

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 182**

51 Int. Cl.:
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
B01F 13/00 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
B01F 3/08 (2006.01)
B01F 5/06 (2006.01)
B01F 5/10 (2006.01)
B01F 13/10 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
B01F 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10252052 .5**
96 Fecha de presentación: **03.12.2010**
97 Número de publicación de la solicitud: **2380558**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2011**

54 Título: **Disposición de cámaras de interacción y contrapresión para microfluidización**

30 Prioridad:
03.12.2009 US 283548 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.12.2012

73 Titular/es:
NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:
RUECKL, HARALD y
SCHEFFCZIK, HANNO

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 182 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

Disposición de cámaras de interacción y contrapresión para microfluidización.

Campo de la técnica

5 La presente invención pertenece al campo de la fabricación de adyuvantes en emulsión de aceite en agua para vacunas por microfluidización.

Técnica antecedente

10 El adyuvante de vacuna conocido como 'MF59' [1-3] es una emulsión submicrónica de aceite en agua de escualeno, polisorbato 80 (también conocido como Tween 80), y trioleato de sorbitán (también conocido como Span 85). Puede también incluir iones de citrato por ejemplo, tampón de citrato de sodio de 10 mM. La composición de la emulsión por volumen puede ser de aproximadamente 5% de escualeno, aproximadamente 0,5% de Tween 80 y aproximadamente 0,5% de Span 85. El adyuvante y su producción se describen con más detalle en el capítulo 10 de la referencia 4, capítulo 12 de la referencia 5 y en el capítulo 19 de la referencia 6.

15 Como se describe en la referencia 7, el MF59 es fabricado a escala comercial mediante la dispersión de Span 85 en la fase de escualeno y Tween 80 en la fase acuosa, seguido por la mezcla a alta velocidad para formar una emulsión de partículas gruesas. Esta emulsión de partículas gruesas se hace pasar repetidamente a través de un microfluidizador para producir una emulsión que tiene un tamaño de gota de aceite uniforme. Como se describe en la referencia 6, la emulsión microfluidificada se filtra a través de una membrana de 0,22 μm para eliminar las gotas de aceite grandes, y el tamaño medio de las gotas de la emulsión resultante se mantiene sin cambios durante al menos 3 años a 4 °C. El contenido de escualeno de la emulsión final se puede medir como se describe en la referencia 8.

20 La referencia 84 divulga nanoemulsiones obtenidas por varios pasos en canales de interacción con microcanales del tipo Y o Z.

25 Las emulsiones de aceite en agua contienen gotas de aceite. Las gotas de aceite más grandes contenidas en estas emulsiones pueden actuar como sitios de nucleación para la agregación, lo que conduce a la degradación de la emulsión durante el almacenamiento.

Un objeto de la invención es proporcionar procedimientos adicionales y mejorados para la producción de emulsiones de aceite en agua microfluidizadas (tales como, MF59), en particular procedimientos que son adecuados para su uso a escala comercial y que proporcionan una mejor microfluidización para proporcionar emulsiones con un menor número de partículas grandes.

30 Descripción de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende: hacer pasar una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite. El dispositivo de microfluidización comprende una cámara de interacción que comprende una pluralidad de canales de tipo Z y un módulo de procesamiento auxiliar que comprende al menos un canal, en el que el módulo de procesamiento auxiliar está situado corriente abajo de la cámara de interacción.

40 La primera emulsión se puede introducir en la cámara de interacción a una primera presión y la segunda emulsión puede salir del módulo de procesamiento auxiliar a una segunda presión que es menor que la primera presión. En una realización, entre 80 y 95% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través de la cámara de interacción y de 5 a 20% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través del módulo de procesamiento auxiliar.

45 La presente invención proporciona también un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende la etapa de hacer pasar una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite. El dispositivo de microfluidización comprende una cámara de interacción que comprende una pluralidad de canales y un módulo de procesamiento auxiliar que comprende una pluralidad de canales.

50 La primera emulsión puede bien (i) introducirse en la cámara de interacción a una primera presión y la segunda emulsión puede salir del módulo de procesamiento auxiliar a una segunda presión que es inferior a la primera presión, o la primera emulsión puede (ii) introducirse en el módulo de procesamiento auxiliar a una primera presión y la segunda emulsión puede salir de la cámara de interacción a una segunda presión que es menor que la primera presión. En una realización, entre 80 y 95% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través de la cámara de interacción y de 5 a 20% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones

cae a través del módulo de procesamiento auxiliar.

5 Como se describe en más detalle a continuación, la primera emulsión puede tener un tamaño medio de gotas de aceite de 5000 nm o menos, por ejemplo, un tamaño medio entre 300 nm y 800 nm. El número de gotas de aceite en la primera emulsión con un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ puede ser de 5×10^{11} /ml o menos, tal como se describe a continuación. Las gotas de aceite con un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ son desventajosas, ya que pueden causar inestabilidad de la emulsión debido a la aglomeración y coalescencia de las gotas [14].

10 Después de la formación, la primera emulsión se puede someter entonces a al menos un paso de microfluidización para formar la segunda emulsión que tiene un tamaño medio de gotas de aceite reducido. Como se describe a continuación, el tamaño medio de gotas de aceite de la segunda emulsión es 500 nm o menos. El número de gotas de aceite en la segunda emulsión que tiene un tamaño de $> 1,2 \mu\text{m}$ puede ser de 5×10^{10} /ml o menos, tal como se describe a continuación. Para lograr estas características puede ser necesario hacer pasar los componentes de la emulsión a través del dispositivo de microfluidización una pluralidad de veces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 veces.

15 La segunda emulsión puede después filtrarse, por ejemplo, a través de una membrana hidrófila de polietersulfona, para dar una emulsión de aceite en agua que puede ser adecuada para su uso como un adyuvante de vacuna. El tamaño medio de gotas de aceite de la emulsión de aceite en agua producida después de la filtración puede ser 220 nm o menos, por ejemplo, entre 135 y 175 nm, entre 145 y 165 nm, o aproximadamente 155 nm. El número de gotas de aceite que tiene un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ presente en la emulsión de aceite en agua producida después de la filtración puede ser de 5×10^8 /ml o menos, por ejemplo, 5×10^7 /ml o menos, 5×10^6 /ml o menos, 2×10^6 /ml o menos, o 5×10^5 /ml o menos.

20 La emulsión final de aceite en agua formada después de la filtración puede tener al menos 10^2 veces menos gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ en comparación con la primera emulsión, e idealmente al menos 10^3 veces menos (por ejemplo, 10^4 veces menos).

En algunas realizaciones, más de un ciclo de etapas (i) y (ii) se utiliza antes de la etapa (iii). De manera similar, se pueden utilizar múltiples repeticiones de las etapas (i) y (ii) individuales.

25 En general, el procedimiento se realiza entre 20-60 °C, e idealmente a 40 ± 5 °C. Aunque los componentes de la primera y segunda emulsiones pueden ser relativamente estables incluso a temperaturas más altas, la descomposición térmica de algunos componentes puede ocurrir y, por lo tanto, se prefieren temperaturas menores.

Componentes de la emulsión

30 El tamaño medio de gotas de aceite (es decir, el diámetro promedio de las gotas de aceite de la emulsión) se puede medir utilizando una técnica de dispersión de luz dinámica, como se describe en la referencia 13. Un ejemplo de una máquina de medición por dispersión de luz dinámica es el Analizador de tamaño partículas de submicrométricas Nicomp 380 (de Particle Sizing Systems).

El número de partículas que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ se puede medir utilizando un contador de partículas, tal como el Accusizer™ 770 (de Particle Sizing Systems).

35 Los procedimientos de la invención se utilizan para la fabricación de emulsiones de aceite en agua. Estas emulsiones incluyen tres ingredientes básicos: un aceite; un componente acuoso, y un tensioactivo.

Debido a que las emulsiones están destinadas al uso farmacéutico entonces el aceite será típicamente biodegradable (metabolizable) y biocompatible.

40 El aceite utilizado puede comprender escualeno, un aceite de hígado de tiburón, que es un terpenoide ramificado, insaturado ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}$; $[(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)]_2=\text{CHCH}_2-$]₂; 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno; CAS RN 7683-64-9). El escualeno es particularmente preferido para su uso en la presente invención.

El aceite de la presente invención puede comprender una mezcla (o combinación) de aceites, por ejemplo, comprendiendo escualeno y al menos un aceite adicional.

45 En lugar de (o además de) utilizar una emulsión de escualeno, puede comprender aceite o aceites que incluyen aquellos de, por ejemplo, un animal (como el pescado) o una fuente vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco, y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de frutos secos. Se puede utilizar, por ejemplo, el aceite de jojoba obtenido de la semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, tef, tritical y similares también pueden ser utilizados. Ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se producen de forma natural en los aceites de semillas, se pueden preparar mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales de partida apropiados partiendo de los aceites de frutos secos

y de semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamífero son metabolizables y, por lo tanto, se pueden utilizar. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica.

5 La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden ser fácilmente recuperados. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena, tal como, esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de pescado que se pueden utilizar en la presente memoria descriptiva. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan generalmente como terpenoides. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también se puede utilizar. Los aceites de pescado, incluidos el escualeno y el escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o se pueden obtener por procedimientos conocidos en la técnica.

10 Otros aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con escualeno. Cuando la fase oleosa de una emulsión incluye un tocoferol, cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ se puede utilizar, pero α -tocoferoles son los preferidos. D- α -tocoferol y DL- α -tocoferol se puede utilizar ambos. Un α -tocoferol preferido es el DL- α -tocoferol. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo, diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Si una sal de este tocoferol se va a utilizar, la sal preferida es el succinato. Se puede utilizar una combinación de aceite que comprende escualeno y un tocoferol (por ejemplo, DL- α -tocoferol).

15 El componente acuoso puede ser agua del grifo (por ejemplo, API) o puede incluir componentes adicionales solutos por ejemplo. Por ejemplo, se pueden incluir sales para formar un tampón de citrato, por ejemplo, o las sales de fosfato, tales como sales de sodio. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato, un tampón de Tris, un tampón de borato, un tampón de succinato; un tampón de histidina, o un tampón de citrato. Los tampones estarán típicamente dentro del intervalo 5-20mm.

20 El tensioactivo es preferiblemente biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Los tensioactivos se pueden clasificar por su "EHL" (equilibrio hidrófilo/lipófilo), en el que un HLB en el intervalo de 1-10 generalmente significa que el tensioactivo es más soluble en aceite que en agua, y un HLB en el intervalo de 10-20 significa que es más soluble en agua que en aceite. Las emulsiones comprenden preferiblemente al menos un tensioactivo que tiene un HLB de al menos 10, por ejemplo, al menos 15, preferiblemente al menos 16.

25 La invención se puede utilizar con tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitán (comúnmente conocidos como los Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), que se comercializan bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros en bloque EO/PO lineales; octoxinolos, que pueden variar en el número de repetición de grupos de etoxi (oxi-1 ,2-etanodiilo), siendo octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polietileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30), éter de polioxietileno-9-lauril, y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y sorbitán monolaurato. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son polisorbato 80 (Tween 80; monooleato de polioxietileno sorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

30 Las mezclas de tensioactivos se pueden incluir en la emulsión, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85, o mezclas de Tween 80/Triton-X100. Una combinación de un éster de polioxietileno sorbitán tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) también es adecuado. Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol. Las mezclas útiles pueden comprender un tensioactivo con un valor HLB en el intervalo de 10-20 (por ejemplo, Tween 80, con un HLB de 15,0) y un tensioactivo con un valor HLB en el intervalo de 1-10 (por ejemplo, Span 85, con un HLB de 1,8).

Formación de la primera emulsión

Antes de la etapa de microfluidización, los componentes de la emulsión se pueden mezclar para formar una primera emulsión.

35 Las gotas de aceite en la primera emulsión puede tener un tamaño promedio de 5000 nm o menos, por ejemplo 4000 nm o menos, 3000nm o menos, 2000nm o menos, 1200nm o menos, 1000nm o menos, por ejemplo, un tamaño medio entre 800 y 1200 nm o entre 300 nm y 800 nm.

En la primera emulsión del número de gotas de aceite con un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ puede ser de 5×10^{11} /ml o menos, por ejemplo, 5×10^{10} /ml o menos, o 5×10^9 /ml o menos.

40 La primera emulsión puede ser entonces microfluidiza para formar una segunda emulsión que tiene un tamaño medio de gotas de aceite menor que el de la primera emulsión y/o gotas de aceite con un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$.

45 El tamaño medio de gotas de aceite de la primera emulsión se puede lograr mediante la mezcla de los componentes

de la primera emulsión en un homogeneizador. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1, se pueden combinar en un recipiente de mezcla (12) y, a continuación los componentes combinados pueden ser introducidos (13) en un homogeneizador mecánico, tal como un homogeneizador (1) rotor-estator.

5 Los homogeneizadores pueden operar de forma vertical y/u horizontal. Para mayor comodidad en un entorno comercial, los homogeneizadores en línea son los preferidos.

10 Los componentes se introducen en un homogeneizador rotor-estator y coinciden con un rotor de giro rápido que contiene ranuras u orificios. Los componentes son lanzados hacia afuera por centrifugación de forma similar a una bomba y se hacen pasar a través de las ranuras/orificios. En algunas realizaciones, el homogeneizador incluye múltiples combinaciones de rotores y estatores, por ejemplo, una disposición concéntrica de anillos de dientes de cerdas, como se muestra por los elementos (3) y (4), (5) y (6) y (7) y (8) en La Figura 1 y en la Figura 2. Los rotores de los homogeneizadores útiles a gran escala pueden tener forma de anillos de dientes de cerdas en el borde de un propulsor multi-hoja de orientación horizontal (por ejemplo, elemento (9) en la Figura 1) alineados en próxima tolerancia para hacer coincidir los dientes en un revestimiento estático. La primera emulsión se forma a través de una combinación de la turbulencia, cavitación y cizallamiento mecánico que ocurren dentro de la brecha entre el rotor y el estator. Los componentes se introducen útilmente en una dirección paralela al eje del rotor.

15 Un parámetro de rendimiento importante en los homogeneizadores de rotor-estator es la velocidad de la punta del rotor (velocidad periférica). Este parámetro es una función tanto de la velocidad de giro como del diámetro del rotor. Una velocidad de la punta de al menos 10 ms^{-1} es útil, e idealmente más rápida, por ejemplo, $\geq 20 \text{ ms}^{-1}$, $\geq 30 \text{ ms}^{-1}$, $\geq 40 \text{ ms}^{-1}$, etc. Una velocidad de la punta de 40 ms^{-1} se puede lograr fácilmente a 10.000 rpm con un homogeneizador pequeño o a velocidades de giro inferiores (por ejemplo, 2.000 rpm) con un homogeneizador más grande. Los homogeneizadores adecuados de alta cizalla están comercialmente disponibles.

20 Para la fabricación a escala comercial, el homogeneizador debería tener idealmente un caudal de al menos 300 L/hr, por ejemplo, $\geq 400 \text{ l/hr}$, $\geq 500 \text{ l/hr}$, $\geq 600 \text{ l/hr}$, $\geq 700 \text{ l/hr}$, $\geq 800 \text{ l/hr}$, $\geq 900 \text{ l/hr}$, $\geq 1000 \text{ l/hr}$, $\geq 2000 \text{ l/hr}$, 5000 l/hr, o incluso $\geq 10000 \text{ l/hr}$. Los homogeneizadores adecuados de gran capacidad están disponibles comercialmente.

25 Un homogeneizador preferido proporciona una velocidad de cizallamiento de entre 3×10^5 y $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, por ejemplo, entre 3×10^5 y $7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, entre 4×10^5 y $6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, por ejemplo aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$.

Aunque los homogeneizadores de rotor-estator generan relativamente poco calor durante el funcionamiento, el homogeneizador puede ser enfriado durante su uso. Idealmente, la temperatura de la primera emulsión se mantiene por debajo de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante la homogeneización, por ejemplo, por debajo de $45 \text{ }^\circ\text{C}$.

30 En algunas realizaciones, los componentes de la primera emulsión se pueden homogeneizar varias veces (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o más veces). Para evitar la necesidad de una larga cadena de recipientes y homogeneizadores, los componentes de la emulsión pueden en lugar hacerse circular (por ejemplo, como se muestra por el elemento (11) en la Figura 1). En particular, la primera emulsión se puede formar mediante la circulación de los componentes de la primera emulsión a través de un homogeneizador una pluralidad de veces (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100 etc. veces). Sin embargo, muchos ciclos pueden ser indeseables ya que pueden producir la re-coalescencia como se describe en la referencia 14. Por lo tanto, el tamaño de las gotas de aceite puede ser monitoreado si se utiliza la circulación homogeneizador para verificar que se alcanza un tamaño de gota deseado y/o que no se está produciendo la re-coalescencia.

35 La circulación a través del homogeneizador es ventajosa porque puede reducir el tamaño medio de gotas de aceite en la primera emulsión. La circulación es también ventajosa porque puede reducir el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \text{ } \mu\text{m}$ en la primera emulsión. Estas reducciones en el tamaño medio de la gota y el número de gotas $> 1,2 \text{ } \mu\text{m}$ en la primera emulsión pueden proporcionar ventajas en el proceso o procesos corriente abajo. En particular, la circulación de los componentes de la primera emulsión a través del homogeneizador puede conducir a un proceso de microfluidización mejorado que luego puede dar lugar a una reducción del número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \text{ } \mu\text{m}$ en la segunda emulsión, es decir, después de la microfluidización. Esta mejora en los parámetros de la segunda emulsión puede proporcionar un rendimiento de filtración mejorado. El rendimiento de filtración mejorado puede dar lugar a menos pérdidas del contenido durante la filtración, por ejemplo, pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión de aceite en agua es MF59.

40 Dos tipos particulares de circulación se denominan aquí como "tipo I" y "tipo II". La circulación de tipo I se ilustra en la Figura 5, mientras que la circulación de tipo II se ilustra en la Figura 6.

45 La circulación de los componentes de la primera emulsión puede comprender una circulación de tipo I de la transferencia de los componentes de la primera emulsión entre un primer recipiente de premezcla y un homogeneizador. El primer recipiente de premezcla puede tener un tamaño de 50 a 500 l, por ejemplo, 100 a 400 l, 100 a 300 l, 200 a 300 l, 250 l ó 280 l. El primer recipiente de premezcla puede estar fabricado de acero inoxidable. 50 La circulación de tipo I puede continuar durante 10 a 60 minutos, por ejemplo 10 a 40 minutos ó 20 minutos.

La circulación de los componentes de la primera emulsión puede comprender una circulación de tipo II de la transferencia de los componentes de la primera emulsión desde un primer recipiente de premezcla, a través de un

5 primer homogeneizador a un segundo recipiente de premezcla (que opcionalmente tiene las mismas propiedades que el primer recipiente de premezcla), y luego a través de un segundo homogeneizador. El segundo homogeneizador será generalmente igual que el primer homogeneizador, pero en algunas disposiciones el primer y segundo homogeneizadores son diferentes. Tras el paso de los componentes de la primera emulsión a través del segundo homogeneizador, los componentes de la primera emulsión pueden transferirse de nuevo al primer recipiente de premezcla, por ejemplo, si se va a repetir el proceso de la circulación de tipo II. Por lo tanto, los componentes de la emulsión pueden viajar en una ruta de una vez entre el primer y segundo recipientes de premezcla a través de un único homogeneizador (véase la Figura 6). La circulación de tipo II puede realizarse una sola vez o una pluralidad de veces, por ejemplo 2, 3, 4, 5 etc. veces.

10 La circulación de tipo II es ventajosa, en comparación con la circulación de tipo I, ya que puede ayudar a asegurar que todos los componentes de la primera emulsión pasen a través del homogeneizador. El vaciado del primer recipiente de premezcla significa que el contenido de todos los contenidos de la emulsión ha pasado a través del homogeneizador, en el segundo recipiente de premezcla. Del mismo modo, el contenido del segundo recipiente de premezcla puede ser vaciado, de nuevo asegurándose de que todo pasa todos a través del homogeneizador. Por lo tanto, la disposición de tipo II puede convenientemente asegurar que todos los componentes de la emulsión se homogeneizan al menos dos veces, lo cual puede reducir tanto el tamaño medio de gotas de aceite como el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ en la primera emulsión. Una circulación de tipo II ideal implica, por tanto, vaciar el primer recipiente de premezcla y hacer pasar sustancialmente todo su contenido a través del homogeneizador en el segundo recipiente de premezcla, seguido por el vacío del segundo recipiente de premezcla y haciendo que vuelva a pasar sustancialmente todo su contenido a través del homogeneizador de vuelta al primer recipiente de premezcla. Por lo tanto, todas las partículas pasan a través del homogeneizador al menos dos veces, mientras que esto es difícil de lograr con la circulación de tipo I.

15 En algunas realizaciones, se utiliza una combinación de las circulaciones de tipo I y de tipo II, y esta combinación puede proporcionar una primera emulsión con buenas características. En particular, esta combinación puede reducir el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ en la primera emulsión. Esta combinación puede comprender cualquier orden de las circulaciones de tipo I y II, por ejemplo, de tipo I seguido de tipo II, de tipo II seguido de tipo I, de tipo I seguido de tipo II seguido por el tipo I de nuevo etc. En una realización, la combinación comprende 20 minutos de circulación de tipo I seguido por una sola circulación de tipo II, es decir, la transferencia de los componentes de la primera emulsión que se han hecho circular desde un primer recipiente de premezcla, a través de un primer homogeneizador a un segundo recipiente de premezcla, y luego a través de un segundo homogeneizador una vez.

20 El primer y segundo recipientes de premezcla pueden mantenerse bajo un gas inerte, por ejemplo nitrógeno, por ejemplo, de hasta 0,5 bar. Esto puede evitar que los componentes de la emulsión se oxiden, que es particularmente ventajoso si uno de los componentes de la emulsión es escualeno. Esto puede proporcionar un aumento en la estabilidad de la emulsión.

25 Como se ha mencionado anteriormente, la entrada inicial para el homogeneizador puede ser una mezcla no homogénea de los componentes de la primera emulsión. Esta mezcla se puede preparar mezclando los componentes individuales de la primera emulsión de forma individual pero, en algunas realizaciones, varios componentes se pueden combinar antes de esta mezcla. Por ejemplo, si la emulsión incluye un tensioactivo con un HLB inferior a 10, entonces este tensioactivo puede ser combinado con un aceite antes de la mezcla. De manera similar, si la emulsión incluye un tensioactivo con un HLB superior a 10, entonces este tensioactivo puede ser combinado con un componente acuoso antes de la mezcla. Las sales del tampón se pueden combinar con un componente acuoso antes de la mezcla, o pueden añadirse por separado.

30 Los procedimientos de la invención se pueden utilizar en gran escala. Por lo tanto, un procedimiento puede implicar la preparación de una primera emulsión, cuyo volumen es mayor que 1 litro por ejemplo ≥ 5 litros, ≥ 10 litros, ≥ 20 litros, ≥ 50 litros, ≥ 100 litros, ≥ 250 litros, etc.

Después de su formación, la primera emulsión se puede microfluidizar, o se puede almacenar a la espera de microfluidización.

35 En algunas realizaciones, en particular aquellas en las que se utilizan múltiples ciclos de las etapas (i) y (ii), la entrada para el homogeneizador será la salida de un microfluidizador, de tal manera que la primera emulsión se microfluidiza y después se somete de nuevo a homogeneización.

Microfluidización

Después de su formación, la primera emulsión se microfluidiza con el fin de reducir su tamaño medio de gotas de aceite y/o para reducir el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$.

40 Los instrumentos de microfluidización reducen el tamaño medio de gotas de aceite mediante propulsión corrientes de componentes de entrada a través de canales geoméricamente establecidos a alta presión y alta velocidad. La presión a la entrada de la cámara de interacción (también denominada la "primera presión") puede ser sustancialmente constante (es decir, $\pm 15\%$; por ejemplo, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$) durante al menos 85% del tiempo

durante el que los componentes se alimentan en el microfluidizador, por ejemplo al menos 87%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99% o 100% del tiempo durante el que se alimenta la emulsión en el microfluidizador.

5 En una realización, la primera presión es de 1300 bar \pm 15% (18 KPSI \pm 15%), es decir, entre 1100 bar y 1500 bar (entre 15 KPSI y 21 KPSI) para 85% del tiempo durante el que la emulsión se alimenta en el microfluidizador. Dos perfiles de presión adecuados se muestran en la Figura 3. En la Figura 3A la presión es sustancialmente constante durante al menos 85% del tiempo, mientras que en la Figura 3B la presión permanece continuamente sustancialmente constante.

10 Un aparato de microfluidización comprende típicamente al menos una bomba intensificadora (preferiblemente dos bombas, que pueden ser sincronas) y una cámara de interacción. La bomba intensificadora, que es idealmente impulsada electro-hidráulicamente, proporciona alta presión (es decir, la primera presión) para forzar una emulsión en y a través de la cámara de interacción. La naturaleza sincrónica de las bombas intensificadoras se puede utilizar para proporcionar la presión sustancialmente constante de la emulsión que se ha descrito anteriormente, lo que significa que las gotas de emulsión están todas expuestas a sustancialmente el mismo nivel de fuerzas de cizallamiento durante la microfluidización.

15 Una ventaja de la utilización de una presión sustancialmente constante es que puede reducir los fallos por fatiga en el dispositivo de microfluidización, lo que puede conducir a una mayor vida útil del dispositivo. Una ventaja adicional de la utilización de una presión sustancialmente constante es que los parámetros de la segunda emulsión se pueden mejorar. En particular, el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ presente en la segunda emulsión puede ser reducido. Además, el tamaño medio de gotas de aceite de la segunda emulsión se puede
20 reducir cuando se utiliza una presión sustancialmente constante. La reducción en el tamaño medio de gotas de aceite y en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ en la segunda emulsión puede proporcionar un rendimiento de filtración mejorado. El rendimiento de filtración mejorado puede dar lugar a menos pérdidas del contenido durante la filtración, por ejemplo, pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión es MF59.

25 La cámara de interacción puede contener una pluralidad, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 etc., de canales de geometría fija en los que pasa la emulsión. La emulsión entra en la cámara de interacción a través de una línea de entrada que puede tener un diámetro entre 200 y 250 μm . La emulsión se divide en corrientes a medida que entra en la cámara de interacción y, a alta presión, se acelera hasta una velocidad alta. A medida que pasa a través de los canales, las fuerzas producidas por la alta presión pueden actuar para reducir el tamaño de gotas de aceite en la emulsión y reducir el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$. Estas fuerzas pueden incluir:
30 fuerzas de cizallamiento, a través de la deformación de la corriente de emulsión que se producen por el contacto con las paredes del canal; fuerzas de impacto, a través de colisiones que ocurren cuando las corrientes de emulsión a alta velocidad chocan unas con otras, y fuerzas de cavitación, a través de la formación y el colapso de las cavidades dentro de la corriente. La cámara de interacción por lo general no incluye partes móviles. Puede incluir superficies acanaladas de cerámica (alúmina, por ejemplo) o de diamante (diamante policristalino, por ejemplo). Otras superficies pueden estar fabricadas de acero inoxidable.

35 La geometría fija de la pluralidad de canales en la cámara de interacción puede ser de geometría tipo "Y" o de geometría tipo "Z".

40 En una cámara de interacción de geometría de tipo Y, una sola corriente de emulsión de entrada se divide en primera y segunda corrientes de emulsión, que después se recombinan en una sola corriente de emulsión de salida. Antes de la recombinación, cada una de las primera y segunda corrientes de emulsión se puede dividir independientemente en una primera y segunda pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) de sub-corrientes. Cuando las corrientes de emulsión se recombinan, las primera y segunda corrientes de emulsión (o sus sub-corrientes) están perfectamente fluyendo en direcciones sustancialmente opuestas (por ejemplo, la primera y
45 segunda corrientes de emulsión, o sus sub-corrientes, están fluyendo sustancialmente en el mismo plano ($\pm 20^\circ$) y la dirección del flujo de la primera corriente de emulsión es $180 \pm 20^\circ$ diferente de la dirección del flujo de la segunda corriente de emulsión). Las fuerzas producidas cuando las corrientes de emulsión se recombinan pueden actuar para reducir el tamaño de las gotas de aceite en la emulsión y reducir el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$.

50 En una cámara de interacción de geometría tipo Z, la corriente de emulsión se hace pasar alrededor de una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) de esquinas en ángulo sustancialmente recto (es decir, $90 \pm 20^\circ$). La Figura 4 ilustra una cámara de interacción de geometría tipo Z y dos esquinas en ángulo recto en la dirección del flujo. Durante su paso alrededor de las esquinas, una corriente de emulsión de entrada se puede dividir en una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) de sub-corrientes y recombinarse después en una sola corriente de emulsión de salida (por ejemplo, como se muestra en la Figura 4, con cuatro sub-corrientes (32)). La división y posterior recombinación (31) puede ocurrir en cualquier punto entre la entrada y la salida. Las fuerzas que se producen cuando la emulsión entra en contacto con las paredes del canal a medida que pasa alrededor de las esquinas pueden actuar para reducir el tamaño de las gotas de aceite en la emulsión y reducir el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$. Un ejemplo de una cámara de interacción de tipo Z es la cámara de
55 interacción E230Z de Microfluidics.

En una realización, la corriente de emulsión se hace pasar alrededor de dos esquinas en ángulo sustancialmente recto. En el punto en que la corriente de emulsión de entrada pasa alrededor de la primera curva sustancialmente en ángulo recto, se divide en cinco sub-corrientes. En el punto en que las sub-corrientes pasan alrededor de la segunda esquina sustancialmente en ángulo recto, se recombinan en una única corriente de emulsión de salida.

- 5 En la técnica anterior ha sido habitual el uso de cámaras de interacción de tipo Y para emulsiones de aceite en agua, como las de la presente invención. Sin embargo, hemos descubierto que es ventajoso utilizar una cámara de interacción de geometría de canal tipo Z para emulsiones de aceite en agua, porque esto puede dar como resultado una mayor reducción en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ presente en la segunda emulsión en comparación con una cámara de interacción de geometría tipo Y. La reducción en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ en la segunda emulsión puede proporcionar un rendimiento de filtración mejorado. El rendimiento de filtración mejorado puede dar lugar a menos pérdidas del contenido durante la filtración, por ejemplo, pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión es MF59.

- 10 Un aparato de microfluidización preferido funciona a una presión entre 170 bar y 2750 bar (aproximadamente 2500 psi y 40000 psi) por ejemplo a aproximadamente 345 bar, aproximadamente 690 bar, aproximadamente 1380 bar, aproximadamente 2070 bar, etc.

- 15 Un aparato de microfluidización preferido funciona a una velocidad de flujo de hasta 20 L/min por ejemplo, hasta 14 L/min, hasta 7 L/min, hasta 3,5 L/min, etc.

Un aparato de microfluidización preferido tiene una cámara de interacción que proporciona una velocidad de cizallamiento de más de $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ por ejemplo $\geq 2,5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, $\geq 5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, $\geq 10^7 \text{ s}^{-1}$, etc.

- 20 Un aparato de microfluidización puede incluir múltiples cámaras de interacción que se utilizan en paralelo por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más, pero es más útil incluir una cámara de interacción única.

- El dispositivo de microfluidización puede comprender un módulo de procesamiento auxiliar (APM, también conocido como microfluidizadores en una cámara de contrapresión – estas expresiones se utilizan indistintamente en el presente documento) que comprende al menos un canal. El APM contribuye a la reducción en el tamaño medio de gotas de aceite en la emulsión que pasa a través del dispositivo de microfluidización, aunque la mayoría de la reducción se produce en la cámara de interacción. Como se ha mencionado anteriormente, los componentes de la emulsión se introducen a la cámara de interacción de la bomba o bombas intensificadoras bajo una primera presión. Los componentes de la emulsión salen generalmente del APM a una segunda presión que es inferior a la primera presión (presión atmosférica, por ejemplo). En general, entre 80 y 95% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través de la cámara de interacción (por ejemplo de P_1 a P_2 en la Figura 4) y 5 a 20% de la diferencia de presión entre la primera y segunda presiones cae por el módulo de procesamiento auxiliar, por ejemplo, la cámara de interacción puede proporcionar aproximadamente el 90% de la caída de presión mientras que el APM puede proporcionar aproximadamente el 10% de la caída de presión. Si la presión que cae a través de la cámara de interacción y la presión que cae a través del módulo de procesamiento auxiliar no tienen en cuenta la totalidad de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones, esto puede ser debido a una caída de presión finita a través de los conectores entre la cámara de interacción y el módulo de procesamiento auxiliar.

- 35 El APM generalmente no incluye partes móviles. Puede incluir superficies acanaladas de cerámica (alúmina, por ejemplo) o de diamante (diamante policristalino, por ejemplo). Otras superficies pueden estar fabricadas de acero inoxidable.

- 40 El APM está generalmente colocado corriente abajo de la cámara de interacción y también se puede colocar secuencial a la cámara de interacción. En la técnica anterior, los APM estaban por lo general colocados corriente abajo de las cámaras de interacción comprendiendo canales de tipo Y para suprimir la cavitación y, por lo tanto, aumentar la velocidad de flujo en la cámara de tipo Y hasta en un 30%. Además, en la técnica anterior los APM estaban por lo general colocados corriente arriba de las cámaras de interacción que comprenden canales de tipo Z para reducir el tamaño de grandes aglomerados. En este último caso, el APM sólo disminuye la velocidad de flujo en las cámaras de tipo Z hasta en un 3%. Sin embargo, se ha encontrado que la colocación de los APM corriente abajo de una cámara de interacción que comprende una pluralidad de canales de tipo Z es ventajoso en la presente invención, ya que puede dar como resultado una mayor reducción en el tamaño medio de gotas de aceite y una mayor reducción en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ presentes en la segunda emulsión. Como se ha descrito anteriormente, la reducción en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ en la segunda emulsión puede proporcionar un rendimiento de filtración mejorado. El rendimiento de filtración mejorado puede dar lugar a menos pérdidas del contenido durante la filtración, por ejemplo, pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión de aceite en agua es MF59. Una ventaja adicional de este posicionamiento de una cámara de interacción de tipo Z y un APM corriente abajo es que puede dar como resultado una disminución de presión más lenta después de la cámara de interacción. La disminución de presión más lenta puede conducir a un aumento en la estabilidad del producto, porque hay menos gas encerrado en la emulsión.

- 55 Un APM contiene al menos un canal de geometría fija en el que se hace pasar la emulsión. El APM puede contener una pluralidad, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 etc., de los canales de geometría fija en los que se hace pasar la

emulsión. El canal o canales del APM pueden ser lineales o no lineales. Los canales no lineales adecuados son de geometría tipo "Z" o de geometría tipo "Y", que son los mismos que se han descritos anteriormente para la cámara de interacción. En una realización, el canal, o canales, del APM son de geometría tipo Z. Una pluralidad de canales tipo Z divide la emulsión en corrientes a medida que entra en el APM.

- 5 En contraste a las recomendaciones del fabricante, el uso de un APM que comprende una pluralidad de canales de geometría fija es ventajosa en comparación con un APM de un solo canal de geometría fija, porque puede dar como resultado una mayor reducción en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ presentes en la segunda emulsión. Como se ha descrito anteriormente, la reducción en el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ en la segunda emulsión puede proporcionar un rendimiento de filtración mejorado. El rendimiento de filtración mejorado puede dar lugar a menos pérdidas del contenido durante la filtración, por ejemplo, pérdidas de escualeno, Tween 80 y Span 85 cuando la emulsión de aceite en agua es MF59.

- 10 Un aparato de microfluidización genera calor durante el funcionamiento, lo que puede elevar la temperatura de una emulsión de 15-20 °C con respecto a la primera emulsión. Ventajosamente, por lo tanto, la emulsión microfluidificada se enfría tan pronto como sea posible. La temperatura de la segunda emulsión puede mantenerse por debajo de 60 °C, por ejemplo, por debajo de 45 °C. Por lo tanto, una salida de la cámara de interacción y/o una salida del APM puede alimentar a un mecanismo de refrigeración, tal como un intercambiador de calor o serpentín de refrigeración. La distancia entre la salida y el mecanismo de refrigeración debe mantenerse lo más corta posible para acortar el tiempo global reduciendo de los retrasos de refrigeración. En una realización, la distancia entre la salida del microfluidizador y el mecanismo de refrigeración está entre 20-30cm. Un mecanismo de refrigeración es particularmente útil cuando una emulsión se somete a múltiples etapas de microfluidización, para evitar el sobrecalentamiento de la emulsión.

- 15 El resultado de la microfluidización es una emulsión de aceite en agua, la segunda emulsión, en la que el tamaño medio de gotas de aceite es 500 nm o menos. Este tamaño medio es particularmente útil ya que facilita la esterilización en filtro de la emulsión. Las emulsiones en las que al menos 80% en número de las gotas de aceite tienen un tamaño medio de 500 nm o menos, por ejemplo, 400 nm o menos, 300 nm o menos, 200 nm o menos o 165 nm o menos, son particularmente útiles. Además, el número de gotas de aceite en la segunda emulsión que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ es de 5×10^{10} /ml o menos, por ejemplo 5×10^9 /ml o menos, 5×10^8 /ml o menos, o 2×10^8 /ml o menos.

- 20 La entrada inicial para la microfluidización puede ser la primera emulsión. En algunas realizaciones, sin embargo, la emulsión microfluidificada se somete a microfluidización de nuevo, de tal manera que ocurren múltiples rondas de microfluidización. En particular, la segunda emulsión puede formarse mediante la circulación de los componentes de la segunda emulsión a través de un dispositivo de microfluidización una pluralidad de veces, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 etc. veces. La segunda emulsión se puede formar mediante la circulación de los componentes de la segunda emulsión a través de un dispositivo de microfluidización de 4-7 veces.

- 25 La circulación de los componentes de la segunda emulsión puede comprender una circulación de tipo I de transferencia de los componentes de la segunda emulsión entre un primer recipiente de emulsión (que opcionalmente tiene las mismas propiedades que el primer recipiente de premezcla) y el dispositivo de microfluidización.

- 30 La circulación de los componentes de la segunda emulsión puede comprender una circulación de tipo II de transferencia de los componentes de la segunda emulsión desde un primer recipiente de emulsión, a través de un primer dispositivo de microfluidización hasta un segundo recipiente de emulsión (que opcionalmente tiene las mismas propiedades que el primer recipiente de premezcla), y después a través de un segundo dispositivo de microfluidización.

- 35 El segundo dispositivo de microfluidización puede ser el mismo que el primer dispositivo de microfluidización. Como alternativa, el segundo dispositivo de microfluidización puede ser diferente del primer dispositivo de microfluidización.

El primer recipiente de emulsión puede ser el mismo que el primer recipiente de premezcla. Como alternativa, el primer recipiente de emulsión puede ser el mismo que el segundo recipiente de premezcla.

- 40 El segundo recipiente de emulsión puede ser el mismo que el primer recipiente de premezcla. Como alternativa, el segundo recipiente de emulsión puede ser el mismo que el segundo recipiente de premezcla.

El primer recipiente de emulsión puede ser el mismo que el primer recipiente de premezcla y el segundo recipiente de emulsión puede ser el mismo que el segundo recipiente de premezcla. Como alternativa, el primer recipiente de emulsión puede ser el mismo que el segundo recipiente de premezcla y el segundo recipiente de emulsión puede ser el mismo que el primer recipiente de premezcla.

- 45 Como alternativa, el primer y segundo recipientes de emulsión pueden ser diferentes al primer y segundo recipientes de premezcla.

Después del paso de los componentes de la segunda emulsión a través del segundo dispositivo de microfluidización, los componentes de la segunda emulsión se pueden transferir de vuelta al primer recipiente de emulsión, por ejemplo, si se tiene que repetir el proceso de la circulación de tipo II. La circulación de tipo II se puede realizar una sola vez o una pluralidad de veces, por ejemplo 2, 3, 4, 5 etc. veces.

- 5 La circulación de tipo II es ventajosa ya que asegura que todos los componentes de la segunda emulsión hayan pasado por el dispositivo de microfluidización al menos 2 veces, lo que reduce el tamaño medio de gotas de aceite y el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ en la segunda emulsión.

Una combinación de circulación de tipo I y de la circulación de tipo II se puede utilizar durante la microfluidización. Esta combinación puede comprender cualquier orden de la circulación de tipo I y de tipo II, por ejemplo, de tipo I seguido de tipo II, de tipo II seguido de tipo I, de tipo I seguido de tipo II seguido por el tipo I de nuevo etc.

10 El primer y segundo recipientes de emulsión pueden mantenerse bajo un gas inerte, por ejemplo, hasta 0,5 bar de nitrógeno. Esto evita que los componentes de la emulsión se oxiden, lo que es particularmente ventajoso si uno de los componentes de la emulsión es escualeno. Esto conduce a un aumento en la estabilidad de la emulsión.

15 Los procedimientos de la invención se pueden utilizar a gran escala. Por lo tanto, un procedimiento puede implicar la microfluidización de un volumen superior a 1 litro por ejemplo ≥ 5 litros, ≥ 10 litros, ≥ 20 litros, ≥ 50 litros, ≥ 100 litros, ≥ 250 litros, etc.

Filtración

20 Después de microfluidización, se filtra la segunda emulsión. Esta filtración elimina las gotas de aceite de gran tamaño que han sobrevivido a los procedimientos de homogeneización y microfluidización. Aunque pequeño en términos numéricos, estas gotas de aceite pueden ser grandes en términos de volumen y pueden actuar como sitios de nucleación para la agregación, lo que conduce a la degradación de la emulsión durante el almacenamiento. Además, esta etapa de filtración puede lograr la esterilización del filtro.

25 La membrana de filtración especialmente adecuada para la esterilización del filtro depende de las características del fluido de la segunda emulsión y del grado de filtración requerido. Las características de un filtro pueden afectar a su idoneidad para la filtración de la emulsión microfluidificada. Por ejemplo, sus características de tamaño de poro y superficie pueden ser importantes, especialmente cuando se filtra una emulsión en base a escualeno.

30 El tamaño de poro de las membranas utilizadas con la invención debe permitir el paso de las gotas deseadas manteniendo al mismo tiempo las gotas no deseadas. Por ejemplo, se deben conservar las gotas que tienen un tamaño $\geq 1 \mu\text{m}$ mientras que permita el paso de las gotas $< 200 \text{ nm}$. Un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ ó $0,22 \mu\text{m}$ es ideal, y también puede lograr la esterilización del filtro.

35 La emulsión se puede pre-filtrar por ejemplo, a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$. La prefiltración y filtración se pueden lograr en una sola etapa mediante el uso de conocidos filtros de doble capa que incluyen una primera capa de membrana con poros más grandes y una segunda capa de membrana con poros más pequeños. Los filtros de doble capa son particularmente útiles con la invención. La primera capa tiene idealmente un tamaño de poro $> 0,3 \mu\text{m}$, tal como entre $0,3\text{-}2 \mu\text{m}$ o entre $0,3\text{-}1 \mu\text{m}$, o entre $0,4\text{-}0,8 \mu\text{m}$, o entre $0,5\text{-}0,7 \mu\text{m}$. Un tamaño de poro $\leq 0,75 \mu\text{m}$ en la primera capa se prefiere. Por lo tanto, la primera capa puede tener un tamaño de poro de $0,6 \mu\text{m}$ ó $0,45 \mu\text{m}$, por ejemplo. La segunda capa tiene idealmente un tamaño de poro que es menor que el 75% (y, preferiblemente, menos de la mitad de) del tamaño de poro de la primera capa, por ejemplo, entre 25-70% o entre 25-49%, la primera capa del tamaño de poro de la primera capa, es por ejemplo, entre 30-45%, tal como $1/3$ ó $4/9$, de tamaño de poro de la primera capa. Por lo tanto, la segunda capa puede tener un tamaño de poro $< 0,3 \mu\text{m}$, tal como entre $0,15\text{-}0,28 \mu\text{m}$ o entre $0,18\text{-}0,24 \mu\text{m}$ por ejemplo una segunda capa de tamaño de poro $0,2 \mu\text{m}$ o $0,22 \mu\text{m}$. En un ejemplo, la primera capa de membrana con poros de mayor tamaño proporciona un filtro de $0,45 \mu\text{m}$, mientras que la segunda capa de membrana con poros más pequeños proporciona un filtro de $0,22 \mu\text{m}$.

45 La membrana de filtración y/o la membrana de prefiltración pueden ser asimétricas. Una membrana asimétrica es una en la que el tamaño de poro varía de un lado de la membrana al otro, por ejemplo, en la que el tamaño de poro es mayor en la cara de entrada que en la cara de salida. Un lado de la membrana asimétrica puede ser denominado como la "superficie de poros gruesos", mientras que el otro lado de la membrana asimétrica puede ser denominado como la "superficie de poros finos". En un filtro de doble capa, una o (idealmente) ambas capas pueden ser asimétricas.

50 La membrana de filtración puede ser porosa u homogénea. Una membrana homogénea es, por lo general, una película densa de 10 a $200 \mu\text{m}$. Una membrana porosa tiene una estructura porosa. En una realización, la membrana de filtración es porosa. En un filtro de doble capa, ambas capas pueden ser porosas, ambas capas pueden ser homogéneas, o puede ser una capa porosa y una capa homogénea. Un filtro de doble capa preferido es uno en el que ambas capas son porosas.

55 En una realización, la segunda emulsión se filtra previamente a través de una membrana asimétrica, porosa hidrófila y después se filtra a través de otra membrana asimétrica, porosa hidrófila que tiene poros más pequeños que la

membrana de prefiltración. Esta puede utilizar un filtro de doble capa.

El filtro o filtros de membrana pueden ser esterilizados en autoclave antes de su uso para asegurarse de que son estériles.

5 Las membranas de filtración se hacen típicamente de materiales de soporte poliméricos, tales como, PTFE (Politetra-fluoro-etileno), PES (polietersulfona), PVP (polivinilpirrolidona), PVDF (fluoruro de polivinilideno), nylon (poliamidas), PP (polipropileno), celulosas (incluyendo ésteres de celulosa), PEEK (poliéter-éter), nitrocelulosa, etc. Estas tienen diferentes características, con unos soportes siendo intrínsecamente hidrófobos (por ejemplo, PTFE) y otros que son intrínsecamente hidrófilos (por ejemplo, acetatos de celulosa). Sin embargo, estas características intrínsecas pueden ser modificadas por tratamiento de la superficie de la membrana. Por ejemplo, se conoce la preparación de membranas hidrofílicas o hidrofobizadas tratándolas con otros materiales (tales como, otros polímeros, grafito, silicona, etc.) para revestir la superficie de la membrana, por ejemplo, véase la sección 2.1 de la referencia 15. En un filtro de doble capa, las dos membranas se pueden hacer de diferentes materiales o (idealmente) del mismo material.

15 Un filtro ideal para su uso con la invención tiene una superficie hidrófila, en contraste con la enseñanza de las referencias 9-12 en las que se señala que se deben utilizar filtros hidrófobos (polisulfona). Los filtros con superficies hidrófilas se pueden formar a partir de materiales hidrófilos, o por hidrofiliación de materiales hidrófobos, y un filtro preferido para su uso con la invención es una membrana hidrófila de polietersulfona. Varios procedimientos diferentes son conocidos para transformar las membranas hidrofóbicas de PES en membranas hidrofílicas de PES. A menudo se consigue por revistiendo la membrana con un polímero hidrófilo. Para proporcionar la fijación permanente del polímero hidrófilo a la PES una capa de revestimiento hidrófilo se somete, por lo general, o bien a una reacción de reticulación o de injerto. La referencia 15 divulga un procedimiento para la modificación de las propiedades superficiales de un polímero hidrófobo que tiene extremos de cadena funcionalizables, que comprende poner en contacto el polímero con una solución de un fragmento de enlace para formar un enlace covalente, y luego poner en contacto el polímero hidrófobo que se ha hecho reaccionar con una solución de un agente de modificación. 20 La referencia 16 divulga un procedimiento de hidrofiliación membrana de PES por revestimiento de membrana directa, que implica la humectación previa con alcohol, seguida de la inmersión en una solución acuosa que contiene un monómero hidrófilo, un monómero polifuncional (reticulante) y un iniciador de polimerización. El monómero y el reticulante se polimerizan después utilizando la polimerización térmica o iniciada por UV para formar un revestimiento de polímero reticulado hidrófilo sobre la superficie de la membrana. Del mismo modo, las referencias 25 17 y 18 divulgan un revestimiento de membrana de PES por inmersión en una solución acuosa de polímero hidrófilo (óxido de polialquileno) y al menos un monómero polifuncional (reticulante) y, polimerizar después un monómero para proporcionar un revestimiento hidrófilo no extraíble. La referencia 19 divulga la hidrofiliación de membrana de PES por una reacción de injerto en la que una membrana de PES se somete a un tratamiento de plasma de helio a baja temperatura seguido por el injerto del monómero hidrófilo N-vinil-2-pirrolidona (NVP) en la superficie de la 30 membrana. Tales procesos adicionales se divulgan en las referencias 20 a 26.

En los procedimientos que no dependen del revestimiento, el PSE puede ser disuelto en un disolvente mezclado con un aditivo hidrófilo soluble, y después la solución mezclada se utiliza para moldear una membrana hidrófila por ejemplo, por precipitación o iniciando la co-polimerización. Dichos procedimientos se divulgan en las referencias 35 27 a 33. Por ejemplo, la referencia 33 divulga un procedimiento de preparación de una membrana hidrófila de carga modificada que tiene pocos extraíbles de membrana y permite la recuperación rápida de la resistividad de agua ultrapura, que tiene una estructura de red polimérica inter-penetrante reticular formada haciendo una solución de polímero de una mezcla de PES, PVP, polietilenimina, y diglicidil éter alifático, formando una película fina de solución, y precipitando la película como una membrana. Un proceso similar se divulga en la referencia 34.

Los enfoques híbridos se pueden utilizar, en los que los aditivos hidrófilos están presentes durante la formación de la 40 membrana y se añaden también más tarde como un revestimiento, por ejemplo, véase la referencia 35.

La hidrofiliación de la membrana de PES se puede lograr también por tratamiento con plasmas a baja temperatura. La referencia 36 describe la modificación hidrófila de la membrana PES por el tratamiento con CO₂-plasma a baja temperatura.

50 La hidrofiliación de la membrana de PES se puede lograr también por oxidación, como se describe en la referencia 37. Este procedimiento implica la humectación previa de una membrana hidrófoba de PSE en un líquido que tiene una baja tensión superficial, la exposición de la membrana de PES húmeda a una solución acuosa de oxidante y, a después a calentamiento.

La inversión de fases se puede utilizar también, tal como se describe en la referencia 38.

55 Una membrana de PES hidrófila ideal se puede conseguir por tratamiento de PES (hidrófobo) con PVP (hidrófilo). El tratamiento con PEG (hidrófilo) en lugar de PVP se ha encontrado que proporciona una membrana de PES hidrofílica que se contamina fácilmente (especialmente cuando se utiliza una emulsión de escualeno) y que también libera desventajosamente formaldehído, durante el tratamiento en autoclave.

Un filtro preferido de doble capa tiene una primera membrana de PES hidrófila y una segunda membrana de PES

hidrófila.

Las membranas hidrófilas conocidas incluyen membranas de Bioassure (de Cuno); polietersulfona EverLUX™; polietersulfona Stylux™ (ambas de Meissner); Millex GV, Millex HP, Millipak 60, 200 y Millipak Durapore CVGL01TP3 (de Millipore); membrana Fluorodyne™ EX FED, Supor™ EAV; Supor™ EBV, Supor™ EKV (todas de Pall); Sartopore™ (Sartorius); membrana de PES hidrófila de Sterlitech y membrana de PES WFPES de Wolftechnik.

Durante la filtración, la emulsión puede mantenerse a una temperatura de 40 °C o menos, por ejemplo 30 °C o menos, para facilitar el éxito de la filtración estéril. Algunas emulsiones no pueden pasar a través de un filtro estéril cuando están a una temperatura superior a 40 °C.

Es ventajoso llevar a cabo la etapa de filtración dentro de 24 horas, por ejemplo dentro de 18 horas, dentro de 12 horas, dentro de 6 horas, dentro de 2 horas, dentro de 30 minutos, para producir la segunda emulsión porque después de este tiempo puede que no sea posible hacer pasar la emulsión a través del segundo filtro estéril sin la obstrucción del filtro, como se describe en la referencia 39.

Los procedimientos de la invención se pueden utilizar a gran escala. Por lo tanto, un procedimiento puede implicar el filtrado de un volumen superior a 1 litro por ejemplo ≥ 5 litros, ≥ 10 litros, ≥ 20 litros, ≥ 50 litros, ≥ 100 litros, ≥ 250 litros, etc.

La emulsión final

El resultado de la microfluidización y de la filtración es una emulsión de aceite en agua en la que el tamaño medio de gotas de aceite puede ser menor que 220 nm, por ejemplo 155 ± 20 nm, 155 ± 10 nm o 155 ± 5 nm, y en la que el número de gotas de aceite que tienen un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ puede ser de 5×10^6 /ml o menos, por ejemplo 5×10^7 /ml o menos, 5×10^6 /ml o menos, 2×10^6 /ml o menos o 5×10^5 /ml o menos.

El tamaño medio de gotas de aceite de las emulsiones descritas en el presente documento (incluyendo la primera y segunda emulsiones) es por lo general no menos de 50 nm.

Los procedimientos de la invención se pueden utilizar a gran escala. Por lo tanto, un procedimiento puede implicar la preparación de una emulsión final con un volumen superior a 1 litro por ejemplo ≥ 5 litros, ≥ 10 litros, ≥ 20 litros, ≥ 50 litros, ≥ 100 litros, ≥ 250 litros, etc.

Una vez que la emulsión de aceite en agua se ha formado, puede ser transferida en botellas de vidrio estériles. Las botellas de vidrio pueden tener 5 l, 8 l, o 10 l de tamaño. Como alternativa, el aceite en agua puede ser transferido a una bolsa estéril flexible (bolsa flexible). La bolsa flexible puede tener 50 l, 100 l o 250 l de tamaño. Además, la bolsa flexible puede estar equipada con uno o más conectores estériles para conectar la bolsa flexible al sistema. El uso de una bolsa flexible con conectores estériles es ventajoso en comparación con las botellas de vidrio ya que la bolsa flexible es más grande que las botellas de vidrio, lo que significa que puede que no sea necesario cambiar la bolsa flexible para almacenar toda la emulsión fabricada en un solo lote. Esto puede proporcionar un sistema estéril cerrado para la fabricación de la emulsión que puede reducir la posibilidad de impurezas que están presentes en la emulsión final. Esto puede ser particularmente importante si la emulsión final se utiliza para fines farmacéuticos, por ejemplo, si la emulsión final es el adyuvante MF59.

Las cantidades preferidas de aceite (% en volumen) en la emulsión final son entre 2-20%, por ejemplo aproximadamente 10%. Un contenido en escualeno de aproximadamente 5% o aproximadamente 10% es particularmente útil. Un contenido de escualeno (p/v) entre 30-50 mg/ml es útil, por ejemplo, entre 35-45 mg/ml, 36-42 mg/ml, 38-40 mg/ml, etc.

Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) en la emulsión final son: ésteres de polioxietileno sorbitán (tales como Tween 80) 0,02 a 2%, en particular aproximadamente 0,5% o aproximadamente 1%, ésteres de sorbitán (tales como Span 85) 0,02 a 2%, en particular aproximadamente 0,5% o aproximadamente 1%; polioxietanoles octil- o nonilfenoxi (tales como Triton X-100) 0,001 a 0,1%, en particular 0,005 a 0,02%; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) 0,1 a 20%, preferiblemente de 0,1 a 10% y en particular de 0,1 a 1% o aproximadamente 0,5%. Un contenido de polisorbato 80 (p/v) de entre 4-6mg/ml es útil, por ejemplo, entre 4,1-5,3 mg/ml. Un contenido de trioleato de sorbitán (p/v) de entre 4-6 mg/ml es útil, por ejemplo, entre 4,1-5,3 mg/ml.

El proceso es particularmente útil para preparar cualquiera de las siguientes emulsiones de aceite en agua:

- Una emulsión que comprende escualeno, polisorbato 80 (Tween 80), y trioleato de sorbitán (Span 85). La composición de la emulsión por volumen puede ser de aproximadamente 5% de escualeno, aproximadamente 0,5% de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5% de trioleato de sorbitán. En términos de peso, estas cantidades se convierten en 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% trioleato de sorbitán. Este adyuvante se conoce como 'MF59'. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones de citrato por ejemplo, 10 mM de tampón de citrato de sodio.
- Emulsiones que contienen escualeno, un α -tocoferol (idealmente DL- α -tocoferol), y polisorbato 80. Estas

- emulsiones pueden tener (en peso) de 2-10% de escualeno, 2-10% α -tocoferol y de 0,3 a 3% de polisorbato 80, por ejemplo, 4,3% de escualeno, 4,7% α -tocoferol, 1,9% de polisorbato 80. La relación en peso de escualeno: tocoferol es preferiblemente ≤ 1 (por ejemplo, 0,90) ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y polisorbato 80 pueden estar presentes en una relación en volumen de aproximadamente 5:2, o en una relación en peso de aproximadamente 11:5. Una emulsión de este tipo se puede hacer por disolución de polisorbato 80 en PBS para proporcionar una solución al 2%, mezclando después 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), a continuación, microfluidizar la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas de aceite submicrónicas, por ejemplo, con un tamaño entre 100 y 250 nm, preferiblemente de aproximadamente 180 nm.
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión puede incluir también un monofosforil lípido A 3-O-desacilado. ('3d-MPL ') La emulsión puede contener un tampón de fosfato.
 - Una emulsión que comprende escualeno, un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g/ml de polisorbato 80, 110 μ g/ml de Triton X-100 y 100 μ g/ml de succinato de α -tocoferol) y estas concentraciones deberán incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión puede incluir también un 3d-MPL. La emulsión puede incluir también una saponina, tal como QS21. La fase acuosa puede contener un tampón de fosfato.
 - Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de polioxietileno alquil éter (por ejemplo polioxietileno (12) cetosteáril éter) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitán o éster de manida, tal como monooleato de sorbitán o 'Span 80'). La emulsión es preferiblemente termorreversible y/o tiene al menos 90% de las gotas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [40]. La emulsión puede incluir también uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecylalitoside y/o sacarosa), y/o un alquilpoliglicósido. Puede incluir también un agonista de TLR4, tal como uno cuya estructura química no incluye un anillo de azúcar [41]. Tales emulsiones se pueden liofilizarse.

Las composiciones de estas emulsiones, expresadas en términos de porcentaje anteriormente, pueden ser modificadas por dilución o concentración (por ejemplo, por un número entero, tal como 2 ó 3 o por una fracción, tal como 2/3 ó 3/4), en la que sus coeficientes no cambian. Por ejemplo, un MF59 concentrada de 2 pliegues tendría aproximadamente el 10% de escualeno, aproximadamente 1% de polisorbato 80 y aproximadamente el 1% de trioleato de sorbitán. Las formas concentradas se pueden diluir (por ejemplo, con una solución de antígeno) para proporcionar una concentración final deseada de la emulsión.

Las emulsiones de la invención son idealmente almacenadas entre 2 °C y 8 °C. No deben congelarse. Deben mantenerse idealmente fuera de la luz directa. En particular, las emulsiones que contienen escualeno y vacunas de la invención deben ser protegidas para evitar la descomposición fotoquímica del escualeno. Si las emulsiones de la invención se almacenan, entonces se encuentran preferiblemente en una atmósfera inerte, por ejemplo, N₂ o argón.

Vacunas

Aunque es posible administrar adyuvantes en emulsión de aceite en agua por sí a los pacientes (por ejemplo, para proporcionar un efecto adyuvante para un antígeno que se ha administrado por separado al paciente), es más habitual mezclar el adyuvante con un antígeno antes de la administración, para formar una composición inmunogénica, por ejemplo, una vacuna. La mezcla de emulsión y antígeno puede tener lugar extemporáneamente, en el momento de su uso, o puede tener lugar durante la fabricación de la vacuna, antes del llenado. Los procedimientos de la invención se pueden aplicar en ambas situaciones.

Por lo tanto, un procedimiento de la invención puede incluir una etapa de proceso adicional de mezclar la emulsión con un componente antigénico. Como alternativa, puede incluir una etapa adicional de empaquetar el adyuvante en un kit como un componente de kit junto con un componente antigénico.

En general, por lo tanto, la invención se puede utilizar en la preparación de vacunas mixtas o cuando se preparan kits que incluyen antígeno y adyuvante listos para mezclar. Cuando la mezcla tiene lugar durante la fabricación entonces los volúmenes de antígeno y emulsión a granel que se mezclan será típicamente mayor que 1 litro por ejemplo ≥ 5 litros, ≥ 10 litros, ≥ 20 litros, ≥ 50 litros, ≥ 100 litros, ≥ 250 litros, etc. Cuando la mezcla tiene lugar en el punto de uso entonces los volúmenes que se mezclan serán, por lo general, menores que 1 mililitro por ejemplo $\leq 0,6$ ml, $\leq 0,5$ ml, $\leq 0,4$ ml, $\leq 0,3$ ml, $\leq 0,2$ ml, etc. En ambos casos es habitual que los volúmenes sustancialmente iguales de la solución de emulsión y antígeno se mezclen, es decir, sustancialmente 1:1 (por ejemplo, entre 1,1:1 y 1:1,1, preferiblemente entre 1,05:1 y 1:1,05, y más preferiblemente entre 1,025:1 y 1:1,025). En algunas realizaciones, sin embargo, un exceso de emulsión o un exceso de antígeno se puede utilizar [42]. Cuando se utiliza un volumen en exceso de un componente, el exceso será generalmente de al menos 1,5:1, por ejemplo, $\geq 2:1$, $\geq 2,5:1$, $\geq 3:1$, $\geq 4:1$, $\geq 5:1$, etc.

- 5 Cuando el antígeno y el adyuvante se presentan como componentes separados dentro de un kit, están físicamente separados entre sí dentro del kit y esta separación se puede lograr de varias maneras. Por ejemplo, los componentes pueden estar en recipientes separados, tales como viales. Los contenidos de dos viales pueden mezclarse cuando sea necesario, por ejemplo, mediante la retirada de los contenidos de un vial y la adición de ellos al otro vial, o retirando por separado los contenidos de ambos viales y mezclándolos en un tercer recipiente.
- 10 En otra disposición, uno de los componentes del kit está en una jeringa y el otro está en un recipiente tal como un vial. La jeringa se puede utilizar (por ejemplo, con una aguja) para insertar su contenido en el vial para su mezcla, y la mezcla se puede retirar con la jeringa. Los contenidos mezclados en la jeringuilla se pueden administrar a un paciente, normalmente a través de una nueva aguja estéril. El envasado de un componente en una jeringa elimina la necesidad de usar una jeringa separada para su administración al paciente.
- 15 En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se mantienen juntos pero separados en la misma jeringa, por ejemplo, en una jeringa de doble cámara, tales como las descritas en las referencias 43-50 etc. Cuando la jeringa se acciona (por ejemplo, durante la administración a un paciente), entonces el contenido de las dos cámaras se mezclan. Esta disposición evita la necesidad de una etapa separada de mezcla en el momento de uso.
- 20 Los contenidos de los diversos componentes del kit estarán todos por lo general en forma líquida. En algunas disposiciones, un componente (normalmente el componente antígeno en lugar del componente de emulsión) está en forma seca (por ejemplo, en una forma liofilizada), estando el otro componente en forma líquida. Los dos componentes pueden ser mezclados con el fin de reactivar el componente seco y proporcionar una composición líquida para su administración a un paciente. Un componente liofilizado se encuentra típicamente dentro de un vial en lugar de una jeringa. Los componentes secos pueden incluir estabilizantes tales como lactosa, sacarosa o manitol, así como mezclas de combinaciones de lactosa/sacarosa de los mismos por ejemplo, mezclas de sacarosa/manitol, etc. Una posible disposición utiliza una emulsión de componente líquido en una jeringa precargada y un componente antígeno liofilizado en un vial.
- 25 Si las vacunas contienen componentes además de la emulsión y antígeno y entonces estos componentes adicionales pueden ser incluidos en un solo estos dos componentes del kit, o puede ser parte de un del tercer componente de kit.
- Los recipientes adecuados para vacunas mixtas de la invención, o para los componentes del kit individuales, incluyen viales y jeringuillas desechables. Estos recipientes deben ser estériles.
- 30 Cuando una composición/componente se encuentra en un vial, el vial se hace preferiblemente de un cristal o de material plástico. El vial se esteriliza preferiblemente antes de que la composición se añada dentro del mismo. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales se sellan preferiblemente con un tapón sin látex, y se prefiere la ausencia de látex en todo material de envasado. En una realización, un vial tiene un tapón de goma de butilo. El vial puede incluir una dosis única de vacuna/componente, o puede incluir más de una dosis (un vial "multidosis"), por ejemplo 10 dosis. En una realización, un vial incluye 10 x 0,25 ml de dosis de emulsión. Los viales preferidos están fabricados de vidrio incoloro.
- 35 Un vial puede tener una tapa (por ejemplo, un cierre tipo Luer) adaptada de tal manera que una jeringa precargada puede insertarse en la tapa, el contenido de la jeringa puede ser expulsado en el vial (por ejemplo, para reconstituir el material liofilizado en el mismo), y el contenido del vial puede ser retirado de nuevo en la jeringa. Después de la retirada de la jeringa del vial, una aguja puede entonces conectarse y la composición puede ser administrada a un paciente. El tapón está situado preferiblemente en el interior de un sello o cubierta, de tal manera que el sello o cubierta tiene retirarse antes de que se pueda acceder al tapón.
- 40 Cuando una composición/componente se envasa en una jeringa, la jeringa no tendrá normalmente una aguja unida a ella, aunque una aguja separada se puede suministrar con la jeringa para el montaje y su uso. Aguja de seguridad son las preferidas. Las agujas de 2,54 centímetros de calibre 23, 2,54 centímetros de calibre 25 y 12,70/20,32 centímetros de calibre 25 son las típicas. Las jeringas pueden estar provistas de etiquetas despegables en las que puede estar el número de lote, la estación de gripe y la fecha de caducidad de los contenidos impresos, para facilitar llevar un registro. El émbolo de la jeringa tiene preferiblemente un tapón para evitar que el émbolo sea retirado accidentalmente durante la aspiración. Las jeringas pueden tener una capa y/p émbolo de goma de látex. Las jeringuillas desechables contienen una dosis única de vacuna. La jeringa tendrá generalmente un tapón en la punta para sellar la punta antes de la fijación de una aguja, y el capuchón de la punta está fabricado preferiblemente de un goma de butilo. Si la jeringa y la aguja se envasan por separado entonces la aguja está preferiblemente equipada con un escudo de goma de butilo.
- 50 La emulsión se puede diluir con un tampón antes de su envasado en un vial o en una jeringa. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato, un tampón de Tris, un tampón de borato, un tampón de succinato; un tampón de histidina, o un tampón de citrato. La dilución puede reducir la concentración de componentes del adyuvante mientras que conserva sus proporciones relativas, por ejemplo, para proporcionar un adyuvante de "fuerza-media".
- 55 Los recipientes pueden ser marcados para mostrar un volumen de media dosis, por ejemplo, para facilitar su administración en niños. Por ejemplo, una jeringa que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que

muestra un volumen de 0,25 ml.

Cuando un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringuilla o un vial) se utiliza, entonces, se prefiere utilizar un recipiente fabricado de un vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de cal sodada.

Varios antígenos se pueden utilizar con emulsiones de aceite en agua, incluyendo pero sin limitarse a: antígenos virales, tales como proteínas de la superficie viral; antígenos bacterianos, tales como proteínas y/o antígenos sacáridos; antígenos fúngicos; antígenos de parásitos; y antígenos tumorales. La invención es particularmente útil para vacunas contra el virus de la influenza, el VIH, la anquilostomiasis, virus de la hepatitis B, virus del herpes simple, la rabia, el virus respiratorio sincitial, el citomegalovirus, *Staphylococcus aureus*, clamidia, coronavirus SARS, virus de varicela zoster, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *anthracis Bacillus*, virus de Epstein Barr, virus del papiloma humano, etc. Por ejemplo:

- Antígenos del virus de la influenza. Estos pueden tomar la forma de un virus vivo o de un virus inactivado. Cuando un virus inactivado se utiliza, la vacuna puede comprender virión entero, virión dividido o antígenos de superficie purificados (incluida la hemaglutinina y, normalmente, también incluida la neuraminidasa). Los antígenos de la gripe también pueden presentarse en forma de virosomas. Los antígenos pueden tener cualquier subtipo de hemaglutinina, seleccionado entre H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, 10 H, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16. La vacuna puede incluir antígeno o antígenos de uno o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus influenza, incluyendo el virus de influenza A y/o virus de influenza B, por ejemplo, una vacuna A/HSN1 o A/H1N1 monovalente, o una vacuna A/H1N1 + A/H3N2 + B trivalente. El virus de la influenza puede ser una cepa recombinante, y puede haberse obtenido por técnicas de genética inversa [por ejemplo, 51 a 55]. Por lo tanto, el virus puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/PR/8/34 (normalmente 6 segmentos de A/PR/8/34, siendo los segmentos de HA y N una cepa de vacuna, es decir, un recombinante 6:02). Los virus utilizados como fuente de los antígenos pueden cultivarse bien en huevos (por ejemplo, huevos de gallina embrionados) o en cultivo celular. Cuando se utiliza el cultivo celular, el sustrato celular será típicamente una línea celular de mamífero, tales como MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38, etc. Las líneas celulares de mamífero preferidas para el cultivo del virus de la influenza incluyen: células MDCK [56-59], derivadas de un riñón canino Madin Darby, las células Vero [60-62], derivada de riñón de mono verde africano, o células PER.C6 [63], que se deriven de retinoblastos embrionarios humanos. Cuando el virus se ha cultivado en una línea celular de mamífero, entonces la composición ventajosamente estará libre de proteínas de huevo (por ejemplo, ovoalbúmina y ovomucoide) y del ADN de pollo, lo que reduce la alergenicidad. Las dosis unitarias de vacuna son típicamente normalizadas con referencia al contenido de hemaglutinina (HA), medido normalmente mediante SRID. Las vacunas existentes contienen típicamente aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque se pueden utilizar dosis más bajas, particularmente cuando se utiliza un adyuvante. Las dosis fraccionales tales como ½ (es decir 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y ⅙ se han utilizado [64,65], al igual que dosis más altas (por ejemplo, 3x o 9x dosis [66,67]). Por lo tanto, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de influenza, preferiblemente entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo, 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7 µg, 0,5-5 µg, etc. Las dosis particulares incluyen, por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,75, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc. por cepa.

- Virus de la inmunodeficiencia humana, incluidos el VIH-1 y VIH-2. El antígeno típicamente será un antígeno de cubierta.

- Antígenos de superficie del virus de la Hepatitis B. Este antígeno se obtiene preferiblemente mediante procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, después de la expresión en una levadura *Saccharomyces cerevisiae*. A diferencia del HBsAg viral nativo, el antígeno recombinante expresado en levadura es no glicosilada. Puede estar en forma de partículas sustancialmente esféricas (diámetro promedio de aproximadamente 20 nm), incluyendo una matriz lipídica que comprende fosfolípidos. A diferencia de las partículas HBsAg nativas, las partículas expresadas en levadura pueden incluir fosfatidilinositol. La HBsAg puede ser de cualquiera de los subtipos ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- y adrq+.

- Anquilostoma, particularmente como se ve en caninos (*Ancylostoma caninum*). Este antígeno puede ser Ac-MTP-1 recombinante (metaloproteasa similar a astacina) y/o una hemoglobinasas aspártico (Ac-APR-1), que puede expresarse en un baculovirus/sistema de células de insecto como una proteína secretada [68,69].

- Antígenos del virus del Herpes Simplex (VHS). Un antígeno del VHS preferido para su uso con la invención es la glicoproteína de membrana gD. Se prefiere el uso de gD de una cepa de VHS-2 (antígeno 'gD2'). La composición puede utilizar una forma de gD en la que la región de anclaje de la membrana C-terminal ha sido eliminada [70], por ejemplo, una gD truncada que comprende los aminoácidos 1-306 de la proteína natural con la adición de aparagine y glutamina en el extremo C-terminal. Esta forma de la proteína incluye el péptido de señal que se escinde para producir una proteína aminoácida 283 madura. La delección del anclaje permite que la proteína se prepare en forma soluble.

- Antígenos de virus del papiloma humano (VPH). Los antígenos de VPH preferidos para su uso con la invención son proteínas de la cápsida L1, que se pueden ensamblar para formar estructuras conocidas como partículas similares a virus (VLP). Las VLP pueden producirse mediante expresión recombinante de L1 en células de levadura (por ejemplo, en *S. cerevisiae*) o en células de insecto (por ejemplo, en *Spodoptera cells*, tales como *S. frugiperda*, o *Drosophila cells*). Para las células de levadura, los vectores plasmídicos pueden

portar el gen o genes L1; para las células de insectos, los vectores de baculovirus pueden portar el gen o genes L1. Más preferiblemente, la composición incluye las VLP L1 de ambas cepas VPH-16 y VPH-18. Esta combinación bivalente se ha demostrado que es altamente efectiva [71]. Además de las cepas VPH-16 y VPH-18, también es posible incluir VLP L1 de las cepas VPH-6 y VPH-11. El uso de cepas de VPH oncogénicas también es posible. Una vacuna puede incluir entre 20-60 µg/ml (por ejemplo, aproximadamente 40 µg/ml) de L1 por cepa de VPH.

- Antígenos de ántrax. El ántrax es causado por *Bacillus Anthracis*. Los antígenos adecuados del *Bacillus Anthracis* incluyen componentes-A (factor letal (LF) y factor de edema (EF)), los cuales pueden compartir un componente-B común conocido como antígeno protector (PA). Los antígenos pueden opcionalmente ser desintoxicados. Más detalles se pueden encontrar en las referencias [72 a 74].

- Antígenos *S. aureus*. Una variedad de antígenos *S.aureus* son conocidos. Los antígenos adecuados incluyen sacáridos capsulares (por ejemplo, de una cepa tipo 5 y/o de tipo 8) y proteínas (por ejemplo, ISDB, Hla, etc.). Los antígenos sacáridos capsulares están idealmente conjugados en una proteína portadora.

- Antígenos *S.pneumoniae*. Una variedad de antígenos *S.pneumoniae* son conocidos. Los antígenos adecuados incluyen sacáridos capsulares (por ejemplo, a partir de uno o más de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y/o 23F) y proteínas (por ejemplo, neumolisina, neumolisina destoxificada, proteína tríada de polihistidina D (PhtD), etc.). Los antígenos capsulares están idealmente conjugados en una proteína portadora.

- Antígenos del cáncer. Una variedad de antígenos específicos de tumores son conocidos. La invención se puede utilizar con antígenos que provocan una respuesta inmunoterapéutica contra el cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, etc.

Una solución del antígeno se mezclará normalmente con la emulsión, por ejemplo, en una relación en volumen de 1:1. Esta mezcla puede ser realizada por un fabricante de la vacuna, antes de su llenado, o puede realizarse en el punto de uso, por un profesional sanitario.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones realizadas usando los procedimientos de la invención son farmacéuticamente aceptables. Se pueden incluir componentes además de la emulsión y el antígeno opcional.

La composición puede incluir un conservante, tal como, tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que la vacuna debe estar sustancialmente libre de (es decir, menos de 5 µg/ml) material de mercurio, por ejemplo, libre de tiomersal [75,76]. Las vacunas y componentes que contienen mercurio no son los más preferidos.

El pH de una composición estará generalmente entre 5,0 y 8,1, y más típicamente entre 6,0 y 8,0 por ejemplo, entre 6,5 y 7,5. Un proceso de la invención puede, por tanto, incluir una etapa de ajustar el pH de la vacuna antes de su envasado.

La composición es preferiblemente estéril. La composición es preferiblemente no pirogénica, por ejemplo, que contiene <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y, preferiblemente, < 0,1 UE por dosis. La composición es preferiblemente libre de gluten.

La composición puede incluir material para una única inmunización o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit "multidosis"). La inclusión de un conservante se prefiere en las disposiciones multidosis.

Las vacunas se administran típicamente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml, aunque media dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml) se puede administrar a niños.

Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna

La invención proporciona kits y composiciones preparadas utilizando los procedimientos de la invención. Las composiciones preparadas de acuerdo con los procedimientos de la invención son adecuadas para la administración a pacientes humanos, y la invención proporciona un procedimiento de elevar una respuesta inmune en un paciente, que comprende la etapa de administrar tal composición al paciente.

La invención proporciona también estos kits y composiciones para su uso como medicamentos.

La invención proporciona también el uso de: (i) una preparación acuosa de un antígeno, y (ii) una emulsión de aceite en agua preparada de acuerdo con la invención, en la fabricación de un medicamento para elevar una respuesta inmune en un paciente.

La respuesta inmune planteada por estos procedimientos y usos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpos, preferiblemente una respuesta de anticuerpos protectores.

Las composiciones se pueden administrar de diversas maneras. La vía de inmunización más preferida es mediante inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o pierna), pero otras vías disponibles incluyen inyección subcutánea, intranasal [77-79], oral [80], intradérmica [81, 82], transcutánea transdérmica, [83], etc.

Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como adultos. El paciente puede ser menor a 1 año de edad, de 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. El paciente puede ser mayor (por ejemplo, ≥ 50 años de edad, preferiblemente ≥ 65 años), los jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, servicios armados y personal militar, las mujeres embarazadas, enfermos crónicos, pacientes inmunodeprimidos, y personas que viajan al extranjero. Sin embargo, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos, y se pueden utilizar de forma más general en una población.

Las vacunas de la invención se pueden administrar a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario) que otras vacunas.

10 **Procesos intermedios**

La invención proporciona también un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que comprende microfluidización de una primera emulsión para formar una segunda emulsión y después la filtración de la segunda emulsión. La primera emulsión tiene las características descritas anteriormente.

15 La invención proporciona también un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que comprende la filtración de una segunda emulsión, es decir, una emulsión microfluidificada. La emulsión que se microfluidiza tiene las características descritas anteriormente.

La invención proporciona también un procedimiento para la fabricación de una vacuna, que comprende combinar una emulsión con un antígeno, en el que la emulsión tiene las características descritas anteriormente.

Realizaciones específicas

20 Las realizaciones específicas de la presente invención incluyen:

- Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, que comprende las etapas de (i) la formación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite; (ii) la microfluidización de la primera emulsión para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite, y (iii) la filtración de la segunda emulsión utilizando una membrana hidrófila.
- 25 • Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que comprende las etapas de (i) la formación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite de 5000 nm o menos, (ii) la microfluidización de la primera emulsión para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite, y (iii) la filtración de la segunda emulsión utilizando una membrana hidrófila.
- 30 • Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que comprende las etapas de (i) la formación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite, (ii) la microfluidización de la primera emulsión para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite, y (iii) la filtración de la segunda emulsión utilizando una membrana hidrófila de polietersulfona.
- 35 • Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, comprendiendo el método la etapa (i) la formación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite usando un homogeneizador, en el que la primera emulsión se forma mediante la circulación los componentes de la primera emulsión a través de un homogeneizador una pluralidad de veces.
- 40 • Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, comprendiendo el método la etapa de (b) la microfluidización de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite, en el que la segunda emulsión se forma mediante la circulación de los componentes de la segunda emulsión transfiriendo los componentes de la segunda emulsión desde un primer recipiente de emulsión, a través de un primer dispositivo de microfluidización hasta un segundo recipiente de emulsión, y luego a través de un segundo dispositivo de microfluidización, en el que el primer y segundo dispositivos de microfluidización son los mismo.
- 45 • Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende: hacer pasar una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gota de aceite; en el que el dispositivo de microfluidización comprende una cámara de interacción que comprende una pluralidad de canales de tipo Z y un módulo de procesamiento auxiliar que comprende al menos un canal; en el que el módulo de procesamiento auxiliar está situado corriente abajo de la cámara de interacción.
- 50 • Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende la etapa de hacer pasar una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite; en el que el dispositivo de microfluidización comprende una cámara de interacción y un módulo de procesamiento auxiliar que comprende una pluralidad de
- 55 • Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende la etapa de hacer pasar una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite; en el que el dispositivo de microfluidización comprende una cámara de interacción y un módulo de procesamiento auxiliar que comprende una pluralidad de

canales.

- 5 • Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende la etapa de hacer pasar una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite, en el que el dispositivo de microfluidización comprende una cámara de interacción y en el que la presión de los componentes de la emulsión a la entrada de la cámara de interacción es sustancialmente constante durante al menos 85% del tiempo durante el cual se alimenta la emulsión en el microfluidizador.
- 10 • Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que comprende la etapa de la formación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite, en el que la formación de la primera emulsión se lleva a cabo bajo un gas inerte, por ejemplo nitrógeno, por ejemplo, a una presión de hasta 0,5 bar.
- 15 • Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que comprende la etapa de hacer pasar una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite, el que la formación de la segunda emulsión se lleva a cabo bajo un gas inerte, por ejemplo nitrógeno a una presión de, por ejemplo, hasta 0,5 bar.
- 20 • Un procedimiento para la fabricación de una emulsión de aceite en agua, que comprende las etapas de (i) la formación de una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite; (ii) la microfluidización de la primera emulsión para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite, (iii) la filtración de la segunda emulsión; (iv) la transferencia de la emulsión de aceite en agua en una bolsa flexible estéril.

General

25 La expresión "que comprende" abarca "que incluye", así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. En su caso, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

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

30 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 lo tanto, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes entonces, dos componentes se pueden combinar entre sí, y entonces la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

35 Cuando se utilizan materiales animales (sobre todo bovino) en el cultivo de células, deben ser obtenidos de fuentes que son libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), y, en particular, libre de encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En general, se prefiere cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 muestra un ejemplo específico de un homogeneizador que puede ser utilizado para formar una primera emulsión.

La Figura 2 muestra el detalle de un rotor y un estator que se pueden utilizar en tal homogeneizador.

La Figura 3 muestra dos perfiles de presión para un modo de bomba intensificadora síncrona.

La Figura 4 muestra una cámara de interacción de canal tipo Z.

45 La Figura 5 muestra una circulación de tipo I, mientras que la Figura 6 muestra una circulación de tipo II. Los recipientes están etiquetados como "C", mientras que un homogeneizador se etiqueta como "H". La dirección y el orden de los movimientos de fluido se muestran. En la Figura 6 el homogeneizador tiene dos flechas de entrada y dos flechas de salida, pero en realidad el homogeneizador tiene un único canal de entrada y un único canal de salida.

Modos de llevar a cabo la invención

50 Una primera emulsión que comprende escualeno, polisorbato 80, trioleato de sorbitán y tampón de citrato de sodio se preparó por homogeneización. La primera emulsión se homogeneizó hasta que tuvo un tamaño medio de gotas de aceite de 1200 nm o menos y un número de gotas de aceite que tenían un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ de 5×10^9 /ml o menos.

La primera emulsión se sometió después a microfluidización para formar una segunda emulsión. El dispositivo de microfluidización comprendía dos bombas intensificadoras síncronas que proporcionaron una presión sustancialmente constante de aproximadamente 700 bar (es decir, aproximadamente 10000 psi). La emulsión se hizo pasar a través del dispositivo de microfluidización cinco veces. La emulsión se mantuvo a una temperatura de 40 ± 5 °C durante la microfluidización mediante el uso de un mecanismo de refrigeración.

Cuatro ejecuciones de prueba se llevaron a cabo. En el primer par de ejecuciones de prueba se posicionó un módulo de procesamiento auxiliar de un solo canal (APM) situado corriente arriba de un canal 8, la cámara de interacción de tipo Z (IXC), de acuerdo con lo recomendado por el fabricante, y el caudal de la emulsión en el dispositivo microfluidizador era 10,2 L/min. En el segundo par de ejecuciones de prueba, un APM multi-canal se situó corriente abajo de un canal 8, IXC de tipo Z y el caudal de la emulsión en el dispositivo microfluidizador era 11,6 L/min. Ambas ejecuciones de prueba se llevaron a cabo a gran escala (250 litros). Los resultados de las cuatro ejecuciones de prueba están en la Tabla 1.

Como se muestra en la Tabla 1, las ejecuciones de prueba en las que el APM se situó corriente abajo de las emulsiones producidas de IXC con un tamaño medio de partícula más pequeño y menos partículas con $1,2 \mu\text{m}$. Además, el orden IXC-APM alcanzó un diámetro de partícula < 200 nm después de 1 pasada mientras este tamaño no se había alcanzado incluso después de 4 pasadas con el orden APM-IXC. Por lo tanto, el posicionamiento del APM corriente abajo de la IXC de tipo Z ha demostrado ser ventajoso para la fabricación a gran escala.

Se entenderá que la invención ha sido descrita a modo de ejemplo solamente y se pueden realizar modificaciones mientras permanezcan dentro del alcance y espíritu de la invención.

Tabla 1

Orden	APM-IXC		IXC-APM	
	1	2	3	4
Número de ejecución	1	2	3	4
Tamaño medio de gotas de aceite después de 1 pasada	249	220,9	200,8	200,3
Nº de gotas de aceite con un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ después de 2 pasadas	$180,7 \times 10^6$	$175,4 \times 10^6$	$54,3 \times 10^6$	$62,1 \times 10^6$
Tamaño medio de gotas de aceite después de 1 pasada	230	224,9	170,9	167,5
Nº de gotas de aceite con un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ después de 2 pasadas	$170,2 \times 10^6$	$139,6 \times 10^6$	$43,0 \times 10^6$	$42,8 \times 10^6$
Tamaño medio de gotas de aceite después de 3 pasadas	218	221,5	166,8	156,7
Nº de gotas de aceite con un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ después de 3 pasadas	$166,7 \times 10^6$	$164,3 \times 10^6$	$36,7 \times 10^6$	$42,5 \times 10^6$
Tamaño medio de gotas de aceite después de 4 pasadas	215	222,6	154,3	156,8
Nº de gotas de aceite con un tamaño $> 1,2 \mu\text{m}$ después de 4 pasadas	$127,6 \times 10^6$	$115,6 \times 10^6$	$35,9 \times 10^6$	$43,2 \times 10^6$

Referencias

- [1] WO90/14837.
 [2] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
 [3] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
 [4] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 [5] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 [6] New Generation Vaccines (eds. Levine et al.). 3rd edition, 2004. ISBN 0-8247-4071-8.
 [7] O'Hagan (2007) Expert Rev Vaccines 6(5):699-710.
 [8] EP-B-2029170
 [9] Baudner et al. (2009) Pharm Res. 26(6):1477-85.
 [10] Dupuis et al. (1999) Vaccine 18:434-9.
 [11] Dupuis et al. (2001) Eur J Immunol 31:2910-8. [12] Burke et al. (1994) J Infect Dis 170:1110-9.
 [13] Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions (W. Scharlt), 2007. ISBN: 978-3-540-71950-2.
 [14] Jafari et al (2008) Food Hydrocolloids 22:1191-1202
 [15] WO90/04609.
 [16] US-4,618,533
 [17] US-6,193,077
 [18] US-6,495,050
 [19] Chen et al. (1999) Journal of Applied Polymer Science, 72:1699-1711.
 [20] US-4,413,074
 [21] US-4,432,875
 [22] US-4,340,482

[23] US-4,473,474
 [24] US-4,473,475
 [25] US-4,673,504
 5 [26] EP-A-0221046.
 [27] US-4,943,374
 [28] US-6,071,406
 [29] US-4,705,753
 [30] US-5,178,765
 [31] US-6,495,043
 10 [32] US-6,039,872
 [33] US-5,277,812
 [34] US-5,531,893.
 [35] US-4,964,990
 [36] Wavhal & Fisher (2002) *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 40:2473-88.
 15 [37] W02006/044463.
 [38] Espinoza-Gómez et al. (2003) *Revista de la Sociedad Química de México* 47:53-57.
 [39] Lidgate et al (1992) *Pharmaceutical Research* 9(7):860-863.
 [40] US-2007/0014805.
 [41] W02007/080308.
 20 [42] W02007/052155.
 [43] W02005/089837.
 [44] US 6,692,468.
 [45] WO00/07647.
 [46] WO99/17820.
 25 [47] US 5,971,953.
 [48] US 4,060,082.
 [49] EP-A-0520618.
 [50] WO98/01174.
 [51] Hoffmann et al. (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.
 30 [52] Subbarao et al. (2003) *Virology* 305:192-200.
 [53] Liu et al. (2003) *Virology* 314:580-590.
 [54] Ozaki et al. (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.
 [55] Webby et al. (2004) *Lancet* 363:1099-1103.
 [56] WO97/37000.
 35 [57] Brands et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
 [58] Halperin et al. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
 [59] Tree et al. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
 [60] Kistner et al. (1998) *Vaccine* 16:960-8.
 [61] Kistner et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
 40 [62] Bruhl et al. (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
 [63] Pau et al. (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
 [64] WO01 /22992.
 [65] Hehme et al. (2004) *Virus Res.* 103(1-2):163-71.
 [66] Treanor et al. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.
 45 [67] Keitel et al. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.
 [68] Williamson et al. (2006) *Infection and Immunity* 74: 961-7.
 [69] Loukas et al. (2005) *PLoS Med* 2(10): e295.
 [70] EP-A-0139417.
 [71] Harper et al. (2004) *Lancet* 364(9447):1757-65.
 50 [72] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.
 [73] Demicheli et al. (1998) *Vaccine* 16:880-884.
 [74] Stepanov et al. (1996) *J Biotechnol* 44:155-160.
 [75] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.
 [76] WO02/097072.
 55 [77] Greenbaum et al. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
 [78] Zurbriggen et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
 [79] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC).* 43:728-30.
 [80] Mann et al. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
 [81] Halperin et al. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
 60 [82] Herbert et al. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
 [83] Chen et al. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.
 [84] US 2006/251684

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende:
 - 5 hacier pasar una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite; y la filtración de la segunda emulsión
 - en el que el dispositivo de microfluidización comprende una cámara de interacción que comprende una pluralidad de canales de tipo Z y una cámara de contrapresión que comprende al menos un canal; y
 - en el que la cámara de contrapresión está situada corriente abajo de la cámara de interacción.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera emulsión es introducida en la cámara de interacción a una primera presión y la segunda emulsión sale de la cámara de contrapresión a una segunda presión que es inferior a la primera presión, y en el que entre 80 y 95% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través de la cámara de interacción y de 5 a 20% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través de la cámara de contrapresión.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cámara de contrapresión comprende una pluralidad de canales.
4. Un procedimiento de fabricación de una emulsión de aceite en agua que comprende la etapa de hacer pasar una primera emulsión que tiene un primer tamaño medio de gotas de aceite a través de un dispositivo de microfluidización para formar una segunda emulsión que tiene un segundo tamaño medio de gotas de aceite que es menor que el primer tamaño medio de gotas de aceite; en el que el dispositivo de microfluidización comprende una cámara de interacción que comprende una pluralidad de canales y una cámara de contrapresión que comprende una pluralidad de canales.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la primera emulsión o bien:
 - 25 (i) se introduce en la cámara de interacción a una primera presión y la segunda emulsión sale de la cámara de contrapresión a una segunda presión que es inferior a la primera presión; o
 - (ii) se introduce en la cámara de contrapresión a una primera presión y la segunda emulsión sale de la cámara de interacción a una segunda presión que es inferior a la primera presión; y

en el que entre 80 y 95% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través de la cámara de interacción y de 5 a 20% de la diferencia de presión entre la primera y la segunda presiones cae a través de la cámara de contrapresión.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el canal o los canales de la cámara de contrapresión son canales de tipo Z.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa de formación de la primera emulsión utilizando un homogeneizador.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer tamaño medio de gotas de aceite es de 5000 nm o menor.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el número de gotas de aceite que tienen un tamaño > 1,2 µm en la primera emulsión es 5×10^{11} /ml o menor.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo tamaño medio de gotas de aceite es de 500 nm o menor.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el número de gotas de aceite que tienen un tamaño > 1,2 µm en la segunda emulsión es 5×10^{10} /ml o menor.
12. Un procedimiento para preparar una composición de vacuna, que comprende preparar una emulsión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y combinar la emulsión con un antígeno.
13. Un procedimiento para preparar un kit de vacuna que comprende la preparación de una emulsión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y envasar la emulsión en un kit tal como un componente del kit junto con un componente antigénico.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que los componentes del kit están en viales separados; por ejemplo, en el que los viales son de vidrio de borosilicato.
15. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la emulsión es un adyuvante a granel y el procedimiento comprende extraer dosis unitarias del adyuvante a granel para su envasado

como componentes del kit.

5 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el antígeno es un antígeno del virus de la influenza, por ejemplo, en el que la combinación de la emulsión y el antígeno forma una composición de vacuna; y en el que la composición de vacuna incluye aproximadamente 15 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 7,5 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 3,8 µg, aproximadamente 1,9 µg, aproximadamente 1,5 µg hemaglutinina por cepa del virus de la influenza.

10 17. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que: la cámara de interacción tiene una pluralidad de canales de geometría fija en los que se hace pasar la emulsión y en los que la emulsión se acelera bajo presión para reducir el tamaño de las gotas de aceite en la emulsión y reducir el número de gotas de aceite que tienen un tamaño > 1,2 µm; en el que los canales en la cámara de interacción incluyen una pluralidad de esquinas en ángulo sustancialmente recto, y en el que la cámara de contrapresión tiene al menos un canal de geometría fija en el que se hace pasar la emulsión.

Figura 1

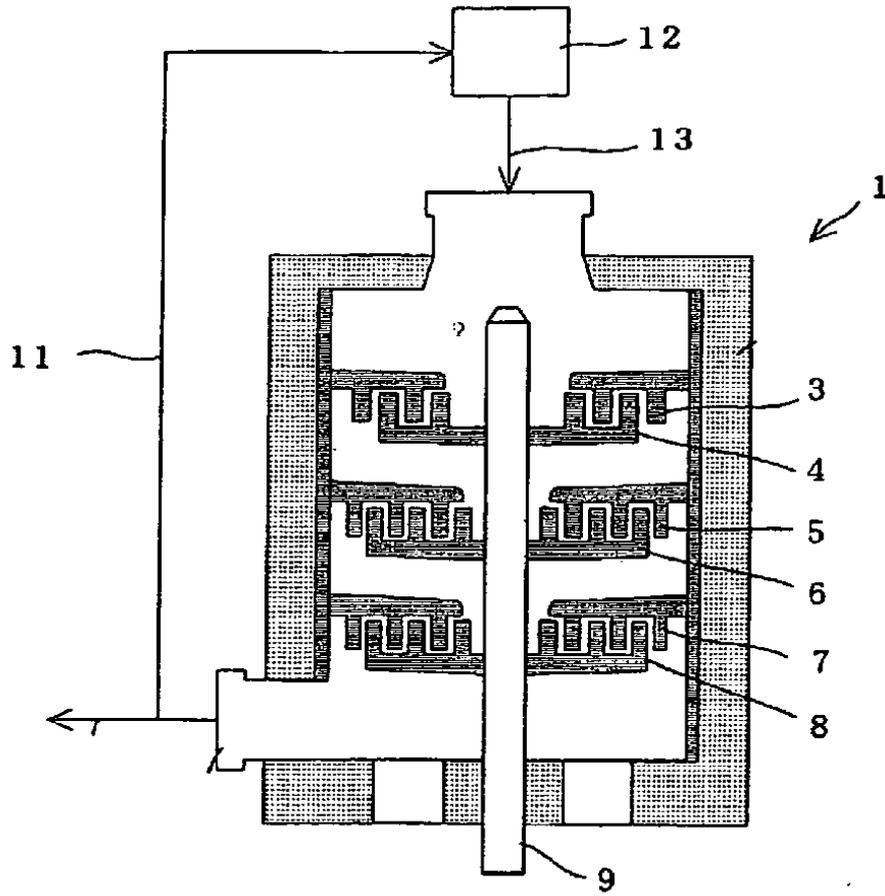


Figura 2

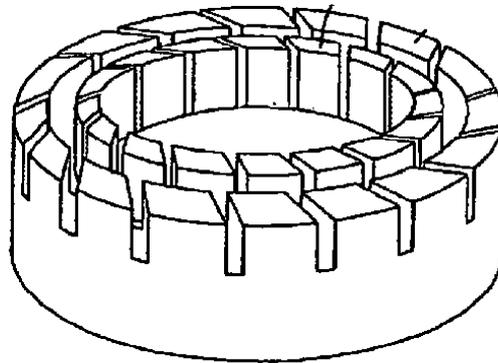


Figura 3

Figura 3A

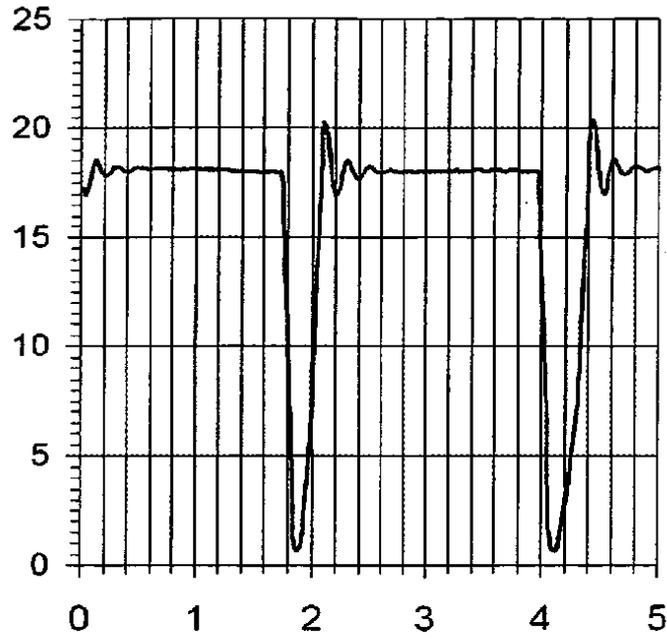


Figura 3B

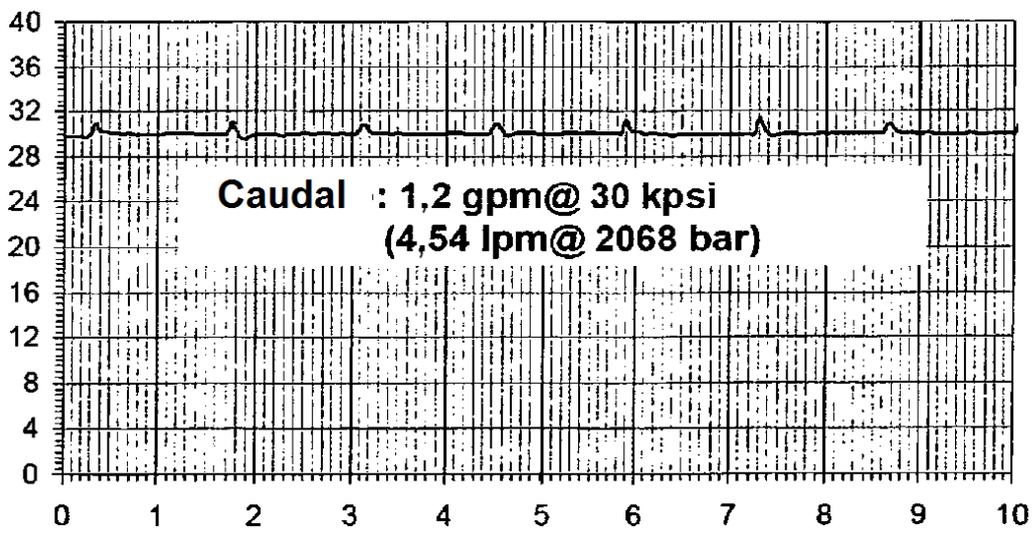


Figura 4

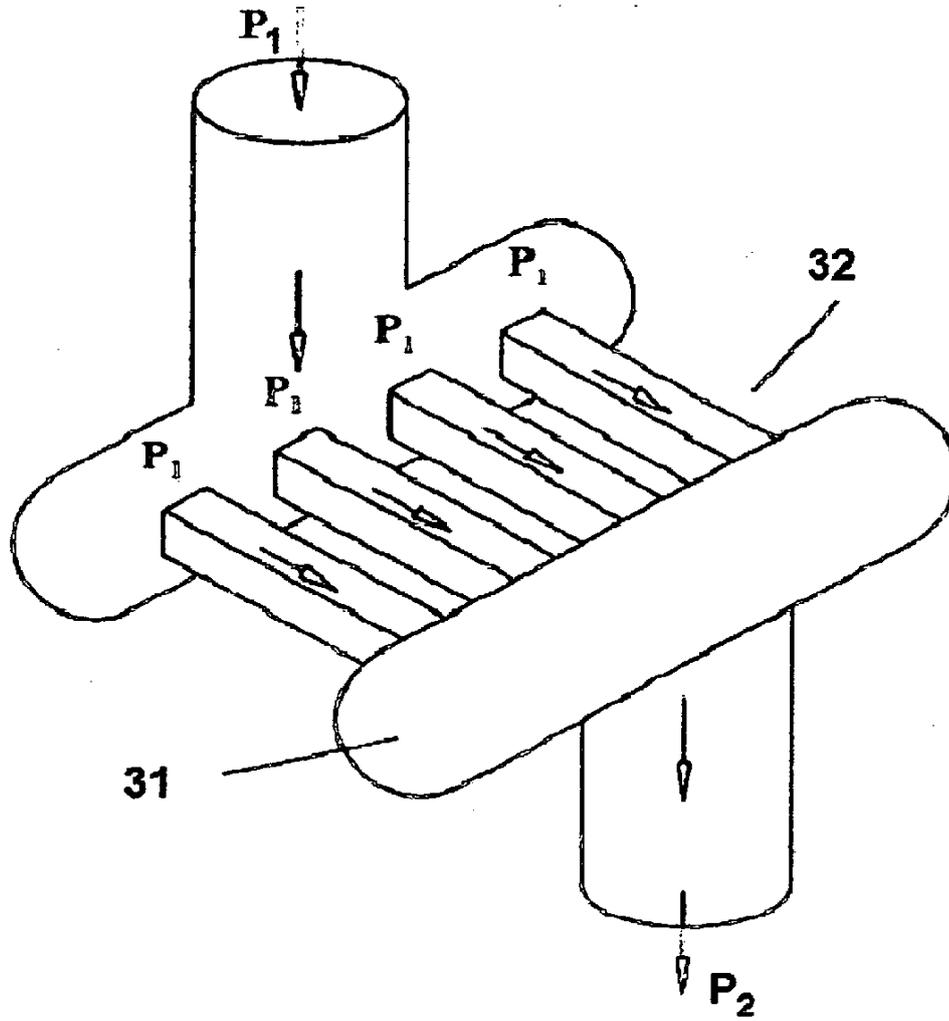


Figura 5

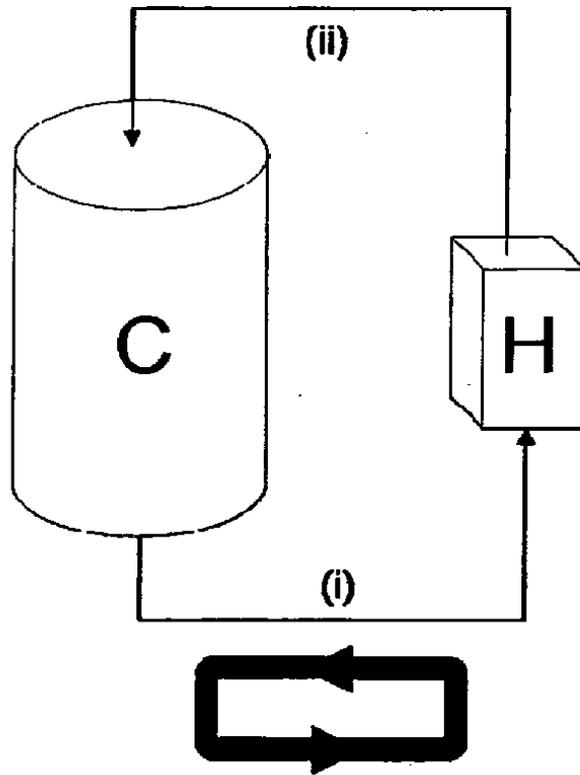


Figura 6

