con una emulsión obtenida según la invención mediante un procedimiento de preparación muy sencillo de inversión de fase por medio de un cambio de temperatura, se ha obtenido un adyuvante que es tanto bueno e incluso ligeramente mejor que la emulsión de la técnica anterior obtenida usando tasas de cizallamiento muy grandes.

Ejemplo 8: Composición de vacuna trivalente contra la gripe que comprende una emulsión según la invención a diferentes concentraciones.

5 Se han preparado a partir de la emulsión concentrada del ejemplo 1 y de una composición de vacuna que comprende las 3 cepas víricas de la campaña de 2004 (la cepa A/New Caledonia (H1N1), la cepa A/Wyoming (H3N2) y la cepa B/Jiangsu) dosis de inmunización de 30 µl que tienen las siguientes composiciones:

- 0,3 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
- 6,3 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS,
- 0,3 µg de HA de cada una de las cepas víricas; 0,12 mg de escualeno; 0,018 mg de Dehymuls™ SMO; 0,023 mg de Eumulgin™ B1 y 0,022 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4 (emulsión al 0,4%),
- 10 • 0,3 µg de HA de cada una de las cepas víricas; 0,299 mg de escualeno; 0,044 mg de Dehymuls™ SMO; 0,057 mg de Eumulgin™ B1 y 0,055 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4 (emulsión al 1%).
- 0,3 µg de HA de cada una de las cepas víricas; 0,75 mg de escualeno; 0,11 mg de Dehymuls™ SMO; 0,143 mg de Eumulgin™ B1 y 0,138 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4 (emulsión al 2,5%).

15 Se disponía de 5 grupos de 8 ratones BALB/c, hembras, de 8 semanas de edad, a los que se les ha administrado el D0 por vía intradérmica (cara interna de la oreja) una dosis de 30 µl de una de las composiciones indicadas anteriormente (1 composición por grupo).

Para evaluar la cantidad de anticuerpos inducida se han realizado extracciones sanguíneas el D21 en las que se han determinado por ELISA los anticuerpos anti-H1N1, los anticuerpos anti-H3N2 y los anticuerpos anti-B y por IHA (inhibición de la hemaglutinación) la actividad contra la cepa A/H1N1, la cepa A/H3N2 y la cepa B.

20 Los resultados obtenidos se representan en la tabla siguiente en forma de medias para cada uno de los grupos; los resultados de ELISA se expresan en log₁₀ de unidades arbitrarias de ELISA y los resultados del IHA son los valores medios aritméticos de los inversos de la dilución.

Composición ensayada	Anti-H1N1		Anti-H3N2		Anti-B	
	ELISA	IHA	ELISA	IHA	ELISA	IHA
0,3 µg de HA	3,864	67	4,594	320	4,406	31
6,3 µg de HA	4,478	269	5,041	1660	5,053	135
0,3 µg HA + emulsión de la invención al 0,4%	4,053	108	4,827	525	4,545	54
0,3 µg HA + emulsión de la invención al 1%	4,312	269	5,074	1174	4,733	123
0,3 µg HA + emulsión de la invención al 2,5%	4,425	293	5,200	1974	4,840	123

25 Estos resultados confirman de nuevo que, cualquiera que sea la cepa evaluada, la emulsión según la invención ha permitido, con una dosis muy pequeña de antígenos, tener una respuesta del sistema inmunitario muy importante.

Ejemplo 9: Preparación de una composición liofilizable

Se ha procedido como en el ejemplo 1 pero usando agua en lugar de la disolución tampón; la emulsión obtenida se ha diluido a continuación con una disolución acuosa que comprende manitol, sacarosa y dodecilmaltósido con el fin de obtener una emulsión cuya composición final es la siguiente:

- 30 • 5% de escualeno,
- 0,95% de polioxietileno cetoestearil éter,
- 0,75% de monooleato de sorbitano,
- 3% de manitol.

- 2% de dodecilmaltósido,
- 6% de sacarosa.

5 Esta emulsión se ha liofilizado y conservado durante 3 meses a 4°C; después de la reconstitución se ha constatado que sus propiedades se habían conservado, principalmente sus cualidades de emulsión monodispersa, con valores de d50 y de d90 próximos a los medidos antes de la liofilización.

Esta emulsión se ha podido diluir a ½ con una disolución que comprende antígenos de vacuna con el fin de obtener una composición de vacuna.

Ejemplo 10 : Comparación del efecto adyuvante de la emulsión según la invención y de un tensioactivo presente en la emulsión

10 Se ha querido evaluar la actividad adyuvante de la emulsión según la invención en comparación con la del tensioactivo Eumulgin™ B1 que está presente en la emulsión.

Para ello se ha realizado un ensayo en ratones por medio de antígenos de la gripe.

15 Para este objetivo se disponía de antígenos de virus gripal obtenidos según el procedimiento descrito en los ejemplos de la solicitud WO9605294, excepto por el hecho de que la cepa vírica usada era la cepa A/New Caledonia H1N1. Se disponía igualmente de una composición de vacuna que comprendía las 3 cepas víricas de la campaña del 2004 (la cepa A/New Caledonia (H1N1), la cepa A/Wyoming (H3N2) y la cepa B/Jiangsu).

Se ha preparado a partir de la emulsión concentrada obtenida según la invención y descrita en el ejemplo 1, de Eumulgin™B1 y de las composiciones de antígenos del virus de la gripe, dosis de inmunización de 100 µl que tenían las composiciones siguientes:

- 20
- 1 µg de HA de la cepa H1N1 en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
 - 5 µg de HA de la cepa H1N1 en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
 - 1 µg de HA de la cepa H1N1; 2,5 mg de escualeno, 0,37 mg de Dehymuls™ SMO; 0,48 mg de Eumulgin™ B1 y 0,46 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
 - 1 µg de HA de la cepa H1N1 y 0,48 mg de Eumulgin™ B1 en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
- 25
- 0,33 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
 - 1,66 µg de HA de cada una de las cepas víricas en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
 - 0,33 µg de HA de cada una de las cepas víricas; 2,5 mg de escualeno; 0,37 mg de Dehymuls™ SMO; 0,48 mg de Eumulgin™ B1 y 0,46 mg de manitol en disolución tampón de PBS a pH 7,4;
- 30
- 0,33 µg de HA de cada una de las cepas víricas y 0,48 mg de Eumulgin™ B1 en disolución tampón de PBS a pH 7,4.

35 Se disponía de 8 grupos de 8 ratones BALB/c hembras que se han inmunizado por vía intramuscular mediante una sola inyección el D0. Se han extraído el D21 y el D35 muestras sanguíneas para evaluar mediante una dosificación de ELISA su contenido en anticuerpos totales inducidos contra la cepa gripal A/H1N1 o contra cada una de las cepas de la vacuna trivalente. Los valores de anticuerpos indicados en la tabla siguiente se expresan en unidades de ELISA arbitrarias en valor log10, con un umbral de detección a 1,3 log10.

Composiciones de las dosis de inmunización	Valores el D21			Valores el D35		
	H1N1	H3N2	B	H1N1	H3N2	B
H1N1 a 1 µg	2,745			2,848		
H1N1 a 5 µg	3,057			3,139		
H1N1 a 1 µg + emulsión de la invención	4,002			4,128		
H1N1 a 1 µg + Eumulgin™ B1	3,019			3,119		

ES 2 390 104 T3

Composiciones de las dosis de inmunización	Valores el D21			Valores el D35		
	H1N1	H3N2	B	H1N1	H3N2	B
Vacuna trivalente de 1 µg de HA total	3,111	3,718	3,706	3,218	4,147	3,935
Vacuna trivalente de 5 µg de HA total	3,692	4,386	3,975	3,776	4,632	4,225
Vacuna trivalente de 1 µg de HA total + emulsión de la invención	4,252	5,002	4,596	4,186	5,214	4,897
Vacuna trivalente de 1 µg de HA total + Eumulgin™ B1	3,146	3,712	3,950	3,241	4,177	4,242

5 Los resultados obtenidos en este ensayo confirman lo que ya se ha obtenido en los ensayos precedentes, es decir que la emulsión según la invención permite reducir de forma importante la dosis de antígenos para una misma respuesta del sistema inmunitario; en efecto, se ha obtenido una mejor respuesta usando la emulsión según la invención y solamente 1 µg de HA en lugar de usar una dosis de 5 µg de HA sin adyuvante.

Además se observa que el tensioactivo usado no presenta verdaderamente efecto adyuvante cuando se usa solo, mientras que la emulsión según la invención es muy adyuvante frente a todas las cepas ensayadas.

REIVINDICACIONES

- 1.** Composición inmunógena que comprende al menos un antígeno contra la gripe y una emulsión adyuvante aceite en agua obtenida por un procedimiento de inversión de fase por variación de la temperatura de una mezcla que comprende al menos :
- 5 - escualeno,
 - un disolvente acuoso,
 - un polioxietilen alquil éter, cuyo balance hidrófilo/lipófilo es superior o igual a 10,
 - un tensioactivo no iónico hidrófobo, cuyo balance hidrófilo/lipófilo es interior o igual a 9.
- 2.** Composición inmunógena según la reivindicación 1, caracterizada por que la emulsión adyuvante comprende una población monodispersa de gotas de escualeno de las que el 90 % del volumen está constituido por gotas que tienen un tamaño inferior a 200 nm.
- 10
- 3.** Composición según la reivindicación anterior, caracterizada por que el 90 % del volumen de las gotas de escualeno está constituido por gotas que tienen un tamaño inferior a 150 nm.
- 4.** Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende además al menos un alditol.
- 15
- 5.** Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la cantidad de antígeno vacunal está reducida hasta 63 veces.
- 6.** Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende de 0,4 a 2,5 % de escualeno en peso en la composición vacunal.